



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Biología



*ANÁLISIS DE LAS VASOINHIBINAS RETINIANAS Y SU GENERACIÓN
OCULAR EN RATAS DIABÉTICAS Y NO DIABÉTICAS*

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

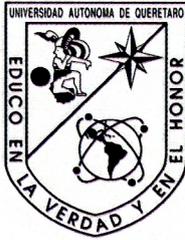
Presenta

Elva Hortencia Adán Castro

Dirigido por

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.

Santiago de Querétaro, Qro. México, Abril 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología



*ANÁLISIS DE LAS VASOINHIBINAS RETINIANAS Y SU GENERACIÓN
OCULAR EN RATAS DIABÉTICAS Y NO DIABÉTICAS*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta

Elva Hortencia Adán Castro

Exp. 197092

Dirigido por

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.

Dr. María del Carmen Clapp Jiménez L.
Director

Firma

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Sinodal

Firma

Dra. Yazmín Macotela Guzmán
Sinodal

Firma

Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández
Sinodal

Firma

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro. México, Abril 2014

RESUMEN

Las vasoinhibinas (Vi) son una familia de péptidos anti-angiogénicos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL). Dado que las vasoinhibinas están presentes en la retina y la retinopatía diabética está determinada por la angiogénesis retiniana, nuestra hipótesis es que en la condición diabética ocurre una regulación a la baja en la producción de Vi que podría favorecer a la progresión de esta enfermedad. Por lo tanto, nosotros investigamos los niveles de vasoinhibinas en la retina y la proteólisis de la PRL en los ojos de ratas diabéticas y no diabéticas.

Para inducir la diabetes, las ratas fueron tratadas con una inyección de estreptozotocina o vehículo. Cuatro semanas después, las vasoinhibinas presentes en la retina fueron evaluadas por Western blot. La actividad de las proteasas oculares encargadas de generar vasoinhibinas a partir de la PRL, fue evaluada mediante una inyección de PRL recombinante en el ojo de ratas tanto diabéticas como no-diabéticas y los productos de la proteólisis presentes en el vítreo a diferentes tiempos, fueron analizados por Western blot.

Los resultados obtenidos mostraron altos niveles de vasoinhibinas en la retina de ratas diabéticas con respecto a las retinas no-diabéticas. La PRL inyectada en el vítreo fue parcialmente convertida hacia vasoinhibinas desde las 2 y hasta las 24 horas después de la inyección. Tanto la PRL como las vasoinhibinas resultantes fueron degradadas con el tiempo y esto ocurrió en mayor grado en los ojos de las ratas diabéticas.

Estos resultados sugieren que en la condición de diabetes aumentan las proteasas oculares capaces de generar pero también de degradar a las vasoinhibinas. El equilibrio entre estas acciones proteolíticas podrían promover la estabilidad de las vasoinhibinas retinianas para ayudar a contrarrestar la angiogénesis en la retinopatía diabética.

Palabras clave: *vasoinhibinas, diabetes mellitus, retinopatía diabética, angiogénesis.*

SUMMARY

Vasoinhibins are a family of antiangiogenic peptides derived from prolactin (PRL) by proteolytic cleavage. Given that vasoinhibins are present in the retina and excessive retinal angiogenesis determines diabetic retinopathy, we hypothesized that in the diabetic condition, there is a downregulation of retinal vasoinhibins that contributes to the progression of diabetic retinopathy. We therefore compared the levels of vasoinhibins and the activity of PRL cleaving enzymes in the retina of diabetic and non-diabetic rats.

Vasoinhibins in the retina of non-diabetic and diabetic rats treated four weeks prior with a single injection of streptozotocin, were evaluated by Western blot. The activity of ocular proteases generating vasoinhibins from PRL was evaluated by injecting recombinant PRL intravitreally into the eyes of rats and determining vasoinhibins in the vitreous at different time points by Western blot. Higher levels of vasoinhibins were detected in the retina of diabetic rats and compared to non-diabetic counterparts. PRL injected intravitreally was partially converted to vasoinhibins from 2 and up to 24 hours following injection. Both PRL and the resulting vasoinhibins were degraded over time and such proteolytic processing was higher in eyes from diabetic rats.

These findings suggest that the diabetic condition associates with upregulation of ocular proteases able to generate but also degrade vasoinhibins. The balance between these proteolytic actions may promote the stability of retinal vasoinhibins to help counteract pathological angiogenesis in diabetic retinopathy.

Key words: *vasoinhibins, diabetes mellitus, diabetic retinopathy, angiogenesis.*

Dedicatorias

*Dedico este trabajo a **mis padres**, las dos personas que me dieron la vida y desde entonces hasta hoy, me han dado todo y han hecho de mí todo lo que soy, así que cada paso dado, cada obstáculo librado y cada logro, es de ellos también, gracias por su amor, su comprensión, su confianza y toda la fuerza y el apoyo que me dan todos los días.*

A mis hermanos, las personas más increíbles que conozco desde que existo:

***Ramón**, por ser un maestro y filósofo en mi vida. Hiciste que creyera en mí, pensar que todo es posible porque somos capaces y que los límites los ponemos nosotros. Gracias a ti nunca desistí.*

***Ángeles**, hermanita, gracias por consentirme cuando estoy de vacaciones y cumplirme todos mis antojos de comida. Siempre me haces feliz. Gracias por tu apoyo.*

***Mariana**, hermanita, las palabras no alcanzan para decir cuánto te quiero. Gracias por apoyarme en todo, gracias por ser mi amiga y mi cómplice. Gracias por creer siempre en mí.*

***Norma**, hermanita, gracias mostrarme “el mundo”, gracias por ser mi guía, por llevarme de la mano en todo este camino, ¡Aquí puedes soltarme, pues lo mejor de ti, lo depositaste en mí y me hiciste una persona valiente, fuerte y trabajadora. Mira, ya puedo seguir andando sola, pues llevo una antorcha encendida de luz tuya!*

***Luis**, hermanito, gracias por todo tu apoyo, por todo tu amor y por confiar ciegamente en mí.*

Familia, los amo infinitamente.

***Isaías**, estoy feliz de haberte conocido en este camino. Gracias por ser mi amor, amigo, mi compañero y mi cómplice. Gracias por alegrarme todos los días de estos últimos tres años. Siempre has confiado en mí, siempre has estado ahí. Gracias por quererme tanto.*

***Nun DL** por tu amistad y por ser mi guía en el trabajo diario del laboratorio. Por las vivencias y las risas que siempre nos alegran un día pesado.*

***Xaru RH** por tu amistad y por creer en mí. Por todas las pláticas tan entretenidas que siempre resultan liberadoras y alegres. Por escucharme y por tus consejos.*

***Lupita LC** por tu amistad y por toda la paciencia al enseñarme. Por tu complicidad y por comprenderme siempre, por tu ayuda. Pero sobre todo por tu confianza.*

***Fernando LB** por tu amistad y por todo el apoyo tanto técnico como moral, así como por tu cariño de todos los días.*

A ustedes, les digo que los quiero mucho, ¡qué privilegio conocerlos!

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mi directora de tesis, la Dra. Carmen Clapp, por haberme recibido en su laboratorio y hacerme parte de su equipo de trabajo, por su paciencia a lo largo de la realización de este proyecto, por sus enseñanzas, por su comprensión y ayuda en todo momento.

Agradezco con todo mi corazón a mis asesores por su tiempo, su ayuda y por estar siempre disponibles para mí: Dr. Marco Antonio Sánchez, Dra. Yazmín Macotela y Dra. Isabel Méndez.

Gracias al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por abrirme sus puertas.

*Gracias a mi **alma máter**, la Universidad Autónoma de Querétaro por recibirme en su seno y darme una formación de calidad. Hasta hoy entendí la frase que está en letras grandes en tus camiones escolares:*

Te estoy tejiendo un par de alas, sé que te irás cuando termine... pero no soporto verte sin volar.

— Andrés Castuera

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	8
<i>Diabetes Mellitus</i>	8
<i>Componentes oculares</i>	10
<i>Vascularización de la retina</i>	11
<i>Fisiopatología de la RD</i>	12
<i>Tratamientos para la RD</i>	15
<i>La prolactina (PRL)</i>	17
<i>Vasoinhibinas</i>	18
<i>Efectos vasculares y mecanismo de acción de las vasoinhibinas</i>	20
<i>Vasoinhibinas y RD</i>	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
<i>Animales</i>	23
<i>Grupos experimentales</i>	23
<i>Modelo de DM inducido por estreptozotocina</i>	23
<i>Presencia de PRL y vasoinhibinas en la retina de ratas diabéticas y no diabéticas mediante Western blot</i>	24
<i>Proteólisis de la PRL en el vítreo de la rata</i>	25
RESULTADOS	26
1. <i>Detección de vasoinhibinas en la retina de ratas no diabéticas</i>	26
2. <i>Los niveles de vasoinhibinas son mayores en retinas diabéticas respecto a las no diabéticas</i>	28
3. <i>La proteólisis de PRL por proteasas oculares aumenta en las ratas diabéticas con respecto a las no diabéticas</i>	28
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES.....	35
LITERATURA CITADA.....	36

Indice de figuras

Figura 1 Estructura del ojo humano y la retina	11
Figura 2 Esquema de una retina sana y una con retinopatía diabética.	15
Figura 3 Secuencia lineal y estructura terciaria de la PRL humana	18
Figura 4 Representación de los sitios de corte de la PRL por las proteasas Catepsina D y MMP y representación de las vasoinhibinas.....	19
Figura 5 Presencia de las vasoinhibinas en la retina de ratas no diabéticas.....	27
Figura 6 Presencia de las vasoinhibinas en la retina de ratas diabéticas y análisis de los niveles de vasoinhibinas.....	29
Figura 7 Análisis de la proteólisis de la PRL en el vítreo de ratas diabéticas y no diabéticas	30

INTRODUCCIÓN

La formación de vasos sanguíneos o angiogénesis en la retina es la causa de la pérdida de la visión en la retinopatía diabética, que es una de las complicaciones más frecuentes y tempranas de la diabetes. La retinopatía diabética se origina a consecuencia de una reducción severa en la perfusión sanguínea que produce hipoxia en la retina. La hipoxia estimula e inhibe la expresión de factores estimuladores e inhibidores de la vasopermeabilidad y de la angiogénesis, respectivamente. El desequilibrio a favor de factores proangiogénicos resulta en la formación de nuevos vasos sanguíneos en la retina que invaden y sangran en el vítreo donde llegan a formar una membrana fibrovascular que puede ejercer tracción sobre la retina ocasionando su desprendimiento y, por ende, ceguera. Por lo tanto, es claro el gran interés por entender los factores reguladores de la vascularización retiniana capaces de frenar las alteraciones vasculares debidas a la diabetes.

