



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**PARTICIPACION DE LA PROLACTINA
EN LA ANGIOGENESIS DEL OVARIO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
PRESENTA:
GLORIA ALEJANDRA EUGENIA CASTILLA LEÓN

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. CARMEN CLAPP JIMENEZ



CAMPUS JURQUILLA-UNAM, QRO.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MANUEL, ALEJANDRA Y EILEEN.

CON AMOR

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Doctorado se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, en Juriquilla Querétaro, bajo la dirección de la Dra. Carmen Clapp, a quien le agradeceré siempre su apoyo y confianza para lograr este objetivo.

Quiero agradecer, tanto al comité tutorial como a los miembros del jurado por su invaluable ayuda para mejorar este trabajo:

Dr. Alfonso Cárabez Trejo

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Carmen Clapp Jiménez

Dra. María de la Luz Torner Aguilar

Dra. Maricela Luna Muñoz

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos

Dr. Enrique Pedernera Astegiano

Agradecimiento, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por aceptarme como becario para realizar mis estudios de doctorado, así como al PAPIIT-UNAM por una beca externa.

Agradezco el apoyo académico, técnico y de amistad de las siguientes personas, por que gracias a su participación se logró concluir con este trabajo:

Dra. Celina García.

Dra. Stéphanie Thebault.

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.

Dra. Martha Cruz Soto.

Nut. Fernando López Barrera.

M. en C. Gabriel Nava.

Dr. Gerardo Perera.

MVZ. Martín García.

Laboratoristas: Sr. Antonio Prado y Daniel Mondragón.

Al Rastro Municipal del Estado de Querétaro por su apoyo incondicional para la obtención de muestras, en especial al MVZ. Francisco Barcenás y MVZ. Luis Rangel.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A mi esposo Manuel y a mis hijas Ale y Eileen por su amor y paciencia.

Mi familia: Mamá (†), Papá (†), Chio, Yeli, Ricky y Roger, por estar siempre conmigo.

Mi segunda familia: Sr. Fernando (†), Sra. Guillermina, Fernando, Alma, Guillermo, Ruth, Tavo y respectivas familias por su apoyo incondicional en todo momento.

Al Dr. Flavio Mena Jara por su apoyo, comprensión y palabras de aliento.

A mis amigos y compañeros del INB-UNAM, por su ánimo y apoyo, además de que nunca dejaron de echarme porras para lograr esta meta en la vida:

M. en C. Nilda Navarro.

Biol. María Eugenia Ramos.

Lab. Asucena Ortega.

Dra. Ma. Teresa Morales.

Nela Monasterio.

Verónica Cabrera.

Bertha Esquivel.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi alma *Mater*

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I INTRODUCCIÓN	3
II ANTECEDENTES	
2.1 PROLACTINA	5
2.1.1 Estructura	6
2.1.2 Receptores a PRL	7
2.2 ANGIOGÉNESIS	
2.2.1 Proceso de angiogénesis	10
2.2.3 Angiogénesis en el ovario	11
2.2.4 Participación de la PRL en la angiogénesis del ovario	14
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1.1 Obtención del líquido folicular	19
5.1.2 Determinación de la concentración de PRL en el líquido folicular	19
5.1.3 Análisis de la PRL del líquido folicular por Western-blot	21
5.1.4 Obtención de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC)	21
5.1.5 Efecto del líquido folicular sobre la proliferación de BUVEC	22
5.1.6 Efecto del estándar de PRL bovina sobre la proliferación de BUVEC	23
5.1.7 Detección del receptor de PRL en BUVEC	23
5.1.8 Mecanismo de señalización del receptor de PRL	24

VI ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	25
VII RESULTADOS	
7.1 El líquido folicular estimula la proliferación de células endoteliales.....	26
7.2 El líquido folicular contiene PRL.....	27
7.3 La PRL del líquido folicular estimula la proliferación de células endoteliales.....	28
7.4 El líquido folicular estimula la expresión de las isoformas larga y corta del receptor de PRL, además la PRL y el LF estimulan la fosforilación de JAK2 y STAT3.....	32
VIII. DISCUSIÓN.....	35
IX. CONCLUSIONES.....	39
X. BIBLIOGRAFÍA.....	40

&&&&&

RESUMEN

La formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis es esencial para el desarrollo de los folículos ováricos y de su transición a cuerpo lúteo. La prolactina (PRL) posee efectos proangiogénicos y en este trabajo se propone que esta hormona pudiera formar parte del grupo de los factores que promueven la angiogénesis de los folículos ováricos. Los resultados mostraron que el líquido folicular de ovarios bovinos estimula la proliferación de las células endoteliales de cordón umbilical bovino (BUVEC) y que este efecto se bloquea mediante el uso de anticuerpos específicos contra PRL. Consistentemente, mediante las técnicas de ELISA, Western blot y el bioensayo específico que utiliza la línea celular Nb2 derivada de linfocitos murinos, se determinó la presencia de PRL en el líquido de folículos pequeños (<5mm de diámetro) y grandes (<10 mm de diámetro) y la concentración se relacionó directamente con el efecto de la hormona sobre la proliferación de las BUVEC. Además, se observó que el líquido folicular tiene la capacidad de estimular la expresión de las isoformas de los receptores largo y corto de la PRL en las células endoteliales, y que se necesita del pretratamiento con líquido folicular (12 h) de las BUVEC para que dosis conocidas de una preparación estándar de PRL estimulen la proliferación endotelial. Sin embargo, la PRL estándar activa la vía de señalización de la cinasa Janus-2 y del transductor de señal y activador de transcripción-3 (JAK2/STAT-3) en ausencia del pretratamiento con líquido folicular. De acuerdo a estos resultados concluimos que la PRL presente en el líquido folicular ovárico estimula la proliferación de células endoteliales en cultivo y que su efecto involucra la regulación de las isoformas de los

receptores largo y corto de la PRL por mecanismos celulares independientes a los asociados con la vía JAK-2/STAT3.

ABSTRACT

Angiogenesis is essential for the development of the ovarian follicle and its transition into the corpus luteum. In addition to the main proangiogenic factors, VEGF and bFGF, the follicular fluid contains the hormone prolactin (PRL), which is known to have proangiogenic effects. Here, we show that the promotion of endothelial cell proliferation by follicular fluid correlates with its levels of PRL, and that blockage of PRL by antibody neutralization prevents follicular fluid from stimulating endothelial cell proliferation. Notably, the follicular fluid can increase the expression of the short and long PRL receptor isoforms in endothelial cells, and a short-time pretreatment with the follicular fluid is required for a purified PRL standard to stimulate endothelial cell proliferation. However, purified PRL activates the JAK2/STAT3 pathway in endothelial cells in the absence of the pretreatment with follicular fluid. In summary, PRL present in the follicular fluid stimulates the proliferation of endothelial cells. This effect likely involves the up-regulation of the short and long PRL receptor isoforms by some component of the follicular fluid and is independent of PRL-induced JAK2/STAT3 signaling.

I. INTRODUCCION

La angiogénesis o neovascularización es el proceso mediante el cual ocurre la formación de nuevos vasos capilares sanguíneos a partir de vasos capilares pre-existentes. Este proceso involucra una serie de fases secuenciales que incluyen la degradación de la membrana basal del vaso capilar, la migración, la proliferación y la asociación de las células endoteliales vasculares (Folkman et al., 1992). La angiogénesis ocurre bajo condiciones fisiológicas acompañando el crecimiento y diferenciación de los tejidos durante el desarrollo embrionario y fetal, determinando diversos eventos en el aparato reproductor de las hembras y promoviendo la reparación de tejidos como consecuencia de lesiones y fracturas. Actualmente, el enorme interés por comprender la regulación de la angiogénesis deriva del reconocimiento, de que la sobre proliferación de vasos sanguíneos determina la progresión de padecimientos de alto impacto mundial como son el cáncer, la retinopatía diabética y la artritis reumatoide.

En el aparato reproductor femenino tienen lugar cambios cíclicos donde el crecimiento depende de angiogénesis. Un ejemplo es el desarrollo folicular ovárico, en el cual la formación de nuevos vasos sanguíneos entre las células de la teca permite el crecimiento del folículo hasta su fase preovulatoria, etapa donde la permeabilidad vascular favorece la formación del antro y la ruptura eventual del folículo ovárico. Después de la ovulación, la angiogénesis masiva determina el crecimiento y la función del cuerpo lúteo (Braw-Tal et al., 1997; Driancourt et al., 2001). Se reconoce que el líquido folicular contiene factores proangiogénicos y antiangiogénicos (Plendl J, 2000) entre los que podría incluirse a la hormona PRL.

La PRL representa un grupo de hormonas y citocinas capaces de regular una gran variedad de procesos dentro de la reproducción, osmorregulación, inmunomodulación, y angiogénesis (Ben-Jonathan et al., 1996; Bole-Feysot et al., 1998; Lorenson et al., 2001; Corbacho et al., 2002; Clapp et al., 2008). Las propiedades de regular la angiogénesis se asocian con la estructura molecular de la PRL ya que se ha demostrado que fragmentos de la PRL, recientemente denominados vaso inhibinas (Clapp et al., 2006a), inhiben la proliferación, la migración y la supervivencia de células endoteliales así como la vasodilatación y la vasopermeabilidad (Clapp et al., 2008). En contraste a los efectos inhibitorios de las vaso inhibinas, se tienen evidencias de que la PRL completa promueve la angiogénesis. Esta hormona estimula la proliferación de vasos sanguíneos en diversos modelos *in vivo* y se ha reportado la presencia de sus receptores en células endoteliales (Clapp et al., 2008). El equilibrio entre los efectos de la PRL y las vaso inhibinas parece modular la angiogénesis en la glándula mamaria (Clapp et al., 2008), en el ojo (Clapp et al., 2006b), y en el corazón (Hilfiker-Kleiner et al., 2007).

Cabe notar que el ovario es un órgano blanco de la PRL. La PRL estimula la expresión de receptores a la hormona luteinizante (LH) por las células de la granulosa, influye sobre la maduración del ovocito dentro del folículo y modifica la producción de progesterona por las células lúteas (Niswender GD y Nett T, 1988; Redmer et al., 1996. Además, la PRL se encuentra presente en el líquido folicular ovárico (Abulafia, O y Sherer D, 2000) y puede derivar tanto de la circulación sanguínea como también de la síntesis local. Se ha reportado la expresión del RNA mensajero de la PRL y de la proteína en las células de la granulosa (Sirotkin A, et al., 1992; Schwärzler P, et

al., 1997). El hecho de que la angiogénesis es un proceso muy importante en los folículos ováricos y que el líquido folicular contiene PRL capaz de regular la angiogénesis nos llevó a investigar la posible propiedad de la PRL como un factor proangiogénico folicular.

II. ANTECEDENTES

2.1 PROLACTINA

La PRL es una hormona polipeptídica secretada principalmente por los lactotrofos que son células especializadas de la glándula pituitaria anterior (Freeman et al., 2000) que comprenden entre el 20 y 50% del total celular de dicha glándula (Ben-Jonathan et al., 1996). No obstante, la síntesis de PRL no se limita a la adenohipófisis, ya que se ha identificado la síntesis de esta hormona en numerosos tejidos extra-pituitarios que incluyen a la decidua uterina, epitelio mamario, tejido neuronal, células del sistema inmunológico, células de la granulosa y células del endotelio vascular (Ben-Jonathan et al., 1996; Corbacho et al., 2002). Asimismo, la PRL puede encontrarse en fluidos corporales diversos como la sangre, fluido cerebroespinal, líquido amniótico, lágrimas, leche, sudor, líquido folicular (Bole-Feysot et al., 1998) y líquido sinovial (Ogueta et al., 2002).

La PRL posee más de 300 funciones biológicas asociadas a procesos reproductivos, del crecimiento y desarrollo, como regulador dentro de la endocrinología, metabolismo, fisiología neural, conducta, inmunomodulación, balance de electrolitos, y angiogénesis (Bole-Feysot et al., 1998; Corbacho et al., 2002). Estas acciones involucran efectos celulares tales como la regulación de la proliferación (Olazabal et al., 2000), diferenciación (Ogueta et al., 2002) y supervivencia (Zermeño et al., 2006).

