



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA  
AVANZADA**

**ANÁLISIS DE LOS NIVELES ENDÓGENOS,  
GENERACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE  
VASOINHIBINAS EN EL VÍTREO DE PACIENTES  
CON RETINOPATÍA DIABÉTICA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN TECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**AURA ILEANA MORENO VEGA**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ-  
LABORA,  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA UNAM**



**JURIQUILLA, QUERÉTARO, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA

### Votos Aprobatorios

COMITÉ ACADÉMICO  
Licenciatura en Tecnología  
PRESENTE

En cumplimiento del Artículo 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis con título "ANÁLISIS DE LOS NIVELES ENDÓGENOS, GENERACIÓN Y BIOACTIVIDAD DE VASOINHIBINAS EN EL VÍTREO DE PACIENTES CON RETINOPATÍA DIABÉTICA", que realizó el (la) pasante **AURA ILEANA MORENO VEGA**, con número de cuenta: **40901490-7**, bajo la opción de titulación por Tesis y Examen profesional en la carrera de Licenciatura en Tecnología.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Campus UNAM-Juriquilla, Qro a 19 de febrero de 2014

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Maria del Carmen Clapp Jiménez L.	
SECRETARIO	Dra. Luz María López Marín	
VOCAL	Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez	
1er. SUPLENTE	Dra. Isabel Méndez Hernández	
2º SUPLENTE	Dr. Michael Jeziorski	

## **AGRADECIMIENTOS**

A la licenciatura en Tecnología del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM Campus Juriquilla y al Dr. José Luis Aragón Vera.

A todos los miembros de servicios escolares de la Licenciatura en Tecnología por haberme apoyado: Magdalena Reyes Olan, Concepción Arellano Andrade, Judith Estrada Lugo y la Licenciada Ramos Hernández.

A los apoyos recibidos por parte del CONACYT:  
Beca de Ayudante de Investigador 2011 y 2012 (expediente 1404 7253)  
Beca de Apoyo a la Titulación de la SEP (folio 200055)

Apoyo al trabajo experimental (Donativo SALUD-2011-1-161594)

A mi tutora: Dra- Carmen Clapp por todo su apoyo y dedicación en mi formación.

A mis sinodales:  
Dr. Manuel Aguilar Ramírez  
Dr. Michael Jeziorski  
Dra. Luz María López Marín  
Dra. Isabel Méndez Hernández

Al Dr. Jakob Triebel por sus aportaciones y apoyo en el proyecto.

A los colaboradores del Instituto Mexicano de Oftalmología gracias a los cuales pudieron obtenerse las muestras de los pacientes:  
Dr. Miguel Ángel Vázquez Membrillo  
Dra. Renata García Franco  
Dr. Ellery López Star

Al Lic. en Nutrición Fernando López Barrera, al M.en C. Gabriel Nava Pinto y a los laboristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán por su apoyo en mi trabajo.

A los pacientes por haber donado sus muestras.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A todos mis profesores por su apoyo y enseñanza que me otorgaron.

A todos los investigadores que me recibieron en su laboratorio y con los cuales aprendí cosas invaluableles que me formaron científicamente.

A todos los miembros del laboratorio A-14 y A-15 que me brindaron su apoyo y amistad. Así como los miembros de los otros laboratorios en los cuales estuve.

A mi hermana y mi familia.

## **Dedicatoria**

*A mis padres,*

*A abuelita,*

*“Science cannot solve the ultimate mystery of nature. And that is because, in the last analysis, we ourselves are part of nature and therefore part of the mystery we are trying to solve.”*  
Max Planck

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>II</b>
<b>Agradecimientos personales.....</b>	<b>III</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>IV</b>
<b>Índice.....</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>X</b>
<b>I.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 La angiogénesis.....	1
1.2 La angiogénesis ocular.....	1
1.3 La retinopatía diabética.....	2
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1 Vasoinhibinas.....	4
2.2 Vías de señalización de las vasoinhibinas.....	6
2.3 Vasoinhibinas y angiogénesis ocular.....	7
2.4 Vasoinhibinas y retinopatías.....	9

<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>11</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>12</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
5.1 General.....	12
5.2 Particulares.....	12
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
6.1 Pacientes y muestras.....	13
6.2 Cuantificación de la proteína total presente en las muestras de ví pacientes control y con retinopatía diabética proliferativa.....	14
6.3 Determinación de niveles endógenos de vasoinhibinas en vítreo.	14
6.4 Proliferación de células endoteliales en cultivo.....	15
6.5 Ensayo para medir la actividad de proteasas vítreas.....	16
6.6 Identificación de MMP intravítreales.....	18
6.7 Análisis estadístico.....	18
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
7.1 Detección de vasoinhibinas en el vítreo humano.....	20
7.2 Efecto de vítreos de pacientes control y con RDP sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo.....	21

7.3 El vítreo contiene proteasas que cortan a la PRL en fragmentos de 15 a 18kDa.....	23
7.4. Los fragmentos de 15-18kDa de la PRL generados por el vítreo son vasoinhibinas y resultan de la acción de MMP.....	25
7.5 La generación de vasoinhibinas por MMP intravitrales es menor en pacientes con RDP.....	26
7.6 La cantidad de MMPs vítreas es similar entre pacientes control y con RDP.....	27
<b>VIII DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>X. ANEXO I : LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>41</b>

## Lista de figuras y Tablas

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Representación esquemática de la estructura tridimensional de la hormona de la prolactina (PRL) humana.....	5
2. Vías de señalización través de las cuáles actúan las vasoinhibinas en las células endoteliales.....	7
3. Vasoinhibinas (Vi) presentes en vítreo humano.....	20
4. Efecto de vítreos de pacientes control y con RDP sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo.....	22
5. El vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa RDP es más pro-angiogénico que el vítreo control.....	23
6. Proteasas presentes en el vítreo humano procesan proteolíticamente a la PRL humana.....	24
7. MMP presentes en el vítreo humano cortan a la PRL humana hacia vasoinhibinas.....	25
8. La actividad de MMP del vítreo para generar vasoinhibinas es menor en la RDP.....	26
9. Las metaloproteasas de matriz MMP-2 y 9 están presentes en vítreos de pacientes control y con retinopatía diabética proliferativa.....	28
<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Concentraciones de los inhibidores de proteasas empleados en el estudio.....	17

## RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) es una enfermedad vasoproliferativa que se caracteriza por la vasopermeabilidad y la neovascularización retinianas aberrantes que resultan en la merma de la visión o en la ceguera en la diabetes. Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL) que inhiben la angiogénesis y la vasopermeabilidad retinianas en la RD experimental. Estos péptidos se han detectado en la retina, por lo que una disminución de sus niveles podría favorecer el desarrollo de la RD. En este trabajo investigamos la presencia, actividad y generación de las vasoinhibinas en vítreos de pacientes no diabéticos (grupo control) y con RD avanzada o proliferativa (RDP). La evaluación por Western blot de vítreos concentrados solo permitió detectar vasoinhibinas en 5 de los 30 vítreos analizados. Sin embargo, encontramos que el vítreo de pacientes control, pero no el de aquellos con RDP, inhibe la proliferación de células endoteliales en cultivo inducida por el factor estimulador del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Esta acción anti-angiogénica se bloqueó mediante la inmunoneutralización de vasoinhibinas vítreas sugiriendo su contribución en este efecto. En contraste, el vítreo de pacientes con RDP, pero no el vítreo control, estimuló por sí solo la proliferación de las células endoteliales. Estos hallazgos muestran las propiedades anti-angiogénicas y pro-angiogénicas del vítreo de pacientes control y con RDP, respectivamente, y sugieren que estos efectos pudieran estar asociados con una disminución en los niveles de vasoinhibinas durante la RDP. En apoyo a esta posibilidad, encontramos que la incubación de PRL recombinante con el vítreo de pacientes control

resulta en la generación de una vasoinhibina de 17 kDa que se bloquea con inhibidores de metaloproteasas de matriz (MMP), y que la generación de dicha vasoinhibina es mayor que con el vítreo de pacientes con RDP. Concluimos que los vítreos de pacientes control contienen MMP capaces de generar vasoinhibinas en una mayor proporción que los vítreos de pacientes con RDP. De acuerdo con nuestro trabajo proponemos la posibilidad de que una reducción en la generación y/o actividad de las vasoinhibinas vítreas pudiera contribuir a la progresión de la RD humana.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 La angiogénesis**

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Clapp *et al* 2008). Este proceso ocurre muy activamente durante el desarrollo, acompañando el crecimiento y la diferenciación de los tejidos; mientras que en la vida adulta la angiogénesis determina el crecimiento y función de órganos reproductivos femeninos y la reparación de tejidos a consecuencia de lesiones o fracturas (Carmeliet 2005). No obstante, la sobreproducción de vasos sanguíneos puede contribuir a enfermedades tales como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la artritis y las retinopatías vasoproliferativas. De hecho, en los tejidos del adulto, la mayoría de los vasos sanguíneos se encuentran en un estado inactivo y su proliferación se mide en años. Pese a esto, las células endoteliales que conforman los vasos sanguíneos mantienen su habilidad para proliferar rápidamente en respuesta a un estímulo tal como la hipoxia o la inflamación que causa el desequilibrio a favor de los factores que promueven la angiogénesis. Por consiguiente, la investigación acerca de factores anti-angiogénicos resulta interesante para el posible desarrollo de terapias contra la formación excesiva o aberrante de vasos sanguíneos particularmente en las enfermedades angiogénico-dependientes mencionadas.

## **1.2. La angiogénesis ocular**

El ojo es un tejido sensorial complejo que, como la mayoría de los tejidos sanos adultos, mantiene los vasos sanguíneos en un estado latente. Para capturar y enfocar la luz,

es importante que el sistema óptico del ojo sea transparente, por lo que, a diferencia de otros tejidos, el ojo está compuesto por varios compartimentos avasculares. Ejemplos de estos son la córnea, el lente, el vítreo y la parte externa de la retina (Ross y Pawlina, 2011; Clapp *et al* 2008). Como se mencionó antes, una perturbación en la regulación del crecimiento de los vasos sanguíneos puede promover el desarrollo de retinopatías vasoproliferativas tales como la degeneración macular asociada con la edad, la retinopatía del prematuro y la retinopatía diabética.