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL) que inhiben la angiogénesis, la vasodilatación y la vasopermeabilidad. Estudios recientes indican que tanto la PRL como las vasoinhibinas están presentes en la retina (Aranda et al., 2005; Rivera et al., 2007), y que estas últimas influyen sobre la vascularización de tejidos oculares bajo condiciones normales y patológicas. La inmunoneutralización de vasoinhibinas induce la proliferación de vasos sanguíneos en la córnea (Dueñas et al., 1999) y en la retina (Aranda et al., 2005) y la administración intraocular de vasoinhibinas inhibe la vasopermeabilidad y la angiogénesis en modelos murinos de retinopatía diabética (Pan et al., 2004; García et al., 2008). De acuerdo a estos estudios se ha propuesto que las vasoinhibinas constituyen reguladores fisiológicos de la vascularización retiniana y, por tanto, que la alteración en sus niveles pudiera influir sobre la progresión de la retinopatía diabética.

En este trabajo de tesis investigamos la presencia de vasoinhibinas en la retina de las ratas no diabéticas y diabéticas y si la actividad de proteasas capaces de generarlas se altera bajo condiciones de diabetes. A continuación se revisan algunos antecedentes generales sobre la diabetes mellitus, la fisiopatología de la retinopatía diabética, y la generación y acciones vasculares de las vasoinhibinas.

ANTECEDENTES

Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades no transmisibles más comunes y actualmente se le considera un problema de salud pública a nivel de pandemia. En el año 2001 se estimó que habría 300 millones de pacientes con DM para el año 2025 (Federación Internacional de Diabetes, 2013). Sin embargo, la realidad ha sobrepasado las expectativas. A finales del año pasado, el número de personas con DM aumentó a 382 millones y se espera que para el año 2035 sean 592 millones. Además, se cree que existen alrededor de 175 millones de personas diabéticas no diagnosticadas. La mayoría de los diabéticos tienen entre 20 y 79 años y el 80% de ellos vive en países de ingresos medios y bajos (Federación Internacional de Diabetes, 2013). México ocupa el sexto lugar a nivel mundial con 8.7 millones de diabéticos y la DM actualmente figura entre las primeras causas de muerte en el país (Gutiérrez et al., 2012).

La DM se describe como una enfermedad crónico degenerativa de carácter heterogéneo debido a su etiología múltiple. Deriva de un trastorno metabólico caracterizado por una condición de hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, que aparece cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina o no puede usar la insulina eficazmente (Harris y Zimmet, 1997). La insulina es una hormona producida por el páncreas que permite que la glucosa de los alimentos entre en las células del cuerpo, donde se convierte en la energía necesaria para que funcionen las células y los tejidos. Una persona con diabetes no absorbe adecuadamente la glucosa, y esta se acumula en la sangre (hiperglucemia) lo cual, con el tiempo daña los tejidos del cuerpo. Este daño puede conducir a una discapacidad y a complicaciones de salud que pueden llegar a ser mortales.

Se reconocen 3 tipos principales de DM, la tipo 1, la tipo 2 y la DM gestacional. La DM tipo 1 se caracteriza por una deficiencia en la secreción de insulina debido a la destrucción de las células beta del páncreas por el sistema inmunológico (Daneman, 2006). A este tipo de diabetes también se conoce como diabetes dependiente de insulina. La DM tipo 2 es la forma más común, su origen es multifactorial y está asociado a la obesidad, mala alimentación, inactividad física,

factores genéticos, etnicidad, etc., (Stumvoll et al., 2005). Con el tiempo estas condiciones pueden conducir a la resistencia de la acción de la insulina que caracteriza a la DM tipo 2 (Deshpande et al., 2008).

En la diabetes gestacional las mujeres desarrollan resistencia a la insulina por lo general, alrededor de la semana 24 del embarazo. La resistencia a la insulina parece deberse a la acción de hormonas producidas por la placenta (Persson y Hanson, 1998).

Existe un estado denominado “prediabetes” que describe una condición en la cual las personas presentan niveles altos de glucosa en sangre, pero no tan altos como para considerarse DM. Se estima que unos 316 millones de personas en el mundo, o sea el 6,9% de la población adulta mundial, se encuentra en esta condición que posee un alto riesgo de progresar a DM tipo 2 (Deshpande et al., 2008).

En cualquier tipo de diabetes, la falta de incorporación de la glucosa a las células resulta en hiperglucemia, la cual desencadena alteraciones bioquímicas que con el tiempo afectan a diversos tejidos del cuerpo y conduce a complicaciones muy severas. Estas complicaciones pueden ser macrovasculares como son daños cardiovasculares, ataques cerebrovasculares y enfermedades vasculares periféricas; y complicaciones microvasculares que producen daños al sistema nervioso (neuropatías), daños renales (nefropatías) y daños oculares (retinopatía diabética; RD) (Cai y Boulton, 2002).

La RD se define como una complicación microvascular crónica que provoca lesiones, oclusión y proliferación de los vasos sanguíneos de la retina (Powers, 2005, Cheung et al., 2010). Para poder entender la importancia de la vascularización retiniana y cómo la calidad visual se ve seriamente afectada por la RD es necesario explicar algunos aspectos de los componentes oculares.

Componentes oculares

La retina es la capa más interna del ojo, está conformada por tejido neural y se encarga de captar y convertir la luz en impulsos eléctricos que, en el sistema nervioso central, dan lugar a la percepción visual. La luz recorre de forma sucesiva la córnea, el humor acuoso, el cristalino y el cuerpo vítreo hasta llegar a la retina (Figura 1A). Este eje visual debe permanecer transparente para que la luz pueda pasar sin sufrir alguna desviación y dicha transparencia se relaciona con la ausencia de vascularización. La córnea, el cristalino, el vítreo y la cara externa de la retina son avasculares, toman el oxígeno y los nutrimentos por difusión a partir de los fluidos oculares. El cuerpo vítreo es un gel que ocupa la cámara posterior del ojo y está mayormente compuesto por agua, colágeno y ácido hialurónico. El vítreo contribuye a mantener la presión ocular, evita que el globo ocular se colapse, absorbe impactos y mantiene a la retina en su posición. La retina está formada por diversos tipos celulares distribuidos en diez capas (Figura 1B) que a partir de su límite con el vítreo corresponden a la membrana limitante interna (MLI), la capa de fibras nerviosas (CFN) formada por prolongaciones de axones de las células ganglionares; la capa de células ganglionares (CCG), la capa plexiforme interna (CPI), la capa nuclear interna (CNI) constituida por los núcleos de las células bipolares, amacrinas y horizontales; la capa plexiforme externa (CPE) formada por fibras nerviosas que provienen de los fotorreceptores (conos y bastones); la capa nuclear externa (CNE), la membrana limitante externa (MLE), la capa de fotorreceptores (CF) y finalmente, el epitelio pigmentario retiniano (EPR). Las células del EPR contienen gran cantidad de melanina, que absorbe el exceso de luz e impide su reflejo sobre otras partes de la retina y el consecuente deterioro de la percepción visual.

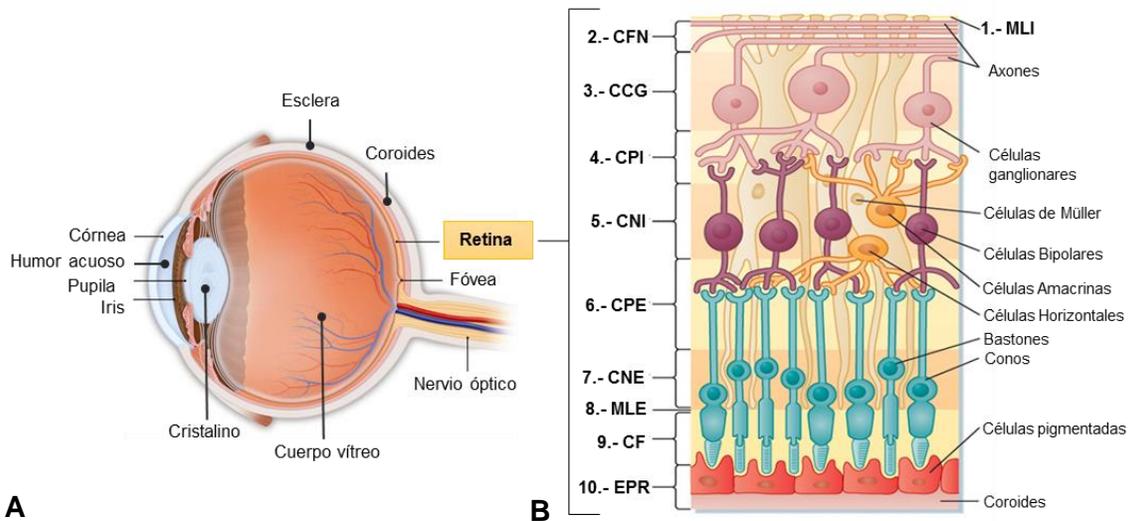


Figura 1 A) Estructura del ojo humano. B) Tipos celulares que conforman las capas de la retina. (Esquema modificado de Koeppen y Stanton, 2008).

Vascularización de la retina

El aporte sanguíneo de la retina se lleva a cabo por medio de dos sistemas vasculares separados, el sistema vascular retiniano y el sistema vascular coroideo. El riego sanguíneo que nutre a las capas internas de la retina proviene de la arteria central, una de las ramas de la carótida interna, la cual penetra en el ojo, junto con el nervio óptico y luego se divide para irrigar toda la superficie interna de la retina. Así, las cuatro capas internas de la retina (MLI, CFN, CCG, CPI y CNI) tienen su propio riego sanguíneo, independiente de la coroides. Sin embargo esta irrigación no es suficiente para las capas más externas de la retina (CPE, CNE, MLE, CF y EPR) que dependen de la difusión de oxígeno y nutrientes a partir de los vasos coroideos.

Los vasos sanguíneos coroideos también provienen de la arteria central (Pournaras et al., 2008). La arteria central se divide en dos ramas principales que a su vez se ramifican en arteriolas y capilares. La pared de capilares está compuesta por tres elementos: células endoteliales, pericitos y membrana basal. Cabe señalar que la irrigación sanguínea ocular está limitada por la barrera hematorretiniana que forma la capa continua de células endoteliales carente de fenestraciones (poros), la presencia de múltiples pericitos y las uniones cerradas entre las células del EPR y

del epitelio de los cuerpos ciliares (estructuras localizadas entre el iris y la porción más anterior y periférica de la retina responsables de la producción del humor acuoso) (Kaur et al., 2008). Por ello, para entrar o salir de la retina, la mayor parte de las sustancias requieren un transporte activo a través de las células endoteliales, del EPR y de los cuerpos ciliares.

De acuerdo a esta información es claro que la vascularización ocular y en particular la de la retina se encuentra sujeta a un control muy estricto, cuya alteración puede conducir a la sobreproducción de vasos sanguíneos que caracteriza a las llamadas retinopatías vasoproliferativas que incluyen a la RD.

