



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM-JURIQUILLA

EFFECTO INHIBITORIO DE LA PRL 16K SOBRE LA
ANGIOGÉNESIS OCULAR:
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A
M. en C. JORGE ARANDA LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ-LABORA

Juriquilla

2007





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.

Esta tesis doctoral se pudo llevar a cabo gracias al apoyo invaluable de las siguientes personas:

La dirección académica del comité tutorial integrado por los Doctores Carmen Clapp, Rogelio Arellano Ostoa y Alejandro Zentella Dehesa.

El apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera y del M en C. Gabriel Nava Pinto.

La asistencia de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán.

El apoyo del MVZ Martín García Servín, responsable del Bioterio del Instituto de Neurobiología

La ayuda de los miembros de la biblioteca del Instituto de Neurobiología: Bib. Pilar Galarza Barrios, Ignacio Caballero Navarro y Rafael Silva Cruz. De igual manera, agradezco el apoyo de la Unidad de Proteogenómica dirigida por la Dra. Anaid Antaramián Salas y el Dr. Manuel Aguilar Ramírez

La asistencia de de la Q. Leonor Casanova Rico responsable de la sede del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, con la colaboración de María del Carmen Velázquez Rodríguez, Yolanda Orduña Cruz y Magdalena Reyes Olán.

Agradezco el apoyo brindado por el CONACyT (Becario 159586) y por la DGEP-UNAM. Asimismo, quiero agradecer al Instituto Mexicano de Oftalmología, en particular al Dr. Víctor Manuel Corona Uribe, ya que gracias a su apoyo desinteresado se pudo culminar este trabajo.

Índice de tablas y figuras	2
Glosario	3
i. Abstract	5
ii. INTRODUCCION	8
1) Angiogénesis	9
a) Factor de crecimiento del endotelio vascular	10
b) Factor de crecimiento de fibroblastos	14
c) Proteasas	15
d) Moléculas de Adhesión	16
2) Factores antiangiogénicos	17
a) La angiostatina	17
b) La endostatina	18
c) Factor derivado del epitelio pigmentado	19
d) Vasoinhibinas	20
3) Retinopatías vasoproliferativas	24
a) Retinopatía diabética (RD)	25
iii. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
iv. HIPÓTESIS	32
v. OBJETIVOS	32
Objetivo General	32
Objetivos Particulares	32
vi. MATERIALES Y METODOS	33
Reactivos	33
Animales	33
RT-PCR	33
Hibridación in situ	34
Análisis de la proteólisis de la PRL	35
Western blot	35
Inmunoneutralización de PRLs en la retina	35
Inyección de ARN de interferencia (ARNi)	36
Inyección intravítrea de VEGF y Vi	36
Cuantificación de la neovascularización de la retina	37
Evaluación de la dilatación vascular	37
Ensayo de citrulina	38
Ensayo de Azul de Evans para cuantificar la permeabilidad vascular	38
Análisis estadístico	39
vii. RESULTADOS	40
Expresión del ARN mensajero de PRL en la retina	40
Detección de las proteínas PRL y Vi en la retina	41
El humor vítreo genera Vi a partir de PRL	43
Efecto de la inmunoneutralización de las PRLs endógenas sobre la angiogénesis retiniana	44
Efecto de la regulación negativa del ARN mensajero de PRL sobre la angiogénesis y la vasodilatación de la retina	46
Las vasoinhibinas bloquean el efecto del VEGF sobre la vasopermeabilidad y la vasodilatación retiniana	48

Las vasoinhibinas reducen la activación inducida por VEGF de las sintasas de óxido nítrico	51
viii. Discusión.....	52
BIBLIOGRAFIA.....	58

Índice de tablas y figuras.

Tabla 1. Vi endógenas y exógenas.....	23
Figura 1. Ramificación progresiva de la red vascular en el embrión de pollo.....	9
Figura 2. Efectos de los receptores de VEGF.....	12
Figura 3. La retina expresa el ARNm de la PRL.....	40
Figura 4. Detección de PRL y Vi en la retina por Western Blot.....	42
Figura 5. La PRL es procesada a Vi en el humor vítreo.....	44
Figura 6. Efecto de la inmunoneutralización de Vi sobre la angiogénesis retiniana.....	45
Figura 7. Efecto de la regulación negativa del ARNm de PRL sobre la angiogénesis y vasodilatación retiniana.....	46
Figura 8. Vasodilatación retiniana inducida por la inyección intravitreal de ARNi de PRL.....	47
Figura 9. Vi exógenas bloquean los efectos del VEGF sobre la vasodilatación.....	49
Figura 10. Cuantificación de la permeabilidad vascular por el método de azul de Evans.....	50
Figura 11. Análisis de la actividad de NOS por el método de citrulina tritiada.....	51

Glosario

ADN.....	Acido desoxirribonucleico
ADNc.....	Acido desoxirribonucleico complementario
AKT.....	Proteína cinasa B
ARN.....	Ácido ribonucleico
ARNi.....	Acido ribonucleico de interferencia
ARNm.....	Acido ribonucleico mensajero
CREB.....	Proteína de unión al elemento de respuesta del AMP cíclico
eNOS.....	Sintasa endotelial de óxido nítrico
FGF.....	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR.....	Receptor para el factor de crecimiento de fibroblastos
FKHR.....	Forkhead
GFP.....	Proteína verde fluorescente
GH.....	Hormona de crecimiento
HIF-1.....	Factor inducible por hipoxia-1
IGF-1.....	Factor de crecimiento semejante a la insulina-1
IKK.....	Complejo de la cinasa I-kappa B
LP.....	Lactógeno placentario
MAPK.....	Cinasas de proteína activadas por mitógenos
MMP.....	Metaloproteasa de matriz
MPM.....	Marcadores de peso molecular
NO.....	Óxido nítrico
NOS.....	Sintasas de óxido nítrico
PAI-1.....	Inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1
PEDF.....	Factor derivado del epitelio pigmentario
PI3K.....	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKB.....	Proteína cinasa B

PKC.....	Proteína cinasa C
PRL.....	Prolactina
RD.....	Retinopatía diabética
TIMP.....	Inhibidor tisular de las metaloproteasas de matriz
TSP-1.....	Trombospondina-1
uPA.....	Activador de plasminógeno tipo urocinasa
uPAR.....	Receptor para el activador de plasminogéno
VEGF.....	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR-1.....	Receptor de VEGF tipo 1
VEGFR-2.....	Receptor de VEGF tipo 2
Vi.....	Vasoinhibinas

i. Abstract

Purpose: Disruption of the anti-angiogenic environment of the retina can lead to aberrant neovascularization, the major cause of blindness throughout the world. The hormone prolactin (PRL) is proteolytically processed to vaso-inhibins, a family of peptides with anti-angiogenic and vasoconstrictive actions. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) may mediate the properties of vaso-inhibins. This work was conducted to determine if vaso-inhibins are produced in the retina and contribute to the local inhibition of angiogenesis and vasodilation. In addition, exogenous vaso-inhibins were tested for inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced permeability and dilation of retinal blood vessels.

Methods: Expression of PRL mRNA in rat retinas was determined by RT-PCR and *in situ* hybridization. PRL and vaso-inhibins were evaluated in retinal homogenates by western blots. The proteases responsible for the intraocular generation of vaso-inhibins were explored by analyzing the proteolysis of PRL injected into the vitreous humor in the presence or absence of inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs). The role of endogenous vaso-inhibins was studied by evaluating the effect of the intravitreal injection of neutralizing antibodies, or small interfering RNAs, targeting PRL followed by the histological quantitation of blood vessel number, area and diameter. The effect of exogenous vaso-inhibins was investigated after their intravitreal injection with or without VEGF on the dilation and permeability of blood vessels by histology, or by the Evans Blue quantitative assay. Finally, the effect of vaso-inhibins on the VEGF-induced activation of retinal nitric oxide synthase was evaluated by the [³H] L-citrulline method.

Results: Rat retina expressed PRL mRNA in the outer nuclear layer, the outer plexiform layer, the inner nuclear layer and the ganglion cell layer. Both full-length PRL and a 16 kDa vaso-inhibin were detected in retinal homogenates using both polyclonal and monoclonal antibodies. The intravitreal injection of antibodies able to neutralize the actions of vaso-inhibins increased the number of retinal blood vessels and capillary area three-fold. Furthermore, siRNA-mediated inhibition of

PRL mRNA increased retinal neovascularization three-fold and resulted in a significant increase in vasodilation. MMPs inhibitors prevented the generation of vaso-inhibins from prolactin, suggesting that MMPs are the active PRL-cleaving enzymes. The intravitreal injection of VEGF results in significant increases in vasodilation, vasopermeability, and nitric oxide synthase activity, effects that are blocked by vaso-inhibins.

Conclusions: These results demonstrate that PRL is synthesized and cleaved to vaso-inhibins by retinal tissue, and plays a key role in preventing angiogenesis, vasodilation and vasopermeability in the healthy retina. Furthermore, vaso-inhibins may help control VEGF-mediated vasoproliferative retinopathies.

Resumen

Objetivo: La sobreproducción de vasos sanguíneos (angiogénesis) en la retina es la primera causa de ceguera en el mundo, y se presenta como consecuencia de la pérdida del ambiente predominantemente antiangiogénico característico de la retina normal. La familia de las prolactinas (PRL), hormonas originalmente asociadas con la secreción láctea, incluye a las denominadas vaso-inhibinas, que corresponden a fragmentos amino-terminales de la PRL con potente actividad antiangiogénica y vasoconstrictora mediada a través de la inhibición de la sintasa endotelial de óxido nítrico. En el presente trabajo se examinó la producción de las vaso-inhibinas en la retina, y su contribución al mantenimiento del ambiente antiangiogénico local. Además, se analizó el posible potencial terapéutico de las vaso-inhibinas exógenas a través de investigar su efecto sobre la vasodilatación y la vasopermeabilidad inducidas por la administración intravítrea del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Métodos: La expresión del ARN mensajero de PRL en la retina de la rata se determinó mediante RT-PCR e hibridación *in situ*. La PRL y las vaso-inhibinas se detectaron en extractos de retina por Western blot. El papel funcional de la PRL y de las vaso-inhibinas endógenas se analizó mediante la inyección intravítrea, ya sea de anticuerpos anti-PRL capaces de inactivar a las PRLs locales, o bien de ARN de interferencia (ARNi) diseñados para eliminar la expresión del ARN mensajero de PRL en la retina. Las vaso-inhibinas exógenas se inyectaron intravítreamente solas o en combinación con VEGF. Se evaluó el número y diámetro de los vasos sanguíneos en montajes planos de retina teñidos para la vasculatura. La permeabilidad vascular fue evaluada a través de cuantificar la extravasación de eritrocitos y el método cuantitativo del azul de Evans. La actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial fue analizada mediante el método de la citrulina tritiada.

Resultados: El ARN mensajero de PRL se expresa a través de la retina de la rata en la capa nuclear externa, capa plexiforme externa, la capa nuclear interna y la capa de las células ganglionares. Anticuerpos anti-PRL, policlonales y monoclonales, detectaron a la PRL y a las vaso-inhibinas en la retina. La inyección

intravitreal de anticuerpos capaces de neutralizar a las vasoinhibinas, estimularon significativamente el área capilar y el número de vasos sanguíneos retinianos. Además, la inhibición del ARN mensajero de PRL por la inyección de ARNi aumentó significativamente la neovascularización y la vasodilatación retinal. Las vasoinhibinas exógenas bloquearon el efecto vasodilatador y promotor de la vasopermeabilidad inducido por la administración de VEGF en la retina.

Conclusiones: Los resultados obtenidos sugieren que las vasoinhibinas son inhibidores locales de la angiogénesis, la vasodilatación y la vasopermeabilidad en la retina normal. Además, apoyan el potencial terapéutico de las vasoinhibinas al mostrar su capacidad de bloquear los efectos vasculares del VEGF, el principal promotor de las alteraciones vasculares características de las retinopatías vasoproliferativas, como la diabética.

ii. INTRODUCCION

El establecimiento de la red vascular es un proceso exquisitamente regulado que es dependiente de dos procesos que actúan sucesivamente (1). El primero de ellos es la vasculogénesis que consiste en la formación *de novo* de los vasos sanguíneos a partir de células precursoras llamadas hemangioblastos (1). La red vascular primitiva establecida por la vasculogénesis es expandida gracias al segundo proceso o angiogénesis que se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de aquellos previamente existentes (2).

Si bien la angiogénesis es esencial para el crecimiento y diferenciación de los tejidos durante el desarrollo, en el organismo adulto este proceso se limita a eventos asociados a la reproducción y la reparación tisular. Esto se debe al equilibrio a favor de los factores inhibitorios por sobre los estimulatorios de la angiogénesis, que en la vida adulta mantiene en reposo al endotelio vascular (3). La alteración de este balance contribuye de manera decisiva a la proliferación de vasos sanguíneos en diversas patologías como el cáncer, la artritis reumatoide y las retinopatías vasoproliferativas (3). Dentro de este último grupo, destaca la retinopatía diabética (RD) que es la principal causa de ceguera a nivel mundial (4, 5). Este padecimiento se caracteriza por alteraciones vasculares inducidas por la

hiperglucemia crónica y que incluyen la vasodilatación de los capilares retinianos, el engrosamiento de su membrana basal, la pérdida de células murales (pericitos), la presencia de microaneurismas y el crecimiento aberrante de neovasos retinianos hacia el humor vítreo. Estos vasos pueden ejercer tracción sobre la retina conduciendo a su desprendimiento y a la ceguera.

El propósito de este trabajo fue investigar el posible papel de las vasoinhibinas (Vi) – una familia de inhibidores de la angiogénesis derivados de la hormona prolactina (PRL)- en la regulación fisiológica de la angiogénesis retiniana, con miras a su posible aplicación terapéutica.

1) Angiogénesis.

El plexo vascular primario que es establecido en las etapas más tempranas del desarrollo es expandido y remodelado por la angiogénesis hacia un sistema vascular maduro altamente estereotipado y jerarquizado en el cual los vasos mayores se ramifican progresivamente hasta formar los vasos sanguíneos más finos o capilares (Figura 1) (6).

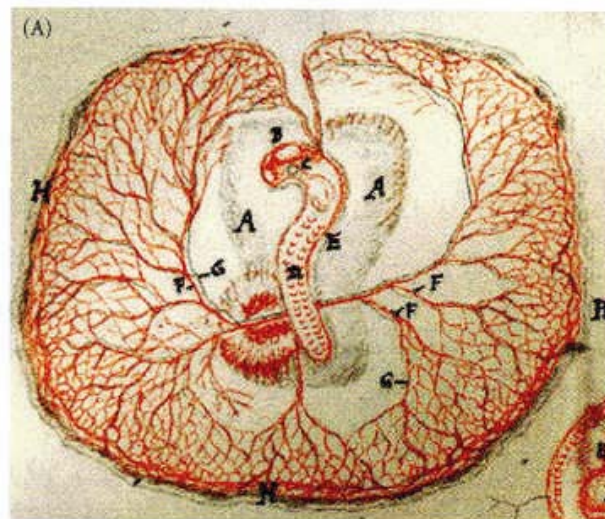


Figura 1. Dibujo por M. Malpighi (1661) mostrando la red vascular y su ramificación progresiva en un embrión de pollo [1].

Durante el desarrollo post-natal la angiogénesis determina el crecimiento de los órganos, pero al llegar a la madurez su frecuencia disminuye. Se ha reportado que en la aorta de la rata neo-natal la proporción de células endoteliales en proliferación es del 13% mientras que en el adulto es apenas del 0.1% (7). Estos datos sugieren que en la madurez el endotelio se encuentra en reposo y la red vascular se renueva lentamente. Sin embargo, procesos fisiológicos como el remodelado muscular después del ejercicio, el crecimiento de la glándula mamaria y de la placenta durante el embarazo, y la cicatrización a consecuencia de lesiones o fracturas son mediados por una proliferación acelerada del endotelio. Se ha propuesto que el estado de reposo del endotelio es consecuencia del predominio de la acción de factores inhibidores sobre los estimuladores de la angiogénesis (3).

La angiogénesis es un proceso complejo caracterizado por una secuencia de eventos que están coordinados tanto espacial como temporalmente (3). Así, inicialmente tiene lugar la dilatación de los vasos existentes acompañada por un incremento en la permeabilidad vascular mediada por la apertura de las uniones endoteliales. Subsecuentemente, la producción local de proteasas trae consigo la degradación de la matriz extracelular del capilar, permitiendo que las células endoteliales activadas proliferen y migren formando vasos inmaduros. Estos vasos sintetizan y deponen una nueva membrana basal, completando su maduración al reclutar células murales llamadas pericitos. Como es de esperarse los eventos asociados a la angiogénesis son dependientes de diversos factores de crecimiento, proteasas y moléculas de adhesión. A continuación se describen algunos de los factores angiogénicos más importantes.

a) Factor de crecimiento del endotelio vascular.

En 1996, se reportó que en el ratón, la inactivación de solo un alelo del factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF, producía diversas anomalías en el desarrollo y defectos severos en la vascularización, resultando en la muerte de las crías entre el día 11 o 12 del desarrollo embrionario (8). Más aún, en animales recién nacidos en los que se inactivó parcialmente el gen de VEGF se

observaron defectos severos en la vascularización del riñón y una reducción considerable tanto en la talla corporal como en la esperanza de vida (9). Estos y otros experimentos mostraron que el VEGF es esencial para la angiogénesis y la vasculogénesis. La expresión del ARNm de VEGF es inducida por una baja tensión de O₂ (hipoxia) tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (4, 10). El mediador clave de las respuestas ante la hipoxia es el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1), que a su vez es regulado por el producto del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau (VHL). En condiciones de normoxia VHL marca mediante poli-ubiquitinación a HIF-1 para ser degradado en el proteosoma. Sin embargo, cuando se presentan condiciones de hipoxia, VHL es inactivado permitiendo la acción de HIF-1, y en consecuencia la expresión del VEGF (11). La supresión patológica de VHL conduce a la formación de hemangioblastomas en la retina y el cerebelo, característicos de la enfermedad de von Hippel-Lindau (12, 13).

Los efectos del VEGF son mediados a través de dos receptores membranales (figura 2) llamados VEGFR-1 (ó Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1) (14) . Los efectos mediados por VEGFR-1 son controversiales. Varios trabajos sugieren que este receptor actúa como un “señuelo” capaz de unirse al VEGF, pero que no inicia la transducción de señales necesaria para establecer la angiogénesis (15). Otros trabajos sugieren que la unión del VEGF a este receptor si resulta en acciones sobre la angiogénesis a través de inducir la activación de la metaloproteasa de matriz (MMP) 9 (16) y del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) (17), dos proteasas que están estrechamente asociadas a la migración celular (18). En cuanto al VEGFR-2, se ha demostrado que su dimerización seguida de su autofosforilación por la unión al VEGF induce la proliferación del endotelio, así como su migración y sobrevivencia (9, 14, 19). Más aún, la activación de este receptor se ha asociado a las etapas iniciales de la angiogénesis incluyendo el aumento del diámetro capilar (20, 21) y de la vasopermeabilidad (22).

