



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE PROLACTINA Y DE LA
VASOINHIBINA EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA RETINOPATÍA DEL
PREMATURO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
MIGUEL ANGEL VÁZQUEZ MEMBRILLO

TUTORA:
DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM.

DR. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

QUERÉTARO, MAYO 2020



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.

JURADO DE EXAMEN

Presidente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Secretario	Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora
Vocal	Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno
Vocal	Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra
Vocal	Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla, Querétaro. Fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) S0008-FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE 289568. El alumno recibió apoyo con el número de registro de becario 289715.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El asesoramiento de Dra. Nuri Aranda López, responsable de la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología

El asesoramiento de la M. en C. Leonor Casanova Rico, responsable de la Unidad de Enseñanza del Instituto de Neurobiología

Apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera, Dra. Xarubet Ruíz Herrera de los laboratorios A-14 y A-15 del Instituto de Neurobiología

Apoyo técnico de ISC Elsa Nydia Hernández Río de la Unidad de Microscopía Confocal del Instituto de Neurobiología

La labor asistencial de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán de los laboratorios A-14 y A-15 del Instituto de Neurobiología

Al MVZ Martín García Servín y a la Dra. Alejandra Castilla León responsables del Bioterio del Instituto de Neurobiología

El apoyo técnico de la Lic. Ma. Lourdes Lara Ayala, responsable de la Unidad de Videoconferencia del Instituto de Neurobiología

El apoyo técnico del Dr. Francisco Valles Valenzuela coordinador de la Biblioteca del Campus Juriquilla

El apoyo técnico de Luis Aguilar, Alejandro De León, Carlos Flores y Jair García del Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS), UNAM

Al apoyo de mi Maestra la Dra. Carmen Clapp y de mi Maestro el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Al apoyo de mi Maestra de Retina y Vítreo la Dra. Renata García Franco

El apoyo de las autoridades del Instituto Mexicano de Oftalmología I.A.P.: Dr. Manuel Corona Uribe, Dr. Ellery López Star, Dr. Van Charles Lansingh

El apoyo técnico de Rafael González Flores del Instituto Mexicano de Oftalmología I.A.P.

Agradecimiento al Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas

Agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

DEDICATORIA

A Dios

A Caro mi amada esposa

A mis Padres Araceli y Miguel

A mi hermanita Aracely

A la familia hermosa que me apoya siempre

A mis Profesores quienes con su guía han iluminado el camino a seguir: Dra. Carmen Clapp, Dr. Gonzalo Martínez De La Escalera, Dra. Renata García Franco, Dr. Ellery López Star, Dr. Van Charles Lansingh, Dra. Stephanie Thebault, Dra. Edith Arnold, Dra. Yazmín Macotela G., gracias por ser mi ejemplo y mi guía

A mis tutores del programa Dra. Maricela Luna Muñoz, Dr. Miguel Angel Morales Mendoza por su guía y apoyo.

Al Equipo del Ojo: Nundy, Elvita, Montse, Frey, Gaby gracias por su apoyo

Al apoyo del Dr. Manuel Corona Uribe, al Instituto Mexicano de Oftalmología I.A.P.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
ABSTRACT.....	9
RESUMEN.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. ANTECEDENTES.....	15
II.1 SISTEMA OCULAR	15
II.1.1 ANATOMÍA BÁSICA.....	15
II.1.2 LA RETINA.....	16
II.1.3 LA MACULA.....	18
II.1.4 IRRIGACIÓN.....	18
II.1.4.1 Irrigación de la retina.....	18
II.1.5 DESARROLLO DEL GLOBO OCULAR.....	19
II.1.5.1 Embriología del globo ocular.....	19
II.1.5.2 Desarrollo de la Retina humana.....	20
II.1.5.3 Desarrollo de los vasos en la retina.....	21
II.2 RETINOPATÍA DEL PREMATURO	22
II.2.1 DEFINICIÓN RETINOPATÍA DEL PREMATURO.....	22
II.2.2 SITUACIÓN ACTUAL EN MÉXICO.....	23
II.2.3 CLASIFICACIÓN DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO.....	23
II.2.3.1 Localización y extensión de la ROP.....	24
II.2.3.2 Estadios de la Retinopatía del Prematuro.....	24
II.2.4 PATOFISIOLOGÍA DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO.....	28
III. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	29
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
V. JUSTIFICACIÓN.....	31
VI. HIPÓTESIS.....	31

VII. OBJETIVOS.....	32
VIII. MÉTODOS.....	32
VIII.1 ESTUDIO CLÍNICO.....	32
VIII.1.1 Pacientes.....	32
VIII.1.2 Diagnóstico de ROP.....	33
VIII.1.3 Severidad de ROP.....	33
VIII.1.4 Obtención de muestras séricas y análisis de PRL, vasoinhibina y VEGF.....	33
VIII.2 ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	34
VIII.2.1 Ratones.....	34
VIII.2.2 Evaluación de la vasculatura normal de la retina.....	35
VIII.2.3 Modelos murinos de antiangiogénesis inducida por hipoxia y pérdida de vasos sanguíneos.....	35
VIII.2.4 Inmunofluorescencia.....	36
VIII.2.5 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).....	37
VIII.2.6 PRL Sérica.....	38
VIII.2.7 Análisis estadístico.....	38
IX. RESULTADOS.....	39
IX.1 Estudio clínico.....	39
IX.2 Estudio experimental.....	48
X. DISCUSIÓN.....	55
XI. ÍNDICE DE FIGURAS.....	63
XII. ÍNDICE DE TABLAS.....	65
XIII. ANEXOS.....	66
XIV. REFERENCIAS.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ROP	Retinopatía del Prematuro
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
EPO	Eritropoyetina
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
SDG	Semanas de gestación
PRL	Prolactina
RN	Recién nacidos
UTIN	Unidad de Terapia Intensiva Neonatal
ICROP	Clasificación Internacional de la Retinopatía del Prematuro (International Classification of Retinopathy of Prematurity)
AV	Agudeza Visual

ABSTRACT

Background: Retinopathy of prematurity (ROP) is a potentially blinding retinal neovascular disease. The hormone prolactin (PRL) is emerging as an important regulator of retinal blood vessels. PRL is proangiogenic and can be cleaved to the antiangiogenic PRL fragment, vasoinhibin. To evaluate whether the PRL/vasoinhibin axis influences ROP, we measured the levels of PRL and vasoinhibin in patients before and after the onset of ROP. Because PRL levels were higher in ROP than in control patients, we then investigated whether raising the levels of circulating PRL modify retinal angiogenesis in newborn mice exposed to high levels of oxygen or to normoxia.

Methods: A prospective, longitudinal, case-control study covering postnatal weeks 1 to 7 measured serum PRL, vasoinhibin, and vascular endothelial growth factor (VEGF) weekly in 90 premature infants diagnosed as ROP or control. Newborn mice and their nursing mothers were subjected to 75% oxygen or to normoxia from postnatal day (P) 6 to P8 (group 1) or from P2 to P5 (group 2). PRL (2 µg/g i.p. twice a day) or vehicle, were injected from P5 to P8 in group 1 and from P1 to P5 in group 2.

Results: PRL levels were higher in ROP than in control patients before [(106.2 ± 11.3) vs. 64.7 ± 4.9 ng/ml, postnatal week 1] and during [(120.6 ± 10) vs. 84.7 ± 7.5ng/ml, postnatal week 5] ROP diagnosis. PRL, but not gestational age, birth weight, Apgar score, sepsis, or ventilation time, correlated with ROP. The relative risk (RR) of developing ROP increased if PRL levels were higher than thresholds of 80 ng/ ml (RR = 1.55, 95% CI: 1.06–2.28), 100 ng/ml (RR = 1.63, 95% CI: 1.14–2.34), or 120 ng/ml (RR = 1.95, 95% CI: 1.41–2.68). Vasoinhibin levels were 39.7% higher (95% CI: 4.5–77.5) in the circulation of ROP than in control patients at postnatal week 1 and similar thereafter, whereas VEGF serum levels were always similar. PRL treatment reduced the inhibition of blood vessel growth and the increase in vascular regression induced by hyperoxia in the retina of newborn mice as revealed by the immunofluorescence

staining of blood vessels and the expression of angiogenesis and apoptosis markers. The proangiogenic effect may involve a reduced conversion of PRL to vasoinhibin.

Conclusion: High serum levels of PRL and vasoinhibin may predict and impact ROP progression. PRL has a proangiogenic effect in the neonate retina that could help promote physiological and pathological retinal vascularization.

RESUMEN

Antecedentes: La retinopatía del prematuro (ROP) es una enfermedad neovascular de la retina que puede producir ceguera. La hormona prolactina (PRL) está surgiendo como un regulador importante de los vasos sanguíneos oculares. La PRL estimula el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) pero adquiere propiedades antiangiogénicas mediante su procesamiento proteolítico a vaso inhibina, un fragmento de la PRL que inhibe la angiogénesis. Para determinar si el eje PRL/vaso inhibina influye sobre la ROP, determinamos los niveles circulantes de ambas hormonas y su relación con la incidencia y la progresión del padecimiento en un estudio clínico. Encontramos que los niveles de la PRL son más altos en ROP, lo que nos llevó a investigar si la elevación de los niveles circulantes de la PRL modifica la angiogénesis que ocurre en la retina de ratones recién nacidos expuestos a niveles altos o normales de oxígeno.

Métodos: Se realizó un estudio clínico prospectivo, longitudinal, de casos y controles donde se determinaron los niveles séricos de PRL, vaso inhibina y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) una vez por semana a lo largo de las semanas postnatales 1 a 7 en 90 bebés prematuros diagnosticados como ROP o control. Ratones recién nacidos y sus madres lactantes fueron expuestos a 75% de oxígeno o normoxia desde el día postnatal (P) 6 a P8 (grupo 1) o desde P2 a P5 (grupo 2). Se inyectó PRL (2 µg / g i.p. dos veces al día) o vehículo de P5 a P8 en el grupo 1 y de P1 a P5 en el grupo 2.

Resultados: Los niveles de PRL fueron más altos en los pacientes con ROP que en los control antes [(106.2 ± 11.3) vs. 64.7 ± 4.9 ng/ml, semana postnatal 1] y durante [(120.6 ± 10) vs. 84.7 ± 7.5 ng/ml la semana postnatal 5] el diagnóstico de ROP. La PRL, pero no la edad gestacional, el peso al nacer, el puntaje de Apgar, la presencia de sepsis o el tiempo de ventilación, se correlacionaron con la aparición de la ROP. El riesgo relativo (RR) de desarrollar ROP aumentó en relación directa con niveles

umbrales 80 ng/ml (RR = 1.55, IC 95%: 1.06–2.28), 100 ng/ml (RR = 1.63, 95% IC: 1.14–2.34), o 120 ng / ml (RR = 1.95, IC 95%: 1.41–2.68) de la hormona. Los niveles circulantes de vasoinhibina fueron 39.7% más altos (IC 95%: 4.5-77.5) en la circulación en el grupo con ROP que en el control durante la semana postnatal 1 y similares a partir de entonces, mientras que los niveles séricos de VEGF siempre fueron similares. El tratamiento con PRL redujo la inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos y el aumento de la regresión vascular inducida por la hiperoxia en la retina de ratones neonatos, como lo reveló el marcaje inmunohistoquímico de los vasos sanguíneos y la expresión de marcadores de angiogénesis y apoptosis.

Conclusiones: Niveles altos de PRL y vasoinhibina sérica predicen y pueden afectar la progresión de la ROP. La PRL estimula la angiogénesis de la retina neonatal y este efecto podría influir sobre la vascularización fisiológica y patológica del órgano en esta fase del desarrollo.

I. INTRODUCCIÓN

La retinopatía del prematuro (ROP) se define como un trastorno vasoproliferativo de la retina en los recién nacidos pretérmino y es considerada como un problema de salud pública, sobre todo en los países en vías de desarrollo ¹ en los que se reconoce como la principal causa de ceguera no reversible en la población infantil . La ROP ocurre cuando el desarrollo de la vasculatura ocular es incompleto y afectado por condiciones que resultan en su excesiva permeabilidad y proliferación vascular que conlleva al desprendimiento de la retina y pérdida visual. La fisiopatología de la ROP se explica por la existencia de dos fases secuenciales en el desarrollo vascular: la fase I en la que el crecimiento de la vasculatura retiniana disminuye o se detiene y algunos vasos se pierden debido a la prematurez. La fase II en la que, a consecuencia de la menor vascularización, se genera hipoxia que estimula la angiogénesis y la permeabilidad vascular. La etiología de la ROP es múltiple ² pero el factor determinante es la neovascularización de la retina inducida por hipoxia . La exposición a altos niveles de oxígeno durante la estancia en terapia intensiva neonatal interfiere con la formación fisiológica de los vasos sanguíneos retinianos y provoca la muerte y obliteración de la vasculatura existente lo que deriva en un cuadro de hipoxia local . La hipoxia induce la proliferación en la retina de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) a través de estimular la expresión de inductores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y de inhibir la de factores antiangiogénicos, como el factor derivado del epitelio pigmentado. Los nuevos vasos sanguíneos invaden y sangran en el vítreo produciendo una membrana fibrovascular que llega a ocasionar el desprendimiento de la retina y la consecuente ceguera en los estados avanzados de la ROP ³.

Además de los niveles de saturación de oxígeno, se conocen varios factores de alto riesgo que influyen sobre el desarrollo de la ROP y que incluyen: el grado de prematurez, el bajo peso al nacimiento, la desnutrición, la infección perinatal, la baja ganancia de peso postnatal y los bajos niveles del factor de crecimiento tipo insulina ^{1 4}. Existe una relación inversa entre la severidad de la ROP y el peso al nacimiento, de tal manera que bajo un peso extremadamente bajo al nacer (<1000g)

mas del 80% de los recién nacidos presentarán algún grado de ROP ⁴ y, de estos, el 28.8% requerirá tratamiento para evitar la ceguera y el 6% progresará a los estados de ROP más avanzados ⁴ por lo que es muy importante contar con instrumentos pronósticos que puedan auxiliar sobre la necesidad o no de aplicar los tratamientos en cuestión.

La PRL se presenta como un regulador eficiente de los vasos sanguíneos, ya que es capaz tanto de estimular como de inhibir el crecimiento vascular . Estos efectos opuestos resultan del corte proteolítico de la PRL al fragmento molecular de esta hormona denominado vaso inhibina. La molécula completa de PRL promueve la angiogénesis mientras que la vaso inhibina inhibe el crecimiento, la dilatación, la permeabilidad y la supervivencia de los vasos sanguíneos ⁵. La generación de la vaso inhibina ocurre en el hipotálamo, la hipófisis y a nivel de sus órganos blanco lo que define al eje PRL/vaso inhibina como un nuevo eje endócrino. Este eje contribuye al mantenimiento de la avascularidad corneal ⁶, regula la vascularización normal de la retina ⁷, y se altera en las retinopatías vasoproliferativas como la retinopatía diabética ⁸ y la ROP.

El propósito de este trabajo fue analizar la posible influencia del eje PRL/vaso inhibina en la fisiopatología de la ROP. Para lo cual, dividimos nuestro estudio en dos rubros, un estudio clínico en donde evaluamos los niveles circulantes de la PRL y la vaso inhibina en relación con la presencia de ROP en recién nacidos prematuros a lo largo de las primeras siete semanas de nacimiento . Debido a que los pacientes con ROP presentaron niveles mas elevados de la PRL en la circulación, consideramos importante investigar, en un segundo rubro, si la elevación de la PRL circulante modifica la vascularización de la retina de ratones recién nacidos expuestos a alto oxígeno. Nuestro trabajo propone que la hormona PRL y su metabolito, la vaso inhibina tienen la potencialidad de ser desarrolladas como nuevas herramientas pronósticas y terapéuticas de la ROP ⁹.

A continuación se revisan aspectos generales de la anatomía y fisiología ocular, del desarrollo y diferenciación de la retina, de la fisiopatología de la ROP y del eje PRL/vasoinhibina que establecen el marco conceptual de este trabajo.

II. ANTECEDENTES

II.1 EL GLOBO OCULAR HUMANO

II.1.1 ANATOMÍA BÁSICA

El ojo, o globo ocular, es el principal órgano de la visión. Cada uno de los globos oculares ocupan una cavidad ósea llamada órbita, el volumen de cada órbita es de aproximadamente 30 cm³ y ésta tiene la función de proteger los ojos de traumas mecánicos. El resto del espacio de la órbita está ocupado por músculos extraoculares, tejido graso, vasos sanguíneos, nervios y la glándula lagrimal ¹⁰. El diámetro anteroposterior de un ojo adulto es aproximadamente de 23-25 mm. El diámetro transversal promedio en un ojo adulto es de 24 mm. El ojo contiene tres compartimentos: la cámara anterior, la cámara posterior y la cavidad vítrea ¹⁰. La cámara anterior, es de aproximadamente 3 mm de profundidad y es el espacio existente entre el iris y la córnea, y se encuentra ocupado por aproximadamente 200 µL de humor acuoso.

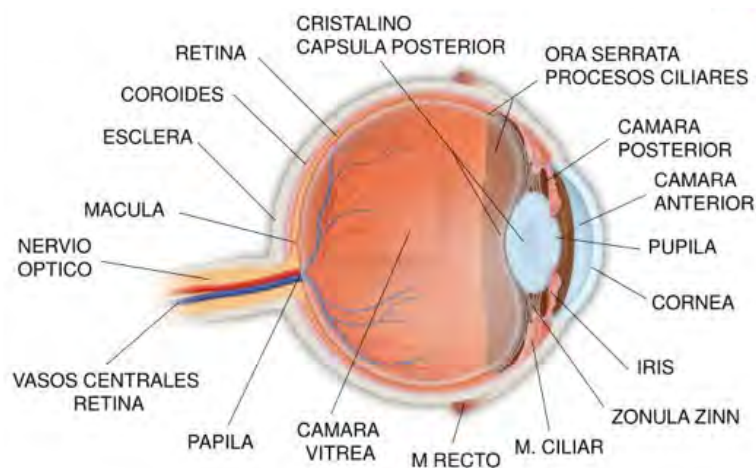


Figura 1. Esquema de la sección de un ojo humano mostrando sus diferentes componentes. Modificado de la Academia Americana de Oftalmología 2019 ¹⁰.

