



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA
PRESENCIA DE LA SUBUNIDAD BETA
DEL COMPLEJO F_1F_0 ATP SINTASA EN
LA SUPERFICIE ENDOTELIAL,
DURANTE LA ACTIVACIÓN
MEDIADA POR CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOQUÍMICAS)**

P R E S E N T A :

**BIOL. HÉCTOR RUBÉN MAYA
PINEDA**



TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA
DEHESA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MÉXICO, D. F.
Noviembre 2007
CARACTERIZACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA
SUBUNIDAD BETA DEL COMPLEJO F₁F₀ ATP SINTASA
EN LA SUPERFICIE ENDOTELIAL, DURANTE LA
ACTIVACIÓN MEDIADA POR CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Alejandro Zentella Dehesa en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, unidad periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa	INCMNSZ, IIB, UNAM
Dra. Marietta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Marietta Tuena Sangri, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y del Dr. José de Jesús García para la realización de este proyecto, así como a la Dra. María Tusié Luna, del Departamento de Biología Molecular del INCMNSZ, en cuyo laboratorio se llevó a cabo la generación de los anticuerpos monoclonales.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. José Luís Ventura Gallegos, al Dr. José Esparza y la Dra. Paulina Cortés en los experimentos realizados durante el proyecto.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (45519-M) y PAPIIT (IN205703). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marietta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
------------	----------------------------	--

Vocal	Dra. Marcela Lizano Soberón	INCAN, IIB, UNAM
Secretario	Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química,
UNAM		
Suplente	Dra. María Elena Ibarra Rubio	Facultad de Química,
UNAM		
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química,
UNAM		

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mi hermano Jean, por su apoyo y comprensión durante todo este tiempo, sin el cual habría sido muy difícil la realización de esta, una meta más en este ya largo camino.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por admitirme en su grupo de investigación y Quien no solamente me aportó conocimientos sino que me ayudo a ver mi proyecto desde diferentes puntos de vista. Le agradezco mucho por sus observaciones, siempre objetivas y críticas, y por confiar en mi; así como por su apoyo para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	III
ABREVIATURAS	V
I. INTRODUCCIÓN	7
A. F1F0 ATP sintasa	7
a) Identificación antigénica de las subunidades y IF1 en la superficie celular.	13
b) Metabolismo de ecto-nucleótidos	14
B. Angiostatina	18
a) Acción de la angiostatina	23
C. Angiogénesis y cáncer.	24
D. Activación Endotelial	26
E. Anticuerpos monoclonales	29
II. ANTECEDENTES	32
A. Definición del Problema	33
III. HIPÓTESIS	34
IV. OBJETIVO GENERAL	34
A. Objetivo Particular	34
a) Posibles aplicaciones de los anticuerpos a generar	35
V. METODOLOGÍA	36
A. Cultivo de células endoteliales	36

B. Inmunoensayo tipo "western blot".	36
C. Citometría de flujo	38
D. Inmunoensayo tipo ELISA	39
E. Generación de anticuerpos monoclonales	40

VI. RESULTADOS 41

A. Caracterización de sueros policlonales de conejo contra subunidades purificadas del complejo F1F0 de la ATP sintasa de extracto mitocondrial de corazón de bovino	41
a) Patrón de bandeo de los extractos mitocondriales de corazón de bovino	42
b) Tamizaje de los antisueros de conejo generados contra las subunidades de la F1F0	44
c) Tamizaje de los antisueros de conejo generados contra las subunidades de la F1F0 en células L929	44
d) Modificación en las condiciones usadas de los antisueros con un posible reconocimiento de la subunidad	46
e) Optimización de las condiciones de bloqueo de los inmunoensayos contra las subunidades β y γ	48
f) Ensayos de citometría de flujo empleando el antisuero contra la subunidad beta.	49
B. Generación de anticuerpos monoclonales	51
a) Selección del ratón inmunizado contra el complejo F1F0 por afinidad.	51
b) Fusión y selección de hibridomas	53

VII. DISCUSIÓN 64

A. Caracterización de sueros policlonales de conejo contra subunidades purificadas del complejo F1F0 de la ATP sintasa	64
--	----

B. Generación de anticuerpos monoclonales	67
VIII. CONCLUSIONES	70
IX. PERSPECTIVAS	71
X. BIBLIOGRAFÍA	72
XI. ANEXOS	85

RESUMEN

Estudios previos han permitido identificar subunidades de la F_1F_0 ATP sintasa en complejos capaces de catalizar la síntesis de ATP en la superficie de células endoteliales humanas primarias. Este mismo complejo se postula como el posible receptor de la angiostatina y del HGF. La angiostatina es un inhibidor natural de la angiogénesis (creación de nuevos vasos sanguíneos). Se ha propuesto que las subunidades α y β de la ATP sintasa constituyen el principal sitio de unión en las células endoteliales para la angiostatina. La unión de la angiostatina a su receptor en células endoteliales promueve la inhibición de la proliferación y migración de las células endoteliales durante la angiogénesis tumoral, es decir es un agente antiangiogénico (Moser, *et al.* 2001). Al analizar la presencia de la subunidad beta del complejo F_1F_0 ATP sintasa en la superficie de las células endoteliales por citometría de flujo empleando anticuerpos contra esta subunidad, se encontró que el pre-tratamiento con TNF-alfa, inductor del estado endotelial activado, resulta en un decremento en la cantidad de esta subunidad detectada por esta técnica (Cortés, *et al.* 2005).

El complejo de la F_1F_0 ATP sintasa mitocondrial consta de 16 subunidades (α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ , OSCP e IP en F_1 y b_2 , c_{9-14} , d, e, F6, g, 6 y A6L en F_0) (García, *et al.* 2002), pero hasta ahora sólo se han identificado a las subunidades α , β (Moser, *et al.* 1999), γ (Arakaki *et al.* 2003) y la proteína inhibidora (IP; Burwick, *et al.* 2005), en la superficie externa de diversos tipos celulares.

Para el análisis del resto de las subunidades del complejo es necesario contar con anticuerpos monoclonales capaces de reconocer específicamente a cada una de ellas.

El contar con diferentes anticuerpos monoclonales permitiría la identificación del epítotope o epítopes de la subunidad β que interactúan con la angiostatina y que podrían ser el factor que desencadena la actividad antiangiogénica de la angiostatina.

Anteriormente, se estuvo trabajando con antisueros generados en conejo contra las subunidades del complejo. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios debido a la alta inespecificidad de éstos, lo que impidió tener la certeza de que el reconocimiento, así como las variaciones en la presencia de antígeno en respuesta al TNF- α en la célula, fueran atribuibles a la subunidad beta antes mencionada. Además, estos antisueros no se pudieron seguir produciendo debido a la muerte de los conejos.

Entonces se tomó la decisión de generar anticuerpos monoclonales como una fuente continua de anticuerpos, asegurando una mayor especificidad de estos hacia las subunidades del complejo y en especial para la subunidad beta.

ABREVIATURAS

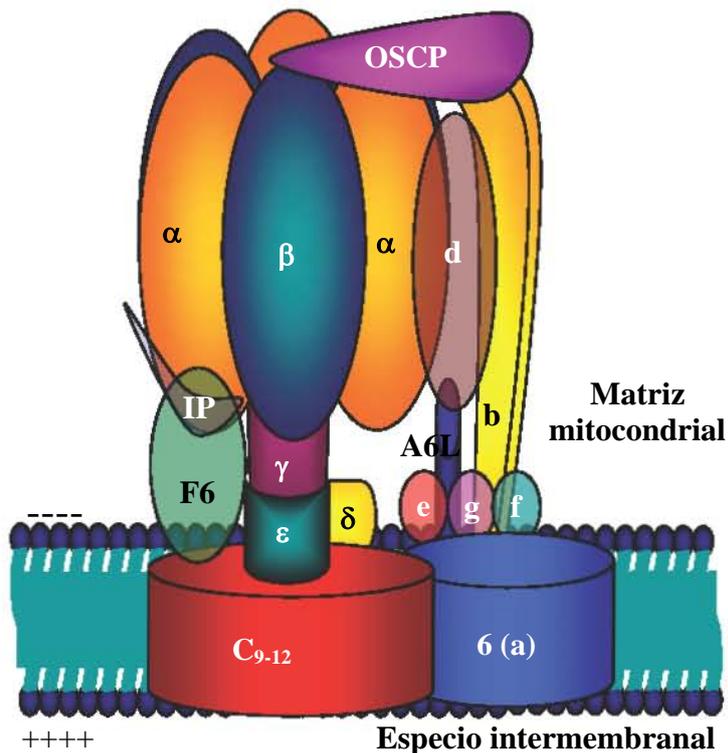
Ab	Anticuerpo
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADP	Adenosin Difosfato
ATP	Adenosin Trifosfato
Ca⁺	Ion de Calcio
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento
CDRs	Regiones determinantes complementarias
CH	Dominio constante de cadena pesada
CL	Dominio constante de cadena ligera
D.O.	Densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Células endoteliales
ELAMs	Moléculas endoteliales de adhesión a leucocitos
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fabs	Del inglés "fragment antigen binding"
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos b
Fc	Del inglés "fragment crystallizable"
FcγRs	Receptores gamma Fc
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FR	Residuos estructurales
FSDs	Donadores libres de sulfidrilos
H⁺	Protón de Hidrógeno
HAT	Medio de cultivo selectivo de hipoxantina, aminopterina y timidina
HGF	Factor de crecimiento hepático
HGPRT	Enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa
HIF	Factor inducible de hipoxia
HMEC-1	Células endoteliales humanas de microvasculatura 1
HUVECs	Células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IF1	Del inglés "Inhibitory factor one"
IFP	Intensidad de fluorescencia promedio
Ig	Inmunoglobulina
IKK	Cinasa IκB
IL-	Interleucina

IP	Proteína inhibidora
KDa	Kilo Daltones
L	Litros
LPS	Lipopolisacárido
Mab	Anticuerpos monoclonales
µg	Microgramos
Mg⁺	Ión Magnesio
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido Nítrico
OSCP	Del inglés "Oligomycin sensitivity conferring protein"
<i>P. modestum</i>	<i>Propionigenium modestum</i>
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PC-3	Carcinoma humano de próstata
PE	Ficoeritrina
TIM	Translocasa interna de la membrana mitocondrial
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TOM	Translocasa externa de la membrana mitocondrial
uPA	Urocinasa
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1
VEGF	Factor endotelial de crecimiento vascular
VEGFR	Receptor de VEGF
VH	Dominio variable de cadena pesada
VL	Dominio variable de cadena ligera
vmrl	Valor medio del rango de lecturaalor medio del rango de lectura

I. INTRODUCCIÓN

A. F₁F₀ ATP sintasa

La F₁F₀-ATP sintasa es un complejo mitocondrial muy bien caracterizado



+++++
Fig. 1. Estructura del complejo F₁ F₀ de la ATP sintasa mitocondrial.

que cataliza en forma reversible la reacción de síntesis o hidrólisis de ATP. Por lo tanto, la forma mitocondrial, funciona como ATP sintasa aprovechando la energía de un gradiente protón-motriz. Este proceso consume protones transportados por su canal F₀ del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial.

Inversamente, la unión de Mg²⁺ a ATP y la hidrólisis de éste último, impulsan la rotación del cuello central en la parte catalítica F₁. Dado que este cuello central está asociado a un anillo de 10-12 subunidades c en F₀, esta rotación impulsada desde F₁ se extiende a F₀ con lo cual se bombean protones desde el lado negativo al lado positivo de la membrana. Esta translocación de protones genera un gradiente electroquímico. El acoplamiento de este proceso a la hidrólisis de ATP permite que este complejo pueda exportar protones eficientemente aun en contra de su gradiente electroquímico (García, 2005).

En comparación de otros motores moleculares como el motor flagelar que es impulsado por una diferencia en el potencial electroquímico a través de la membrana citoplasmática independiente de ATP (Junge, 1999), la ATP sintasa utiliza dos sistemas de fuerza motora: produce ATP a expensas de una diferencia de potencial electroquímico y en sentido contrario genera una diferencia electroquímica a expensas de la hidrólisis de un ATP (Junge, 1999).

En la bacteria *Propionigenium modestum*, en el mecanismo de movimiento electroquímico de la ATP sintasa, la porción F_0 conduce cationes de Na^+ , en contraste, bacterias fotosintéticas y respiratorias translocan H^+ como en los cloroplastos y las mitocondrias de eucariontes (Junge, 1999). A pesar de esta diferencia, la ATP sintasa de *P. modestum* opera con el mismo principio general de las enzimas translocadoras de H^+ . Se ha demostrado, que con base en construcciones quiméricas de las enzimas translocadoras de protones entre *P. modestum* y la F_1 de *E. coli* (Kaim y Dimroth, 1995; Laubinger *et al.* 1990), entre cloroplastos y cianobacterias, así como *E. coli* (Engelbrecht *et al.* 1989; Lill *et al.* 1993) sus subunidades tienen la misma estructura y funcionalidad. Esta conservación de función de las construcciones quiméricas entre diferentes reinos de vida fue inesperada, considerando los millones de años de evolución que las separa (Blair, Ngo *et al.* 1996).

La ATP sintasa ha aumentado en complejidad estructural conforme las membranas transductoras de energía se han especializado en su función de sintetizar ATP, pero manteniendo una base estructural que presenta pocas o nulas modificaciones (García, 2005).

En eubacterias como *E. coli* la enzima contiene solo 8 subunidades ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta$ en F_1 y ab_2c_{9-14} en F_0), las cuales aumentan a 10 y 16 en cloroplastos y

mitocondrias, respectivamente (García, *et al.* 2002). En eucariontes la porción soluble F_1 se compone de un hetero-hexámero de 3 subunidades α y 3 β alternadas entre sí. Este complejo hexamérico está unido a un cuello central formado por las subunidades γ , ϵ y δ (García, *et al.* 2002). La porción transmembranal F_0 consta de un canal de protones que se forma en la interfase entre la subunidad **6** y el anillo de subunidades **c** y un tallo lateral, formado por las subunidades **b**, **d** y **F6** (García, *et al.* 2002). En la parte superior del tallo lateral se ubica la subunidad **OSCP** (del inglés: oligomycin sensitivity conferring protein) que acopla este tallo con el hexámero $\alpha_3\beta_3$ (García, *et al.* 2002; Fig. 1).

La ATP sintasa funciona como un motor rotatorio donde el flujo de protones a través de la porción F_0 provoca que el anillo de subunidades **c** y el cuello central roten respecto al resto de la enzima, generando cambios

Sector	Subunidad	
F_1	3 α	} Genes Nucleares
	3 β	
	γ	
	δ	
	ϵ	
	OSCP Inhibidora	
F_0	b	} Genes Mitocondriales
	9-14 c	
	F6, d, e, f, g	
	6* A6L	

Tabla 1. Subunidades dependientes de genes nucleares y genes mitocondriales (García, *et al.* 2002)

conformacionales en los sitios catalíticos de la subunidad F_1 ; los cuales resultan en la síntesis y liberación de ATP (García, *et al.* 2002).