### **1.3 La retinopatía diabética**

La retinopatía diabética es una complicación que se desarrolla a partir de una microangiopatía y genera cambios funcionales y estructurales en la retina. Estos cambios pueden traducirse en un conjunto de lesiones características que pueden conllevar a la ceguera, y que se presentan en pacientes que han padecido la *diabetes mellitus* por varios años (Cai *et al* 2002). Las complicaciones vasculares de la diabetes son de las manifestaciones más graves de esta enfermedad y entre los mecanismos que la ocasionan se encuentra la elevación crónica de los niveles circulantes de glucosa. Las alteraciones bioquímicas causadas por la hiperglucemia crónica pueden traducirse en el ojo en un aumento de la permeabilidad de la vasculatura retiniana, alteraciones en el flujo sanguíneo, engrosamiento de la membrana basal, neovascularización ocular, microaneurismas, pérdida de pericitos y aumento en la proliferación y migración de células endoteliales capilares. En la retina, los cambios en el flujo de la perfusión sanguínea producen hipoxia e isquemia. La hipoxia estimula la activación de diversas cascadas de señalización, incluyendo la expresión de factores que promueven la vasopermeabilidad y la angiogénesis. Durante este

proceso de neovascularización, los vasos sanguíneos se extienden por la retina e invaden el humor vítreo, formando una membrana fibrosa que puede desprender la retina y causar la ceguera (Durham *et al* 2011; Rask-Madsen *et al* 2013).

La retinopatía diabética es una de las enfermedades que se encuentra en la lista de prioridad de enfermedades oculares de la Organización Mundial de la Salud (OMS), debido a que es una de las causas principales de ceguera en adultos en edad laboral (Resnikoff 2004). Aunque las terapias hasta ahora existentes ayudan a reducir la pérdida de la visión, son efectivas en porcentajes limitados de pacientes y algunas de ellas pueden llegar a ser bastante costosas o tener efectos secundarios importantes (Simo *et al* 2008). Al respecto, la fotocoagulación panretiniana, que es la terapia más común para la retinopatía diabética, reduce de manera significativa la pérdida de la visión en tan sólo un 50% (Chen *et al* 2011).

En consecuencia, resulta de gran importancia investigar estrategias alternativas para contrarrestar las alteraciones vasculares generadas por la retinopatía diabética y restituir el ambiente predominantemente anti-angiogénico del ojo sano. Dentro de estas alternativas, ha surgido un importante campo de investigación relacionado con el uso de inhibidores endógenos de la angiogénesis tales como las vasoinhibinas.

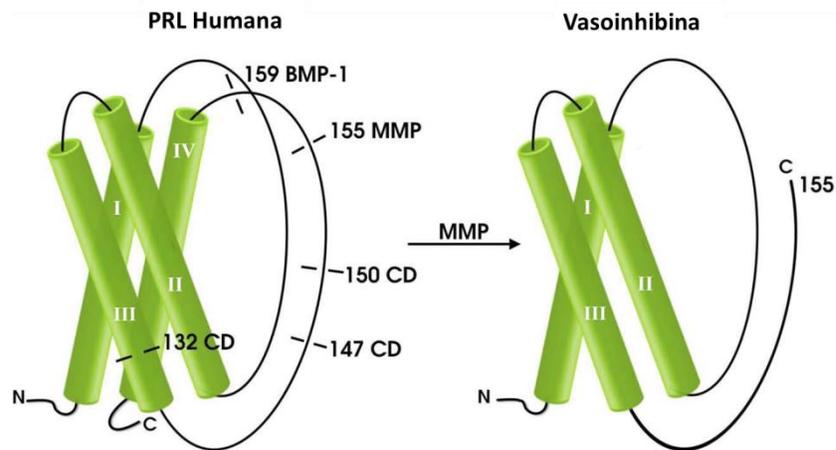
A continuación, se describen antecedentes generales sobre las vasoinhibinas, su generación y efectos vasculares y cómo éstas influyen sobre la homeostasis del ojo sano y en la progresión de enfermedades vasoproliferativas oculares.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Vasoinhibinas

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos generados a partir del corte proteolítico de la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento, y el lactógeno placentario (Clapp 2006). Dentro de esta familia de hormonas, la PRL es una proteína de 23kDa producida principalmente por los lactotrofos del lóbulo anterior de la glándula pituitaria. Además, se ha descubierto que la PRL es generada por varios tejidos extrahipofisarios y que sus receptores se localizan en prácticamente todos los tipos celulares, lo que convierte a la PRL en una hormona muy versátil, con más de 300 funciones independientes (Bole-Feysot 1998). La diversidad funcional de la PRL, puede también derivar de modificaciones post-traduccionales que modifican su estructura (Sinha 1995). Al respecto, la PRL humana puede ser cortada por proteasas como la catepsina-D (CD) (Piwinca *et al* 2004), la proteína morfogénica de hueso 1 (BMP-1) (Ge *et al* 2007) y las metaloproteasas de matriz (MMP) (Macotella *et al* 2006), generando a las vasoinhibinas: una familia de péptidos anti-angiogénicos que contienen la región amino-terminal (N-terminal) de la PRL (Clapp *et al* 2006). Los pesos moleculares de las vasoinhibinas generadas varían entre 14 y 18kDa, dependiendo de la proteasa que actúe sobre la PRL. La proteólisis por la CD en las posiciones 1-132, 1-147 y 1-150 de la PRL genera péptidos de 15.0, 16.8 y 17.2kDa respectivamente (Piwinca *et al* 2004). En cuanto a la BMP-1, esta enzima corta a la PRL entre los aminoácidos 159 y 160, produciendo vasoinhibinas de 18kDa (Ge *et al* 2007). Finalmente, el procesamiento proteolítico por las MMP-1, 2, 3, 8, 9 y 13, corta en la unión peptídica 156-157 de la PRL, generando vasoinhibinas de 17kDa, las cuales pueden continuar siendo procesadas por las mismas MMP para generar vasoinhibinas de 16 y

14kDa (Macotella *et al* 2006). Cabe mencionar que todas las proteasas mencionadas anteriormente llevan a cabo estos cortes proteolíticos en sitios que se encuentran cercanos o dentro del asa que conecta a la tercera con la cuarta alfa-hélices de la PRL (**Figura 1**).



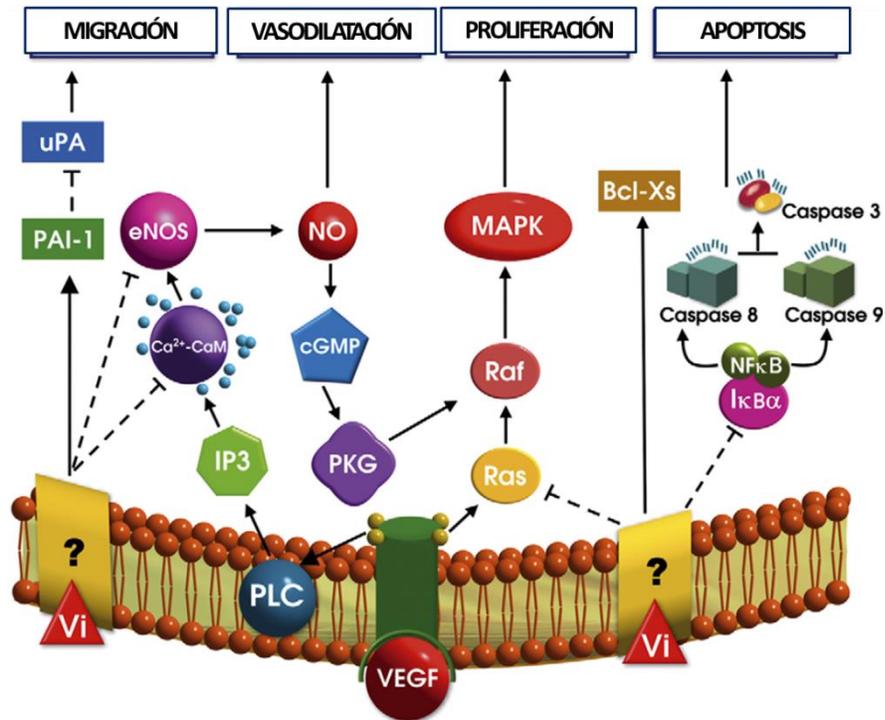
**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura tridimensional de la hormona de la prolactina (PRL) humana. Se indican los sitios de corte proteolítico llevados a cabo por las diferentes enzimas (líneas puntadas). La proteína morfogénica del hueso (BMP-1) corta en el residuo 150, las metaloproteasas de matriz (MMP) en el residuo 155 y la Catepsina-D (CD) en los residuos 132, 147 y 150. A la derecha del esquema se representa la vasoinhibina generada por el corte de las MMP. Tomado de Clapp *et al* 2008.

Hasta la fecha, se desconoce la naturaleza química de los receptores a las vasoinhibinas, si bien se ha mostrado la presencia de sitios de unión saturables, específicos y de alta afinidad en membranas aisladas de células endoteliales, a los cuales se unen las vasoinhibinas de manera reversible, con una  $K_d$  de 0.9 a 9.9 nM (Clapp y Weiner 1992). Asimismo, estos sitios de unión están asociados con proteínas de 32 y 52 kDa, que podrían corresponder a un receptor o una proteína reguladora de las vasoinhibinas. Aún más, en estudios de competencia por la unión de estos sitios, las vasoinhibinas mostraron ser las

más potentes, mientras que la PRL íntegra y la hormona de crecimiento humana no compitieron por dicha unión (Clapp y Weiner 1992).

## **2.2 Vías de señalización de las vasoinhibinas**

Las vasoinhibinas actúan directamente sobre células endoteliales en cultivo inhibiendo su proliferación (Clapp *et al* 1993), migración (Lee *et al* 2007), permeabilidad (García *et al* 2008) y vasodilatación (González *et al* 2004) inducida por distintas sustancias vasoactivas, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), la interleucina 1-beta, la acetilcolina y la bradicidina. Las vasoinhibinas previenen la proliferación endotelial al inhibir la activación de la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) así como mediante la inhibición de la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) (D'Angelo *et al* 1995; García *et al* 2008). De hecho, ambas vías pueden interactuar entre sí. Por ejemplo, el óxido nítrico (NO) estimula la producción de guanosin-monofosfato cíclico (cGMP), el cual activa a la proteína cinasa dependiente de cGMP que a su vez fosforila/activa a Raf (Clapp *et al* 2006). Por otra parte, las vasoinhibinas inhiben la vasopermeabilidad y la vasodilatación a través de activar a la proteína fosfatasa 2-A que defosforila e inactiva la eNOS (García *et al* 2008). Relacionado con la regresión vascular, las vasoinhibinas actúan mediante la inducción de la apoptosis de las células endoteliales (Martini *et al* 2000; Dueñas *et al* 2004) a través de promover la activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl2 así como la activación de caspasas mediadas por la vía de señalización NFκB (Tabruyn *et al* 2008) (**Figura 2**).