La cámara posterior es la porción anatómica del ojo posterior al iris y anterior al cristalino. Se encuentra también ocupada por humor acuoso en un volumen promedio de 60 μ L. El compartimento mas grande del ojo es la cavidad vítrea, la cual representa más de dos tercios el volumen total del ojo con un volumen promedio de 3 - 5 ml de gel vítreo ¹¹. El volumen total del globo ocular de un adulto es de aproximadamente 6.5 - 7 ml (Figura 1). ¹⁰

II.1.2 LA RETINA

Cuando se explora el fondo ocular, la parte visible incluye a la retina, sus vasos grandes, el vítreo y el nervio óptico ¹⁰. La retina comprende un tejido neuroepitelial que, en su región posterior, se adhiere firmemente a la cabeza del nervio óptico y en su región anterior a la ora serrata ¹². La retina se divide en dos partes, una parte central y una parte periférica. La organización histológica de la retina comprende nueve capas (Figura 2) y un epitelio pigmentado (EPR), denominadas respectivamente como retina neurosensorial y epitelio pigmentado.

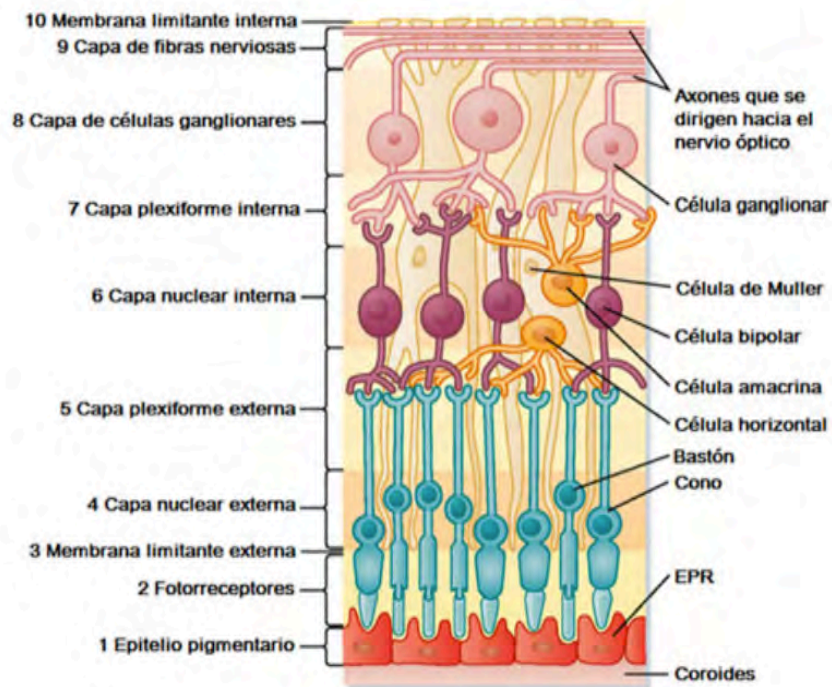


Figura 2. Células y capas de la retina. Modificado de la Academia Americana de Oftalmología 2019 ¹⁰.

Las capas de la retina neurosensorial desde la parte externa (desde la coroides) hacia la porción mas interna son: 1) el epitelio pigmentado de la retina (EPR) ¹³ que es la capa mas externa en proximidad con la membrana de Bruch que la separa de la coroides; 2) la capa de fotorreceptores, que contiene los segmentos internos y externos de los fotorreceptores; 3) la membrana limitante externa (MLE), región compuesta por uniones tipo hendidura (“gap”) entre fotorreceptores y células de Müller; 4) la capa nuclear externa (CNE) ¹³ que contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores, conos y bastones; 5) la capa plexiforme externa (CPE), formada por la interconexión de fotorreceptores, células bipolares y células horizontales; 6) la capa nuclear interna (CNI) ¹³, compuesto por los cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales y amácrinas; 7) la capa plexiforme interna (CPI) ¹⁰, formada por axones de células bipolares y las dendritas de las células amácrinas que se conectan con las células ganglionares modulando los impulsos eléctricos ¹³; 8) la capa de células ganglionares (CCG) ¹¹, formada por los cuerpos neuronales de las células ganglionares; 9) la capa de fibras nerviosas ¹³, compuesta por los axones de las células ganglionares que proyectan sus axones para formar el nervio óptico; y 10), la membrana limitante interna ¹³, formada por las proyecciones terminales de las células de Müller.

La retina neurosensorial está compuesta por elementos neuronales, gliales y vasculares ¹². Dentro de los elementos neuronales se encuentran los fotorreceptores que son neuronas altamente especializadas, los conos y los bastones ¹³. En el ojo humano existen aproximadamente seis millones de conos y 120 millones de bastones ¹¹. Los conos son más sensibles durante el día, se localizan en el centro de la retina (o fovea), son sensibles a tres colores: rojo, verde y azul. Los bastones contienen rodopsina, que es un pigmento sensible a la luz compuesto por una parte proteica (opsina) y una no proteica derivada de la vitamina A (11-cis-retinal) que permite la absorción de fotones ¹³.

II.1.3 LA MACULA

La mácula, también llamada mácula lútea debido a su coloración amarilla, es la capa más sensible de la retina donde se concentra la mayor agudeza visual ¹¹. Se encuentra localizada en la región temporal respecto al nervio óptico. La luteína y la zeaxantina son carotenoides que hacen que la mácula tenga el pigmento amarillo. Estos pigmentos tienen efectos anti-inflamatorios y propiedades de filtro de la luz azul. La dieta rica en éstos pigmentos es protectora en contra de enfermedades en la retina como la retinopatía diabética y la retinopatía del prematuro ¹⁴. En el centro de la mácula se localiza una depresión avascular llamada fovea, la cual contiene la mas alta concentración de conos de la retina ¹².

II.1.4 IRRIGACIÓN

La retina recibe irrigación en la vida adulta de dos fuentes principales: 1) los vasos uveales y 2) los vasos retinianos ¹³. La coroides, que es parte de la circulación uveal, irriga las 2/3 partes externas de la retina, mientras las ramas de la arteria central de la retina irrigan la parte interna de la retina ¹⁰. Las capas externas de la retina donde se encuentran los fotorreceptores son avasculares y reciben aporte sanguíneo y nutrientes a partir de la coroides, mientras que la capa interna de la retina de la cual forman parte las células ganglionares se nutren a partir de los vasos de la retina interna ¹¹. Alrededor del 65% del oxígeno que se utiliza en la retina proviene de la coroides. En humanos tanto la vasculatura retiniana como de la coroides derivan de ramas de la arteria oftálmica ¹³.

II.1.4.1 Irrigación de la retina

Las arterias del globo ocular derivan de la arteria oftálmica, que es a su vez la primera rama de la arteria carótida interna ¹¹. Los vasos sanguíneos de la retina son análogos a los vasos sanguíneos cerebrales en cuanto a que conforman una barrera fisiológica que regulan el flujo de agua, iones y proteínas a la retina, la barrera hemato-retiniana (BHR). Esta barrera es indispensable para mantener las concentraciones de iones y sustratos específicos de la retina neural necesarios para su funcionamiento adecuado. La BHR interna está compuesta por una capa no

fenestrada de células endoteliales que forman los lechos capilares (localizados en la capa de fibras nerviosas en la parte interna y externa de la capa nuclear interna) ¹². Por su parte la BHR externa está conformada por el epitelio pigmentario de la retina que forma una barrera entre el plexo vascular coroideo y la retina.

Las arterias y las venas permanecen en la capa de fibras nerviosas de la retina, mientras que las arteriolas y vénulas se extienden a las capas más profundas de la retina, formando de este modo dos principales redes microvasculares: 1) capilares superficiales en la capa de células ganglionares y fibras nerviosas, y 2) capilares más densos y profundos en ambos lados de la capa nuclear interna ¹³.

La coroides recibe irrigación por dos sistemas arteriales diferentes: 1) las arterias ciliares posteriores cortas que aportan el riego sanguíneo a la coroides posterior y 2) las arterias ciliares posteriores largas que proveen irrigación a la porción anterior de la coroides ¹¹.

II.1.5 DESARROLLO DEL GLOBO OCULAR

II.1.5.1 Embriología del globo ocular

Las estructuras oculares derivan del ectodermo embrionario del cual se forma el tubo neural en cuyo extremo cefálico se hacen aparentes las evaginaciones que formarán las vesículas ópticas a partir de la tercera semana de la gestación ([Figura 3](#)).

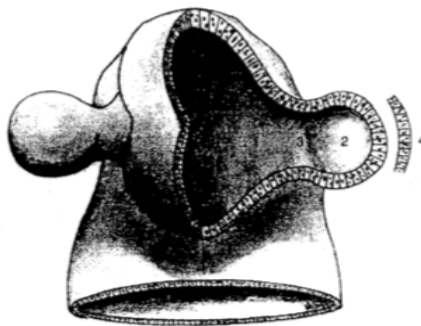


Figura 3. Cavidad del cerebro anterior que se comunican con las vesículas ópticas ¹⁵ a través del tallo óptico (3). Ectodermo de revestimiento ¹⁵. Modificado de Gómez-Leal A 2000¹⁶

De la parte anterolateral de cada vesícula óptica se producen dos invaginaciones anteroposteriores, la primera formará la vesícula del cristalino formada por el ectodermo de revestimiento y quedará incluida dentro de la copa óptica y la segunda, la copa óptica formada por neuroectodermo (Figura 4). La copa óptica tiene dos capas, una externa (nucleada) y una interna (no nucleada), esta última dará origen a la retina y a sus células. Por detrás se encuentra una capa delgada que formará el epitelio pigmentario de la retina, primera estructura del cuerpo en pigmentarse.

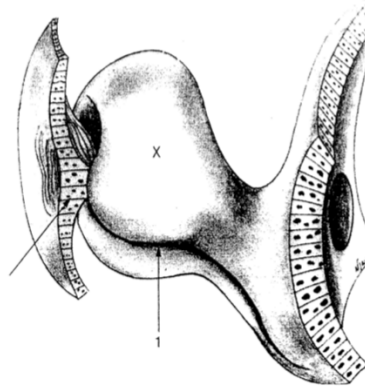


Figura 4. Copa óptica (X), vesícula del cristalino invaginándose (flecha), hendidura embrionaria ¹⁵. Modificado de Gómez-Leal A 2000 ¹⁶.

II.1.5.2 Desarrollo de la retina humana

Entre los 20 y 32 días del desarrollo embrionario (Etapa I: Diferenciación en zonas) ¹⁷ se distinguen tres capas en la copa óptica: una interna acelular (capa marginal) y una externa con múltiples capas celulares (capa de neuroepitelio primitivo) que formarán la retina neurosensorial y una tercera capa externa a las dos anteriores con 2 a 3 capas de células que derivará en el epitelio pigmentado. En ésta etapa la arteria hialoidea penetra al ojo. A partir de la quinta semana (tercer mes de gestación) (Etapa II: Capas transitorias) ¹⁷, las células que componen la capa del neuroepitelio primitivo migran hacia la capa marginal (acelular) para formar la capa neuroblástica interna y la capa neuroblástica externa y es en ésta etapa cuando se desarrollan las células de Müller ¹⁶⁻¹⁸. En la Etapa III (Migración y diferenciación) (tercer al séptimo mes de la gestación) ¹⁸ se forman las células ganglionares y las capas nucleares interna y externa. Entre el cuarto y quinto mes de la gestación se distinguen en la

capa externa las células reniformes que son las precursoras de los fotorreceptores. Finalmente, en la etapa IV (séptimo mes a primer mes postnacimiento) se finaliza el desarrollo de la retina ¹⁶. En la fóvea, las células ganglionares se desplazan en dirección centrífuga y dejan una sola hilera alrededor de la fóvea. Al nacimiento, la capa nuclear interna forma una sola capa, las fibras de la plexiforme externa se distribuyen de una manera radial y la nuclear externa no cambia.

La retina periférica al nacer, se asemeja en su anatomía macroscópica a la del adulto, sin embargo, la región central de la retina correspondiente a la fóvea no se encuentra funcionalmente desarrollada en su totalidad ¹⁹ a pesar de la existencia de la depresión foveal y de que las capas celulares se encuentran presentes, los segmentos externos de los fotorreceptores son estrechos, sus segmentos internos cortos y la capa nuclear externa es delgada ¹⁹. Es al cuarto mes de edad postnatal cuando los fotorreceptores foveales alcanzan su longitud completa, la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares se desplazan lateralmente para formar la depresión foveal similar a la de una persona adulta ¹⁹ y es el momento en el cual, el desarrollo de la agudeza visual (AV) se produce para alcanzar la máxima capacidad visual a partir de los 5 años de edad aproximadamente. De tal manera que la AV de un niño antes de los 4 meses de edad está determinada por la región extrafoveal (región periférica de la retina) y al término de su primer año de vida, un niño tiene una AV cercana a la mitad de la de un adulto sano ²⁰.

II.1.5.3 Desarrollo de los vasos sanguíneos en la retina

El desarrollo vascular comprende dos procesos: la vasculogénesis (los vasos sanguíneos se originan de precursores embrionarios para formar vasos “de novo”) y la angiogénesis (proliferación de nuevos vasos a partir de los vasos ya existentes) ²¹. Los vasos sanguíneos en el ojo humano se forman a partir de la arteria hialoidea presente desde la etapa I del desarrollo ^{16,17}. Aproximadamente a los 4 meses de la gestación, la arteria hialoidea se convierte en la arteria central de la retina ¹⁶. En esta etapa, precursores embrionarios de las células endoteliales vasculares generan capilares sanguíneos (vasculogénesis) que posteriormente proliferan (angiogénesis) para formar un lecho vascular laminar que crece radialmente hacia la periferia de la

retina a partir del nervio óptico ²². Los vasos se extienden a través de la capa de fibras nerviosas y llegan a la periferia de la retina en la semana 26 de la gestación ²². A partir de este momento y hasta la semana 34 los vasos superficiales vascularizan la parte interna de la capa nuclear interna de la retina y cubren las 2/3 de la superficie retiniana que se observa vascularizada en la vida adulta ²². Finalmente, una tercera capa vascular se aprecia en la semana 36, localizada en la parte externa de la capa nuclear interna, ésta capa migrará únicamente a la mitad del área total de la retina ²². Los vasos de la retina se forman tomando a los astrocitos como guía, los cuales migran hacia la periferia de la retina antes que las células endoteliales ²². Los astrocitos se identifican por la presencia de la GFAP (proteína ácida fibrilar glial), tienen forma de huso y están presentes en las puntas vasculares de migración. También se ha sugerido la presencia de angioblastos con capacidad de migrar tanto a la periferia de la retina como hacia las capas más profundas de la retina (hacia la capa nuclear interna) ²². Sin embargo, se considera que el mayor aporte vascular deriva del proceso de angiogénesis por gemación, ramificación y estabilización vascular ²¹.

II. 2 RETINOPATÍA DEL PREMATURO

II.2.1 DEFINICIÓN DE LA RETINOPATÍA DEL PREMATURO

La ROP es la causa principal de ceguera prevenible en niños en todo el mundo. Esta influencia se puede constatar cuando se considera que en el 2010 se estimaron 19 millones niños con pérdida visual ²³. Existen distintas causas de ceguera infantil, sin embargo, alrededor de 25,000 niños ciegos por causa de la ROP viven en América Latina ²⁴. La enfermedad se caracteriza por proliferación de tejido fibrovascular anormal en el borde entre la retina vascular y la avascular. Afecta únicamente a los recién nacidos prematuros y en especial a aquellos con ≤ 1500 g de peso al nacer y/o ≤ 32 semanas de edad gestacional. Sin embargo, la ROP también puede presentarse en niños recién nacidos prematuros mayores ²⁴ cuando tienen lugar factores de riesgo o morbilidad neonatal, como por ejemplo: el síndrome de dificultad respiratoria, transfusiones sanguíneas, infección, bajo peso e hiperglucemia ²³. La ceguera por ROP disminuye cuando se mejoran los estándares de atención neonatal

²⁴. Desde el año 2006, como estrategias de prevención de la ROP en América Latina, se utilizan enfoques multidisciplinarios de salud que incluyen la prevención del parto prematuro (obstetras y matronas), mejoras en la atención neonatal (neonatólogos y enfermeros), detección y tratamiento (oftalmólogos y anesthesiólogos), rehabilitación de la visión (terapeutas de baja visión y ocupacionales) y trabajadores sociales de la Unidad de Terapia Intensiva Neonatal ²⁵ que facilitan el seguimiento adecuado y el mejor control de la prematurez ²⁴.

II. 2.2 SITUACIÓN ACTUAL EN MÉXICO

México cuenta con más de 120 millones de habitantes, y se ubica como la segunda economía mas importante de América Latina y la decimoquinta en el mundo. Desde 1982, México ha logrado una tasa de mortalidad infantil inferior a 60 por cada 1000 nacidos vivos. Ésta cifra representa en gran medida la sobrevida de los recién nacidos prematuros, que actualmente es del 90% cuando son menores de 34 semanas de gestación. Desde la década de 1980, México enfrenta el riesgo de ocurrencia de casos de ceguera por ROP en proporciones epidémicas, pues es la mayor causa de ceguera infantil prevenible en México y representa el 35 y 60% de los niños que ingresan en escuelas para ciegos en las ciudades de Guadalajara y Morelia respectivamente ²⁴.

II. 2.3 CLASIFICACION DE LA RETINOPATIA DEL PREMATURO

La ROP es una enfermedad compleja de la microvasculatura retiniana del recién nacido prematuro. A medida que se incrementa la supervivencia de los bebés prematuros de edades gestacionales bajas aumentan las complicaciones oculares relacionadas con esta enfermedad ²³. La Clasificación Internacional de la Retinopatía del Prematuro (ICROP) se publicó inicialmente en 1984 ²⁶ y se extendió en 1987 ²⁷. Representó un consenso estandarizado internacional para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad ^{26,27}. La clasificación original facilitó el desarrollo de ensayos clínicos multicéntricos y el conocimiento de la ROP. Posteriormente un grupo de oftalmólogos pediatras y especialistas en retina revisaron algunos aspectos del ICROP e introdujeron herramientas clínicas para su evaluación ³.