Fisiopatología de la RD

La RD es la segunda causa de ceguera irreversible y discapacidad visual en la población mundial en edad laboral (20 a 74 años) (Fong, 2004). Se estima que en México 2 de cada 5 persona que padecen diabetes cursan con RD (Gutiérrez et al., 2012). Un estudio en un grupo de pacientes con diabetes con seguimiento a largo plazo, reportó que la incidencia de RD fue de 23, 48 y 71% a los 3, 6 y 12 años con la enfermedad, respectivamente (Rodríguez et al., 2005). Así, la incidencia de la RD se incrementa con la duración del padecimiento y se considera que luego de 20 años el 95% de las personas con DM tipo 1 y más del 60% de aquellas con DM tipo 2 iniciarán con algún tipo de retinopatía (Mohamed et al., 2007). Los principales factores de riesgo para que se desarrolle RD son el tiempo de evolución de la diabetes, la hiperglicemia crónica y la hipertensión arterial (Lamoureaux et al., 2004, Cheung et al, 2010).

En la RD se presentan alteraciones a nivel estructural y funcional en los vasos de la retina, que incluyen lesiones, oclusión y proliferación (Cheung et al., 2010). Los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la RD son complejos y no se han dilucidado en su totalidad. Aunque ya se ha confirmado la fuerte asociación entre la hiperglicemia crónica y el inicio y la progresión de la RD, el mecanismo subyacente que conduce al daño microvascular como resultado de la hiperglicemia, sigue siendo poco claro (Matthews et al., 2004). Al respecto, se han propuesto algunas vías bioquímicas que actúan como posibles vínculos entre la hiperglicemia

y la RD. Estos incluyen el incremento en la sobreproducción de polioles, la activación de la vía de la proteína cinasa C (PKC)-diacilglicerol (DAG), la producción de especies reactivas de oxígeno, la glicosilación de diversas proteínas, leucostasis etc (Brownlee, 2005; Tarr et al.,2012).

La vía del polirol o sorbitol, consiste en una cascada de reacciones químicas catalizadas por la enzima aldosa reductasa donde se obtiene fructuosa a partir de glucosa, pasando por el sorbitol. El incremento de esta vía disminuye los niveles de NADPH que se requieren para la generación de glutatión reducido, un antioxidante intracelular muy importante. Al tener bajas concentraciones de glutatión reducido, las células se vuelven muy susceptibles al estrés oxidativo que, en etapas tempranas de la diabetes, produce la disfunción de las células endoteliales (Kern y Engerman, 1995). Además, el NADP⁺ procedente de la vía del polirol desvía el metabolismo de la glucosa hacia la síntesis *de novo* de diacilglicerol (DAG). El DAG es un activador natural de la proteína cinasa C (PKC), y la PKC estimula la expresión de endotelina-1, que disminuye el flujo capilar causando isquemia en la retina. La isquemia retiniana estimula la síntesis del factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF), que es un potente factor angiogénico, por parte de los pericitos y de otras células locales (Das-Evcimen y King, 2007). Posteriormente, los pericitos mueren por efectos combinados del estrés oxidativo a consecuencia de la vía del sorbitol y la glicosilación no enzimática (Hammes et al., 2011).

La glicosilación no enzimática se define como la adición de la glucosa al grupo amino de la lisina de las proteínas plasmáticas y tisulares. Trae como consecuencia que las proteínas nativas modifiquen su estructura, sus propiedades fisicoquímicas y sus funciones biológicas. El grado de glicosilación dependerá de la concentración de glucosa en el medio y del tiempo de vida media de la proteína. Cuando las concentraciones de glucosa se mantienen altas crónicamente, los productos de las reacciones de glicosilación se estabilizan y se transforman en los llamados productos finales de glicosilación conocidos como AGE (Advanced Glycosylation End Product) (Kennedy, 1982). Los AGE alteran las propiedades de la membrana plasmática del endotelio favoreciendo la leucostasis, también tiene lugar la glicosilación no enzimática de la hemoglobina que disminuye su capacidad

transportadora de oxígeno que conlleva a la hipoxia (Gabbay, 1982). Además, se conoce que los AGE también inducen la expresión de genes que dan lugar a la expresión de factores como el VEGF, que inducen el aumento de la permeabilidad vascular y la vasodilatación que lleva a la simultánea acumulación de proteínas de origen plasmático en la membrana basal del capilar, conduciendo a la oclusión de la luz capilar (Cai y Boulton, 2002). Todos estos mecanismos conllevan a una disminución en la perfusión sanguínea y consecuentemente a una hipoxia local.

La hipoxia, por si misma, promueve la angiogénesis ya sea estimulando la producción de factores angiogénicos o inhibiendo la de los factores antiangiogénicos (Carmeliet, 2005). En la retina de pacientes diabéticos, los nuevos vasos sanguíneos tienden a crecer en dirección del vítreo, son frágiles y susceptibles a sangrar, lo cual genera hemorragias vítreas que interfieren con la visión, pero que además favorece la producción de un tejido fibroso que al ejercer tracción sobre la retina, la llega a desprender ocasionando ceguera (Frank, 2004, Yam y Kwok, 2007).

La RD se clasifica básicamente en dos etapas: no proliferativa (RDNP) y proliferativa (RDP) (Figura 2). La RDNP es la fase inicial y se caracteriza por el engrosamiento de la membrana basal de los capilares, la apoptosis y el desprendimiento de pericitos y del endotelio vascular, lo que a su vez aumenta la vasopermeabilidad y la oclusión de los vasos retinianos. Estas alteraciones se traducen en cambios histológicos vasculares en la retina que incluyen microaneurismas, vasos tortuosos, hemorragias intraretinianas y formaciones vasculares algodonosas. En la RD proliferativa, como su nombre indica, tiene lugar la proliferación de vasos sanguíneos anómalos que en sus etapas avanzadas invaden y sangran en el cuerpo vítreo y llegan a ocasionar el desprendimiento de la retina (Frank, 2004).

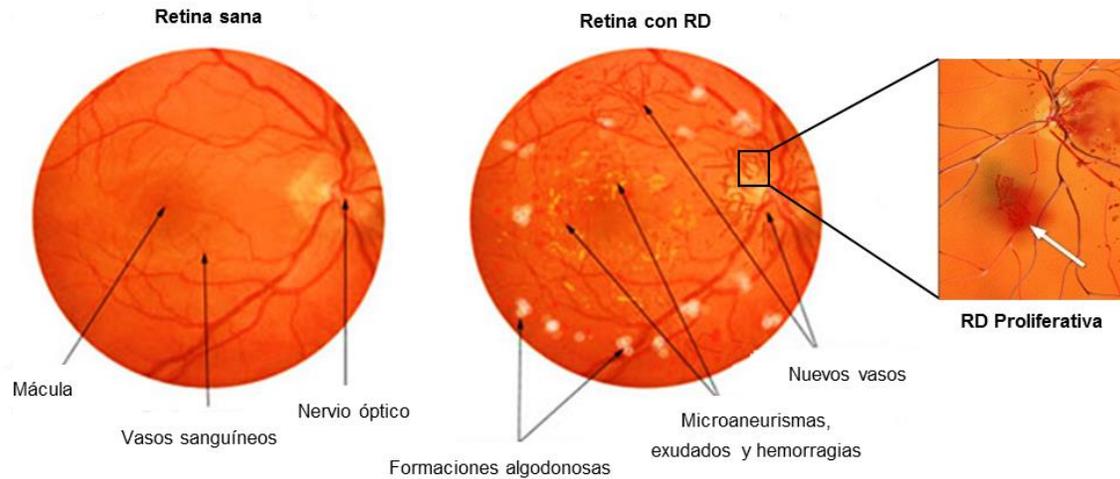


Figura 2 Esquema que muestra una retina normal y una retina con RD, en la cual se indican las alteraciones vasculares que caracterizan al padecimiento. (Modificada de Frank, 2004).

Tratamientos para la RD

Para evitar el desarrollo de la RD y la posterior pérdida de la visión, las estrategias actuales se basan en el control de la glicemia y en la fotocoagulación láser (Bhavsar, 2008). La técnica de láser para el tratamiento de enfermedades retinianas se utilizó por primera vez por los oftalmólogos Morón Salas y Meyer-Schwickerath, en 1949 y se describió como la *quemadura terapéutica retiniana provocada por luz*. En la década de los 70's se usó por primera vez para tratar la RD por el oftalmólogo Duke-Elder quien consiguió la regresión de los exudados duros vasculares con este método (Pinazo Durán y García Medina, 2008).

La fotocoagulación con láser tiene su efecto sobre la retina cuando la radiación luminosa se convierte en energía térmica (Suomalainen, 1993). Esto genera pequeñas quemaduras en zonas discretas de la retina con el propósito de eliminar el tejido isquémico y productor de factores proangiogénicos (Singh et al., 2008). Sin embargo, este procedimiento solamente es eficaz en el 50% de los diabéticos, es destructivo en sí mismo y conlleva a efectos colaterales no deseados que incluyen la presencia de glaucoma, la interferencia con la visión nocturna y el

desarrollo de lesiones neurales que traen consigo la disminución irreversible de la visión.

La vitrectomía es otro tratamiento de la RD que consiste en remover y sustituir una porción o todo el vítreo. Se lleva a cabo en cuadros avanzados de hemorragias vítreas o de desprendimiento de retina, cuando gracias a la vitrectomía se elimina el tejido fibrovascular y se reubica la retina desprendida. El inconveniente que presenta este procedimiento quirúrgico es el hecho de que aumenta el riesgo de la formación de cataratas en un 44% (Kaplan, 1996) y es un factor de riesgo para neovascularización del iris (Stefansson, 2009).

Aunque estos tratamientos tienen tasas de éxito elevadas, no previenen ni curan la RD y al término de intervenciones sucesivas aumentan la probabilidad de ceguera. Por lo tanto, el objetivo primordial de la investigación en este campo es la búsqueda de terapias más efectivas y menos invasivas capaces no solo de prevenir sino de curar la RD.

Una opción promisoriosa de los últimos años se basa en el uso de terapias antiangiogénicas (Bainbridge et al., 2003) capaces de bloquear la acción de factores angiogénicos, particularmente del VEGF, con anticuerpos, RNA de interferencia (Reich et al., 2003) o receptores solubles (Bainbridge et al., 2002). Al respecto, el estudio y la identificación de nuevos factores vasoactivos presentes en la retina con capacidad de frenar su vascularización bajo condiciones de diabetes reviste un gran interés. Entre estos factores se encuentran las vaso-inhibinas, una familia de péptidos derivados de la hormona prolactina (PRL) que inhiben la vasopermeabilidad, la vasodilatación y la angiogénesis ocular (Clapp et al., 2008). De hecho, estos péptidos bloquean el efecto del VEGF y de otros factores proangiogénicos (González et al., 2004; García et al 2008).

La prolactina (PRL)

La PRL es una hormona polipeptídica secretada por células especializadas (lactotropos) del lóbulo anterior de la hipófisis (Freeman et al., 2000). La PRL fue identificada hace más de ocho décadas (1928) y desde entonces ha estado asociada a la producción de leche en los mamíferos. Sin embargo, se le han atribuido alrededor de trecientas funciones diferentes que incluyen acciones en la reproducción, el crecimiento y el desarrollo, el metabolismo, la función cerebral, la regulación del sistema inmunológico, la osmoregulación y la angiogénesis (Freeman et al., 2000; Ben-Jonathan et al., 2006; Clapp et al., 2009).