El complejo tiene la peculiaridad de ensamblarse a partir de la expresión de 2 genomas (Tabla 1), ya que la mayoría de sus subunidades se codifican

en el núcleo, pero dos subunidades (**6** y **A6L**) están codificadas en el genoma mitocondrial (García, *et al.* 2002).

Las proteínas mitocondriales son sintetizadas como proteínas precursoras y son translocadas a la matriz mitocondrial a partir del citosol por sistemas de importación proteica. Esta importación se realiza por un mecanismo postraducciona l distinto al del retículo endoplásmico (Alberts, 2002). Las proteínas precursoras mitocondriales tienen una secuencia señal en su extremo N terminal que es rápidamente removido por la peptidasa señal después de la importación a la mitocondria. La característica estructural de la secuencia señal es su tendencia a plegarse en forma de α hélice (Alberts, 2002). La translocación de proteínas a través de la membrana está mediada por complejos proteicos que funcionan como translocadores de proteínas: los complejos son la translocasa externa de la membrana mitocondrial (TOM) y la translocasa interna de la membrana mitocondrial (TIM). El complejo TOM se localiza en la membrana externa, mientras que el complejo TIM formado por las subunidades TIM23 y TIM22 se ubica en la membrana interna (Alberts, 2002). La acción conjunta de estos dos sistemas de transporte permite el paso de proteínas del citosol a la matriz mitocondrial. El complejo TOM se requiere para la importación de todas las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo. El complejo TOM transporta la secuencia señal al espacio intermembranal y ayuda a insertar proteínas transmembranales a la membrana externa (Alberts, 2002). Después el complejo TIM23 transporta algunas de estas proteínas a la matriz, mientras ayuda a insertar proteínas transmembranales a la membrana interna. El complejo TIM22 media la inserción de una subclase de proteínas de membrana internas como la proteína acarreadora que transporta ADP, ATP y fosfato (Alberts, 2002).

La porción F_0 comienza a ensamblarse con la formación del anillo de subunidades c , al cual se acopla la porción F_1 que se ensambla en forma independiente (García, *et al.* 2002; Tzagoloff, *et al.* 2004). Después, se

agrega la subunidad **A6L** y el tallo lateral con **OSCP** y, sólo entonces, se agrega la subunidad **6**, habilitando al canal de protones (García, *et al.* 2002; Tzagoloff, *et al.* 2004). Se propone que el establecimiento secuencial de un puente entre dos residuos del canal de protones la arginina 159 de la subunidad **6** y el glutámico 58 de cada una de las subunidades **c** son esenciales para el mecanismo de rotación en respuesta al gradiente de protones (García, *et al.* 2002).

La hidrólisis del ATP impulsa la rotación del cuello central de la parte catalítica F_1 , conformado por las subunidades γ , δ y ϵ en la enzima mitocondrial. Dado que este cuello central está asociado a un anillo de 10-12 subunidades **c** del canal F_0 , esta rotación impulsada desde la F_1 se extiende a F_0 .

Dada la reversibilidad de la reacción catalizada por este complejo enzimático, la naturaleza ha diseñado diferentes mecanismos de regulación que inhiben de manera preferente el funcionamiento del complejo F_1F_0 en el sentido de la hidrólisis de ATP (actividad de F_1F_0 -ATPasa) en condiciones donde disminuye el gradiente de protones (García, 2005). Han surgido diferentes subunidades a lo largo de la evolución que funcionan como inhibidores preferenciales de la actividad de F_1F_0 -ATPasa. En eubacterias, la subunidad ϵ participa en la rotación del cuello central del complejo durante la síntesis de ATP. En sentido contrario la actividad hidrolítica de la F_1F_0 -ATPasa es inhibida por la subunidad ϵ (García, 2005). En la enzima de cloroplastos, se genera un puente disulfuro durante la fase oscura en la subunidad γ del rotor lo que disminuye la velocidad de rotación del cuello central, así, se previene que el complejo F_1F_0 hidrolice al ATP generado durante la fotosíntesis (García, 2005).

En mitocondrias, la proteína IF₁ (de sus siglas en inglés, Inhibitory Factor one) es una proteína básica de 9.6 KDa que comprende 84 amino ácidos (Pullman y Monroy 1963), se ha descrito como el inhibidor intrínseco de la actividad de F₁- ATPasa y F₁F₀-ATPasa mitocondriales (Pullman y Monroy, 1963).

La IF₁ se une al dímero α/β del sitio catalítico por su extremo N-terminal (Cabezón, 2003). La IF₁, también se encuentra unida a las subunidades γ y ϵ del rotor central de la F₁ (Minauro-Sanmiguel, 2002). La inhibición de la IF₁ involucra dos mecanismos independientes: por una parte interfiere con el giro del rotor central y por otra inhibe los cambios conformacionales de los sitios catalíticos. En bacterias y cloroplastos los mecanismos de inhibición convergen en el bloqueo de la rotación del cuello central (García, 2005).

La unión de la IF₁ a la ATP sintasa es dependiente del pH, con lo que está directamente acoplada al gradiente protonmótriz. Al reducirse el pH debajo de la neutralidad, la capacidad inhibitoria de IF₁ se incrementa (Panchenko y Vinogradov, 1985). En la ausencia de oxígeno o en la presencia de un desacoplante de la fosforilación oxidativa la ATP sintasa hidroliza ATP y la glicólisis se convierte en la única fuente de ATP celular (Cabezón, *et al.* 2000).

Se ha sugerido que la IF₁ existe en dos conformaciones: una forma inactiva rica en α -hélices, no inhibitoria predominante arriba de pH 6.7, y una forma inhibitoria activa, con baja cantidad de α -hélices, presenta valores de pH menores a 6.7 (Cabezón, *et al.* 2000).

En resumen, desde el punto de vista energético, estructural y funcional la ATP sintasa que asemeja a un pequeño motor molecular es un complejo proteico mitocondrial muy importante para la célula, debido a su alta

eficiencia y capacidad, producto de un proceso evolutivo de millones de años. Un hallazgo inesperado en años recientes ha sido la identificación de varias de sus subunidades en una localización extramitocondrial, en especial, en la membrana plasmática (Moser, *et al.* 1999).

a) Identificación antigénica de las subunidades α , β e IF1 en la superficie celular.

Proteínas que normalmente se encuentran en el citoplasma como la α -enolasa (Miles, *et al.* 1991), también se encuentran en la superficie externa de la membrana celular e intervienen en la unión del plasminógeno o ayudan en la citotoxicidad mediada por linfocitos, respectivamente. Se ha reportado que las subunidades α , β y γ de la ATP sintasa se localizan en la membrana plasmática de células neoplásicas (Das, *et al.* 1994), endoteliales (Moser, *et al.* 1999; Arakaki *et al.* 2003) y hepáticas (Martínez, *et al.* 2003). Recientemente se ha encontrado que la membrana plasmática de células endoteliales también presenta la proteína inhibidora (IP; Burwick, *et al.* 2005) y se cree que regula la actividad catalítica de la F_1F_0 de membrana plasmática (Burwick, *et al.* 2005). Sin embargo, dada la falta de anticuerpos comerciales contra el resto de las subunidades de la ATP sintasa no se ha establecido si el resto de las subunidades de F_1F_0 están presentes en la membrana plasmática.

Se ha propuesto que la enzima puede ser un receptor para ligandos como la angiostatina en células endoteliales (Moser, *et al.* 1999, 2001); también se ha sugerido que la actividad de F_1F_0 en la membrana plasmática puede regular las señales de transducción de la angiostatina (Arakaki, *et al.* 2003; Veitonmaki *et al.* 2004). También se ha reportado que la enzima puede jugar un papel importante en la regulación de la concentración extracelular de nucleótidos (Arakaki, *et al.* 2003).

b) Metabolismo de ecto-nucleótidos

La ATPsintasa en la superficie de HUVEC's es catalíticamente competente en la síntesis de ATP (Moser, *et al.* 2001), por lo que el concepto de que la síntesis de ATP es estrictamente intracelular es cuestionable. La presencia extracelular de enzimas del metabolismo de los nucleótidos está de acuerdo con el hecho de que tanto nucleósidos como nucleótidos de adenina actúan como moléculas de señalización extracelular (Hoyle y Bunnstock, 1991; Ravelic y Bunnstock, 1998). El papel extracelular de los nucleótidos en la regulación de la comunicación intercelular está ampliamente conservado en la evolución eucariótica (Soderbom y Loomis, 1998). Además, receptores extracelulares para el ATP pueden estar como canales iónicos (P2X) o como receptores acoplados a proteínas G (P2Y), que en todos los tejidos de mamíferos son ubicuos (Ravelic y Bunnstock, 1998). El ATP extracelular puede activar cascadas de señalización por medio de la unión a los receptores P2X/P2Y en la superficie celular, lo que desencadena la activación de la cinasa 3 fosfatidilinositol, la estimulación de la síntesis de DNA y la replicación celular (Moser, *et al.* 2002; Ravelic y Bunnstock 1998; González-Gronow *et al.* 1994).

Varios nucleótidos como son ATP y UTP actúan sobre diferentes receptores celulares como P2Y₂, P2Y₆, y P2X₇ en células endoteliales, macrófagos y células epiteliales; esto estimula la expresión de moléculas de adhesión (como ICAM-1 y VCAM-1) y de secreción como citocinas y quimiocinas (IL-1, IL-6, IL-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1; Boeynaems y Communi, 2006).

En el sistema cardiovascular, la adenosina liberada de miocitos, mantiene el flujo sanguíneo a zonas isquémicas del corazón (Berne y Belardinelli,

1985) y el ATP puede jugar un papel importante en la regulación, momento a momento, del flujo cardiaco de sangre en estados no patológicos (Buxton y check, 1995).

Las células endoteliales liberan ATP en respuesta a estímulos como estrés y a agonistas vasoactivos incluyendo ATP (Yang *et al.* 1994; Bodin y Bunnstock, 1996). La presencia de cantidades significativas de ATP en la superficie de células endoteliales puede proveer varios mecanismos para promover la proliferación endotelial e incrementar el flujo sanguíneo de tumores vascularizados (Moser *et al.* 2001).

Una hipótesis sugiere que el ATP generado en la superficie está disponible para actuar a través del receptor P2Y para activar cascadas de señalización dependientes de Ca^{2+} , que incrementarían la síntesis de ADN (Ravelic y Bunnstock, 1998), promoviendo la proliferación celular endotelial en el ambiente tumoral. La ATPsintasa membranal de células HUVECs (es una ecto-nucleotidasa tipo E ya que es capaz de sintetizar ATP e hidrolizar ADP (Plesner, 1995), también metaboliza la liberación del agonista de plaquetas, ADP lo que indica que esta enzima forma parte de un sistema tromborregulador (Marcus, et al 1995).

Otras ecto enzimas importantes dentro del metabolismo del ATP son la adenosina desaminasa, una enzima soluble presente en suero y en la superficie de algunas células y la nucleótido pirofosfatasa (Yegutkin, *et al.* 2001). Si bien esta última es importante en diversos tejidos para el catabolismo de ATP, no se expresa en la membrana apical de células endoteliales. (Gendaszewska-Darmach E, *et al.* 2003; Zimmermann H. 2000).

Con todo lo anterior, queda claro que existen vías de síntesis y degradación de ATP y nucleótidos de adenina en el espacio extracelular

donde sirven como señales de estrés tisular, o moduladores de la coagulación e incluso, alterando el fenotipo endotelial. Dentro de este contexto, la presencia de la ATP sintasa en la superficie endotelial puede representar uno de los mecanismos de generación de ATP extracelular y jugar un papel relevante en la activación de plaquetas, leucocitos y de las mismas células endoteliales regulando la respuesta inflamatoria.

Existen varios inhibidores de la ATP sintasa mitocondrial como agliconas isoflavononas, esteres de catequinas y varios compuestos polifenólicos (Zheng, *et al.* 1999, 2000; Barnes, *et al.* 1995; Yang, *et al.* 1999). También, el resveratrol que inhibe el desarrollo de crecimiento tumoral inducido por 7, 12-dimetilbenzantracenos (Jang *et al.* 1997) y al piceatanol que inhibe el crecimiento tumoral al inhibir cinasas de tirosina (Zheng, y Ramírez 1999).

Un inhibidor específico para la hidrólisis del ATP en la mitocondria que se ha identificado, es la proteína inhibidora o IF₁. Esta actividad inhibitoria ha sido identificada también sobre la superficie de células endoteliales (Burwick *et al.* 2005). Dicha inhibición no se asocia con el bloqueo de la proliferación endotelial, por lo que no parece estar ligado a los efectos de la angiostatina. Al interferir con la degradación de ATP, la IF₁ podría tener una función protectora sobre las células endoteliales en un microambiente tumoral al permitirles conservar ATP durante periodos de bajo pH (Burwick *et al.* 2005). Por el contrario, la unión de la angiostatina a la ATP sintasa no sólo disminuye la proliferación, sino que también interfiere con la síntesis de ATP, abatiendo los niveles extracelulares del nucleótido y cambiando el balance hacia un efecto antiangiogénico. Un ambiente con bajo pH favorece la unión de IF₁ a células endoteliales y células tumorales lo que sugiere que IF₁ puede modular la angiogénesis tumoral. La dependencia del crecimiento tumoral en la angiogénesis está ya muy bien

documentada, y es conocido que la expansión tumoral más allá de su tamaño prevascular ($1-3\text{mm}^3$) requiere de la generación de nuevos vasos sanguíneos (Folkman, 1986). En las mitocondrias a bajo pH, decrece el pH de la matriz y el gradiente de protones requerido para la síntesis de ATP declina, bajo estas condiciones la IF_1 conservaría ATP sobre la superficie de células endoteliales dando a los vasos sanguíneos una fuente constante de ATP, facilitando la angiogénesis y también el crecimiento de las células tumorales (Burwick *et al.* 2005).

La adición de ATP sintasa a cultivos de líneas celulares tumorales induce una despolarización de la membrana, cambian su permeabilidad y terminan por lisar las células transformadas (Virgilio, *et al.*; Zanovello, *et al.* 1990). Por lo que se induce que la ATP sintasa de la mitocondria pueda estar presente en la superficie de líneas celulares tumorales, donde participaría en el transporte de H^+ a través de la membrana plasmática (Moser, *et al.* 1999).