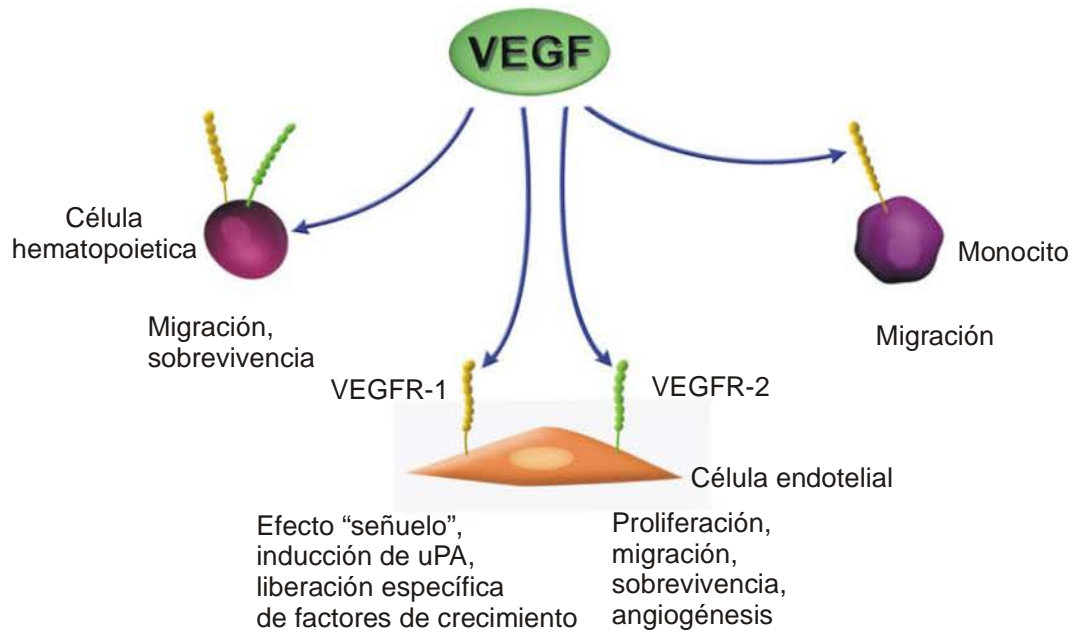


Figura 2. La unión del VEGF a su receptor tipo 1 (VEGFR-1) no tiene efectos directos sobre la angiogénesis por lo que se ha propuesto que actúa como un “señuelo” que secuestra al VEGF inhibiendo su actividad. Se propone que los efectos angiogénicos de esta molécula son mediados por VEGFR-2 cuya activación se ha asociado a la proliferación, migración y supervivencia del endotelio, así como a incrementos en la vasopermeabilidad y el diámetro capilar.

El efecto del VEGF sobre la permeabilidad es 50,000 veces más potente que el de la histamina (23). Este factor de crecimiento no solo promueve la formación de fenestraciones que permiten la salida de solutos pequeños del vaso sanguíneo, sino también la aparición de organelos vesiculo-vacuolares a través de los cuales se establece la difusión de proteínas (19, 22, 23). A largo plazo el VEGF puede debilitar las uniones adherentes entre las células endoteliales mediante acciones sobre moléculas de adhesión como las cadherinas y las ocludinas (19, 22, 23). Bajo estas condiciones, células como los eritrocitos y diversas macro-moléculas pueden extravasarse. El trabajo de Kevil y colaboradores ha mostrado que el VEGF induce cambios en la localización de moléculas de adhesión que regulan la permeabilidad en las células endoteliales (24). Una dosis 660 pM incrementó 3.4 veces el flujo de ^{14}C -albúmina en cultivos

de células endoteliales. Estos cambios se asociaron con la re-localización hacia el citoplasma de las cadherinas y las ocludinas conduciendo a la formación de poros y brechas entre las células endoteliales. Los inhibidores farmacológicos Gö6976 y wortmannina no tuvieron efecto alguno sobre los cambios inducidos sobre la permeabilidad vascular inducidos por el VEGF, descartando que estos dependan de las vías de proteína cinasa C (PKC) y fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) (24). Sin embargo inhibidores específicos de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) como AG126 y PD98059, bloquearon con una alta eficiencia los efectos del VEGF sobre la re-localización de las cadherinas. Los complejos de cadherina-cateninas pueden interactuar físicamente con los receptores de diversos factores de crecimiento, incluyendo VEGFR-2. Se ha demostrado que la expresión de VE-cadherina en cultivos confluentes de células endoteliales atenúa los efectos proliferativos del VEGF a través de reducir la fosforilación de VEGFR-2 (25, 26). Este efecto puede deberse a la acción de fosfatasas vecinas al complejo cadherina- VEGFR-2. Finalmente, en células endoteliales en las que no se expresa la β -catenina no existe la inhibición por contacto, por lo que siguen respondiendo a los efectos del VEGF (25).

Por otra parte, la delección de la sintetasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) bloquea los efectos del VEGF sobre vasopermeabilidad (27, 28), sugiriendo que este efecto es dependientes de la producción de óxido nítrico (NO) (27-30). De hecho, la unión del VEGF a su receptor VEGFR-2 induce la producción de NO de manera casi inmediata, y el NO producido por eNOS media los efectos de VEGF sobre la proliferación del endotelio. Inhibidores de amplio espectro de las sintetasas de óxido nítrico (NOS) bloquean los efectos mitogénicos del VEGF tanto *in vivo* como *in vitro* (27, 28, 31, 32). Además, el NO esta asociado de manera determinante a los efectos hemodinámicos del VEGF. La inserción de implantes conteniendo VEGF en animales inmunosuprimidos produce vasodilatación y mantiene el flujo sanguíneo en los neovasos. Estos efectos no se observaron en animales eNOS^{-/-} (33).

Además, la unión del VEGF a su receptor activa la vía de señalización de PI3K/Akt (19). Akt, también conocido como proteína cinasa B (PKB) controla

funciones celulares esenciales que incluyen a la proliferación, la apoptosis, el metabolismo y la transcripción génica. Ensayos de incorporación de timidina tritiada en células endoteliales mostraron que la expresión normal de Akt aumenta tres veces la proliferación celular, comparado con células en las que se suprimió la expresión de Akt (Akt^{-/-}); además, en estas mismas células Akt^{-/-} se observó una reducción significativa de la migración celular en respuesta a moléculas angiogénicas. Finalmente, la señalización de Akt inducida por VEGF en el endotelio inactiva diversos factores pro-apoptóticos como BAD, la pro-caspasa 9 y forkhead (FKHR) (34); y Akt también puede estimular la expresión de genes inhibidores de la apoptosis como son la proteína de unión al elemento de respuesta del AMP cíclico (CREB) y el complejo de la cinasa I-kappa B (IKK) (35). Estos reportes demuestran que el VEGF puede actuar como un factor de sobrevivencia en el endotelio.

b) Factor de crecimiento de fibroblastos.

Los efectos pro-angiogénicos del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) son mediados a través de su unión a receptores específicos (FGFR), o bien, a moléculas proteínas membranales como las integrinas (36). El FGF induce la auto-fosforilación de su receptor, activando a las MAPK (37) y a PKC, promoviendo la proliferación del endotelio (38, 39) y la quimiotaxis del endotelio (40). Estos efectos también se han asociado a la activación de proteasas como el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA (41) y las MMPs (42). La adición de FGF a células endoteliales cultivadas en geles de colágena tipo I promueve la formación de estructuras tridimensionales semejantes a capilares. Este evento es dependiente de la activación de la proteína cinasa p38 (43).

El FGF puede alterar la expresión de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ (44) y de las cadherinas (45). Una exposición breve a FGF altera las uniones célula-célula en el endotelio y a largo plazo promueve la redistribución del antígeno membranal CD-31. Estos resultados han conducido a la propuesta de que el FGF puede participar en la migración del endotelio que es requerida para la angiogénesis (46).

c) Proteasas

La degradación de la matriz extracelular por diversas proteasas regula la disponibilidad de diversos factores de crecimiento y citocinas pro-angiogénicas (10). Por sus características estas proteasas se clasifican en MMPs, catepsinas y proteasas de serina. Las MMP son endopeptidasas dependientes de zinc que de acuerdo a su localización se subdividen en dos familias: MMP solubles y aquellas que están asociadas a la membrana celular (MT-MMP) (47). Las primeras son activadas en el ambiente extracelular, mientras que las MT-MMP son activadas intracelularmente por enzimas como la furina. Ambos tipos de MMP son regulados por los inhibidores tisulares de las MMP o TIMPs (47).

En la familia de las proteasas de serina, el uPA y la plasmina han sido involucrados en la proliferación e invasión endotelial (48, 49). Tanto el receptor de uPA (uPAR) como la MT1-MMP participan en la formación de complejos extracelulares en los lamelipodios y las adhesiones focales de las células en migración mediando una proteólisis controlada, de tal suerte que se mantiene un soporte suficiente para que las células puedan establecer la angiogénesis (50), ya que una degradación excesiva puede impedir interacciones indispensables entre la célula y la matriz extracelular deteniendo el proceso. Enfermedades devastadoras como el cáncer y la artritis se caracterizan por la degradación de la matriz extracelular tanto en las etapas tempranas de la enfermedad como en fases de crecimiento invasivo (3, 51).

Las proteasas de cisteína o catepsinas son producidas como zimógenos inactivos que dependen del procesamiento proteolítico del extremo amino-terminal de la molécula para su activación (52). Sus efectos son regulados por las cistatinas las cuales pueden actuar intracelularmente (estefinas) o extracelularmente (cininogénos y cistatinas). Aunque estas proteasas son conocidas como mediadores de la inactivación proteica en lisosomas, datos recientes indican que participan activamente en otras funciones específicas como la remodelación del hueso y de la matriz extracelular, en el procesamiento de antígenos por células T, en la apoptosis y en el crecimiento tumoral. La actividad de las catepsinas es dependiente de la acidez del pH ambiental, característico de

las vesículas endosomales y los lisosomas. Sin embargo las catepsinas B, K y L son exportadas al exterior o a la membrana celular, y contribuyen a la angiogénesis y al reclutamiento de células progenitoras endoteliales (52). Se ha reportado que la catepsina K está asociada con bombas de protones presentes en la membrana celular las cuales pueden facilitar la acidificación pericelular del ambiente extracelular permitiendo la actividad de estas proteasas (52).

d) Moléculas de Adhesión

La angiogénesis depende de la interacción entre las células vasculares. Durante este proceso el endotelio expresa numerosas moléculas de adhesión como el factor de Von Willebrand (también conocido como factor VIII) y la fibronectina. En células endoteliales humanas en cultivo el VEGF promueve la activación de integrinas. Estas moléculas son receptores membranales que actúan como sitios de unión específicos para las moléculas de adhesión, conectado la matriz extracelular con el citoesqueleto. Las integrinas están formadas por una cadena de glicoproteína α y una cadena β . Al proliferar, las células endoteliales expresan diversas integrinas, en especial a $\alpha_v\beta_3$. Los niveles de expresión de esta integrina se cuadruplican durante la angiogénesis de la membrana corioalantoidea del pollo (53). Estas observaciones han establecido a la integrina $\alpha_v\beta_3$ como un importante marcador angiogénico (54, 55). En apoyo a esta observación, se ha demostrado que la inhibición de $\alpha_v\beta_3$ con anticuerpos específicos, reduce significativamente la angiogénesis inducida por FGF en la membrana corioalantoidea del pollo (56, 57).

La adición de VEGF o FGF a células endoteliales cultivadas en geles tridimensionales de colágena I induce la formación de estructuras tubulares semejantes a capilares. El uso de péptidos cíclicos dirigidos específicamente contra las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ inhibe la formación de las estructuras tubulares en el ensayo descrito (58). Finalmente, en algunos modelos la inhibición de las integrinas bloquea la activación de la vía de PI3K/Akt resultando en la apoptosis del endotelio (59), y estudios recientes han analizado el uso de la tecnología de interferencia de ARN (ARNi) para reducir la expresión de las integrinas en enfermedades como el cáncer (58, 60, 61).

2) Factores antiangiogénicos

La contraparte fisiológica de los factores pro-angiogénicos, son aquellas moléculas con efectos inhibitorios sobre la proliferación de la vasculatura (3, 10, 62). A finales de los años 70, el grupo del Dr. Judah Folkman reportó la existencia de inhibidores endógenos de la angiogénesis (3, 62, 63). Se ha propuesto que la avascularidad de diversos tejidos como el cartílago y la córnea se debe a un predominio local de los factores inhibidores de la angiogénesis. Siguiendo este razonamiento, la búsqueda de estas moléculas se concentró en tejidos avasculares. Los factores anti-angiogénicos que se han identificado actúan sobre una o más de las distintas fases de la angiogénesis, y más del 50% de los inhibidores identificados son fragmentos peptídicos derivados del procesamiento proteolítico de proteínas mas grandes que por si mismas no tienen acciones sobre la angiogénesis (64).

Entre los inhibidores endógenos de la angiogénesis se incluyen:

a) La angiostatina,

La angiostatina se deriva del procesamiento proteolítico del plasminógeno. En realidad, el término angiostatina se refiere a una familia de fragmentos derivados del plasminógeno que se caracterizan por contener motivos estructurales formados por cuatro triples hélices conocidos como *kringle* (65). La isoforma nativa de la angiostatina contiene los kringles 1 al 4 del plasminógeno, e inhibe el proceso de neovascularización impidiendo el crecimiento de tumores y la formación de metástasis (65). Además, la angiostatina inhibe de manera específica la proliferación e induce la apoptosis del endotelio (40). Los mecanismos que median las acciones de la angiostatina no han sido elucidados, sin embargo se ha propuesto que su unión a las cadenas α y β de la sintetasa de ATP resulta en un decremento de la proliferación y la migración celular (40). Otros estudios han mostrado que la angiostatina reduce la expresión del VEGF, y que puede bloquear los efectos de esta molécula sobre la vasopermeabilidad (66, 67).

El plasminógeno contiene un quinto kringle que también posee efectos anti-angiogénicos. De hecho, se ha reportado que el kringle 5 bloquea la proliferación del endotelio con mayor eficiencia que la angiostatina (65).

b) La endostatina

El colágeno XVIII es uno de los principales componentes de la membrana basal de las células endoteliales. El procesamiento proteolítico del extremo C-terminal de esta molécula genera a la endostatina, un fragmento con actividades anti-angiogénicas tanto *in vitro* como *in vivo* (68). El mecanismo por el que la endostatina ejerce sus efectos no ha sido descrito, sin embargo se ha reportado que es capaz de bloquear la señalización del VEGFR-2 (69). También se ha descrito que su unión a la integrina $\alpha_5\beta_1$ bloquea la adhesión celular a la matriz y diversas vías de señalización teniendo como resultado la inhibición de la angiogénesis y la promoción de la apoptosis del endotelio (70, 71). En un estudio reciente, se ha presentado evidencia que sugiere que los efectos de la endostatina son mediados a través de la regulación de amplios conjuntos de genes que actúan en el endotelio. Brevemente, este trabajo muestra que la adición de endostatina a cultivos celulares resulta en una baja significativa en la expresión de genes pro-angiogénicos como HIF-1 y las STAT, mientras que aumenta la expresión de inhibidores de la angiogénesis como la vasostatina y la trombospondina-1 (TSP-1) (72).

A pesar de estos resultados, se ha encontrado que la inhibición de la expresión de colágeno XVIII y por lo tanto de endostatina en modelos animales o en condiciones patológicas en los humanos, no resulta en un incremento aparente de la angiogénesis, sugiriendo que esta molécula no es indispensable para la regulación global de la vascularización (68). Además, datos obtenidos parecen sugerir que el requerimiento de endostatina es tejido-específico, particularmente en el ojo y el cerebro (73-76). Mutaciones que inhiben la expresión de la colágena XVIII resultan en una atenuación progresiva de la agudeza visual en ratones y humanos (76). La caracterización de los defectos oculares en los modelos animales en que se suprimió la expresión de colágena XVIII reveló grandes

similitudes con las características histopatológicas del síndrome de Knobloch que se caracteriza por degeneración vitreo-retiniana y de la mácula, así como por miopía y desprendimiento de la retina (76, 77).

c) Factor derivado del epitelio pigmentado

El factor derivado del epitelio pigmentario o PEDF es un miembro inerte de la familia de inhibidores de proteasas de serina (78). Se cree que su inactividad sobre dichas proteasas se debe a cambios en la secuencia de su centro reactivo (79). El PEDF fue descrito por primera vez a finales de los años 80 en el medio condicionado de cultivos primarios de células epiteliales de la retina (80). Posteriormente fue detectado en la circulación, el cerebro, la médula espinal, el hígado y el corazón entre otros órganos (81). Si bien el PEDF es inactivo sobre las proteasas, se ha demostrado que posee efectos neurotróficos y neuroprotectores (78, 82, 83). Sin embargo, son sus acciones sobre la angiogénesis las que más han atraído el interés de la comunidad científica. El PEDF es el inhibidor más potente de la angiogénesis que se ha descrito hasta el momento. Este factor es capaz de inhibir la migración de las células endoteliales, incluso en presencia de factores pro-angiogénicos como el VEGF y el FGF (81, 84). Posee efectos inhibitorios de la vasopermeabilidad (85) e induce la apoptosis de las células endoteliales a través de la vía Fas/FasL (86). Además, el trabajo de Cai y colaboradores sugiere que el PEDF puede alterar el equilibrio entre los reguladores de la angiogénesis a través de inactivar a los receptores del VEGF (84). El trabajo de otros grupos ha mostrado una disminución en la expresión y en los niveles de VEGF en presencia de PEDF (87). Una evidencia más de su acción como un inhibidor endógeno de la angiogénesis es que en modelos animales en los que se eliminó la expresión del PEDF se observó una mayor densidad vascular en diversos órganos, incluyendo el páncreas y la próstata (88).