En los humanos, el gen de la PRL se localiza en el cromosoma 6 y su expresión no se limita a la glándula hipófisis. La PRL puede ser sintetizada y secretada por sitios extrahipofisarios como la placenta, la glándula mamaria, las células de sistema inmunológico (leucocitos), el útero, el endometrio, el cerebro, la próstata, el tejido adiposo, el endotelio vascular y el cartílago. Este amplio espectro de tejidos productores pero también la amplia distribución de los receptores a PRL son consistentes con la diversidad funcional de esta hormona (Ben-Jonathan et al., 1996; Corbacho et al., 2002; Macotela et al., 2006; Clapp et al., 2008). Los receptores de la PRL pertenecen a la superfamilia de receptores a citocinas clase 1 (Bole-Feysot et al., 1998) y se localizan en la membrana celular de una gran diversidad de tejidos, que incluyen a todos los enunciados arriba como productores de la hormona (Ben-Jonathan et al. 1996; Goffin et al., 1996). En términos generales, la PRL activa a su receptores a través de inducir su dimerización y fosforilación lo que da lugar al acoplamiento de proteínas que desencadenan cascadas específicas de señalización y que principalmente involucran la vía de las cinasas Janus (JAK) y la subsecuente fosforilación/activación de los factores de transcripción STAT (Signal Transduction Activators of Transcription) (Goffin et al., 2005).

La PRL tiene 199 aminoácidos y una masa molecular de 23 kDa (Figura 3). Se han descrito varias isoformas o especies moleculares de PRL resultado de modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la glicosilación, la sulfatación y la proteólisis enzimática (Larrea et al., 1985; Sinha, 1995). Estas

modificaciones estructurales también influyen sobre su diversidad funcional. Al respecto, se ha mostrado que fragmentos moleculares de la PRL (las vasoinhibinas) poseen acciones inhibitorias sobre los vasos sanguíneos, acciones que están ausentes en la molécula madre (Clapp et al., 2006).

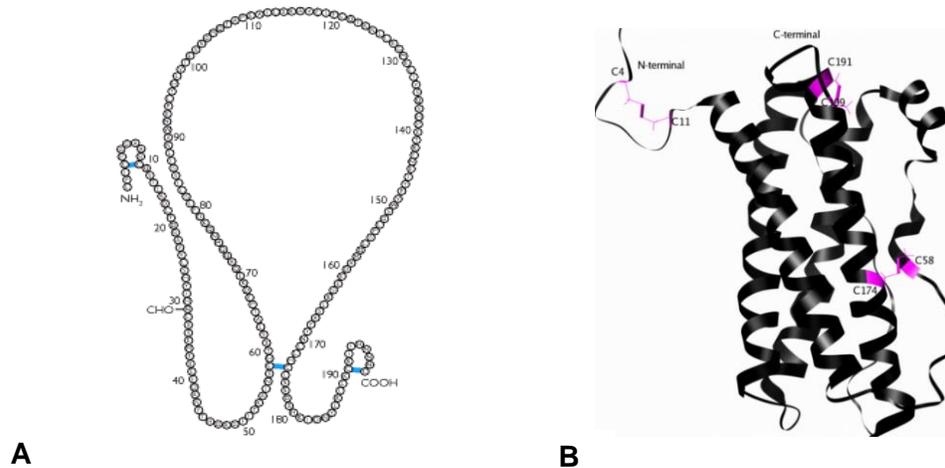


Figura 3 A) Secuencia lineal de la PRL humana indicando sus 199 aminoácidos ligados por tres puentes disulfuro que tiene una masa molecular de 23 kDa. B) Estructura terciaria de la PRL que muestra su conformación en cuatro α -hélices anti-paralelas.

Vasoinhibinas

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la PRL con propiedades inhibitorias de la función vascular. El corte de la PRL se lleva a cabo por proteasas que generan dos fragmentos peptídicos: un fragmento que contiene la región amino-terminal de la molécula madre y otro fragmento que corresponde a la región carboxilo-terminal de la hormona (Clapp et al., 2006). A pesar de que ambos fragmentos se generan concomitantemente, solamente los fragmentos amino-terminales poseen efectos inhibitorios sobre los vasos sanguíneos y fueron, por ende, denominados como vasoinhibinas. Aún se desconoce cuál pudiera ser la posible acción de los fragmentos carboxilo-terminales remanentes.

Las proteasas responsables de la proteólisis incluyen a la catepsina D (Piwnica et al., 2004), las metaloproteasas de matriz (MMP) de los tipos 1, 2, 3, 8,

9 y 13 (Macotella et al., 2006) y la proteína morfogenética de hueso-1 (BMP-1) (Geat al., 2007). Estas proteasas cortan a la PRL en diferentes regiones cerca y dentro del asa que conecta las α -hélices 3 y 4 de la molécula y, por ende, la masa molecular de las vaso inhibinas resultantes depende de qué enzima realice la proteólisis y de su sitio de corte en la PRL (Figura 4). La catepsina D corta a la PRL de rata entre los aminoácidos 145-146 lo que resulta en una vaso inhibina de aproximadamente de 16.3 kDa (Baldocchi et al., 1993). Sin embargo, dicha proteasa corta a la PRL humana entre los aminoácidos 132-133, 147-148 y 150-151, lo que genera vaso inhibinas de 15, 16.8 y 17.2 kDa respectivamente. Por su parte, las vaso inhibinas derivadas de la acción de las MMP tienen una masa molecular entre los 17 y 14 kDa y la BMP-1 corta a la PRL entre los aminoácidos 159 y 160 resultando en un péptido de aproximadamente de 18 kDa (Figura 4).

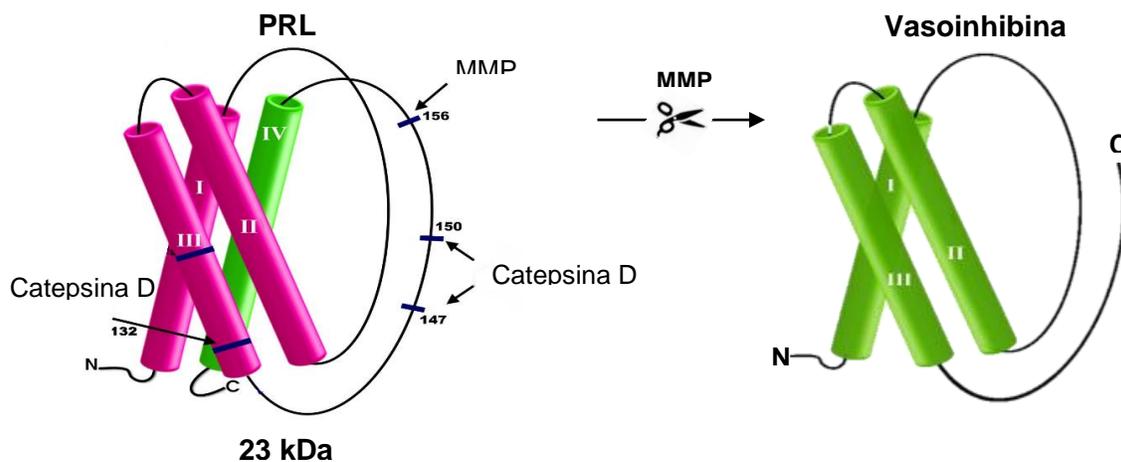


Figura 4 Representación de la PRL que muestra los sitios donde es cortada por las proteasas Catepsina D y MMP. Se representa también la vaso inhibina que resulta del corte de la MMP (Tomada y modificada de Clapp et al., 2009).

Las vaso inhibinas están presentes en la circulación y se generan tanto en la adenohipófisis como en otros tejidos que incluyen al endotelio vascular, el hipotálamo, el cartílago y tejidos oculares (Clapp et al., 1994; Aranda et al 2005; Macotella, 2006).

Efectos vasculares y mecanismo de acción de las vasoinhibinas

Las vasoinhibinas inhiben el crecimiento y la migración de las células endoteliales en respuesta a factores como el VEGF y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) (Lee et al., 2007). Las vasoinhibinas también actúan independientemente de los factores de crecimiento induciendo la apoptosis de las células endoteliales (Martini et al., 2000; Dueñas et al., 2004). Además, inhiben la permeabilidad vascular (Clapp et al., 2006; García et al., 2008) y la vasodilatación inducida por acetilcolina y la bradicidina (González et al., 2004).

Se han identificado también algunas de las vías de señalización que median los efectos de las vasoinhibinas en la detención del ciclo celular vía la inhibición de las ciclinas D1 y B1 y la expresión de los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina, p21 (cip1) y p27 (kip1) (Tabruyn et al., 2005). En este tipo de acción también participan efectos de las vasoinhibinas sobre la inhibición de la activación de las cinasas de proteínas activadas por mitógeno (MAPK) (D' Angelo et al., 1997), y la activación del sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS). Además, se encontró que las vasoinhibinas inhiben el efecto del VEGF sobre la permeabilidad vascular a través de activar a la proteína fosfatasa 2A que desfosforila e inactiva a la eNOS (García et al., 2008).

No obstante, todavía se desconoce la naturaleza de los receptores que median los efectos vasculares de las vasoinhibinas. Sin embargo, se han reportado sitios de unión específicos, saturables y de alta afinidad para vasoinhibinas que se asocian con proteínas de 32 y 53 kDa y que la PRL no compite por dicha unión (Clapp y Weiner, 1992).

Vasoinhibinas y RD

Debido a los efectos inhibitorios de las vasoinhibinas sobre el endotelio vascular, se propuso que estos péptidos pudieran participar en el control de la angiogénesis ocular, que como se mencionó debe ser muy estricto para asegurar la transparencia de los tejidos y, consecuentemente, la correcta función visual. En apoyo a esta posibilidad, se encontró que las vasoinhibinas están presentes en la retina de ratas normales y que la inyección intravitreal de anticuerpos capaces de inmunosequestrarlas estimula la angiogénesis retiniana (Aranda et al., 2005). Además, se detectó que las vasoinhibinas están presentes en las membranas fibrovasculares que se forman en el ojo de pacientes con retinopatía del prematuro. Este padecimiento es otro tipo de retinopatía vasoproliferativa que se ocasiona en recién nacidos prematuros a consecuencia de los cambios en los niveles de oxígeno a las que son expuestos dentro y fuera de la incubadora. En estos pacientes se propuso que las vasoinhibinas oculares podrían propiciar la regresión por apoptosis de los nuevos vasos sanguíneos que ocurre en una proporción importante de ellos (Dueñas et al., 2004). Con respecto a la RD, se reportó que los niveles circulantes de PRL influyen sobre los niveles de vasoinhibinas en la retina. La inducción de hiperprolactinemia en ratas diabéticas se traduce en altos niveles de vasoinhibinas en la retina capaces de reducir cambios locales de vasopermeabilidad debidos a la diabetes (Arnold et al., 2010). Además, el hecho de que la administración intravitreal de vasoinhibinas puras (García et al., 2008) o de vectores derivados de virus adenoasociados que transducen vasoinhibinas (Ramírez et al., 2011) reduce la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas apoya el potencial terapéutico de estos péptidos en la RD y sugiere que una disminución en sus niveles intraoculares pudiera influir sobre la progresión de este padecimiento. En este trabajo de tesis, investigamos si los niveles de PRL y de vasoinhibinas se alteran en ratas diabéticas y si la actividad de proteasas capaces de generarlas se altera bajo condiciones de diabetes.