II.2.3.1 Localización y grado de extensión de la ROP

Con el fin de definir la localización anteroposterior de la ROP se describieron 3 zonas concéntricas observadas en la exploración clínica ²⁶. Cada zona toma como centro al nervio óptico en lugar de la mácula, debido a que los vasos normales de la retina crecen a partir del nervio óptico y se dirigen hacia la porción mas anterior y periférica de la retina (ora serrata) ³. La zona I (la parte mas interna) comprende un círculo, cuyo radio es el doble de la distancia existente desde el centro del nervio óptico al centro de la mácula (Figura 5). La zona II se extiende de manera centrífuga desde el borde de la zona I a la ora serrata nasal (en el meridiano de las 3 h en la posición del ojo derecho y la posición 9 h en posición del ojo izquierdo). La zona III es la creciente residual en el sector temporal ³. La extensión de la enfermedad se mide por meridianos de husos horarios de acuerdo a la escala analógica del reloj o bien por sectores que miden 30° ³.

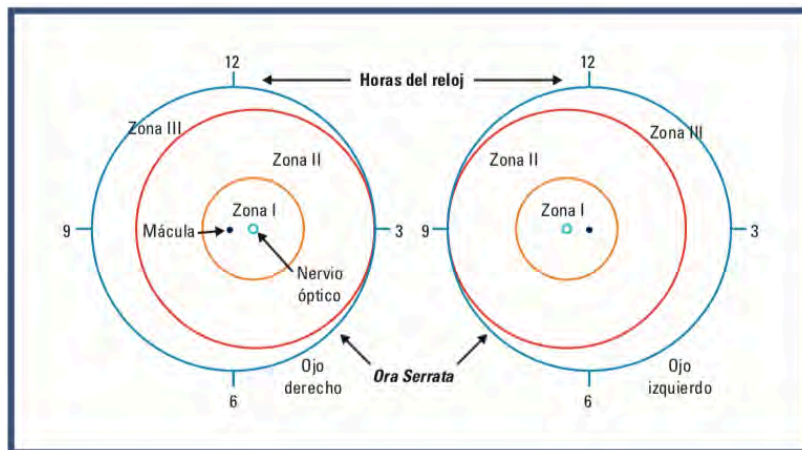


Figura 5. Esquema de la retina con los bordes de las zonas y las horas de reloj utilizadas para describir la localización y extensión de la ROP (Adaptado del Comité de Clasificación de la ROP) ^{3,24}.

II.2.3.2 Estadios de la ROP

Existen 5 etapas utilizadas para describir el desarrollo vascular anormal a nivel de la unión entre la retina vascular y la avascular. Cuando mas de una etapa ocurre al mismo tiempo se toma en consideración la de mayor grado ³.

Etapa 1: Línea de demarcación

La línea de demarcación es una marca delgada, plana que separa la retina avascular anterior de la retina vascularizada posterior. (Figura 6a) ³.

Etapa 2: Cresta

La cresta es el punto clave la etapa 2, surge del sitio de la línea de demarcación, tiene altura y anchura, se extiende sobre el plano de la retina y presenta con un color blanco-rosado. En esta etapa también llegan a observarse posterior a la cresta unos penachos pequeños neovasculares a los que se les denomina "popcorn" por su similitud con las palomitas de maíz (Figura 6b) ³.

Etapa 3: Proliferación fibrovascular extraretiniana

En la etapa 3 tiene lugar la proliferación vascular anormal o neovascularización que se puede extender desde la cresta al vítreo. En el vítreo, los nuevos vasos sanguíneos forman una membrana fibrovascular que cuando se exagera trae consigo la etapa 4 de la ROP (Figura 6c) ³.

Etapa 4: Desprendimiento parcial de la retina

El estadio 4 ocurre cuando la membrana fibrovascular ejerce tracción sobre la retina desprendiéndola parcialmente y puede ser desprendimiento de retina parcial extrafoveal (4A), cuando no involucra a la fovea, o bien desprendimiento de retina parcial con involucro foveal (4B) (Figura 6 d, e) ³.

Etapa 5: Desprendimiento total de la retina

El desprendimiento traccional total de la retina (Figura 6f) generalmente es en forma de embudo y se clasifica en anterior y posterior en función del sitio en el que se encuentre la porción cerrada del embudo (Figura 6f) ³.

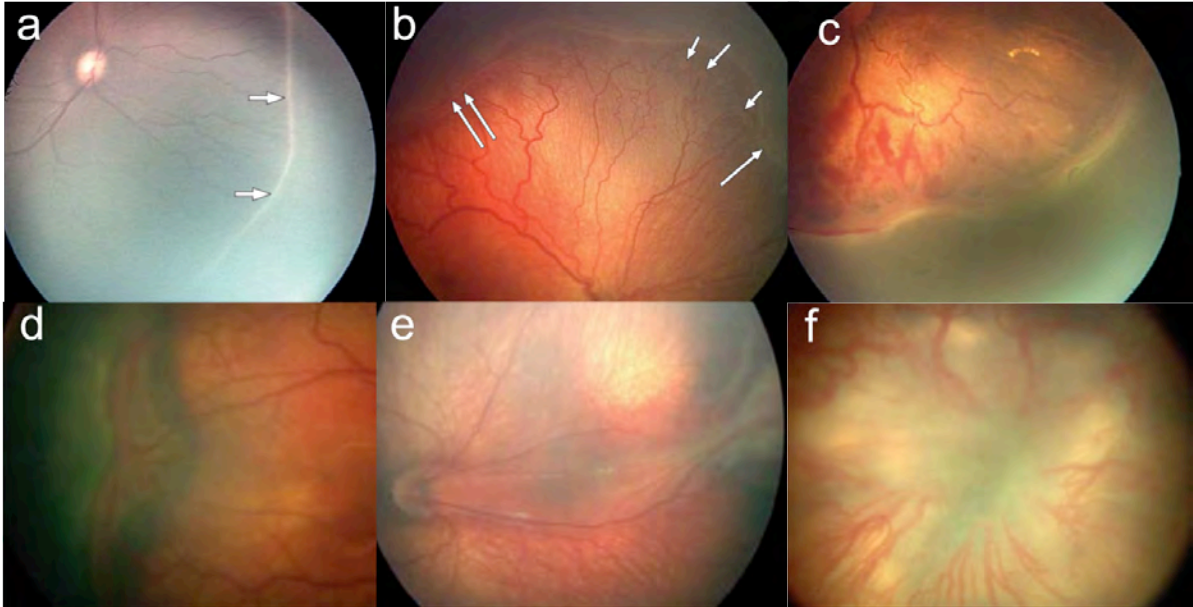


Figura 6. Fotografía de fondo de ojo que ilustra: (a) la línea de demarcación de la etapa 1; (b) la cresta (flechas largas) entre la retina vascular y avascular y los penachos de neovasos aislados (“popcorn”, flechas cortas); (c) infiltración al vítreo de la proliferación fibrovascular (etapa 3); (d) desprendimiento parcial de la retina no involucra la fóvea (etapa 4A); (e) desprendimiento parcial de la retina que involucra la fóvea (etapa 4B); y (f) desprendimiento total de la retina (estadio 5). (Adaptado del Comité de Clasificación de la ROP) ³

Enfermedad Plus

Existen otros signos que indican la actividad y severidad de la ROP y que incluyen: ¹⁵ dilatación venosa extensa; ¹⁵ tortuosidad arteriolar de los vasos de la retina posterior; (3) dilatación de los vasos del iris; ¹⁵ pobre dilatación pupilar; y opacidad vítrea (“haze”) (Figura 7).

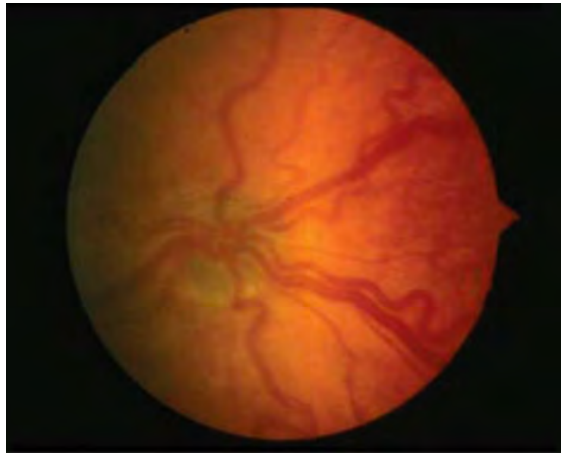


Figura 7. Fotografía de fondo de dilatación venosa posterior y de tortuosidad arteriolar, característica de enfermedad plus. (Adaptado del Comité de Clasificación de la ROP) ³

ROP agresiva posterior (AP-ROP)

Es una enfermedad poco común, rápidamente progresiva, se observa por lo general en la zona I, aunque también en la zona II. Los vasos del polo posterior presentan: ¹⁵ dilatación aumentada y tortuosidad en los 4 cuadrantes mayor a la de los vasos periféricos; ¹⁵ derivaciones inter-vasculares; (3) dilatación y tortuosidad vascular que no permite distinguir arteriolas de vénulas; y ¹⁵, hemorragias entre la zona vascular y la avascular (**Figura 8**).

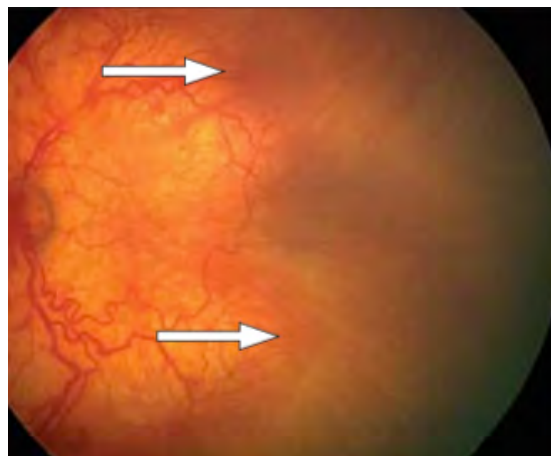


Figura 8. Fotografía de fondo con AP-ROP, se observa una enfermedad plus prominente. (Adaptado del Comité de Clasificación de la ROP) ³

II.2.4.PATOFISIOLOGIA DE LA ROP

De la información anterior se desprende que la ROP es una enfermedad de la microcirculación retiniana que ocurre en los ojos donde el desarrollo vascular de la retina es incompleto. En la ROP, la angiogénesis y vasopermeabilidad excesiva de la retina conlleva a su desprendimiento y a la eventual ceguera. La patofisiología de la ROP se explica a través de la existencia de dos fases secuenciales de desarrollo vascular: la fase 1 en donde el desarrollo vascular normal de la retina disminuye o se interrumpe y algunos vasos se pierden debido al nacimiento prematuro. Y la fase 2, donde la reducción de la vascularización debida a la fase 1, genera hipoxia que, a su vez, estimula la vasopermeabilidad y vasoproliferación excesiva que conduce al desprendimiento de la retina ²⁸. El factor de crecimiento vascular o VEGF es el principal factor inducible por hipoxia que media la neovascularización en la ROP ²⁸⁻³⁰, aunque otros factores proangiogénicos inducidos (eritropoyetina) o no por hipoxia (factor tipo insulina 1) ²⁸ indudablemente participan. En este trabajo se investiga la posible participación en la ROP del sistema PRL/vasoinhibina, un eficiente regulador de los vasos sanguíneos oculares ³¹.

III. ANTECEDENTES INMEDIATOS

La hormona PRL, denominada originalmente por sus funciones sobre la producción de leche durante la lactancia, ejerce múltiples efectos en la reproducción, la osmoregulación, la respuesta inmune, el comportamiento y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) . La PRL estimula la angiogénesis a través de inducir la expresión de VEGF por diversos tipos celulares, pero también a través de acciones directas sobre las células endoteliales vasculares estimulando su proliferación ²¹. Por otra parte, la PRL es metabolizada hacia vaso inhibina, un fragmento de PRL con propiedades inhibitorias de la función vascular ²¹ . La vaso inhibina actúa directamente sobre las células del endotelio vascular inhibiendo la vasopermeabilidad, la vasodilatación, la vasoproliferación y promoviendo la regresión por apoptosis de los nuevos vasos sanguíneos ²¹. Debido a las acciones opuestas de la PRL y la vaso inhibina sobre la vascularización, la resultante final de sus efectos esta esencialmente determinada por la actividad de las proteasas convertidoras y, por ende, la regulación de dichas enzimas representaría un mecanismo eficiente para estimular y/o inhibir la vascularización ²¹.

La posible participación del sistema PRL/vaso inhibinas en las alteraciones vasculares de la ROP se apoya en estudios previos que mostraron que la expresión adenoviral de vaso inhibina en la retina de ratas recién nacidas interfiere con la neovascularización inducida por hiperoxia/hipoxia en un modelo experimental de la ROP . Además, se reportó la presencia de PRL y de vaso inhibina en la circulación y en los fluidos intraoculares (humor acuoso y líquido subretiniano) de pacientes que tuvieron ROP en su grado mas avanzado y que, 6 meses a tres años después de la enfermedad, fueron sometidos a vitrectomía . Es posible que la PRL y las vaso inhibinas presentes en el ojo de estos pacientes pudieran provenir de la circulación. Se tienen evidencias en roedores adultos que bajo condiciones de hiperprolactinemia se favorece la incorporación de la PRL a la retina y su procesamiento proteolítico hacia vaso inhibina capaz de inhibir los efectos vasculares del VEGF, así como la vasopermeabilidad incrementada debida a la retinopatía

diabética experimental . También se ha reportado que la leche materna protege contra la ROP y es posible que en esta protección pudiera participar la PRL vía su conversión a vasoinhibina, ya que se conoce que la PRL se concentra en la leche materna ³² y que esta hormona pasa de la leche a la circulación del recién nacido . Sin embargo, se desconoce si la PRL es convertida eficientemente hacia vasoinhibina en la retina de los recién nacidos por lo que, dados los efectos proangiogénicos de la PRL, también pudiera ser posible que niveles sistémicos altos de PRL pudieran promover la vascularización retiniana y constituir un mecanismo de riesgo en la ROP.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De estas consideraciones, se desprende la posibilidad de que el aumento de la PRL y de vasoinhibina en la circulación pudiera tener un valor negativo o positivo contra la progresión de la ROP y, por ende, que la determinación de los niveles séricos de ambas proteínas pudiese tener valor pronóstico contrario o favorable de la progresión de este padecimiento. Específicamente se consideraron dos alternativas: ¹⁵ que niveles altos de PRL y de vasoinhibina en el suero resultan en un incremento de la vasoinhibina intraocular y, consecuentemente, en una menor progresión de la ROP; y ¹⁵, que, altos niveles sistémicos de PRL aunado a bajos niveles de vasoinhibinas circulantes y/o intraoculares, pudieran favorecer el desarrollo de la ROP. Como se mencionó, solo se tiene información acerca de la concentración sérica de PRL y de vasoinhibinas, en pacientes que cursaron con el grado mas severo de la ROP (grado 5) y que se analizaron al momento de la vitrectomía, es decir cuando estos pacientes tenían entre 6 meses a 3 años de edad, y cuando la neovascularización ocular (ROP) ya no estaba presente ³³. De aquí parte la necesidad de valorar los niveles séricos de estas proteínas desde las etapas iniciales y a lo largo del padecimiento clínico; y de complementar estas determinaciones con un análisis experimental donde se analice la influencia de los niveles hormonales sobre la vascularización de la retina en roedores recién nacidos.

Estos estudios podrían ayudar a dilucidar el valor potencial de los niveles sistémicos de estas hormonas como un método pronóstico de utilidad para la toma de decisiones clínicas y posibles tratamientos en el manejo de la ROP.

V. JUSTIFICACION

La ROP es la mayor causa de ceguera en la niñez en el mundo. La ROP ocurre en ojos con un sistema vascular incompleto y causa proliferación vascular, vasopermeabilidad y desprendimiento de la retina. Actualmente los factores de riesgo más conocidos incluyen el grado de prematuréz (<37 semanas de gestación), el bajo peso al nacer y la exposición a altos niveles de oxígeno en la UTIN. Se conoce que el 75% de los bebés prematuros que nacen con ≤ 1250 gramos desarrollan algún grado de ROP, pero de estos solamente el 6% progresan al grado severo de la enfermedad . El tratamiento convencional para controlar la ROP es la fotocoagulación con laser de los neovasos en la retina pero el procedimiento es invasivo en si mismo y frecuentemente daña la retina y perjudica visión . Dado que una proporción pequeña de los pacientes con ROP progresan a los cuadros mas severos, el contar con marcadores sistémicos que auxilien en la pertinencia del uso o no de la terapia láser es muy conveniente.

Este proyecto investiga a la hormona PRL como marcador de la enfermedad desde etapas tempranas del nacimiento, antes de que los síntomas de la ROP se manifiesten. Los resultados de éste estudio abren nuevas perspectivas en torno al uso de la PRL y su metabolito (vasoinhibina) como agentes pronósticos y terapéuticos en la ROP y otras retinopatías vasoproliferativas como la diabética.

VI. HIPÓTESIS

El aumento de los niveles de la PRL circulante y/o la reducción de la vasoinhibina sérica promueven la incidencia y severidad de la ROP.

VII. OBJETIVOS

- Determinar los niveles en suero de la PRL en recién nacidos prematuros con y sin ROP a lo largo de las siete primeras semanas después del nacimiento.
- Determinar los niveles en suero de Vi en recién nacidos prematuros con y sin ROP a lo largo de las siete primeras semanas después del nacimiento.
- Determinar el efecto de elevar los niveles sistémicos de la PRL sobre la vascularización de la retina de ratones recién nacidos normales y de aquellos expuestos a altos niveles de oxígeno.

VIII. METODOS

VIII.1 ESTUDIO CLINICO

VIII.1.1 Pacientes

El estudio fue aprobado por el Comité de investigación del Hospital Fray Antonio Alcalde y todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los padres de los pacientes que participaron en el estudio.

Se incluyeron bebés que nacieron con edad gestacional < 35 semanas en el Hospital Civil Fray Antonio Alcalde y el Hospital Materno infantil "Esperanza López Mateos" de la ciudad de Guadalajara, México, entre febrero del 2012 y enero del 2013. Los criterios de exclusión fueron: peso corporal menor a 500 g, tratamiento con algún medicamento conocido que afecta la secreción de hipofisaria de PRL (metoclopramida, metildopa, opioides, cimetidina o esteroides postnatales). Ciento dieciocho niños se identificaron como candidatos y fueron autorizados para participar. Posteriormente 28 pacientes fueron excluidos (15 debido a medicamentos, 7

fallecieron antes de llevar a cabo el examen oftalmoscópico, 5 no proporcionaron muestras, 1 fue transferido a otro hospital) lo que dejó un total de 90 sujetos de estudio. Todos los niños fueron hospitalizados en la UTIN y recibieron nutrición enteral con fórmula estándar y progresión gradual en cantidad de leche materna, suplementada en algunos casos con glucosa, aminoácidos y lípidos según las indicaciones médicas de acuerdo al estado de salud de cada sujeto de estudio.