2.1.1 Estructura

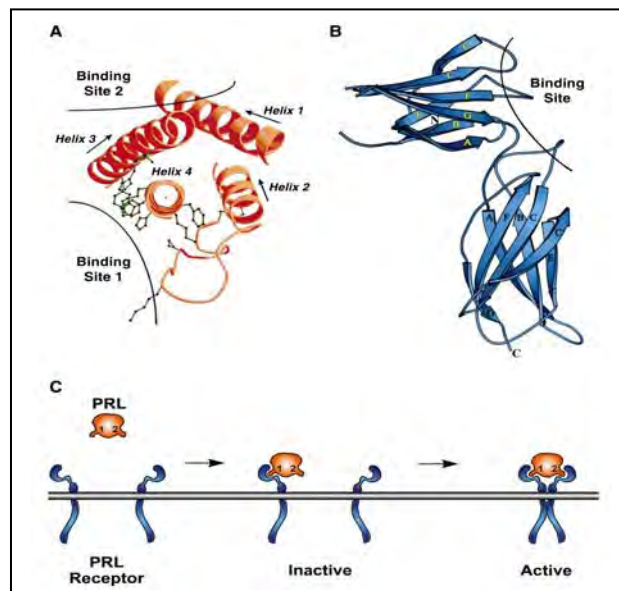
La PRL presenta una gran variabilidad estructural y se le ha considerado como una prohormona. La PRL es inicialmente transcrita a partir de un único gen y traducida hacia una proteína que en el humano está compuesta por 199 aa y una masa molecular de 23 kDa (PRL 23K) organizada en 4 α -hélices antiparalelas. Esta proteína que es la forma molecular predominante de la hormona puede ser convertida en distintas formas moleculares bioactivas a través de modificaciones postraduccionales como la glicosilación, fosforilación, proteólisis y agregamiento (Sinha, 1995). Se ha propuesto que la multiplicidad de las acciones de la PRL pudieran resultar en parte de su polimorfismo estructural (Sinha, 1995). En particular, la proteólisis enzimática de PRL entre los residuos aminoacídicos que conforman el asa que liga las alfa hélices tres y cuatro de su molécula, confiere a los fragmentos resultantes, acciones antiangiogénicas no ejercidas por la molécula madre (Ferrara et al., 1991; Clapp et al., 1993; Struman et al., 1999). Estos fragmentos han sido denominados como vasoinhibinas y se suman a la creciente lista de proteínas que adquieren funciones específicas o son activadas como resultado de la proteólisis de precursores mayores. Este mecanismo de activación es común a otros potentes factores antiangiogénicos, como la angiostatina (O'Reilly et al., 1994) y la endostatina (O'Reilly et al., 1997), y de otras citocinas proinflamatorias, como la interleucina 1 β (IL-1 β) (Thornberry et al., 1992) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Moss et al., 1997).

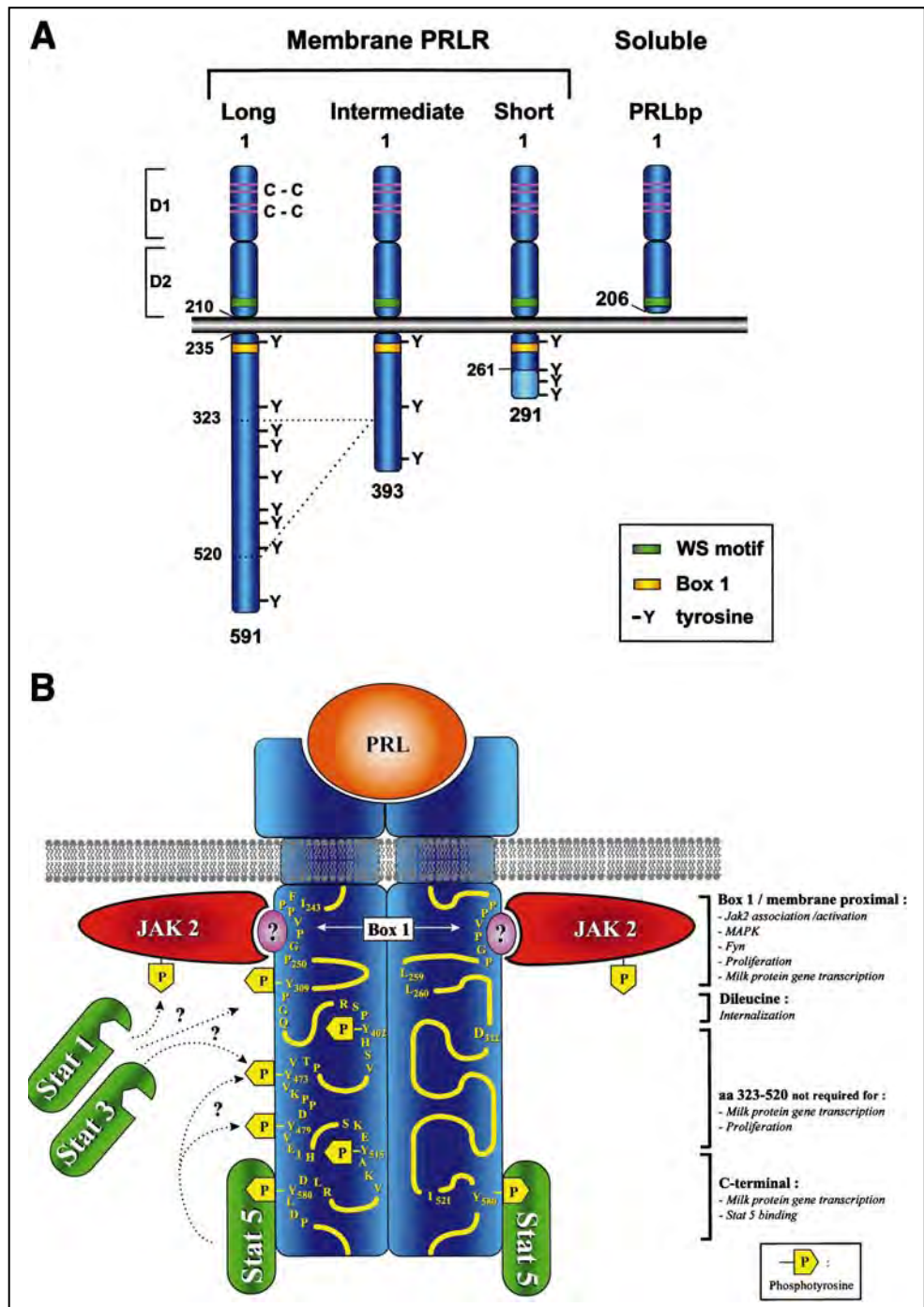
2.1.2 Receptores a PRL

Debido a sus características estructurales y su vía de transducción de señal, los receptores de PRL pertenecen a la familia de receptores de citocinas *clase 1* (familia de los receptores de las hematopoyetinas). Esta familia incluye a los receptores de la PRL, GH, eritropoyetina, GM-CSF y las IL-2 a la IL-7, excluyendo a la IL-5 (Bole-Feysot et al., 1998; Cosman et al., 1990). Estos receptores son glicoproteínas con un solo dominio transmembranal y presentan el extremo N-terminal orientado hacia el exterior. La región de mayor similitud entre los miembros de esta familia de receptores corresponde al dominio extracelular y consiste en dos pares de cisteínas, unidas por puentes disulfuro, localizadas hacia el extremo N-terminal y un motivo conservado llamado WS (Trp-Ser-X-Trp-Ser) localizado cerca de la región transmembranal (Goffin et al., 1996; Cosman et al., 1990). Además, en la mayoría de los receptores de esta familia existe una región rica en prolinas llamada (por sus siglas en inglés) PRM “proline rich motif” o Box 1 que se localiza en el dominio intracelular y es fundamental para la señalización del receptor (Bole-Feysot et al., 1998; Yu-Lee, 1997). La porción citoplasmática de estos receptores carece de secuencias consenso relacionadas con la actividad de cinasa o alguna otra actividad enzimática. La vía de señalización intracelular utilizada es la vía JAK/STAT. En el caso de la PRL intervienen las proteínas cinasas Janus (JAK) 1, 2 y 3 y los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) 1, 3 y 5, siendo las principales JAK 2 y STAT 5 (Bole-Feysot et al., 1998). Finalmente, en esta familia de receptores, la dimerización u oligomerización del receptor es un requisito absoluto para que se inicie la transducción de la señal. En el caso del receptor de PRL, la dimerización ocurre cuando una molécula de la

hormona unida a un receptor se une a una segunda molécula de receptor a través de un segundo sitio de unión (Bole-Feysot, et al., 1998; Goffin et al., 1996).

Hasta el momento se han clonado tres receptores de PRL, el “largo” (80 kDa), el “intermedio” (65 kDa) y el “corto” (42 kDa) (Bole-Feysot et al., 1998; Yu-Lee, 1997). Todos tienen el mismo dominio extracelular de unión al ligando y difieren en la longitud y secuencia del dominio intracelular. La información respecto a la función específica de los distintos receptores es aún fragmentaria y hacer generalizaciones resulta muy difícil considerando la diversidad de los efectos de PRL. En general, se considera que las isoformas larga e intermedia son funcionalmente equivalentes mientras que el receptor “corto” es inactivo. En el epitelio mamario el receptor “largo” estimula al promotor de la β -caseína, sin embargo, el receptor “corto” es incapaz de hacerlo y además, cuando se dimeriza con el receptor “largo”, funciona como una isoforma negativa dominando inactivándolo. En relación con los efectos de PRL sobre la proliferación celular, se ha demostrado que la heterodimerización de cualquiera de las isoformas (corto/largo, corto/intermedio e intermedio/largo) da como resultado un receptor inactivo (Bole-Feysot et al., 1998).





Bole-Feyssot et al., 1998.

2.2 ANGIOGENESIS.

2.2.1 Proceso de angiogénesis.

La angiogénesis o neovascularización es el proceso mediante el cual ocurre la formación de nuevos vasos capilares sanguíneos a partir de vasos capilares pre-existentes. La angiogénesis involucra una serie de fases secuenciales que incluyen la degradación de la membrana basal del vaso capilar, la migración, la proliferación y la asociación de las células endoteliales que conforman los capilares sanguíneos (Folkman et al., 1992). Estos eventos son regulados por múltiples factores tanto hormonales como locales. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y angiopoyetinas 1 y 2 son probablemente los factores más importantes que promueven la angiogénesis, pero la regulación de este proceso es complejo e involucra una amplia interacción entre células, múltiples factores solubles y componentes de la matriz extracelular (Adams et al., 2007; Carmeliet P, 2003; Jain RK, 2003; Lamalice L, 2007).

La angiogénesis ocurre de forma activa durante la vida embrionaria y fetal acompañando el crecimiento y diferenciación de los tejidos. Posteriormente, la angiogénesis disminuye y es prácticamente inexistente en el adulto donde el endotelio vascular presenta una población estable de células con una tasa mitótica baja. Cuando en el adulto ocurre la presencia de crecimiento capilar de forma continua e incrementada, esto se asocia a diversas condiciones patológicas como procesos de inflamación y reparación tisular o enfermedades que incluyen: el cáncer, retinopatías vasoproliferativas y artritis reumatoide (Folkman J y Shing Y, 1992; Aurebach W y Aurebach R, 1994).

Sin embargo, en las hembras adultas, la angiogénesis ocurre de forma normal durante la actividad reproductiva en el ovario, el útero, la placenta y la glándula mamaria donde se exhiben períodos constantes de crecimiento, desarrollo y regresión a lo largo del ciclo reproductor. Así es posible observar que las células endoteliales de estos órganos presentan una tasa mitótica alta semejante a la presente en las células endoteliales bajo condiciones patológicas. La importancia de la angiogénesis en los eventos reproductivos se pone de manifiesto por su afectación después del bloqueo de la acción del VEGF (Fraser et al., 2000; Fraser et al., 2005; Girling et al., 2005).

La interrupción transitoria de la señalización del VEGF por agentes específicamente diseñados para inactivar al VEGF o bloquear sus receptores suprime el desarrollo folicular, la ovulación (Wulff et al., 2001; Wulff et al., 2002), la formación del cuerpo lúteo, la liberación de progesterona (Wulff et al., 2001) y la regeneración del endometrio postmenstrual (Fan X, 2008).

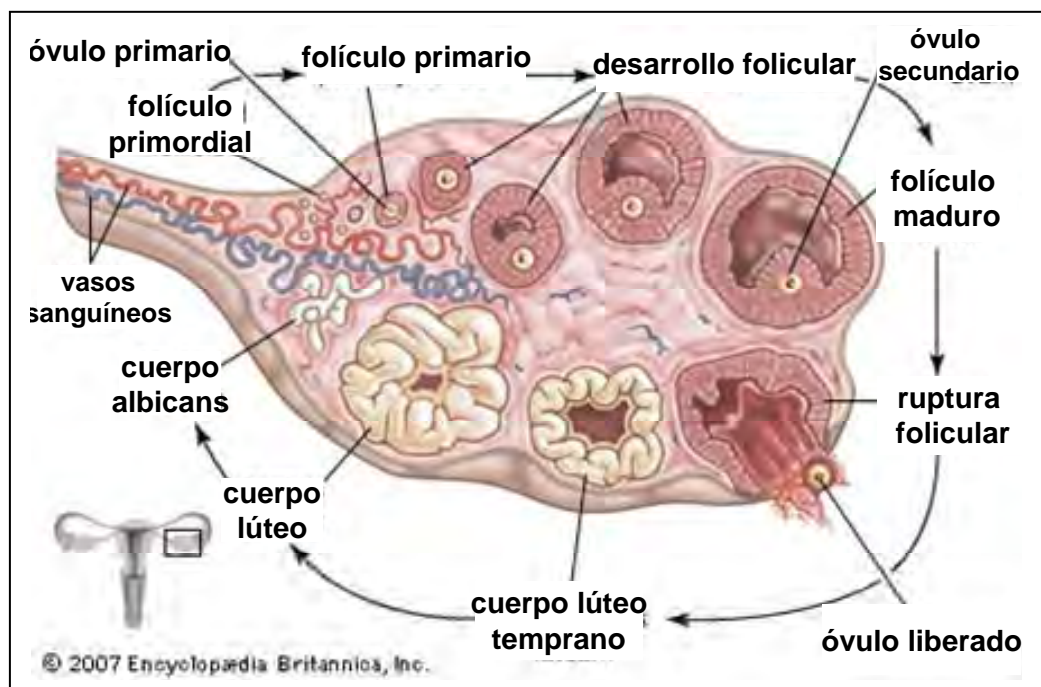
2.3.2 Angiogénesis en el ovario

El desarrollo y el crecimiento del tejido ovárico depende del suplemento vascular (Plendl, 2000). El desarrollo de los cuatro estados básicos de los folículos ováricos (primordial, primario, secundario y terciario) se encuentra acompañado por cambios cualitativos y cuantitativos de la microvasculatura del ovario (Basset 1943; Plendl, 2000), si bien la angiogénesis ocurre solamente durante las últimas fases del crecimiento folicular y los nuevos capilares se forman entre las células de la teca externa. Los neovasos son más permeables lo que determina la acumulación del líquido folicular que antecede y favorece la ruptura del folículo al momento de la ovulación (Redmer et al., 1996; Taymor et

al., 1996). Después de la ovulación, los capilares de la teca externa se extienden rápidamente a través de las células de la granulosa e invaden y acompañan la diferenciación y desarrollo del cuerpo lúteo, responsable de la producción de progesterona, necesaria para la receptividad del útero al momento de la implantación del embrión y para el mantenimiento de la gestación (Niswender et al., 1988; Plendl, 2000; Tamanini et al., 2004; Stocco et al., 2007). Así, la luteinización de cuerpo lúteo depende de la angiogénesis que al ser intensa confiere la denominación inicial del cuerpo lúteo como “cuerpo hemorrágico”. Posteriormente, la coloración de dicha estructura se torna amarillenta debido a los pigmentos liposolubles (lipocromos) que se encuentran en el citoplasma de las células lúteas. En caso de que la implantación embrionaria no ocurra, el cuerpo lúteo inicia su regresión o luteólisis acompañada por la muerte vía apoptosis del endotelio vascular (Plendl, 2000).