HIPÓTESIS

Los niveles de las vasoinhibinas y la actividad de las proteasas que las generan disminuyen en ratas diabéticas.

OBJETIVOS

- 1) Investigar la presencia de vasoinhibinas en las retinas de ratas con diabetes.
- 2) Determinar los niveles de vasoinhibinas en las retinas de ratas con diabetes con respecto a las no diabéticas.
- 3) Analizar la proteólisis de la PRL hacia vasoinhibinas en el ojo de ratas diabéticas y no diabéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 gramos de peso corporal. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones convencionales (12:12 horas luz:oscuridad; a 22°C y con acceso a agua y alimento *ad libitum*). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM siguiendo las normas de la Declaración para el Uso de Animales en la Investigación Oftalmológica y de la Visión de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) de EUA.

Grupos experimentales

Se trabajó con 2 grupos experimentales:

- Grupo diabetes: ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina
- Grupo control: ratas no diabéticas

Modelo de DM inducido por estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ) es un fármaco que destruye selectivamente a las células beta pancreáticas productoras de insulina en ratas (Wei et al., 2003) Es un modelo convencional de DM donde una sola inyección de STZ eleva los niveles de glucosa en sangre en 2-4 días y esta condición de hiperglicemia es permanente (Lenzen, 2008).

La inducción de diabetes se realizó luego de imponer ayuno a las ratas durante toda la noche. Por la mañana, las ratas del grupo diabetes fueron inyectadas intraperitonealmente con una dosis de STZ de 60mg/kg de peso corporal. La STZ fue preparada en una solución amortiguadora de citratos, pH 4.5 (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA). Cuarenta y ocho horas después se determinaron los niveles de glucosa sanguínea mediante el uso de un glucómetro convencional y se consideraron diabéticos aquellos animales con valores de más

de 250 mg/dL de glucosa (Navaratna et al., 2007). Las ratas se mantuvieron diabéticas por cuatro semanas hasta su sacrificio.

Presencia de PRL y vasoinhibinas en la retina de ratas diabéticas y no diabéticas mediante Western blot

Los animales fueron sacrificados por decapitación, previa anestesia con CO₂. Los ojos se colocaron por separado en una solución de fosfatos (PBS, pH 7.4) para lavarlos y mantenerlos hidratados. Las retinas se extrajeron bajo el microscopio de disección, inmediatamente se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70° C hasta su procesamiento. Las retinas se homogenizaron en buffer de lisis (50 mM Tris pH 7.4, 0.5% Igepal, 100 mM NaCl, 1 µg/µl aprotinina, 0.5 mM PMSF). Posteriormente, se cuantificó la proteína total de cada homogenado siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1979). Cantidades iguales de proteína total (40 µg) fueron mezclados en una relación 1:1 con buffer Laemmli 2X (condiciones reductoras), calentados a 95°C durante 5 minutos, y sometidos a electroforesis en geles al 15% de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 80 volts durante hora y media. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0.2 µm) en una cámara de transferencia semiseca y durante 30 minutos a 25V. Las membranas fueron bloqueadas con 4% de leche en polvo sin grasa por 1 hora y luego se incubaron durante toda la noche con una dilución 1:500 en PBS-0.05% Tween de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el extremo amino-terminal (INN-1) o carboxilo-termina (INN-368) de la PRL previamente caracterizados (Aranda et al., 2005). La detección de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó mediante el uso de anticuerpos secundarios conjugados a fosfatasa alcalina (1:5,000 en PBS-Tween 0.05% por dos horas) y un kit comercial colorimétrico (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA).

Como estándares se utilizaron una preparación de PRL recombinante de rata, adquirida del Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis de los Institutos Nacionales de Salud de los EUA; y una preparación de vasoinhibinas generada por proteólisis enzimática de PRL recombinante de rata tratada con un extracto de

glándula mamaria de rata, enriquecido con Catepsina D, de acuerdo al método previamente descrito (Clapp,1987).

Posteriormente, se cuantificó por densitometría a cada banda de las prolactinas empleando el software de análisis Quantity One 1-D (BioRad) y normalizados contra la intensidad de las bandas obtenidas para la β -tubulina endógena utilizada como control de carga.

Proteólisis de la PRL en el vítreo de la rata

La proteólisis de la PRL se analizó *in vivo* mediante la administración intravitreal de la hormona y la subsecuente extracción del vítreo para analizar los productos de la proteólisis por Western blot. Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de una solución de ketamina 70% y xilacina 30% (1ul/g de peso corporal). La inyección intravitreal de PRL se realizó de acuerdo al método descrito previamente (Aranda et al 2005). Brevemente, se sujetó el ojo de la rata y bajo el microscopio de disección se introdujo una aguja hipodérmica calibre 27 a 2 mm por debajo del limbo esclero-corneal para realizar un orificio que permitiera introducir la aguja de una microjeringa Hamilton con la PRL (5 μ g/4 μ l de PBS pH 7.4) a inyectar en el ojo. La inyección de PRL se llevó a cabo tanto en ratas diabéticas como controles en ambos ojos y las ratas fueron sacrificadas a las 2, 6 y 24 horas posteriores a la inyección intravitreal. Los vítreos fueron congelados en hielo seco inmediatamente y luego se guardaron a -70° C hasta su procesamiento por Western blot. Los Western blots se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento antes descrito pero utilizando como anticuerpo primario anti-PRL de rata (C-1) (Aranda et al., 2005) a una dilución 1:500 en PBS-Tween 0.05%.

RESULTADOS

1. Detección de vasoinhibinas en la retina de ratas no diabéticas

Dado que las vasoinhibinas contienen la región amino-terminal de la PRL y no la carboxilo terminal, quisimos validar la especificidad de anticuerpos monoclonales anti-PRL para su detección. Así, caracterizamos anticuerpos monoclonales anti-PRL dirigidos contra el extremo amino-terminal (anti-N-TERM) y carboxilo-terminal (anti-C-TERM) de la PRL utilizando una preparación de PRL que tiene un corte entre los aminoácidos 145 y 149 y que generamos de acuerdo al método descrito previamente (Clapp et al., 1987). En la Figura 5A se ilustra la secuencia lineal de dicha PRL cortada (PRLC), donde se puede apreciar que el corte ocurre en el asa de mayor tamaño formada por el puente disulfuro intermedio de la molécula. De manera que la reducción de dicho puente disulfuro por efecto de la presencia del agente reductor β -mercaptoetanol (β -ME) separa a la PRLC en dos fragmentos, uno amino-terminal de 16 kDa que corresponde a una vasoinhibina, y otro fragmento, carboxilo-terminal de 7 kDa. La combinación de PRL y PRLC revelada con el anti-N-TERM solamente muestra a la PRL (23 kDa) y a la vasoinhibina (16 kDa) (Figura 5B, primer carril). En contraste, el anti-C-TERM, no muestra a la vasoinhibina pero si a la PRL y al fragmento carboxilo terminal de 7 kDa (Figura 5C primer carril). Una vez validados, utilizamos estos anticuerpos para investigar la presencia de PRL y de vasoinhibinas en la retina de ratas control. Encontramos que el anti-N-TERM reaccionó con proteínas de 23 y 17 kDa, mientras que el anti-C-TERM solo reaccionó con la de 23 kDa. Estos resultados demuestran la presencia en la retina de proteínas con inmunoreactividad tipo-PRL que probablemente corresponden a PRL y a una vasoinhibina de 17 kDa.

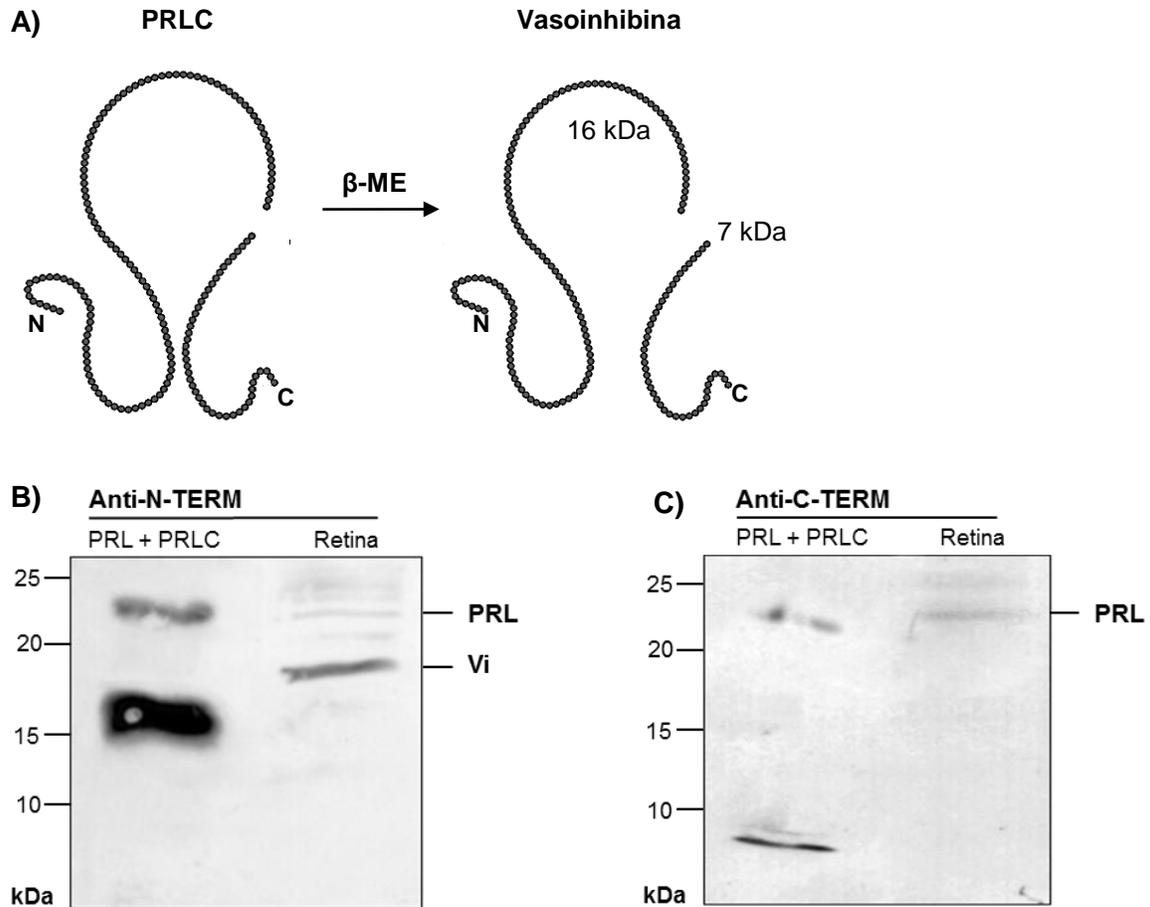


Figura 5 A) Representación de la secuencia lineal de la PRL cortada en el asa de mayor tamaño formada por el puente disulfuro intermedio de la PRL (PRLC), cuya reducción con β -mercaptoetanol (β -ME) genera un fragmento amino (N)-terminal de 16 kDa (vasoinhibina; Vi) y uno carboxilo (C)-terminal de 7 kDa. Western blots representativos, de una combinación de estándares de PRL + PRLC y de un extracto de retina de rata no-diabética, procesados en condiciones reductoras y revelados con en anti-N-TERM (B) o con el anti-C-TERM (C). Los números a la izquierda denotan los pesos moleculares de proteínas marcadoras en kDa.