Los patrones de expresión del PEDF y el VEGF han sido ampliamente estudiados en el ojo. El equilibrio entre estas dos moléculas previene la neovascularización de la coroides que es característica de la degeneración macular asociada a la edad y de la retinopatía diabética (89, 90). Esta relación se

ha descrito en otros tejidos como por ejemplo las placas de crecimiento de la epífisis ósea. En esta zona, la expresión de PEDF predomina en áreas avasculares mientras que el VEGF abunda en las zonas hipertróficas vascularizadas (91, 92). Niveles bajos de PEDF se han correlacionado con un incremento en las metástasis y un mal pronóstico en cáncer de próstata y pancreático, así como en neuroblastomas y gliomas (84, 88). Los efectos del PEDF en la inhibición de diversos tipos tumorales ponen de manifiesto la necesidad de descubrir y caracterizar otros inhibidores naturales de la angiogénesis.

d) Vasoinhibinas

Las vasoinhibinas (Vi) son una familia de fragmentos amino-terminales derivados del procesamiento proteolítico de la prolactina (PRL), el lactógeno placentario (LP) y la GH (93, 94) (tabla 1). Los fragmentos derivados de la PRL son los más ampliamente estudiados de la familia de las Vi. Estas moléculas poseen la capacidad de bloquear la vasodilatación y la angiogénesis y de promover la regresión vascular, propiedades que no comparten con las hormonas precursoras (95-98). El procesamiento proteolítico de la PRL humana por catepsina D produce cortes en las posiciones 132-133, 147-148 y 150-151 generando Vi de 15, 16.8 y 17.2 kDa respectivamente (94). La proteólisis por acción de las MMP-1, -2, -3, -8, -9 y -13 corta a la PRL entre los aminoácidos 156 y 157 generando una Vi de 17 kDa que puede seguir siendo procesada por las MMP hasta Vi de 16 y 14kDa (95) (tabla 1).

La estructura básica de las Vi es desconocida. La actividad anti-angiogénica se ha localizado en el extremo amino-terminal debido a que se ha reportado que fragmentos de tamaño similar pero conteniendo el extremo C-terminal de la hormona carecen de efectos sobre la angiogénesis (99). Recientemente, se ha encontrado que los fragmentos N-terminales de 16kDa de la PRL y la GH contienen en su estructura motivos estructurales conocidos como “péptidos oblicuos”, esto es, secuencias cortas de 14 aa caracterizados por una distribución asimétrica de residuos hidrofóbicos que pudieran representar los sitios activos de las Vi (100). Utilizando tecnología de ADN recombinante, se ha encontrado que

estas secuencias poseen efectos anti-angiogénicos tanto *in vitro* como *in vivo*, si bien sus efectos son significativamente menores que los de las Vi completas (100). Es interesante analizar la causa por la que las Vi poseen propiedades anti-angiogénicas pero no las moléculas madre. Se ha propuesto que el procesamiento proteolítico de la PRL remueve la cuarta α -hélice de la hormona madura, resultando en la exposición de residuos hidrofóbicos que de otra manera estarían ocultos y que pudieran constituir sitios de interacción con receptores específicos distintos a los de las hormonas precursoras (94)

Las Vi poseen diversos efectos sobre la angiogénesis que resultan en la inhibición de este proceso. Se ha encontrado que estos fragmentos actúan *in vivo* e *in vitro* a través de bloquear la proliferación de las células endoteliales inducida tanto por FGF como por VEGF (97). Asimismo, las Vi pueden bloquear la vasodilatación inducida por el VEGF (98) y la activación de uPA inducida por el FGF (101). Es posible que este último efecto medie la habilidad de las Vi para bloquear la migración y adhesión endotelial responsable de la formación de estructuras tubulares en geles de colágena tipo I (96). Además, las Vi pueden actuar independientemente de los factores de crecimiento para inducir la apoptosis de las células endoteliales en cultivo (102). A pesar de los esfuerzos de varios grupos de investigación, no se ha identificado al receptor específico para la Vi. Clapp y Weiner (103) describieron un sitio de unión saturable de alta afinidad (K_d 1-10nM) para la Vi de 16 kDa de la PRL en la membrana de células endoteliales, y mediante estudios de *crosslinking* identificaron estos sitios de unión como proteínas de 32 y 52 kDa.

¿Qué moléculas median los efectos de las Vi? En el contexto de la proliferación celular, las Vi interfieren con la activación inducida por VEGF y FGF de las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPK) (104) a nivel de Ras (105, 106), y esta interferencia conlleva a la inhibición de las ciclinas D1 y B1 y al bloqueo de la transición de G_0 - G_1 y de G_2 -M del ciclo celular (107). Por otra parte, las Vi activan al factor nuclear kappaB (NFkB) a través de estimular la degradación del inhibidor citosólico I κ B- α (108), y esta activación conduce a la activación de las caspasas 8, 9 y 3 y con ello a la apoptosis del endotelio vascular (108).

Además las Vi parecen estimular la conversión de Bcl-X_L a su forma pro-apóptica Bcl-X_S (109). Por lo que respecta a los mecanismos responsables de la migración y de la organización del endotelio vascular en estructuras capilares, se ha demostrado que las Vi pueden bloquear la actividad basal de uPA a través de inducir la expresión del inhibidor del activador de plasminogéno tipo I (PAI-1) (101). Finalmente, estudios recientes han demostrado que las Vi bloquean la activación de eNOS inducida por el VEGF (98). Como se describió anteriormente, la actividad de eNOS media los efectos mitogénicos, vasodilatadores y promotores de la vasopermeabilidad del VEGF. La adición de donadores de NO bloqueó los efectos inhibidores de las Vi sobre la proliferación endotelial y la dilatación de segmentos aislados de aorta y de vasos coronarios (98). Asimismo, se tiene evidencia de que las Vi interfieren con la activación de la eNOS a través de bloquear la movilización de Ca²⁺ intracelular (98).

Aunque diversas proteasas pueden generar a las Vi *in vitro* (93, 94) poco se sabe sobre su formación *in vivo*. Hasta hace poco se creía que la catepsina D era la enzima que procesaba a la PRL hacia Vi (99, 110). Sin embargo, debido a que esta proteasa requiere de un pH ácido para actuar, su relevancia fisiológica fue cuestionada (99). Estudios recientes han mostrado que tanto MMPs exógenas como endógenas son capaces de procesar la PRL a Vi a un pH fisiológico, apoyando la generación de estos fragmentos en el espacio extracelular de tejidos sanos (95). Además, se ha demostrado la asociación de la catepsina D con el intercambiador de Na⁺/H⁺ y la H⁺/ATPasa membranales, los cuales favorecen la formación de microdominios extracelulares con un pH lo suficientemente ácido para facilitar el procesamiento de la PRL (111). En apoyo a la formación endógena de las Vi, estas moléculas han sido detectadas en la circulación y en diversos órganos y fluidos (tabla 1). Interesantemente, se ha detectado a las Vi en tejidos avasculares como el cartílago (112) y la córnea (113) apoyando la participación de estos péptidos en la ausencia de vasos sanguíneos que caracteriza a estos tejidos.

Tabla 1.

Vasoinhibinas endógenas				
HORMONA MADRE	ORIGEN	MASA (kDa)	N-TERMINAL	REFERENCIAS
PRL (humana)	Adenoma hipofisiario	16	Sí	(105)
	Células endoteliales	14, 16	No se sabe	(114)
	Líquido subretiniano	16	No se sabe	(115)
	Líquido amniótico	14	No se sabe	(116)
	Suero	16	No se sabe	(115-117)
PRL (rata)	Hipófisis anterior	16	No se sabe	(117, 118)
	Hipófisis posterior	14	No se sabe	(117, 118)
	Condrocitos	16	Sí	(95)
	Fibroblastos	16	No se sabe	(119)
GH (humana)	Suero	14,16	No se sabe	(118, 119)
	Hipófisis anterior	17	No se sabe	(120-122)
GH (humana)	Suero	16,17	No se sabe	(120, 122)
	Hipófisis anterior	16,17	No se sabe	(120, 122)
Vasoinhibinas exógenas				
HORMONA MADRE	GENERADA POR	MASA (kDa)	EFFECTOS ANTI-ANGIOGÉNICOS	REFERENCIAS
PRL (humana)	Catepsina D	15-17.2	<i>In vitro</i>	(105)
	MMPs	17.7	<i>In vitro</i>	(95)
	Recombinante (123aa)	13.9	<i>In vitro e in vivo</i>	(96, 98, 123)
	Recombinante (139aa)	15.8	<i>In vitro e in vivo</i>	(101, 102, 109, 124)
PRL (rata)	Catepsina D	16.3	<i>In vitro e in vivo</i>	(96, 98, 101, 115)
GH (humana)	Recombinante (133aa)	15.3	<i>In vitro e in vivo</i>	(99)
Lactógeno placentario	Recombinante (133aa)	15.5	<i>In vitro e in vivo</i>	(99)

El reconocimiento del papel de la angiogénesis en el crecimiento y funcionamiento de diversos tejidos, así como en el establecimiento y la progresión de un amplio espectro de padecimientos ha despertado un interés considerable en la identificación de factores angiogénicos que pudieran representar herramientas terapéuticas capaces de bloquear la formación de neovasos o de promover su involución. El ojo es uno de los órganos en los que se presenta uno de los controles más estrictos de la angiogénesis (4). El control de este proceso es central para el funcionamiento ocular y su alteración conlleva a un grupo de enfermedades conocidas como retinopatías vasoproliferativas que son la principal causa de ceguera a nivel mundial (4, 125-130). En las siguientes secciones se describe la influencia de la angiogénesis en el desarrollo de estos padecimientos, en particular sobre la retinopatía diabética, así como evidencias de que las Vi podrían representar factores reguladores de la angiogénesis ocular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

3) *Retinopatías vasoproliferativas*

En el adulto sano, el ojo contiene varios compartimentos avasculares, incluyendo a la córnea, el cristalino, el humor vítreo y la mitad externa de la retina (128, 130). Cuando estas estructuras se vascularizan, la agudeza visual disminuye, se genera opacidad ocular, y se producen las retinopatías vasoproliferativas, que incluyen a la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro y a la degeneración macular asociada con la edad. Estos tres padecimientos son las principales causas de ceguera en el mundo (128, 130). La diabetes afecta aproximadamente al 10% de la población mundial y la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en personas entre los 20 y los 65 años de edad (131, 132). Se considera que después de 20 años con diabetes, el 98% de los pacientes con diabetes tipo 1 y más del 60% de los pacientes con diabetes tipo 2 presenta algún tipo de retinopatía (4, 131, 132). Asimismo, la retinopatía del prematuro es un grave problema de salud en países en desarrollo como México. Se estima que el 66% de los infantes prematuros desarrolla retinopatía del

prematureo si su peso al nacer es menor a 1.25 kg y que este porcentaje es mayor (82%) en prematuros con pesos menores a 1kg (125, 133). Si bien la retinopatía del prematuro puede ser controlada mediante la fotocoagulación de los neovasos durante las primeras semanas fuera de la incubadora (133), esta práctica no es siempre factible en los centros nacionales de salud y muchos de estos niños pierden la vista. Finalmente, la degeneración macular asociada con la edad representa la principal causa de ceguera en personas mayores de 50 años (4, 5). El común denominador de las retinopatías vasoproliferativas, al igual que de otros padecimientos angiogénico-dependientes, es la hipoxia tisular que es a su vez la consecuencia de una reducción severa o completa en la perfusión sanguínea (isquemia) (4). A continuación se detallan los mecanismos propuestos para el desarrollo de la retinopatía diabética.

a) Retinopatía diabética (RD)

La hiperglucemia característica de los pacientes diabéticos está estrechamente asociada a las alteraciones vasculares que se han descrito en la retinopatía diabética. En apoyo a esta afirmación, diversos estudios muestran que un estricto control glicémico puede retrasar o incluso prevenir el establecimiento de la enfermedad (131, 132). Lamentablemente, las lesiones de la vasculatura retiniana persisten incluso cuando se ha vuelto a la normoglicemia (130, 131). La RD se diagnostica por la aparición de lesiones vasculares retinianas de gravedad progresiva, culminando con la formación de neovasos (retinopatía diabética proliferativa). La ceguera puede resultar ya sea por la formación de hemorragias que enturbian el humor vítreo o por la asociación de los neovasos a un tejido fibroso intravítreal que ejerce tracción sobre la retina produciendo su desprendimiento (132).

¿Cuáles son las alteraciones vasculares que caracterizan la retinopatía diabética? Inicialmente se presentan una serie de cambios en la vasculatura que son difícilmente detectados a nivel clínico y que anteceden a la aparición de cambios patológicos. Pueden pasar incluso décadas antes de que haya cambios observables. Un ejemplo claro de lo anterior son las alteraciones en la hemodinámica de la retina. En diversos modelos animales, así como en muestras

de pacientes se ha observado un engrosamiento de la matriz extracelular vascular. Se ha encontrado que el ARNm de la fibronectina y los colágenos tipo I, III, IV y V aumentan en la membrana basal vascular de pacientes con RD (132, 134, 135). Asimismo, la adhesión de plaquetas y leucocitos a los vasos retinianos aumenta considerablemente, y se ha reportado que los leucocitos de los diabéticos son más rígidos (136) que los de personas sanas debido a la mayor polimerización de actina. El engrosamiento de la matriz y la adhesión de los leucocitos rígidos a los capilares retinianos pueden producir su oclusión, y conducen al bloqueo de la circulación sanguínea en amplias regiones de la retina (isquemia). Otro de los efectos característicos de la hiperglucemia sobre la vasculatura retiniana es la muerte de los pericitos (136, 137), que se ve agravada cuando hay fluctuaciones entre hiperglucemia y normoglucemia como es frecuente en la diabetes pobremente controlada. Los pericitos regulan la proliferación y contractilidad del endotelio (136, 137). En la retina en desarrollo, aquellos vasos que carecen de pericitos son más susceptibles a desaparecer en el modelo de retinopatía inducida por oxígeno (138). En la RD la muerte de los pericitos y la pérdida de las uniones vasculares intercelulares predisponen al endotelio a proliferar. Aunado a esto la isquemia tisular descrita anteriormente genera hipoxia que incrementa de manera notable la producción de factores pro-angiogénicos, mientras que los niveles de los inhibidores de la angiogénesis decaen notablemente (89, 129, 130, 139, 140).

Los principales factores reguladores de la angiogénesis involucrados en la progresión de la RD son los siguientes:

1. El **VEGF** es el principal factor angiogénico que media la RD y su nivel llega a quintuplicarse en el humor vítreo de los pacientes diabéticos (89, 139, 141). Este incremento se ha correlacionado con un aumento en los niveles de HIF-1 en la retina isquémica (29, 142). Como se describió anteriormente el VEGF estimula al endotelio a proliferar y degradar la matriz extracelular, así como a migrar y formar estructuras tubulares que anteceden la formación de neovasos. Más aún, el VEGF desempeña un papel temprano en el establecimiento de la RD. Se ha detectado un aumento en su nivel en retinas diabéticas aparentemente sanas

(132). La administración intravitreal de VEGF en animales produce características retinianas típicas de la RD temprana, entre ellas un aumento en la permeabilidad del endotelio vascular que se ha asociado al rearrreglo de las proteínas de las uniones estrechas como las cadherinas, *zonula occludens* y las occludinas (24, 29, 142-144). Esta acción puede aumentar la deposición de proteínas y lípidos del plasma, los cuales se precipitan formando exudados duros que contribuyen a la oclusión capilar.

Aunque el VEGF actúa principalmente como un factor parácrino, se ha reportado que también puede unirse a leucocitos y que posee efectos proinflamatorios (145). Receptores a VEGF se encuentran presentes en diversos subtipos de células inflamatorias. Se ha demostrado que las plaquetas son capaces de producir y liberar VEGF (146), participando activamente en el rompimiento de la barrera hemato-retiniana característico de las retinopatías, así como en la formación de neovasos (147).

2. Factor de crecimiento semejante a la insulina-1 (**IGF-1**). Hace más de 50 años se propuso la participación de factores hipofisarios en el desarrollo de la retinopatía diabética. En 1953, Poulsen describió una mejoría notable en un caso de RD severa en un paciente con diabetes tipo 1 que desarrolló la enfermedad de Simmond (necrosis de la hipófisis debido a una hemorragia). En pruebas clínicas, pacientes con diabetes tipo 1 fueron sometidos a hipofisectomía seguida por una terapia de reemplazo de todas las hormonas hipofisarias. El resultado mostró que la hipofisectomía producía una mejoría sensible en la agudeza visual, excepto en aquellos donde se reemplazó la hormona de crecimiento (GH) (148), sugiriendo posibles acciones proangiogénicas de la GH. Dado que los efectos mitogénicos de la GH son mediados por IGF-1, este factor fue uno de los primeros en ser directamente relacionados con la RD. Reportes iniciales mostraron que un incremento agudo en los niveles de IGF-1 antecedió al establecimiento de la fase proliferativa de la RD en modelos animales (149, 150). Posteriormente, se detectó un incremento en el nivel de IGF-1 en el vítreo de pacientes con RD (151), y se propuso que este aumento se asocia con el aumento de vasopermeabilidad.

Estudios *in vitro* han mostrado que el IGF-1 puede inducir la proliferación y migración del endotelio (152), así como la degradación de la matriz extracelular del capilar (153). *In vivo* se ha demostrado que IGF-1 puede inducir angiogénesis en la retina de conejos (154) y Smith y colaboradores han mostrado que animales transgénicos que expresan un antagonista de GH son resistentes al modelo de retinopatía inducido por oxígeno (155). Esta observación se repitió con animales normales tratados con un análogo de la somatostatina y se bloqueó bajo tratamiento con IGF-1 (155).

Si bien es claro que la angiogénesis ocular puede ser resultado del incremento en la concentración de factores angiogénicos (4, 5, 79, 128), su establecimiento también requiere de la disminución en la concentración de factores antiangiogénicos (87, 89, 141, 156, 157). La relevancia de esta caída se pone de manifiesto por el hecho de que en el ojo sano no ocurre proliferación vascular a pesar de la presencia continua de múltiples factores estimuladores de la angiogénesis. Hasta el momento, el PEDF, la angiostatina y la endostatina son los principales inhibidores de la angiogénesis ocular asociados con la progresión de la RD.

3. El **PEDF** participa activamente en el mantenimiento de la avascularidad de la córnea (79). Su inmunoneutralización conduce a la neovascularización de este tejido. Más aún, la inyección intravítreal de anticuerpos dirigidos contra el PEDF bloquea las propiedades anti-angiogénicas del humor vítreo (79, 89). Se ha reportado que los niveles de PEDF en el humor vítreo de pacientes con RD ó degeneración macular asociada a la edad presentan una disminución significativa (89, 90). Además, se ha encontrado que un aumento en los niveles intraoculares del PEDF producido ya sea por su inyección intravítreal (158), o mediante el uso de vectores adenovirales (87), bloquea de manera efectiva la neovascularización producida en modelos de retinopatía inducida por isquemia. Estos datos han despertado un interés considerable en el uso del PEDF para tratar a las retinopatías vasoproliferativas.