La información con respecto a la angiogénesis del ovario ha sido revisada extensivamente (Fraser, 2005; Fraser, 2000; Tamanini et al., 2004), y estas evidencias muestran que en el ovario, el VEGF se encuentra bajo control hormonal. El VEGF aumenta en células de la granulosa y de la teca de los folículos a medida que estos se vuelven dependientes de la acción estimulante de las gonadotropinas (Shweiki et al., 1993). También se ha observado que la inhibición de la liberación de gonadotropinas mediante el uso de un antagonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) inhibe tanto la expresión de VEGF como la angiogénesis en los folículos ovulatorios (Taylor et al., 2004). Además otras hormonas peptídicas estimulan la expresión de VEGF folicular y la angiogénesis. Por ejemplo, los factores tipo insulina-1 y 2 (IGF1 e IGF-2)

promueven la expresión del VEGF en células de la granulosa (Malaguarnera et al., 2002, 2004, 2005), y la angiotensina II induce la síntesis de VEGF en células endoteliales (Chua et al., 1998), promueve la expresión de bFGF en células lúteas bovinas (Stirling et al., 1990), y contribuye a los efectos angiogénicos dentro del cuerpo lúteo. Por otra parte, LH regula la producción de angiotensina II en el ovario (Yoshimura Y, 1997), y los antagonistas de la angiotensina II bloquean el efecto de la LH sobre la expresión de bFGF en células lúteas (Stirling et al., 1990). Más aún, el bFGF y el VEGF promueven la producción de angiotensina II por el cuerpo lúteo, lo que contribuye a la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo temprano (Kobayashi et al., 2001). Finalmente, cabe mencionar que, algunas de estas hormonas y factores proangiogénicos se encuentran presentes en el líquido folicular como por ejemplo el bFGF, VEGF, proteína ácida secretada y rica en cisteína (SPARC), angiotensina II y PRL (Bagavandoss et al., 1988).



2.3.3 Participación de la PRL en la angiogénesis del ovario.

La PRL se encuentra presente en el líquido folicular de diversas especies (Bohnet H y Baukloh V, 1985; Przala et al., 1986; Ohwaki et al., 1992), y parece derivar de la hormona producida localmente por células de la granulosa. En referencia a lo anterior, se ha demostrado la presencia del ARN mensajero de PRL en células de la granulosa humanas, bovinas, porcinas y de ratón (Einspanier et al., 1986; Schwärzler et al., 1997; Sirotkin et al., 1992; Imaoka et al., 1998). Sin embargo, la PRL del líquido folicular ovárico también puede derivar de la hormona circulante. En roedores se demostró que, la PRL aumenta en la circulación durante el período preovulatorio en respuesta a la acción estimulante de los estrógenos sobre las células secretoras de PRL de la hipófisis anterior (Przala et al., 1986; Linder et al., 1988; Taymor MD, 1996). La activación de receptores a PRL resulta en un aumento en la expresión de receptores a la hormona LH por las células de la granulosa (Clark et al., 1992; Clark et al., 1993), que promueve la maduración del ovocito dentro del folículo y estimula la producción de progesterona por las células lúteas. De hecho, la PRL regula la función lútea (Risk et al., 2001). El aumento en PRL circulante durante el proestro de un ciclo fértil donde no hubo gestación estimula la luteólisis, pero después de una pseudogestación ó gestación, el aumento de PRL sistémica promueve la supervivencia y función del cuerpo lúteo (Gaytan et al., 2001).

Las acciones de PRL sobre el ovario podrían involucrar efectos proangiogénicos (Gruemmer et al., 2005). Estudios realizados en la última década apoyan el hecho de que la PRL funcione como un factor promotor de la angiogénesis. Estudios *in vivo*, muestran que la PRL estimula la proliferación

de células endoteliales del cuerpo lúteo (Gaytan et al., 1997), de testículos (Ko et al., 2003), y del miocardio (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). La ausencia del receptor de PRL interfiere con la vascularización del cuerpo lúteo durante la gestación (Grosdemouge et al., 2003), y con el desarrollo de la glándula mamaria (Horseman et al., 1997) que también depende de una vascularización normal (Clapp et al., 2008). Sin embargo, varias inconsistencias reflejan la complejidad de las acciones de PRL sobre la angiogénesis. Se ha demostrado que la PRL es proangiogénica en el ensayo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo únicamente durante el estado latente del crecimiento de los vasos sanguíneos (Struman et al., 1999), y no durante su fase proliferativa (Clapp et al., 1993; Ge et al., 2007; Struman et al., 1999; Ueda et al., 2006). Por otra parte, la PRL no estimula el crecimiento de vasos sanguíneos en el ensayo de angiogénesis de la cornea (Clapp et al., 1993; Ueda et al., 2006), pero la delección del gen de PRL se asocia con una alta vascularización de tumores pituitarios en ratones viejos (Cruz-Soto et al., 2002).

Una pregunta importante aún sin resolver, es si la PRL actúa directa o indirectamente sobre las células endoteliales para estimular su proliferación. El receptor de PRL se ha detectado en ciertas células endoteliales para estimular su proliferación (Merkle et al., 2000; Ricken AM, 2007; Ueda et al., 2006), pero no en otras células (Ochoa et al., 2001; Clapp et al., 1992), y la gran mayoría de los estudios realizados no han logrado demostrar efectos mitogénicos de PRL sobre células endoteliales en cultivo (Clapp et al., 1993; Ferrara et al., 1991; Ochoa et al., 2001; Ricken AM, 2007; Struman et al., 1999; Ueda et al., 2006). Es posible, que esta ausencia de efecto se deba a que las células endoteliales producen y secretan PRL capaz de promover la proliferación de

manera autócrina (Clapp et al., 1998; Ricken AM, 2007). Sin embargo, en contraste con los estudios negativos existe un reporte del efecto directo de PRL sobre la proliferación de las células endoteliales *in vitro*, que es dependiente de la expresión de la hemo-oxigenasa-1 (Malaguarnera et al., 2002), una enzima que promueve el desarrollo del ciclo celular y previene la apoptosis vía la producción de bilirrubina y monóxido de carbono (Brouard et al., 2000; Deramautd et al., 1998).

Por otra parte, la PRL puede estimular la angiogénesis indirectamente al inducir la producción de factores proangiogénicos en otros tipos celulares (Kamat et al., 1985), al promover la expresión de VEGF o bFGF en células de la decidua uterina (Srivastava et al., 1998), células inmunes (Goldhar et al., 2005; Malaguarnera et al., 2004, 2005; Too et al., 1998) y células epiteliales mamarias (Goldhar et al., 2005). La PRL también induce la expresión de VEGF por células epiteliales mamarias y por la línea celular de linfoma Nb2 (Goldhar et al., 2005) a través de la activación de la vía JAK2/MAPK en macrófagos. La PRL promueve la transcripción del VEGF mediante la activación de hemo oxigenasa-1 (Malaguarnera et al., 2002).

Las acciones opuestas de PRL sobre el cuerpo lúteo pudieran involucrar mecanismos proangiogénicos y antiangiogénicos (Stocco et al., 2007). El tratamiento con PRL induce la proliferación de células endoteliales en el cuerpo lúteo en ratas ciclantes, mientras que la disminución en la concentración de PRL circulante con bromocriptina (Gaytan et al., 1997) o la delección del gen del receptor de PRL (Grosdemouge et al., 2003) interfiere con la angiogénesis en el cuerpo lúteo. Además, la concentración de vaso-inhibinas derivadas de la

proteólisis de la PRL puede elevarse al final del ciclo estral, por que la PRL estimula la actividad de la metaloproteasa 2 (MMP-2) durante la regresión del cuerpo lúteo (Endo et al., 1993), y la MMP-2 genera vasoinhibinas a partir de PRL (Macotella et al., 2006). Además, al inicio de su regresión, el cuerpo lúteo produce y secreta altas concentraciones de catepsina D, otra de las proteasas que procesan a la PRL hacia vasoinhibinas (Erdmann et al., 2007).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que la angiogénesis es un proceso importante para el desarrollo y ovulación de los folículos ováricos y la hormona PRL promueve la angiogénesis y además se encuentra presente en el líquido folicular, en este estudio investigamos si la PRL del líquido folicular tiene acciones proangiogénicas y por lo tanto, si esta participa en la regulación de la angiogénesis folicular.

III. HIPOTESIS.

La prolactina del líquido folicular estimula la angiogénesis a través de un efecto directo sobre el endotelio vascular.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Analizar si la prolactina presente en el líquido folicular estimula la proliferación de células endoteliales en cultivo, determinar el tipo de receptores a PRL presentes en estas células y si su activación conlleva a la proliferación endotelial a través de la vía JAK2/STAT3 .

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la concentración de la prolactina presente en el líquido folicular aumenta con relación al desarrollo de los folículos.
2. Analizar si la PRL del líquido folicular se asocia con PRLs que promueven (PRL íntegra) o inhiben (vasoinhibinas) la angiogénesis, a través de determinar la masa molecular y la bioactividad de la prolactina presente en el líquido folicular.
3. Determinar si el líquido folicular tiene efecto sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo y si este efecto se bloquea mediante la inmunoneutralización de la PRL endógena con anticuerpos anti-PRL policlonales y monoclonales.
4. Analizar la presencia de receptores de PRL en las células endoteliales y si el efecto de la PRL del líquido folicular se asocia a la activación de la vía JAK2 y STAT3.

V. MATERIAL Y METODOS

5.1.1 Obtención del líquido folicular ovárico.

Se obtuvieron ovarios de vacas adultas, no gestantes y sanas en el Rastro Municipal (Municipio de Querétaro). Después del sacrificio, los ovarios fueron disecados, colocados en solución salina (NaCl 0.9%) a 4°C y trasladados al laboratorio.

Los ovarios fueron manipulados por separado bajo condiciones estériles, las dimensiones de los folículos ováricos se determinaron mediante el uso de un Vernier y los folículos se clasificaron de acuerdo a su diámetro: en pequeños (≤ 5 mm) y grandes (≥ 10 mm). Posteriormente, el líquido folicular (LF) se obtuvo por punción directa de cada folículo y jeringas de insulina. Los LF correspondientes a un mismo tamaño folicular fueron reunidos en un solo tubo. Dado que hay un número mayor de folículos pequeños que de medianos y grandes (generalmente uno), el volumen obtenido fue equivalente entre las tres poblaciones de folículos. Los LF se centrifugaron a 2000 rpm X 10 min, el sobrenadante se alicuotó y almacenó a -20°C.

5.1.2 Determinación de la concentración de PRL en el líquido folicular

a) ELISA (Ensayo Inmuno-enzimático en fase sólida).

Se estableció el ensayo de ELISA para PRL bovina utilizando anticuerpos primarios y secundarios acoplados a peroxidasa y de acuerdo al método previamente descrito (Dueñas et al., 1999). Brevemente, placas Dynatech Immulon de 96 pozos se forraron con 10 ng de PRL bovina (grado biológico) y distintas diluciones del antisuero anti-prolactina bovina (NHPP2, Grado RIA) suministrados ambos por los Institutos Nacionales de Salud de los EUA (NIH,

Torrance, CA). Se seleccionó la dilución 1:2000 del antisuero por ser la mínima, capaz de dar lecturas máximas de unión a PRL. Con esta dilución se incubaron concentraciones crecientes de PRL en cada uno de los pozos forrados con 10 ng de PRL, y se obtuvo una curva de competencia que proporcionó valores lineales dentro de un intervalo entre 2 y 100 ng de PRL. Curvas de competencia con distintas diluciones de los LF fueron paralelas a la curva estándar y sus valores fueron cuantificados de acuerdo a dicha curva estándar. Observando un coeficiente de variación de 6% intraensayo y de 11% interensayo.

b) Bioensayo en células Nb2.