VIII.1.2 Diagnóstico de la ROP

La ROP se diagnosticó mediante oftalmoscopia indirecta. Se iniciaron revisiones semanales a partir de la semana 3 de edad postnatal que corresponde a ≥ 31 semanas de edad postmenstrual (suma de la edad gestacional y edad postnatal).

VIII.1.3 Severidad de la ROP

Se utilizó la escala de severidad establecida por la Clasificación Internacional de la ROP ³. Brevemente, la clasificación considera tres niveles: 0, ausencia de la enfermedad; 1 y 2, enfermedad leve (línea de demarcación y cresta, respectivamente); y 3, enfermedad severa (cresta con proliferación fibrovascular extraretiniana). Ningún bebé desarrolló etapas 4 o 5 de la ROP.

VIII.1.4 Obtención de muestras séricas y análisis de PRL, vasoinhibina y VEGF

Las muestras de sangre (0.5 mL) se obtuvieron semanalmente y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Los niveles de PRL se cuantificaron mediante el inmunoensayo IMMULITE 2000 XPi (Siemens, Múnich, Alemania). Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron menores al 1%. La vasoinhibina sérica se determinó mediante inmunoprecipitación-Western blot de acuerdo al método publicado previamente ³⁴. Brevemente, 50 uL de suero se precipitaron con 2 uL de antisuero anti-PRL humana [HC1; obtenido y caracterizado como se reportó previamente ^{33,34}]. Las muestras se incubaron con el antisuero HC1 durante la noche y posteriormente con la proteína-A-sefarosa (35 uL, Sigma Aldrich, St Louis, MO) durante 2 h. Subsecuentemente se les centrifugó y lavó con NET-gel (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, 5 mMol/l de ácido etilenodiaminotetraacético, 0.1% Nonidet P-40, 0.25%

de gelatina de piel bovina, 0.02% de ázida de sodio, pH 8), con NET-gel y SDS al 10% y finalmente con 0.05 M Tris y 1% Nonidet P-40, pH8. Cada lavado tuvo una duración de 10 min a 4°C bajo agitación suave y fue seguida de centrifugación a 9,000 x g por 5 min. El precipitado final se procesó por medio de electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) utilizando un gel al 15% de acrilamida y condiciones reductoras. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con leche al 4% en 0.1% de Tween-20-PBS durante 1 h a temperatura ambiente e incubadas durante la noche a 4°C con 4 ug/mL de anticuerpos monoclonales anti-PRL humana (mAb5602, Diagnostic Biochem Canada Inc., London, Canada). Estos anticuerpos están dirigidos contra el extremo amino-terminal de la PRL³⁵, que es la región de la PRL presente en la vasoinhibina^{5,36}. La reacción con el anticuerpo primario se reveló utilizando anticuerpos secundarios anti-ratón generados en burro acoplados a fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y un kit de detección colorimétrica (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La cuantificación de la vasoinhibina se realizó mediante densitometría utilizando el software de análisis de imágenes Quantity One (Bio-Rad).

Los niveles séricos de VEGF se cuantificaron por medio de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) que reconoce la isoforma humana del VEGF-165 tanto natural como recombinante, con un coeficiente de variabilidad intra- e inter- ensayo de < 4.7% y < 8.1%, respectivamente.

VIII.2 ESTUDIO EXPERIMENTAL

VIII.2.1 Ratones

Todos los procedimientos con animales fueron realizados siguiendo los lineamientos éticos de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) y aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales fueron sacrificados por inhalación de Bióxido de Carbono y decapitación.

Se utilizaron ratones hembra CD1 cruzadas por primera vez que fueron monitoreadas diariamente para conocer la fecha y la hora del nacimiento de su camada. El día del parto se definió como día posnatal 0 (P0). En el día P1 el número de crías fue normalizado a 10 crías por madre. Se estimó un número similar de machos y hembras por camada debido a que en nuestro bioterio la proporción de machos: hembras es de 51:49 y la distribución de las madres y camadas por grupo se hizo en forma aleatorizada. Sin embargo, el sexo de las crías es una variable importante. Si bien se han obtenido resultados controversiales entre el sexo del bebé y el desarrollo de la ROP ³⁷, se conoce que el sexo fetal se puede asociar con niveles maternos elevados de factores proangiogénicos y proinflamatorios y, por ende, que el sexo pudiera influir sobre el desarrollo de la ROP ³⁸.

VIII.2.2 Evaluación de la vasculatura normal de la retina

Para poder definir los tiempos adecuados para visualizar el efecto de la PRL sobre la vascularización de la retina, inicialmente evaluamos la vascularización normal de la retina del ratón a lo largo de los primeros 8 días posteriores al nacimiento. Las retinas de 4 a 8 ratones fueron procesadas hacia montajes planos o congeladas para evaluar vasos sanguíneos por medio de inmunofluorescencia o RT-PCR tiempo real, respectivamente, como se describe más adelante.

VIII.2.3 Modelos murinos de antiangiogénesis inducida por hipoxia y pérdida de vasos sanguíneos

En el ratón la retina es esencialmente avascular al momento del nacimiento y, por ende, se considera un modelo de la retina de humanos prematuros ³⁹. Los vasos sanguíneos se originan a partir del nervio óptico y migran radialmente hasta completar la vasculatura en el día P8 ⁴⁰. La exposición a hiperoxia (75% de oxígeno) en el ratón neonato suprime la expresión de factores angiogénicos como el VEGF lo que limita el crecimiento y sobrevivencia de los vasos sanguíneos de la retina ⁴¹. Dado que la PRL y la vasoinhibina tienen efectos opuestos sobre la angiogénesis, el tratamiento de ratones neonatos con PRL podría resultar en efectos tanto angiogénicos como antiangiogénicos. Consideramos que la rápida expansión de los

vasos sanguíneos que tiene lugar en la retina bajo condiciones ambientales normales de oxígeno facilitaría la detección de acciones antiangiogénicas, mientras que posibles efectos proangiogénicos serían mejor visualizados a través de reducir la tasa de proliferación vascular mediante la hiperoxia.

Ratones recién nacidos y sus madres lactantes fueron expuestos a condiciones de hiperoxia (75% de niveles de O₂) previamente reportadas como efectivas para reducir la angiogénesis y la supervivencia vascular de la retina del neonato ⁴². Para esto la jaula, conteniendo a la madre y su camada, se introdujo dentro de una cámara de plexiglass acoplada a un tanque de oxígeno vía un controlador de entrada (ProOx 360; BioSpherix, Ltd., Lacona, NY). Por su parte, ratones recién nacidos controles y sus madres lactantes se mantuvieron en sus jaulas bajo aire ambiente (normoxia) fuera de la cámara de plexiglass. Se analizó el efecto de la hiperoxia y del tratamiento con PRL sobre dos etapas diferentes de vascularización retiniana: un estado tardío de P6 a P8 (grupo 1), cuando la tasa de vascularización del plexo primario es lenta; y un estadio temprano, de P2 a P5 (grupo 2), cuando el plexo vascular primario crece rápidamente ³⁹. La PRL (PRL ovina, Sigma-Aldrich; 2 µg/g de peso corporal) o el vehículo (0.9% NaCl) se inyectó intra-peritonealmente dos veces al día (8 am y 8 pm) de P5 a P8 en el grupo 1 o de P1 a P5 en el grupo 2. Las crías se sacrificaron 4 horas después de su primera inyección de PRL o vehículo en P8 (grupo 1) o P5 (grupo 2) y los ojos fueron procesados para inmunofluorescencia o RT-PCR tiempo real.

VIII.2.4 Inmunofluorescencia

Se obtuvieron montajes planos de retinas que se mantuvieron en metanol frío al menos 20 minutos antes de la inmunotinción de acuerdo al método descrito ⁴³. Las retinas se lavaron varias veces en PBS (pH 7.4) y se permeabilizaron y bloquearon con PBS, 1% Tritón X-100, 0.4% albúmina de suero bovino (BSA) y 10% de suero normal de cabra durante 48 h a 4°C. La inmunotinción se realizó durante 48 h a 4°C con una dilución 1:400 del anticuerpo poli-clonal anti-CD31 (ab28364, Abcam PLC, Cambridge, UK) diluido en PBS, 1% Tritón X-100 y 0.4% BSA. Al cabo de este tiempo las retinas se lavaron tres veces en PBS durante 15 minutos y se incubaron

toda la noche con una dilución 1:600 del anticuerpo secundario cabra anti-conejo-Alexa Fluor 555 (A32732, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) en 0.3% Tritón X-100, PBS. Las preparaciones se lavaron 3 veces en PBS, se montaron en laminillas utilizando Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se almacenaron protegidos de la luz a 4 °C. Los montajes planos de retina se observaron y digitalizaron a una magnificación de 10X bajo microscopía confocal (Zeiss LSM 780 DUO, Oberkochen, Alemania). Se tomaron varias imágenes hasta llegar a una imagen completa de toda la retina. La densidad de la red capilar se analizó a través de cuantificar el área fluorescente con respecto al área total de la retina mediante el programa Image ProPlus (Versión 7.0.0.591, Media Cybernetics, MD, USA). La ausencia de fluorescencia definió las áreas avasculares que se cuantificaron en la periferia y la retina central y se expresaron en relación al área total de la retina. La evaluación fue realizada por dos observadores cegados al experimento en montajes planos de 4 a 13 ratones.

VIII.2.5 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR)

El RNA total se aisló utilizando el estuche Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). El cDNA se sintetizó utilizando el estuche de retrotranscripción de alta capacidad (Applied Biosystems, Warrington, UK). Los productos de la PCR fueron cuantificados utilizando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Auburn, AL) en 10 µl de volumen final de reacción conteniendo una concentración 0.5 mM de cada uno de los siguientes pares de oligonucleóticos de ratón para CD-31: 5'-ATGACCCAGCAACATTCACA-3' y 5'-TCGACAGGATGGAAATCACA-3'; Receptor 2 VEGF (VEGFR2): 5'-GCCCTGCCTGTGGTCTCACTAC-3' y 5'-CAAAGCATTGCCCATTCGAT-3'; VEGF: 5'-CGCGAGTCTGTGTTTTTGCA-3' y 5'-CAGAGCGGAGAAAGCATTTGT-3'; p53: 5'-GAGTCACAGTCGGATATCAG -3' y 5'-AGCAACAGATCGTCCATGCA-3'; y hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (Hprt): 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3' y 5'-GTTGAGAGATCATCTCCACC-3'. Las condiciones de amplificación fueron de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de alineación específica para cada par de oligonucleótidos y 30

segundos a 72°C por 40 ciclos. Los datos de la PCR fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, los ciclos umbrales fueron normalizados con respecto al gen casero Hprt para calcular el nivel de expresión de mRNA. Los niveles absolutos de CT Hprt fueron similares ($P=0.397$) entre normoxia (21.38 ± 0.29 , $n = 8$) e hiperoxia (21.7 ± 0.27 , $n = 9$) y validaron la expresión estable de Hprt y su uso para normalización. La expresión de los distintos genes se comparó utilizando 4 a 15 animales por grupo.

VIII.2.6 PRL Sérica

Ratones en P5 fueron inyectados utilizando una dosis única de PRL ovina ($2 \mu\text{g/g}$ peso corporal) y sacrificados 10 min post-inyección. La PRL ovina se midió mediante el bioensayo de las células Nb2, un ensayo convencional que se basa en la acción específica que tiene la PRL sobre la proliferación de esta línea celular, y fue llevado a cabo de acuerdo al método publicado ⁴⁴. En ensayo se hizo específico para cuantificar a la PRL ovina (vs. la PRL de ratón) a través de bloquear la respuesta proliferativa celular mediante una dilución 1:500 de anti-suero anti-PRL ovina (IC1, NHPP, Torrance, CA) que no reconoce a la PRL de ratón en este ensayo.

VIII.2.7 Análisis Estadístico

El programa Sigma Stat 7.0 (Systat Software, San José, CA) se usó para el análisis estadístico de los grupos del estudio clínico. La prueba t de Student y la U de Mann-Whitney compararon dos grupos con una distribución normal y no normal, respectivamente. El nivel de asociación entre las variables numéricas y categóricas se determinó mediante el coeficiente de Pearson y la prueba chi-cuadrada, respectivamente. La prueba de Kruskal-Wallis se empleó como una prueba global para evaluar las diferencias longitudinales entre los tres grupos. Las diferencias específicas entre los tres grupos se analizaron mediante la ANOVA de una vía seguida de la prueba *post hoc* Bonferroni. Tablas de contingencia analizadas mediante la prueba exacta de Fisher determinaron riesgos relativos. El análisis de regresión logística multivariada mediante el programa MedCalc versión 16 evaluó la asociación de diferentes factores de riesgo con la ROP. El análisis estadístico del estudio experimental utilizó el software PRISMA 8 (GraphPath Software Inc, San

Diego, CA). Las pruebas de Brown-Forsythe y de Bartlett determinaron la distribución e igualdad de las varianzas. La ANOVA de dos vías seguida de la prueba Tukey post-hoc comparó diferencias entre 4 grupos. Tanto para el estudio clínico como para el experimental, el umbral de significancia fue para $P < 0.05$.

IX. RESULTADOS

IX.1. Estudio Clínico

La [Tabla 1](#) muestra las características demográficas y clínicas de los pacientes estudiados. La ROP se diagnosticó entre las semanas postnatales 3 y 9 (5 ± 1.5 (EEM) semanas, 95% CI:4.6-5.5) y se observó en 49 (54.4%) de los 90 niños del estudio. De éstos últimos, en 27 (55.1%) se encontró un etapa leve de ROP (14 etapa 1 y 13 etapa 2) y en 22 (44.9%) se encontró un ROP severo (etapa 3). Los grupos control y ROP fueron similares en edad gestacional, género, Apgar (5 min después del nacimiento), y tiempo de ventilación, pero fueron distintos en el peso al nacimiento ([Tabla 1](#)). La incidencia de sepsis mostró una tendencia mayor, si bien no significativa, en los niños que desarrollaron la ROP ([Tabla 1](#)). Los niveles circulantes de PRL durante la primera semana postnatal fueron significativamente mayores en el grupo que posteriormente desarrolló la ROP comparado al grupo control (106.2 ± 11.2 (EEM) vs. 64.7 ± 4.8 ng/mL, $P=0.001$). A pesar de que el bajo peso al nacer y los altos niveles de PRL estuvieron asociados con la ROP, no existió correlación entre el peso al nacimiento y los niveles de PRL cuando se consideraron a todos los pacientes (control y ROP; [Figura 9b](#)) ($r = 0.05$, $P = 0.63$), sugiriendo que no existe una relación causal entre el bajo peso al nacer y los niveles de PRL sérica.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes en el estudio. ROP leve corresponde a etapas 1 y 2, ROP severo a la enfermedad en etapa 3. Los valores son promedios +/- SEM. CI: intervalo de confianza.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de la población en estudio.

	Control (n=41)	95% CI	ROP (n=49)	95% CI	P
Edad gestacional (semanas)	30.8 ± 0.3	30.2 - 31.5	30.2 ± 0.3	29.7 – 30.8	0.16 ^a
Género F n (%)	20 (48.7)		26 (53.1)		0.83 ^b
Apgar (5 min)	8.28 ± 0.2	7.9 – 8.7	8.22 ± 0.1	8.0 – 8.5	0.77 ^c
Incubadora (días)	3.53 ± 0.9	1.6 – 5.4	6.54 ± 1.8	2.7 – 10.3	0.22 ^c
Peso al nacer (g)	1317 ± 34.9	1247 - 1388	1193 ± 35.8	1121- 1265	0.01 ^c
Sepsis n (%)	29 (70.7)		42 (85.7)		0.11 ^b
Diagnóstico de ROP (Semanas postnatales)			5 ± 1.5	4.6 – 5.5	
ROP leve (%)			27 (55.1)		
ROP grave (%)			22 (44.9)		

La ROP leve corresponde a las etapas 1 y 2 de la enfermedad, la ROP grave a la etapa 3 de la enfermedad. CI = Intervalo de confianza. Los valores son medias ± SEM. Los valores de P comparan los grupos control y ROP y son de t-test^a, χ^2 test^b, and Mann-Whitney U test^c.

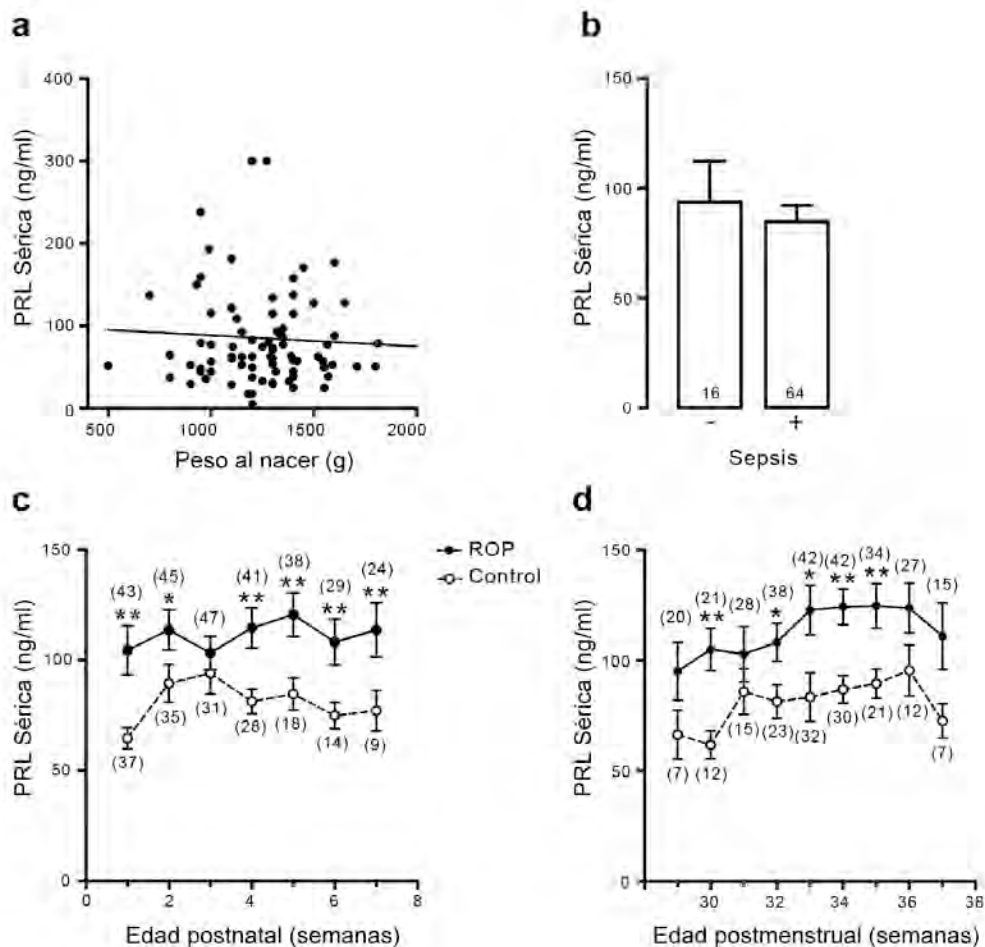


Figura 9. Niveles séricos más altos de prolactina (PRL) se asocian con la incidencia y progresión de la retinopatía del prematuro (ROP). (a) No existe correlación ($r = 0.05$, $P = 0.6$) entre los niveles séricos de PRL en la semana 1 posnatal y el peso al nacer en la población de estudio. (b) Los niveles séricos de PRL en la semana 1 posnatal son similares ($P = 0,66$) entre pacientes con o sin sepsis. Los valores son medias \pm EE. El número de pacientes (n) se indica dentro de las barras. Los niveles séricos de PRL son más altos a lo largo de las edades postnatales (c) y postmenstruales (d) de pacientes con ROP (círculos negros) en comparación con pacientes sin ROP (círculos blancos). Los valores son medias \pm EEM. El número de pacientes (n) se indica entre paréntesis. * $P < 0,04$ y ** $P < 0,005$ vs. pacientes sin ROP.