**Figura 2. Vías de señalización través de las cuáles actúan las vasoinhibinas en las células endoteliales.** Las vasoinhibinas se unen a sitios de unión presentes en la membrana e inhiben la migración y proliferación y estimulan su apoptosis. También bloquean la vasopermeabilidad. Las flechas y las líneas discontinuas indican acciones estimuladoras e inhibitoras, respectivamente. Abreviaciones: IP3: Inositol trifosfato, PKG: Proteína cinasa G, PLC: Fosfolipasa C, Vi: Vasoinhibinas. Tomado de Clapp *et al* 2006.

### 2.3 Vasoinhibinas y angiogénesis ocular

Se ha reportado la presencia de vasoinhibinas en la glándula pituitaria (Cruz-Soto *et al* 2009), en la circulación (Torner *et al* 1995, Triebel *et al* 2009, Hilfiker-Kleiner *et al* 2007), en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario (Méndez *et al* 2010), en el cartílago articular (Macotella *et al*), en la córnea (Dueñas *et al* 1999) y en la retina (Aranda *et al* 2005). En condiciones fisiológicas, el cartílago, la córnea y la retina se caracterizan por ser avasculares (cartílago y córnea) o por tener una vascularización restringida (retina) (Clapp

*et al 2006; Clapp et al 2008*). Sus propiedades anti-angiogénicas y la presencia en estos tejidos sugiere que las vasoinhibinas participan en la inhibición de la vascularización fisiológica.

La restricción de la vasculatura ocular ocurre a pesar de la presencia de una gran variedad de factores pro-angiogénicos en el ojo (*Sivalingam et al 1990; Gerhadinger et al 1998*), sugiriendo el predominio de la acción de factores inhibidores por sobre la de los estimuladores (*Dorrell et al 2007*). Por lo tanto, la alteración de dicho equilibrio resultaría en la angiogénesis patológica que caracteriza a las retinopatías vasoproliferativas.

La PRL está presente en el humor acuoso humano (*Pleyer et al 1991; Dueñas et al 2004*), y tanto ésta, como las vasoinhibinas se pueden detectar en la retina de la rata y del mono (*Rivera et al 2008; Aranda et al 2005*). De manera interesante, en un estudio en pacientes con retinopatía del prematuro (ROP), se encontró una correlación significativa entre las concentraciones de PRL en el humor acuoso y las del fluido subretiniano (*Dueñas et al 2004*). Lo anterior es consistente con el hecho de que el fluido retiniano proviene en su gran mayoría del vítreo y el flujo posterior del humor acuoso (*Pederson y Toris 1985*). Las vasoinhibinas intraoculares pueden provenir de la internalización y proteólisis de la PRL circulante, dado que la PRL radioactiva inyectada intracardialmente se incorpora en la retina, coroides y cuerpos ciliares (*O'Steen y Sundberg 1982*).

Por otra parte, la PRL también se produce intraocularmente. El ARNm de la PRL ha sido detectado en la retina en ratas (*Aranda et al 2005*). Aún más, en los vasos sanguíneos de las membranas fibrosas retrolentales que se forman en pacientes con ROP se ha encontrado ARNm de PRL, así como evidencia de que ésta es procesada hacia vasoinhibinas. Consistente con esta presencia de vasoinhibinas, los fluidos oculares contienen enzimas capaces de cortar la PRL hacia vasoinhibinas (*Dueñas et al 2004*).

La posible participación de las vasoinhibinas en mantener el ambiente predominantemente anti-angiogénico del ojo sano fue mostrada en estudios donde se indujo angiogénesis mediante anticuerpos capaces de inmunosequestrar a las vasoinhibinas o por medio del ARN de interferencia capaz de bloquear la producción de PRL en la retina (Aranda *et al* 2005; Dueñas *et al* 1999). Asimismo, el inmunosequestro de vasoinhibinas en ratas neonatas redujo la apoptosis de las células vasculares de los vasos hialoideos, lo cual sugiere que las vasoinhibinas estimulan la regresión fisiológica de estos vasos después del nacimiento (Dueñas *et al* 2004).

## **2.4 Vasoinhibinas y retinopatías**

Las vasoinhibinas tienen potencial terapéutico en las retinopatías vasoproliferativas debido a que inhiben la vasopermeabilidad, la vasodilatación y la angiogénesis ocular (Clapp *et al* 2008). A este respecto, la administración local de vasoinhibinas en la córnea inhibió la estimulación de la neovascularización inducida por el bFGF (Dueñas *et al* 1999); la expresión de vasoinhibinas mediante el uso de vectores adenovirales inhibió la neovascularización inducida por isquemia en un modelo murino (Pan *et al* 2004); la inyección de las vasoinhibinas puras o la terapia génica con vasoinhibinas utilizando vectores derivados de virus adenoasociados bloqueó la vasopermeabilidad retiniana inducida por VEGF y por diabetes en la rata (Ramírez *et al* 2011; García *et al* 2008). Además, la inducción de hiperprolactinemia en ratas diabéticas se asoció con niveles elevados de vasoinhibinas retinianas y con menor permeabilidad vascular en la retina (Arnold *et al* 2010). Finalmente, se ha demostrado que los pacientes con retinopatía

diabética tienen niveles disminuidos de vasoinhibinas en suero (Triebel *et al* 2009), sin embargo, no se conoce el nivel de vasoinhibinas en el vítreo de estos pacientes.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la *diabetes mellitus* el estado de hiperglucemia crónico entre otras complicaciones, promueve daños microvasculares que, en la retina, favorecen el desarrollo de la retinopatía diabética (Chen *et al* 2011). En los estados más avanzados de la enfermedad, nuevos vasos sanguíneos invaden el vítreo, generando hemorragias y formando tejido fibroso que puede desprender la retina ocasionando la pérdida de visión o ceguera. Debido a la alta prevalencia de la diabetes, la retinopatía diabética es la principal causa de pérdida de visión y ceguera en adultos a nivel mundial (Heng *et al* 2013). Pese a décadas de investigación en torno al desarrollo y tratamiento de la retinopatía diabética, la prevalencia de esta enfermedad en la población adulta sigue creciendo, siendo de un 40% a nivel mundial y un 31.65% en México (Heng *et al* 2013, Rojas y Lima 2008). Un ejemplo del aumento acelerado de la prevalencia de esta enfermedad es el crecimiento de un 89% de la población de adultos de más de 40 años con retinopatía diabética, entre el año 2000 y 2010, en los Estados Unidos (Prevent Blindness America, Cole J. 2012). Por otra parte, de acuerdo con estadísticas internacionales, se espera que la población de personas con retinopatía diabética crezca de 126.6 millones en 2011 a 191.0 millones de personas adultas en 2030 (Zheng *et al* 2013). Con respecto a su manejo, la fotocoagulación con láser es el tratamiento más empleado, se aplica en estados ya avanzados de la retinopatía y puede tener varios efectos secundarios, que merman aún más la visión.

Por todo lo anterior, resulta importante investigar los factores involucrados en el desarrollo y progresión de la retinopatía diabética con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la enfermedad, así como desarrollar terapias más efectivas y con menos efectos

secundarios que permitan tratar a una mayor población con diferentes estadios de la enfermedad. Con respecto a esto, el estudio de las vasoinhibinas como inhibidores naturales de la angiogénesis ocular reviste gran interés.

## **IV. HIPÓTESIS**

Las vasoinhibinas están presentes en el vítreo humano y su generación se altera a la baja, en condiciones de retinopatía diabética

## **V. OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Investigar la presencia, bioactividad y generación de las vasoinhibinas en el vítreo humano de pacientes no diabéticos y diabéticos con retinopatía diabética proliferativa.

### **5.2 Particulares**

En pacientes no diabéticos y diabéticos con retinopatía diabética proliferativa:

1. Analizar la presencia de vasoinhibinas en el vítreo.
2. Analizar *in vitro* los efectos antiangiogénicos de las vasoinhibinas presentes en el vítreo.
3. Determinar la actividad de proteasas vítreas capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Pacientes y muestras**

Pacientes de sexo masculino, entre las edades de 18-90 años, se reunieron de manera aleatoria en el Hospital “Luis Sánchez Bulnes” (Asociación para Evitar la Ceguera en México, México D.F.) y en el Instituto Mexicano de Oftalmología (IMO) (Querétaro, Qro.). A cada paciente, se le tomó y registró un historial médico detallado y se le sometió a una evaluación oftalmológica completa. La presencia o ausencia de retinopatía diabética se determinó con base a la Escala Internacional de Severidad Clínica de Retinopatía Diabética y Edema Macular Diabético (Wilkinson CP, Ferris). A partir de tal diagnóstico, se separó a los pacientes en dos grupos: un grupo control, sin diabetes y un grupo con retinopatía diabética proliferativa (RDP). Sólo aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión (individuos que no presenten otras enfermedades o tomen algún medicamento que altere los niveles séricos de PRL), fueron invitados a participar en el estudio. Criterios de exclusión: historia médica de cirrosis hepática, prolactinoma, otros adenomas pituitarios, disfunción tiroidea, lesiones torácicas en los últimos 3 meses, sarcoidosis, tuberculosis, histiocitosis, hipofisitis linfocítica o medicación con antipsicóticos (fenotiazina, haloperidol, risperidona) antidopaminérgicos (metoclopramida, domperidona), antihipertensivos conocidos por su efecto en la secreción de PRL (metildopa, verapamil), estrógenos, opiáceos o cimetidina. Las muestras de vítreo sin diluir fueron obtenidas en los individuos sometidos a una vitrectomía siguiendo protocolos previamente reportados (Quiroz-Mercado H 2005). El protocolo para la recolección de las muestras fue previamente autorizado por los pacientes mediante un consentimiento firmado, y aprobado

por el comité de ética de ambas instituciones- Instituto de Neurobiología UNAM, Instituto Mexicano de Oftalmología.