Para conocer la bioactividad de la PRL en los LF se realizó el bioensayo de las células linfoides Nb2. Las células Nb2 son una línea celular que proviene de un linfoma murino que es dependiente de la PRL para su proliferación (Tanaka et al., 1980). Este bioensayo fue realizado de acuerdo al método establecido por Cruz et al., 2001, en el cual cajas de 96 pozos se sembraron con 15,000 células Nb2/ pozo en 100 μ l de medio de bioensayo [Dulbecco's Modified Tagle Médium (DMEM, GIBCO, BRL, USA) + 10% HS +antibióticos 1% (penicilina, estreptomycin; GIBCO) + 3.3 μ l β -mercaptoetanol (J. Baker, EUA)] y se cultivaron durante 48 h en presencia o ausencia de distintas concentraciones del LF. Al término del tiempo, las células Nb2 fueron incubadas en presencia de 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) durante 4 h a 37°C. La reducción de MTT por deshidrogenasas celulares genera un producto (formazán) colorido cuya cuantificación es una medición directa del metabolismo y viabilidad celular. Dado que la actividad de estas

enzimas se asocia directamente con el número de células, este método se acepta convencionalmente como índice de proliferación celular (Green et al., 1984). El formazán precipitado por la reducción de MTT se solubilizó con 0.4N HCl-SDS 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente y su cuantificación se obtuvo midiendo la absorbancia de cada pozo a 570 nm. La concentración de PRL bioactiva en el líquido folicular se determinó a través de interpolar las respuestas de proliferación celular de las muestras de los LF con las dosis crecientes de la PRL estándar bovina.

5.1.3 Análisis de la PRL del líquido folicular por Western-blot.

Las proteínas presentes en el líquido folicular se cuantificaron por el método de Bradford (1976). Muestras de LF de folículos grandes y pequeños conteniendo 1 µg de proteína, se procesaron bajo condiciones reductoras (Laemmli, 1970) y desnaturalizantes (SDS) en geles al 15% de poliacrilamida y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979), y revelaron con el antisuero anti-PRL bovina (NHPP2, 1:300) o en el caso control con suero normal de conejo (NRS, 1:300). Las membranas se revelaron mediante el estuche de anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina (Bio-Rad Laboratorios Hercules, CA).

5.1.4 Obtención de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC)

Las BUVEC fueron aisladas a partir de cordones umbilicales provenientes de fetos bovinos colectados en el Rastro Municipal, y de acuerdo al método descrito por Olsen et al., 1994. La vena umbilical fue perfundida con solución

de Hank's (GIBCO BRL, USA) durante 15 minutos a 37°C, posteriormente las células endoteliales fueron removidas con tripsina-EDTA (GIBCO BRL, USA)/ Hank's. La suspensión celular fue centrifugada y el paquete celular resuspendido en el medio de cultivo [F-12K (GIBCO BRL, USA)] suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 µ/ml de penicilina estreptomina (GIBCO BRL, USA)]. Las células fueron sembradas en platos de 100 mm y el medio fue cambiado cada tercer día. Las BUVEC se utilizaron entre los pases 6 y 15 bajo un 80% de confluencia.

5.1.5 Efecto del LF sobre la proliferación de BUVEC.

Distintas cantidades del LF provenientes de los folículos grandes y pequeños (0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 µl, que corresponden a las diluciones 1:200, 1:100, 1:40 y 1:10 respectivamente de los LF de folículos grandes y pequeños) se adicionaron a células BUVEC sembradas 10,000 células/pozo en cajas de 48 pozos en 250 µl de medio de bioensayo (F-12K + antibióticos 1% + 0.1% de suero fetal bovino inactivado) y se incubaron durante 48 horas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de aire. El efecto del LF se comparó con un grupo control donde el líquido folicular de folículos grandes fue inactivado con calor al hervirlo por 30 min a 90°C, y subsecuentemente centrifugado por 60 min a 2500 rpm para remover las proteínas desnaturalizadas. La proliferación endotelial se evaluó mediante el método de MTT citado anteriormente.

La posible participación de PRL presente en el LF en el efecto proliferativo del mismo se evaluó por medio de la incubación del LF en presencia y ausencia de una dilución 1:300 de anticuerpos policlonales ó monoclonales anti-PRL bovina. Además del antisuero NHPP2, se utilizó un antisuero casero

generado en conejos contra el estándar de PRL bovina del NIH. Los anticuerpos monoclonales anti PRL bovina (5G2 y 6F11) fueron donados por Jonathan Scammel de la Universidad de Alabama del Sur en Mobile, EUA. Los anticuerpos control se purificaron a partir del suero normal de conejo (NRS) y anticuerpos de suero de ratón no inmunizado fueron adquiridos de ICN Biomedicals (Aurora, IL, EUA).

5.1.6 Efecto del estándar de PRL bovina sobre la proliferación de BUVEC.

Las BUVEC se trataron con dosis crecientes del estándar de PRL bovina (0.02, 0.1, 0.2, 1.0, 2.0 y 10.0 nM) durante 48 h. En otro experimento, las BUVEC fueron preincubadas 12 h con una dilución 1:10 del LF de folículos grandes, posteriormente el LF fue retirado y sustituido por diferentes concentraciones de PRL bovina durante 36 h. En ambos experimentos la proliferación celular se evaluó mediante el uso del MTT.

5.1.7 Detección del receptor de PRL en BUVEC.

Sesenta µg de proteína de un homogenado de células BUVEC se procesó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras utilizando geles al 7.5% de poliacrilamida. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa reveladas con una dilución 1:500 de anticuerpos anti-receptor de PRL policlonales (R116, donado por la Dra. Li-Yuan Yu-Lee, Universidad de Texas en Houston, EUA) y monoclonales (U5, obsequio del Dr. Paul Kelly, INSERM U584, Paris, Francia). El anticuerpo policlonal anti-actina (sc-7210, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) se utilizó como

control para evaluar la cantidad de muestra cargada en el gel. La reacción con los anticuerpos se reveló utilizando estuches de anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón acoplados a fosfatasa alcalina (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA), o bien acoplados a peroxidasa de rábano (111-035-003, Jakson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA). Estos últimos se evaluaron mediante la técnica de quimioluminiscencia (ECL, superSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

5.1.9 Mecanismo de señalización del receptor de PRL.

Para evaluar la participación del receptor de PRL en su efecto proliferativo sobre las BUVEC, las células fueron incubadas durante 15 minutos en presencia o ausencia del inhibidor de JAK2, AG490 (100 μ M) (Neria et al., 2007), preincubadas por 12 h con o sin el LF de folículos grandes (dilución 1:10), y subsecuentemente incubadas con PRL bovina (2.0 nM) durante 36 h. Asimismo, la fosforilación/activación de las proteínas JAK2 y STAT3, que forman parte de la vía clásica de activación del receptor de PRL, se evaluó mediante Western blot. Para este propósito, BUVEC incubadas durante 24 horas en medio de cultivo libre de suero fueron pre-tratadas con o sin el LF (10 μ l) de folículos grandes por 12, 24 ó 48 h y posteriormente incubadas durante 5 min con ó sin PRL bovina (dilución 1:10). Al cabo de la incubación, las BUVEC se lavaron con buffer de fosfatos, se lisaron con 5nM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5% Nonidet, 1mM EGTA, 10 μ g/ ml aprotinina, 1 mM PMSF, se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min a 4°C y se procesaron por Western blot. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con una dilución 1:200 del anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina (p-Tyr, clone 4610, Upstate-Milipore,

Billerica, MA) y se revelaron mediante anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano y quimioluminiscencia. Posteriormente, los anticuerpos se removieron de estas membranas que se incubaron con una dilución 1:250 del anticuerpo policlonal anti- STAT-3 total (sc-483, Santa Cruz Biotechnology), ó con una dilución 1:1000 del anticuerpo policlonal anti JAK2 total (06-255 en, Upstate-Milipore). Finalmente, estas segundas reacciones fueron reveladas utilizando con segundos anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina. Los valores de densidad óptica fueron determinados mediante el programa de análisis de imágenes 1D software v3.5 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

VI. Análisis estadísticos.

Los resultados se compararon mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA) con la prueba de Dunnet, o en su caso se utilizó la prueba T de Student, utilizando el programa estadístico Sigma Stat 7.0 (Systat Software Inc., San José CA). Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar para $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS.

7.1 El líquido folicular estimula la proliferación de células endoteliales.

La proliferación de las BUVEC se evaluó después de su incubación con concentraciones crecientes del LF proveniente de folículos ováricos grandes y pequeños (Fig. 1). El LF de ambos tipos de folículos estimuló la proliferación endotelial, si bien el efecto del LF de los folículos grandes alcanzó valores significativamente mayores ($P < 0.05$) al de los pequeños. En diluciones de 1/40 a 1/10, el efecto del LF de los folículos grandes fue similar al inducido por la concentración de 0.25 nM de bFGF, uno de los principales factores proangiogénicos presentes en el líquido folicular (Tamanini et al., 2004) (Fig. 1). El efecto mitogénico del LF de los folículos grandes se bloqueó mediante su inactivación con calor indicando su mediación por una molécula termo-sensible.

Figura 1

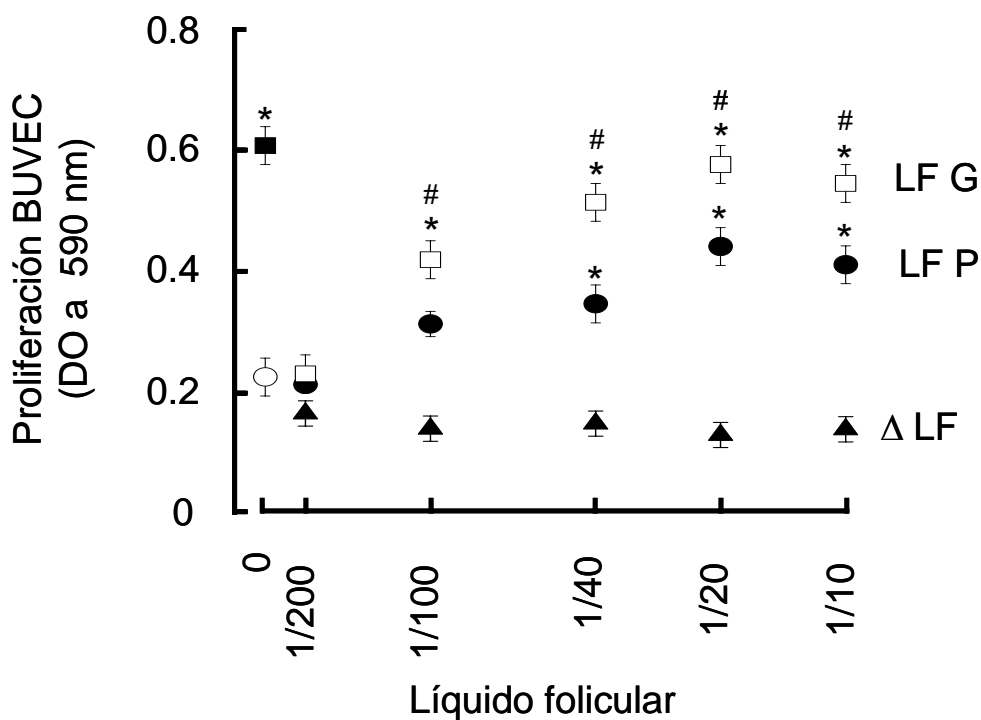


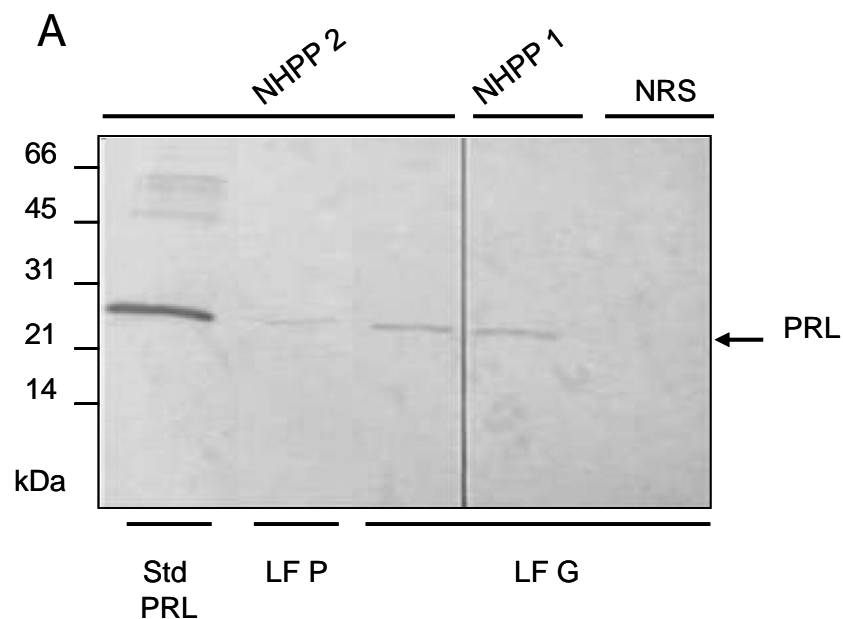
Figura 1. Efecto dosis-dependiente sobre la proliferación de BUVEC después de un tratamiento por 48 h con diluciones 1:200, 1:100, 1:40, 1:20, de líquido folicular (LF) de folículos pequeños (LFP; círculos negros) y grandes (LFG,

cuadros blancos), antes y después de su inactivación con calor (LF Δ , triángulos negros). Como control positivo, las BUVEC se incubaron con bFGF (0.25nM) por 48 h (cuadro negro). Los resultados son promedios \pm EE de tres experimentos independientes. # $P < 0.05$ vs. control (sin tratamiento, círculo blanco) y * $P < 0.05$ vs. LFP.