A su vez, los niveles de PRL sérica fueron similares entre los pacientes con o sin sepsis ($P = 0.66$; [Figura 9b](#)) a pesar de la tendencia de la sepsis a asociarse con la ROP.

Los niveles séricos de la PRL durante la semana posnatal 1 se correlacionaron con un mayor riesgo relativo de desarrollar la ROP ([Tabla 2](#)). Al comparar los umbrales del cuartil de PRL inferior con el del superior, el riesgo relativo aumentó de 1.3 a 1.95, con un incremento en el riesgo relativo entre cada umbral. En los niveles mas altos de PRL, el riesgo de desarrollo de ROP se duplicó ([Tabla 2](#)).

Tabla 2. Niveles séricos de PRL y riesgo relativo de ROP

PRL sérica (ng/ml) en semana postnatal 1	Riesgo relativo	95% CI	P
> 60	1.33	0.86 - 2.06	0.256
> 80	1.55	1.06 - 2.28	0.038
> 100	1.63	1.14 – 2.34	0.023
> 120	1.95	1.41 – 2.68	0.002

Los valores de P son tablas de contingencia de formulario analizadas con la prueba exacta de Fisher.

Lo siguiente que se investigó fue si el valor predictivo de la PRL sistémica durante la primera semana de vida se asocia con el valor predictivo de las variables de riesgo conocidas para el desarrollo de la ROP, esto es: bajo peso al nacer, edad gestacional corta, bajo índice Apgar, sepsis, y tiempo prolongado de ventilación^{28,45}. Para esto se realizó un análisis multivariado de regresión donde se ingresaron los niveles de PRL de la primera semana de nacimiento junto con los factores de riesgo ya descritos ([Tabla 3](#)).

Tabla 3. Análisis multivariado que muestra la relación de variables independientes con el riesgo de ROP en bebés con ROP y controles.

Variable independiente	OR	95% CI	P
Edad gestacional	0.926	0.624 - 1.375	0.704
Apgar (5 min)	2.209	0.954 - 5.117	0.064
Tiempo incubadora	1.037	0.890 - 1.209	0.640
Peso al nacer	0.999	0.996 - 1.003	0.675
Sepsis	0.555	0.150 - 2.060	0.379
PRL	1.016	1.003 - 1.029	0.013

Los valores de P provienen del análisis de regresión logística condicional multivariada.

Este análisis mostró que los niveles elevados de PRL en la semana posnatal 1 se correlacionaron significativamente ($P = 0.013$) con la ocurrencia de la ROP pero no las otras variables independientes (Tabla 3), sugiriendo que los altos niveles sistémicos de PRL por si solos son un factor de riesgo para ROP. Los niveles circulantes de PRL fueron mas elevados en el grupo con ROP durante la semanas 1, 2 y 4 a 7 (Figura 9c). De igual manera, los niveles de PRL se observaron elevados en las semanas 30 y 32 a 35 de edad postmenstrual en los bebés con ROP (Figura 9d). Estos hallazgos sugieren que el tiempo posterior al nacimiento, mas que el desarrollo del bebé, es el principal factor que influye sobre los altos niveles circulantes de la PRL en la ROP. La ROP fue diagnosticada alrededor de la semana 5 posnatal (Tabla 1), esto es, alrededor de la semana 35 de edad postmenstrual, los niveles de PRL circulantes elevados precedieron y coexistieron con la aparición de ROP.

Los niveles longitudinales de la PRL sérica en diferentes estadios de la ROP (control, leve, y severo) se muestran en la (Figura 10).

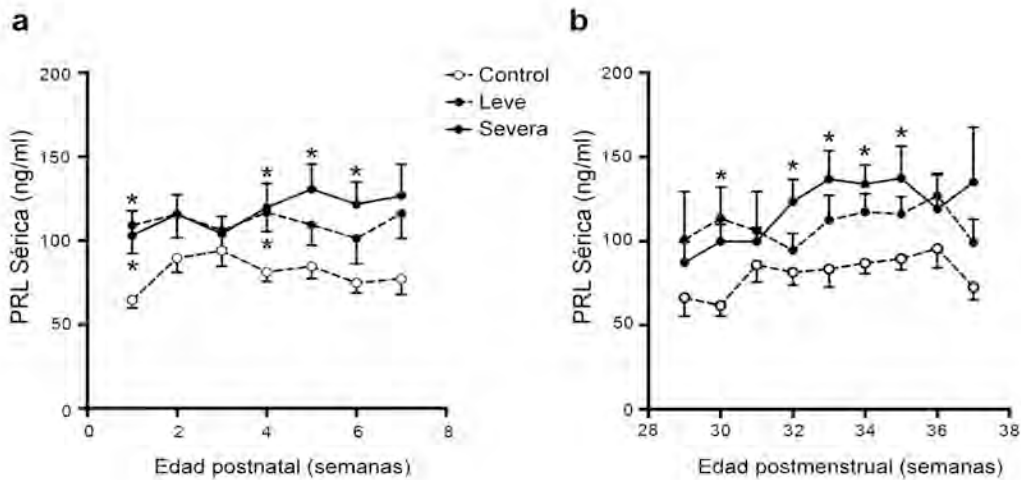


Figura 10. Los niveles de prolactina (PRL) permanecen más altos durante más tiempo en la ROP severa vs. leve. Los niveles séricos de PRL a lo largo de la edad postnatal (a) y de la edad postmenstrual (b) en pacientes con ROP vs. pacientes sin ROP es función de la gravedad de la enfermedad. Los círculos negros y la línea continua indican valores de PRL en ROP severa; los círculos negros y la línea discontinua indican valores de PRL en ROP leve; y los círculos blancos y la línea discontinua indican valores de PRL en pacientes sin ROP. La ROP severa corresponde a la etapa 3 de la enfermedad y la ROP leve corresponde a las etapas 1 y 2 de la enfermedad. Los valores son medias \pm EEM. El número de pacientes con ROP severa, leve y sin ROP a diferentes edades posnatales son: semana 1 (21,22,37), semana 2 (22,23,35), semana 3 (21,26,31), semana 4 (19,22,28), semana 5 (20,18,18), semana 6 (14,15,14) y semana 7 (9,12,12). El número de pacientes con ROP severa, leve y sin ROP a diferentes edades postmenstruales son: semana 29 (13,7,7), semana 30 (13,8,12), semana 31 (14,14,15), semana 32 (18,20,23), semana 33 (18,24,32), semana 34 (18,24,30) y semana 35 (14,20,21), semana 36 (11,16,12), y semana 37 (5,10,7). * $P < 0.04$ vs. sin ROP.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró valores de P de 0.0001 y 0.0002 a lo largo de la edad posnatal y la edad postmenstrual, respectivamente, indicando diferencias longitudinales en los "niveles de PRL promedio" entre los tres grupos. La ANOVA de una vía con la aplicación de la prueba de corrección de Bonferroni, demostró

diferencias significativas entre ROP-leve y el grupo control a las semanas posnatales 1 y 4, mientras que en el grupo con ROP severo los valores fueron distintos con respecto al control en las semanas posnatales 1, 4, 5, y 6 (Figura 10a). Igualmente, las diferencias entre ROP-leve y su control fueron significativas únicamente en la semana postmenstrual 30, mientras que ROP-severo y el grupo control fueron significativamente diferentes en la semana postmenstrual 32, 33, 34 y 35 (Figura 10b). El hecho de que la PRL sérica fué significativamente mas alta por mayor tiempo en el ROP-severo sugiere que los niveles de PRL aumentan con el empeoramiento de la enfermedad.

Posteriormente, medimos los niveles de vasoinhibina en la circulación del grupo control y del grupo ROP. Las muestras séricas del grupo control y del grupo ROP fueron inmunoprecipitadas para la detección de vasoinhibina en las semanas posnatales 1, 2, 4, y 6 y se muestran imágenes representativas del Western Blot en la Figura 11. Como era esperado ³⁴, las cadenas ligeras de las moléculas de inmunoglobulinas, que tienen una masa de 25 kDa interfieren con la detección de la PRL completa que tiene una masa de 23 kDa. Los sueros mostraron proteínas de 14 y de 16 kDa con inmunoreactividad de PRL (contienen el extremo N-terminal de la PRL que es reconocido por el anticuerpo monoclonal utilizado) que podrían corresponder a isoformas de la vasoinhibina, cuyo rango en tamaño es de 11 - 18 kDa y que contienen la región N-terminal de la PRL ³⁶. El valor densitométrico combinado de las dos vasoinhibinas medidas en la primera semana posterior al nacimiento fueron significativamente mas alto (P = 0.03) en niños que posteriormente desarrollaron ROP comparado con pacientes control (Figura 11a).

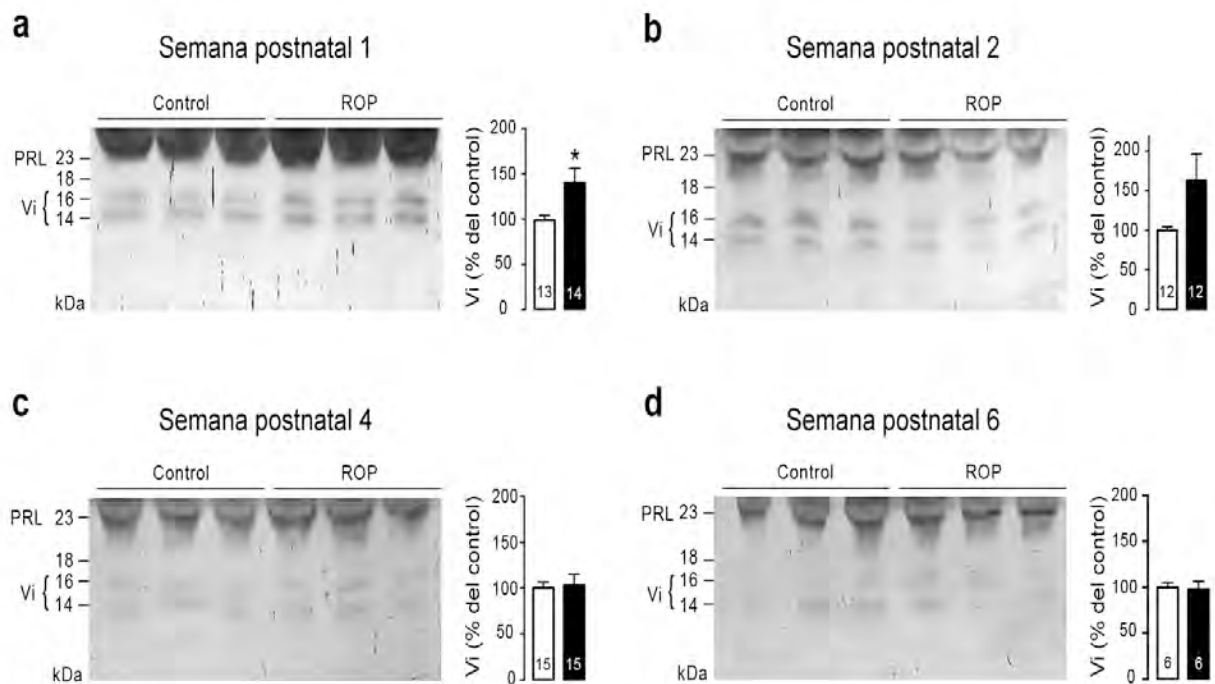


Figura 11. Los niveles de vasoinhibina se encuentran elevados durante la primera semana post-nacimiento en pacientes con ROP. Western blots representativos que evalúan a vasoinhibinas (Vi) en muestras de suero de tres pacientes sin ROP (control) y tres pacientes con ROP en las semanas postnatales 1 (a), 2 (b), 4 (c) y 6 (d). Las muestras de suero se inmunoprecipitaron con un antisuero anti-PRL y se analizaron por Western blots revelados con un mAb anti-Prolactina (PRL) que reacciona con el extremo N-terminal de la hormona. Los números en el lado izquierdo indican la masa molecular de la PRL completa (23 kDa) y de vasoinhibinas de 18, 16 y 14 kDa. Los gráficos de barras a la derecha muestran los valores densitométricos combinados (medias \pm EEM) de las dos isoformas de vasoinhibina (16 y 14 kDa) detectadas en pacientes que desarrollaron ROP, expresadas como un porcentaje de las presentes en el grupo de control. El número de pacientes se indica dentro de las barras. * $P < 0.03$ vs. control.

En contraste, las concentraciones de las dos vaso inhibinas fueron similares entre el grupo control y el grupo con ROP en las semanas postnatales 2 ($P = 0.08$), 4 ($P = 0.84$) y 6 ($P = 0.83$) (Figura 11b, c). Estos hallazgos sugieren que la vaso inhibina sistémica aumenta durante la primera semana del nacimiento en asociación con el desarrollo posterior de la ROP.

El VEGF se encuentra presente en la circulación de los neonatos ⁴⁶, aumenta en el vítreo de los pacientes con ROP ⁴⁷, y posee un papel crucial en el desarrollo y la progresión de la ROP ²⁸⁻³⁰. Sin embargo, en el presente estudio, el grupo control y el grupo de ROP presentaron niveles circulantes similares de VEGF a lo largo de las 6 semanas de edad posnatal (Figura 12).

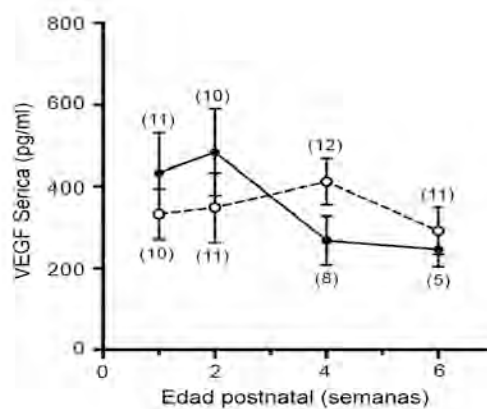


Figura 12. Los niveles séricos de VEGF no cambian en pacientes con ROP. Niveles séricos de VEGF (medias \pm EEM) evaluados por ELISA en pacientes sin ROP (círculos blancos) y ROP (círculos negros) en las semanas postnatales 1, 2, 4 y 6. El número de pacientes se indica entre paréntesis.

IX.2. Estudio experimental

La inmunotinción de los vasos sanguíneos de montajes planos de retina confirmó el patrón de desarrollo de la vasculatura del ratón recién nacido ⁴⁰ (Figura 13a).

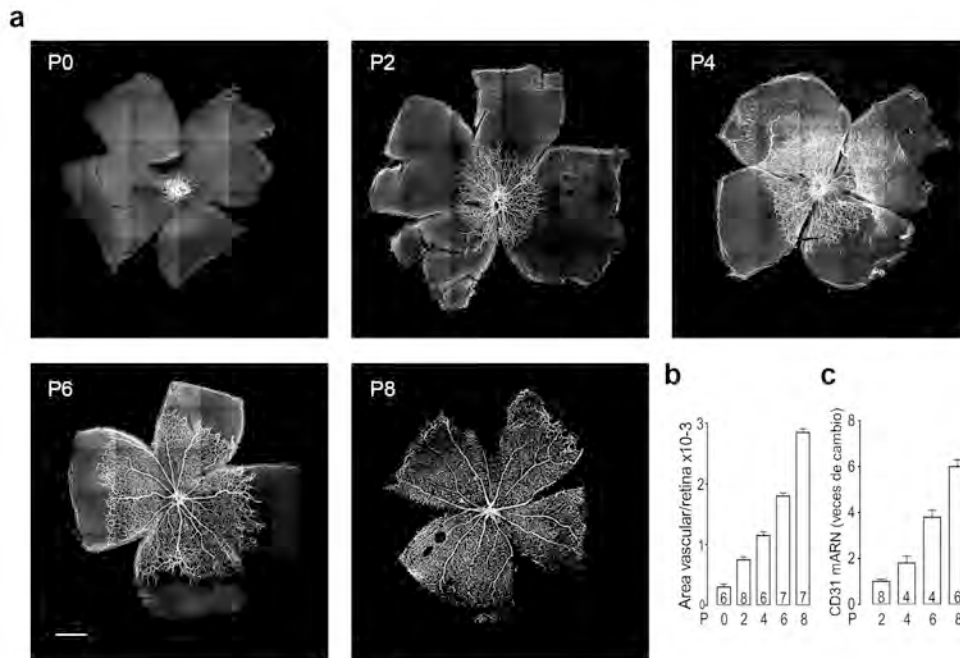


Figura 13. a. Desarrollo de vasculatura retiniana del ratón en preparaciones de montaje plano de retina marcadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra CD-31. Montajes planos representativos obtenidos de ratones el día del nacimiento [día posnatal 0 (P0)] y en P2, 4, 6 y 8. La escala corresponde a 500 µm. b. Área de la retina que contiene la señal de fluorescencia vascular en relación a la área total de la retina. c. Valoración mediante qRT-PCR de los niveles del ARNm de CD-31 en retinas de P0 a P8. Los valores representan la media \pm EEM. Los números dentro de las barras indican el número de retinas evaluadas, cada una de un animal independiente.