## **6.2 Cuantificación de la proteína total presente en las muestras de vítreo de pacientes control y con retinopatía diabética proliferativa (RDP)**

La cuantificación de proteína total se llevó a cabo en las muestras de vítreo mediante la técnica de Bradford, empleando una curva estándar de BSA (rango de 0- 2.5µg de proteína) y una placa de microtitulación de 96 pozos. 2µl de muestra fueron mezclados con 200 µl de una solución de Bradford (BioRad Protein Assay Dye Reagent). Las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro (iMark Microplate Absorbance Reader de BioRad) a una longitud de onda de 595 nm e interpoladas en una curva estándar.

## **6.3 Determinación de niveles de vasoinhibinas en vítreo**

Los niveles endógenos de vasoinhibinas en los dos grupos de pacientes fueron determinados mediante el análisis por Western blot (Western Blotting Tools, Millipore), empleando anticuerpos específicos contra la prolactina que reconoce a las vasoinhibinas, con la ventaja de diferenciar por peso entre las distintas formas moleculares. Las muestras fueron concentradas de 100µl a 30µl mediante centrifugación, empleando filtros de centrifugación con un peso molecular de corte de 5kDa (Vivaspin 20, Vivaproducts, Inc., Littleton, MA). 80µg de proteína de vítreo fueron mezclados con 15 µl de buffer de Laemmli (condiciones reductoras), calentados a 95°C durante 5 minutos, y sometidos a electroforesis en geles al 15% de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (poro de 0.2µm)

durante 1h a 0.1A y bloqueados con leche al 5% en TBS-T para evitar la unión inespecífica de anticuerpos. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C bajo rotación, con un antisuero anti-PRL humana previamente caracterizado y generado en conejo (H-C1, dilución 1:500; Dueñas *et al* 2004) o con un anticuerpo monoclonal (dilución 1:75) dirigido contra el extremo amino-terminal de la hormona (N-Term, mAb 5602, Diagnostic Biochem Canada, Inc., London, Ontario, Canada). La detección de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina y un kit comercial colorimétrico (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA). Los valores de la densidad óptica fueron establecidos empleando el software de análisis Quantity One 1-D (BioRad) y normalizados contra un estándar interno de vasoinhibinas recombinantes humanas.

#### **6.4 Proliferación de células endoteliales en cultivo**

El efecto de las vasoinhibinas presentes en los vítreos humanos sobre la angiogénesis se analizó utilizando células endoteliales bovinas derivadas de la vena umbilical (BUVEC) en cultivo. Las células, aisladas y cultivadas de acuerdo a protocolos reportados (Cajero-Juarez 2002, fueron sembradas a una densidad de 5,000 células por 0.75 cm<sup>2</sup> (placas de 48 pozos) en 200µl de medio en medio celular completo (F12K Ham Kaighn's modification, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) y 50 U/ml de penicilina/estreptomicina). Una vez adheridas a la placa (3 a 4 horas posterior al sembrado), las células fueron sincronizadas en la fase G0 del ciclo celular mediante la incubación (12-16 horas) con 200 µl/pozo de medio F12K conteniendo 0.5% SFB. A continuación, las células se incubaron en presencia o ausencia de diferentes cantidades de

proteína (25, 50 y 100µg) de vítreos de pacientes control ( $n= 6$ ) o con RDP ( $n= 12$ ). En otros experimentos, después del paso de sincronización, las células se incubaron con el mismo volumen de medio F12K 10% SFB conteniendo o no, el factor pro-angiogénico bFGF (10 ng/ml; donación de Scios, Mountain View, CA), y en presencia o ausencia de 25 µg de proteínas del vítreo de pacientes control o con RDP. Además, para inmunosequestrar a las vasoinhibinas presentes en el vítreo humano, un grupo de los experimentos se llevaron a cabo en presencia del antisuero anti-PRL humana (H-C1, dilución 1:100). Una hora después de agregar los tratamientos, se agregaron 0.1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina por pozo y se determinó su incorporación al DNA celular al cabo de las siguientes 24 horas.

## **6.5 Ensayo para medir la actividad de proteasas vítreas**

La actividad de proteasas vítreas capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL se evaluó mediante la incubación de 200 ng de PRL recombinante humana (obsequio de Michael E. Hodsdon, Yale University, New Haven, CT) con 15 µg de proteína de vítreo de pacientes control o con RDP en un buffer de incubación (Tris 200 mM pH 7.4, conteniendo 200 nM NaCl y 17. 1mM CaCl<sub>2</sub>) a diferentes tiempos a 37°C y en agitación (600 rpm). La generación de vasoinhibinas se estableció mediante el análisis de las muestras por SDS-PAGE y Western blot, empleando el antisuero anti PRL-humana (H-C1, dilución 1:300) o el anticuerpo monoclonal N-term 5602 (dilución 1:75). Las membranas fueron transferidas durante 40 min a 25V. Se caracterizó la actividad enzimática en función de la concentración proteica del vítreo (5, 15 y 30 µg) y del tiempo de incubación (1, 3, 6, 12 y 24 h). También se evaluó el efecto de inactivar al vítreo con calor a 90 °C durante 15 min

con agitación a 600 rpm). Para el resto de los experimentos se utilizaron 15 µg de proteína del vítreo y 24 horas de incubación.

La identidad de las proteasas intravitreales responsables del corte de la PRL hacia vasoinhibinas se determinó mediante el uso de distintos inhibidores de proteasas (Tabla 1). Los inhibidores fueron preincubados con 15 µg de proteína del vítreo por 30 min a 37 °C, 600 rpm, antes de adicionar los 200 ng de PRL recombinante humana y el buffer de Tris pH 7.4, la incubación continuó por 24 h.

Tabla 1. Concentraciones de los inhibidores de proteasas empleados en el estudio

<b>Inhibidor</b>	<b>Proteasa a la que inhibe</b>	<b>Concentraciones empleadas *</b>
Pepstatina A	Proteasas de aspártico (catepsina D)	1.4µM
PPACK	Proteasas de serina (trombina)	1 µM
1-10 Fenantrolina	Metaloproteasas de Matriz	10mM
EDTA	Metaloproteasas de Matriz	5mM
Aprotinina	Proteasas de serina (como tripsina, y excepto trombina)	10 µg/ml
GM6001/Galardina	Metaloproteasas de Matriz	10 µM

\* Las concentraciones fueron las efectivas en los estudios de Macotella *et al* 2006 y Ofosu *et al* 1986.

## 6.6 Identificación de MMPs intravitreales

Las MMP presentes en el vítreo de pacientes control o RDP se determinaron mediante Western blot utilizando diferentes concentraciones de proteína total del vítreo dependiendo de la MMP a detectar. La concentración óptima para detectar a las MMP-3 fue 15  $\mu\text{g}$  y para las MMP-2, 9 de 30  $\mu\text{g}$ . Las muestras de proteína de vítreo fueron mezcladas con 10  $\mu\text{l}$  de buffer de Laemmli (condiciones reductoras), calentadas a 95  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min, y sometidas a SDS-PAGE en geles de 10 % (MMP-3) y al 7.5% (MMP-2 y MMP-9) de acrilamida. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ) durante 1h a 0.1A. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$  bajo rotación, con anticuerpos anti-MMP, a una dilución de 1:300: anti-MMP-3 (N-Term, Anti-Matrix Metalloproteinase-3, Sigma Aldrich), anti-MMP-2 (rabbit polyclonal, MMP-2 sc-10736, Santa Cruz Biotechnology) o anti-MMP-9 (rabbit polyclonal, Anti-Matrix Metalloproteinase-9 hinge region, Sigma Aldrich). La detección de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina y un kit comercial colorimétrico (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA). Los valores de densitometría fueron obtenidos empleando el software de análisis Quantity One 1-D (BioRad).

## 6.7 Análisis estadístico

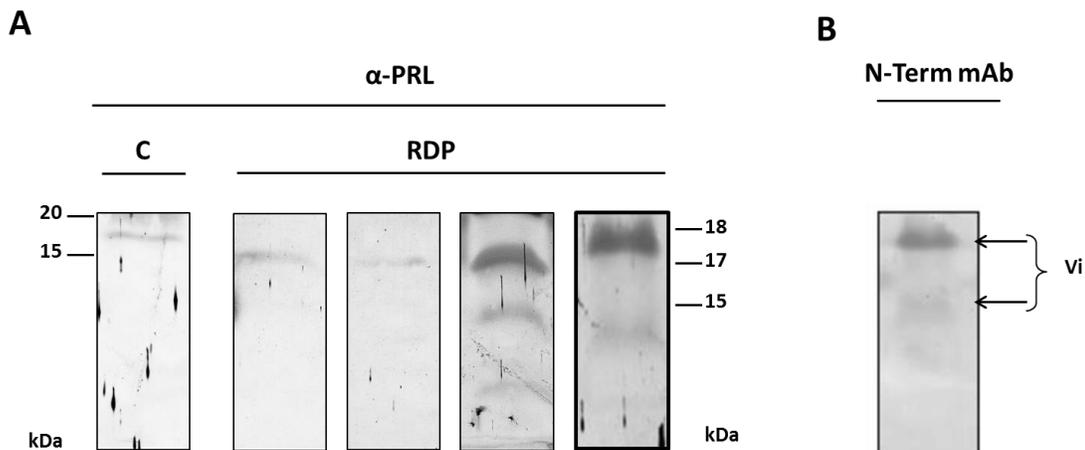
Los resultados fueron expresados como promedios  $\pm$  error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software Prism6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Los datos mostraron una distribución no normal, por lo que se analizaron empleando la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación

múltiple de Dunn o la prueba de Mann-Whitney. La prueba de correlación de Pearson fue usada para establecer correlaciones entre conjuntos de datos. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron como estadísticamente significativos.