También se ha reportado que la angiostatina, reconoce al complejo α/β de la ATP sintasa en la superficie de células endoteliales, donde bloquea la actividad tanto de ATP sintasa como de ATPasa del complejo enzimático (Moser, *et al.* 1999, 2001). Se ha reportado que la angiostatina también inhibe la proliferación celular (Cao, *et al.* 1996; Moser, *et al.* 2001). Sin embargo, el mecanismo de acción de la angiostatina en el complejo ATP sintasa de las células endoteliales aún se desconoce (Moser *et al.* 2001)

Con la identificación de subunidades del complejo de la ATP sintasa en la superficie de células tumorales y endoteliales, la visión clásica de la ATP sintasa como un complejo exclusivo de la mitocondria se ha modificado. Su presencia en la superficie de células endoteliales podría contribuir el

metabolismo del ATP y ectonucleótidos de adenina, aunque esto aún requiere de comprobación, además de la progresión de procesos tumorales. La función de la ATPasa en la superficie endotelial también parece estar ligada a los efectos de la angiostatina, al fungir como su posible receptor.

B. Angiostatina

En la vasculogénesis que se da durante el desarrollo embrionario, células endoteliales nuevas se diferencian de las células madre. En contraste, en la angiogénesis nuevos vasos sanguíneos emergen de vasos pre-existentes (Risau, 1997).

En la vida adulta, donde la vasculogénesis está ausente, estímulos fisiológicos como la curación de heridas y el ciclo reproductivo de la mujer favorecen la angiogénesis. Condiciones patológicas como el crecimiento tumoral, la artritis reumatoide y la retinopatía diabética, también inducen la angiogénesis (Ji, *et al.* 1998). Se ha propuesto que en cáncer pueda darse incluso la vasculogénesis. La fase activa de remodelamiento vascular en los tumores es un reflejo del hecho de que células endoteliales tumorales proliferan entre 20 y 2000 veces más rápido que el tejido normal en adultos (Denekamp, 1984).

La angiogénesis consiste en una secuencia de eventos que incluyen (I) la disolución del basamento membranal, (II) la migración, (III) la proliferación de células endoteliales, (IV) la formación de ramificaciones vasculares y (V) la formación de un nuevo basamento membranal (Jendraschak y Sage, 1996).

Se han descrito varios factores angiogénicos que incluyen al factor vascular de crecimiento endotelial, el factor básico de crecimiento fibroblástico y la

fosforilasa de timidina. Por el contrario, se han identificado factores naturales de inhibición angiogénica como trombospondina y la angiostatina (Bicknell y Harris 1996). Por lo general, en tumores se sobreexpresan varias moléculas proangiogénicas, incluyendo miembros de las familias del factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF básico) y del factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) (Kandel, 1991).

La angiogénesis se inicia rápidamente en respuesta a condiciones hipóxicas o isquémicas. En células endoteliales, la relajación vascular mediada por óxido nítrico (NO) es un prerrequisito para que entren a una cascada angiogénica, también cambios morfológicos conducen a un decremento en el estado de confluencia haciéndolas susceptibles a mitógenos (Folkman, 1997). En todos los tipos de angiogénesis bajo condiciones tanto fisiológicas como patológicas, la activación endotelial es el primer evento que se lleva a cabo (Moser, *et al.* 2001).

Se ha sugerido que el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) es importante durante el inicio de la angiogénesis dada su habilidad para inducir vasodilatación, producción de NO y un incremento en la permeabilidad de las células endoteliales (Ziche *et al.*, 1997). Esto le permite a proteínas del plasma entrar al tejido para formar una red provisional rica en fibrina (Dvorak, 1986). La observación de que la producción de VEGF está bajo el control del factor inducible de hipoxia (HIF) fortalece la idea de que el VEGF juega un papel importante en la respuesta angiogénica temprana. Además, la expresión del receptor de VEGF (VEGFR) también está regulado bajo condiciones hipóxicas o isquémicas (Forsythe *et al.*, 1996). El VEGF es producido abundantemente por células tumorales hipóxicas, monocitos y otras células del sistema inmune presentes en el intersticio (Brown *et al.*, 1997).

Además de afectar la vasodilatación y permeabilidad vascular, VEGF puede inducir la expresión de proteasas, receptores importantes en la invasión celular, el remodelamiento tisular y prevenir la apoptosis endotelial (Ferrara y Keyt, 1997; Gupta *et al.*, 1999). La angiogénesis no es completamente dependiente de la producción del VEGF (Hansen-Algenstaedt *et al.* 1999).

Señales proangiogénicas generadas por las células tumorales, ponen en movimiento una serie de respuestas endoteliales altamente reguladas (Moser, *et al.* 2001). El sistema fibrinolítico del plasminógeno, sus activadores y sus inhibidores, juegan un papel principal en los eventos que ocurren entre células endoteliales y tumorales (Folkman, 2000). La plasmina es enzimáticamente importante por su habilidad para activar metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que permiten a las células tumorales degradar proteolíticamente barreras del basamento membranal generando invasión y eventualmente dando lugar a metástasis (Liotta, 1992; DeClerck y Laug, 1996).

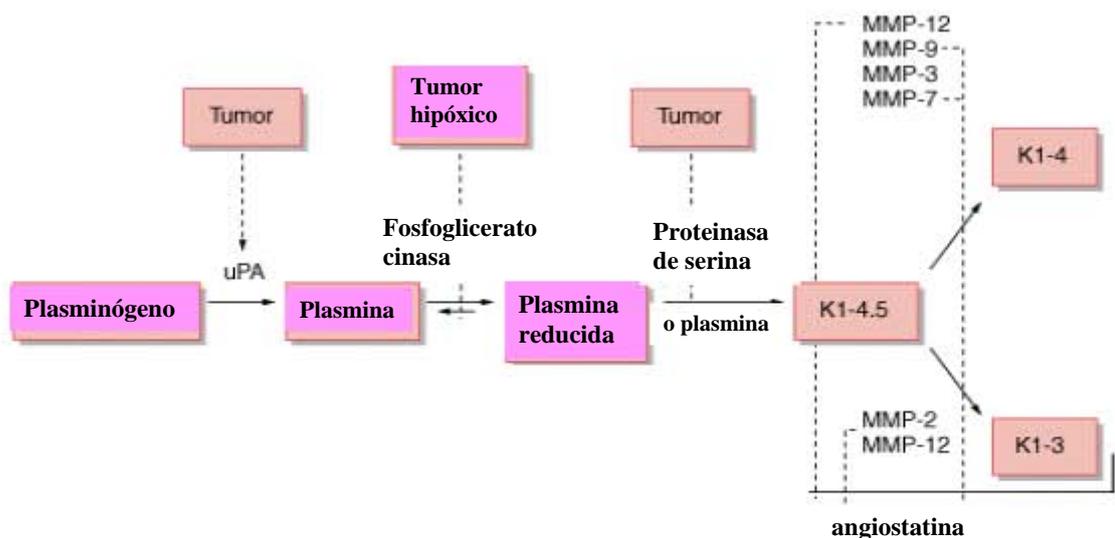


Fig. 2.- Fragmentos derivados del plasminógeno y enzimas que los hidrolizan. Tomada de Cancer Medicine. 6th ed. Frei III, Emil, editors. Hamilton (Canada): Fig. 11-8 c2003.

El plasminógeno y sus activadores se unen a receptores de membrana de las células tumorales, donde se genera la plasmina y donde se activa la transducción de señal, promoviendo la secreción de la metaloproteinasa 9 (MMP-9; González-Gronow, *et al.* 1994, 2001). El rompimiento proteolítico de la plasmina por proteinasas de las células tumorales, producen fragmentos adicionales que carecen de actividad proteolítica y algunos de los cuales inhiben la angiogénesis (O'Reilly, *et al.* 1994; Gately, *et al.* 1996, 1997). Estos fragmentos, llamados angiostatinas, se encuentran entre los inhibidores más potentes de la angiogénesis. Todas las angiostatinas tienen en común la presencia de uno o más de los cinco dominios “kringle” (arrugas) contenidos dentro del plasminógeno, el más estudiado es el producto que contiene los dominios “kringle” 1, 2 y 3. Esta forma de angiostatina inhibe la proliferación y la migración de células endoteliales (Moser, *et al.* 1999).

Existen reportes en los que se menciona que la metaloelastasa, la elastasa de páncreas, la plasmina reductasa y la plasmina convierten al plasminógeno a angiostatina. Existen dos miembros de la familia de MMPs, la matrilisina (MMP-7) y la gelatinasa B/colagenasa tipo IV (MMP-9), que hidrolizan al plasminógeno humano generando fragmentos de angiostatina (Patterson y Sang, 1997; Fig.3).

La conversión del plasminógeno a angiostatina parece requerir de una reducción de puentes disulfuro, seguida de una proteólisis (Stathakis, *et al.* 1997; Gately, *et al.* 1997).

Células de carcinoma humano de próstata (PC-3) liberan enzimas que convierten al plasminógeno en angiostatina, como la urocinasa (uPA) y donadores libres de sulfidrilo (FSDs; Gately, *et al.* 1997). Otras enzimas capaces de generar la angiostatina son las proteinasas de serina (Gately, *et*

al 1996), una metaloelastasa de macrófago (Dong, *et al.* 1997) y la metaloproteinasa 3 de matriz (MMP-3; Lijnen, *et al.* 1998).

La angiostatina se purificó originalmente a partir de orina de ratones con carcinoma pulmonar de Lewis (O'Reilly, *et al.* 1994) y es generada de manera endógena por una variedad de tumores humanos (Kisker, *et al.* 2001; Gately, *et al.* 1996).

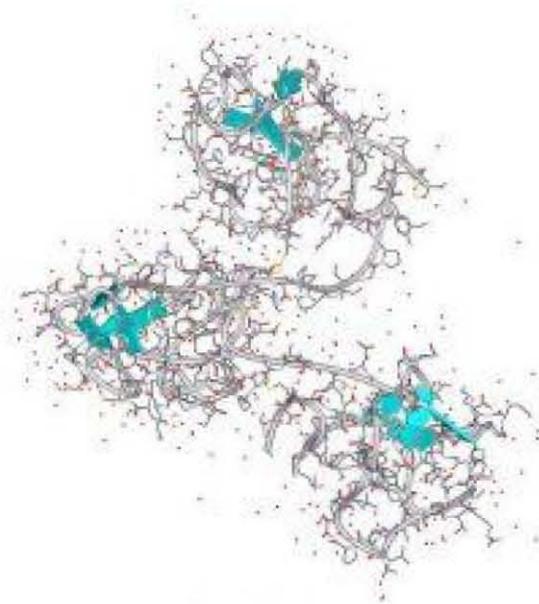


Fig. 3.- Modelo tridimensional de la angiostatina realizado en Swiss model.
www.expasy.ch

La angiostatina es una proteína de aproximadamente 38KDa (O'Reilly, *et al.* 1994), que suprime el crecimiento de tumores experimentales en modelos animales (O'Reilly, *et al.* 1996). Comprende los primeros tres o cuatro dominios "kringle" (arrugas) del plasminógeno. Cada "kringle" consiste de aproximadamente 80 aminoácidos (Fig. 3) arreglados en un patrón altamente conservado de triplete de puentes disulfuro que le dan estabilidad. La angiostatina comienza en el residuo Val79 o Tyr80 del plasminógeno (O'Reilly, *et al.* 1996).

a. **Acción de la angiostatina.**

Se ha observado que la angiostatina inhibe la proliferación de células endoteliales y de músculo liso al interrumpir la transición G2/M durante el ciclo celular (Griscelli, *et al.* 1998). Induce apoptosis y presenta efectos inhibitorios en células HUVECs, lo cual indica que su unión a la ATPsintasa, puede funcionar como un mecanismo de inhibición del crecimiento de células endoteliales (Claesson-Welsh, *et al.* 1998; Moser, *et al.* 1999). Se han sugerido varios receptores para la angiostatina como: la ATPsintasa en la superficie endotelial, Vb3, la angiomotina. Se ha sugerido que la angiostatina y la anexina II, pueden mediar una cascada de eventos que desencadenaría una inhibición de la angiogénesis (Moser, *et al.* 1999).

La angiostatina puede bloquear la función de la integrina $\alpha_3\beta_3$ (Tarui, *et al.* 2001), inhibir la activación del plasminógeno en la matriz extracelular (Stack, *et al.* 1999) y la migración endotelial, lo que induciría su efecto antiangiogénico (Trojanovsky, *et al.* 2001).

La angiostatina tiene similitudes con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un factor angiogénico de crecimiento que actúa como mitógeno e inductor de la motilidad en células endoteliales y de músculo liso (Wajih y Sane, 2003). A pesar de que tienen el efecto contrario sobre la angiogénesis, tanto HGF como la angiostatina poseen dominios “kringles” (Cao, *et al.* 1996; Nakamura, *et al.* 1989) y comparten una homología significativa a nivel de aminoácidos (Naldini, *et al.* 1991). Se ha demostrado que la angiostatina inhibe la respuesta al HGF en células endoteliales y de músculo liso, mientras que no afecta los eventos de señalización estimulados por VEGF y b-FGF (Wajih y Sane, 2003). La angiostatina inhibe la autofosforilación del receptor del HGF (c-met), así como los eventos río abajo incluyendo la fosforilación de Akt y ERK1/2.

Esta inhibición parece ser competitiva, ya que puede ser revertida por altas concentraciones de HGF, es decir, el HGF compite con la angiostatina por los mismos sitios de unión sobre la superficie de células HUVEC (Wajih y Sane, 2003).

La angiostatina no sólo inhibe la proliferación, sino que también inhibe la migración celular mediada por VEGF y el b-FGF, al parecer, debido a la interferencia con la función de las integrinas (Wajih y Sane, 2003). En células endoteliales, en condiciones de bajo pH puede inducir acidosis intracelular y anoikis (pérdida de unión celular). Lo cual indicaría que la angiostatina tendría un efecto modulador dentro de un microambiente tumoral (Wajih y Sane, 2003).

La angiostatina recombinante murina inhibe fuertemente la proliferación de células capilares endoteliales bovinas *in vitro* y suprime el crecimiento del carcinoma primario pulmonar de Lewis (Wu, *et al.* 1997). Otros estudios muestran una inhibición en el crecimiento de tumores primarios en ratones inyectados con angiostatina purificada, con evidencia de un incremento en la apoptosis tumoral específica (O'Reilly, *et al.* 1996). El efecto antiproliferativo de la angiostatina también es resultado de la inhibición en la progresión del ciclo celular (Griscelli, *et al.* 1998). Sin embargo, el mecanismo molecular del efecto antiangiogénico de la angiostatina no ha sido elucidado.

C. Angiogénesis y cáncer.

Estudios muestran que tanto el crecimiento tumoral como las metástasis a órganos distantes son dependientes de la angiogénesis (Kim *et al.* 1993). Los tumores primarios arriba de 1-2 mm de diámetro (Harris, 1998), para producir metástasis necesitan reclutar vasos angiogénicos para su

crecimiento (Folkman, 1971; Folkman y Shing 1992). La angiogénesis normal o maligna depende del balance de factores pro y antiangiogénicos (Andre, *et al.* 1998). Es por eso que los inhibidores angiogénicos endógenos como la angiostatina tienen un papel muy importante en el desarrollo de los tumores (Moser, *et al.* 1999). Los blancos bioquímicos de la terapia antiangiogénica son: la interacción entre factores angiogénicos y sus receptores, la interacción de células endoteliales con la matriz extracelular y las vías de señalización intracelular (Andre, *et al.* 1998).