La retina del ratón prácticamente carece de vasos sanguíneos al nacer (P0). La red vascular primaria se origina en la cabeza del nervio óptico, migra radialmente hasta abarcar la mitad de la superficie interna de la retina en P4 y alcanza la periferia alrededor del P8 (Figura 13a). La cuantificación del área vascular de la retina (Figura

13b) y del nivel de expresión del marcador del endotelio vascular, CD-31, (Figura 13c) confirmaron estas diferencias y validaron el uso de ambos parámetros para evaluar la vascularización de la retina neonatal en el ratón.

De los hallazgos anteriores, seleccionamos una etapa tardía y una temprana para estudiar si el tratamiento con PRL modifica la vascularización de la retina bajo hiperoxia y normoxia. En la etapa tardía (P6 a P8), cuando la vascularización se lentifica a medida que los nuevos vasos sanguíneos alcanzan la periferia retiniana, las camadas fueron expuestas a hiperoxia o normoxia y recibieron dos inyecciones diarias de PRL o vehículo del P5 al P8. Los animales se sacrificaron en P8. Se verificó la eficacia del tratamiento con PRL para inducir hiperprolactinemia a través de evaluar los niveles de PRL en un grupo de ratones en P5 sacrificados 10 minutos después de recibir una sola inyección de PRL. El tratamiento con PRL elevó los niveles séricos de la hormona a 726 ± 63 ng/ml ($n = 9$). Debido a que la vida media de la PRL es de alrededor de 40 minutos⁴⁸, estimamos que las inyecciones de PRL durante los dos días mantendrían valores de hiperprolactinemia (> 20 ng/ml) al menos durante 8 horas cada día.

La exposición a hiperoxia de P6 a P8 interfirió con la vascularización de la retina periférica retiniana y produjo la pérdida de vasos sanguíneos en la retina central (Figura 14a).

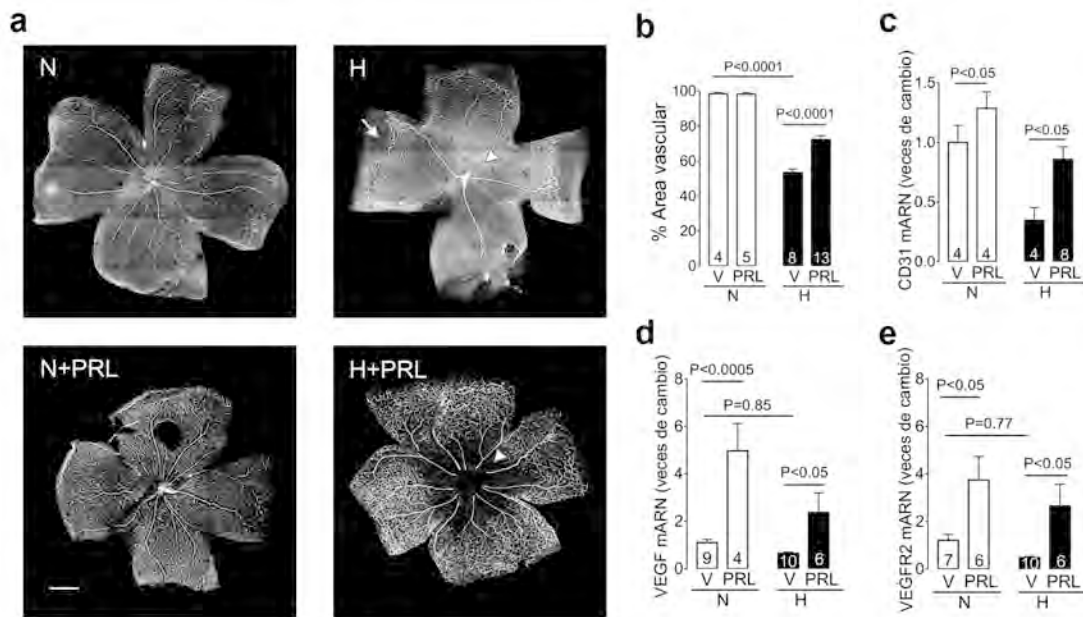


Figura 14. La PRL reduce la inhibición inducida por la hiperoxia de la angiogénesis retiniana en el día postnatal (P) 8. a. Micrografías representativas que muestran la vascularización en montajes planos de retina de ratones recién nacidos expuestos a normoxia (N) o hiperoxia (H) del P6 al P8 y sometidos al tratamiento sistémico con PRL (PRL) o vehículo (V) de P5 a P8. Los vasos sanguíneos se revelaron mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo contra CD-31, un marcador de células endoteliales. La escala denota 500 μ m. Se indican las áreas avasculares periféricas (flecha) y centrales (punta de flecha). b. Área de la retina que contiene la señal de fluorescencia vascular en relación al área total de la retina. Valoración de la vasculatura basada en la cuantificación por RT-PCR de los niveles del ARNm de CD-31 (c), VEGF (d) y VEGFR2 (e) en retinas en P8. Los valores representan la media \pm EEM. Los números dentro de las barras indican el número de retinas evaluadas, cada una de un animal independiente.

Estos cambios representaron reducciones del 53% y 72% en el área vascular retiniana (Figura 14b) y en la expresión de CD-31 (Figura 14c), respectivamente. El tratamiento con PRL no modificó la vascularización de la retina bajo normoxia, pero redujo la inhibición del crecimiento vascular inducida por la hiperoxia (Figura 14a), de

modo que bajo hiperoxia, el área vascular retiniana total aumentó y los niveles de expresión de CD-31 fueron más altos que en los controles tratados con vehículo (Figura 14b, c). Además, la PRL estimuló la expresión retiniana del VEGF y del receptor 2 del VEGF (Figura 14e) bajo hiperoxia pero también bajo condiciones de normoxia.

- **La PRL redujo la pérdida de vasos sanguíneos inducida por la hiperoxia en la retina periférica de ratones neonatos en P8**

La localización del efecto de la PRL se estudió en P8 a través de cuantificar las áreas avasculares de la retina (Figura 15). El tratamiento con PRL redujo el área avascular de la retina (Figura 15a), esencialmente a expensas de la retina periférica, donde la avascularidad fue significativamente menor que en el grupo control tratado con vehículo (Figura 15b). El área avascular central de la retina no fue diferente entre los animales tratados con PRL y con vehículo (Figura 15c). No obstante, se conoce que la avascularidad de la retina central en respuesta a la hiperoxia se debe a la regresión por apoptosis de los vasos sanguíneos^{49,50} y la PRL inhibió el efecto estimulador de la hipoxia sobre la expresión del factor pro-apoptótico p53 (Figura 15d).

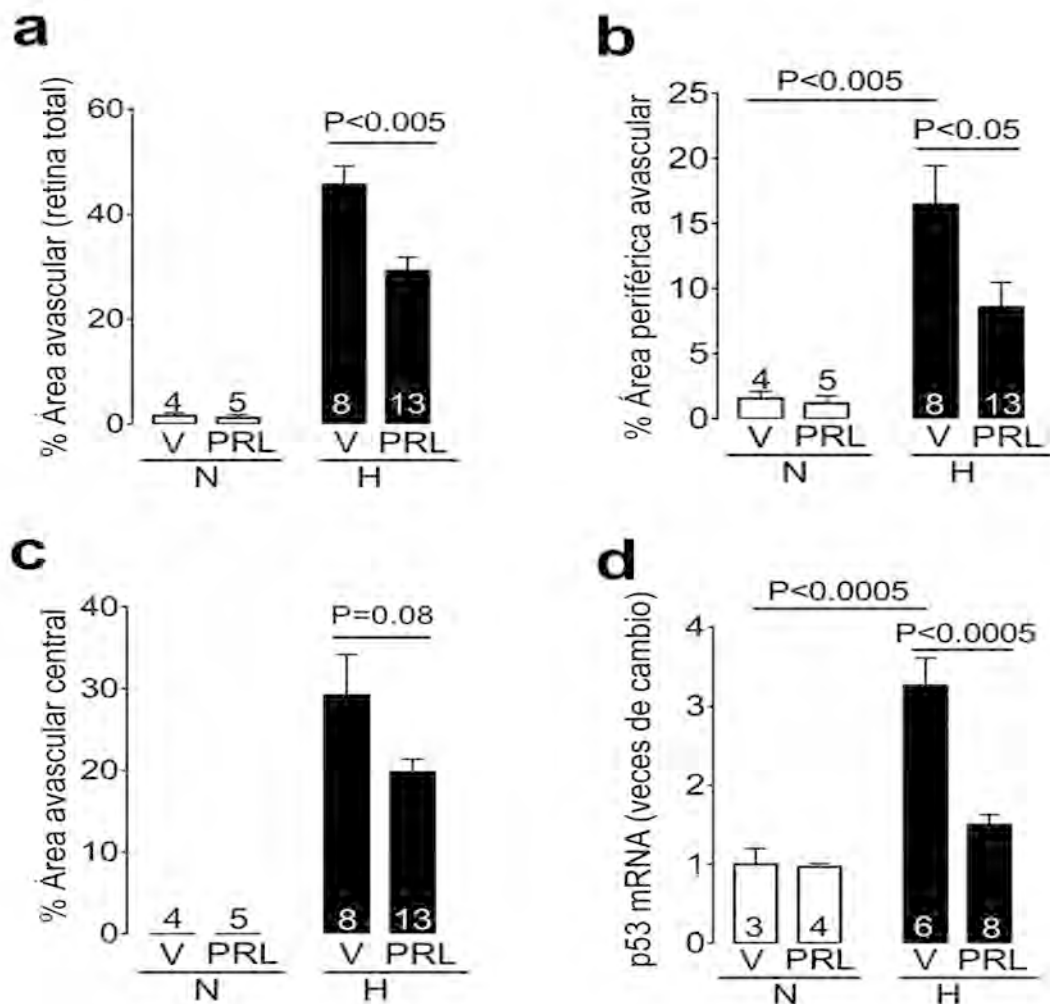


Figura 15. La PRL reduce la inhibición de la angiogénesis periférica en respuesta a la hiperoxia en el día posnatal (P) 8. Área retiniana total (a), periférica (b) y central (c) que carecen de la señal de fluorescencia vascular en relación al área total de la retina. Los vasos sanguíneos se revelaron mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo contra CD-31, un marcador de células endoteliales, en montajes planos de retina de ratones recién nacidos expuestos a hiperoxia (H) o normoxia (N) del P6 a P8 e inyectados sistémicamente con PRL (PRL) o vehículo (V) del P5 a P8. d. Cuantificación por qRT-PCR de los niveles del ARN mensajero del factor proapoptótico p53. Los valores representan la media \pm EEM. Los números dentro de las barras indican el número de retinas evaluadas, cada una de un animal independiente.

- **La PRL redujo la pérdida de vasos sanguíneos inducida por hiperoxia en la retina central de ratones neonatos en P5**

En la etapa temprana (P1 a P5), cuando los capilares retinianos están creciendo rápidamente⁴⁰, las camadas fueron expuestas a hiperoxia o normoxia del P2 al P5 y recibieron dos inyecciones diarias de PRL o vehículo antes (en P1) y durante la exposición a hiperoxia / normoxia. La hiperoxia causó la pérdida de capilares en la retina central, pero su influencia en la vascularización periférica no fue evidente (Figura 16a).

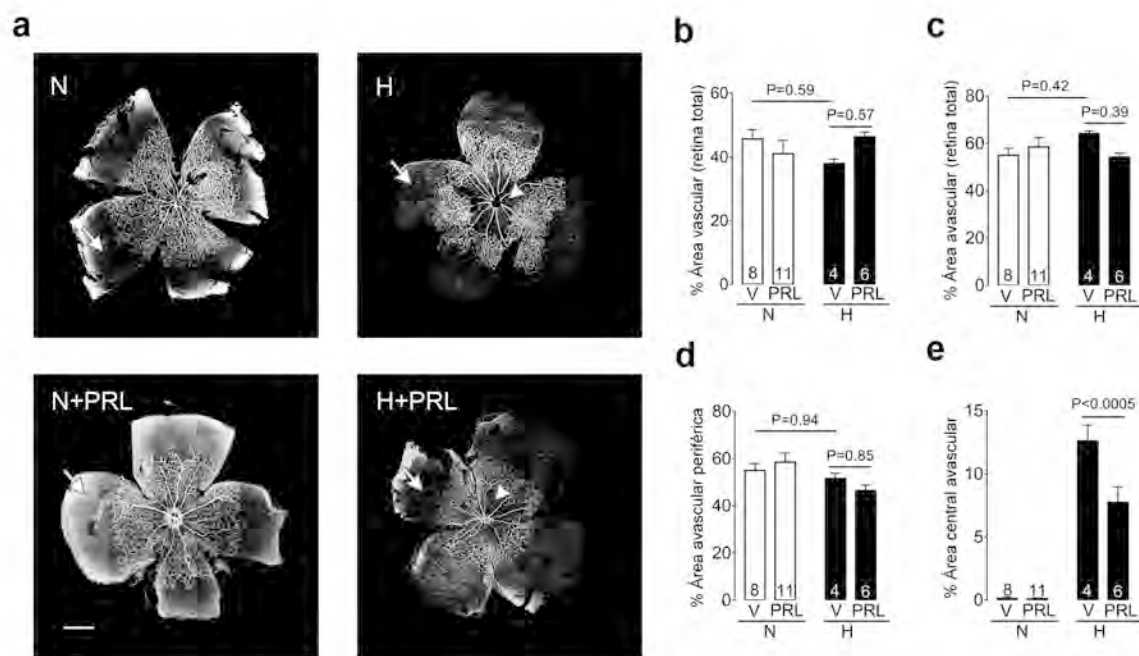


Figura 16. La PRL reduce la pérdida de vasos sanguíneos inducida por la hiperoxia en la retina central en el día postnatal (P) 5. a. Micrografías representativas que muestran la vascularización de montajes planos de retinas en ratones recién nacidos expuestos a normoxia (N) o hiperoxia (H) de P2 a P5 y sometidos al tratamiento sistémico con PRL (PRL) o vehículo (V) de P1 a P5. Los vasos sanguíneos se marcaron por inmunofluorescencia con un anticuerpo contra CD-31. La escala denota 500 μ m. Se indican las áreas avasculares periféricas (flecha) y centrales (punta de flecha). b. Área de la retina con señal de fluorescencia vascular en relación al área total de la retina. Área retiniana total (c), periférica (d) y central (e) que carecen de la señal de fluorescencia vascular en relación al área total de la retina. Los valores representan la

media \pm EEM. Los números dentro de las barras indican el número de retinas evaluadas, cada una de un animal independiente.

El área central afectada representa una pequeña proporción ($12 \pm 3.4\%$) de toda la retina (Figura 16e). No hubo diferencias en la vascularización (Figura 16b) y la avascularidad (Figura 16c) de toda la retina y en la avascularidad de la retina periférica (Figura 16d) entre las condiciones de hiperoxia y normoxia en ausencia o presencia de PRL. Sin embargo, el tratamiento con PRL redujo la pérdida de vasos sanguíneos inducida por la hiperoxia en la retina central, de modo que el área avascular retiniana central por efecto de la PRL (Figura 16 a y e).

X. DISCUSIÓN

El estudio clínico evaluó los niveles circulantes de la hormona proangiogénica PRL y de su metabolito antiangiogénico (vasoinhibina) antes y durante la manifestación clínica de la ROP. Encontramos que la PRL se incrementa significativamente tanto antes como durante la ROP, mientras que las vasoinhibina solo se eleva antes de la ROP, lo que muestra una alteración del eje PRL/vasoinhibina consistente con la promoción de las fases avascular inicial y vascular tardía de la enfermedad. Estos hallazgos sugieren que la determinación sérica de la PRL y de la vasoinhibina durante la primera semana de vida tiene valor en la predicción de la ROP y que estas hormonas participan en la progresión de la enfermedad en función de sus acciones opuestas sobre la angiogénesis ocular.

La PRL se eleva progresivamente en la sangre tanto materna como fetal durante el embarazo y alcanza valores máximos (alrededor de 200 ng/mL) al término del mismo ^{51,52}. Además, la decidua produce PRL que se acumula en el líquido amniótico en niveles 10 a 100 veces mayores a los presentes en la circulación de la madre o en la circulación fetal ⁵³. Por su parte, la placenta humana procesa a la PRL hacia vasoinhibina ³⁴ y la vasoinhibina está presente tanto en la circulación materna como en el líquido amniótico al fin de la gestación ³⁴. Los bebés prematuros poseen niveles circulantes menores de PRL en comparación con los bebés a término y ésta diferencia desaparece entre el día posnatal 4 y la semana posnatal 6, momento en que los valores de PRL se reducen en el bebé a término, pero no en los bebés prematuros.

Nuestro trabajo confirma la hiperprolactinemia sostenida reportada durante las primeras 6 semanas de vida en los bebés prematuros y muestra que los niveles de PRL son aún mayores en los bebés prematuros que eventualmente desarrollarán ROP. El género, la edad gestacional, el Apgar, la sepsis y el tiempo de ventilación, no parecen estar correlacionados con los niveles de PRL ya que todos estos parámetros fueron similares entre los pacientes con y sin ROP. A su vez, el valor de

la PRL sérica durante la primera semana de vida no se correlacionó con el peso al nacimiento ni con la presencia de sepsis, lo que sugiere que el aumento de PRL circulante que tiene lugar en los pacientes que desarrollarán ROP no depende del crecimiento fetal ni del estrés ocasionado por la sepsis. La falta de correlación entre el nivel circulante de la PRL y el peso al nacimiento, sexo, y Apgar no es inesperada⁵⁴, pero niveles bajos de PRL han sido asociados con la necesidad de administrar respiración asistida en neonatos prematuros⁵⁵. En este contexto, la edad gestacional, el peso al nacimiento, la sepsis, el Apgar y la duración de la ventilación son factores de riesgo conocidos para el desarrollo de la ROP^{28,45}. Sin embargo, el ajuste de estas variables a través del análisis de regresión logística mostró que el nivel de PRL durante la primera semana de vida fue la única variable independiente asociada con la ROP en nuestro estudio. Además, el riesgo relativo de ROP a lo largo de las categorías del cuartil de la PRL fue lineal, v.gr. se observaron diferencias estadísticas con cada incremento en los valores umbral de la PRL y el cuartil superior mostró el doble del riesgo de desarrollar la ROP. De acuerdo a este análisis se sugiere que la PRL por si misma es una variable predictiva de riesgo para la ROP.