4. **Angiostatina y endostatina.** Se ha reportado que los niveles de angiostatina aumentan considerablemente después de la fotocoagulación con láser, el tratamiento usado actualmente para la RD (159). Asimismo, los niveles de endostatina en el humor acuoso y en el vítreo se correlacionan significativamente con la severidad de la RD (160). Como en el caso del PEDF, tanto la administración intravitreal de endostatina como su expresión a través de adenovirus reducen la neovascularización retiniana (161, 162).

5. **Vasoinhibinas.** Dado que las Vi son el tema central de esta tesis, las evidencias de su asociación con las retinopatías vasoproliferativas en general, se considera en la sección a continuación.

Vasoinhibinas y retinopatías vasoproliferativas

Las vasoinhibinas se generan en el ojo de pacientes con retinopatía del prematuro (115), un trastorno neovascular de la retina análogo a la retinopatía diabética, donde las condiciones de hiperoxia de la incubadora a las que son sometidos los recién nacidos prematuros conlleva a la oclusión de vasos sanguíneos retinianos y con ello a la isquemia e hipoxia local (115, 125, 133). En pacientes con el grado más avanzado de la retinopatía del prematuro, sometidos a cirugía intraocular varios meses después de finalizado el proceso angiogénico, se detectó a las Vi en el líquido subretiniano y en las membranas fibrovasculares intraoculares (115). Estas Vi pueden derivar de la prolactina sintetizada intraocularmente, ya que los vasos sanguíneos de las membranas fibrovasculares expresan el ARN mensajero de la prolactina (115). Al respecto, se propuso que las Vi podrían participar en la regresión vascular intraocular que tiene lugar en los pacientes con retinopatía del prematuro. Si bien el 82% de los bebés prematuros que pesan menos de 1.25 Kg al nacimiento desarrollan neovasos en la retina, solamente el 6% de estos pacientes llegan a presentar grados avanzados de la enfermedad (125, 133). Esto es así debido a que los neovasos oculares involucionan por apoptosis en la mayoría de los pacientes (163). Dado que las Vi

estimulan la apoptosis de las células endoteliales (102), podrían estar implicadas en la regresión de los neovasos y con ello en evitar la progresión de la retinopatía del prematuro. En apoyo a esta posibilidad, se ha visto que la inmunoneutralización de PRLs oculares bloquea la regresión por apoptosis del sistema hialoideo, un sistema vascular fetal que involuciona por apoptosis en la rata recién nacida (115).

Por otra parte, la prolactina sistémica también puede funcionar como fuente de Vi intraoculares, y en este sentido los niveles elevados de PRL en la circulación podrían tener un valor pronóstico favorable en las retinopatías vasoproliferativas. Como ya se mencionó, la relación entre las hormonas hipofisarias y la retinopatía diabética se exploró hace tiempo a consecuencia de la observación de que la hipofisectomía reviste efectos benéficos sobre la regresión vascular ocular (148). Estos efectos benéficos se atribuyen a la supresión de la hormona de crecimiento que es diabetogénica (164) y puede estimular la neovascularización a través de inducir la expresión del factor angiogénico IGF-1 (165). Sin embargo, dado que la prolactina disminuye en los pacientes hipofisectomizados, también se ha investigado la posible asociación entre los niveles circulantes de prolactina y la retinopatía diabética. Al respecto, en los estudios iniciales se reportaron niveles circulantes de PRL más altos en pacientes diabéticos sin retinopatía severa que en aquellos con retinopatía severa (166, 167). Sin embargo, estudios subsecuentes no confirmaron estos hallazgos (168, 169) y el tema dejó de explorarse, a pesar de que los estudios negativos no fueron concluyentes, dado que no especificaban el tipo de retinopatía (proliferativa versus no proliferativa) y el grado de la misma. Recientemente, el análisis de un grupo de 133 pacientes con retinopatía diabética, categorizados de acuerdo a la severidad del padecimiento, reveló que la concentración sérica de prolactina es significativamente mayor en los diabéticos sin retinopatía o con retinopatía no proliferativa que en aquellos con retinopatía diabética proliferativa, el grado más severo de la enfermedad (170) Cabe también mencionar que al final del embarazo y en el período postparto, cuando los niveles circulantes de prolactina se encuentran elevados, ocurre una regresión de la retinopatía diabética (171, 172), y esta correlación ha llevado a

plantear el papel protector de la PRL en este padecimiento. A este respecto, es interesante señalar la observación de que la leche materna protege contra la retinopatía del prematuro (173), y que este efecto pudiera deberse, entre otros factores, a la presencia de prolactina en la leche, desde donde puede incorporarse a la circulación de las crías (174). Finalmente, se ha reportado que la prolactina puede tener efectos benéficos sobre la incidencia y progresión de la diabetes tipo-1, a través de acciones conjuntas sobre el sistema neuroendócrino, el sistema inmune y posiblemente sobre la regulación del metabolismo de la glucosa (175, 176)

iii. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente la diabetes afecta a más de 150 millones de personas a nivel mundial y su prevalencia esta aumentado rápidamente. México no es la excepción. Nuestro país es el noveno lugar en cuanto a prevalencia de la enfermedad, sin embargo, en un lapso de solo 2 años los costos producidos por la diabetes aumentaron un 25% (177), sugiriendo un claro aumento en su incidencia. La retinopatía diabética es una complicación común que surge por la hiperglucemia crónica de los diabéticos y que se caracteriza por el crecimiento patológico de neovasos en la retina que invaden el humor vítreo y eventualmente producen ceguera. La fotocoagulación con rayo láser de la retina es la opción terapéutica actual; es el equivalente oftalmológico de amputar una extremidad, reduce considerablemente la visión periférica y nocturna (4) y no es efectiva en todos los casos. Es por esto que la búsqueda de nuevos tratamientos para la RD es una necesidad apremiante.

Las Vi son una familia de inhibidores de la angiogénesis formada por fragmentos que contienen la región amino-terminal de la PRL, la GH y el LP. Dentro de esta familia, las Vi generadas a partir de la PRL han sido las más ampliamente estudiadas. Diversos reportes apuntan a que estas Vi podrían participar en la regulación fisiológica de la angiogénesis ocular (113, 115, 178), abriendo la posibilidad de su aplicación terapéutica. En este trabajo nos propusimos extender estos hallazgos a través de investigar si la PRL se expresa en la retina y si puede ser procesada hacia Vi. Asimismo, analizamos los efectos de las Vi endógenas sobre la regulación de la angiogénesis retiniana y el efecto de su inhibición sobre el equilibrio angiogénico ocular. Finalmente, como un intento de evaluar la potencialidad terapéutica de estos péptidos, estudiamos las acciones de la Vi exógenas en presencia del principal mediador de la RD, el VEGF.

iv. HIPÓTESIS

La PRL es expresada en la retina y es procesada hacia vasoinhibinas que participan activamente en la regulación fisiológica y patológica de la angiogénesis ocular.

v. OBJETIVOS

Objetivo General

Demostrar la participación de las Vi en la regulación de la angiogénesis fisiológica y patológica en la retina.

Objetivos Particulares

- Demostrar la expresión de la PRL en la retina
- Determinar si la PRL es procesada intraocularmente hacia Vi por MMPs locales.
 - Analizar la participación de las Vi endógenas en la inhibición de la angiogénesis retiniana
 - Determinar si las Vi exógenas bloquean la dilatación y permeabilidad de los vasos retinianos inducida por el VEGF
 - Determinar si las Vi inhiben la actividad de la eNOS inducida por el VEGF en la retina.

vi. MATERIALES Y METODOS

Reactivos

La PRL de rata (grado biológico) se obtuvo del Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis de EUA (NHPP, Torrance, CA, EUA). La Vi de 16 kDa de la PRL (Vi) se generó por proteólisis enzimática de la PRL de rata con una fracción particulada de la glándula mamaria de la rata, seguida por filtración en gel y carbamidometilación de acuerdo al método previamente descrito (179). Se utilizaron anticuerpos anti-PRL policlonales (C-1) y monoclonales (INN-1, INN-368) previamente caracterizados (113, 180). Los anticuerpos preinmunes empleados en los grupos testigo se purificaron de suero normal de conejo mediante el método descrito (113). Los anticuerpos INN-1 e INN-368 fueron donados por el Dr. Peter Berger (Academia Nacional de Ciencias de Austria, Innsbruck, Austria) y los anticuerpos preinmunes de ratón se obtuvieron de ICN Biomedicals (Aurora, IL, EUA).

Animales

El cuidado y tratamiento de los animales se sujetó a las normas establecidas por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) en el código "*Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*" Se emplearon ratas macho de la variedad Wistar (200-250 g) anestesiadas con 70% de ketamina/30% de xilacina (1 μ l/g de peso corporal i.p.) para la posterior inyección intravitreal de las diferentes sustancias bioactivas.

RT-PCR

Inmediatamente después de sacrificar a los animales, se enuclearon los ojos y se disecó y congeló la retina. Se extrajo y cuantificó el ARN total, del cual se retrotranscribieron 5 μ g en un volumen de reacción de 25 μ l empleando la transcriptasa reversa (RT) del virus de la leucemia murina Moloney (Promega, Madison, WI, EUA). Se tomaron alícuotas de 2 μ l de la reacción y se procesaron mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR) para la amplificación de

ADN complementario (ADNc) (30 seg a 94°C, 45 seg a 65°C, y 45 seg a 72°C por 40 ciclos) con dos oligonucleótidos específicos para PRL de rata (plantilla en sentido ACT TCT TCC CTA GCT ACT CCT GAA GAC y plantilla en antisentido GCA GTT GTT TTT ATG GAC AAT TTG GCA). El producto de amplificación específico está constituido por 418 pares de bases. Dado que los oligonucleótidos tienen como anclaje posiciones en los exones 3 y 5 del gen de PRL de rata, la amplificación del ADNc pudo distinguirse fácilmente de la amplificación de ADN genómico.

Hibridación in situ

Se fijaron retinas aisladas de rata en paraformaldehído al 4% por 24 h, y se incubaron por otras 24 h en sacarosa libre de RNAasa al 10% y por 3 días en sacarosa al 30%. Entonces se incluyeron en medio para congelación de tejido (Leica Instruments, Alemania), se cortaron en secciones de 10 µm y se montaron en laminillas Superfrost/Plus (A. Daigger & Company, EUA). Las secciones se secaron por 15 minutos a 60°C, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 10 a 15 minutos, y se lavaron en una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) adicionada con Tween 20 al 0.1% (PBT). Las secciones se incubaron en una mezcla 1:1 de PBT y solución amortiguada de hibridación (SSC al 5X, Tween 20 al 0.1%, formamida deionizada al 50% y 100 µg/ml de ADN sonificado de esperma de salmón) y se prehibridaron por 1 h a 55°C. A partir de un plásmido linealizado conteniendo el ADNc de la PRL de rata, se sintetizaron sondas marcadas con digoxigenina tanto en dirección sentido como antisentido. Las sondas se desnaturalizaron en solución amortiguada de hibridación y se incubaron por un período de hibridación a 55°C toda la noche. Las laminillas se lavaron a 60°C con solución de hibridación y después se lavaron en PBT. Finalmente se incubaron por dos horas en la solución de anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, se lavaron en PBT y se reveló la señal por exposición al substrato azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato en un amortiguador alcalino (Roche, Suiza).

Análisis de la proteólisis de la PRL

La proteólisis de la PRL por el humor vítreo se evaluó *in vivo* mediante la inyección intravitreal de PRL. La inyección intravitreal se llevó a cabo en ratas anestesiadas a través de la realización de un pequeño orificio 2 mm por debajo del limbo esclerocorneal, con una aguja hipodérmica calibre 29 como guía para insertar una microjeringa (Hamilton, Reno, NV, EUA). Cada ojo fue inyectado con 2 μ l conteniendo 5 μ g de PRL de rata (grado biológico, National Hormone Pituitary Program, Torrance, CA) 10 minutos después de haber inyectado por el mismo orificio 2 μ l de vehículo (PBS) solo, o conteniendo galardina (10 μ M, Calbiochem, San Diego, EUA), un inhibidor específico de MMPs. Seis horas después, las ratas fueron sacrificadas y el humor vítreo extraído y procesado para western blot.

Western blot

Extractos en PBS de retinas de rata se incubaron toda la noche con una solución conteniendo el anticuerpo policlonal anti-PRL (C-1). El sedimento inmunoprecipitado se sometió a ebullición en solución amortiguada reducida de Laemmli, y a electroforesis en gel de poliacrilamida (15%) con dodecilsulfato de sodio. Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron en una solución 1:500 del anticuerpo policlonal anti-PRL (C-1) o de los anticuerpos monoclonales anti-PRL INN-1 o INN-368. El complejo antígeno-anticuerpo se reveló con la reacción de fosfatasa alcalina y el empleo de un estuche comercial de anticuerpos secundarios (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Inmunoneutralización de PRLs en la retina

Este procedimiento está basado en reportes previos de la actividad de neutralización de PRL y Vi por el empleo de los anticuerpos C-1 e INN-1 tanto *in vivo* (113) como *in vitro* (178). Cada ojo fue inyectado con 2 μ l, conteniendo ya sea 2 μ g de algún anticuerpo anti-PRL (C-1, INN-1 o INN-368), anticuerpos preinmunes (de conejo o ratón), o vehículo (PBS). Seis días después de la inyección, las ratas fueron sacrificadas y las retinas extraídas y fijadas en

paraformaldehído al 4% por 1 hora, y equilibradas en sacarosa al 10% por 3 horas, al 20% toda la noche y al 30% por 4 días. El tejido se congeló incluido en Medio para Congelación de Tejido (Tissue Tek), y se obtuvieron secciones de 12 μm para ser montadas en laminillas cubiertas con gelatina.

Inyección de ARN de interferencia (ARNi)

Para la obtención de los ARNi se empleó el estuche Dicer (Gene Therapy Systems, San Diego, CA, EUA). Se amplificó un fragmento de 522 pares de bases ubicado en la región codificante del gen de PRL de rata utilizando los oligonucleótidos GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT TCT GGT GGC GAC TGC CAG A y GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC TTG TGG GAA TCC CTG CGC A. Además se amplificó un fragmento de tamaño similar a partir del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando los oligonucleótidos incluidos en el estuche. Los productos de amplificación fueron purificados y se empleó la polimerasa del fago T7 para transcribir moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc), dado que cada uno de los oligonucleótidos empleados contiene una región promotora específica para la polimerasa de ARN del fago T7 en la sección terminal 5'. Estas moléculas fueron digeridas con la enzima Dicer, y los ARNi resultantes se purificaron, cuantificaron y resuspendieron en agua a una concentración de 50 ng/ μl . Alícuotas de 3 μl (10 pmol) de ARNi ya sea de PRL de rata o de GFP se combinaron con 0.5 μl del reactivo Transit TKO (Mirus, Madison, WI, EUA) y se dejaron reposar durante 20 minutos antes de la inyección. Las inyecciones se llevaron a cabo como se describió anteriormente. Las inyecciones testigo fueron el vehículo (0.5 μl de Transit TKO y 3 μl de PBS) o 3.5 μl de PBS. Seis días después de la inyección las ratas fueron sacrificadas, y los ojos extraídos, fijados y seccionados como se describió anteriormente.

Inyección intravítrea de VEGF y Vi

Ratas macho anestesiadas fueron inyectadas intravítreamente con PBS, Vi (1 μg), VEGF (0.3 μg), o VEGF en combinación con Vi (mismas dosis). En todos los casos el volumen inyectado fue de 3.5 μl . Al día siguiente de la inyección los

animales fueron anestesiados y las retinas extraídas para la evaluación de la vasopermeabilidad o de la vasodilatación local.

Cuantificación de la neovascularización de la retina

Los vasos sanguíneos se marcaron mediante el empleo de anticuerpos generados contra la molécula de adhesión de plaquetas a endotelio-1 (anti-PECAM-1, Endogen, Woburn, MA, EUA), los cuales distinguen células endoteliales de forma específica (181), seguido de un anticuerpo secundario biotinilado, el cual fue revelado empleando el estuche de detección ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). De forma alternativa, se empleó un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (Alexa Fluor-488, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), el cual resultó ser un marcador específico de vasos sanguíneos, a juzgar por estudios de marcaje doble ya sea con anti-CD31 o con anticuerpos contra la proteína Von Willebrand, otro marcador específico de células endoteliales.

Se obtuvieron seis juegos de secciones seriadas de la retina completa, seccionada cada 60 μm , las cuales se observaron a una alta amplificación (40X) para registrar los vasos sanguíneos teñidos. Las imágenes se digitalizaron y analizaron mediante el empleo del programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Los vasos sanguíneos se delinearon y contaron, y se registraron sus áreas y densidad relativa. Como valores experimentales individuales se consideraron los promedios de seis secciones por ojo.

Evaluación de la dilatación vascular

Con el fin de delinear la red vascular retiniana, se realizaron montajes planos de las preparaciones de retinas y se tiñeron los eritrocitos contenidos en dicha red, empleando una reacción de peroxidación previamente descrita (113). Cada preparación fue digitalizada con un objetivo 20X y sobrepuesta para crear una imagen tridimensional de la preparación completa. La dilatación vascular se evaluó mediante el registro del área y longitud de la superficie de los vasos sanguíneos. El cociente entre el área del vaso y su longitud proporcionó una cuantificación del diámetro, que se empleó para realizar comparaciones entre

experimentos. Los acúmulos de eritrocitos extravasados por unidad de área se tomaron como índice de permeabilidad vascular.

Ensayo de Azul de Evans para cuantificar la permeabilidad vascular

Este es un ensayo cuantitativo que se basa en la unión irreversible del colorante azul de Evans a la albúmina plasmática. El aumento en vasopermeabilidad eleva la difusión de proteínas séricas a través de las uniones estrechas del endotelio, permitiendo la fuga del complejo azul de Evans/albumina y su difusión tisular. De acuerdo al método descrito (182), el azul de Evans fue inyectado en la vena yugular de ratas anestesiadas, inyectadas intravitrealmente con VEGF solo o en combinación con Vi, y al cabo de 90 minutos, los animales fueron sacrificados por inhalación de monóxido de carbono y perfundidos con PBS a un pH de 3.5. Las retinas fueron extraídas, secadas mediante su exposición al vacío por 5 horas (SPD 1010 SpeedVac System, ThermoSavant, EUA) y su peso seco evaluado. Posteriormente, las retinas se disolvieron en formamida por 18 horas a 70°C y se centrifugaron a 70,000 rpm por una hora. Se recuperaron los sobrenadantes, donde se determinó la concentración de azul de Evans por espectrofotometría a 620nm.