Existen muchas evidencias que apoyan el concepto de que la angiogénesis es un prerrequisito para el crecimiento tumoral. Al bloquear reguladores positivos de la angiogénesis o utilizar reguladores negativos del proceso se presenta un retraso o regresión de tumores experimentales. Como ya hemos mencionado, el VEGF y el b-FGF, son mitógenos potentes y fuertes quimioatrayentes para células endoteliales (Shing, *et al.* 1984; Maciag, *et al.* 1984; Ferrara y Henzel. 1989). Esto ha llevado a tratar de interferir con la función de estos factores. En tumores, anticuerpos neutralizantes contra VEGF o b-FGF causan un marcado decremento en su crecimiento por medio de la inhibición angiogénica (Gross, *et al.* 1993; Kim, *et al.* 1993). Además, reguladores negativos de la angiogénesis, como angiostatina, endostatina y antagonistas de la integrina $\alpha v \beta 3$, tienen un profundo efecto antitumoral (O'Reilly, *et al.* 1994, 1997; Brooks, *et al.* 1995). Las evidencias experimentales sugieren que la angiogénesis tumoral también requiere de un balance entre factores proangiogénicos como el VEGF y factores antiangiogénicos como la angiostatina.

D. Activación endotelial

Las células endoteliales juegan un papel importante en el sistema vascular, ya que sirven como una barrera entre el compartimento intravascular y los tejidos debajo de éste. Bajo condiciones normales las células endoteliales no son capaces de adherir plaquetas o leucocitos ni de producir citocinas. Sin embargo, adquieren estas características en respuesta a lipopolisacáridos bacterianos (LPS) o citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β o IL-6), que promueven un cambio en el fenotipo endotelial reversible denominado estado activado. Este cambio fenotípico, se caracteriza por un incremento en la capacidad adhesiva de las células endoteliales a causa de la aparición de nuevas proteínas de superficie, designadas colectivamente como moléculas endoteliales de adhesión a leucocitos (ELAM's). Entre estas moléculas de adhesión destacan la E-selectina y las molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1; Pober, 2002).

La activación endotelial es favorecida durante la inflamación que se define como el reclutamiento local y activación de leucocitos y es un componente esencial de la respuesta inmune innata a patógenos y células dañadas. La respuesta inflamatoria innata tiene sólo una habilidad limitada para distinguir células normales de aquellas que se encuentran dañadas (Pober, 2002). La inflamación es favorecida por el factor de necrosis tumoral (TNF α), es una citocina pro-inflamatoria derivada principalmente de fagocitos mononucleares, tiene como uno de sus principales blancos a las células del endotelio vascular (EC; Pober y Cotran, 1990). Los efectos sobre las células endoteliales incluyen cambios en la forma de las células y un incremento en su movilidad, que puede contribuir a la extravasación en sitios de inflamación así como la vasoregulación mediada por NO, la

adhesión leucocitaria dependiente de ELAMs, la activación leucocitaria inducida por citocinas como IL-6 y la coagulación inducida por la expresión de factores pro coagulantes como el factor Von Willebrand (Madge y Pober, 2001).

El factor de necrosis tumoral (TNF) actúa sobre las células endoteliales a través de su receptor TNFR, del cual existen dos tipos: TNFR1 y TNFR2. La activación endotelial que induce el TNF en las células endoteliales involucra la síntesis de nuevas proteínas, es decir induce la transcripción génica de novo (Pober y Cotran, 1990). Este cambio en el patrón de expresión está mediado por dos factores específicos trans activadores (factores de transcripción), NF- κ B y AP-1, que son esenciales para la inducción por TNF de ELAM's (Collins, *et al.* 1995).

En células sin estimular, proteínas inhibidoras de NF- κ B (I κ Bs) normalmente secuestran los complejos NF- κ B en el citosol, ocultando sus secuencias de destino nuclear, con lo que previenen su entrada al núcleo donde ocurre la transcripción de los genes (Baldwin, 1996). En respuesta a TNF, las proteínas I κ B son fosforiladas por un complejo de cinasas de I κ B (IKK α -IKK β -IKK γ) en residuos específicos de serina presentes en el extremo carboxilo. Una vez fosforilados, los I κ Bs son ubiquitinados y rápidamente degradados por el proteasoma citosólico. Este proceso ocurre dentro a los primeros 15 minutos después de tratar a las células HUVECs con TNF. En HUVECs, el TNF causa la degradación de I κ B- α , β y ϵ (Jonson, *et al.* 1996; Spiecker *et al.* 2000; López Bojórquez *et al.* 2004).

Una vez que se degrada I κ B, el dímero NF- κ B queda libre y puede trasladarse del citosol al núcleo y activar la transcripción al unirse a secuencias específicas de DNA (κ BRE) en los promotores y enhancers de sus genes blanco. En HUVECs, el NF- κ B activado por TNF está formado por homodímeros y heterodímeros que involucran 3 diferentes miembros de la familia Rel llamados p50 (NF- κ B1), p65 (Rel A) y c-Rel. Los homodímeros de p50 parecen estar presentes constitutivamente en el núcleo y no están regulados por la degradación de I κ B (Pober, 2002).

El receptor de TNF que predomina en las células HUVECs es TNFR2 (Bradley, *et al.* 1994; Gaeta, *et al.* 2000). Sin embargo, estas células no expresan moléculas de adhesión por medio del TNFR2 (Slowik, *et al.* 1993), pero la presencia de este incrementa la sensibilidad de la célula a TNF (Slowik, *et al.* 1993).

Está documentado que el TNF, induce la activación de éstas células al cambiar los niveles de algunas proteínas de la membrana plasmática (Pober, 2002). Por ejemplo, los niveles de trombomodulina disminuyen (Grey, *et al.* 1998), mientras aquellos de P-CAM, ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina se incrementan en células endoteliales después de ser tratadas con TNF (Pober, 2002).

La reciente identificación de la ATPsintasa en la membrana de células HUVECs ha llevado a proponer su posible participación en las diferentes respuestas endoteliales, incluyendo la angiogénesis y la activación endotelial asociada a la reacción inflamatoria (Hajjar *et al.* 1986, 1994).

E. Anticuerpos monoclonales

Se ha visto que para el estudio de las subunidades del complejo F1F0 de la ATP sintasa, es necesario utilizar herramientas eficaces y confiables que permitan obtener resultados que sean reproducibles. Una herramienta como tal, son los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos son inmunoglobulinas (Ig) altamente específicas que reconocen, neutralizan y por opsonización median la eliminación de antígenos extraños. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgE, IgA e IgD (Kim, *et al.* 2005). La IgG la más empleada experimentalmente, está organizada en distintos dominios estructurales y funcionales: Está constituida por dos cadenas pesadas (H, 50KDa) y dos cadenas ligeras (L, 25KDa). Las dos cadenas ligeras están constituidas por un dominio variable

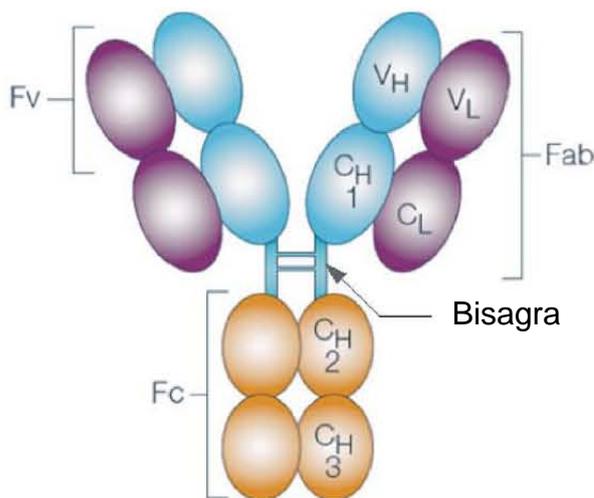


Fig. 4. Diagrama esquemático de la estructura de las inmunoglobulinas.

(VL) y un dominio constante (CL); las dos cadenas pesadas están conformadas por un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3; Kim, *et al.* 2005).

Por medio de la papaína, un anticuerpo puede ser dividido en dos fragmentos, uno de

unión a antígenos (Fabs, del inglés fragment antigen binding) y una región constante (Fc, del inglés fragment crystallizable) que puede unirse a los receptores Fc en una variedad de células hematopoyéticas (Fig. 4). Estos dos fragmentos están unidos por una región flexible llamada de “bisagra” (Fig. 4; Kim, *et al.* 2005). Los dominios de las cadenas variables pesadas (VH) y ligeras (VL), unen antígenos en la región amino terminal de los

Fabs. Cada dominio presenta un plegamiento característico en las inmunoglobulinas que consiste en dos hojas β antiparalelas con un puente disulfuro intramolecular (Kim, *et al.* 2005). Dentro de cada dominio V hay tres regiones que son hipervariables en su secuencia formando “loops” (bucles) al final de las hojas β . Los bucles hipervariables son los responsables primarios del reconocimiento de antígenos y son referidos como regiones determinantes complementarias (CDRs).

Los aminoácidos del dominio V actúan como andamio para soportar los bucles y son referidos como residuos estructurales (FR; Kim, *et al.* 2005).

La porción Fc del anticuerpo media funciones de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En ADCC, los anticuerpos se unen a receptores Fc (Fc γ Rs) sobre la superficie de células efectoras como las células asesinas naturales (NK) y macrófagos, y desencadenan la fagocitosis o lisis de las células blanco (Kim, *et al.* 2005). En la CDC, los anticuerpos matan las células blanco al disparar la cascada del complemento en la superficie celular. La región Fc también está asociada con la vida media del anticuerpo en suero. Esto es debido a que el receptor FcRn en células endoteliales se une a la interfase entre los dominios CH2 y CH3 protegiendo a IgG de la degradación (Kim, *et al.* 2005).

En la respuesta inmune humoral provocada por un inmunógeno, diferentes partes o regiones de esta molécula extraña como pueden ser los motivos y dominios, pueden evocar la producción de anticuerpos, por lo que se les denomina determinantes antígenicos o epítopes que usualmente comprenden de seis a ocho aminoácidos, aunque también pueden ser lípidos y carbohidratos (Nelson, *et al.* 2000). La mayoría de los anticuerpos reconocen e interactúan con una forma tridimensional compuesta de

residuos discontinuos traídos en yuxtaposición por el doblamiento de la molécula. Alternativamente, los anticuerpos pueden reconocer también segmentos lineales de aminoácidos o epítopes continuos o incluso pequeñas moléculas denominados haptenos (Nelson, *et al.* 2000).

Un inmunógeno puede inducir la producción de anticuerpos de numerosas clonas de células B, esto genera anticuerpos policlonales donde cada anticuerpo reconoce a un epítope específico (Nelson, *et al.* 2000). Esto puede ser importante en algunos ensayos donde la detección de una molécula depende de un solo epítope. La producción de estos anticuerpos policlonales es relativamente simple, barata y se pueden obtener en un tiempo corto. Además, el uso de animales grandes como caballos, cabras y conejos, permite la recuperación de grandes volúmenes de suero rico en estos anticuerpos (Nelson, *et al.* 2000). Sin embargo, los anticuerpos en solución se deterioran perdiendo su capacidad de reconocimiento, por lo que en algún momento será necesario generar un lote fresco. Es importante notar que puede haber diferentes rangos de variación en el repertorio de epítopes que pueden ser reconocidos entre lote y lote. Esto conlleva a diferencias en la respuesta y título del anticuerpo, por lo que los anticuerpos policlonales en general sufren de falta de reproducibilidad (Nelson, *et al.* 2000).

Por otra, parte la propagación de una clona aislada de células B puede producir anticuerpos de especificidad única. A un anticuerpo de especificidad única derivada de una clona de células B se le denomina anticuerpo monoclonal (Nelson, *et al.* 2000). Sin embargo, se requieren células B inmortales que permitan un cultivo continuo de células, ya que las células B silvestres en medio de cultivo celular mueren a los pocos días de ser extraídas del bazo de ratón (Nelson, *et al.* 2000). Consecuentemente,

se han investigado métodos para conferir inmortalidad a las clonas de células B productoras de un anticuerpo de interés. La inmortalidad se ha obtenido por transformación por vía viral (por ejemplo usando el virus Epstein-Barr virus) y o fusión a células cancerosas para generar híbridos o hibridomas, como las células del mieloma AG8 (Nelson, *et al.* 2000). El cultivo continuo de hibridomas de células B ofrece una fuente reproducible y un suministro potencialmente inagotable de anticuerpo con alta especificidad.

Los anticuerpos monoclonales han permitido el desarrollo de sistemas para inmunoensayos estandarizados y seguros. Sobre todo los anticuerpos monoclonales sirven como una herramienta confiable para la investigación de macromoléculas y células, teniendo probada su efectividad en términos de especificidad para pruebas de diagnóstico clínico.

II. ANTECEDENTES

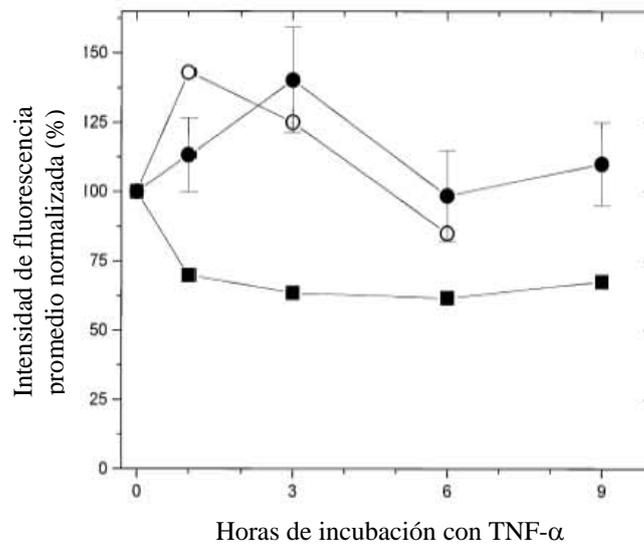


Fig. 5. Efecto de TNF sobre la unión de anticuerpos anti-IP y anti- β a células HUVECs vivas. Las células se incubaron con 10 ng/ml de TNF recombinante (Invitrogen). En los tiempos indicados en el gráfico, las células en un ensayo de citometría, fueron expuestas a anticuerpos policlonales anti-IP (círculos cerrados), anticuerpos monoclonales (círculos abiertos) y anticuerpos policlonales contra la subunidad β (cuadros cerrados).