7.2 El líquido folicular contiene PRL.

La presencia de PRL se evaluó en los folículos ováricos grandes y pequeños mediante Western blots (Fig. 2A). Este método detectó PRL inmunoreactiva de 23 kDa en ambos LF si bien con una mayor concentración en los folículos grandes que en los pequeños (Fig. 2B). La especificidad del ensayo se confirmó con el uso de dos anticuerpos policlonales anti-PRL y la falta de reacción cuando se empleó suero normal de conejo. La presencia de PRL se confirmó mediante ELISA y el bioensayo de la línea celular Nb2 proveniente de un linfoma murino. Los resultados de ambos métodos fueron similares confirmando la mayor concentración de PRL en los folículos grandes con respecto a los pequeños (Fig. 2B). Con base en estos resultados todos los experimentos subsecuentes se realizaron con LF de folículos ováricos grandes.

Figura 2.



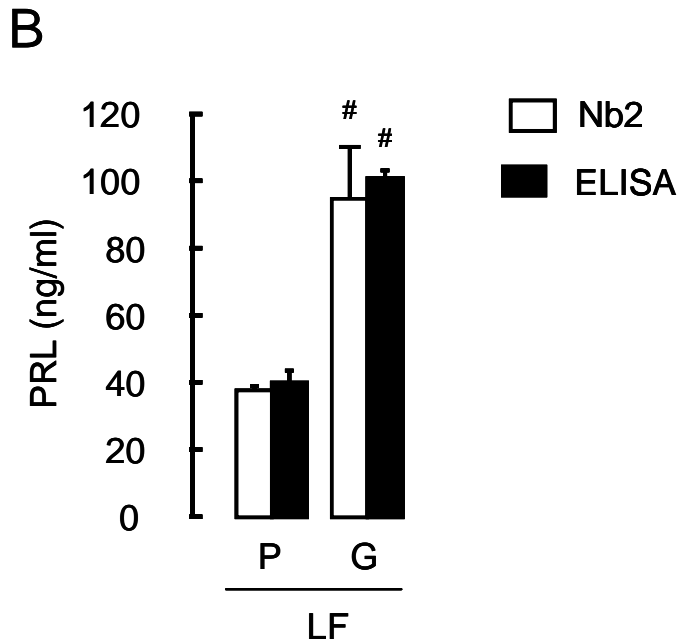


Figura 2. A. Western-blot representativo que muestra la presencia de PRL inmunoreactiva de 23 kDa en el líquido folicular de folículos pequeños (LFP) y grandes (LFG), mediante su reacción con dos antisueros anti-PRL (NHPP1 y NHPP2) y la ausencia de reacción con suero normal de conejo (NRS). Se incluye una preparación estándar de PRL (Estd PRL) y las posiciones de marcadores de pesos moleculares en kDa. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. **B.** Determinación de PRL en líquido folicular proveniente de folículos pequeños (P) y grandes (G) por el ensayo de proliferación celular de la línea celular Nb2 y el ELISA. Los resultados son promedios \pm EE de tres experimentos independientes. $\#P < 0.05$ vs. LFP.

7.3 La PRL del líquido folicular estimula la proliferación de células endoteliales.

Para evaluar la contribución de la PRL en el efecto mitogénico del LF, se determinó el efecto del LF sobre la proliferación de las BUVEC en presencia de anticuerpos capaces de inmunosequestrar e inactivar a la PRL endógena (Fig. 3). Así, se emplearon dos anticuerpos policlonales y dos monoclonales anti-PRL y se utilizaron como controles el suero normal de conejo e inmunoglobulinas de ratón. Los cuatro anticuerpos anti-PRL inhibieron el efecto

proliferativo del LF, mientras que el suero y los anticuerpos control no tuvieron efecto. El tratamiento con el antisuero anti-PRL NHPP1 en ausencia del LF no mostró efecto (Fig. 3).

Figura 3.

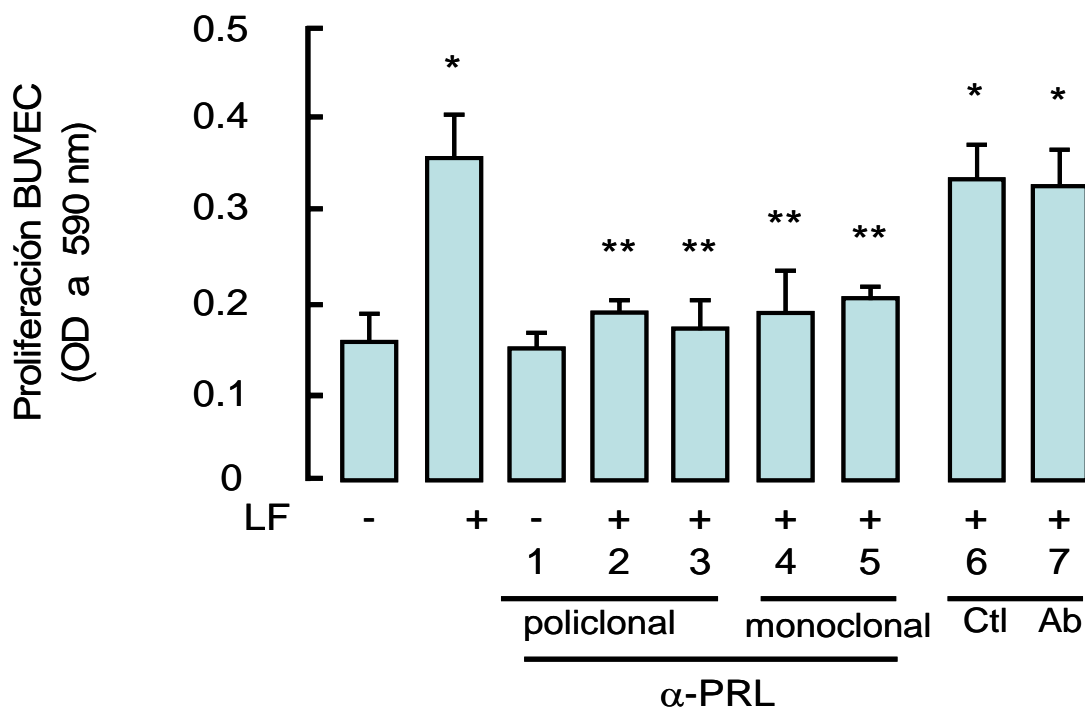


Figura 3. Efecto del líquido de folículos grandes (dilución 1/10) (LFG) sobre la proliferación de las BUVEC por 48 h, en presencia de anticuerpos policlonales anti-PRL (pAb, 2: NHPP1; 3: NHPP2, 1:500), anticuerpos monoclonales anti-PRL (mAb, 4:5G2; 5:6F11, 1 µg/ml), o con anticuerpos control (ctl Ab, 6: suero normal de conejo (NRS), 1:500; 7:IgG de ratón, 2 µg/ml). Como control negativo, las BUVEC con anticuerpos (pAb, 1:NHPP1) en ausencia del LFG + y -, indican la presencia o no de LFG, respectivamente. La proliferación celular se evaluó mediante el método de MTT a través de la densidad óptica (DO) del producto colorido de la reacción formazán. Los resultados son promedios ± EE de tres experimentos independientes * $P < 0.05$ vs. sin LFG y ** $P < 0.05$ vs. con LFG.

Para examinar más a fondo el efecto de la PRL, las BUVEC fueron incubadas con una preparación estándar de PRL durante las últimas 36 horas de un período de incubación de 48 horas. En este experimento la PRL no

afectó la proliferación de las BUVEC en ninguna de las concentraciones probadas (0.02-10 nM) (Fig. 4). Para evaluar si la presencia del LF es necesaria para que la PRL pueda estimular la proliferación endotelial, las BUVEC fueron incubadas durante 12 h con el LF (dilución 1/10) y durante las siguientes 36 horas se incubaron en ausencia del LF con o sin la PRL estándar. El tratamiento con el LF por 12 h en ausencia de PRL no tuvo ningún efecto significativo sobre la proliferación de las BUVEC. Sin embargo, después de 12 horas de pre-incubación con LF todas las concentraciones de PRL estimularon la proliferación de las células endoteliales (Fig. 4).

Figura 4.

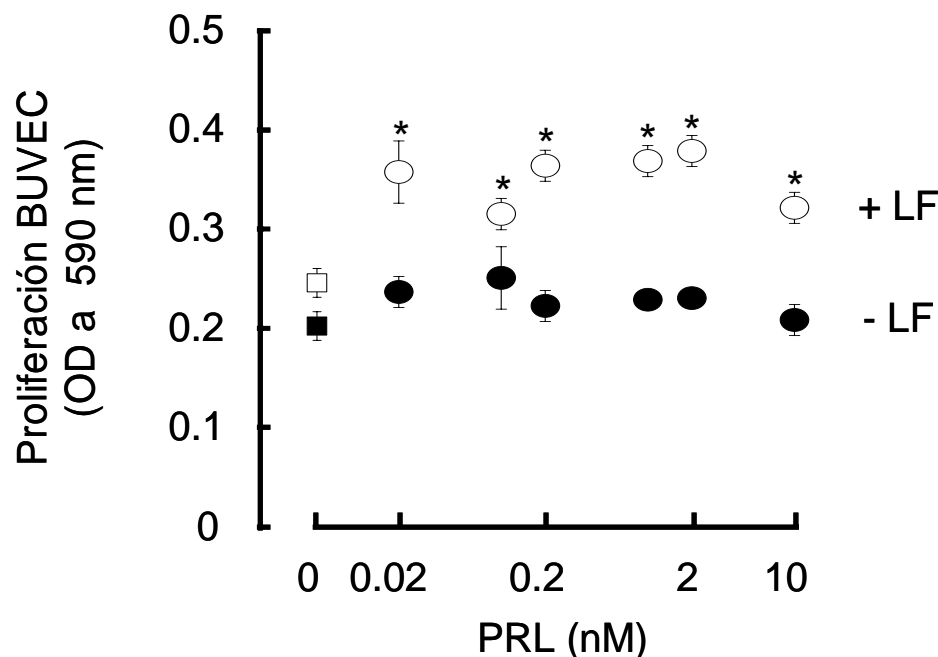
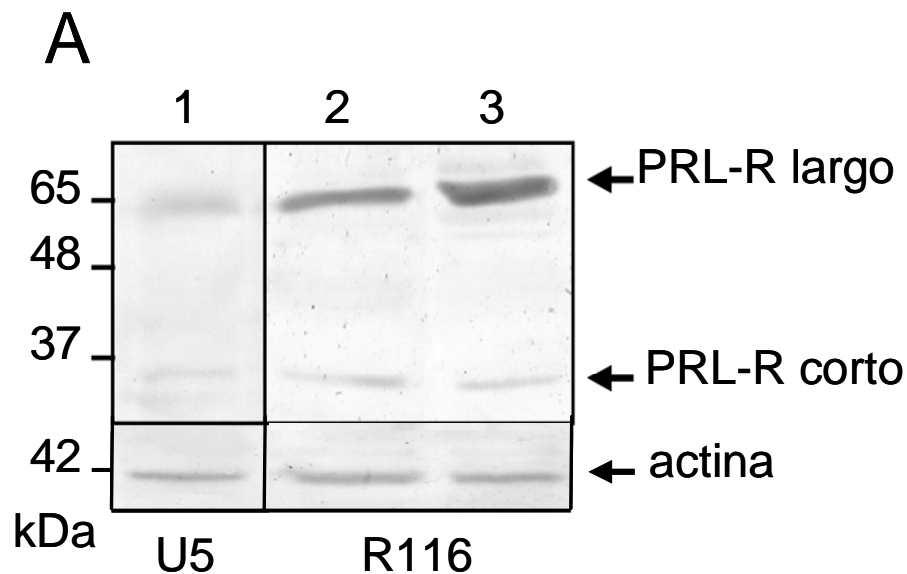


Figura 4. Efecto de la PRL exógena sobre la proliferación de las BUVEC. La PRL estándar se adicionó después de una preincubación por 12 horas en ausencia (círculos negros) o en presencia de líquido folicular (LF, círculos blancos). Los controles son la incubación de BUVEC con LF por 12 horas, seguida de una incubación por 36 horas sin PRL (cuadro blanco) y las BUVEC incubadas por 48 horas sin LF y sin PRL (cuadro negro). La proliferación celular se evaluó mediante el método de MTT a través de analizar los valores de la densidad óptica (DO) del producto colorido de la reacción formazán. Los valores son promedios \pm EE de triplicados. * $P < 0.05$ vs las concentraciones respectivas de la PRL en ausencia del LF.