2. Los niveles de vasoinhibinas son mayores en retinas diabéticas respecto a las no diabéticas

El análisis por Western blot reveló mayores niveles de la PRL y de la vasoinhibina en retinas de ratas diabéticas con respecto a las no diabéticas. En la Figura 6A se muestran los resultados de cinco retinas de ratas diabéticas (DB) y tres retinas de ratas no-diabéticas (control), revelado con el anti-N-TERM. Las diferencias son debidas a la condición de la diabetes y no a concentraciones diferentes de proteína total, como se aprecia por los niveles similares de β -tubulina (una proteína constitutiva) presentes en las muestras. Los niveles de PRL y de vasoinhibinas son significativamente mayores en la diabetes cuando se analizan los valores de densitometría de las bandas de proteína en los blots de ratas diabéticas (n=8) y ratas no-diabéticas (n=6) (Figura 6B).

3. La proteólisis de PRL por proteasas oculares aumenta en las ratas diabéticas con respecto a las no diabéticas

Con la finalidad de investigar si la generación ocular de vasoinhibinas a partir de PRL era diferente en este modelo de diabetes que en condiciones control, se inyectó PRL en el vítreo de ratas diabéticas y no diabéticas y se analizaron los productos de su proteólisis al cabo de diferentes tiempos posteriores a dicha inyección, por Western blot, y fue revelado con el anticuerpo policlonal anti-PRL C1.

Después de las primeras 2 horas, la PRL inyectada intravitrealmente es modificada hacia vasoinhibinas con pesos moleculares aparentes de 14, 15 y 16 kDa tanto en las ratas no diabéticas como en las diabéticas (Figura 7). A las 6 y a las 24 horas la mayor parte de la PRL y de las vasoinhibinas desaparecen del vítreo de ratas diabéticas y no diabéticas. Sin embargo, en estas últimas aumenta ligeramente y permanece una vasoinhibina de 14 kDa que parece muy estable pues prácticamente no se modifica entre las 6 y las 24 h. Esto sugiere que el ojo contiene proteasas capaces tanto de generar vasoinhibinas a partir de PRL como de degradar a ambas proteínas y que su actividad difiere en la diabetes experimental.

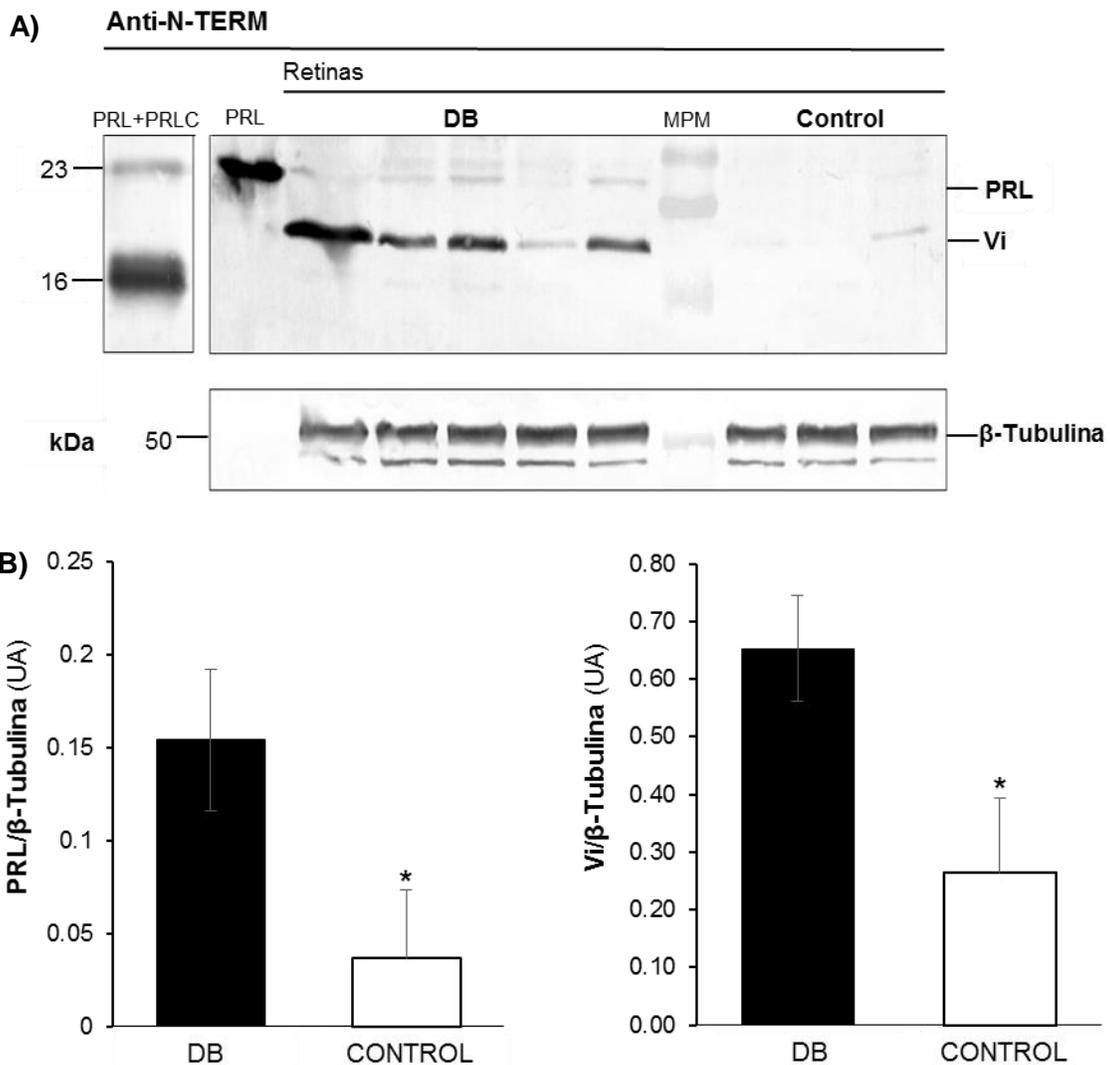


Figura 6 A) Western-blot representativo de extractos de retinas de ratas diabéticas (DB) y no-diabéticas (Control) procesados en condiciones reductoras. Se muestran los pesos moleculares de la combinación de los estándares de PRL y PRL cortada (PRLC); así como marcadores de peso molecular (MPM). La β -tubulina se usó como una proteína de control de carga. **B)** Cuantificación de las vasoinhibinas (Vi) retinianas por densitometría. Los valores mostrados son los promedios \pm SEM de las densitometrías de PRL y vasoinhibinas relativos a β -Tubulina y donde AU son las unidades arbitrarias en la gráfica. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de t de student. DB (n=8) y Control (n=6). * $p \leq 0.05$.

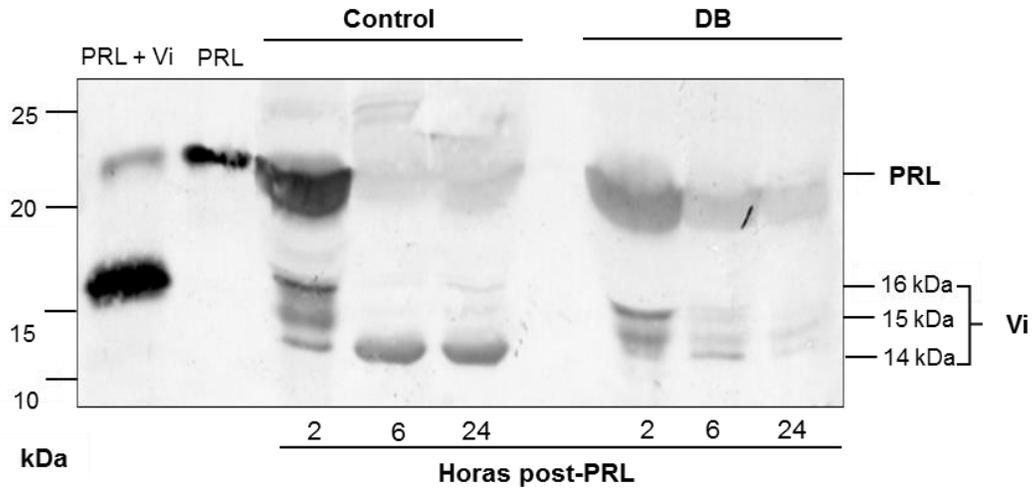


Figura 7 Western blot representativo que muestra los productos de la proteólisis de la PRL inyectada intravítrealmente en ratas diabéticas (DB) y no-diabéticas (Control) y analizados en el vítreo a diferentes tiempos después de la inyección de la hormona. Se muestran la combinación de los estándares de PRL y PRL cortada (PRLC) y de la PRL sola. La β -tubulina se reveló como control de carga. Los números a la izquierda muestran los pesos moleculares en kDa de proteínas marcadoras. El blot fue revelado usando un el anticuerpo policlonal anti-PRL C1.

DISCUSIÓN

La retinopatía diabética (RD) es la principal causa de ceguera y discapacidad visual en la población en edad laboral (Fong, 2004). Este padecimiento deriva de la sobreproducción de vasos sanguíneos en la retina a consecuencia de un desequilibrio a favor de factores locales pro-angiogénicos por sobre los anti-angiogénicos. Diversas evidencias han señalado que las vasoinhibinas se encuentran entre los factores que inhiben la angiogénesis, la vasodilatación y la vasopermeabilidad en la retina y que estos péptidos tienen potencialidad para el control de las alteraciones vasculares que determinan la RD (García et al., 2008). Debido a esto, se ha sugerido que una alteración en los niveles de las vasoinhibinas retinianas pudiera influir sobre la progresión de la RD. En esta tesis investigamos si los niveles de vasoinhibinas se modifican en la retina de ratas diabéticas en asociación con cambios en la actividad de proteasas oculares capaces de generarlas a partir de PRL.

Nuestro trabajo confirmó la presencia de PRL y de vasoinhibinas en la retina de ratas no-diabéticas reportada previamente (Aranda et al., 2005). Mediante Western blot, detectamos proteínas inmunorreactivas de 23 y 17 kDa, que muy probablemente corresponden a PRL y a una vasoinhibina porque son reconocidas por un anticuerpo monoclonal anti-PRL dirigido contra el extremo amino-terminal de la hormona, que es la parte de la PRL presente en las vasoinhibinas. Además, mientras que la proteína de 23 kDa reaccionó con el anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo carboxilo-terminal de la PRL, que es la porción de la PRL ausente en las vasoinhibinas, la posible vasoinhibina no fue reconocida por dicho anticuerpo.