## VII RESULTADOS

### 7.1 Detección de vasoinhibinas en el vítreo humano

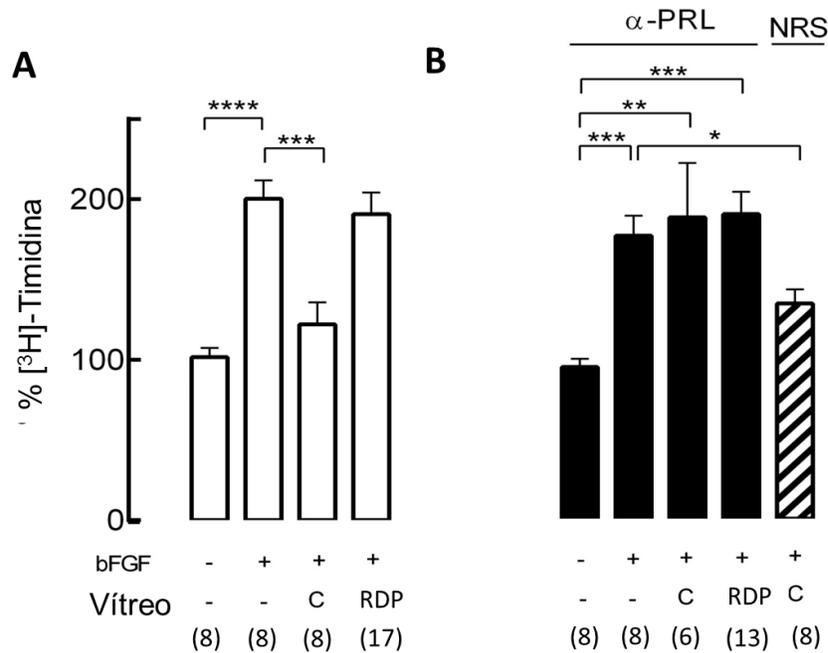
Péptidos con inmunorreactividad de PRL y pesos moleculares aparentes de 15, 17 y 18 kDa fueron detectados mediante Western blot en 5 de las 37 muestras de vítreo tanto de pacientes control como con RDP, reveladas con el anti-suero anti-PRL ( $\alpha$ -PRL) (**Figura 3A**). Su posible naturaleza de vasoinhibinas se apoyó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la región amino terminal de la PRL, que es la parte de la PRL presente en las vasoinhibinas (N-Term mAb) (**Figura 3B**). Si bien estos hallazgos sugieren la presencia de vasoinhibinas en algunas muestras de vítreo humano, su ausencia en la mayor parte de las muestras analizadas pudiera deberse a la baja sensibilidad del Western blot. Con el propósito de detectar a las vasoinhibinas endógenas presentes en el vítreo se investigaron las propiedades anti-angiogénicas del vítreo humano y se intentó bloquear dicha actividad con anticuerpos capaces de inmunosequestrar a las vasoinhibinas.



**Figura 3. Vasoinhibinas (Vi) presentes en vítreo humano.** (A) Análisis por Western blot de las proteínas tipo vasoinhibinas presentes en 80 $\mu$ g de proteína de vítreo de un paciente control (C) y de cuatro pacientes con retinopatía diabética proliferativa (RDP) empleando el anticuerpo anti-PRL ( $\alpha$ -PRL). (B) Western blot representativo de una de las muestras de vítreo mostrada en (A) reveladas con el anticuerpo monoclonal anti-PRL que reacciona con el extremo amino-terminal de la molécula (N-Term).

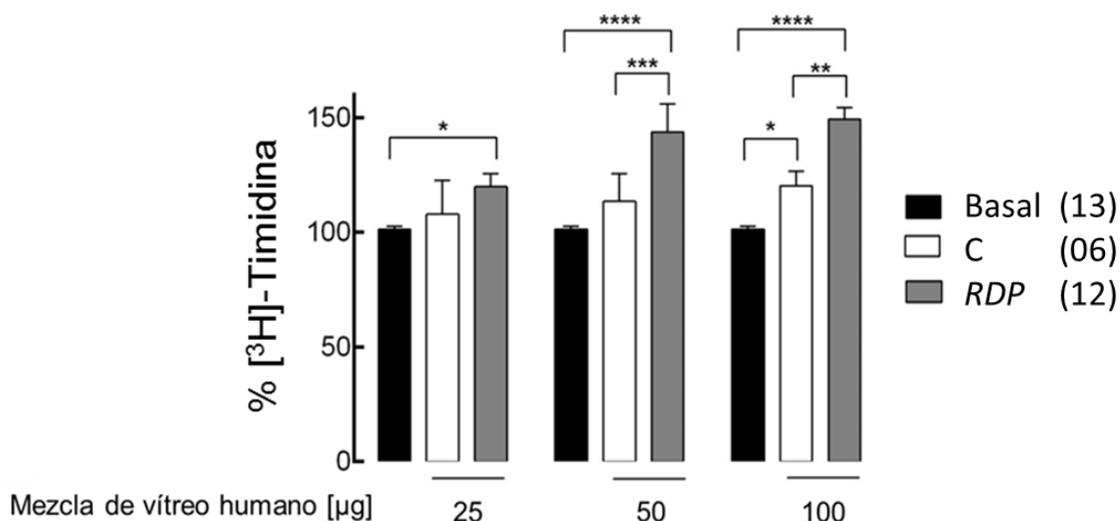
## **7.2 Efecto de vítreos de pacientes control y con RDP sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo**

La actividad anti-angiogénica de vítreos de pacientes control y con RDP se valoró sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo inducida por el factor pro-angiogénico bFGF y valorada a través de la incorporación de timidina tritiada al DNA celular (Fig. 4). Como se esperaba, el bFGF estimuló la proliferación endotelial. La adición del vítreo de pacientes control, mas no la del vítreo de pacientes con RDP, se asoció con el bloqueo del efecto pro-angiogénico del bFGF (**Figura 4A**). Cuando los mismos experimentos se llevaron a cabo en presencia de anticuerpos capaces de inmunosequestrar a las vasoinhibinas endógenas (el anti-PRL;  $\alpha$ -PRL), se bloqueó el efecto antiangiogénico del vítreo control. Sin embargo, la adición de suero normal de conejo (NRS) no modificó el efecto antiangiogénico del vítreo control (**Figura 4B**). Estos hallazgos son consistentes con la posibilidad de que el vítreo de pacientes control posea efectos antiangiogénicos en los que participen vasoinhibinas endógenas y que dicha participación pudiera estar ausente en el vítreo de pacientes con RDP dado que dicho vítreo no modificó el efecto mitogénico del bFGF. También es posible que la ausencia de efecto antiangiogénico en el vítreo de pacientes con RDP pudiera deberse a la mayor abundancia de factores pro-angiogénicos capaces de neutralizar la acción inhibitoria de vasoinhibinas endógenas. Procedimos entonces a evaluar el efecto de los vítreos de ambos grupos sobre la proliferación basal, en ausencia de bFGF, de las células endoteliales en cultivo.



**Figura 4. Vasoinhibinas presentes en vítreos de pacientes control pero no de pacientes con retinopatía diabética proliferativa inhiben la proliferación de células endoteliales.** (A) Incorporación de timidina tritiada (<sup>3</sup>H)-timidina) al ADN de células endoteliales bovinas derivadas de la vena umbilical incubadas en presencia (+) o ausencia (-) del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), con o sin 25 µg de proteína de vítreo de pacientes control (C) o con retinopatía diabética proliferativa (RDP). (B) Experimento bajo las mismas condiciones que en (A) pero adicionando anticuerpo anti-PRL (α-PRL) o suero normal de conejo (NRS). Los valores se expresan como el promedio ± SEM. Los números en paréntesis indican los valores de n. \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ , \*\*\* $P \leq 0.0008$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$ .

Al respecto, tres diferentes cantidades de proteína total de vítreo (25, 50 y 100 µg) de pacientes con RDP estimularon la proliferación basal de las células endoteliales, mientras que solamente la concentración más elevada (100 µg) del vítreo de pacientes control tuvo un efecto estimulador (Figura 5). Estos hallazgos apoyan la mayor actividad proangiogénica de los vítreos de pacientes con RDP con respecto a los de los pacientes control.

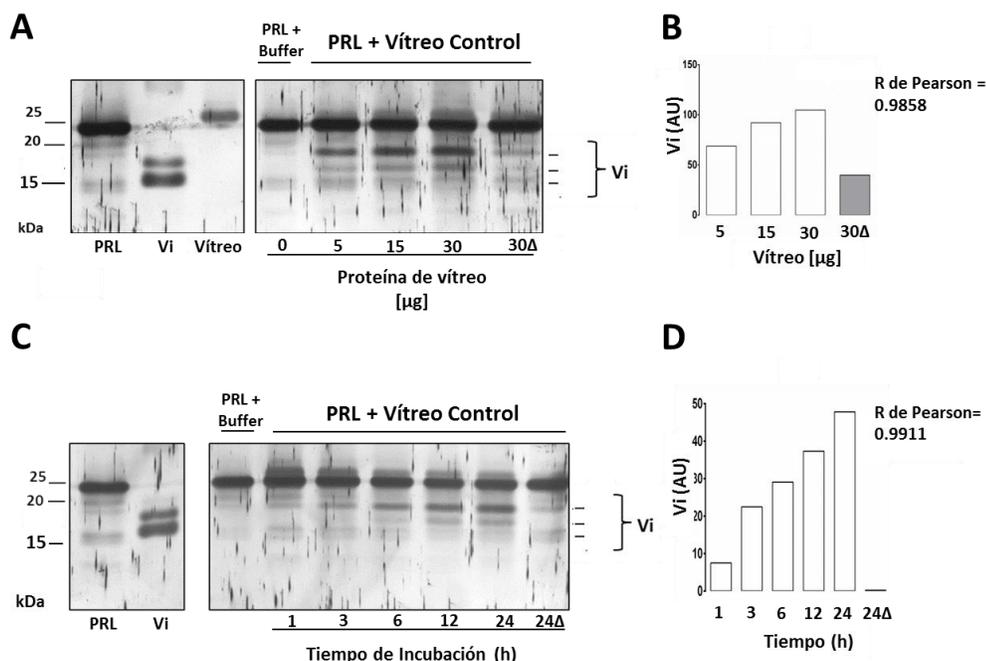


**Figura 5. El vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa RDP es más pro-angiogénico que el vítreo control.** Incorporación de timidina tritiada ( $[^3\text{H}]$ -timidina) al ADN de células endoteliales bovinas derivadas de la vena umbilical incubadas en la presencia o ausencia (basal) de distintas concentraciones (25, 50 y 100  $\mu\text{g}$ ) de una mezcla de vítreos de pacientes control (C) o con retinopatía diabética proliferativa (RDP). Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. Los números en paréntesis indican los valores de n. \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ , \*\*\*  $P \leq 0.0008$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$

### 7.3. El vítreo contiene proteasas que cortan a la PRL en fragmentos de 15 a 18kDa

Con el propósito de analizar si la menor y mayor capacidad angiogénica y antiangiogénica; respectivamente, del vítreo control podría asociarse con una actividad diferencial de proteasas capaces de generar vasoinhibinas presentes en el vítreo, investigamos la actividad de dichas proteasas en el vítreo de pacientes control. Una preparación de PRL recombinante humana se incubó con diferentes concentraciones de proteínas del vítreo de un paciente control (**Figura 6 A, B**) y por diferentes periodos de incubación (**Figura 6 C, D**). Las incubaciones se llevaron a cabo a un pH neutro (pH 7.4), y los productos generados por la proteólisis de la PRL se evaluaron mediante Western blot

con anti-suero anti-PRL ( $\alpha$ -PRL). El análisis por Western blot mostró que la PRL es cortada hacia fragmentos de 15 a 18kDa y que el corte es dependiente tanto de la concentración de proteína del vítreo como del tiempo de incubación. Asimismo, la proteólisis se debe a la actividad de proteasas debido a que dicho procesamiento prácticamente desapareció al inactivar el vítreo con calor (**Figura 6 A-D**).