La ATPsintasa en la superficie de HUVEC's es catalíticamente competente en la síntesis de ATP (Hoyle y Bunnstock, 1991; Ravelic y Bunnstock, 1998). Está reportado que la angiostatina al unirse al dominio F_1 de la ATPsintasa inhibe la actividad catalítica de la enzima, así como la proliferación celular (Cao, *et al.* 1996), bloquea la migración (ji, *et al.* 1998) e induce la apoptosis de células endoteliales (Claesson-Welsh, *et al.* 1998). Está reportado que el TNF induce la expresión de algunas proteínas de membrana como ICAM-1, VCAM-1 y la selectina-E promoviendo la activación de células endoteliales (Poerber, 2002). Por tanto, se evaluó el efecto de esta citocina sobre la expresión de proteínas de membrana de células HUVECs asociadas a la ATPsintasa como la proteína inhibidora de la ATP sintasa (IP) y la subunidad β del dominio F_1 de la enzima (Fig. 5). Interesantemente, mientras que la expresión de la subunidad β decreció un 40% en células tratadas con TNF, la IP se incrementó transitoriamente. La

disminución en la subunidad β persistió por nueve horas y el incremento en la IP regresó a sus niveles basales después de 3 h (Fig.5; Cortés, *et al.* 2005).

A. Planteamiento del Problema

Las células endoteliales juegan un papel muy importante durante la reacción inflamatoria, pasando de un estado de reposo a uno activado al ser estimuladas por citocinas pro-inflamatorias como el TNF o la IL-1 β . Durante la activación endotelial se induce la expresión de una gran variedad de proteínas asociadas a la respuesta inflamatoria, entre las que destacan moléculas de adhesión intercelular y proteínas asociadas a la coagulación. El descubrimiento de la angiostatina incrementa nuestro entendimiento sobre la regulación de la angiogénesis fisiológica y patológica, también ofrece la oportunidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer (Cao, 1998). Además cabe destacar que la subunidad β de la ATPsintasa mitocondrial está presente en la superficie de varias líneas celulares derivadas de tumores humanos como las células del linfoma de Burkitt o células de cáncer de pulmón (Moser, *et al.* 1999).

Por todo lo anterior, proponemos analizar los niveles de expresión de las subunidades del complejo de la ATP sintasa y su funcionalidad en la célula endotelial activada en respuesta a TNF en presencia de angiostatina, ya que se desconocen los efectos de ésta sobre el fenotipo endotelial activado.

III. HIPÓTESIS

Ya que la activación del endotelio por TNF modula negativamente la expresión de la subunidad β del complejo F_1 de la ATP sintasa que actúa como receptor de la angiostatina, esperamos un efecto similar sobre las demás subunidades del complejo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios de expresión del complejo F_1 de la ATP sintasa en la superficie de las células endoteliales de cordón umbilical humanas al ser tratadas con TNF- α .

A. Objetivo Particular

❖ Generar anticuerpos monoclonales contra la subunidad β y las demás subunidades del complejo F_1 de la ATP sintasa, como herramientas para su identificación en la membrana endotelial.

a. Posibles aplicaciones de los anticuerpos a generar

❖ Analizar la presencia de las subunidades del complejo F_1 de la ATP sintasa antes y después del tratamiento con TNF- α para determinar su respuesta y los niveles de expresión de éstas a lo largo del tiempo.

❖ Evaluar el efecto de inhibidores de la transcripción y traducción sobre la expresión de la subunidad beta de la F_1F_0 ATP sintasa en respuesta al TNF.

- ❖ Analizar la cantidad y función de la F_1F_0 ATP sintasa como receptor de angiotatina en células HUVECs en respuesta al estímulo con TNF.

V. METODOLOGÍA

A. Cultivo de células endoteliales

La obtención de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVECs), se basó en la metodología empleada por Jaffe descrita en 1973. Los cordones umbilicales utilizados fueron obtenidos del Hospital de Gineco-Obstetricia “Dr. Luís Castelazo Ayala” del IMSS bajo un protocolo de investigación previamente aprobado por el comité de ética e investigación de ese centro de salud. Los cordones colectados se mantuvieron y transportaron en PBS estéril. Los cordones fueron procesados realizando una digestión enzimática en la vena umbilical durante 15 min a 37°C con colagenasa tipo IV al 0.02% disuelta en una solución salina isotónica HEPES 1%. La solución resultante se colectó y centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. El botón obtenido se resuspendió en medio de cultivo M-199 suplementado con 10% de SFB y antibiótico con antimicótico (GIBCO™). Las células resuspendidas fueron sembradas en cajas petri nuevas y estériles de 100 x 20 mm (NUNC). Después de un día de incubación a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%, las células adheridas se lavaron de 2 a 3 veces con PBS suplementado con 3 mM de CaCl₂ y 5 mM de MgCl₂ (PBS-Ca²⁺Mg²⁺) para eliminar los eritrocitos y se cambia el medio nuevamente. Los lavados seguidos de cambio de medio completo se repitieron hasta llegar a un cultivo semiconfluyente (>80%).

B. Inmunoensayo tipo “western blot”.

Se utilizó extracto mitocondrial de corazón de bovino obtenido con el procedimiento empleado en el artículo Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou, 1977, a una concentración de 5.6 µg/µl, cuantificado mediante el

reactivo de Bradford. A los extractos de proteína total se les adicionó amortiguador laemmli de cargado, después las muestras fueron calentadas durante 5 min.

Los extractos se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de entre 10% y 12% (SDS-PAGE) con un gel concentrador al 4%, y se corrieron a 80 V hasta que se observó la salida del frente (aproximadamente 2 h). Las proteínas de los geles se transfirieron empleando un amortiguador de transferencia (ver tabla apéndice I), a una membrana de PVDF (Membrana de transferencia Immobilon, tamaño de poro 0.45 μm , Millipore) toda la noche.

Posteriormente, se retiró la membrana de la cámara de transferencia y se bloqueó con leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé) preparada al 10% en PBS/Tween 0.1% entre 1-2 h. Se emplearon como anticuerpos primarios antisueros de ratón y sobrenadantes de las clonas generadas que se mencionarán más adelante a diferentes diluciones en PBS/Tween 0.1% con albúmina al 1.5 - 3%.

Posteriormente, se lavaron las membranas con PBS-Tween 0.1%, dos lavados de 10 min y tres de 5 min. Después se trataron durante 50 min con anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-ratón a una dilución 1:10,000 en TBS/Tween con albúmina al 1%. Este es un anticuerpo de cabra que reconoce a IgG de ratón o conejo según el caso, acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). La quimioluminiscencia se obtuvo al incubar las membranas con solución reveladora (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate de PIERCE). Las bandas se visualizaron con películas de radiografía (Kodak MXB).

C. Citometría de flujo

Para el ensayo de citometría, células HUVECs se cultivaron en medio de cultivo M-199 a una confluencia entre 80 y 90% en placas de cultivo Corning Inc. COSTAR de 24 pozos. Se estudiaron células sin y con estímulo, las células estimuladas se preincubaron durante 3 h con 10 ng/ml de TNF- α ; al término de este tiempo se aspiró el medio y se lavaron dos veces con PBS- Ca²⁺ Mg²⁺ a 0.1 g/L para eliminar medio de cultivo. Después se les incubó por 30 min a 4°C en agitación, con 500 μ l/pozo de antisueros generados en conejo contra la subunidad beta y la proteína inhibidora del complejo F₁F₀ de la ATP sintasa, diluidos en PBS- Ca²⁺ Mg²⁺ con 2.5% de BSA (Sigma/Aldrich, libre de ácidos grasos) a una dilución 1:100. Después las células se lavaron nuevamente.

Al término de los lavados, las células se incubaron durante 30 min en la oscuridad a 4°C con una solución de PBS- Ca²⁺ + Mg²⁺ con 2.5% de BSA y anticuerpo secundario acoplado de isotiocianato de fluoresceína (anti-IgG de ratón-FITC Invitrogen®) a una dilución 1:100 para los sobrenadantes de los hibridomas o una solución de anticuerpo secundario acoplado a ficoeritrina (anti-IgG de conejo-PE Invitrogen®) a una dilución de 1:100 para los antisueros. En un volumen total de 500 μ l/pozo. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

Después de los 30 min se aspiró nuevamente la solución y se realizaron 2 lavados. Después las células se incubaron en PBS EDTA 5mM durante 15-20 min o hasta que las células se despegaron de la placa por completo verificándose por el microscopio. Las células se recolectaron en tubos FALCON de poliestireno de 12 x 75 mm para citometría. Las muestras se leyeron en un citómetro FACSCalibur (BECTON DICKINSON Co).

D. Inmunoensayo tipo ELISA.

Se sensibilizó la placa de poliestireno de 96 pozos con un volumen de 100 μl /pozo de una solución ya sea con F_1F_0 ATP sintasa purificada o con subunidad β de *T. thermophilus*, diluida en una solución amortiguadora de carbonatos a pH 9.6 a una concentración de 1.6 y 5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C.

Después, se eliminó la solución vertiendo el contenido de los pozos y se secó el exceso. La placa se lavó 3 veces con 200 μl /pozo con la solución salina de fosfatos y Tween₂₀ (amortiguador de lavado), cada lavado duró 5 min. Una vez lavada la placa se agregaron 200 μl /pozo de solución de bloqueo (leche al 5% en PBS-Tween₂₀), durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Al término del tiempo, se volvió a lavar la placa bajo las condiciones antes ya mencionadas. Después, se hicieron las diluciones respectivas para antiseros de ratón y sobrenadantes de las clonas obtenidas. A cada pozo se le agregó un volumen de 100 μl de una solución de antisuero o sobrenadante se diluido 1:1000 en PBS-Tween₂₀ y se incubó durante 2 h a TA.

Al finalizar el tiempo de incubación la placa se lavó y se colocaron 100 μl por pozo del conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa a una dilución 1:2000 en PBS-tween₂₀. La placa se incubó por 2 h a TA. La placa se lavó nuevamente y se dejó incubando con 100 μl /pozo de solución de cromógeno/sustrato (orto-fenilendiamina, ácido cítrico 0.1M y citrato de sodio 0.1M, H₂O₂ al 30%) en oscuridad durante 30 min. Después de este tiempo la reacción se detuvo añadiendo 100 μl por pozo de ácido sulfúrico 2N. La absorbancia de la placa se leyó en el lector de ELISA a 490 nm.

E. Generación de anticuerpos monoclonales.

Se tomaron 3 ratones de la cepa BALB/c a los cuales se les inyectó por vía peritoneal con una solución de coadyuvante de Freund y 30 μg del complejo F_1F_0 ATPsintasa purificado por ratón por semana en tres ocasiones.

Después de una semana de la última inmunización se realizó un ELISA usando F_1F_0 ATPsintasa purificada como antígeno, para determinar cuál de los ratones utilizados tuvo el título más alto en respuesta al complejo purificado. Al ratón con mejor respuesta se le suministró un refuerzo o “booster” de amplificación de 15 μg del complejo F_1F_0 ATPsintasa por vía intra-caudal. Después de una semana del refuerzo se sacrificó el ratón, se le extrajo el bazo y por perfusión se extrajeron sus esplenocitos. Con polietilenglicol se indujo la fusión de los esplenocitos con la línea celular AG-8 de mieloma de ratón en una proporción de 10:1, respectivamente.

Las células AG-8 tienen una deficiencia en el gen que codifica para la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT), al fusionarse con los esplenocitos se reestablece la síntesis de la HGPRT lo que permite la selección de los hibridomas (Correa, *et al.* 2000).

Los hibridomas estables son expandidos en un medio selectivo denominado HAT por sus componentes (hipoxantina, aminopterina y timidina) y sólo aquellas células fusionadas que recobran la síntesis de la HGPRT pueden sobrevivir en este medio (Correa, *et al.* 2000). Los linfocitos no funcionados no son capaces de reproducirse en cultivo debido a la ausencia de los factores celulares solubles e insolubles que se requieren para proliferar (Correa, *et al.* 2000). Después, durante el proceso de clonación y expansión, se trató de mantener en cada pozo una proporción aproximada de 1 célula/pozo. Los hibridomas con respuesta positiva al antígeno fueron seleccionados por inmunoensayos tipo western y ELISA.

VI. RESULTADOS

A. Caracterización de sueros policlonales de conejo contra subunidades purificadas del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa de extracto mitocondrial de corazón de bovino

La detección de varias subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa sobre la superficie tanto de células tumorales como endoteliales se ha basado en el empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra las diferentes subunidades del complejo. El uso de estas herramientas ha permitido la identificación de las subunidades α , β , γ e IP (Moser, *et al.* 1999; Arakaki *et al.* 2003). Dado que el único anticuerpo monoclonal disponible comercialmente está dirigido contra la subunidad α (Moser, *et al.* 1999), iniciamos por probar la utilidad de antisueros de conejo contra diferentes subunidades del complejo F_1F_0 proporcionados por la Dra. Marietta Tuena (IFC. UNAM) y generados en su laboratorio. Estos antisueros nos permitirían analizar la presencia de las diferentes subunidades en la superficie de las células endoteliales.

Con el propósito de purificar el complejo F_1F_0 de la ATP sintasa para la generación de anticuerpos contra las subunidades α , β , γ , δ , ϵ , OSCP e IP de F_1 , y las subunidades a y b de F_0 , se tomaron muestras enriquecidas con los dominios F_1 y F_0 de la ATP sintasa obtenidas a partir de extracto mitocondrial de corazón de bovino (Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-Puyou, 1977). Estas muestras se separaron en una electroforesis en gel de acrilamida al 10% (Gel Von Jagow, Schägger y von Jagow, 1991). Después, una vez separadas las bandas de acuerdo a sus pesos moleculares, cada banda fue eluida, y corrida nuevamente tres veces, para tratar de obtener bandas correspondientes a cada subunidad, con un grado de pureza

confiable. Estas bandas se recortaron e inyectaron directamente en los conejos, de tal manera que generaran anticuerpos policlonales contra cada una de las subunidades del complejo F₁. El gel de la banda sirvió como coadyuvante durante la inmunización de los conejos. A partir de estos conejos se obtuvieron los sueros con los que se trabajó en parte de este proyecto.