Para investigar si los niveles de la PRL y las vasoinhibinas retinianas se alteran en la diabetes, utilizamos el modelo de diabetes tipo 1 inducido por estreptozotocina. En este modelo se produce una hiperglicemia acentuada (>250 mg/dL) comparable a la presente en pacientes con RD. Además, en dicho modelo también se presentan complicaciones comunes de la diabetes como son la nefropatía y la RD (Wei et al., 2003). Esta última se detecta a partir de los 15 días del tratamiento con STZ y presenta algunas de las características comunes de la RD no proliferativa, a saber: hemorragias, vasodilatación y tortuosidad de los

capilares (García et al., 2008). Si bien el cuadro de vasopermeabilidad retiniana se agrava con la progresión de la RD inducida por STZ (Arnold et al., 2010), este modelo nunca presenta la vasoproliferación de la retina característica de la RD proliferativa presente en humanos. Se desconoce la razón de esta limitación, pero se ha propuesto que puede deberse a que el cuadro vasoproliferativo requiere de varios años de exposición a la enfermedad que exceden el tiempo de vida de los roedores. También es posible, que en la retina de la rata se tenga control más estricto de la neovascularización ocular que en la retina humana.

Después de un mes de haber inducido diabetes con STZ, encontramos que tanto la PRL como la vaso inhibina se elevan en la retina con respecto a los niveles observados en las ratas no-diabéticas. Estos resultados fueron diferentes a los esperados, de que en la diabetes, la generación de vaso inhibinas a la baja pudiera contribuir a las alteraciones vasculares del padecimiento. Sin embargo, en el análisis por Western blot, la concentración de la vaso inhibinas retinianas fue mayor en ratas diabéticas que en ratas sin diabetes. De acuerdo a estos resultados, es posible que las vaso inhibinas no influyan en la progresión de la retinopatía en este modelo de diabetes. Sin embargo, el hecho de que los niveles de PRL y de vaso inhibinas retinianas asociados a la RD estén elevados con respecto a la condición normal, sugiere que dichas proteínas pudieran ser parte de los mecanismos protectores que frenan el avance del padecimiento en roedores.

Partiendo del hecho de que las alteraciones vasculares retinianas debidas a la diabetes progresan con el tiempo, sería posible proponer que a tiempos más prolongados fuera más factible observar cambios a la baja en los niveles de vaso inhibinas retinianas. Esto es posible, porque en un estudio preliminar extendimos dos semanas más de diabetes (a 6 vs. 4 semanas después de la inyección de STZ) y encontramos menos vaso inhibinas en la retina de las ratas diabéticas con respecto a las de las ratas no diabéticas. De ser ciertos estos resultados, se apoyaría la propuesta de que el factor tiempo es determinante de las diferencias entre los cuadros de RD obtenidos experimentalmente en roedores y la patología humana.

De hecho, la hipótesis de que en la diabetes puede disminuir la generación de vasoinhibinas oculares, se apoya también en la investigación realizada por Triebel et al., 2009, donde se reportó que los niveles de PRL y vasoinhibinas se reducen en la circulación en pacientes con diabetes mellitus (DM) con respecto a la de los sujetos sanos. Asimismo, estudios recientes en pacientes han mostrado que la PRL sistémica se reduce en la diabetes y hay evidencias de que dicha reducción se puede relacionar con la progresión de la RD (Arnold et al., 2010). Estas observaciones ligan los niveles circulantes de ambas proteínas con la fisiopatológica de la RD. Al respecto, se conoce que la PRL sistémica puede ingresar a los tejidos oculares (O'Steen y Sundberg, 1982) y que la inducción de hiperprolactinemia en la rata se traduce en niveles incrementados de vasoinhibinas en la retina y en una reducción en la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes (Arnold et al., 2010).

Por otra parte, los niveles retinianos de PRL y de vasoinhibinas podrían depender tanto de la síntesis local de PRL, como de la actividad de las proteasas capaces de convertirla hacia vasoinhibinas. Estudios previos utilizando RT-PCR e hibridización *in situ* mostraron que el RNA mensajero de la PRL se expresa en la retina de la rata (Aranda et al., 2005) y en las membranas fibrolentales de pacientes con retinopatía del prematuro (Dueñas et al., 2004). Además, se conoce que en la RD tiene lugar la activación de metaloproteasas (MMP) que son proteasas responsables de la remodelación y mantenimiento de la arquitectura de diferentes tejidos, incluidos los oculares. De interés, en el vítreo humano se ha identificado la presencia de las MMP 1, 2, 3, y 9 (Plantner et al., 1998; Sivak et al., 2002). Además, en la RDP humana se ha encontrado un 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). Se sabe que todas estas MMP pueden convertir a la PRL hacia vasoinhibinas.

Para abundar sobre la generación de vasoinhibinas en la retina bajo condiciones de diabetes, investigamos la proteólisis ocular de la PRL bajo condiciones *in vivo*. Para esto, un estándar puro de PRL recombinante se inyectó intravítreamente y los productos de su proteólisis se analizaron en vítreos obtenidos

a diferentes tiempos posteriores a la inyección de la hormona. Los resultados mostraron la actividad de proteasas en el vítreo capaces de generar fragmentos de PRL que oscilan entre los 14 y los 16 kDa. De manera interesante, tanto la PRL como las vasoinhibinas dependiendo del tiempo, lo que sugiere que la actividad proteolítica ocular no sólo genera a las vasoinhibinas sino que también puede degradar tanto a estos péptidos como a la PRL. Esto es importante ya que indica que de acuerdo al grado de actividad proteolítica se podría frenar las alteraciones vasculares (vía la generación de vasoinhibinas) o promoverlas (a través de degradar a las vasoinhibinas). Fue interesante, que en el caso de los vítreos control prevalece más una vasoinhibina de 14 kDa que en los vítreos de ratas diabéticas. Estos estudios son de carácter preliminar pues, si bien son representativos de tres animales independientes, queda por verificar la identidad de los productos de la proteólisis como vasoinhibinas y el tipo de proteasas que las genera.

Los niveles y tipo de vasoinhibinas contrastan entre los resultados evaluados en la retina (una vasoinhibina de 17 kDa más abundante en retinas de animales diabéticos que en las de los animales no-diabéticos) y los analizados en el vítreo (vasoinhibinas de pesos moleculares menores a 17 kDa y más estables en los animales no-diabéticos que en los diabéticos). Los experimentos no son comparables, pues en la retina se analizaron los niveles endógenos de vasoinhibinas y en el vítreo los productos de la proteólisis de la PRL exógena inyectada intravitrealmente. Sin embargo, nuestros hallazgos nos permiten especular que la producción de vasoinhibinas pudiera regularse diferencialmente en la retina y el vítreo. En la primera, su concentración aumentaría para contrarrestar la progresión de la RD, al menos en las etapas iniciales del padecimiento. En el vítreo, su degradación facilitaría la invasión de vasos sanguíneos y con ello la progresión a los estados avanzados del padecimiento. Quedan por determinarse los niveles endógenos de la PRL y de las vasoinhibinas en el vítreo y sus posibles diferencias en asociación con la diabetes.

CONCLUSIONES

Los niveles de vasoinhibinas se incrementan en la retina de ratas diabéticas.

La PRL es procesada proteolíticamente por proteasas oculares y los productos generados parecen más estables en el ojo de ratas no diabéticas.

Se requieren más estudios para poder entender el significado funcional de estas diferencias.

LITERATURA CITADA

Aranda, J., J.C. Rivera, M. C. Jeziorski, J. Riesgo-Escovar, G. Nava, F. López-Barrera, H. Quiróz-Mercado, P. Berger, G. Martínez de la Escalera, C. Clapp. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, Vol. 46, No. 8. Pp. 2947-2953.

Arnold, E., J.C. Rivera, S. Thebault, D. Moreno-Paramo, H. Quiróz-Mercado, A. Quintanar Stephano, N. Binart, G. Martínez de la Escalera y C. Clapp. 2010. High levels of serum prolactin Project againts diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*. Vol. 59, No. 12. Pp. 3192-7.

Bainbridge, J.W., A. Mistry, M. De Alwis, E. Paleolog, A. Baker, A.J. Thrasher y R.R. Ali. 2002. Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther.* Vol.9, No. 5. Pp.320-6.

Bainbridge, J.W., A.R. Mistry, A.J. Thrasher y R.R. Ali 2003. Gene therapy for ocular angiogenesis. *Clin Sci (Lond)*. Vol.104, No, 6. Pp.561-75.

Baldocchi, R. A., L. Tan, D.S. King y C.S. Nicoll. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*. Vol. 133. Pp. 935-938.

Ben-Jonathan, N., E.R. Hugo, T.D. Brandebourg y C.R. LaPensee. 2006. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab*. Vol. 61, No. 19. Pp. 7356-62.

Ben-Jonathan, N., J. Mershon, D. Allen y R. Steinmetz. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, function and clinical aspects. *Endocr Rev*. Vol. 17. Pp. 639–669.

Ben-Jonathan, N., J.L. Mershon, D.L. Allen y R.W. Steinmetz.1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews*. Vol. 17.Pp. 639–669.

Bhavsar, R. 2008. Diabetic retinopathy: the latest in current management. *Retina*. Vol. 26. Pp. 71-79.

Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart, P.A. Kelly. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* Vol. 19. Pp. 225-268.

Bradford, MM. 1979. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72. Pp. 248-254.

Brown, D., H. Hamdi, S. Bahri y M.C. Kenney. 1994. Characterization of an endogenous metalloproteinase in human vitreous. *Curr Eye Res.* 1994. Vol. 13, No. 9. Pp. 639-47.

Brownlee, M. 2005. The pathobiology of diabetes complications, a unifying mechanism. *Diabetes*. Vol. 54. Pp. 1615-25.

Cai, J. y M. Boulton 2002. The pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eye. NPG. Review*. Pp. 243.

Carmeliet, P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. Vol. 69, No. 21. Suppl 3. Pp. 4-10.

Cheung, N., P. Mitchell, T.Y. Wong. 2010. Diabetic Retinopathy. *Lancet*, Vol. 376. Pp. 112-122.

Clapp, C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16kDa forms. *Endocrinology*. Vol. 121, No. 6. Pp. 2055.

Clapp, C. y R.I. Weiner. 1992. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*. Vol. 130, No. 3. Pp. 1380-1386.

Clapp, C., J. Aranda, C. Gonzáles, M.C. Jeziorski y G. Martínez de la Escalera 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab.* Vol. 17. Pp. 301-307.

Clapp, C., L. Torner, G. Gutierrez-Espinosa, E. Alcantara, F. López-Gomez, M. Nagano, P. Kelly, S. Mejía, M. Morales, G. Martínez de la Escalera. 1994. The prolactin gene is expressed in the hypothalamicneurohypophyseal system and the protein is processed into a 14kDa fragment with activity like 16kDa prolactin. *Physiology.* Vol. 91. Pp. 10384.