De hecho, valores sistémicos elevados de PRL pudieran impactar la aparición y la progresión de la ROP. Los niveles de la PRL fueron significativamente mayores en los pacientes con ROP que en el grupo control durante la primera (vasoinhibitoria) y la segunda (vasoproliferativa) fases del padecimiento, esto es en la semanas postmenstruales 30 y 32 a la 35, respectivamente. Además, los niveles de PRL permanecieron elevados por un tiempo mayor en pacientes con estado severo que con el estado leve de la enfermedad, implicando que los niveles de PRL aumentan conforme la enfermedad empeora. Debido a que la PRL puede tanto inhibir como estimular la proliferación y la regresión de los vasos sanguíneos, sus niveles elevados en pacientes con ROP pudieran contribuir tanto a la fase proliferativa como a la fase inhibitoria del padecimiento. Los efectos opuestos sobre la angiogénesis se explican a través del eje de PRL/ vasoinhibina. La PRL estimula la vascularización pero puede ser proteolíticamente modificada a vasoinhibina, un fragmento de la PRL con efectos antiangiogénicos. La conversión de PRL a vasoinhibina tiene lugar en la

hipófisis y en los órganos blanco, donde la PRL y la vasoinhibina activan distintos complejos de receptores y vías de señalización para estimular e inhibir el crecimiento y la supervivencia de los vasos sanguíneos ^{5,36}.

La vasoinhibina (isoformas de 14 y 16 kDa) se detectaron en todas las muestras sanguíneas de los niños prematuros, tal vez debido a que los altos niveles de la PRL circulante durante el periodo neonatal favorecen su generación. Sin embargo, a pesar de que los niveles de PRL fueron mas altos durante la ROP, la vasoinhibina aumentó significativamente únicamente durante la primera semana de vida postnatal que corresponde a la fase inhibitoria de la ROP. Lo anterior sugiere que en la fase temprana de la enfermedad se favorece el corte de la PRL a vasoinhibina y que la vasoinhibina, entonces generada, puede contribuir a la interrupción y regresión de la vasculatura normal que da lugar al inicio de la enfermedad.

La neutralización de la vasoinhibina mediante la administración intravítrea de anticuerpos anti-PRL reduce la regresión vascular mediada por apoptosis de los vasos hialoideos en ratones neonatos ³³ y la transferencia génica de vasoinhibina utilizando vectores adenovirales inhibe la angiogenesis en el modelo de la ROP en el ratón ⁵⁶. Además, la expresión de metaloproteasas de matriz (MMP) 2 y 9 aumenta en el ojo antes de la fase vasoproliferativa del modelo experimental de la ROP en el ratón ^{57,58} y varias MMP, incluyendo la MMP-2 y la MMP-9 procesan a la PRL a vasoinhibina ⁵⁹. La catepsina D, que también genera a la vasoinhibina ³⁵, está presente en varios compartimentos oculares ⁶⁰ y disminuye en la circulación de pacientes con retinopatía diabética ⁶¹. El hecho de que la vasoinhibina no aumente durante la fase vasoproliferativa de la ROP, sugiere que la actividad de las proteasas de PRL disminuye en ésta segunda fase y que, a la par de los niveles elevados de la PRL, favorece la acción proangiogénica de la PRL.

El estudio clínico presentó varias limitaciones. El número analizado de pacientes con ROP y sin ROP fue pequeño y presentó características clínicas y demográficas similares, lo cual posiblemente enmascaró el impacto de los factores de riesgo conocidos sobre el desarrollo de la ROP. Si bien, las asociaciones del riesgo relativo son robustas, el análisis utilizando cortes de cuartiles específicos impide relacionar

niveles específicos de PRL con el riesgo. A su vez, el número reducido de pacientes posterior a la estratificación de ROP y la falta de pacientes con mayores niveles de severidad (estadio 4 y 5) limitaron el poder estadístico requerido para realizar afirmaciones definitivas en relación a la progresión de la enfermedad. Otra importante limitación de nuestro trabajo fue la ausencia de un ensayo cuantitativo para medir a la vasoinhibina. El ensayo de quimioluminiscencia inmunométrico empleado para medir PRL esencialmente mide esta hormona pero no a la vasoinhibina, debido a que la vasoinhibina tienen poca (<10%) inmunoreactividad en éste y en otros inmuno-ensayos cuantitativos de PRL ⁶². Ante la ausencia de un ensayo cuantitativo para determinar a la vasoinhibina, sus niveles séricos solo pueden ser detectados semi-cuantitativamente por inmunoprecipitación seguida de Western-blot y densitometría. Esta metodología reveló vasoinhibinas de 14 y 16 kDa, que son las isoformas de la vasoinhibina mejor caracterizadas ^{5,36}. Sin embargo, diferencias pequeñas, pero significativas pudieran haber escapado la detección con esta técnica. Finalmente, si bien la incorporación de la PRL circulante al ojo ^{63,64} y sus efectos sobre la vasculatura ^{7,56,63,65,66} y el tejido neural ⁶⁷ de la retina de animales adultos ya se han mostrado, no existe suficiente información de estos procesos en el neonato. El estudio del efecto de elevar los niveles circulantes de la PRL sobre el desarrollo vascular de la retina en ratones neonatos podrían aclarar muchos de estos conceptos.

El desarrollo de la vasculatura de la retina en los roedores recién nacidos constituye un buen modelo para estudiar el efecto de factores angiogénicos y antiangiogénicos ya que este proceso puede ser fácilmente visible y se puede modificar en períodos cortos de tiempo. Además, estudiar la regulación del desarrollo vascular de la retina es de importancia en el contexto de las retinopatías donde la excesiva vascularización de la retina es causa de ceguera. El eje PRL/vasoinhibina representa un sistema eficiente para la regulación de los vasos sanguíneos oculares de roedores adultos ³¹ pero hay poca información sobre su influencia en la condición neonatal. Este trabajo de tesis muestra que el tratamiento con PRL estimula la proliferación y supervivencia de los vasos sanguíneos de la retina del ratón recién nacido expuesto a altos niveles de oxígeno. Esta observación sugiere que la PRL

puede participar promover la angiogénesis fisiológica y patológica de la retina neonatal.

La cuantificación de las áreas vasculares y avasculares de la retina de los ratones recién nacidos expuestos a hiperoxia durante solo dos días (de P6 a P8) mostró una reducción de la angiogénesis periférica y la pérdida de vasos sanguíneos centrales. Estas lecturas nos permitieron mostrar que la administración sistémica de PRL reduce el efecto de la hiperoxia a través de promover el crecimiento de los vasos radiales interrumpidos por la hiperoxia, de modo que, bajo el tratamiento con la PRL, los vasos sanguíneos alcanzaron el borde de la retina en P8 como ocurre bajo normoxia. La acción proangiogénica de PRL fue también cuantificada a través de evaluar la expresión de CD-31, un marcador de células endoteliales que aumenta con la densidad vascular, y la expresión retiniana del factor angiogénico VEGF y de su receptor 2.

Estos hallazgos son consistentes con evidencias que muestran que la PRL promueve indirecta y directamente la angiogénesis a través de inducir la síntesis de VEGF y la estimulación de la proliferación, migración y capilarización de células endoteliales a través de la activación de diferentes vías de señalización, incluida su vía canónica JAK2-STAT5^{5,31}. Sin embargo, la PRL también estimuló la expresión de VEGF y del VEGFR2 bajo condiciones de normoxia, cuando esta hormona no modificó la angiogénesis retiniana. La razón de esta discrepancia no es clara, pero la falta de efecto de PRL sobre la angiogénesis puede estar relacionada con el alto nivel de vascularización retiniana que ocurre en la retina en desarrollo bajo condiciones de oxígeno ambiental. La PRL estimula la angiogénesis en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo en el estado de no-crecimiento de los vasos sanguíneos pero no en su estado proliferativo^{68,69}. Además, en una etapa anterior del desarrollo de la retina (P2 a P5), cuando el plexo vascular se expande rápidamente, la exposición a la hiperoxia ocasiona la regresión de los vasos centrales de la retina pero no interrumpe la angiogénesis periférica. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte que aborda el efecto a corto plazo de la hiperoxia antes de P7. Nuestros hallazgos muestran que, en el ratón, la angiogénesis retiniana

es resistente a la acción de factores ambientales externos (PRL e hiperoxia) pronto después del nacimiento durante la fase vasoproliferativa más activa.

El efecto estimulador de la PRL sobre el VEGF y VEGFR2 bajo condiciones de normoxia pudiera asociarse con otras acciones biológicas. El VEGF señala a través del VEGFR2 para promover la supervivencia vascular y neuronal en la retina en desarrollo ⁷⁰; la PRL es un factor de supervivencia para diferentes células de la retina, incluidos los fotorreceptores ⁶⁷ y el epitelio pigmentario ⁷¹; y la PRL parece promover la supervivencia de los vasos sanguíneos en la retina central después de exposición a hiperoxia (resultados de esta tesis). La hiperoxia promueve la regresión, vía apoptosis, de los vasos sanguíneos en el centro de la retina debido al daño oxidativo directo ⁵⁰ e, indirectamente, debido a la regulación negativa de VEGF ⁴⁹. El tratamiento con PRL (de P5 a P8) reguló a la baja la expresión retiniana del factor antiapoptótico p53 y estimuló la expresión de VEGF, que sin embargo no rescató la pérdida de la vasculatura central. Sin embargo, el tratamiento con PRL redujo la pérdida de vasos sanguíneos inducida por la hiperoxia en una etapa anterior (de P2 a P5). En conjunto, nuestros hallazgos muestran que el tratamiento con PRL estimula el crecimiento y la supervivencia de los vasos sanguíneos en la retina en desarrollo después del nacimiento.

A diferencia del recién nacido, la hiperprolactinemia inhibe los vasos sanguíneos retinianos en el adulto. El aumento de los niveles circulantes de PRL previene la vasopermeabilidad excesiva inducida por VEGF y la diabetes en la retina de la rata a través de promover la acumulación de vasoinhibina en la retina ⁶³. La terapia génica de vasoinhibina administrada intravitrealmente reduce la vasopermeabilidad retiniana en respuesta a VEGF y la diabetes en la rata ⁶⁶ y la angiogénesis en el modelo de angiogénesis retiniana inducida por isquemia en el ratón ⁵⁶. Por lo tanto, el hecho que el tratamiento con PRL promueva y no inhiba la angiogénesis de la retina neonatal sugiere que el procesamiento de PRL a vasoinhibina pudiera estar disminuido en la retina en desarrollo. Estudios recientes de nuestro laboratorio compararon la actividad de la catepsina D, una aspartil endoproteinasa ácida que convierte a la PRL a vasoinhibina en los gránulos de secreción de las células

productoras de PRL de la hipófisis anterior ⁷², entre extractos de retina de ratones en P8 y de ratones adultos. Encontraron que la conversión de PRL a vasoinhibina debida a la catepsina D disminuye en la retina del ratón recién nacido con respecto a la del ratón adulto. Estos hallazgos son consistentes con una menor generación de vasoinhibina en la retina neonatal. Esta posibilidad tiene sentido si se considera que el nivel de factores antiangiogénicos sería más bajo durante la fase neonatal de activa vascularización y mas alta durante el estado de reposo vascular de la retina adulta. El estudio de los niveles retinianos de la PRL y vasoinhibina de ratones recién nacidos y adultos ayudará a aclarar esta suposición.

Una pregunta importante es si la PRL podría desempeñar un papel fisiológico como promotor del desarrollo vascular retiniano postnatal en ratones. Esta posibilidad se ve desafiada por el hecho de que en los roedores, en contraste con los humanos, la glándula pituitaria apenas produce PRL después del nacimiento ⁷³ y la PRL sérica es indetectable durante la primera semana de vida postnatal ⁷⁴. Sin embargo, la ausencia de PRL sistémica en roedores puede compensarse con PRL local producida en la retina. El ARNm y la proteína PRL se encuentran en neuronas, células gliales ⁷⁵ y células endoteliales ⁷⁶ de la retina de la rata. Las implicaciones fisiológicas de nuestro trabajo deberán apoyarse en estudios futuros que evalúen la expresión local de PRL y de su receptor en la retina de los roedores recién nacidos y el grado del desarrollo vascular de la retina en ratones neonatos nulos para el receptor PRL.

La extrapolación directa de los hallazgos experimentales a pacientes con ROP también es limitada. La retina del ratón recién nacido bajo hiperoxia es un modelo de retina prematura pero no un modelo de ROP. La mayoría de los bebés prematuros están expuestos a la hiperoxia, pero no todos desarrollan ROP, lo que ilustra la mayor vulnerabilidad de la retina debida a la enfermedad. La patogénesis de la ROP conceptualiza como una detención del desarrollo vascular retiniano normal debido al parto prematuro (la fase avascular) que produce hipoxia y conduce a la angiogénesis retiniana excesiva (la fase vascular), el deterioro de la visión y eventual desprendimiento de la retina. El efecto de la PRL promoviendo la proliferación y

supervivencia de los vasos sanguíneos en la retina del ratón recién nacido bajo hiperoxia sería consistente con un efecto protector capaz de contrarrestar la fase avascular de la ROP. Sin embargo, el hecho de que niveles más altos de PRL son una variable de riesgo para la ROP ⁹, sugiere que el efecto proangiogénico de la PRL no protege contra la enfermedad. El que la acción de la PRL difiera entre roedores y humanos no es inesperado. La PRL sistémica, indetectable en roedores recién nacidos, está marcadamente elevada en pacientes prematuros con y sin ROP. Además, la conversión proteolítica de PRL a vaso inhibina que puede reducirse en ratones recién nacidos ⁷⁷ es elevada en humanos con ROP durante la fase avascular pero no en la fase vascular de la enfermedad ⁹. De este modo, en contraste con la menor generación de vaso inhibina capaz de promover la vascularización activa de la retina en ratones neonatos, altos niveles de vaso inhibina se generan en pacientes con ROP durante la fase avascular que pudieran promover dicha fase a través de contrarrestar el efecto protector proangiogénico de la PRL .

En resumen, nuestros hallazgos apoyan la angiogénesis retiniana como blanco de acción del eje PRL/vaso inhibina durante el desarrollo postnatal temprano. Se necesita más investigación para comprender dónde y cómo se generan e interactúan mecánicamente la PRL y la vaso inhibina para influir sobre la vascularización fisiológica y patológica de la retina del recién nacido.

XI. ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema de la sección de un ojo humano mostrando sus diferentes componentes -----	15
Figura 2	Células y capas de la retina-----	16
Figura 3	Cavidad del cerebro anterior que se comunican con las vesículas ópticas a través del tallo óptico y ectodermo de revestimiento -----	19
Figura 4	Copa óptica y la hendidura embrionaria ya formada. Placoda cristaliniiana invaginándose -----	20
Figura 5	Esquema de la retina con los bordes de las zonas y las horas de reloj utilizadas para describir la localización y extensión de la ROP)-----	24
Figura 6	Fotografía de fondo que ilustra los estadios de la ROP-----	26
Figura 7	Fotografía de fondo de dilatación venosa posterior y de tortuosidad arteriolar, característica de enfermedad plus -----	27
Figura 8	Fotografía de fondo con AP-ROP, se observa una enfermedad pus prominente-----	27
Figura 9	Niveles séricos de PRL-----	41
Figura 10	Niveles séricos de PRL-----	44
Figura 11	Niveles de vaso inhibina sérica-----	46

Figura 12	Los niveles séricos de VEGF no cambian en pacientes con retinopatía del prematuro (ROP)-----	47
Figura 13	Desarrollo de vasculatura retiniana de ratón-----	48
Figura 14	La PRL reduce la inhibición inducida por la hiperoxia de la angiogénesis retiniana en el día postnatal (P) 8-----	50
Figura 15	La PRL reduce la inhibición de la angiogénesis periférica en respuesta a la hiperoxia en el día posnatal (P) 8-----	52
Figura 16	La PRL reduce la pérdida de vasos sanguíneos inducida por la hiperoxia en la retina central en el día postnatal (P) 5-----	53

XII. ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Características demográficas y clínicas de los pacientes en el estudio	40
Tabla 2	Niveles séricos de PRL y riesgo relativo de ROP-----	42
Tabla 3	Análisis multivariado que muestra la relación de variables independientes con el riesgo de ROP en lactantes con ROP y controles-----	43

XIII. ANEXOS

A continuación se enlistan las actividades académicas realizadas durante mis estudios doctorales.

PUBLICACIONES

1. 2015; 07 Triebel J, Moreno-Vega AI, **Vázquez-Membrillo M**, Nava G, García-Franco R, López-Star E, Baldivieso-Hurtado O, Ochoa D, Macotela Y, Bertsch T, Martínez de la Escalera G, Clapp C. **High prolactin excretion in patients with diabetes mellitus and impaired renal function.** Clin Lab. 2015;6 1(7): 709-16. doi: 10.7754/clin.lab.2014.141237

2. 2016; 03 Díaz-Lezama N, Wu Z, Adán-Castro E, Arnold E, **Vázquez-Membrillo M**, Arredondo-Zamarripa D, Ledesma-Colunga MG, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. **Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1.** Lab Invest 2016 Mar;96(3):283-95. doi: 10.1038/labinvest.2015.135. Epub 2015 Nov 2016.

3. 2017; 03 Zepeda-Romero LC, **Vazquez-Membrillo M**, Adan-Castro E, Gomez-Aguayo F, Gutierrez-Padilla JA, Angulo-Castellanos E, Barrera de Leon JC, Gonzalez-Bernal C, Quezada-Chalita MA, Meza-Anguiano A, Diaz-Lezama N, Martínez de la Escalera G,

Triebel J, Clapp C. **Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity.** *Pediatr Res.* 2017 Mar; 81(3):473-479. doi: 10.1038/pr.2016.241. Epub 2016 Nov 14.