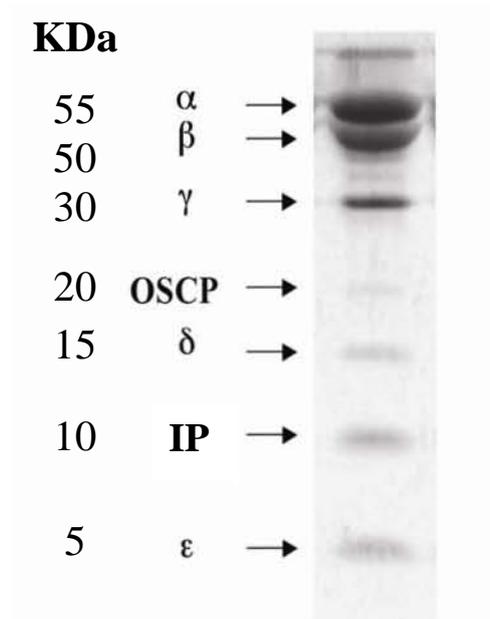


Figura 6. Separación de las subunidades del complejo F₁ de la ATP sintasa a partir de un extracto mitocondrial de corazón de bovino. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 10% según la técnica de Von Jagow. Después del corrimiento electroforético el gel se tiñó con azul de coomassie. La columna de la izquierda se indica la posición de cada una de las subunidades identificadas con letras griegas (α - ϵ) además de la proteína inhibidora (IP) y sus respectivos pesos moleculares (KDa).

a) Patrón de bandeo de los extractos mitocondriales de corazón de bovino

Ya que las proteínas de extractos mitocondriales de corazón de bovino nos servirían para valorar los diferentes antisueros a lo largo de esta tesis, decidimos analizar su patrón de bandeo en geles de acrilamida. Después de determinar la concentración de proteína por el método de Bradford, se realizaron corrimientos electroforéticos con cantidades crecientes de proteínas. Los geles resultantes fueron teñidos con coomassie (Fig. 7A) o

con plata (Fig. 7B). El resultado obtenido mostró un patrón de bandeo bien definido que corresponde a los patrones reportados previamente en la literatura para la proteína, indicando que no se encontraba degradado. Fue necesario realizar esta prueba debido a que en un principio no se obtenía ningún resultado en los inmunoensayos tipo “western blot” empleando los antisueros de conejo. Este resultado ratificó que la preparación mitocondrial se encontraba en buen estado y pudo seguirse empleando a lo largo de este trabajo dentro de un rango de 10 a 20 μg de proteína por carril.

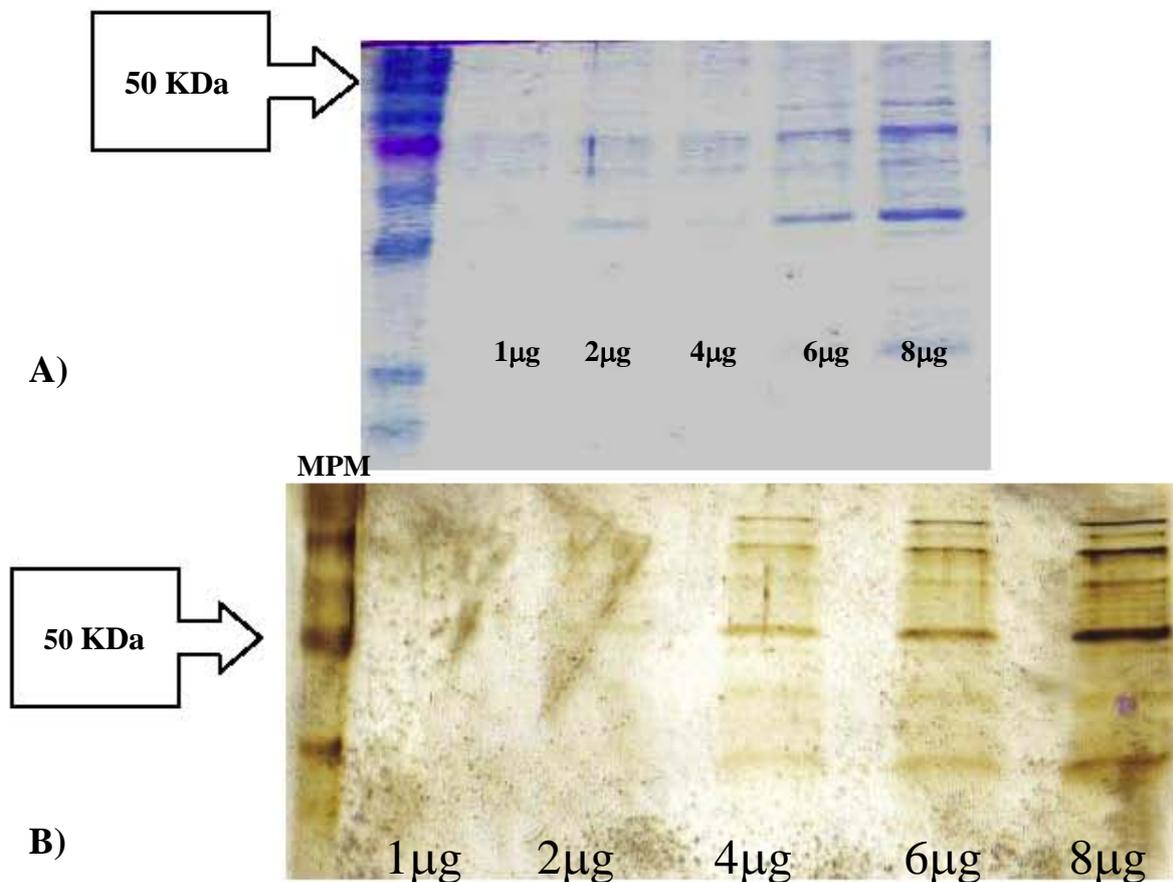


Figura 7. Patrón de bandeo del extracto mitocondrial de corazón de bovino empleados para probar los anticuerpos contra las subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa. Las proteínas se separaron por electroforesis en dos geles de acrilamida al 10% teñidos con azul de coomassie (A) en plata (B) respectivamente. Se utilizó extracto mitocondrial a concentraciones crecientes (1 μg , 2 μg , 4 μg , 6 μg , 8 μg). El primer carril corresponde a los marcadores de peso molecular.

b) Tamizaje de los antisueros de conejo generados contra las subunidades de la F₁F₀

Si bien nuestro propósito original consistía en aplicar los antisueros para identificar a las diferentes subunidades del complejo F₁F₀ en la superficie de células endoteliales, comenzamos por evaluar el patrón de bandeo que generaban estos antisueros en extractos mitocondriales de corazón de bovino. La figura 8 muestra que la mayoría de los antisueros utilizados genera patrones de bandeo complejos, con varias bandas y diferentes entre sí. Los antisueros contra las subunidades α , β , γ , e IP reconocen bandas que podrían corresponder a las subunidades contra las que fueron generadas (recuadros dentro de la figura 8). Algunos antisueros generaron una reacción positiva tenue en la posición esperada, como fue el caso de los antisueros contra las subunidades δ , OSCP y b. Otros antisueros mostraron una alta inespecificidad en el reconocimiento de las subunidades contra las que fueron generados, presentando gran cantidad de bandas inespecíficas sin que pudiera reconocerse las subunidades contra los que fueron generados (IP y ϵ).

c) Tamizaje de los antisueros de conejo generados contra las subunidades de la F₁F₀ en células L929

Tomando en cuenta la inespecificidad en los inmunoensayos contra extracto mitocondrial, se pensó en emplear los antisueros contra un extracto total celular de la línea L929 (fibroblastos de ratón). Esto se realizó con el propósito de evaluar si además del reconocimiento inespecífico contra el extracto mitocondrial los antisueros reconocían proteínas no mitocondriales (Fig. 9).

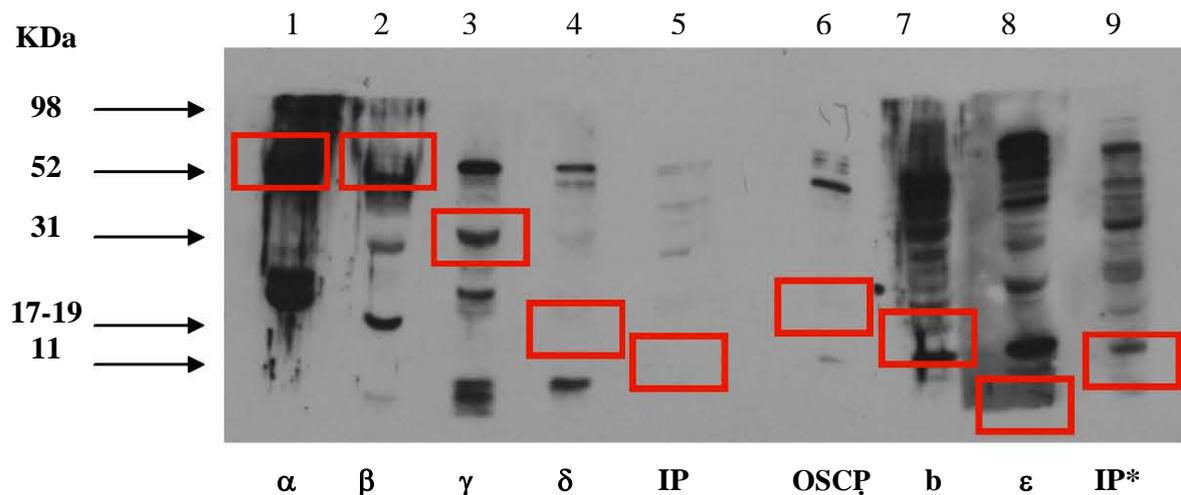


Figura 8. Inmunoensayo tipo “western blot” contra subunidades del complejo F_1F_0 ATP sintasa en extracto mitocondrial de corazón de bovino. Los inmunoensayos tipo “western” se realizaron contra cada una de las subunidades α , β , γ , δ , IP, OSCP, b, ϵ (indicadas en la parte inferior de cada carril). El anticuerpo IP* corresponde al que fue utilizado en la figura 5 (Cortés *et al.* 2005). Se utilizaron las mismas condiciones de separación descritas en la figura 8. Se utilizaron 20 μ g de extracto mitocondrial de corazón de bovino por carril. Los recuadros indican la posición de las subunidades correspondientes a cada suero utilizado.

Los patrones de bandeo obtenidos nos permiten dividir a los antisueros en 2 grupos, uno de mayor y otro de menor especificidad. Los antisueros anti α y β podrían reconocer dichas subunidades ya que presentan bandas en lugares cercanos a los esperados, y presentan un patrón de bandeo similar al obtenido contra el extracto mitocondrial (Fig. 8 carriles 1 y 2). En el caso de los demás antisueros, se reconocen bandas distintas a las obtenidas contra extracto mitocondrial. En estos casos (antisueros γ , δ , IP, OSCP, b y ϵ), aparecen nuevas bandas y otras desaparecen. Con todo esto se confirmó que los antisueros empleados a la misma dilución presentan diferentes grados de especificidad por el antígeno esperado. Entonces se decidió trabajar sólo con los antisueros α , β y γ , ya que, además de generar patrones de bandeo más restringidos, reconocen una banda en la posición esperada (Fig. 8).

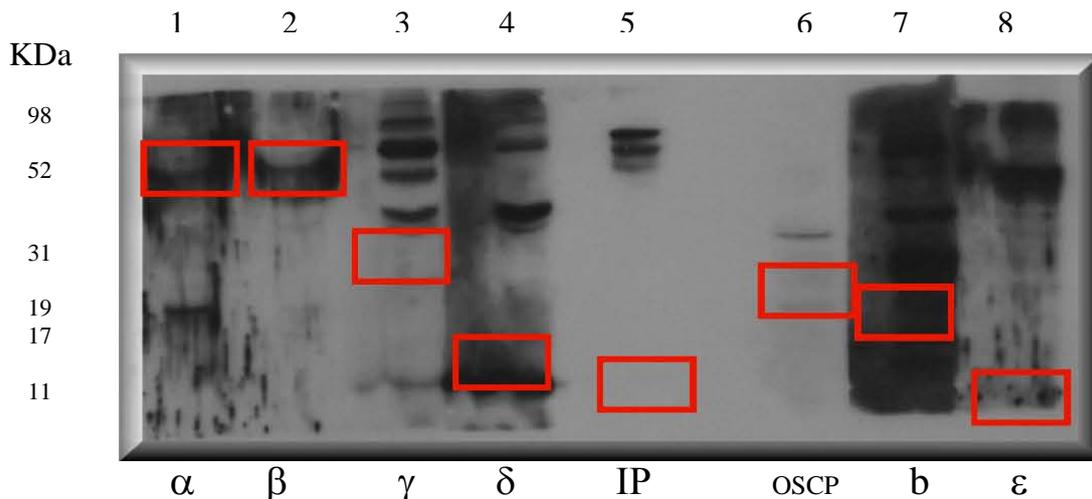


Figura 9. Inmunoensayo tipo “western blot” contra subunidades del complejo F_1F_0 ATP sintasa en células L929. Los inmunoensayos tipo “western blot” se realizaron contra cada una de las subunidades α , β , γ , δ , IP, OSCP, b, ϵ (indicadas en la parte inferior de cada carril). Los sueros se utilizaron a una dilución 1:800 en albúmina al 1.5%. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de acrilamida al 10%. Se utilizaron 40 μg de extracto total de células L929 por carril. La imagen corresponde a una película velada por la señal quimioluminiscente generada por un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. En la columna izquierda se indica la posición de los marcadores de peso molecular (KDa). Los recuadros indican la posible posición de las subunidades correspondientes a cada suero utilizado.

d) Modificación en las condiciones usadas de los antisueros con un posible reconocimiento de la subunidad β

Debido a la alta inespecificidad que mostraron la mayoría de los antisueros generados contra subunidades específicas de la F_1F_0 ATP sintasa, se decidió modificar las diluciones utilizadas de los antisueros contra las subunidades α , β y γ (Fig.8), con el propósito de disminuir la cantidad de anticuerpos contra las bandas inespecíficas y retener la señal de los anticuerpos específicos de alta afinidad, en caso de que aún se encontraran en estas preparaciones. El patrón de bandeo del antisero β , mostró el reconocimiento de tres bandas definidas una de las cuales corresponde a la posición esperada para esta subunidad. Las otras dos bandas de acuerdo a su peso podrían corresponder a otras subunidades del mismo complejo

como la subunidad γ y la subunidad OSCP, respectivamente (Fig. 10A). El antisuero contra la subunidad α reconoce dos bandas, la primera corresponde a la probable posición esperada para dicha subunidad. La posición de la segunda banda no corresponde con las posibles posiciones de ninguna de las subunidades del complejo (Fig. 10 A), por lo que se le siguió considerando como una banda inespecífica. También se empleó el antisuero γ , que reconoció bandas que podrían corresponder a otras subunidades del complejo. El antisuero γ reconoce 6 bandas, una banda concuerda con la posición esperada para la subunidad γ , también de acuerdo a su posición reconocería a la subunidad OSCP y a las subunidades α y β . Por su posición, las demás bandas de se consideraron inespecíficas (Fig. 9A).