Clapp, C., S. Thebault, E. Arnold, C. García, J.C. Rivera y G. Martínez de la Escalera. 2008. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J. Physiol Endocrinol Metab.* Vol. 295, No. 4. Pp. 772-778.

Clapp, C., S. Thebault, M. C. Jeziorski y G. Martínez de la Escalera. 2009. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiol Rev.* Vol.89. Pp.1177–1215.

Corbacho, A.M., G. Martínez de la Escalera y C. Clapp. 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/ placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol.* Vol. 173. Pp. 219–238.

D'Angelo, G., H. Lee y R.I. Weiner 1997. CAMP-dependent protein kinase inhibits the mitogenic action of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in capillary endothelial cells by blocking Raf activation. *J Cell Biochem.* Vol. 67. Pp. 353–366.

Daneman D. 2006. Type 1 diabetes. *Lancet.* Vol. 367. Pp. 847-858.

Das Evcimen, N. y G.L. King 2007. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res.* Vol.55, No.6. Pp. 498-510.

Deshpande, A.D., M. Harris-Hayes y M. Schootman. 2008. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther.* Vol. 88. Pp. 1254-1264.

Dueñas, Z., J.C. Rivera, H. Quiroz-Mercado. 2004. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Vol. 45. Pp. 2049–2055.

Dueñas, Z., L. Torner, A.M. Corbacho. 1990. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Vol.40. Pp. 2498–2505.

Federación Internacional de Diabetes. 2013 Atlas de la Diabetes de la FID. www.idf.org/diabetesatlas

Fong, D.S., L.P. Aiello, T.W. Gardner. 2004. Retinopathy in diabetes. *Diabetes care*. Vol. 27, No.1. Pp. 84S-87S.

Frank, R.N. 2004. Diabetic Retinopathy. *N. Engl J. Med*. Vol. 350. Pp. 48-58.

Freeman, M.E., B. Kanyicska, A. Lerant y G. Nagy. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev*. Vol. 80. Pp. 1523.

Gabbay, K. H. 1982 Glycosylated hemoglobin and diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. Vol. 66, No. 6. Pp.1309-15.

García, C., J. Aranda, E. Arnold, S. Thebault, Y. Macotela, F. López-Casillas, V. Mendoza, H. Quiróz-Mercado, H.L. Hernández-Montiel, S.H. Lin, G. Martínez de la Escalera y C. Clapp. 2008. Vasoinhibins prevent increased retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*. Vol. 118. Pp. 2291-2300.

Ge, G., C.A. Fernández, M.A. Moses y D.S. Greenspan. 2007. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci*. Vol. 104, No. 24. Pp. 314.

Goffin, V., S. Bernichtein, P. Touraine y P.A. Kelly. 2005 Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocrine Reviews*. Vol. 26. Pp. 400–422.

Goffin, V., S. Kinet, V. Mainfroid y J.A. Martial. 1996. Characterization of lactogen receptor-binding site 1 of human prolactin. *J Biol Chem*. Vol. 271, No. 24. Pp.14353-60.

González, C., A.M. Corbacho, J.P. Eiserich, C. García, F. López-Barrera, V. Morales-Tlalpan, A. Barajas-Espinosa, M. Díaz-Muñoz, R. Rubio, S.H. Lin, S.H. 2004. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*. Vol.145, No.57.

Gutiérrez, J.P., J. Rivera-Dommarco, T. Shamah-Levy, S. Villalpando-Hernández, A. Franco, L. Cuevas-Nasu, M. Romero-Martínez, M. Hernández-Ávila. 2012 Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

Hammes, H.P., W. Kerner, S. Hofer, O. Kordonouri, K. Raile y R. Holl 2011. Diabetic retinopathy in type 1 diabetes a contemporary analysis of 8,784 patients. *Diabetologia*. Vol. 54. Pp.1977–1984.

Harris, M. y P. Zimmet. 1997. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 2º Edición. En Alberti, K., P. Zimmet y R. DeFronzo) 9–23 (Wiley, Chichester).

Kaplan, H.J. 1996. Submacular surgery for choroidal neovascularization. *Br J Ophthalmol*. Vol. 80. Pp. 101.

Kaur, C., W.S. Foulds y E-A. Ling 2008. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clinical Ophthalmology*. Vol. 2, No.4.Pp. 879–889.

Kennedy, L., T.D. Mehl, E. Elder, M. Varghese, T.J. Merimee 1982. Non enzymatic glycosylation of serum and plasma proteins. *Diabetes*. Vol. 31(Suppl 3). Pp. 52-6.

Kern, T.S. y R.L. Engerman 1995. Vascular lesions in diabetes are distributed non-uniformly within the retina. *Exp Eye Res*. Vol. 60. Pp. 545-549.

Lamoureaux EL, Hassell JB, Keeffe JE. The impact of diabetic retinopathy on participation on daily living. *Arch Ophthalmol* 2004; 122: 84-88

Larrea, F., C. Villanueva, M.C. Cravioto, A. Escorza, O. Del Real.1985. Further evidence that big, big prolactin is preferentially secreted in women with hiperprolactinemia and normal ovarian function. *Fertil Steril*. Vol. 44. Pp. 25-30.

Lee, S.H., J. Kunz, S.H. Lin y L.Y. Yu-Lee. 2007. 16kDa prolactin inhibits endotelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam 1-Rac-Pak1 signalling pathway. *Cancer Res.* Vol. 67. Pp. 1045.

Lenzen, S. 2008. The mechamins of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetologia.* Vol. 51, No. 2. Pp. 216-226.

Macotella, Y., M.B. Aguilar, J. Guzmán-Morales, J.C. Rivera, C. Zermeño, F. López-Barrera, G. Nava, C. Lavallo, G. Martínez de la Escalera y C. Clapp. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of Cell Sci.* Vol.119, No.9. Pp. 1792.

Martini, J.F., C. Piot, L.M. Humeau, I. Struman, J.A. Martial, R. Weiner. 2000. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol.* Vol.14. Pp. 1536–1549.

Matthews, D.R., I.M. Stratton, S.J. Aldington. 2004. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch Ophthalmol.* Vol.122. Pp.1631–40.

Mohamed, Q., M.C. Gillies y T.Y. Wong. 2007. Management of Diabetic Retinopathy: systematic review. *JAMA.* Vol. 298. Pp. 902.

Navaratna, D., P.G. Mc Guire, G. Menicucci y A. Das. 2007. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes.* Vol. 56, No. 9. Pp. 2380-7.

O'Steen, W.K. y D.K. Sundberg.1982. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injections of Iodinated prolactin. *Ophtalmic Res.* Vol. 14, No.1.Pp. 54-62.

Pan, H., N.Q.N. Nguyen, H. Yoshida, F. Bentzien, L C. Shaw, F. Rentier-Delrue, J.A. Martial, R. Weiner, I. Struman y M.B. Grant. 2004 Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *IOVS,* Vol. 45, No. 7. Pp. 2413–2419.

Persson, B. y U. Hanson 1998. Neonatal morbidities in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* Suppl 2:B79-84.

Pinazo Durán, D.M. y J.J. García Medina 2008. Laser treatment in diabetic retinopathy. *Av Diabetol*. Vol. 24, No.1. Pp. 27-34

Piwnica, D., P. Touraine, I. Struman. 2004. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: Study of their anti-angiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol*. Vol.18. Pp. 2522–2542.

Plantner, J.J., C. Jiang y A. Smine.1998. Increase in interphotoreceptor matrix gelatinase A (MMP-2) associated with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. Vol. 67. Pp. 637–645

Pournaras, C.J., E. Rungger-Bradle, C.E. Riva, S.H. Hardarson y E. Stefansson. 2008. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res*. Vol. 23, No. 3. Pp. 284-330.

Powers A. Diabetes mellitus. En: *Harrison`s Principles of Internal Medicine*. 16th ed., New York, Mc Graw-Hill, 2005.

Ramírez, M., Z. Wu, B. Moreno-Carranza, M.C. Jeziorski, E. Arnold, N. Díaz-Lezama, G. Martínez de la Escalera, P. Colosi, C. Clapp. 2011. *Invest Ophtal Vis Sci*. Vol. 52, No. 12. Pp. 8944-50.

Reich, S.J., A. Kuroki, J. Fosnot, X.Y. Yang, A.M. Maguire, J. Bennett y M.J. Tolentino. 2003. VEGF Directed siRNA Inhibits Experimental Choroidal Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003. Vol. 44: E-Abstract 578

Rivera, J.C., J. Aranda, J. Riesgo-Escobar, G. Nava, S. Thebault, F. López-Barrera, M. Ramírez, G. Martínez de la Escalera y C. Clapp. 2007. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Experimental Eye Research*. Vol. 86. Pp. 314-321.

Rodríguez VE, Cervantes AF, Vargas SE, Ávalos MME, Juárez BDM, Ramírez BEJ. Retinopatía diabética. Incidencia y progresión a 12 años. *Cir Ciruj* 2005; 73: 79-84

Singh, R., K. Ramasamy, C. Abraham, V. Gupta y A. Gupta. 2008. Diabetic Retinopathy: an update. *Indian J. Ophtalmol*. Vol 56, No.3. Pp. 178-88.

- Sinha, Y.N. 1995. Structural variants of prolactin occurrence and physiological significance. *Endocr Rev.* Vol. 16. Pp.354.
- Sivak, J.M. y M.E. Fini. 2002. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res.* Vol. 21. Pp.1–14.
- Stefansson, E. 2009. Physiology of vitreous surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmology.* Vol. 247, No. 2. Pp. 147-163.
- Stumvoll, M., B.J. Goldstein y T.W. Van Haefen. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* Vol. 365. Pp. 1333.
- Suomalainen, V.P. 1993. Comparison of retinal lesions produced by transscleral krypton laser photocoagulation, transpupillar krypton laser photocoagulation and cryocoagulation. *Acta Ophthalmol Scand.* Vol. 71. Pp. 224–229.
- Tabruyn, S.P., N.Q. Nguyen, A.M. Cornet, J.A. Martial y I. Struman. 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.* Vol. 19. Pp. 1932- 1942.
- Tarr, J.M., K. K. Kaul, M. Chopra, E.M. Kohner y R. Chibber. 2012. Pathophysiology of Diabetic Retinopathy. *ISRN Ophthalmology.* Vol. 2013. ID 343560. Pp.13.
- Triebel, J., M. Huefner y G. Ramadori 2009. Investigation of prolactin-related vaso-inhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. Clinical Study. *European Journal of Endocrinology.* Vol.161. Pp. 345–353.
- Wei, M., L. Ong, M.T. Smith, F.B. Ross, K. Schmid, A.J. Hoey, D. Burstow y L. Brown. 2003. The Streptozotocin-Diabetic Rat as a Model of the Chronic Complications of Human Diabetes. *Heart, Lung and Circulation.* Vol. 12.
- Yam, J.C.S. y A.K.H. Kwok. 2007. Update on the treatment of diabetic retinopathy. *Hong Kong Med. J.* Vol. 13, No. 1. Pp. 46-60.