7.4 El líquido folicular estimula la expresión de las isoformas larga y corta del receptor de PRL, y la PRL y el LF estimulan la fosforilación de JAK2 y STAT3.

Con el propósito de dilucidar los mecanismos de la acción de la PRL en las BUVEC, se investigó el efecto del LF sobre la expresión de las isoformas corta y larga del receptor de la PRL. En extractos de BUVEC, anticuerpos monoclonales (U5) y policlonales (R116) anti-receptor de PRL detectaron bandas inmunorreactivas con un peso molecular aparente de 65 y 34 kDa, que corresponden a los tamaños esperados para las isoformas larga y corta del receptor a PRL de la especie bovina, respectivamente (Fig. 5A). El tratamiento de las BUVEC con el LF (dilución 1/10) incrementó la intensidad de ambas proteínas inmunorreactivas en todos los tiempos analizados (Fig. 5 B).

Figura 5



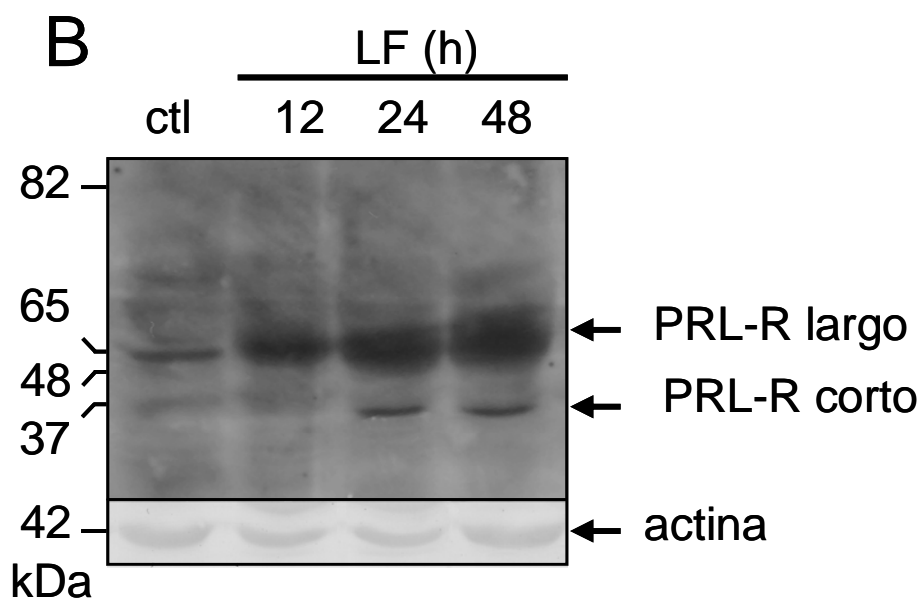


Figura 5. El líquido folicular (LF) regula la expresión del receptor de PRL en las BUVEC. **A.** Extractos de BUVEC incubadas en ausencia del líquido folicular, y procesados por Western-blot utilizando anticuerpos anti-receptor de PRL, monoclonal (U5, carril 1) y policlonal (R116, carril 2). El anticuerpo R-116 también se utilizó para reaccionar con extractos de células endoteliales de aorta bovina (carril 3). Como control de carga se presenta la actina revelada con un anticuerpo policlonal anti-actina. **B.** Extractos de BUVEC incubadas en ausencia del LF por 48 horas (ctl) o en presencia de LF (dilución 1/10) por 12, 24 y 48 horas (h) procesados por Western-blot con el anticuerpo policlonal anti-receptor de PRL (R-116). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Para determinar la funcionalidad de los receptores de PRL en las BUVEC se evaluó el efecto del LF y de la hormona sobre la activación de JAK2 y STAT3 . La incubación de las BUVEC durante 12 horas con el LF (1/10 dilución) estimuló 2.7 veces la fosforilación/activación de JAK2 (Fig. 6A,B) y 6.3 veces la fosforilación/activación de STAT3 (Fig. 6A,C). El tratamiento agudo solo con PRL (2 nM x 5 min) incrementó 0.5 veces la fosforilación/activación de JAK2 (Fig. 6A,B) y 5 veces la fosforilación/activación de STAT3 (Fig. 6A,C). Notoriamente, cuando se aplicó después del LF, la PRL no incrementó el efecto

del LF sobre JAK2 (Fig. 6A,C) y la fosforilación de STAT3 fue más baja que lo observado únicamente con LF pero más alta que el efecto inducido exclusivamente con PRL (Fig. 6A,C).

Figura 6.

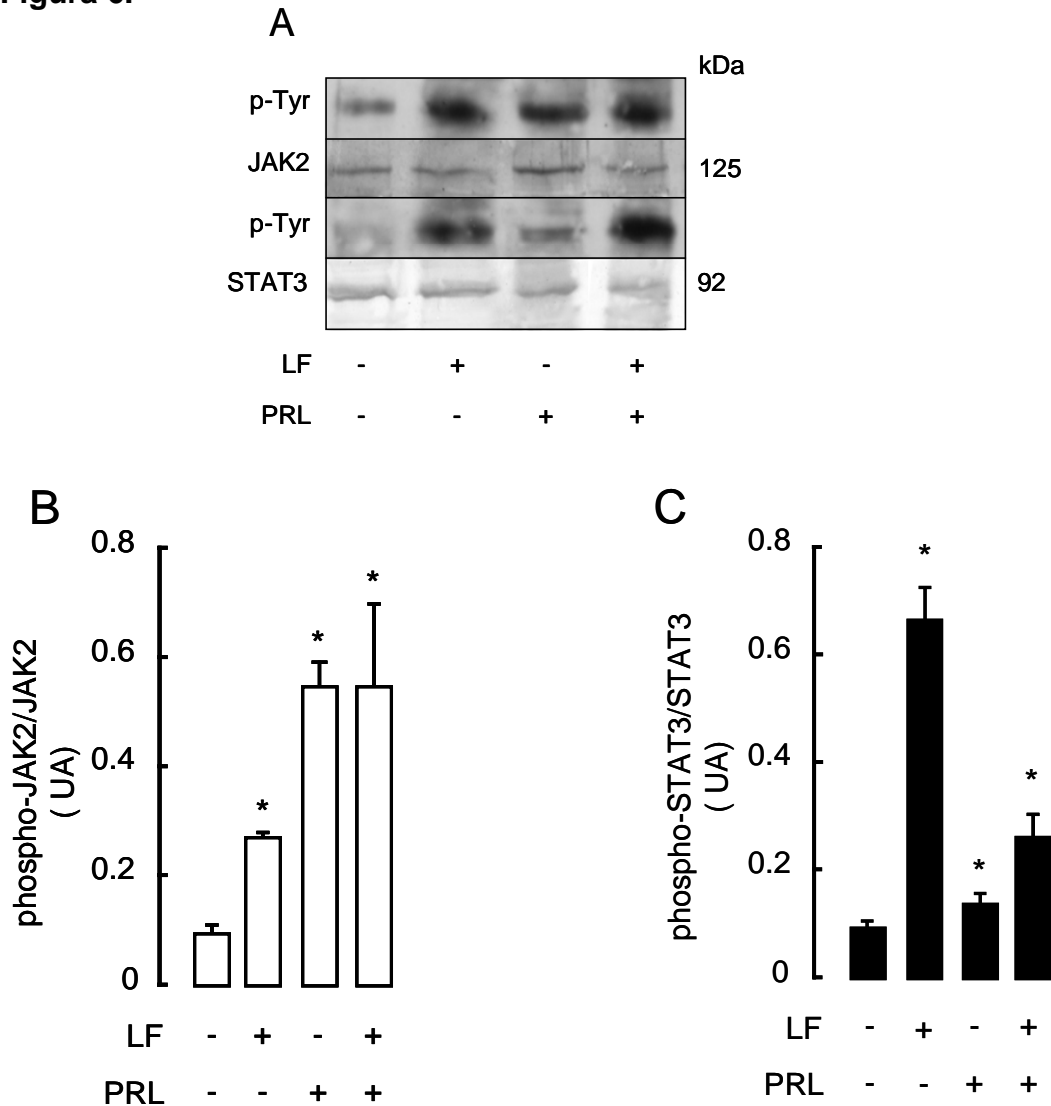


Figura 6. A. Análisis por Western blot de la fosforilación/activación de JAK2 (proteína inmunorreactiva de 125 kDa) y de STAT3 (proteína inmunorreactiva de 92 kDa) de extractos de BUVEC incubadas o no con LF (dilución 1/10), PRL (2nM, 5 min), o con LF por 12h seguida de la aplicación de PRL (2nM) por 5 min. La fosforilación de dichas proteínas se evaluó utilizando anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina (pTyr) y anticuerpos policlonales anti-JAK2 o anti-STAT3. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Análisis densitométrico de las bandas de las proteínas fosforiladas JAK2 (**B**) y STAT3 (**C**) donde los valores son corregidos por las mediciones densitométricas de las bandas de las proteínas totales JAK2 y STAT3 y expresado como cocientes en unidades arbitrarias (UA). Los valores

son promedios \pm EE de determinaciones obtenidas en tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. las BUVEC no tratadas.

Para analizar la posible contribución de una vía JAK2-dependiente en la acción mitogénica del LF sobre el endotelio, las células BUVEC fueron preincubadas con AG490, un inhibidor de JAK2, antes del tratamiento con LF y/o PRL. El AG490 no modificó el efecto del LF sobre las BUVEC (Fig. 7).

Figura 7.

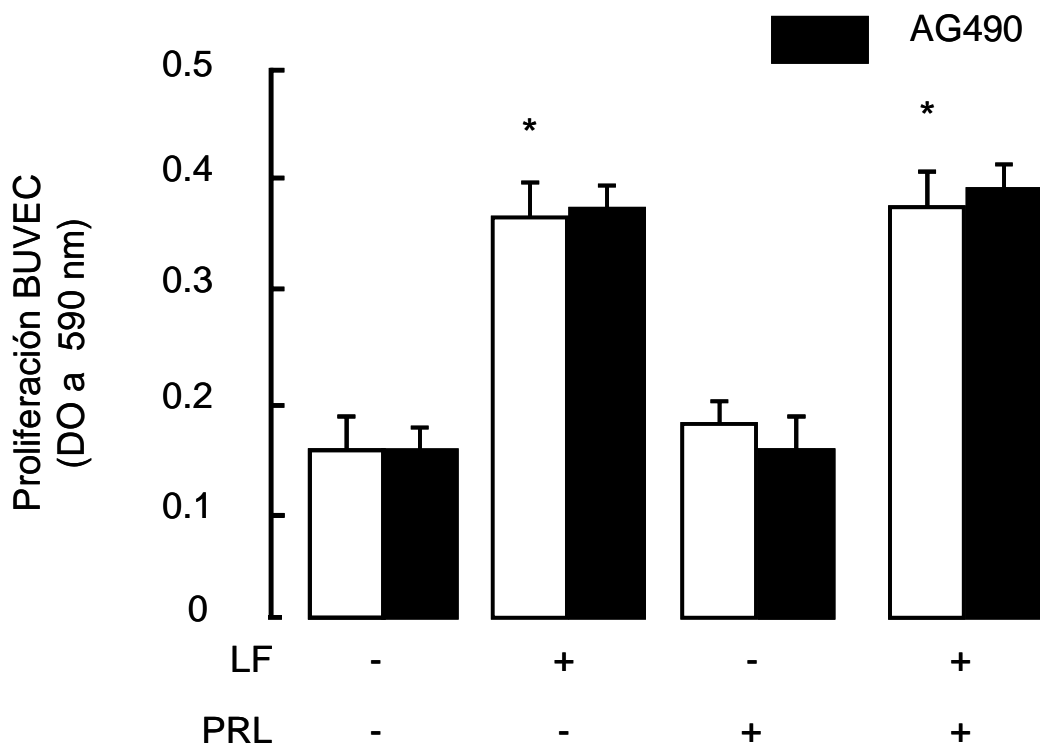


Figura 7. Análisis de la participación de JAK2 en el efecto mitogénico del líquido folicular (LF) sobre las BUVEC. Las BUVEC fueron incubadas o no con LF (dilución 1/10) por 48 horas, o bien con o sin LF por 12 horas seguido de la incubación con PRL por 36 horas. Cada experimento fue realizado después de un pretratamiento por 15 min en presencia o ausencia del inhibidor de JAK2 (AG490, 100 μ M) y expresado como cocientes en unidades arbitrarias (UA). Los resultados son promedios \pm EE de triplicados * $P < 0.05$ vs. BUVEC no tratadas.

VIII. DISCUSION

La angiogénesis es necesaria para la maduración de los folículos ováricos (Redmer et al., 1996), y el LF contiene varios factores proangiogénicos que se originan en células de la granulosa o bien se derivan de la circulación sanguínea (Bachelot et al., 2007; Bachelot et al., 2002; Bailey C et al., 2006). En este trabajo se muestra que la PRL puede formar parte de estos factores. Encontramos que la PRL presente en el LF estimula la proliferación de células endoteliales y que esta acción requiere de la regulación de las isoformas larga y corta de su receptor y de la cooperación de otras moléculas de señalización distintas a JAK2 y STAT3 (Clark et al., 1992; Clark et al., 1993). Estos hallazgos nos indican que el aumento en los niveles de PRL durante el desarrollo folicular promueve la angiogénesis y, por lo tanto, que el impacto de la PRL sobre la foliculogénesis es más amplio de lo que anteriormente se pensaba.