Análisis estadístico

Cada uno de los resultados se replicó tres o más veces en experimentos independientes. Los datos se presentan como promedios \pm errores estándar de la media. En los casos apropiados, se realizaron comparaciones estadísticas por la prueba de la t de Student no pareada o por análisis de varianza (ANOVA) de una cola, seguido de la prueba de Tukey para comparar promedios individuales. El nivel de significancia se estableció en el 5%.

vii. RESULTADOS

Expresión del ARN mensajero de PRL en la retina

Empleando el método de RT-PCR, investigamos la posible expresión del ARN mensajero de la PRL en la retina (Fig. 3A). La amplificación a partir del ARN mensajero extraído de retinas de rata dio como resultado un único producto del tamaño esperado (418 pares de bases), similar al producto amplificado en la muestra testigo empleando el ADNc de la PRL de rata. La distribución tisular del mensajero se analizó mediante hibridación *in situ*. De acuerdo a lo esperado, los controles hibridados con la sonda en dirección sentido, no presentaron señal (Fig. 3B). En contraste, empleando la sonda en dirección antisentido, se detectó una abundante expresión retiniana del mensajero de la PRL (Fig. 3C).

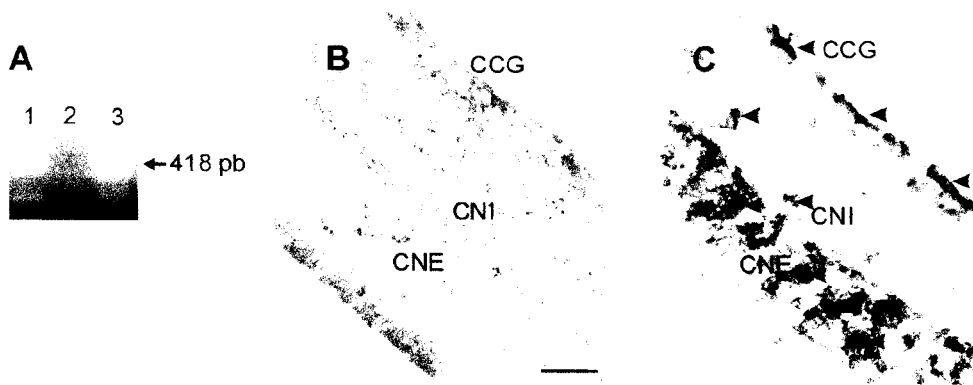


Figura 3. La retina expresa el ARN mensajero de la PRL. **(A)** Producto de RT-PCR obtenido a partir de un extracto de retina utilizando oligonucleótidos específicos para la PRL (carril 1). El ADNc de la PRL se utilizó como control positivo (carril 3), y la omisión de la transcriptasa reversa sirvió como control negativo (carril 2). **(B-C)** Secciones retinianas marcadas contra PRL con una ribsonda en dirección sentido **(B)** o anti-sentido **(C)**. Las flechas indican zonas de

reacción en la capa nuclear externa (CNE), capa nuclear interna (CNI), y en la capa de células ganglionares (CCG). Escala: 50 μ m.

La señal se ubicó principalmente en la capa nuclear externa y en las capas de células ganglionares de la retina, mientras que en la capa nuclear interna las células marcadas fueron menos abundantes.

Detección de las proteínas PRL y Vi en la retina

Dado que se ha mostrado que la PRL puede ser procesada proteolíticamente para dar origen a productos de aproximadamente 16 kDa, que incluyen tanto a la Vi anti-angiogénica, como a un fragmento carboxilo-terminal exento de esta actividad, decidimos investigar la naturaleza de las PRLs endógenas presentes en la retina mediante el empleo de dos anticuerpos monoclonales que reconocen de manera selectiva los extremos amino y carboxilo de la molécula de PRL. La especificidad de los anticuerpos fue demostrada comparando su unión a preparaciones de referencia de la PRL, de Vi, y del fragmento carboxilo-terminal de 6 kDa (Fig. 4A). El anticuerpo policlonal anti-PRL (C-1) reaccionó con las tres variantes moleculares de la PRL y ambos monoclonales reaccionaron con la PRL, pero mientras que el monoclonal INN-1 solamente se unió a la preparación referencia de Vi, el monoclonal INN-368 reconoció exclusivamente el estándar de PRL-6K (Fig. 4A). En vista de estos resultados, es claro que el epítoto antigénico para el anticuerpo INN-1 se localiza en el extremo amino, y para el anticuerpo INN-368 en el extremo carboxilo de la molécula de PRL.

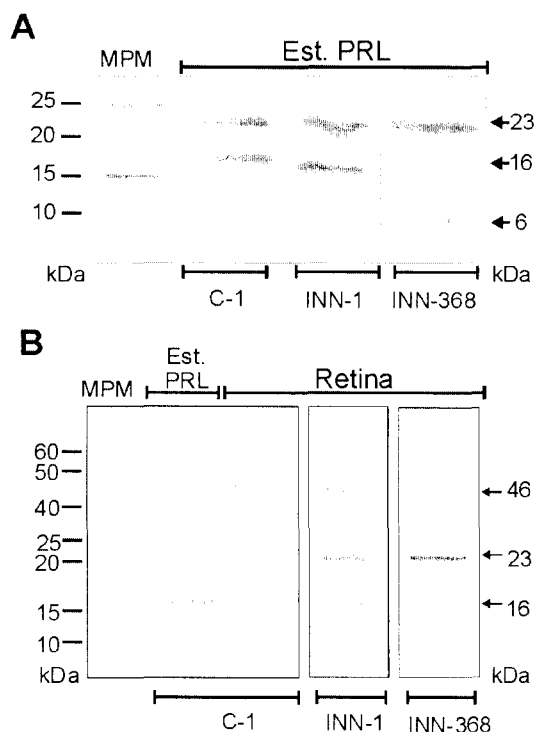


Figura 4. (A) Análisis por Western blot de preparaciones de referencia de PRL. Una combinación de preparaciones referencia de PRL, Vi amino-terminal y PRL-6K carboxilo-terminal, fue analizada utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra la PRL (C-1), o anticuerpos monoclonales dirigidos contra el extremo amino-terminal (INN-1) o el extremo carboxilo-terminal (INN-368) de la PRL. **(B)** Western blot de proteínas con inmunoreactividad tipo PRL en la retina. Extractos retinianos fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo C-1 y procesados para Western blot utilizando los anticuerpos C-1, INN-1 o INN-368. Se indica el peso molecular aparente de los marcadores definidos (MPM) y de las preparaciones referencia de PRL.

Empleando el anticuerpo policlonal C-1 fue posible inmunoprecipitar tres proteínas inmunorreactivas con una movilidad relativa correspondiente a 16, 23 y 46 kDa a partir de extractos de retina de rata (Fig. 4B). Es de suponerse, basado en sus movilidades relativas, que estas proteínas inmunorreactivas correspondan con la Vi, la PRL nativa y un dímero de esta última, respectivamente. El anticuerpo INN-1, selectivo para el extremo amino-terminal de la PRL, detectó a las tres

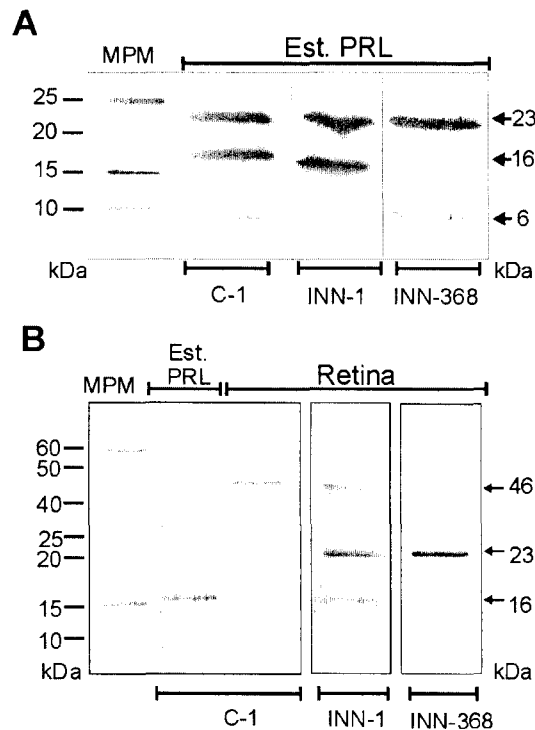


Figura 4. (A) Análisis por Western blot de preparaciones de referencia de PRL. Una combinación de preparaciones referencia de PRL, Vi amino-terminal y PRL-6K carboxilo-terminal, fue analizada utilizando anticuerpos policlonales dirigidos contra la PRL (C-1), o anticuerpos monoclonales dirigidos contra el extremo amino-terminal (INN-1) o el extremo carboxilo-terminal (INN-368) de la PRL. **(B)** Western blot de proteínas con inmunoreactividad tipo PRL en la retina. Extractos retinianos fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo C-1 y procesados para Western blot utilizando los anticuerpos C-1, INN-1 o INN-368. Se indica el peso molecular aparente de los marcadores definidos (MPM) y de las preparaciones referencia de PRL.

Empleando el anticuerpo policlonal C-1 fue posible inmunoprecipitar tres proteínas inmunorreactivas con una movilidad relativa correspondiente a 16, 23 y 46 kDa a partir de extractos de retina de rata (Fig. 4B). Es de suponerse, basado en sus movilidades relativas, que estas proteínas inmunorreactivas correspondan con la Vi, la PRL nativa y un dímero de esta última, respectivamente. El anticuerpo INN-1, selectivo para el extremo amino-terminal de la PRL, detectó a las tres

formas proteicas. Sin embargo, dado que el anticuerpo INN-368 no reconoció a la forma de 16 kDa, se demuestra que ésta corresponde efectivamente a la Vi y por lo tanto carece del extremo carboxilo-terminal de la PRL. El anticuerpo INN-368 no reconoció a la forma de 46 kDa, sugiriendo que en el agregado quedan enmascarados los extremos carboxilo, o bien que se carece de ellos.

El humor vítreo genera Vi a partir de PRL

Para determinar si el humor vítreo procesa a la PRL hacia Vi *in vivo*, inyectamos intravítreamente a la hormona y evaluamos mediante western blot la presencia de Vi en el humor vítreo extraído seis horas después de la inyección (Fig. 5). La selectividad de los anticuerpos se demostró como fue descrito en la sección anterior, y como controles se usaron preparaciones estándar de PRL y Vi (carriles 1, Fig. 5A, B y C). En la muestra de PRL y vítreo se observó una proteína inmunoreactiva de 16 kDa que comigra con el estándar de Vi y que reaccionó con el anticuerpo policlonal y con el monoclonal amino-terminal, pero no con el carboxilo-terminal, lo que la identificó como vasoinhibina (carriles 3, Fig. 5A, B y C). La vasoinhibina no estaba presente en la PRL antes de ser inyectada al vítreo (carriles 2) y no se detectó en las muestras de humor vítreo de ojos previamente inyectados con galardina, un inhibidor de MMPs (carriles 4, Fig. 5A y B)

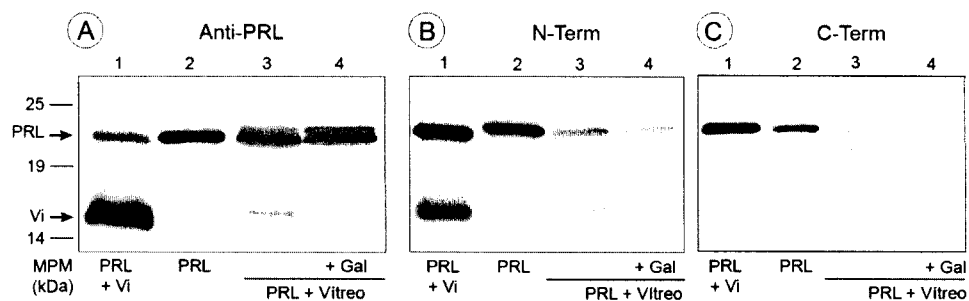


Figura 5. El procesamiento de la PRL inyectada intravitrealmente fue analizado por Western blot revelado con un anticuerpo policlonal (A). La PRL fue procesada a vasoinhibina (Vi) por el humor vítreo (carril 3). El corte enzimático fue bloqueado por galardina (Gal) un inhibidor de las metaloproteasas de la matriz (carril 4). Un control incubado bajo las mismas condiciones que el carril 3 no mostró generación de Vi (carril 2). En el carril 1 se muestra una preparación estándar de PRL y Vi. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra el extremo N-terminal (N-Term) (B) o C-terminal (C-Term) (C) reconocieron los estándares de PRL, sin embargo, el primero reconoció también a la Vi, mientras que el segundo no, confirmando que el fragmento detectado se deriva del extremo N-terminal de la PRL.

Efecto de la inmunoneutralización de las PRLs endógenas sobre la angiogénesis retiniana

Con el propósito de determinar el papel funcional que desempeñan las PRLs retinianas sobre el lecho vascular, estudiamos los efectos de la inmunoneutralización de estas proteínas. Inicialmente abordamos esta pregunta con una aproximación de inmunización pasiva, mediante el uso de anticuerpos anti-PRL administrados por vía intravitreal (Fig. 6). La inyección tanto del anticuerpo policlonal C-1, como del anticuerpo monoclonal INN-1, resultaron en un incremento en el crecimiento de vasos sanguíneos en la retina interna (Fig. 6B y 6D) en comparación con retinas inyectadas con anticuerpos preinmunes (Fig. 6A y 6C) o con el vehículo (PBS). El número de vasos sanguíneos y el área capilar aumentaron tres veces por la inmunización pasiva con ambos anticuerpos ($p < 0.05$; Fig. 6E y 6F). Por el contrario, la inyección intravitreal del anticuerpo

monoclonal INN-368, selectivo para un epítipo ubicado en el extremo carboxilo terminal de la molécula nativa de PRL, no mostró efecto sobre la neovascularización de la retina (Fig. 6E y 6F).

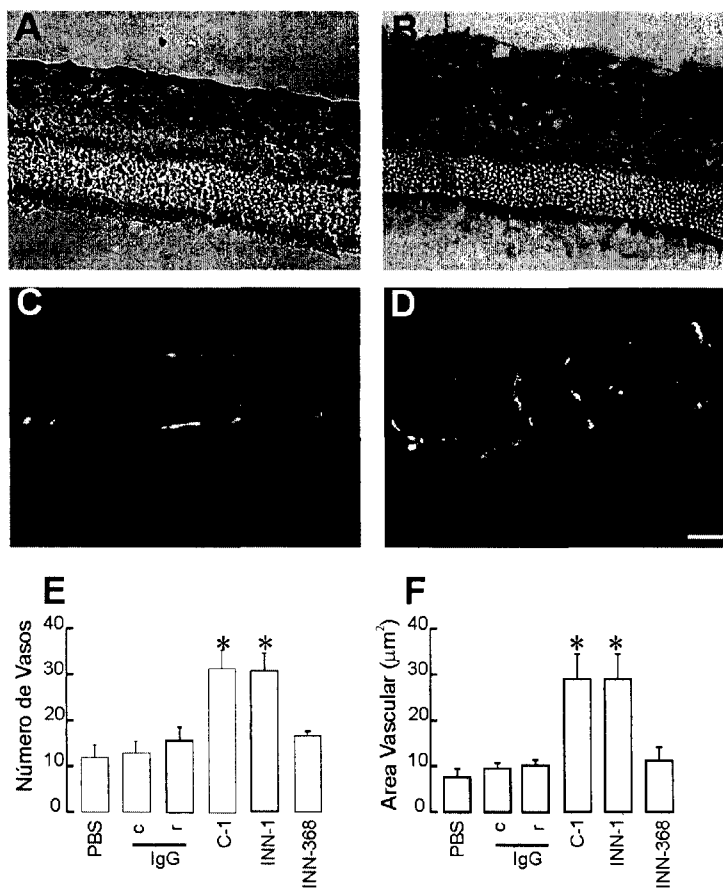


Figura 6. Inducción de angiogénesis retiniana por la inyección intravitreal de anticuerpos dirigidos contra PRL. Retinas representativas tratadas con anticuerpos control purificados de suero de conejo (IgGc) (A) o con el anticuerpo policlonal dirigido contra PRL C-1 (B). Los vasos retinianos fueron marcados utilizando anticuerpos dirigidos contra el marcador específico del endotelio PECAM-1, que a su vez fueron revelados utilizando anticuerpos secundarios acoplados a biotina y la reacción avidina-biotina-peroxidasa. Retinas representativas tratadas con anticuerpos control purificados de suero normal de ratón (IgGr) (C) o con el anticuerpo monoclonal anti-PRL INN-1 (D). Los vasos sanguíneos fueron marcados con anticuerpos fluorescentes (Alexa Fluor 488). Número de vasos (E) y área vascular (F) en retinas inyectadas con PBS, IgGc, IgGr, C-1, INN-1 o INN-

368. Los valores representan el promedio \pm error estándar de cuatro experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. tratamiento con anticuerpos control. Escala: 50 μm .

Efecto de la regulación negativa del ARN mensajero de PRL sobre la angiogénesis y la vasodilatación de la retina

Llevamos a cabo un segundo paradigma de eliminación de las PRLs endógenas, mediante la regulación negativa del ARN mensajero a través de la inyección de ARNi en el humor vítreo. Empleando RT-PCR, confirmamos la capacidad del ARNi para abatir la concentración del ARN mensajero de PRL al cabo de seis días. La inyección del ARNi específico para PRL, abatió la expresión del ARN mensajero de la hormona en comparación con el efecto de inyectar el ARNi específico para la proteína verde fluorescente (GFP) o el vehículo (Fig. 7A). Las retinas expuestas a la acción del ARNi de PRL sufrieron un incremento significativo de la neovascularización, triplicándose tanto el número de vasos sanguíneos como el área vascular en comparación con las retinas tratadas ya sea con el ARNi de GFP o con el vehículo (Fig. 7B y 7D). Además, en los ojos tratados con el ARNi de PRL, se observó un incremento en el diámetro capilar, indicativo de un efecto vasodilatador (Fig. 7C).