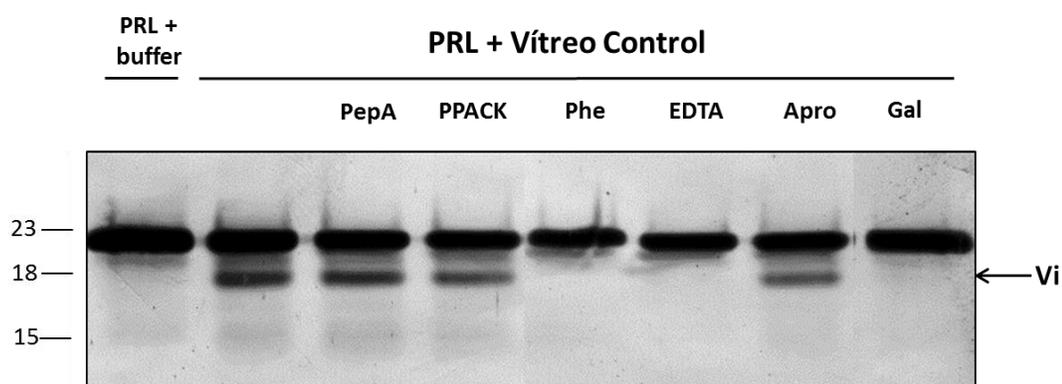


**Figura 6. Proteasas presentes en el vítreo humano procesan proteolíticamente a la PRL humana.** (A) Análisis por Western blot de los productos generados mediante la incubación de PRL recombinante humana con distintas concentraciones de proteína de un vítreo de un paciente control durante 24h. Se observa la presencia de fragmentos de PRL de 15 a 18 kDa. (B) Cuantificación por densitometría de los fragmentos de PRL generados presentado en (A). (C) Análisis por Western blot de los productos generados por la incubación de PRL recombinante humana con 15 μg de proteína de un vítreo control durante diferentes tiempos de incubación. (D) Cuantificación por densitometría de los fragmentos de PRL generados presentado en (C). Δ: Vítreo inactivado con calor. Vi: Vasoinhibinas. AU: Unidades arbitrarias.

## 7.4 Los fragmentos de 15-18kDa de la PRL generados por el vítreo son vasoinhibinas y resultan de la acción de MMP

La naturaleza de los fragmentos generados por el corte proteolítico de la PRL fue analizada mediante Western blot revelados con el anticuerpo monoclonal dirigido contra la región amino terminal de la prolactina (*N-Term*), característica de las vasoinhibinas (**Figura 7**). En efecto, se acepta que sólo los fragmentos de PRL que contienen su extremo amino terminal poseen propiedades anti-angiogénicas (Khurana *et al* 1999). Se encontró que los anticuerpos *N-Term* identificaron los fragmentos de PRL de 15-18 kDa con una intensa marca en una banda de 17kDa, que corresponde a las vasoinhibinas (Figura 7).

La identidad de las proteasas responsables del corte proteolítico de la PRL humana se definió al incubar previamente el vítreo control con distintos inhibidores de proteasas. Se observó que el corte de la PRL humana se bloqueó en presencia de los inhibidores de MMP: EDTA, 1-10 fenantrolina (Phe), o galardina (Gal). Aún más, el corte no se alteró por acción de otros inhibidores de proteasas tales como el inhibidor de proteasas de serina (aprotinina, Apro), de trombina (PPACK) o de catepsina D (pepstatina A, PepA) (**Figura 7**).

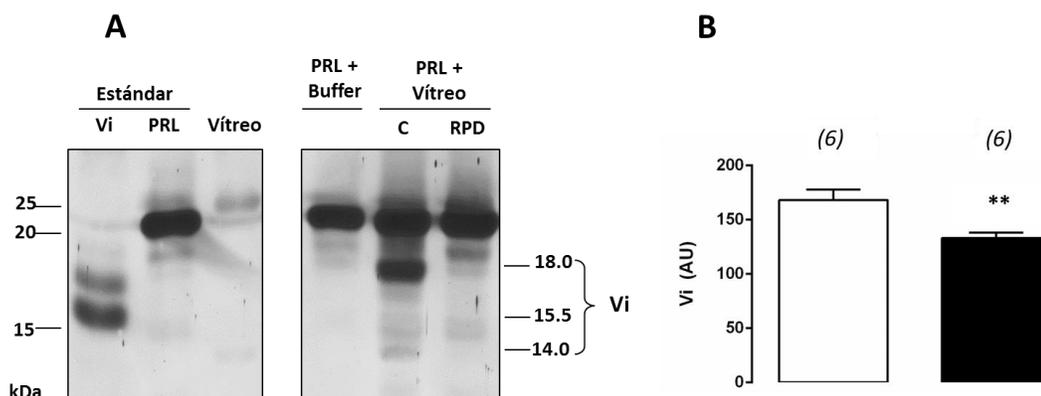


**Figura 7. MMP presentes en el vítreo humano cortan a la PRL humana hacia vasoinhibinas.** Análisis por Western blot de los fragmentos de PRL generados por la incubación de 15  $\mu$ g de proteína de vítreo de pacientes control con 200 ng de PRL humana

recombinante en presencia o ausencia del inhibidor de Catepsina D (PepA), de trombina (PPACK), de proteasas de serina (Apro) y los inhibidores de las MMP (EDTA, Phe y Gal). La incubación se llevó a cabo a un pH neutro y el Western blot fue revelado con el anticuerpo N-Term. La flecha indica la vasoinhibina generada de 17 kDa. El control negativo corresponde a la PRL incubada bajo las mismas condiciones pero en ausencia de vítreo.

## 7.5 La generación de vasoinhibinas por MMP intravitrales es menor en pacientes con RDP

Una vez establecida la presencia de MMP intravitrales capaces de generar vasoinhibinas, se decidió evaluar si su actividad variaba en la PDR. Con este propósito se comparó el procesamiento proteolítico de la PRL recombinante por el vítreo control y el vítreo proveniente de pacientes con RDP. El análisis por Western blot revelado con el anticuerpo N-Term mostró que la incubación de la PRL con vítreos de pacientes control resulta en una mayor generación de vasoinhibinas que la incubación con los vítreos de pacientes con RDP (**Figura 8A**). Esta diferencia es estadísticamente significativa cuando se evalúa la densitometría de las bandas correspondientes a vasoinhibinas (**Figura 8B**). Esto sugiere que la generación de vasoinhibinas en el vítreo pudiera disminuir en la RD.



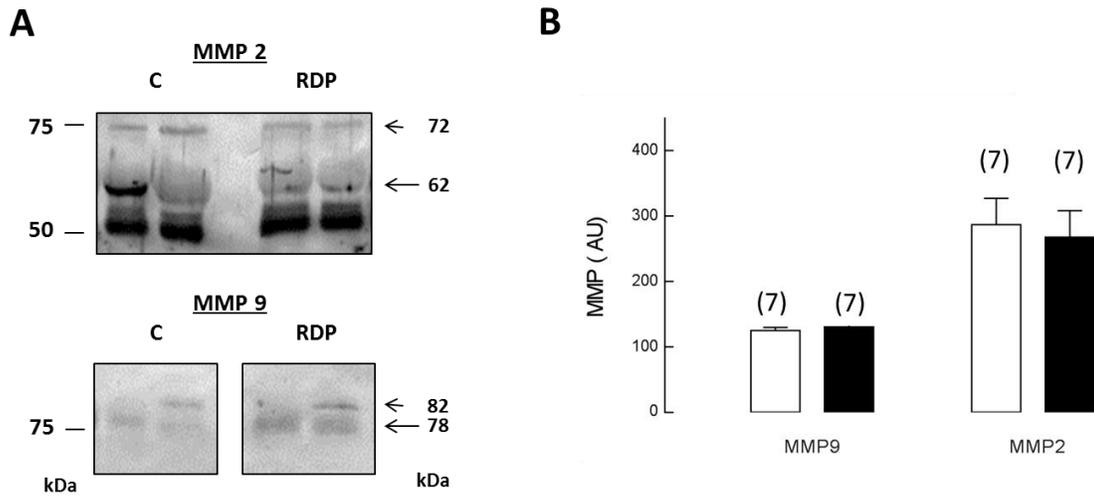
**Figura 8. La actividad de MMP del vítreo para generar vasoinhibinas es menor en la RDP.** (A) Western blot representativo revelado con el anticuerpo monoclonal N-Term que muestra los productos de proteólisis de la PRL recombinante incubada con vítreos de pacientes control y de pacientes con RDP. Los pesos moleculares (kDa) de proteínas

marcadoras se muestran a la derecha. Se muestra la migración de preparaciones estándar de vasoinhibinas humanas (Vi), de la PRL humana recombinante (PRL) y del vítreo de un paciente control sin incubar. **(B)** Cuantificación por densitometría de todas las vasoinhibinas (14-18 kDa) generadas por la incubación con vítreos control (barra blanca) y con vítreos de pacientes con RDP (barra negra) Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. Los números en paréntesis indican los valores de n. **\*\*  $P \leq 0.01$** . AU: unidades arbitrarias

## **7.6 La cantidad de MMP vítreas es similar entre pacientes control y con RDP**

La menor actividad de MMP capaces de generar vasoinhibinas en los vítreos de pacientes con RDP llevó a plantear la posibilidad de la producción de MMP oculares disminuyera en la RDP. Sin embargo, esta posibilidad no se apoya en la literatura. Diversos estudios han mostrado que las MMP juegan un papel importante en el desarrollo de la RD (Sivak *et al* 2002), y hay una mayor actividad de la MMP-2 y MMP-9 en vítreos de pacientes con RDP (Mohammad *et al* 2012, Sivak *et al* 2002).