4. 2018; 10 García-Franco R, García-Roa M, Romero-Morales V, **Vazquez-Membrillo M**, Mira-Lorenzo X, Ramírez-Neria P, Charles V, López-Star E. **Assessing dry age-related macular degeneration in a Mexican population with fundus autofluorescence and spectral domain optical coherence tomography.** *J Clin Exp Ophthalmol.* 2018;9:5. doi: 10.4172/2155-9570.1000754.
5. 2018; 11 McKenna M, Chen T, McAneney H, **Vázquez Membrillo MA**, Jin L, Xiao W, Peto T, He M, Hogg R, Congdon N. **Accuracy of trained rural ophthalmologists versus non-medical image graders in the diagnosis of diabetic retinopathy in rural China.** *Br J Ophthalmol.* 2018 Nov;102(11):1471-1476. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312440. Epub 2018 Jul 4.
6. 2019; 01 Salvador-Salvador F, García-Franco R, Valera-Cornejo D, Mira-Lorenzo X, Ramírez-Neria P, Villalpando-Gómez Y, **Vazquez-Membrillo M**, García-Roa M. **Vitreotomy in diabetic patients with chronic kidney disease and diabetic retinopathy.** *EC Ophthalmology.* 10.1(2019):43-50.
7. 2020; 03 **Vazquez-Membrillo M**, Siqueiros-Marquez L, Freinet-Nuñez F, Díaz-Lezama N, Adán-Castro E, Ramírez-Hernández G, Adán N, Macotela Y, Martínez de la Escalera G, Clapp C. **Prolactin stimulates the vascularization of the retina in newborn mice under hyperoxia conditions.** *J Neuroendocrinol.* 2020 Mar 30. doi: 10.1111/jne.12858.

POSTER Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

1. 2014, 04 **Vazquez Membrillo Miguel Angel**; Luz Consuelo Zepeda Romero; Francisco Gómez Aguayo; Jose Alfonso Gutierrez Padilla; Eusebio Angulo Castellanos; Juan Carlos Barrera de León; Cesáreo González Bernal; Alejandro Quezada Chalita; Alonso Meza Anguiano; Carmen Clapp. Patients with retinopathy of prematurity (ROP) have increased levels of prolactin and reduced levels of vasoinhibins in the circulation. ARVO Annual Meeting 2014 May 4-8 Orlando, Fl.
2. 2014; 09 **Vázquez-Membrillo M**, Zepeda C, Nava G., Moreno-Vega A, Gómez-Aguayo F, Becerra-Gómez N, Alvarez G, Gutiérrez-Padilla JA, Triebel J, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Análisis de la participación de la prolactina y de las vasoinhibinas en la fisiopatología de la retinopatía del prematuro. XXI Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
3. 2014; 09 **Vázquez-Membrillo M**, Díaz-Lezama N, Arredondo-Zamarripa D, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. Análisis del efecto terapéutico de virus adenoasociados que transducen vasoinhibinas en la retinopatía diabética experimental. XXXIII Reunión Anual de Retina/Asociación Mexicana de Retina. Guadalajara, Jalisco México. **Awarded** (mxn\$ 100,000 aplicados al proyecto).
4. 2014; 09 Díaz-Lezama N, Wu Z, Adán-Castro E, Arredondo-Zamarripa D, **Vázquez-Membrillo M**, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. La diabetes aumenta la eficacia de los virus adeno-asociados (AAV) en la retina de la rata. XXI Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
5. 2015; 06 Clapp C, Arnold E, Thebault S, Díaz-Lezama N, Arredondo Zamarripa D, **Vázquez-Membrillo M**, Adán-Castro E, Martínez de la Escalera G. Vascular and neuroprotective actions of vasoinhibins and prolactin in the retina NASCE (North American Society for Comparative Endocrinology). Meeting 2015. Ottawa, Ontario, Canadá.
6. 2015; 07 Díaz-Lezama N, Wu Z, Adán-Castro E, **Vázquez-Membrillo M**, Arredondo-Zamarripa D, Ledezma-Colunga M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble receptor 1 in experimental

diabetic retinopathy. FASEB The Growth Hormone/Prolactin Family in Biology and Disease. Steamboat Springs, Colorado, USA. **Travel Award.**

- 7. 2015; 09** Díaz-Lezama N, Wu Z, Adán-Castro E, **Vázquez-Membrillo M**, Arredondo-Zamarripa D, Ledezma-Colunga M, Moreno-Carranza B, Martínez de la Escalera G, Colosi P, Clapp C. XXII Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
- 8. 2016; 09** **Vázquez-Membrillo M**, Díaz-Lezama N, Adán-Castro E, García-Franco R, Clapp C. ROP: Modelo en retina murina neonatal para la investigación de opciones terapéuticas in vivo. XXXV Reunión Anual de Retina/Asociación Mexicana de Retina. León, Guanajuato, México. **Awarded.**
- 9. 2017; 09** **Vázquez-Membrillo M**, Díaz-Lezama N, Adán-Castro E, Ramírez-Hernández G, Ledezma-Colunga G, Ruíz-Herrera X, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin promotes de hyperoxia-induced inhibition of retinal neovascularization in newborn mice. XXIV Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.
- 10.2019; 03** **Miguel Vazquez-Membrillo, MD**, Nundehui Diaz-Lezama, PhD, Elva Adan-Castro, MS, Gabriela Ramirez-Hernandez, MS, Maria G. Ledesma-Colunga, PhD, Norma Adan, PhD, Lourdes Siqueiros-Marquez, PhD, Francisco Freinet, BS, Magdalena Zamora, BS, Gonzalo Martinez de la Escalera, PhD, Carmen Clapp, PhD. Prolactin reduces the hyperoxia-inhibition of retinal neovascularization in newborn mice. Endocrine Society. Endo Annual Meeting. March 23-27, 2019, New Orleans.
- 11. 2019, 06** Dalia Méndez Marín; Renata García Franco; Van Charles Lansingh; Ellery López Star; Alejandro Arias Gómez; Paulina Ramírez Neria; Marlon García Roa; Verónica Romero Morales; Ximena Mira Lorenzo; **Miguel Vazquez Membrillo**; Yolanda Villalpando Gómez. Secreening for diabetic retinopathy and other retinal diseases: a telemedicine project in Mexico. ARVO Annual Meeting 2019, Vancouver. April 28-May 2.

- 12. 2019, 09** Alejandro Arias Gómez; Renata García Franco; Paulina Ramírez Neria; Dalia Méndez Marín; Van Charles Lansingh; Ellery López Star; Ximena Mira Lorenzo; Verónica Romero Morales; Marlon García Roa; Yolanda Villalpando Gómez; **Miguel Vazquez Membrillo**. Telemedicine screening for retinopathy of prematurity (ROP) using retinal images: a pilot study. ARVO Annual Meeting 2019, Vancouver.
- 13. 2019;09** **Vázquez-Membrillo M**, Díaz-Lezama N, Adán-Castro E, Ramírez-Hernández G, Ledezma-Colunga MG, Adán N, Freinet F, Siqueiros M, Zamora M, Martínez de la Escalera G, and Clapp C. Prolactin reduces the hyperoxia-induced inhibition of retinal neovascularization in newborn mice. XXV Aniversario de las Jornadas del Instituto de Neurobiología, UNAM, Querétaro, México.

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

- 06 2015- 06** Estancia realizada en el Departamento de Investigación de la Universidad de Sun Yat-Sen, Cantón, China. Bajo la supervisión del Dr. Nathan Congdon de la Universidad de Queens, Irlanda del Norte, Reino Unido. se evaluó "impacto en el diagnóstico, tratamiento y nuevos tratamientos en las enfermedades vasculares retinianas, principalmente en retinopatía diabética". Duración de la estancia: 1 año.
- 2016;**

XIV. REFERENCIAS

1. Gilbert C. Retinopathy of prematurity: a global perspective of the epidemics, population of babies at risk and implications for control. *Early human development*. Feb 2008;84(2):77-82.
2. Hartnett ME. Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*. Jan 2015;122(1):200-210.
3. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*. Jul 2005;123(7):991-999.
4. Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, et al. Incidence and early course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Ophthalmology*. Nov 1991;98(11):1628-1640.
5. Clapp C, Thebault S, Macotela Y, Moreno-Carranza B, Triebel J, Martinez de la Escalera G. Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;846:83-95.
6. Duenas Z, Torner L, Corbacho AM, et al. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative ophthalmology & visual science*. Oct 1999;40(11):2498-2505.
7. Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, et al. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. Aug 2005;46(8):2947-2953.
8. Triebel J, Macotela Y, de la Escalera GM, Clapp C. Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB life*. Oct 2011;63(10):806-810.
9. Zepeda-Romero LC, Vazquez-Membrillo M, Adan-Castro E, et al. Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatric research*. Mar 2017;81(3):473-479.
10. Ophthalmology AAO. *Fundamentals and Principles of Ophthalmology*. Vol 22019.
11. Kolb H. Simple Anatomy of the Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, eds. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City UT: : 2020 Webvision.; 1995.
12. Ophthalmology AAO. *Retina and Vitreous*. Vol 122019.
13. Nguyen KH, Patel BC, Tadi P. Anatomy, Head and Neck, Eye Retina. *StatPearls*. Treasure Island FL: StatPearls Publishing LLC.; 2020.

14. Jia YP, Sun L, Yu HS, et al. The Pharmacological Effects of Lutein and Zeaxanthin on Visual Disorders and Cognition Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*. Apr 20 2017;22(4).
15. <http://www.idf.org/diabetesatlas> IDFTDAteAf.
16. Alfredo G-L. *Desarrollo del Globo Ocular y sus Anexos*: Sociedad Mexicana de Oftalmología; 2000.
17. Mann IC. The Process of Retinal Differentiation in Man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. Nov 1927;21(1):110.
18. Mann IC. THE PROCESS OF DIFFERENTIATION OF THE RETINAL LAYERS IN VERTEBRATES. *The British journal of ophthalmology*. Sep 1928;12(9):449-478.
19. Abramov I, Gordon J, Hendrickson A, Hainline L, Dobson V, LaBossiere E. The retina of the newborn human infant. *Science (New York, N.Y.)*. Jul 16 1982;217(4556):265-267.
20. Amado RAD. *Estrabismo aspectos clinicos y tratamiento*: Editorial DALA; 2010.
21. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological reviews*. Oct 2009;89(4):1177-1215.
22. Gariano RF. Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Progress in retinal and eye research*. May 2003;22(3):295-306.
23. Blencowe H, Lawn JE, Vazquez T, Fielder A, Gilbert C. Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010. *Pediatric research*. Dec 2013;74 Suppl 1:35-49.
24. P O-G. *Retinopatía del Prematuro*. México: Permanyer; 2019.
25. Foureaux G, Nogueira BS, Coutinho DC, Raizada MK, Nogueira JC, Ferreira AJ. Activation of endogenous angiotensin converting enzyme 2 prevents early injuries induced by hyperglycemia in rat retina. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*. Sep 29 2015.
26. An international classification of retinopathy of prematurity. Prepared by an international committee. *The British journal of ophthalmology*. Oct 1984;68(10):690-697.
27. An international classification of retinopathy of prematurity. II. The classification of retinal detachment. The International Committee for the Classification of the Late Stages of Retinopathy of Prematurity. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*. Jul 1987;105(7):906-912.
28. Hellstrom A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *Lancet (London, England)*. Oct 26 2013;382(9902):1445-1457.
29. Budd SJ, Hartnett ME. Increased angiogenic factors associated with peripheral avascular retina and intravitreal neovascularization: a model of retinopathy of prematurity. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*. May 2010;128(5):589-595.
30. Harder BC, von Baltz S, Jonas JB, Schlichtenbrede FC. Intravitreal low-dosage bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Acta ophthalmologica*. Sep 2014;92(6):577-581.
31. Clapp C, Thebault S, Arnold E, Garcia C, Rivera JC, de la Escalera GM. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. Oct 2008;295(4):E772-778.
32. Healy DL, Rattigan S, Hartmann PE, Herington AC, Burger HG. Prolactin in human milk: correlation with lactose, total protein, and alpha-lactalbumin levels. *The American journal of physiology*. Jan 1980;238(1):E83-86.
33. Duenas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, et al. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Investigative ophthalmology & visual science*. Jul 2004;45(7):2049-2055.

34. Gonzalez C, Parra A, Ramirez-Peredo J, et al. Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Oct 2007;87(10):1009-1017.
35. Piwnica D, Touraine P, Struman I, et al. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. Oct 2004;18(10):2522-2542.
36. Triebel J, Bertsch T, Bollheimer C, et al. Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. Nov 15 2015;309(10):R1193-1203.
37. Kang HG, Choi EY, Byeon SH, et al. Intravitreal ranibizumab versus laser photocoagulation for retinopathy of prematurity: efficacy, anatomical outcomes and safety. *The British journal of ophthalmology*. Dec 4 2018.
38. Enninga EA, Nevala WK, Creedon DJ, Markovic SN, Holtan SG. Fetal sex-based differences in maternal hormones, angiogenic factors, and immune mediators during pregnancy and the postpartum period. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*. Mar 2015;73(3):251-262.
39. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*. 2007;10(2):77-88.
40. Fruttiger M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. Feb 2002;43(2):522-527.
41. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jan 31 1995;92(3):905-909.
42. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*. Jan 1994;35(1):101-111.
43. Tual-Chalot S, Allinson KR, Fruttiger M, Arthur HM. Whole mount immunofluorescent staining of the neonatal mouse retina to investigate angiogenesis in vivo. *Journal of visualized experiments : JoVE*. Jul 9 2013(77):e50546.
44. Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Nov 1980;51(5):1058-1063.
45. Flynn JT, Chan-Ling T. Retinopathy of prematurity: two distinct mechanisms that underlie zone 1 and zone 2 disease. *American journal of ophthalmology*. Jul 2006;142(1):46-59.
46. Hellgren G, Lofqvist C, Hard AL, et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in relation to retinopathy of prematurity. *Pediatric research*. Jan 2016;79(1-1):70-75.
47. Velez-Montoya R, Clapp C, Rivera JC, et al. Intraocular and systemic levels of vascular endothelial growth factor in advanced cases of retinopathy of prematurity. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*. Sep 7 2010;4:947-953.
48. Yoshida Y, Kawasaki Y, Morikawa N, et al. [A kinetic study on serum prolactin concentration in the thyrotropin-releasing hormone test]. *Kaku igaku. The Japanese journal of nuclear medicine*. Jun 1991;28(6):585-590.
49. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature medicine*. Oct 1995;1(10):1024-1028.
50. Gu X, El-Remessy AB, Brooks SE, Al-Shabrawey M, Tsai NT, Caldwell RB. Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite. *American journal of physiology. Cell physiology*. Sep 2003;285(3):C546-554.

51. Tyson JE, Hwang P, Guyda H, Friesen HG. Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. May 1 1972;113(1):14-20.
52. Winters AJ, Colston C, MacDonald PC, Porter JC. Fetal plasma prolactin levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Sep 1975;41(3):626-629.
53. Ben-Jonathan N, Munsick RA. Dopamine and prolactin in human pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Nov 1980;51(5):1019-1025.
54. Parker CR, Jr., MacDonald PC, Guzick DS, Porter JC, Rosenfeld CR, Hauth JC. Prolactin levels in umbilical cord blood of human infants: relation to gestational age, maternal complications, and neonatal lung function. *American journal of obstetrics and gynecology*. Sep 1989;161(3):795-802.
55. Lucas A, Baker BA, Cole TJ. Plasma prolactin and clinical outcome in preterm infants. *Archives of disease in childhood*. Sep 1990;65(9):977-983.
56. Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, et al. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. Jul 2004;45(7):2413-2419.
57. Notari L, Miller A, Martinez A, et al. Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia. *Investigative ophthalmology & visual science*. Aug 2005;46(8):2736-2747.
58. Zhang W, Yokota H, Xu Z, et al. Hyperoxia therapy of pre-proliferative ischemic retinopathy in a mouse model. *Investigative ophthalmology & visual science*. Aug 11 2011;52(9):6384-6395.
59. Macotela Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, et al. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of cell science*. May 1 2006;119(Pt 9):1790-1800.
60. Hayasaka S. Lysosomal enzymes in ocular tissues and diseases. *Survey of ophthalmology*. Jan-Feb 1983;27(4):245-258.
61. Chen YH, Chou HC, Lin ST, Chen YW, Lo YW, Chan HL. Effect of high glucose on secreted proteome in cultured retinal pigmented epithelium cells: its possible relevance to clinical diabetic retinopathy. *Journal of proteomics*. Dec 21 2012;77:111-128.
62. Clapp C, Sears PS, Russell DH, Richards J, Levay-Young BK, Nicoll CS. Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology*. Jun 1988;122(6):2892-2898.
63. Arnold E, Rivera JC, Thebault S, et al. High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*. Dec 2010;59(12):3192-3197.
64. O'Steen WK, Sundberg DK. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic research*. 1982;14(1):54-62.
65. Garcia C, Aranda J, Arnold E, et al. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *The Journal of clinical investigation*. Jun 2008;118(6):2291-2300.
66. Ramirez M, Wu Z, Moreno-Carranza B, et al. Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Investigative ophthalmology & visual science*. Nov 21 2011;52(12):8944-8950.
67. Arnold E, Thebault S, Baeza-Cruz G, et al. The hormone prolactin is a novel, endogenous trophic factor able to regulate reactive glia and to limit retinal degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Jan 29 2014;34(5):1868-1878.
68. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*. Sep 1993;133(3):1292-1299.

69. Struman I, Bentzien F, Lee H, et al. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 16 1999;96(4):1246-1251.
70. Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Progress in retinal and eye research*. Sep 2012;31(5):377-406.
71. Melendez Garcia R, Arredondo Zamarripa D, Arnold E, et al. Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death. *EBioMedicine*. May 2016;7:35-49.
72. Cruz-Soto ME, Cosio G, Jeziorski MC, et al. Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipophyseal vaso-inhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology*. Dec 2009;150(12):5446-5454.
73. Hoeffler JP, Boockfor FR, Frawley LS. Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: initial prolactin secretors also release growth hormone. *Endocrinology*. Jul 1985;117(1):187-195.
74. Moreno-Carranza B, Bravo-Manriquez M, Baez A, et al. Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. Jun 1 2018;314(6):R902-R908.
75. Rivera JC, Aranda J, Riesgo J, et al. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Experimental eye research*. Feb 2008;86(2):314-321.
76. Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera JC, et al. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. Jun 2001;42(7):1639-1645.
77. Vazquez-Membrillo MS-M, M; Freinet-Nuñez ,F; Diaz-Lezama, N; Adan-Castro,E; Ramirez-Hernandez, G; Adan, N; Macotela,Y; Martinez de la Escalera, G; Clapp, C. Prolactin stimulates the vascularization of the retina in newborn mice under hyperoxia conditions. *Journal of neuroendocrinology*. 2020;ahead of pub.