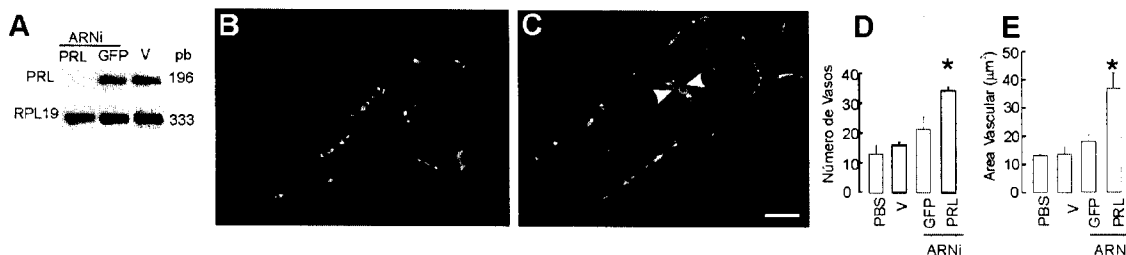


Figura 7. Inducción de angiogénesis retiniana por la inhibición de la expresión de PRL en la retina lograda mediante la administración intravitreal de ARNi PRL. **(A)** Análisis por RT-PCR de la expresión del ARN mensajero de la PRL en retinas pretratadas por 6 días con ARNi-PRL, ARNi-GFP o vehículo (V). La amplificación del gen de la proteína ribosomal L19 (RPL19) fue usada como control. Los vasos sanguíneos fueron marcados en retinas inyectadas con ARNi GFP **(B)** o ARNi PRL **(C)**. El número de vasos sanguíneos **(D)** y el área vascular **(E)** se cuantificó y expresó como el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. el tratamiento con ARNi-GFP. Las flechas señalan vasos dilatados. Escala: 50 μm .

Para cuantificar estos cambios en vasodilatación, se obtuvieron imágenes de la vasculatura retiniana en preparaciones planas. Los ojos inyectados con el ARNi de la GFP no mostraron cambios en la arquitectura vascular (Fig. 8A), mientras que aquellos inyectados con el ARNi de PRL mostraron un aumento en el calibre de los vasos sanguíneos (Fig. 8B). La diferencia en calibre fue de aproximadamente el 32% (Fig. 8C).



Figura 8. Vasodilatación retiniana inducida por la inyección intravitreal de ARNi de PRL. (A-B) Montaje plano de retinas completas previamente tratadas por 6 días con ARNi GFP (A) o con ARNi PRL (B). Las flechas señalan el diámetro de los capilares. (C) El índice de aumento está dado por la razón del diámetro capilar en los montajes planos de retinas de los tres grupos experimentales sobre el de aquellas tratadas con PBS. Los resultados son el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ vs. retinas tratadas con ARNi GFP. Escala: 300 μ m.

Las vasoinhibinas bloquean el efecto del VEGF sobre la vasopermeabilidad y la vasodilatación retiniana

El efecto a corto plazo (24 horas) de la inyección intravitreal de VEGF solo o en combinación con Vi se evaluó sobre montajes planos de retina teñidos para vasos sanguíneos (Fig. 9). Los ojos inyectados con el vehículo mostraron una vasculatura normal (Fig. 9A), mientras que en los ojos tratados con VEGF se observaron múltiples acúmulos de eritrocitos extravasados asociados a microaneurismas y hemorragias, alteraciones que son indicativas de un aumento en la vasopermeabilidad (Fig. 9A). Además, el tratamiento con VEGF resultó en un incremento del diámetro vascular, tanto de los vasos mayores como de los capilares sanguíneos. En los capilares, la vasodilatación inducida por el VEGF permitió la distribución en rosario de los eritrocitos, en comparación con el grupo control, donde los eritrocitos adoptaron una forma alargada (Fig. 9B). La cuantificación de estas diferencias en seis experimentos independientes mostró que el tratamiento con VEGF aumentó ocho veces la vasopermeabilidad (Fig. 9C) y 40% la vasodilatación retinal (Fig. 9D). Las Vi administradas en combinación con el VEGF redujeron cuatro veces su efecto sobre la vasopermeabilidad y bloquearon su acción vasodilatadora (Fig. 9A-D).

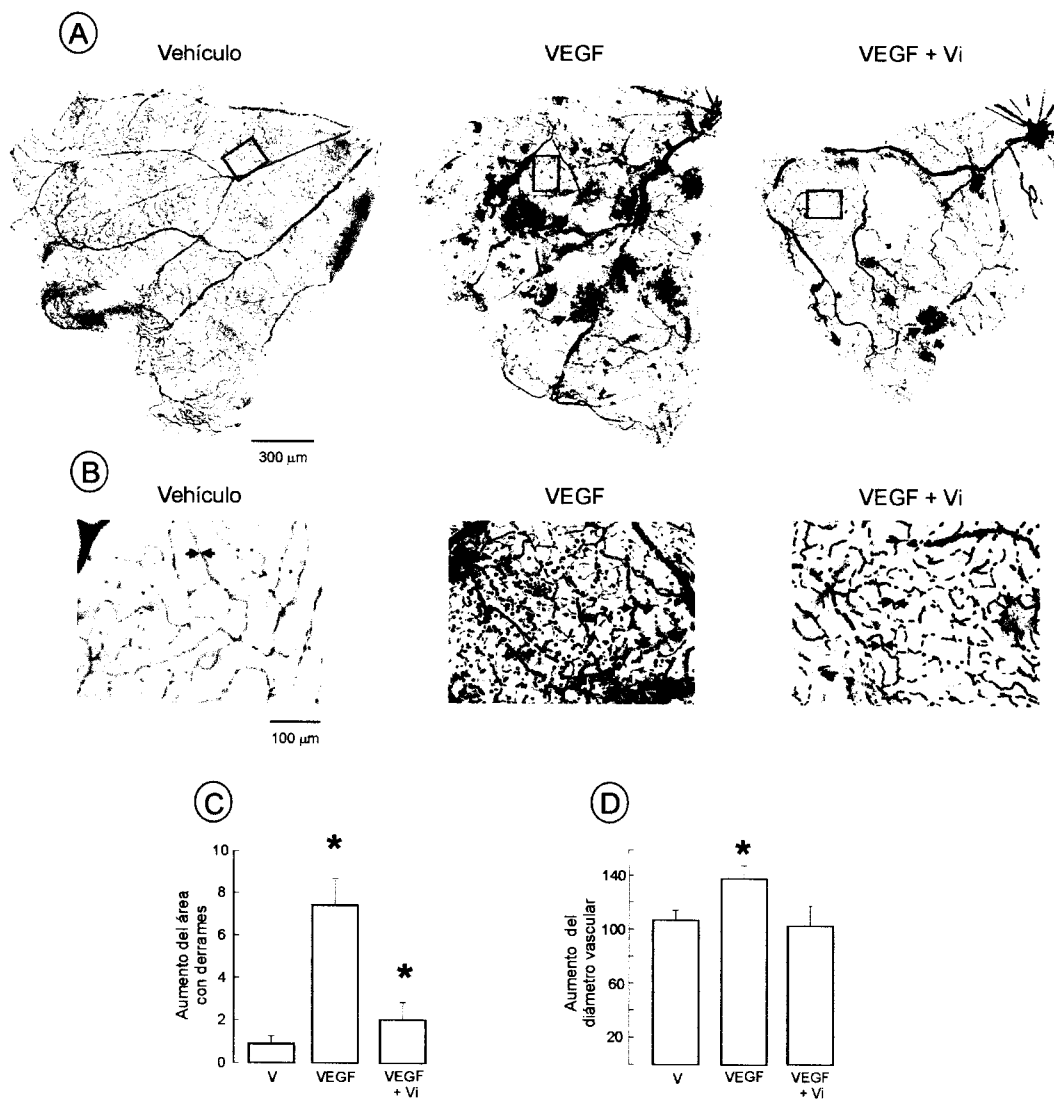


Figura 9. Montaje plano de retinas teñidas para vasos sanguíneos provenientes de ojos inyectados por 24h. con vehículo, VEGF o VEGF + Vi. Las flechas indican las áreas de extravasación de eritrocitos (derrames). **(B)** Amplificación de los recuadros señalados en **(A)**, para ilustrar los cambios de vasodilatación en la microcirculación. Las flechas marcan el diámetro vascular. **(C)** Índice de aumento del área de los derrames de los grupos experimentales con respecto al control inyectado con el vehículo (V). **(D)** Relación del aumento del diámetro vascular de los grupos experimentales con respecto al control. Los resultados de **(C)** y **(D)** son el promedio \pm error estándar de 6 retinas independientes. * $p < 0.05$ vs. VEGF.

Las vasoinhibinas reducen la activación inducida por VEGF de las sintasas de óxido nítrico

Los efectos del VEGF sobre el endotelio son mediados a través del óxido nítrico producido por la eNOS. Para determinar si la inhibición por Vi de los efectos vasculares del VEGF podrían implicar la inhibición de la actividad de la eNOS, evaluamos la actividad global de las NOS inducida por la inyección intravitreal de VEGF en presencia y ausencia de Vi. Los resultados mostraron que el VEGF produce un incremento del ~37% en la actividad de las NOS en la retina (Figura 11). En presencia de la Vi, este efecto es bloqueado y la actividad de las sintasas decae a niveles comparables a los controles tratados solamente con el vehículo (PBS) o con Vi.

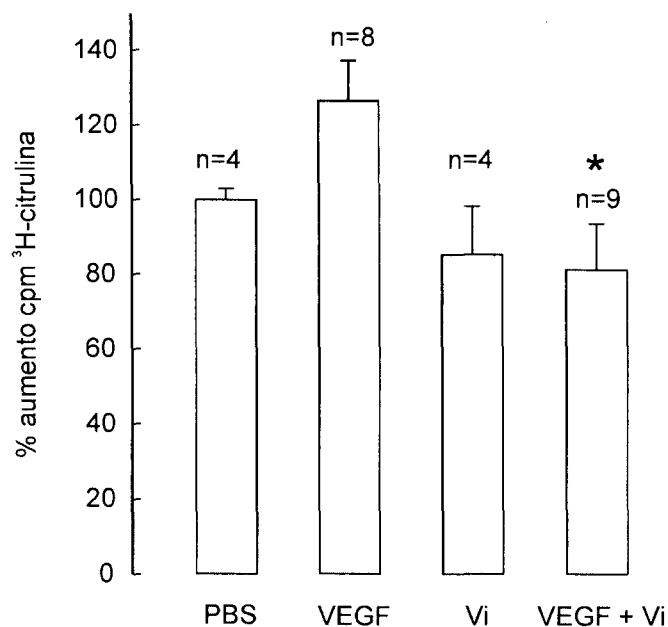


Figura 11. Análisis de la actividad de NOS por el método de ³H-citruilina. El VEGF intravitreal produjo un aumento del 30% en la actividad global de las sintasas comparado con el grupo control inyectado con PBS. En contraste, la administración de Vi no produjo cambios significativos en el nivel de actividad de las enzimas. Más aún, la Vi bloqueó el efecto del VEGF reduciendo la actividad de las NOS a niveles comparables con los controles.

viii. Discusión

A pesar de los avances médicos las retinopatías vasoproliferativas son la principal causa de ceguera a nivel mundial (4, 130). Entre los niños y los ancianos, la retinopatía del prematuro y la degeneración macular asociada a la edad, respectivamente, son las de mayor incidencia (4, 129, 130, 132). Sin embargo, la retinopatía diabética ocupa un lugar destacado, no solo por su alta prevalencia sino también por el rápido incremento en su incidencia (129, 132). El edema macular asociado con un incremento en la vasopermeabilidad, está estrechamente asociado a la pérdida de la vista y antecede a la etapa neovascular de la enfermedad (129, 132). La opción terapéutica actual, la fotocoagulación con láser reduce considerablemente la visión periférica y nocturna. Más aún, aunque este tratamiento es relativamente efectivo en cerca del 50% de los casos para tratar la proliferación de neovasos retinianos (4, 126, 130), el edema macular producido por la diabetes no tiene un tratamiento efectivo y es una de las necesidades médicas menos atendidas de los pacientes diabéticos (66, 87, 135, 183). De esto se colige la clara necesidad y pertinencia de desarrollar alternativas más eficaces y menos dañinas para el tratamiento y control de la retinopatía diabética. El impacto potencial de un tratamiento efectivo puede apreciarse considerando que, por una parte el número de diabéticos ha alcanzado un nivel récord (12% de la población mundial), y que este continúa en aumento. Prácticamente todos los pacientes con diabetes tipo 1 (98%) y el 60% de aquellos con diabetes tipo 2 desarrollan la retinopatía diabética y el edema macular. En los Estados Unidos cerca de 700,000 pacientes padecen la primera enfermedad y 500,000 presentan edema. Además, cerca de 63,000 y 56,000 individuos respectivamente, desarrollan estas complicaciones anualmente (4, 130-132). Dado que estos padecimientos se presentan cuando se altera el equilibrio a favor de los factores angiogénicos oculares por sobre los factores inhibidores de la angiogénesis (87, 89, 157, 184), los factores antiangiogénicos oculares revisten un gran potencial para el desarrollo de agentes terapéuticos capaces de prevenir o corregir dichas patologías (79, 156, 161, 162, 185). Se han descrito varios

inhibidores endógenos de la angiogénesis ocular (66, 67, 161, 186), algunos de los cuales son el resultado del procesamiento proteolítico de precursores inactivos de mayor tamaño (40, 66, 68, 161, 185). En este trabajo se presentan evidencias de que la vasoinhibina de 16 kDa resultado del procesamiento proteolítico de la PRL es uno de los factores antiangiogénicos de la retina, y de que desempeña un papel funcional crítico en el mantenimiento del estado de reposo en que se encuentra la vasculatura local.

Nuestros resultados muestran que el ARNm de la hormona prolactina se expresa en la retina, especialmente en la capa nuclear externa. En esta zona se localizan los cuerpos de los fotorreceptores, y en la retina sana es una región avascular en la que se concentran otros inhibidores de la angiogénesis (4, 186). A juzgar por los resultados de la hibridación *in situ*, la PRL se expresa más débilmente en zonas vasculares de la retina como son la capa de las células ganglionares y la capa nuclear interna. Estos hallazgos sugieren que los fotorreceptores son la principal fuente de PRL retiniana. Si bien la localización celular de la producción de PRL en la retina vascular requiere mayor investigación, probablemente el endotelio vascular participa en la síntesis de esta hormona, dado que células endoteliales aisladas de capilares de retina de rata mantenidas en cultivo sintetizan y secretan PRL (178), y los vasos sanguíneos de las membranas fibrovasculares retrolenticulares de pacientes con retinopatía del prematuro expresan el ARN mensajero de esta hormona (115).

El ARN mensajero que fue amplificado de la retina por medio de RT-PCR, tiene un tamaño equivalente al que codifica para la PRL nativa. Sin embargo, el análisis por Western blot de las PRLs retinianas reveló tres entidades discretas con movilidades electroforéticas relativas correspondientes a 16, 23 y 46 kDa. Estos resultados demuestran que en la retina, al igual que lo que ocurre en otros tejidos donde se expresa el gen de la PRL (116, 187), se generan variantes moleculares de la PRL por medio de modificaciones postraduccionales, y no por procesamiento alternativo del ARN mensajero. De acuerdo con su peso molecular aparente, la proteína de 23 kDa podría corresponder a la PRL nativa, mientras que la proteína de 46 kDa probablemente representa un dímero formado por dos

moléculas de PRL nativa, como los que se han detectado en otros tejidos productores de la hormona (116). Finalmente, la proteína inmunoreactiva de 16 kDa detectada en la retina parece corresponder al fragmento amino-terminal de la PRL, a juzgar por su afinidad con el anticuerpo INN-1 que es selectivo a un epítipo ubicado en el extremo amino de la PRL, pero no con el anticuerpo INN-368 que reconoce el extremo carboxilo. La determinación de la naturaleza de este fragmento 16K es relevante, ya que se ha demostrado que el procesamiento proteolítico de la PRL por trombina genera un fragmento carboxilo terminal de 16kDa (aminoácidos 55-199) que carece de actividad antiangiogénica (99).

El siguiente paso en nuestro trabajo fue determinar si las MMP son responsables de la generación de la vasoinhibina en la retina. Se sabe que varias MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 y MMP-13) convierten parcialmente a la PRL en vasoinhibina (95), que las MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 están presentes en el humor vítreo y que su concentración puede aumentar durante la retinopatía diabética (188). Con este propósito inyectamos intravítreamente a la PRL en la presencia o ausencia de GM-6001, un inhibidor de amplio espectro de las MMP y observamos que la PRL es modificada hacia Vi por el humor vítreo, y que dicho inhibidor bloquea dicho procesamiento. Por lo tanto, concluimos que MMPs presentes en el humor vítreo participan en la generación de las Vi locales.

El hallazgo de que la PRL es sintetizada en la retina y que esta puede ser procesada hacia Vi, sugiere que esta última es parte del grupo retiniano de inhibidores fisiológicos de la angiogénesis. En apoyo a esta hipótesis, encontramos que la inmunización pasiva que resulta de la inhibición de las prolactinas retinianas, triplicó el número de vasos sanguíneos y el área capilar de la retina interna. Esta acción se debe a la inmunoneutralización de las Vi endógenas, ya que los anticuerpos que no las reconocen carecieron de efecto. El hecho de que la inmunoneutralización de las Vi induce una fuerte respuesta angiogénica en la retina sugiere que esta molécula es un inhibidor crucial de la angiogénesis en este tejido. En apoyo al papel supresor de las Vi sobre la angiogénesis retiniana, encontramos que la inyección intravítrea de ARNi dirigidos

contra la PRL estimularon la neovascularización. La inhibición de la expresión de la PRL empleando esta metodología resultó en una respuesta neovascular semejante a la observada con los anticuerpos anti-PRL, sugiriendo que ambos métodos tienen una eficacia similar para bloquear las acciones anti-angiogénicas de la Vi. Sin embargo, a diferencia de los experimentos con anticuerpos, la inyección intravitreal de ARNi indujo también a un incremento significativo (32%) en el diámetro de los vasos sanguíneos. El incremento en el calibre vascular es semejante al inducido por la expresión de VEGF mediante un vector adenoviral en la retina del ratón (134), y sugiere que la PRL o las moléculas derivadas de ella ejercen un poderoso efecto vasoconstrictor en la vasculatura retiniana.

La falta de efecto vasodilatador de los anticuerpos en contraste con el del ARNi es intrigante. Dado que la acción del ARNi es pretraduccional, la vasodilatación podría ser el reflejo de la inhibición colectiva de todas las especies de PRL. Sin embargo, la Vi retiniana podría ser la PRL vasoconstrictora más potente, ya que este fragmento molecular, pero no la PRL nativa, inhibe la activación de la isoforma endotelial de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) inducida por bradicinina y acetilcolina (98). Esta acción de la Vi lleva a la inhibición de la vasodilatación, a juzgar por el reporte de que la Vi bloquea la relajación dependiente de endotelio de segmentos aislados de aorta y de vasos coronarios de rata en respuesta a acetilcolina y bradicinina (98). Debido a que la Vi inhibe la activación de eNOS con mayor eficacia que la proliferación de células endoteliales (0.1 vs 1 nM, respectivamente) (98), es posible que solo se pueda observar la inhibición de la vasodilatación en condiciones que produzcan un bloqueo muy eficaz de su síntesis, como ocurre con el tratamiento con ARNi.