El análisis por Western blot mostró la presencia de las MMP 2 y 9 precursoras (inactivas) y de las formas activas (de menor peso molecular), así como su presencia similar entre los vítreos de pacientes control y con RDP (**Figura 9 A, B**). Eso sugiere, que la diferencia en generación de vasoinhibinas debida a MMP entre los dos grupos de pacientes se debe a otras MMP y/o a una diferente actividad catalítica de las MMP intravitrales.



**Figura 9. Las metaloproteasas de matriz MMP-2 y 9 están presentes en vítreos de pacientes control y con retinopatía diabética proliferativa.** (A) Western blot representativo de las MMP-2 y MMP-9 presentes en vítreos de pacientes control (C) y con retinopatía diabética proliferativa (RDP). Se señala con la cabeza de flecha del lado derecho de la figura los pesos moleculares de la isoforma precursora (MMP2) y el propéptido (MMP9) y con una flecha los de las enzimas activas. (B) Cuantificación por densitometría de las MMP activas presentes en los vítreos de pacientes control (barra blanca) y con RDP (barra negra). Los números en paréntesis indican los valores de n. AU: Unidades arbitrarias

## VIII DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis muestran que en el vítreo humano existen enzimas pertenecientes a la familia de las metaloendopeptidasas capaces de procesar a la prolactina hacia vasoinhibinas. En condiciones patológicas como la retinopatía diabética (RD), la generación de las vasoinhibinas se ve alterada, pudiendo contribuir a la mayor actividad pro-angiogénica observada en los vítreos de estos pacientes. Finalmente, parte de esta respuesta podría explicarse por la actividad biológica que muestran las vasoinhibinas presentes en el vítreo, como inhibidores de la proliferación de células endoteliales.

A continuación, se discuten los hallazgos antes mencionados en relación al desarrollo y progresión de la RD.

El cuerpo vítreo es un gel que rellena la cámara posterior del ojo, entre la retina y el cristalino. El vítreo es avascular y está compuesto de aproximadamente 99% de agua, una matriz de colágeno, glicosaminglicanos y una población pequeña de hialocitos (Ross y Pawlina 2011). Debido a su composición, se tenía el concepto de que la única función del vítreo era la de rellenar la cámara posterior ocular. Sin embargo, en las últimas décadas se reconoce que el vítreo participa en el desarrollo y mantenimiento del ojo, así como en la progresión de diversas patologías oculares (Holekamp 2010; Nickerson 2005). Un claro ejemplo de esto, es su contribución a la patogénesis de la RD.

El vítreo pierde su avascularidad durante etapas avanzadas de la retinopatía diabética, cuando los nuevos vasos sanguíneos retinianos lo invaden causando hemorragias y la formación de un tejido fibroso que puede desprender la retina ocasionando pérdida de visión o ceguera. La invasión vascular del vítreo se ve favorecida por un desequilibrio a favor de factores pro-angiogénicos tales como el VEGF y el factor de crecimiento derivado

de plaquetas (PDGF), entre otros, cuya concentración se incrementa en el vítreo de pacientes con RD proliferativa (RDP) (Abcouwer 2013).

En este trabajo comparamos por primera vez las propiedades angiogénicas del vítreo proveniente de pacientes con RDP con las de los pacientes control y presentamos evidencias de que la mayor generación de vasoinhibinas vítreas podría influir sobre la mayor actividad antiangiogénica y menor actividad angiogénica del vítreo de pacientes control. Así, proponemos que una disminución en los niveles endógenos de las vasoinhibinas en el vítreo de pacientes con RDP promovería alteraciones vasculares que caracterizan a este padecimiento.

En la primera parte del estudio intentamos evaluar los niveles de las vasoinhibinas de los vítreos a través de la técnica de Western blot, un ensayo semicuantitativo que es el único disponible para evaluar a estos péptidos y que adolece de una sensibilidad reducida y de la dificultad de detectar diferencias pequeñas de concentración. Con este método detectamos proteínas con inmunoreactividad tipo-PRL que probablemente corresponden a vasoinhibinas dado su peso molecular aparente (15 a 18 kDa) y su reactividad con anticuerpos policlonales anti-PRL y con el anticuerpo monoclonal anti-PRL dirigido contra el extremo amino-terminal de la hormona, también presente en vasoinhibinas. Sin embargo, las posibles vasoinhibinas solamente se detectaron en el 13.5% de las muestras vítreas analizadas. Esto denota concentraciones pequeñas de vasoinhibinas en el vítreo y, por ende, la necesidad de implementar un método más sensible para su detección. Al respecto, la inmunoprecipitación de vasoinhibinas previa al Western blot permitiría evaluar volúmenes mayores de vítreo a los valorados en este estudio (500 vs. 10-30  $\mu$ l). Para esto se deberán obtener mayores volúmenes de vítreo por paciente y/o llevar a cabo el agrupamiento de los vítreos de varios pacientes.

Diversos estudios han sugerido la presencia de factores antiangiogénicos en el vítreo responsables de impedir su vascularización bajo condiciones fisiológicas (Clapp *et al* 2008). De hecho, se han medido factores antiangiogénicos en el vítreo normal de roedores (Sheibani *et al* 2000 ) y humanos (Kim *et al* 2006, Simó *et al* 2006 ), que incluyen al factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF) y a la trombospondina. La ausencia de vascularización es esencial para la transparencia vítrea y, consecuentemente, para la transferencia de la luz y la fototransducción en la retina. En este trabajo demostramos las propiedades antiangiogénicas del vítreo control. Encontramos que el vítreo de pacientes control inhibe la estimulación de la proliferación de células endoteliales inducida por el bFGF y que dicho efecto inhibitorio se bloquea con anticuerpos capaces de inmunosequestrar a las vasoinhibinas. Este último resultado es interesante pues sugiere que, a pesar de su baja concentración, las vasoinhibinas contribuyen significativamente al efecto anti-angiogénico del vítreo bajo condiciones fisiológicas. Más aún, los hallazgos de nuestro trabajo sugieren que la participación de las vasoinhibinas vítreas se altera durante la RDP. Encontramos que el vítreo de pacientes con RDP no solamente no inhibió el efecto angiogénico del bFGF, sino por si mismo estimuló la proliferación endotelial en concentraciones menores a las concentraciones proangiogénicas del vítreo control. La actividad angiogénica diferencial de los vítreos es consistente con lo reportado previamente en la literatura de que existe mayor concentración de factores pro-angiogénicos en el vítreo y en la retina de pacientes con RD en relación a los vítreos de pacientes no-diabéticos (Kim *et al* 2006; Abu El-Asrar *et al* 2011, Khan *et al* 2003). De tal manera, es posible proponer que la mayor actividad pro-angiogénica del vítreo en la RDP implica mayor concentración de factores pro-angiogénicos y disminución de los antiangiogénicos que presumiblemente incluyen a las vasoinhibinas.

Para analizar dicha posibilidad evaluamos si la generación de vasoinhibinas en el vítreo podría verse disminuida en la RDP. Para esto, incubamos una preparación de PRL recombinante humana con diferentes concentraciones de proteína del vítreo de pacientes control y con RDP. Encontramos que ambos vítreos contienen MMP capaces de procesar a la PRL hacia una vasoinhibina predominante de 17 kDa y que su actividad es mayor en los vítreos de pacientes control. Las MMP son enzimas proteolíticas involucradas en la remodelación y mantenimiento de la arquitectura de los tejidos, incluyendo al ojo. Múltiples patologías oculares han sido relacionadas con la expresión de las MMP, debido a que éstas están involucradas en procesos tales como inflamación, señalización celular, invasión y neovascularización (Sivak *et al* 2002). Al respecto, en el vítreo humano se ha identificado la presencia de las MMP 1, 2, 3, y 9 (Sivak *et al* 2002; Plantner *et al* 1997). Además, en la RDP humana se ha encontrado aumento en la expresión y actividad gelatinolítica de las MMP- específicamente de las MMP 2 y 9 en el vítreo y retina (Brown *et al* 1994). En nuestro trabajo, la mayor actividad de las MMP para generar vasoinhibinas no pareciera resultar de su mayor concentración. En relación con esto, encontramos niveles similares de las MMP 2 y 9 en los vítreos de ambos grupos de pacientes. No obstante, cabe volver a mencionar que la evaluación por Western blot es semicuantitativa y no permite evaluar diferencias pequeñas que pudieran tener valor biológico. También es posible que las MMP responsables de la mayor generación de vasoinhibinas en los vítreos control no sean las MMP 2 y la 9, ya que las otras MMP que se sabe están presentes en el vítreo (MMP1 y 3) también procesan a la PRL hacia vasoinhibinas (Macotela *et al* 2006).

Como se mencionó antes, las vasoinhibinas han sido detectadas en la retina de roedores (Aranda *et al* 2005; Arnold *et al* 2010) y en las membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro (Dueñas *et al* 2004). Estos péptidos pueden generarse a

partir de PRL sistémica que se incorpora al ojo, muy probablemente a través de sus receptores presentes en los cuerpos ciliares (Arnold *et al* 2010). También es posible que las vaso inhibinas resulten del procesamiento de PRL sintetizada intraocularmente. Por otra parte, tanto el ARNm de PRL como la proteína han sido identificados en distintos tipos celulares de la retina de ratas y monos (Aranda *et al* 2005; Rivera *et al* 2008). Igualmente, el ARNm de la PRL se expresa en los vasos sanguíneos de las membranas fibrovasculares retrolentales (Dueñas *et al* 2004).