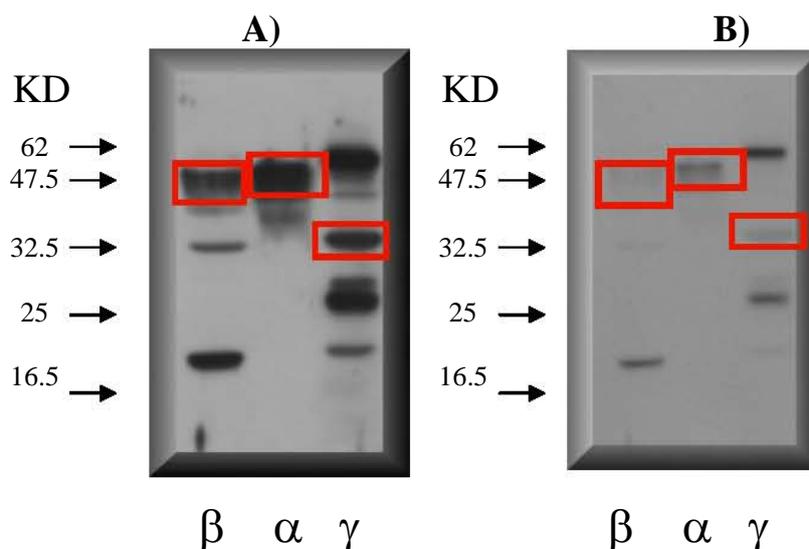


Figura 10. Inmunoensayo tipo “western blot” contra las subunidades α , β y γ del complejo F_1 de la ATP sintasa después de 1 minuto (A) o 30 segundos (B) de exposición. Los sueros se utilizaron a diferentes diluciones: anti- α a 1:1600, anti- β a 1:1600 y anti- γ a 1:1600 en albúmina al 1.5%, con un bloqueo previo de la membrana de PVDF con leche al 5%. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 10%. Se utilizaron 20 μ g de extracto mitocondrial de corazón de bovino por carril. Los recuadros indican la posición de las subunidades correspondientes a cada suero utilizado

Los resultados mostraron que la intensidad de las posibles bandas específicas se mantuvo, mientras que la dilución al doble de los antisueros usados redujo la cantidad y la intensidad de las bandas inespecíficas. Se

emplearon diluciones progresivas hasta la obtención de una relación óptima para la subunidad β , que correspondió a 1:3200 (Fig. 10).

e) Optimización de las condiciones de bloqueo de los inmunoensayos contra las subunidades β y γ .

Habiendo encontrado una dilución óptima para el antisuero β , se buscó la eliminación de las bandas inespecíficas restantes, modificando la cantidad de extracto mitocondrial utilizado, así como el tipo y la concentración de bloqueadores (leche 10% y albúmina 3%). Los antisueros se mantuvieron a la dilución óptima de 1:3200. En la figura 11, los paneles A y B muestran la misma membrana revelada a dos tiempos de exposición. En ambos paneles se muestran dos carriles, uno contra la subunidad β y la otra subunidad γ . Con el antisuero β , se obtuvo una banda que corresponde a la posición esperada para la subunidad β del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa.

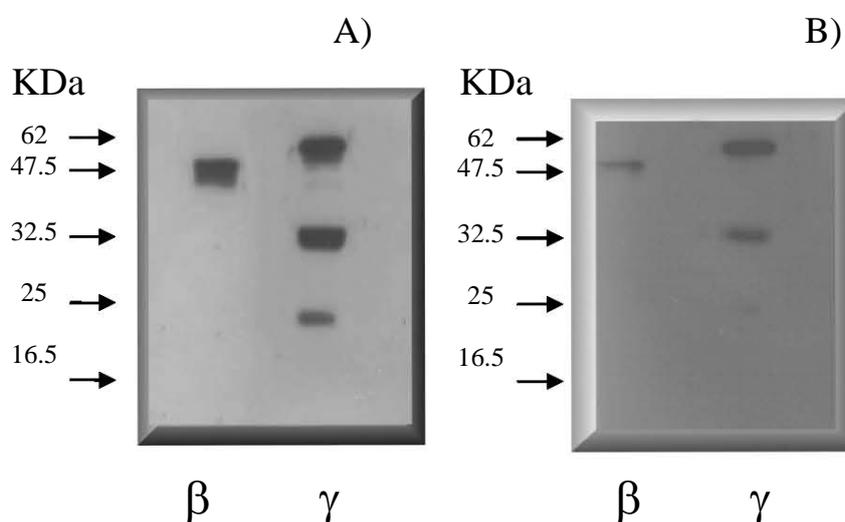


Figura 11. Inmunoensayo tipo “western blot” contra las subunidades β y γ del complejo F_1 de la ATP sintasa a A) 1 minuto, B) 30 segundos, variando las condiciones de bloqueo y diluciones de los anticuerpos. Los sueros se utilizaron a las diluciones: 1:3200 para anti- β y 1:1600 para anti- γ , en albúmina al 3%. La membrana se bloqueó previamente con leche al 10%, el doble de lo empleado en los inmunoensayos tipo “western” anteriores. En cada carril se cargaron 10 μ g de proteína de extracto mitocondrial de corazón de bovino.

Esto indica que al modificar las condiciones antes mencionadas, se lograron eliminar las señales correspondientes a las bandas inespecíficas. Este resultado es importante ya que nos alentó a seguir utilizando dicho antisuero en experimentos posteriores.

En el caso de los antisueros contra γ se identificaron tres bandas de las cuales sólo una corresponde a la posición esperada para dicha subunidad, por lo que se decidió ya no emplear más este antisuero. Este resultado nos dio confianza para seguir empleando el antisuero β .

f) Ensayos de citometría de flujo empleando el antisuero contra la subunidad beta.

Con el propósito de medir la modulación en la superficie de células endoteliales de la subunidad β del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa en respuesta a TNF (Cortés *et al.* 2005), se optó por el uso de citometría de flujo.

Una vez definidas las condiciones óptimas del antisuero β en inmunoensayos tipo “western blot”, se trató de estandarizar las condiciones óptimas del antisuero para citometría. Con tal motivo, se repitieron varias veces las mediciones reportadas en el artículo Cortés *et al.* 2005 que fue nuestro antecedente inmediato para la subunidad β (Fig. 12).

En los ensayos se utilizaron células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs) y células endoteliales de microvasculatura (HMEC-1) (Fig. 12). En HUVECs se obtuvo 63 por ciento más de intensidad de fluorescencia promedio (%IFP) que el control, al ser co-incubadas con suero de conejo preinmunizado. Al ser co-incubadas con antisuero β , se incrementó 5 veces el porcentaje de IFP con respecto al control. Al ser pre-estimuladas durante 3 h con TNF la señal fluorescente generada por el

antisuero β se incrementó 36 por ciento más que el control. Sin embargo, en células HMEC-1 no se obtuvieron datos que indicaran diferencias entre las diferentes condiciones en los ensayos.

Según los resultados obtenidos, las células HUVECs presentaron un comportamiento similar a los resultados presentados en el artículo Cortés *et al.* 2005. Con esto, consideramos haber logrado estandarizar las condiciones en los ensayos de citometría.

Sin embargo, estos ensayos requirieron de cantidades considerables del antisuero β , lo que condujo a utilizar la totalidad de la alícuota con la que contábamos.

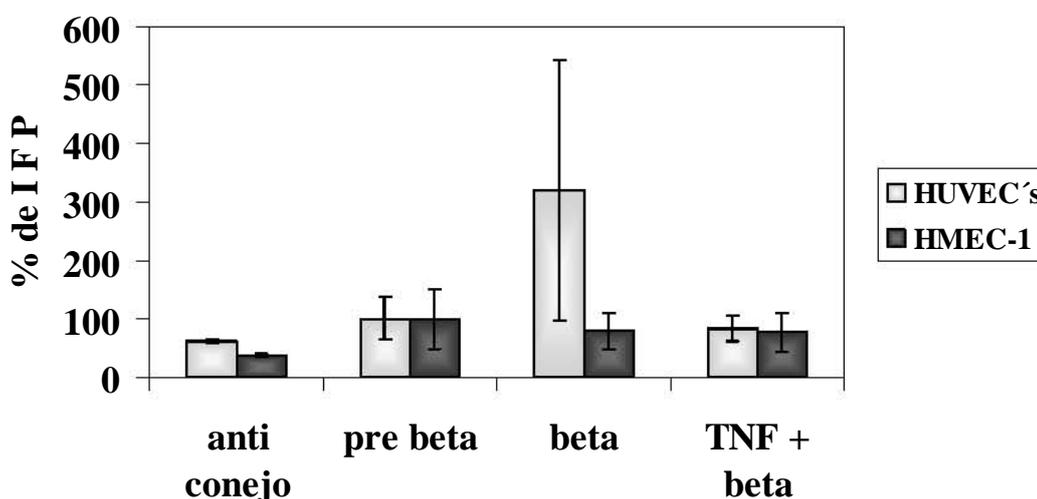


Figura 12. Valoración de la expresión de la subunidad β por citometría de flujo en células HUVEC y HMEC-1. Histograma normalizado de la intensidad de fluorescencia indirecta acoplada a los anticuerpos policlonales contra la subunidad β en células HUVECs o de la línea celular HMEC-1. “anti conejo”: células incubadas solo con anticuerpo secundario; “pre-beta”: células preincubadas con suero de conejo pre-inmunizado; “beta”: células incubadas con anticuerpos policlonales contra la subunidad beta; “TNF + beta”: células pre estimuladas con TNF (10 ng/ml) por 3 h e incubadas con anticuerpos policlonales contra la subunidad beta. Los datos representan el porcentaje de intensidad de fluorescencia promedio (% de IFP) de dos experimentos independientes n=2. La dilución del antisuero beta fue 1:100.

El conejo al que se le había inmunizado con la subunidad β murió durante el proceso de optimización del inmunoensayo. Por lo que no se lograron obtener mas muestras frescas del antisuero. Por lo tanto, se recurrió al uso

de alícuotas almacenadas del antisuero, obtenidas anteriormente. Sin embargo, con estas alícuotas no se obtuvo una buena señal y no se pudieron reproducir los resultados que se habían obtenido hasta ese momento.

B. Generación de anticuerpos monoclonales

Por los motivos antes mencionados, nos quedamos sin antisueros útiles por lo que decidimos generar nuevos anticuerpos capaces de reconocer específicamente las diferentes subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa. Dada la inexistencia de anticuerpos comerciales contra las subunidades del complejo, se vio la posibilidad de generar nuestros propios anticuerpos monoclonales, lo que facilitaría no solo la obtención de cantidades ilimitadas de anticuerpos, sino también la posibilidad de identificar en la superficie de las células endoteliales la probable presencia de las demás subunidades del complejo no identificadas hasta el momento.

a) Selección del ratón inmunizado contra el complejo F_1F_0 por afinidad.

Con el propósito de obtener anticuerpos monoclonales contra cada una de las subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa, se inmunizaron 3 ratones con el complejo purificado. Los animales fueron inmunizados con una preparación de F_1F_0 de la ATP sintasa semejante a la obtenida del extracto mitocondrial. Después de un mes de la inmunización se obtuvo suero de cada uno de los animales y por la técnica de ELISA se determinó su densidad óptica (D.O.), para saber cuál ratón presentaba el título más alto en respuesta al complejo F_1F_0 (Fig.13 y 14). El suero del ratón denominado número 1 mostró la D.O. más baja en todas sus diluciones en relación a los ratones 2 y 3 (Fig.14). El suero del ratón número 2 mostró la

D.O. más alta en relación a los ratones 1 y 3. Al aumentar la dilución de éste suero la D.O. disminuyó con una pendiente muy pronunciada (Fig. 14). El suero del ratón número 3 mostró una D.O. similar a la del ratón 2. Al incrementar la dilución de éste antisuero la D.O. disminuyó con una pendiente menos pronunciada que el suero del ratón 2 (Fig. 14). Con base en los valores de D.O. de los tres ratones se determinó un valor medio del rango de lectura (vmrl), como referencia para determinar los valores a considerarse como un título adecuado. El suero del ratón número 1 tuvo una D.O. inferior al vmrl por lo que fue descartado, ya que consideramos que la respuesta inmune de éste ratón generó anticuerpos con poca afinidad por el complejo F_1F_0 de la ATP sintasa. Los ratones 2 y 3 mostraron una D.O. mayor al vmrl, interpretamos que este resultado indica la presencia de anticuerpos con una mayor afinidad por el complejo F_1F_0 de la ATP sintasa, por esto se decidió extraer los bazos de estos ratones.

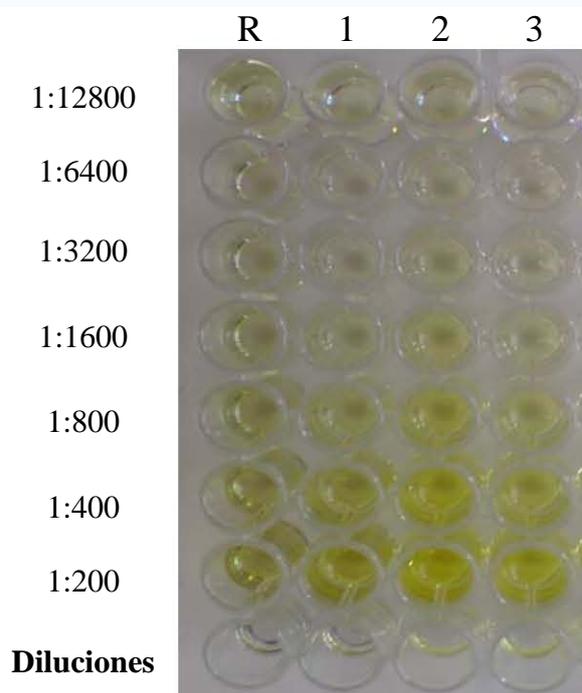


Figura 13. Imagen representativa de la valoración por ELISA de los títulos de anticuerpos contra F_1F_0 en los sueros de tres ratones inmunizados con el complejo F_1F_0 ATPsintasa. En todos los pozos se depositaron $0.16 \mu\text{g}$ de proteína ($1.6 \mu\text{g/ml}$). La columna de la izquierda indica las diluciones de cada suero. Los números corresponden a cada ratón inmunizado (3 ratones) con diluciones progresivas. Usándose como control negativo RPMI con SFB 15% (R).