El incremento tanto del diámetro como de la permeabilidad vascular, están estrechamente vinculados con el establecimiento de la angiogénesis y al edema macular (183, 189) . Por un lado la vasodilatación es el primer paso del proceso angiogénico, el cual al ser acompañado por un aumento de la permeabilidad y la degradación de la matriz extracelular, favorece la migración y proliferación del endotelio. De hecho, la dilatación de los vasos sanguíneos de la retina es una de las primeras y más frecuentes manifestaciones de la retinopatía diabética (132,

183, 189), y tiene lugar en respuesta al VEGF, que es el factor más potente de inducción de angiogénesis en la retina (126, 139). El edema macular puede presentarse en cualquier etapa de la retinopatía diabética, si bien su incidencia se incrementa con la duración de la diabetes y la severidad de la retinopatía. Esta condición se caracteriza por una vasopermeabilidad exacerbada así como por la pérdida de la integridad de las uniones estrechas del endotelio, permitiendo la difusión de proteínas séricas y de lípidos al espacio intra-vitreal.

Los resultados obtenidos muestran que la inyección intravitreal de Vi bloquea totalmente los efectos vasodilatadores del VEGF y reduce 4 veces el incremento en la vasopermeabilidad inducido por este factor en la retina. Estas acciones de las Vi son consistentes con su efecto inhibitorio sobre la activación de eNOS en respuesta al VEGF (98), que es el mecanismo por el cual el VEGF induce la vasodilatación y estimula la vasopermeabilidad. En apoyo a esta hipótesis, la co-administración de Vi con VEGF resulta en una reducción a niveles basales de la producción de NO evaluado por el método de citrulina tritiada. El hecho de que las Vi interfieran con ambos efectos del VEGF, las señala como candidatos potenciales capaces de contrarrestar estos cambios durante la retinopatía diabética no proliferativa. Pero además, las Vi también pueden interferir con los efectos vasoproliferativos y antiapoptóticos del VEGF y de otros factores angiogénicos. Las Vi inhiben la proliferación de células endoteliales en cultivo inducida por el VEGF y por el FGF (96), y promueven la apoptosis de los vasos retinales (115), a través de acciones proapoptóticas directas sobre las células endoteliales (102). Por lo tanto, la acción protectora de las Vi podría extenderse a las diferentes fases de la retinopatía diabética y ser efectiva para bloquear los efectos de diversos factores angiogénicos.

Los resultados del presente trabajo sugieren que la Vi ocupa una posición clave previniendo la angiogénesis en la retina del adulto. Esta función antiangiogénica crucial es consistente con observaciones de que la Vi es efectiva antagonizando diversos inductores de la angiogénesis ocular como el VEGF y el bFGF (113, 185). De hecho, la Vi también es efectiva antagonizando la angiogénesis retiniana inducida por isquemia (185). La caída en la expresión de la

PRL podría ser un factor que contribuya a la progresión de las retinopatías vasoproliferativas. En la mayoría de las situaciones, la angiogénesis ocular es activada por isquemia (una baja en la concentración de oxígeno), la cual se sabe regula positiva y negativamente a estimuladores e inhibidores de la angiogénesis, respectivamente (11, 190). Se ha demostrado que la hipoxia disminuye la síntesis de PRL y su conversión a Vi mediada por catepsina D, en células tumorales de hipófisis de rata (190). Además, se ha correlacionado la presencia de Vi con la involución de membranas fibrovasculares en pacientes con retinopatía del prematuro, y se propuso que podrían participar en detener el proceso angiogénico a través de inducir apoptosis de las células endoteliales (115). Es sabido que este padecimiento involuciona espontáneamente en un número importante de casos debido a la regresión vía apoptosis de los neovasos oculares (115, 133, 163). El papel de la Vi en la regresión vascular se apoya en sus propiedades proapoptóticas (102), y en la observación de que la administración intravitreal de anticuerpos anti-PRL en ratas neonatales causa una reducción importante en la apoptosis de la vasculatura hialoidea (115), una red transitoria de vasos intraoculares fetales que en la rata normalmente sufren regresión espontánea después del nacimiento.

Las Vi oculares podrían derivarse no solo del procesamiento proteolítico de la PRL ocular, sino también de aquella de origen sistémico, importada al ojo por un mecanismo de captura activa (115). Se ha demostrado la incorporación de PRL marcada radiactivamente e inyectada en la circulación sistémica en diversos tejidos oculares incluyendo la retina, la coroides y los cuerpos ciliares (191). En este sentido, se ha reportado que la concentración sanguínea de PRL se encuentra elevada en pacientes con retinopatía del prematuro (115). Además es interesante señalar que la leche materna reduce la incidencia de retinopatía del prematuro (173), lo cual podría tener relación con las altas concentraciones de PRL presentes en la leche materna (192), la cual se sabe tiene acceso a la circulación sistémica del lactante (174), de donde su importación al ojo le permitiría ser procesada hacia Vi con propiedades antiangiogénicas y proapoptóticas (115).

En conclusión, en el presente estudio se demuestra que en la retina se expresa y se sintetiza la PRL la cual es procesada post-traduccionamente a Vi por la acción de las MMP intraoculares. Las Vi deprimen de forma tónica la angiogénesis y la vasodilatación. Estos efectos parecen estar mediados por la capacidad de estos fragmentos de la PRL de reducir la actividad de eNOS. En apoyo a lo anterior, encontramos que las Vi bloquean de manera eficiente los incrementos en el diámetro vascular y en la vasopermeabilidad que son inducidos por la administración intravitreal de VEGF. Estos hallazgos abren la posibilidad de considerar a la PRL y sus variantes moleculares como herramientas potenciales para el tratamiento de las retinopatías vasoproliferativas.

BIBLIOGRAFIA

1. Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9:653-660.
2. Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395.
3. Folkman, J. 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 3:643-651.
4. Gariano, R.F., and Gardner, T.W. 2005. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438:960-966.
5. Das, A., and McGuire, P.G. 2003. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res* 22:721-748.
6. Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936.
7. Beck, L.A.D.A., PA. 1997. Vascular development: cellular and molecular regulation. *Faseb J* 11:365-373.
8. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439.
9. Ferrara, N. 1999. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56:794-814.
10. Hanahan, D., and Folkman, J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.
11. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604-4613.
12. Dahr, S.S., Cusick, M., Rodriguez-Coleman, H., Srivastava, S.K., Thompson, D.J., Linehan, W.M., Ferris, F.L., 3rd, and Chew, E.Y. 2007. Intravitreal Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy with Pegaptanib for Advanced Von Hippel-Lindau Disease of the Retina. *Retina* 27:150-158.
13. Zimmer, M., Doucette, D., Siddiqui, N., and Iliopoulos, O. 2004. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL-/- tumors. *Mol Cancer Res* 2:89-95.
14. Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-676.
15. Clauss, M. 1998. Functions of the VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *Trends Cardiovasc Med* 8:241-245.
16. Wang, H., and Keiser, J.A. 1998. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res* 83:832-840.
17. Kroon, M.E., Koolwijk, P., van der Vecht, B., and van Hinsbergh, V.W. 2000. Urokinase receptor expression on human microvascular endothelial cells is

- increased by hypoxia: implications for capillary-like tube formation in a fibrin matrix. *Blood* 96:2775-2783.
18. Lakka, S.S., Gondi, C.S., Yanamandra, N., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M., and Rao, J.S. 2003. Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res* 63:2454-2461.
 19. Zachary, I. 2003. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 31:1171-1177.
 20. Sellke, F.W., Wang, S.Y., Stamler, A., Lopez, J.J., Li, J., Li, J., and Simons, M. 1996. Enhanced microvascular relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium. *Am J Physiol* 271:H713-720.
 21. Laham, R.J., Li, J., Tofukuji, M., Post, M., Simons, M., and Sellke, F.W. 2003. Spatial heterogeneity in VEGF-induced vasodilation: VEGF dilates microvessels but not epicardial and systemic arteries and veins. *Ann Vasc Surg* 17:245-252.
 22. Weis, S.M., and Cheresh, D.A. 2005. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437:497-504.
 23. Bates, D.O., Lodwick, D., and Williams, B. 1999. Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation* 6:83-96.
 24. Kevil, C.G., Payne, D.K., Mire, E., and Alexander, J.S. 1998. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 273:15099-15103.
 25. Zanetti, A., Lampugnani, M.G., Balconi, G., Breviario, F., Corada, M., Lanfrancone, L., and Dejana, E. 2002. Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:617-622.
 26. Lampugnani, M.G., Orsenigo, F., Gagliani, M.C., Tacchetti, C., and Dejana, E. 2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 174:593-604.
 27. Ando, A., Yang, A., Mori, K., Yamada, H., Yamada, E., Takahashi, K., Saikia, J., Kim, M., Melia, M., Fishman, M., et al. 2002. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol* 191:116-124.
 28. Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C.O., Buerk, D.G., Huang, P.L., and Jain, R.K. 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2604-2609.
 29. Tolentino, M.J., Miller, J.W., Gragoudas, E.S., Jakobiec, F.A., Flynn, E., Chatzistefanou, K., Ferrara, N., and Adamis, A.P. 1996. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 103:1820-1828.
 30. Tilton, R.G., Chang, K.C., LeJeune, W.S., Stephan, C.C., Brock, T.A., and Williamson, J.R. 1999. Role for nitric oxide in the hyperpermeability and

- hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:689-696.
31. Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J.A., and Sessa, W.C. 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100:3131-3139.
 32. Urbich, C., Reissner, A., Chavakis, E., Dernbach, E., Haendeler, J., Fleming, I., Zeiher, A.M., Kaszkin, M., and Dimmeler, S. 2002. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *Faseb J* 16:706-708.
 33. Brooks, S.E., Gu, X., Samuel, S., Marcus, D.M., Bartoli, M., Huang, P.L., and Caldwell, R.B. 2001. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:222-228.
 34. Wang, L., Dittmer, D.P., Tomlinson, C.C., Fakhari, F.D., and Damania, B. 2006. Immortalization of primary endothelial cells by the K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer Res* 66:3658-3666.
 35. Wang, Y., Chang, J., Li, Y.C., Li, Y.S., Shyy, J.Y., and Chien, S. 2004. Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H685-692.
 36. Kanda, S., Tomasini-Johansson, B., Klint, P., Dixelius, J., Rubin, K., and Claesson-Welsh, L. 1999. Signaling via fibroblast growth factor receptor-1 is dependent on extracellular matrix in capillary endothelial cell differentiation. *Exp Cell Res* 248:203-213.
 37. Kang, H.B., Kim, J.S., Kwon, H.J., Nam, K.H., Youn, H.S., Sok, D.E., and Lee, Y. 2005. Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1. *Stem Cells Dev* 14:395-401.
 38. Donnini, S., Solito, R., Giachetti, A., Granger, H.J., Ziche, M., and Morbidelli, L. 2006. Fibroblast growth factor-2 mediates Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angiogenesis in coronary endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 319:515-522.
 39. Drinane, M., Walsh, J., Mollmark, J., Simons, M., and Mulligan-Kehoe, M.J. 2006. The anti-angiogenic activity of rPAI-1(23) inhibits fibroblast growth factor-2 functions. *J Biol Chem* 281:33336-33344.
 40. Eriksson, K., Magnusson, P., Dixelius, J., Claesson-Welsh, L., and Cross, M.J. 2003. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett* 536:19-24.
 41. Dell'Era, P., Mohammadi, M., and Presta, M. 1999. Different tyrosine autophosphorylation requirements in fibroblast growth factor receptor-1 mediate urokinase-type plasminogen activator induction and mitogenesis. *Mol Biol Cell* 10:23-33.
 42. Pintucci, G., Yu, P.J., Sharony, R., Baumann, F.G., Saponara, F., Frasca, A., Galloway, A.C., Moscatelli, D., and Mignatti, P. 2003. Induction of stromelysin-1 (MMP-3) by fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in FGF-2/- microvascular endothelial cells requires prolonged activation of extracellular signal-regulated kinases-1 and -2 (ERK-1/2). *J Cell Biochem* 90:1015-1025.

43. Khalil, N., Xu, Y.D., O'Connor, R., and Duronio, V. 2005. Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK. *J Biol Chem* 280:43000-43009.
44. Tonnesen, M.G., Feng, X., and Clark, R.A. 2000. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5:40-46.
45. El-Hariry, I., Pignatelli, M., and Lemoine, N.R. 2001. FGF-1 and FGF-2 regulate the expression of E-cadherin and catenins in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 94:652-661.
46. Poole, T.J., Finkelstein, E.B., and Cox, C.M. 2001. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 220:1-17.
47. Rundhaug, J.E. 2005. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9:267-285.
48. Prager, G.W., Breuss, J.M., Steurer, S., Olcaydu, D., Mihaly, J., Brunner, P.M., Stockinger, H., and Binder, B.R. 2004. Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. *Circ Res* 94:1562-1570.
49. Prager, G.W., Breuss, J.M., Steurer, S., Mihaly, J., and Binder, B.R. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood* 103:955-962.
50. Offersen, B.V., Pfeiffer, P., Andreasen, P., and Overgaard, J. 2007. Urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in nonsmall-cell lung cancer: Relation to prognosis and angiogenesis. *Lung Cancer*.
51. Carmeliet, P., and Jain, R.K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257.
52. Im, E., and Kazlauskas, A. 2007. The role of cathepsins in ocular physiology and pathology. *Exp Eye Res* 84:383-388.
53. Sheu, J.R., Yen, M.H., Kan, Y.C., Hung, W.C., Chang, P.T., and Luk, H.N. 1997. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. *Biochim Biophys Acta* 1336:445-454.
54. Gasparini, G., Brooks, P.C., Biganzoli, E., Vermeulen, P.B., Bonoldi, E., Dirix, L.Y., Ranieri, G., Miceli, R., and Cheresch, D.A. 1998. Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 4:2625-2634.
55. Konttinen, Y.T., Mackiewicz, Z., Povilenaite, D., Sukura, A., Hukkanen, M., and Virtanen, I. 2004. Disease-associated increased HIF-1, alphavbeta3 integrin, and Flt-1 do not suffice to compensate the damage-inducing loss of blood vessels in inflammatory myopathies. *Rheumatol Int* 24:333-339.
56. Nicolaou, K.C., Trujillo, J.I., Jandeleit, B., Chibale, K., Rosenfeld, M., Diefenbach, B., Cheresch, D.A., and Goodman, S.L. 1998. Design, synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists. *Bioorg Med Chem* 6:1185-1208.

57. Mousa, S.A., O'Connor, L.J., Bergh, J.J., Davis, F.B., Scanlan, T.S., and Davis, P.J. 2005. The proangiogenic action of thyroid hormone analogue GC-1 is initiated at an integrin. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:356-360.
58. Cai, W., and Chen, X. 2006. Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism. *Anticancer Agents Med Chem* 6:407-428.
59. Murillo, C.A., Rychahou, P.G., and Evers, B.M. 2004. Inhibition of alpha5 integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Surgery* 136:143-149.
60. Kawaguchi, T., Yamashita, Y., Kanamori, M., Endersby, R., Bankiewicz, K.S., Baker, S.J., Bergers, G., and Pieper, R.O. 2006. The PTEN/Akt pathway dictates the direct alphaVbeta3-dependent growth-inhibitory action of an active fragment of tumstatin in glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 66:11331-11340.
61. Duxbury, M.S., Ito, H., Benoit, E., Waseem, T., Ashley, S.W., and Whang, E.E. 2005. RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance. *Clin Cancer Res* 11:3433-3438.
62. Folkman, J. 1995. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol Med* 1:120-122.
63. Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.
64. D'Amore, P.A., and Ng, Y.S. 2002. Tales of the cryptic: unveiling more angiogenesis inhibitors. *Trends Mol Med* 8:313-315.
65. Cao, Y., Cao, R., and Veitonmaki, N. 2002. Kringle structures and antiangiogenesis. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2:667-681.
66. Shyong, M.P., Lee, F.L., Kuo, P.C., Wu, A.C., Cheng, H.C., Chen, S.L., Tung, T.H., and Tsao, Y.P. 2007. Reduction of experimental diabetic vascular leakage by delivery of angiostatin with a recombinant adeno-associated virus vector. *Mol Vis* 13:133-141.
67. Koshida, R., Ou, J., Matsunaga, T., Chilian, W.M., Oldham, K.T., Ackerman, A.W., and Pritchard, K.A., Jr. 2003. Angiostatin: a negative regulator of endothelial-dependent vasodilation. *Circulation* 107:803-806.
68. Marneros, A.G., and Olsen, B.R. 2005. Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *Faseb J* 19:716-728.
69. Schmidt, A., Wenzel, D., Thorey, I., Werner, S., Fleischmann, B.K., and Bloch, W. 2005. Endostatin down-regulates soluble guanylate cyclase (sGC) in endothelial cells in vivo: influence of endostatin on vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *Endothelium* 12:251-257.
70. Sudhakar, A., Sugimoto, H., Yang, C., Lively, J., Zeisberg, M., and Kalluri, R. 2003. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4766-4771.
71. Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M.J., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M., and Sukhatme, V.P. 1999. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 274:11721-11726.
72. Salven, P. 2001. Angiogenesis in lymphoproliferative disorders. *Acta Haematol* 106:184-189.