La PRL se encuentra en el LF humano (Laufer et al., 1984), porcino (Przala et al., 1986) y bovino (Henderson et al., 1982), y puede originarse localmente ya que el ARN mensajero de la PRL se expresa en las células foliculares del ovario en humanos (Phelps et al., 2003) y está presente en células de la granulosa de folículos maduros en roedores (Dunaif et al., 1982).

Las concentraciones de PRL medidas en el líquido folicular de la rata (40-100 ng/ml) corresponden al rango reportado en bovinos (20-80 ng /ml) (Wise et al., 1994a; Wise et al., 1994b) y en humanos (30-137 ng /ml) (Bonhet at el., 1985; Linder et al., 1988). Además, de acuerdo a evidencias previas (Henderson et al, 1982), la concentración de PRL fue significativamente mayor en los folículos grandes que en los pequeños. El hecho de que el ELISA y el

bioensayo hayan coincidido en los valores de la concentración de PRL en los líquidos foliculares, aunado a que el análisis de los mismos por Western blot reveló exclusivamente la presencia de una PRL de 23 kDa, apoya que el líquido folicular contiene predominantemente a esta isoforma de la hormona, que es la PRL contra la cual se calibran tanto el ELISA como el bioensayo.

La capacidad del LF para inducir angiogénesis se demostró anteriormente en otras especies de mamíferos (Fraser et al., 2000) y se le atribuyó principalmente a factores proangiogénicos como VEGF y bFGF presentes en el LF (Tamanini et al., 2004). Sin embargo, se ha mostrado que no toda la actividad angiogénica del LF se puede explicar por la acción de estos factores (von Otte et al., 2006). De hecho, en el presente trabajo se muestra que la inmunoneutralización de PRL bloquea la capacidad del LF para promover la proliferación de células endoteliales y, por ende, que la hormona PRL es un factor angiogénico importante del LF. Sin embargo, es difícil entender por qué la inmunoneutralización de PRL elimina la totalidad de la actividad angiogénica del LF. Si bien es posible que la PRL podría ser parte de un importante complejo mitogénico junto con otros factores proangiogénicos, observaciones similares en otros tejidos indican que la inmunoneutralización podría no excluir la contribución de otros potentes reguladores de la angiogénesis. Por ejemplo, la inmunoneutralización de sólo un factor antiangiogénico como el factor derivado del epitelio-pigmentario (PEDF) (Dawson et al., 1999) o de las vasoinhibinas (Aranda et al., 2005) induce la angiogénesis en tejidos oculares, eliminando la acción inhibidora de la molécula inmunosequestrada por el anticuerpo, pero también la de otros factores antiangiogénicos presentes en el ojo. Por otra parte, es de notar, que

la presencia de una mayor concentración de PRL en el LF de los folículos grandes detectada por Western-blot, ELISA, y bioensayo, se asocia con una mayor capacidad del LF para promover la proliferación de células endoteliales.

El efecto proangiogénico de la PRL en el ovario se apoya en las observaciones de que la PRL estimula la proliferación del endotelio vascular del cuerpo lúteo (Gaytan et al., 1997) y que la angiogénesis del cuerpo lúteo se inhibe en los ratones knock-out para el receptor de PRL (Grosdemouge et al., 2003). Sin embargo, el efecto proangiogénico de la PRL no siempre es claro y parece depender de las condiciones del endotelio. Por ejemplo, en la gran mayoría de los estudios *in vitro* no se ha podido demostrar un efecto directo de la PRL sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo (revisados en Clapp et al., 2008), presumiblemente porque los receptores a PRL ya se encuentran ocupados por la PRL producida por las mismas células endoteliales (Clapp et al., 2008). En el presente trabajo, el tratamiento con PRL no estimuló la proliferación de las BUVEC a menos de que estas fueran incubadas previamente con el LF. Bajo estas condiciones, concentraciones de PRL exógena comparables a las detectadas en el LF de folículos pequeños (2 nM) o grandes (4 nM) estimularon significativamente la reproducción de las BUVEC. Estos resultados nos llevaron a considerar el que el LF contiene un componente distinto a la PRL que facilita la acción proangiogénica de la hormona y que esto lo haga posiblemente a través de promover la expresión de los receptores a PRL en el endotelio.

En apoyo a la posibilidad anterior, mostramos que dos anticuerpos anti-receptor de PRL distintos detectaron proteínas con masas moleculares aparentes de 65 y 34 kDa, que probablemente corresponden a las isoformas de

los receptores largo y corto de la PRL cuya presencia fue previamente reportada en estas células (Ricken et al., 2007). Importantemente, encontramos que al incubar las BUVEC con LF durante 12, 24 ó 48 horas se induce el aumento de estos posibles receptores a PRL, sugiriendo fuertemente que la regulación de estos receptores es uno de los mecanismos por los cuales el LF favorece el efecto mitogénico de la PRL sobre el endotelio vascular. Entre los posibles factores presentes en el LF responsables de este efecto se encuentran los esteroides gonadales que se sabe pueden promover la expresión del receptor a PRL (Tseng et al., 1998). Además citocinas proinflamatorias también han sido detectadas en el LF (Buscher et al., 1999), y estas estimulan la expresión de la isoforma del receptor largo a PRL en fibroblastos de pulmón de rata (Corbacho et al., 2003).

En apoyo a que la PRL activa sus receptores en las BUVEC, se mostró que la PRL por si sola induce la fosforilación de JAK2 y STAT3 en estas células. El LF también estimuló la fosforilación JAK2 y STAT3 en las BUVEC, pero los efectos del LF y de la PRL no fueron aditivos. Esto indica que la activación de la vía JAK2/STAT3 en las BUVEC no participa en el efecto estimulador del LF sobre la expresión de los receptores a PRL y tampoco en el efecto angiogénico de PRL. Mas aún, el AG490 a dosis similares a las empleadas en este estudio bloquea específicamente la vía JAK2-STAT en células endoteliales de aorta bovina (Neria et al., 2007) y en células endoteliales de la vena umbilical humana (Matsumiya et al., 2002). Sin embargo, el AG490 no modificó el efecto angiogénico del LF lo que confirma que la vía de JAK2 no está implicada en su acción proangiogénica. Si bien JAK2/STAT es la principal vía de señalización de la PRL, también se han

reportado mecanismos alternos independientes de la activación de JAK2 (Kochendoefer et al., 2003).

Las funciones de la PRL en el ovario son numerosas. Altas concentraciones de PRL en el LF se han asociado con embarazos exitosos (Laufer et al., 1984; Suzuki et al 1998), mientras que la falta del receptor a PRL produce una involución temprana del cuerpo lúteo e infertilidad (Stocco et al., 2007). Mas recientemente se mostró que la sobre expresión de la forma corta del receptor a PRL, en ausencia del receptor largo de la hormona, puede causar alteraciones severas en los folículos ováricos que resultan en una falla ovárica prematura, una condición común de infertilidad y envejecimiento prematuro ovárico en el 1% de las mujeres (Halperin, 2008).

El hecho de que la angiogénesis es un requisito previo para una adecuada maduración de los folículos ováricos y la formación del cuerpo lúteo (Abulafia et al., 2000; Tamanini et al., 2004) aunado a los resultados de esta tesis, que muestran que la PRL presente en el LF tiene acciones proangiogénicas, y apoyan la participación de PRL en la fisiología ovárica, y señalan a la angiogénesis como un blanco importante de las acciones de esta hormona que merecen ser estudiadas a mas profundidad.

VIII CONCLUSIONES.

Los resultados de esta tesis proponen las siguientes conclusiones:

1. La PRL presente en el LF estimula la proliferación de células endoteliales en cultivo.
2. El LF tiene la capacidad de estimular la expresión de las isoformas de los receptores largo y corto en células endoteliales.

3. Los receptores a PRL en las BUVEC presentan mecanismos de señalización independientes a los asociados con la vía JAK2/STAT3.
4. La angiogénesis que ocurre dentro del ovario por acción de la hormona PRL debe seguir siendo estudiada.

X. BIBLIOGRAFIA

Abulafia O y Sherer DM. Angiogenesis of the ovary. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182:240-246. 2000.

Adams RH, y Aliato K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:464-478. 2007.

Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, Lopez-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martínez de la Escalera G y Clapp C. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:2947-2953. 2005.

Aurebach W y Aurebach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharm. Ther.* 63:265-311. 1994.

Bachelot A y Binart N. Reproductive role of prolactin. *Reproduction* 133:361-369. 2007.

Bachelot A, Monget P, Imbert-Bollere P, Coshigano K, Kopchick JJ, Kelly PA y Binart N. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. *Endocrinology* 143:4104-4112. 2002.

Bagavandoss P, Sage EH y Vernon RB. Secreted protein, acid and rich in cystein (SPARC) and Thrombospondin in the Developing Follicle and Corpus Luteum of the rat. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 46(9):1043-1049. 1998.

Bailey CM, Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA y Hendrix MJ. Biological functions of maspin. *J Cell Physiol* 209:617-624. 2006.

Basset, D.L. The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am. J. Anat.* 73:251-291. 1943.

Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D y Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocrine review.* 17:639-670. 1996.

Bohnet HG y Baukloh V. Prolactin concentrations in follicular fluid following ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Hormone Research.* 22:189-195. 1985.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N y Kelly PA. Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. *Endocrine Review.* 19:225-268. 1998.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.* 72:248-254. 1976.

Braw-Tal R y Yossefi S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 109(1):165-71. 1997.

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, y Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 192:1015-1026. 2000.

Buscher U, Chen FC, Kentenich H y Schmiady H. Cytokines in the follicular fluid of stimulated and non-stimulated human ovaries; is ovulation a suppressed inflammatory reaction?. *Hum Reprod.*14:162-166. 1999.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9:653-660. 2003.

Chua CC, Hamdy RC y Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1401:187-194. 1998.

Clapp C y Weiner RI. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130:1380-1386. 1992.

Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC y Martinez de la Escalera G. Vasoinhibins: Endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol. Metab.* 17:301-307. 2006a.

Clapp C, González C, Macotella Y, Aranda J, Rivera JC, García C, Guzmán-Morales J, Zamorano M, Vega C, Martín C, Jeziorski MC y Martínez de la Escalera G. Vasoinhibins: A family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front. Horm. Res.* 35:64-73. 2006b.

Clapp C, López-Gómez FJ, Nava G, Corbacho A, Torner L, Macotella Y, Dueñas Z, Ochoa A, Noris G, Acosta E, Garay E y Martínez de la Escalera G. 1998. Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *Journal of Endocrinology.* 158:137-144. 1993.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F y Weiner R. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology.* 133(3):1292-1299. 1993.

Clapp C, Thebault S y Martínez de la Escalera G. Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*.13:55-67. 2008.

Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, Alcántara E, López-Gómez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejía S, Morales M y Martínez de la Escalera G. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-Kda fragment with activity like 16-Kda prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:10384-10388. 1994.

Clarke D, Arey B y Linzer HD. Prolactin receptor messenger ribonucleic expression in the ovary during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 133(6):2594-2603. 1993.

Clarke D, Young K y Linzer D. Mouse ovarian prolactin receptors. Ovarian cells interactions. Edited by Springer-Verlag. 9°. Ovarian workshop on ovarian cell interactions:genes of physiology. pp. 110-123. 1992.

Corbacho AM, Martínez De La Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol*. 173(2):219-38. 2002.

Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Eiserich JP, Cross CE, Martínez de la Escalera G y Clapp C. Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett*. 544:171-175. 2003.

Cosman D, Lyman SD, Idzerda RL, Beckmann MP, Park LS, Goodwin RG y March CJ. A new cytokine receptor superfamily. *Trends in Biochemistry*. 15:265-270. 1990.

Cruz J, Avina-Zubieta A, Martínez de la Escalera G, Clapp C y Lavallo C. Molecular heterogeneity of prolactin in the plasma of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44:1331-1335. 2001.

Cruz-Soto ME, Scheiber MD, Gregerson KA, Boivin GP y Horseman ND. Pituitary tumorigenesis in prolactin gene-disrupted mice. *Endocrinology* 143: 4429-4436. 2002.

Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W y Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: A potent inhibitor of angiogenesis. *Science.* 285:245-248. 1999.

Deramandt BM, Braunstein S, Remy P, and Abraham NG. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 68: 121-127. 1998.

Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology.* Apr 1;55(6):1211-39. Review. 2001

Dueñas Z, Torner L, Corbacho A, Ochoa A, Gutiérrez-Ospina G, Lopez-Barrera F, Barrios, Berger P, Martínez de la Escalera G y Clapp C. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kda prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative ophthalmology and visual science.* 40(11):2498-2505. 1999.

Dunaif AE, Zimmerman EA, Friesen HG y Frantz AG. Intracellular localization of prolactin receptor and prolactin in the rat ovary by immunocytochemistry. *Endocrinology.* 110:1465-1471. 1982.

Einspanier R, Pitzel L, Wuttke W, Hagendarff G, Preub KD, Kardalinoun E y Scheit H. Demonstration of mRNAs for oxytocin and prolactin in porcine granulosa and luteal cells. FEBS. 204(1):37-40. 1986.

Endo T, Aten RF, Wang F y Behrman HR. Coordinate induction and activation of metalloproteinase and ascorbate depletion in structural luteolysis. Endocrinology 133:690-698. 1993.