La importancia de las vaso inhibinas intraoculares reside en sus propiedades antiangiogénicas e inhibitorias de la vasopermeabilidad y vasodilatación ocular (Clapp *et al* 2008). Estos péptidos participan en la inhibición natural de la angiogénesis retiniana (Aranda *et al* 2005) y su administración frena la progresión de la retinopatía diabética experimental en la rata (García *et al* 2008; Ramírez *et al* 2011; Arnold *et al* 2010). Además, hay evidencias de que los niveles circulantes de vaso inhibinas se reducen en pacientes con RDP (Triebel *et al* 2009). El presente trabajo reafirma la posible influencia de las vaso inhibinas en la progresión de las retinopatías vasoproliferativas, en particular en la diabética. Nuestros resultados son consistentes en que las vaso inhibinas están presentes en el vítreo humano y que su generación y, por ende, su actividad, se reduce en la retinopatía diabética

Finalmente, este trabajo de tesis permitió mostrar que los vítreos de pacientes con retinopatía diabética poseen una mayor actividad proangiogénica, así como una menor respuesta antiangiogénica comparados con los vítreos de pacientes control. Proponemos que el desequilibrio en la generación y acción de las vaso inhibinas en la RDP favorece la progresión de esta enfermedad a través de la reducción del ambiente normalmente antiangiogénico que caracteriza al vítreo sano, así como la promoción de factores pro-

angiogénicos. En conclusión, los hallazgos de este trabajo de tesis confirman la importancia de las vasoinhibinas en el mantenimiento del ambiente avascular del vítreo sano así como en la prevención y origen de la retinopatía diabética.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abcouwer S.F. (2013) Angiogenic Factors and Cytokines in Diabetic Retinopathy. *J Clin Cell Immunol* S1
- Abu El-Asrar, A. M., Nawaz, M. I., Kangave, D., Siddiquei, M. M., Ola, M. S., & Opdenakker, G. (2011). Angiogenesis regulatory factors in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Diabetol*, 50:545–551
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, Lopez-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2005) Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2947–2953.
- Arnold, E., Rivera J., Thebault S., Moreno-Páramo D. et al., (2010) High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*, 59(12):3192-7.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19(3), 225-268.
- Brown, D., Hamdi, H., Bahri, S., Kenney, M.C., (1994). Characterization of an endogenous metalloproteinase in human vitreous. *Curr Eye Res*, 13 (9), 639–647.
- Cai, J., & Boulton, M. (2002); The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye (Lond)*, 16(3), 242-260.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936.
- Chen, C., & Shah, C. P. (2011). Review of therapeutic advances in diabetic retinopathy. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2(1) 39-53.
- Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab*, 17: 301–307.
- Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. (1993) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*;133: 1292–1299.
- Clapp, C., & Weiner, R. I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*, 130(3), 1380-1386.

Clapp, C., Thebault, S., Arnold, E., García, C., Rivera, J. C., & Escalera, G. M. de la. (2008). Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(4), E772-E778.

Cole J. (2012), New Report: Diabetic Retinopathy Rates Spike. *Review of Optometry*. Consultado el 22 de febrero de 2014, <http://www.revoptom.com/content/c/36079>

Cruz-Soto, M. E., Cosio, G., Jeziorski, M. C., Vargas-Barroso, V., Aguilar, M. B., Carabez, A., Berger, P., et al. (2009). Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipofyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology*, 150(12), 5446-5454.

D'Angelo, G. Struman I., Martial J., Weiner R. (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 16kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 6374–6378.

Dhanabal, M., & Sethuraman, N. (2006). Endogenous angiogenesis inhibitors as therapeutic agents: historical perspective and future direction. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 1(2), 223-236d.

Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. (2007) Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 52, Suppl 1: S3–S19.

Dueñas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, Lopez-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2004) Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2049–2055.

Dueñas, Z., Torner, L., Corbacho, A. M., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., Barrios, F. A., et al. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest. Ophthalmol. Vision Sci.*, 40(11), 2498-2505.

Durham, J. T., & Herman, I. M. (2011). Microvascular modifications in diabetic retinopathy. *Current diabetes reports*, 11(4), 253-264.

Garcia C, Aranda J, Arnold E, Thebault S, Macotela Y, Lepez- Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Hernandez-Montiel HL, Lin SH, de la Escalera GM, Clapp C. (2008) Vasoinhibins prevent increased retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*, 118: 2291–2300.

- Garcia C, Aranda J, Arnold E, Thebault S, Macotela Y, Lepez- Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Hernández-Montiel HL, Lin SH, de la Escalera GM, Clapp C. (2008) Vasoinhibins prevent increased retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*, 118: 2291–2300.
- Ge G, Fernandez CA, Moses MA, Greenspan DS. (2007) Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104: 10010–10015.
- Gerhardinger C, Brown LF, Roy S, Mizutani M, Zucker CL, Lorenzi M. (1998) Expression of vascular endothelial growth factor in the human retina and in nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Pathol.*; 152:1453–1462.
- Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., et al. (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*, 145(12), 5714-5722.
- Heng, L. Z., Comyn, O., Peto, T., Tadros, C., Ng, E., Sivaprasad, S., & Hykin, P. G. (2013). Diabetic retinopathy: Pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabetic Medicine*, 30, 640-650.
- Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., Forster, O., et al. (2007). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell*, 128(3), 589-600.
- Holekamp, N. M. (2010). The vitreous gel: more than meets the eye. *Am. J. Ophthalmol.*, 149(1), 32-36.
- Khan Z. A., Chakrabarti S. (2003) Growth Factors in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Experimental Diab. Res.*, 4:287–301.
- Kim, S. J., Kim, S., Park, J., Lee, H. K., Park, K. S., Yu, H. G., & Kim, Y. (2006). Differential expression of vitreous proteins in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*, 31(3), 231-240.
- Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, Weiner RI. (1998) Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression, *Endocrinology* 139: 3696– 3703.
- Lee SH, Kunz J, Lin SH, Yu-Lee LY. (2007). 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res*, 67: 11045–11053.

Majka, S., McGuire, P., Colombo, S., Das, A., (2001). The balance between proteinases and inhibitors in a murine model of proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vision Sci*, 42 (1), 210–215.

Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. (2000)The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol*,14: 1536–1549.

Nickerson C. S. (2005) Engineering the mechanical properties of ocular tissues. Defensa de tesis doctoral, no publicada. California Institute of Technology, Pasadena, California, E.U.A.

Ofofu, F. A., Modi, G. J., Hirsh, J., Buchanan, M. R., & Blajchman, M. A. (1986). Mechanisms for inhibition of the generation of thrombin activity by sulfated polysaccharides. *Ann NY Acad Sci*, 485, 41-55

O’Steen WK, Sundberg DK. (1982) Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res*.14: 54–62.

Pan, H., Nguyen, N.-Q.-N., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L. C., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., et al. (2004) Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vision Sci*, 45(7), 2413-2419

Pederson JE, Toris CB. (1985)Experimental retinal detachment. IX. Aqueous, vitreous, and subretinal protein concentrations. *Arch Ophthalmol* 103:835– 836

Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V. (2004) Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol* 18: 2522–2542.

Pleyer U, Gupta D, Weidle EG, Lisch W, Zierhut M, Thiel HJ. (1991)Elevated prolactin levels in human aqueous humor of patients with anterior uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 229: 447–451.

Ramirez, M., Colosi, P., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., Escalera, G. M. de la, Clapp, C., Jeziorski, M. C., et al. (2011). Vasoinhibin Gene Transfer by Adenoassociated Virus Type 2 Protects against VEGF- and Diabetes-Induced Retinal Vasopermeability. *Retina* 52 (12) 8944-8950

Rask-Madsen, C., & King, G. L. (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab*, 17(1), 20-33. Elsevier Inc.

Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya’ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P., & Mariotti, S. P. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(11), 844-851

Rivera JC, Aranda J, Riesgo J, Nava G, Thebault S, López-Barrera F, Ramirez M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2008) Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res* 86: 314–321.

Rojas Dosal J.A. y Lima Gómez V. (2008) Retinopatía Diabética. *Seminario El Ejercicio Actual de la Medicina*. Facultad de Medicina UNAM. Consultado el 22 de febrero de 2014. [http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/may\\_02\\_ponencia.html](http://www.facmed.unam.mx/sms/seam2k1/2008/may_02_ponencia.html)

Ross M. H., Pawlina W. (2011) *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. (6th ed) Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.

Sebag, J. (1993). Abnormalities of human vitreous structure in diabetes. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 231(5), 257-260

Sheibani N, Sorenson C, Cornelius LA, Frazier WA (2000). Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, is present in vitreous and aqueous humor and is modulated by hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 267: 257-61.

Simo, R. & Hernandez, C. (2008) Intravitreous anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia*, 51, 1574-1580

Sinha, Y.N. (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, 16(3), 354-369

Sivak, J. M., & Fini, M. E. (2002). MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Progress in retinal and eye research*, 21(1), 1-14

Sivalingam J, Kenney GC, Brown WE, Benson WE, Donoso L. (1990) Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*.108: 869 – 872.

Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner RI, Martial JA, 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.

Torner, L. et al. (1995) A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136, 5454–5460

Triebel, J., M. Huefner, and G. Ramadori, (2009) Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol*, 161(2): 345-53.

"Western Blotting Protocols - A Comprehensive List." Merck Millipore. N.p., n.d. Web. 16 Feb. 2014.

Zheng Y, He M, Congdon N.( 2012) The worldwide epidemic of diabetic retinopathy.  
*Indian J Ophthalmol*, 60:428-31

## ANEXO I: LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Apro</b>	Aprotinina
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
<b>BMP-1</b>	Proteína morfogénica del hueso -1
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>C</b>	Control- pacientes no diabéticos
<b>Ca<sup>2+</sup>-CaM</b>	Ca <sup>2+</sup> calmodulina
<b>CD</b>	Catepsina D
<b>cGMP</b>	Guanosin monofosfato cíclico
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>eNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico endotelial
<b>Gal</b>	Galardina
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inostilo trifosfato
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>MAPK</b>	Cinasas activadas por mitógenos
<b>MMP</b>	Metaloproteasas de matriz
<b>NFκB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NRS</b>	Suero control
<b>N-term</b>	Amino terminal
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PEDF</b>	Factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario
<b>Phe</b>	Fenantrolina
<b>PKG</b>	Proteína cinasa G
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PP2A</b>	Proteína fosfatasa 2A
<b>PPACK</b>	D-Phe-Pro-Arg Clorometilcetona
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>RD</b>	Retinopatía diabética
<b>RDP</b>	Retinopatía diabética proliferativa
<b>ROP</b>	Retinopatía del prematuro
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>TIMP-2</b>	Inhibidor tisular de metaloproteasas 2
<b>uPA</b>	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento vascular endotelial
<b>Vi</b>	Vasoinhibinas