73. Stiver, S.I. 2004. Angiogenesis and its role in the behavior of astrocytic brain tumors. *Front Biosci* 9:3105-3123.
74. Rychkova, N., Stahl, S., Gaetzner, S., and Felbor, U. 2005. Non-heparan sulfate-binding interactions of endostatin/collagen XVIII in murine development. *Dev Dyn* 232:399-407.
75. Rege, T.A., Fears, C.Y., and Gladson, C.L. 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro-oncol* 7:106-121.
76. Fukai, N., Eklund, L., Marneros, A.G., Oh, S.P., Keene, D.R., Tamarkin, L., Niemela, M., Ilves, M., Li, E., Pihlajaniemi, T., et al. 2002. Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. *Embo J* 21:1535-1544.
77. Ylikarppa, R., Eklund, L., Sormunen, R., Kontiola, A.I., Utriainen, A., Maatta, M., Fukai, N., Olsen, B.R., and Pihlajaniemi, T. 2003. Lack of type XVIII collagen results in anterior ocular defects. *Faseb J* 17:2257-2259.
78. Steele, F.R., Chader, G.J., Johnson, L.V., and Tombran-Tink, J. 1993. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1526-1530.
79. Dawson, D.W., Volpert, O.V., Gillis, P., Crawford, S.E., Xu, H., Benedict, W., and Bouck, N.P. 1999. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285:245-248.
80. Tombran-Tink, J., Shivaram, S.M., Chader, G.J., Johnson, L.V., and Bok, D. 1995. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *J Neurosci* 15:4992-5003.
81. Bouck, N. 2002. PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* 8:330-334.
82. Yabe, T., Herbert, J.T., Takanohashi, A., and Schwartz, J.P. 2004. Treatment of cerebellar granule cell neurons with the neurotrophic factor pigment epithelium-derived factor in vitro enhances expression of other neurotrophic factors as well as cytokines and chemokines. *J Neurosci Res* 77:642-652.
83. Pang, I.H., Zeng, H., Fleenor, D.L., and Clark, A.F. 2007. Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells. *BMC Neurosci* 8:11.
84. Cai, J., Jiang, W.G., Grant, M.B., and Boulton, M. 2006. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem* 281:3604-3613.
85. Yamagishi, S., Nakamura, K., Matsui, T., Inagaki, Y., Takenaka, K., Jinnouchi, Y., Yoshida, Y., Matsuura, T., Narama, I., Motomiya, Y., et al. 2006. Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-induced retinal vascular hyperpermeability by blocking reactive oxygen species-mediated vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 281:20213-20220.
86. Zaichuk, T.A., Shroff, E.H., Emmanuel, R., Filleur, S., Nelius, T., and Volpert, O.V. 2004. Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J Exp Med* 199:1513-1522.

87. Zhang, S.X., Wang, J.J., Gao, G., Parke, K., and Ma, J.X. 2006. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *J Mol Endocrinol* 37:1-12.
88. Doll, J.A., Stellmach, V.M., Bouck, N.P., Bergh, A.R., Lee, C., Abramson, L.P., Cornwell, M.L., Pins, M.R., Borensztajn, J., and Crawford, S.E. 2003. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 9:774-780.
89. Ogata, N., Nishikawa, M., Nishimura, T., Mitsuma, Y., and Matsumura, M. 2002. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 134:348-353.
90. Holekamp, N.M., Bouck, N., and Volpert, O. 2002. Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 134:220-227.
91. Quan, G.M., Ojaimi, J., Nadesapillai, A.P., Zhou, H., and Choong, P.F. 2002. Resistance of epiphyseal cartilage to invasion by osteosarcoma is likely to be due to expression of antiangiogenic factors. *Pathobiology* 70:361-367.
92. Quan, G.M., Ojaimi, J., Li, Y., Kartsogiannis, V., Zhou, H., and Choong, P.F. 2005. Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone. *Calcif Tissue Int* 76:146-153.
93. Clapp, C., Gonzalez, C., Macotela, Y., Aranda, J., Rivera, J.C., Garcia, C., Guzman, J., Zamorano, M., Vega, C., Martin, C., et al. 2006. Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res* 35:64-73.
94. Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M.C., and Martinez de la Escalera, G. 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17:301-307.
95. Macotela, Y., Aguilar, M.B., Guzman-Morales, J., Rivera, J.C., Zermeno, C., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Lavalle, C., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 119:1790-1800.
96. Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delure, F., and Weiner, R.I. 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133:1292-1299.
97. Ferrara, N., Clapp, C., and Weiner, R. 1991. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129:896-900.
98. Gonzalez, C., Corbacho, A.M., Eiserich, J.P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Munoz, M., Rubio, R., Lin, S.H., et al. 2004. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 145:5714-5722.
99. Khurana, S., Liby, K., Buckley, A.R., and Ben-Jonathan, N. 1999. Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a

- nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology* 140:4127-4132.
100. Nguyen, N.Q., Tabruyn, S.P., Lins, L., Lion, M., Cornet, A.M., Lair, F., Rentier-Delrue, F., Brasseur, R., Martial, J.A., and Struman, I. 2006. Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14319-14324.
 101. Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J., and Weiner, R.I. 1998. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 139:3696-3703.
 102. Martini, J.F., Piot, C., Humeau, L.M., Struman, I., Martial, J.A., and Weiner, R.I. 2000. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol* 14:1536-1549.
 103. Clapp, C., and Weiner, R.I. 1992. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130:1380-1386.
 104. D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J., and Weiner, R.I. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6374-6378.
 105. Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J.A., Kelly, P.A., and Goffin, V. 2004. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol* 18:2522-2542.
 106. D'Angelo, G., Martini, J.F., Iiri, T., Fantl, W.J., Martial, J., and Weiner, R.I. 1999. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol* 13:692-704.
 107. Tabruyn, S.P., Nguyen, N.Q., Cornet, A.M., Martial, J.A., and Struman, I. 2005. The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases. *Mol Endocrinol* 19:1932-1942.
 108. Macotela, Y., Mendoza, C., Corbacho, A.M., Cosio, G., Eiserich, J.P., Zentella, A., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. 2002. 16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *J Endocrinol* 175:R13-18.
 109. Tabruyn, S.P., Sorlet, C.M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R.I., Martial, J.A., and Struman, I. 2003. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 17:1815-1823.
 110. Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S., and Nicoll, C.S. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133:935-938.

111. Piwnicka, D., Fernandez, I., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P.A., and Goffin, V. 2006. A new mechanism for prolactin processing into 16K PRL by secreted cathepsin D. *Mol Endocrinol* 20:3263-3278.
112. Zermeno, C., Guzman-Morales, J., Macotela, Y., Nava, G., Lopez-Barrera, F., Kouri, J.B., Lavalle, C., de la Escalera, G.M., and Clapp, C. 2006. Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol* 189:R1-8.
113. Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A.M., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., Barrios, F.A., Berger, P., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. 1999. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2498-2505.
114. Corbacho, A.M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., Noris, G., Morales, M.A., Martinez De La Escalera, G., and Clapp, C. 2000. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol* 166:53-62.
115. Duenas, Z., Rivera, J.C., Quiroz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Guerrero, J.L., Suarez, A., et al. 2004. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2049-2055.
116. Fukuoka, H., Hamamoto, R., and Higurashi, M. 1991. Heterogeneity of serum and amniotic fluid prolactin in humans. *Horm Res* 35 Suppl 1:58-63.
117. Corbacho, A.M., Martinez De La Escalera, G., and Clapp, C. 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* 173:219-238.
118. Torner, L., Mejia, S., Lopez-Gomez, F.J., Quintanar, A., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. 1995. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136:5454-5460.
119. Corbacho, A.M., Nava, G., Eiserich, J.P., Noris, G., Macotela, Y., Struman, I., Martinez De La Escalera, G., Freeman, B.A., and Clapp, C. 2000. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem* 275:13183-13186.
120. Warner, M.D., Sinha, Y.N., and Peabody, C.A. 1993. Growth hormone and prolactin variants in normal subjects. Relative proportions in morning and afternoon samples. *Horm Metab Res* 25:425-429.
121. Sinha, Y.N., and Jacobsen, B.P. 1994. Human growth hormone (hGH)-(44-191), a reportedly diabetogenic fragment of hGH, circulates in human blood: measurement by radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1411-1418.
122. Lewis, U.J., Sinha, Y.N., and Lewis, G.P. 2000. Structure and properties of members of the hGH family: a review. *Endocr J* 47 Suppl:S1-8.
123. Kim, J., Luo, W., Chen, D.T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L.Y., and Lin, S.H. 2003. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res* 63:386-393.

124. Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R.I., and Martial, J.A. 1999. 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.
125. Wheatley, C.M., Dickinson, J.L., Mackey, D.A., Craig, J.E., and Sale, M.M. 2002. Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. *Br J Ophthalmol* 86:696-700.
126. Qaum, T., Xu, Q., Jousseaume, A.M., Clemens, M.W., Qin, W., Miyamoto, K., Hasselmann, H., Wiegand, S.J., Rudge, J., Yancopoulos, G.D., et al. 2001. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2408-2413.
127. Keshet, E. 2001. More weapons in the arsenal against ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 107:945-946.
128. Dorrell, M., Uusitalo-Jarvinen, H., Aguilar, E., and Friedlander, M. 2007. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 52 Suppl 1:S3-S19.
129. Cai, J., and Boulton, M. 2002. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* 16:242-260.
130. Adamis, A.P., Aiello, L.P., and D'Amato, R.A. 1999. Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis* 3:9-14.
131. Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., and Cruickshanks, K.J. 1994. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 112:1217-1228.
132. Yam, J.C., and Kwok, A. 2007. Update on the treatment of diabetic retinopathy. *Hong Kong Med J* 13:46-60.
133. Reynolds, J.D. 2001. The management of retinopathy of prematurity. *Paediatr Drugs* 3:263-272.
134. Rakoczy, P.E., Brankov, M., Fonceca, A., Zaknich, T., Rae, B.C., and Lai, C.M. 2003. Enhanced recombinant adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor expression in the adult mouse retina: a potential model for diabetic retinopathy. *Diabetes* 52:857-863.
135. Kristinsson, J.K., Gottfredsdottir, M.S., and Stefansson, E. 1997. Retinal vessel dilatation and elongation precedes diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol* 81:274-278.
136. Tang, J., Mohr, S., Du, Y.D., and Kern, T.S. 2003. Non-uniform distribution of lesions and biochemical abnormalities within the retina of diabetic humans. *Curr Eye Res* 27:7-13.
137. Romeo, G., Liu, W.H., Asnaghi, V., Kern, T.S., and Lorenzi, M. 2002. Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 51:2241-2248.
138. Beauchamp, M.H., Marrache, A.M., Hou, X., Gobeil, F., Jr., Bernier, S.G., Lachapelle, P., Abran, D., Quiniou, C., Brault, S., Peri, K.G., et al. 2002. Platelet-activating factor in vasoobliteration of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3327-3337.

139. Witmer, A.N., Vrensen, G.F., Van Noorden, C.J., and Schlingemann, R.O. 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 22:1-29.
140. Pfeiffer, A., Spranger, J., Meyer-Schwickerath, R., and Schatz, H. 1997. Growth factor alterations in advanced diabetic retinopathy: a possible role of blood retina barrier breakdown. *Diabetes* 46 Suppl 2:S26-30.
141. Lu, M., Amano, S., Miyamoto, K., Garland, R., Keough, K., Qin, W., and Adamis, A.P. 1999. Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:3281-3286.
142. Tolentino, M.J., McLeod, D.S., Taomoto, M., Otsuji, T., Adamis, A.P., and Litty, G.A. 2002. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol* 133:373-385.
143. Ghassemifar, R., Lai, C.M., and Rakoczy, P.E. 2006. VEGF differentially regulates transcription and translation of ZO-1alpha+ and ZO-1alpha- and mediates trans-epithelial resistance in cultured endothelial and epithelial cells. *Cell Tissue Res* 323:117-125.
144. Clermont, A.C., Aiello, L.P., Mori, F., Aiello, L.M., and Bursell, S.E. 1997. Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 124:433-446.
145. Czepluch, F.S., and Waltenberger, J. 2006. Monocyte responsiveness towards different arteriogenic stimuli: a functional comparison of various chemoattractants and their combinations. *Thromb Haemost* 96:857-858.
146. Trikha, M., and Nakada, M.T. 2002. Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy. *Semin Thromb Hemost* 28:39-44.
147. Chiarelli, F., Santilli, F., and Mohn, A. 2000. Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Horm Res* 53:53-67.
148. Frystyk, J. 2005. The growth hormone hypothesis - 2005 revision. *Horm Metab Res* 37 Suppl 1:44-48.
149. Bronson, S.K., Reiter, C.E., and Gardner, T.W. 2003. An eye on insulin. *J Clin Invest* 111:1817-1819.
150. Ruberte, J., Ayuso, E., Navarro, M., Carretero, A., Nacher, V., Haurigot, V., George, M., Llombart, C., Casellas, A., Costa, C., et al. 2004. Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *J Clin Invest* 113:1149-1157.
151. Poulaki, V., Jousen, A.M., Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Iliaki, E.F., and Adamis, A.P. 2004. Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 165:457-469.
152. Rymaszewski, Z., Cohen, R.M., and Chomczynski, P. 1991. Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:617-621.
153. Pfeiffer, A., and Schatz, H. 1995. Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103:7-14.
154. Grant, M.B., Mames, R.N., Fitzgerald, C., Ellis, E.A., Aboufrikha, M., and Guy, J. 1993. Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in

- rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* 36:282-291.
155. Smith, L.E., Kopchick, J.J., Chen, W., Knapp, J., Kinose, F., Daley, D., Foley, E., Smith, R.G., and Schaeffer, J.M. 1997. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* 276:1706-1709.
 156. Ozaki, H., Seo, M.S., Ozaki, K., Yamada, H., Yamada, E., Okamoto, N., Hofmann, F., Wood, J.M., and Campochiaro, P.A. 2000. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol* 156:697-707.
 157. Lashkari, K., Hirose, T., Yazdany, J., McMeel, J.W., Kazlauskas, A., and Rahimi, N. 2000. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. *Am J Pathol* 156:1337-1344.
 158. Duh, E.J., Yang, H.S., Suzuma, I., Miyagi, M., Youngman, E., Mori, K., Katai, M., Yan, L., Suzuma, K., West, K., et al. 2002. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:821-829.
 159. Funatsu, H., Yamashita, H., Noma, H., Mochizuki, H., Mimura, T., Ikeda, T., and Hori, S. 2003. Outcome of vitreous surgery and the balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1042-1047.
 160. Noma, H., Funatsu, H., Yamashita, H., Kitano, S., Mishima, H.K., and Hori, S. 2002. Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Arch Ophthalmol* 120:1075-1080.
 161. Takahashi, K., Saishin, Y., Saishin, Y., Silva, R.L., Oshima, Y., Oshima, S., Melia, M., Paszkiet, B., Zerby, D., Kadan, M.J., et al. 2003. Intraocular expression of endostatin reduces VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularization, and retinal detachment. *Faseb J* 17:896-898.
 162. Auricchio, A., Behling, K.C., Maguire, A.M., O'Connor, E.M., Bennett, J., Wilson, J.M., and Tolentino, M.J. 2002. Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther* 6:490-494.
 163. Repka, M.X., Palmer, E.A., and Tung, B. 2000. Involution of retinopathy of prematurity. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Arch Ophthalmol* 118:645-649.
 164. W, J. 2002. Growth hormone therapy and its relationship to insulin resistance, glucose intolerance and diabetes mellitus: a review of recent evidence. *Drug Saf.* 25:199-212.
 165. Frank, R. 2004. Diabetic Retinopathy. *New Engl J Med* 350:48-58.
 166. Hunter PR, A.J., Lunn TA, Horrobin DF, Boyns AR & Cole EN 1974. Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet* i:237.
 167. Harter M, B.N., Pourcher Ph. Kowlowski JM, Krebs B & Ramaioli A 1976. Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet* ii:961-962.

168. Froland, A., Hagen, C., and Lauritzen, E. 1977. Diabetic Retinopathy and prolactin. *Lancet* i:45.
169. Mooradian AD, M.J., Billington CJ, Slag MF, Elson MK & Shafer RB 1985. Hyperprolactinaemia in male diabetics. . *Postgrad Med J* 61.
170. Rivera, J., Moreno-Paramo, D., Aranda, J., Arnold, E., Lopez-Barrera, F., Salazar, N., Quiroz-Mercado, H., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. 2007. Prolactin Decreases in the Circulation of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy: Relationship to Intraocular Vasoinhibins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48:1408-.
171. Srivatsa, L. 1994. Evolution and natural history of diabetic retinopathy during pregnancy. *Metab Ped Sys Ophthalmol* 17.
172. Sheth, B. 2002. Does pregnancy accelerate the rate of progression of diabetic retinopathy? *Curr Diab Rep* 2:327-330.
173. Hylander, M.A., Strobino, D.M., Pezzullo, J.C., and Dhanireddy, R. 2001. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J Perinatol* 21:356-362.
174. Grosvenor, C.E., and Whitworth, N.S. 1983. Accumulation of prolactin by maternal milk and its transfer to circulation of neonatal rat--a review. *Endocrinol Exp* 17:271-282.
175. Hawkins TA, G.R.D.J. 1994. Prolactin modulates the incidence of diabetes in male and female NOD mice. . *Autoimmunity* 18:155-162.
176. Holstad, M.a.S., S 1999. Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *J Endocrinol* 163:229-234.
177. Arredondo, A., Zuniga, A., and Parada, I. 2005. Health care costs and financial consequences of epidemiological changes in chronic diseases in Latin America: evidence from Mexico. *Public Health* 119:711-720.
178. Ochoa, A., Montes de Oca, P., Rivera, J.C., Duenas, Z., Nava, G., de La Escalera, G.M., and Clapp, C. 2001. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1639-1645.
179. Clapp, C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121:2055-2064.
180. Staindl B, B.P., Kofler R, Wick G. 1987. Monoclonal antibodies against human, bovine and rat prolactin: epitope mapping of human prolactin and development of a two site immunoradiometric assay. *J. Endocrinol.* 112:311-318.
181. Newman, P.J. 1994. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci* 714:165-174.
182. Xu, Q., Qaum, T., and Adamis, A.P. 2001. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:789-794.
183. Gao, B.B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S.J., Srinivasan, V.J., Wojtkowski, M., Fujimoto, J.G., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Bursell, S.E., et al. 2007. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med* 13:181-188.

184. Guidry, C., Feist, R., Morris, R., and Hardwick, C.W. 2004. Changes in IGF activities in human diabetic vitreous. *Diabetes* 53:2428-2435.
185. Pan, H., Nguyen, N.Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L.C., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Weiner, R., Struman, I., and Grant, M.B. 2004. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2413-2419.
186. Zhang, S.X., and Ma, J.X. 2007. Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy. *Prog Retin Eye Res* 26:1-37.
187. Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., and Steinmetz, R.W. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639-669.
188. Kon, C.H., Occleston, N.L., Charteris, D., Daniels, J., Aylward, G.W., and Khaw, P.T. 1998. A prospective study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1524-1529.
189. Cunha-Vaz, J., Leite, E., Sousa, J.C., and de Abreu, J.R. 1993. Blood-retinal barrier permeability and its relation to progression of retinopathy in patients with type 2 diabetes. A four-year follow-up study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231:141-145.
190. Cosio, G., Jeziorski, M.C., Lopez-Barrera, F., De La Escalera, G.M., and Clapp, C. 2003. Hypoxia inhibits expression of prolactin and secretion of cathepsin-D by the GH4C1 pituitary adenoma cell line. *Lab Invest* 83:1627-1636.
191. O'Steen, W.K., and Sundberg, D.K. 1982. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res* 14:54-62.
192. Healy DL, R.S., Hartmann PE, Herington AC, Burger HG. 1980. Prolactin in human milk: correlation with lactose, total protein and alpha-lactalbumin levels. *Am J Physiol* 238:E83-E86.