Erdmann S, Ricken A, Merkwitz C, Struman I, Castino R, Hummitzsch K, Gaunitz F, Isidoro C, Martial J y Spanel-Borowski K. The expression of prolactin and its cathepsin D-mediated cleavage in the bovine corpus luteum vary with the estrous cycle. Am J Physiol Endocrinol Metab 293: E1365-1377. 2007.

Fan X, Krieg S, Kuo CJ, Wiegand SJ, Rabinovitch M, Druzin ML, Brenner RM, Giudice LC y Nayak NR. VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium. Faseb J 22:3571-3580. 2008.

Ferrara N, Clapp C y Weiner R. The 16 K fragment of prolactin specifically inhibits assay of fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. Endocrinology. 129:896-900. 1991.

Folkman J. y Shing Y. Angiogenesis. The Journal of Biological Chemistry. 267:10931-10934. 1992.

Fraser HM y Duncan WC. Vascular morphogenesis in the primate ovary. Angiogenesis. 8:101-116. 2005.

Fraser HM y Lunn SF. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. Br. Med. Bull. 56:787-797. 2000.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A y Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. Physiological Reviews. 80:1523-1631. 2000.

Gaytan F, Bellido C, Morales C y Sanchez-Criado JE. Luteolytic effect of prolactin is dependent on the degree of differentiation of luteal cells in the rat. Biol Reprod 65:433-441. 2001.

Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E y Sanchez-Criado JE. Role of prolactin in the regulation of macrophages and in the proliferative activity of vascular cells in newly formed and regressing rat corpora lutea. Biol Reprod 57:478-486. 1997.

Ge G, Fernandez CA, Moses MA y Greenspan DS. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(24):10010-10015. 2007.

Girling JE y Rogers PA. Recent advances in endometrial angiogenesis research. Angiogenesis 8:89-99. 2005.

Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA y Martial JA. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. Endocr Rev 17:385-410. 1996.

Goldhar AS, Vonderhaar BK, Trott JF y Hovey RC. Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. Mol Cell Endocrinol 232:9-19. 2005.

Green LM, Reade JL y Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *Journal of Immunological Methods*. 70:257-268. 1984.

Grosdemouge I, Bachelot A, Lucas A, Baran N, Kelly PA y Binart N. Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. *Reprod. Biol. Endocrinol.* (6)1:12. 2003.

Gruemmer R, Klein-Hitpass L, Neulen J. Regulation of gene expression in endothelial cells: The role of human follicular fluid. *J Mol Endocrinol.* 34:37-46. 2005.

Halperin J, Devi SY, Elizur S, Stocco C, Shehu A, Rebourcet D, Unterman TG, Leslie ND, Le J, Binart N y Gibori G. Prolactin signaling through the short form of its receptor represses forkhead transcription factor foxo3 and its target gene galt causing a severe ovarian defect. *Mol Endocrinol.* 22(2):513-522. 2008.

Henderson KM, McNeilly AS y Swanston IA.. Gonadotrophin and steroid concentrations in bovine follicular fluid and their relationship to follicle size. *J. Reprod. Fertil.* 65:467-473. 1982

Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, Schneider MD, Balligand JL, Desjardins F, Ansari A, Struman I, Nguyen NQ, Zschemisch NH, Klein G, Heusch G, Schulz R, Hilfiker A, y Drexler H. A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128:589-600. 2007.

Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 124:43-101. Review. 1991.

Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, and Dorshkind K. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *Embo J* 16:6926-6935. 1997.

Imaoka T, Matsuda M y Mori T. 1998. Expression of prolactin messenger ribonucleic acid in the mouse gonads during sexual maturation. *Life Science.* 63(25):2251-2258.

Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685-693. 2003.

Kamat BR, Brown L, Manseau EJ, Senger DR y Dourak MF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. *A. J. P.* 146:157-166. 1995.

Ko JY, Ahn YL, and Cho BN. Angiogenesis and white blood cell proliferation induced in mice by injection of a prolactin-expressing plasmid into muscle. *Mol Cells* 15:262-270. 2003.

Kobayashi S, Berisha B, Amselgruber WM, Schams D, and Miyamoto A. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. *J Endocrinol* 170:369-380. 2001.

Kochendoerfer SK, Krishnan N, Buckley DJ y Buckley AR. Prolactin regulation of bcl-2 family members: Increased expression of bcl-xl but not mcl-1 or bad in nb2-t cells. *J. Endocrinol.* 178:265-273. 2003.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:80-685. 1970.

Lamallice L, Le Boeuf F y Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100:782-794. 2007

Laufer N, Botero-Ruiz W, DeCherney AH, Haseltine F, Polan ML y Behrman HR. Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58:430-434. 1984.

Linder Ch, Lichtenberg V, Westhof G, Braendle W y Bettenford G. Endocrin parameters of human follicular fluid and fertilization capacity of oocytes. *Horm. Metabol. Res.* 20:243-246. 1988.

Lorenson MY y Walker AM. Structure-Function Relationship in Prolactin. Chapter 10. Prolactin. En: Kluwer Academic Publisher (eds). (pp. 189-217). USA: Nelson D. Horseman. 2001.

Macotella Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martinez de la Escalera G, and Clapp C. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 119:1790-1800. 2006.

Malaguarnera L, Imbesi R, Di Rosa M, Scuto A, Castrogiovanni P, Messina A, and Sanfilippo S. Action of prolactin, IFN-gamma, TNF-alpha and LPS on heme oxygenase-1 expression and VEGF release in human monocytes/macrophages. *Int Immunopharmacol* 5:1458-1469. 2005.

Malaguarnera L, Imbesi RM, Scuto A, D'Amico F, Licata F, Messina A, and Sanfilippo S. Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages. *J Cell Biochem* 93:197-206. 2004.

Malaguarnera L, Pilastro MR, Quan S, Ghattas MH, Yang L, Mezentsev AV, Kushida T, Abraham NG, and Kappas A. Significance of heme oxygenase in prolactin-mediated cell proliferation and angiogenesis in human endothelial cells. *Int J Mol Med* 10:433-440. 2002.

Matsumiya T, Imaizumi T, Itaya H, Shibata T, Yoshida H, Sakaki H, Kimura H, Satoh K. Production of growth related oncogene protein-alpha in human umbilical vein endothelial cells stimulated with soluble interleukin-6 receptor-alpha: role of signal transducer, janus kinase 2 and mitogen-activated kinase kinase. *Life Science*. 70:3179-3190. 2002.

Merkle CJ, Schuler LA, Schaeffer RC Jr, Gribbon JM y Montgomery DW. Structural and functional effects of high prolactin levels on injured endothelial cells: Evidence for an endothelial prolactin receptor. *Endocrine*. 13:37-46. 2000.

Moss ML, Jin SL, Becherer JD, Bickett DM, Burkhart W, Chen WJ, Hassler D, Leesnitzer MT, McGeehan G, Milla M, Moyer M, Rocque W, Seaton T, Schoenen F,

Warner J y Willard D. Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol.* 72:127-129. 1997.

Neria F, Caramelo C, Peinado H, Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, de Solis AJ, Fernandez-Sanchez R, Penate S, Cano A y Castilla MA. Mechanisms of endothelial cell protection by blockade of the jak2 pathway. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292:C1123-1131. 2007.

Niswender GD y Nett T. The corpus luteum and its control. Knobil and J. Neill, et al. *The physiology of reproduction.* Raven Press. Ltd. N.Y. 489-525. 1988.

Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera JC, Dueñas Z, Nava G, de La Escalera GM, and Clapp C. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1639-1645. 2001.

Ogueta S, Munoz J, Obregon E, Delgado-Baeza E y Garcia-Ruiz JP. Prolactin is a component of the human synovial liquid and modulates the growth and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 190:51-63. 2002.

Ohwaki M, Suganuma N, Seo H, Nawa A, Kikkawa F, Narita O, Matsui, N, y Tomoda Y. Source of prolactin in human follicular fluid. *Endocrinol. Jpn.* 39:601-607. 1992.

Olazabal I, Muñoz J, Ogueta S, Obregón E, García-Ruiz JP. Prolactin (PRL)-PRL receptor system increases cell proliferation involving JNK (c-Jun amino terminal kinase) and AP-1 activation: inhibition by glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 14(4):564-75. 2000.

Olsen E. Culturing of human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. *Cell. J. E. Biology: a laboratory handbook*. Academic Press Inc. 1:142-147. 1994.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, y Folkman L. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell*. 79:315-328. 1994.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR y Folkman L. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 88:277-285. 1997.

Phelps JY, Bugg EM, Shambloott MJ, Vlahos NP, Whelan J y Zacur HA. Prolactin gene expression in human ovarian follicular cells. *Fertil. Steril*. 79:182-185. 2003.

Plendl J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat. Histol. Embryol*. 29:257-266. 2000.

Przala J, Grazul A, Wiesak T, Meszynska A y Dusza L. Steroid hormones and prolactin in porcine follicular fluid in estrous cycle and early pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol*. 56 (3):90-296. 1986.

Redmer A y Reynolds L. Angiogenesis in the ovary. *Reviews of reproduction*. 1:182-192. 1996.

Ricken AM, Traenkner A, Merkwitz C, Hummitzsch K, Grosche J y Spanel-Borowski K. The short prolactin receptor predominates in endothelial cells of micro- and macrovascular origin. *J. Vasc. Res*. 44:19-30. 2007.

Risk M y Gibori G. Mechanisms of luteal cell regulation by prolactin. In Prolactin, pp 265-295. Ed. ND Horseman. Bosto; Kluwer Academic Publishers. 2001.

Schwärzler P, Untergasser G, Hermann M, Dirnhofer S, Abendstein B y Berger P. Prolactin gene expression and prolactin protein in premenopausal and postmenopausal human ovaries. *Fertility and Sterility*. 68 (4):696-701. 1997.

Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H y Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 91 2235-2243. 1993.

Sinha Y.N. Structural variants of prolactin: Ocurrence and physiological significance. *Endocrine reviews*. 16 (3):354-369. 1995.

Sirotkin AV, Nitray J, Politov VP y Marinchenko P. Prolactin-like substance secretion by granulosa cells isolated from bovine ovaries. *Annales d'Endocrinologie*. 53:196-200. 1992.

Srivastava RK, Gu Y, Ayloo S, Zilberstein M y Gibori G. Developmental expression and regulation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in rat decidua and in a decidual cell line. *J Mol Endocrinol* 21:355-362. 1998.

Stirling D, Magness RR, Stone R, Waterman MR y Simpson ER. Angiotensin II inhibits luteinizing hormone-stimulated cholesterol side chain cleavage expression and stimulates basic fibroblast growth factor expression in bovine luteal cells in primary culture. *J Biol Chem* 265: 5-8. 1990.

Stocco C, Telleria C y Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev.* 28:117-149. 2007.

Stock AE y Fournelle J. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology.* 132(3):1108-1114. 1993.

Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, and Martial JA. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1246-1251. 1999.

Suzuki, T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A y Nagura H. Cyclic changes of vascular phenotypes in normal human ovaries. *Human reproduction.* 13(4):953-959. 1998.

Tamanini C y De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod. Domest. Anim.* 39:206-216. 2004.

Taymor MD. The regulation of follicle growth: some clinical implications in reproductive endocrinology. *Fertility and Sterility.* 62 (2):235-247. 1996.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J., et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 356:768-774. 1997.

Too CK, Knee R, Pinette AL, Li AW y Murphy PR. Prolactin induces expression of FGF-

2 and a novel FGF-responsive NonO/p54nrb-related mRNA in rat lymphoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 137: 187-195. 1998.

Towbin H, Staehelin T y Gordon J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4350-4354. 1979.

Tseng L y Zhu HH. Progestin, estrogen, and insulin-like growth factor- α stimulate the prolactin receptor mRNA in human endometrial stromal cells. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 5:149-155. 1998.

Ueda E, Ozerdem U, Chen YH, Yao M, Huang KT, Sun H, Martins-Green M, Bartolini P y Walker AM. A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone. *Endocr Relat Cancer* 13:95-111. 2006.

Von Otte S, Paletta JRJ, Becker S, König S, Fobker M, Greb RR, Kiesel L, Assmann G y Diedrich K. Follicular Fluid High Density Lipoprotein-associated Sphingosine 1-Phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry.* 281(9):5398-5405. 2006.

Wise T y Maurer RR. Follicular development, oocyte viability and recovery in relation to follicular steroids, prolactin and glycosaminoglycan throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge and progestin inhibition of LH surge. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11(1):35-38. 1994.

Wise T, Suss U, Stranziger G, Wuthrich K. y Maurer RR. Cumulus and oocyte maturation an in vitro and in vivo fertilization of oocytes in relation to follicular steroids,

prolactin and glycosaminoglycanos throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH, and progesterin inhibition of LH surge. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11(1):59-86. 1994.

Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, and Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology* 142: 3244-3254. 2001.

Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS y Fraser HM. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology* 143:2797-2807. 2002.

Yoshimura Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol* 18:247-291. 1997.

Yu-Lee L. Molecular actions of prolactin in the immune system. *P.S.E.B.M.* 215:35-52. 1997.

Zermeno C, Guzman-Morales J, Macotela Y, Nava G, Lopez-Barrera F, Kouri JB, Lavalle C, de la Escalera GM y Clapp C. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol* 189:R1-8. 2006.