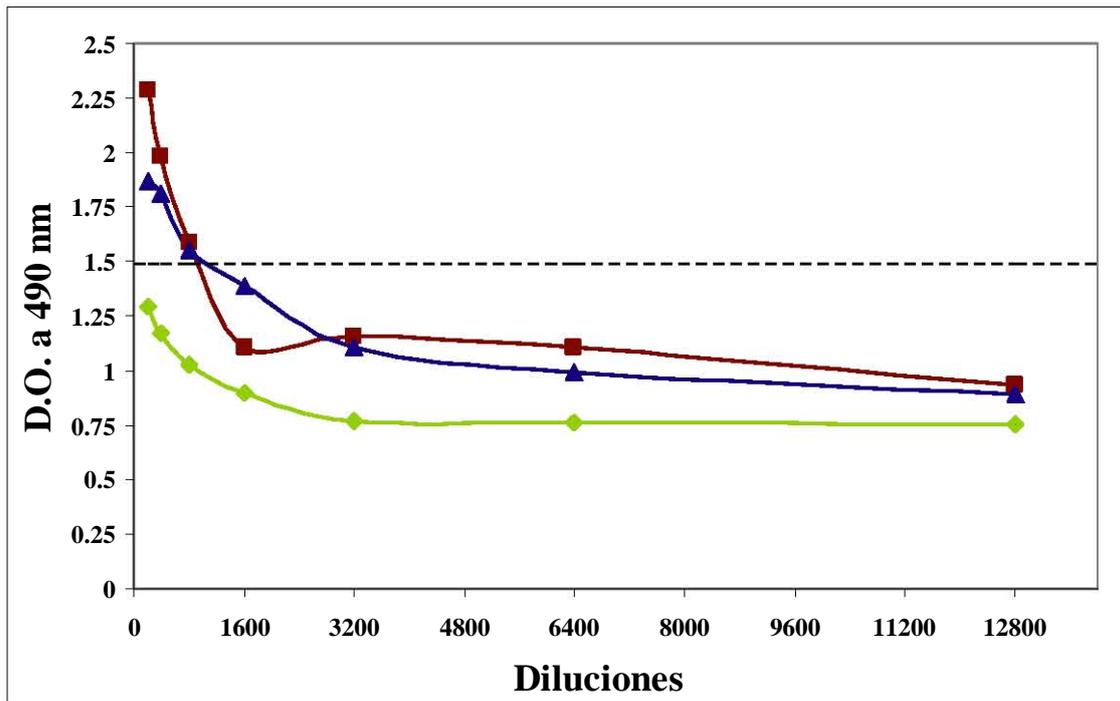


Figura 14. Valoración por ELISA del título de los sueros de 3 ratones en respuesta al antígeno F_1F_0 de la ATPsintasa. Valores de densidad óptica determinados por ELISA para el ratón denominado número 1 (rombos), el ratón número 2 (cuadros) y el ratón 3 (triángulos), la línea discontinua cercana a la D.O. de 1.5 corresponde al valor medio del rango de lectura (vmrl).

b) Fusión y selección de hibridomas

Con base al título más alto obtenido, se realizó la fusión de esplenocitos del ratón inmunizado número 2 con células de mieloma de ratón AG8 para la obtención de los anticuerpos monoclonales. Sin embargo, debido a complicaciones técnicas (el incubador se quedó sin CO_2), se perdieron los hibridomas y no se obtuvieron clonas.

Por lo anterior, se realizó una segunda fusión utilizando células del ratón 3 (Fig. 14). Los hibridomas positivos obtenidos con el medio de selección HAT fueron expandidos, en la fig. 15 se muestra el crecimiento de colonias. Para identificar las clonas que reconocieran a la subunidad beta, se utilizó la subunidad beta de *T. termophilus* (50KDa) purificada, proporcionada por el laboratorio de la Dra. Marietta Tuena. El alineamiento de las secuencias de la subunidad β del complejo F_1 de la ATP sintasa de

mitocondria de bovino (*Bos Taurus*) con la de la ATP sintasa tipo V, de *Thermus thermophilus*, presenta un valor E de 2×10^{-26} según el alineamiento realizado en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool lcl|28052 (322 letters)). Este valor indica una alta similitud entre las secuencias a nivel proteico para dicha subunidad, sugiriendo un buen grado de reacción cruzada entre ambas subunidades.

También, se realizó un corrimiento electroforético teñido en plata con concentraciones crecientes de la subunidad beta purificada, para determinar la posición aproximada de su banda (Fig. 16).

Las clonas obtenidas por la expansión celular se seleccionaron a su vez por la técnica de ELISA empleando a la subunidad beta de *T. termophilus* purificada como antígeno positivo (Fig. 16). Las clonas que dieron una señal positiva al antígeno por ELISA (Fig. 17), a su vez se probaron por inmunoensayo tipo western blot contra extracto mitocondrial de corazón de bovino como segundo control positivo.

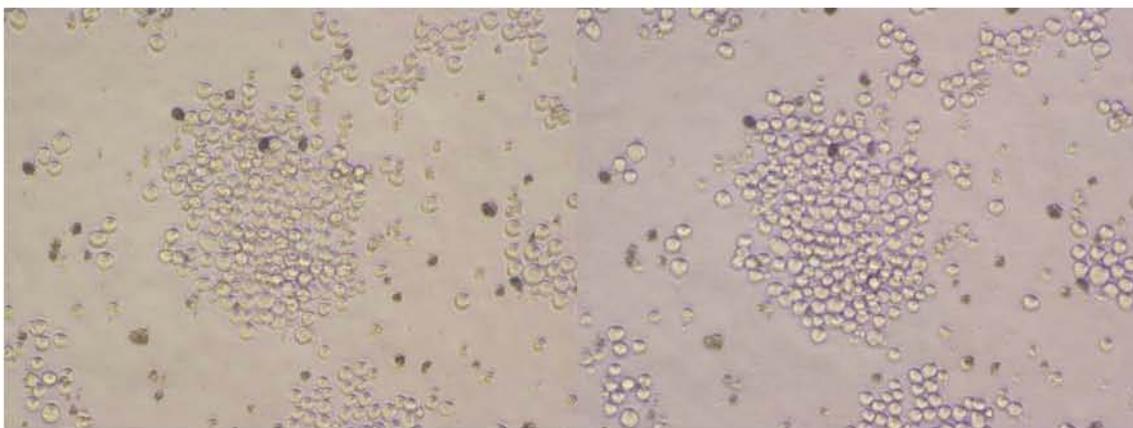


Figura 15. Hibridomas obtenidos 48 h después de la fusión entre células AG8 y esplenocitos del ratón No 3. Micrografía con el microscopio óptico de contraste de fases a 100x.

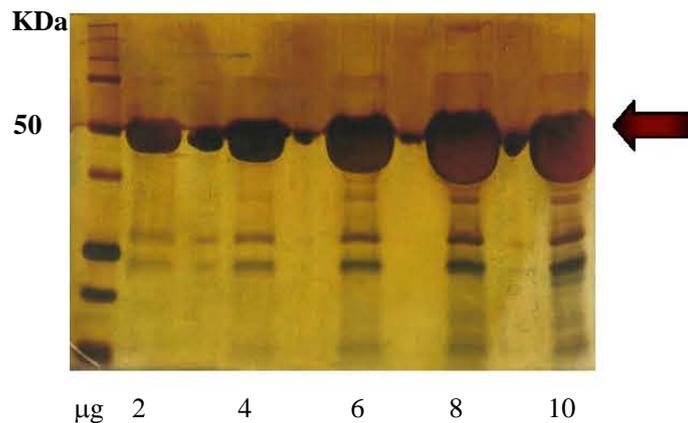


Figura 16. Patrón de bandeado de la subunidad beta de *T. thermophilus* purificada empleada para tamizar los sobrenadantes contra la subunidad beta del complejo F₁ de la ATP sintasa de bovino. Las proteínas se separaron por medio de una electroforesis en un gel de acrilamida al 12% teñido en plata. Se adicionaron concentraciones crecientes (2µg, 4µg, 6µg, 8µg, 10µg) de la proteína beta de *T. thermophilus* purificada. El primer carril corresponde a los marcadores de peso molecular. La flecha indica la posición de la subunidad beta. El número de la izquierda señala el peso molecular en KDa de los marcadores.



Figura 17. Tamizaje por ELISA de los sobrenadantes de hibridomas empleando como antígeno positivo a la subunidad beta de la bacteria termofílica *Thermus thermophilus* (5 µg/ml de antígeno). Los pozos oscuros indican una respuesta positiva. Dilución de los sobrenadantes 1:1000.

De las distintas clonas obtenidas, se distinguieron por ELISA aquellas con mejor reconocimiento del antígeno. De ahí se seleccionaron las subclonas 2D6/A1, 2D6/A2, 2D6/H12, 2C6/F2 (Fig.18). El sobrenadante de la clona 2D6/A1 presentó una banda tenue en el lugar esperado para la subunidad

α del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa . En la posición esperada para la subunidad β , se presentó una doble banda. La intensidad con la cual este sobrenadante reconoció al antígeno, fue tenue y poco definida con respecto a los demás sobrenadantes. El sobrenadante de la clona 2D6/A2 reconoció una banda tenue pero bien definida en la posición esperada para la subunidad β (Fig. 18). Con el sobrenadante de la clona 2D6/H12 se obtuvo una banda inespecífica. El sobrenadante 2C6/F2 presentó un patrón de bandeado similar al obtenido por el sobrenadante 2D6/A2, pero con una señal menos intensa.

La mayoría de las clonas con una señal positiva por ELISA, dieron también una señal positiva por inmunoensayo. Sin embargo, como se puede observar en la figura 18, aún se obtenían bandas inespecíficas, por lo tanto se prosiguió con el proceso de expansión y selección de clonas.

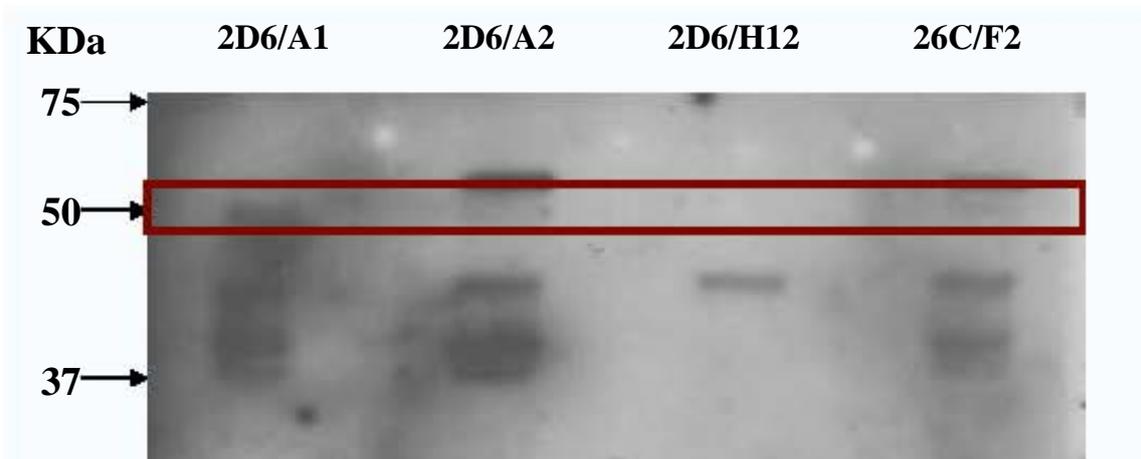


Figura 18. Inmunoensayo tipo “western blot” contra extracto mitocondrial empleando sobrenadantes de las colonias los pozos de hibridomas positivos 2D6/A1, 2D6/A2, 2D6/H12, 2C6/F2 como los que se ilustran en la figura 15. Los sobrenadantes se utilizaron a una dilución 1:1000. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína de extracto mitocondrial de corazón de bovino. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 12%. La columna izquierda corresponde a los marcadores de peso molecular en KDa.

Uno de los objetivos que se tenían con los anticuerpos monoclonales era su empleo en ensayos de citometría. Por lo que se determinó si los anticuerpos también podrían ser utilizados en ensayos de citometría.

Células HUVECs incubadas con antisueros diferentes a los empleados en la fig. 12, presentaron un porcentaje de IFP por debajo del control panel A (fig. 19), indicando poco reconocimiento por parte de los antisueros. El suero de ratón inmunizado contra el complejo F_1F_0 de la ATP sintasa dio un porcentaje de intensidad de fluorescencia promedio casi 3 veces superior al control panel B (fig. 19).

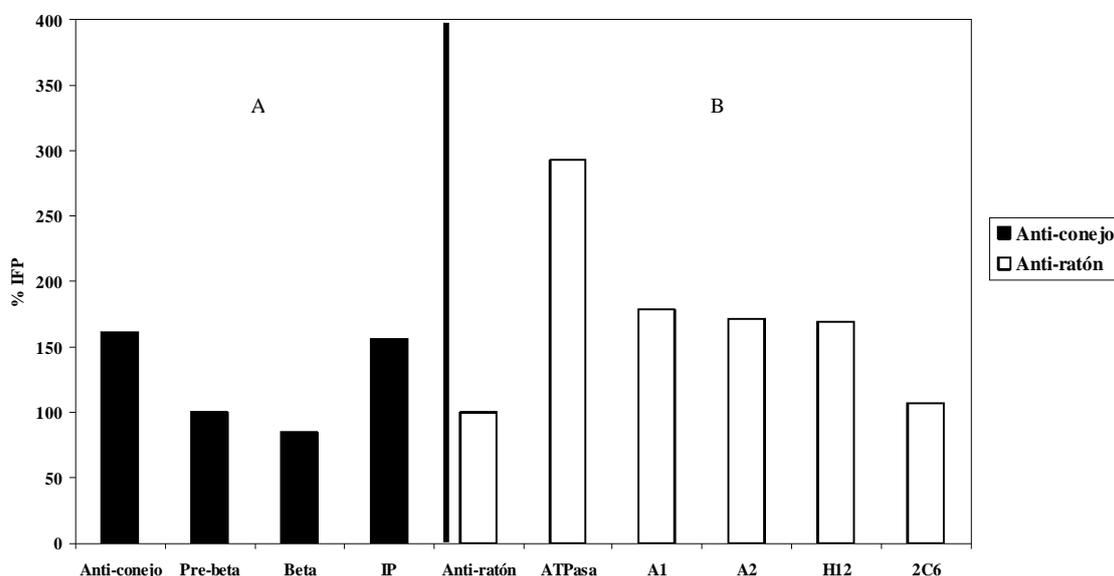


Figura 19. Paneles comparativos entre los sobrenadantes de subclonas de hibridomas y los sueros de ratones inmunizados en células HUVECs. A) Señal fluorescente generada con anticuerpos de conejo contra la subunidad β (Beta) o proteína inhibidora (IP). Como control se añadió anticuerpo secundario anti- IgG de conejo (Anti-conejo) o suero preinmune (Pre-beta). B) Señal fluorescente generada con sobrenadantes de las subclonas (A1, A2, H12 y 2C6) generadas contra la subunidad beta de *T. thermophilus*, como control se añadió anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Anti-ratón) o suero de ratón inmunizado contra el complejo F_1F_0 ATP sintasa (ATPasa). La dilución tanto de sueros como sobrenadantes fue a 1:100. En todos los casos las HUVECs no recibieron ningún estímulo.

Los sobrenadantes A1, A2 y H12 cuyo patrón de bandeo se muestra en la figura 18, dieron un porcentaje de IFP 1.5 veces mayor que el control panel B (fig. 19). El sobrenadante 2C6 dio un porcentaje de IFP apenas 6 % superior al control. Los sobrenadantes A1, A2 y H12 tuvieron

reconocimientos posiblemente del complejo sobre la superficie celular. Por lo que, sólo las clonas de estos sobrenadantes se siguieron seleccionando y expandiendo. Como resultado del proceso de selección de clonas, se obtuvieron los sobrenadantes de las clonas 1F1, 2H12, 2D6/A2, 2A/2 (Fig. 20). Los sobrenadantes 2H12, 2D6/A2 y 2A/2 mostraron un patrón de bandeado similar entre ellos. Estos sobrenadantes permitieron visualizar una banda que corresponde a la posición esperada para la subunidad β . Sin embargo, también se generaron bandas inespecíficas de mayor intensidad (Fig. 20).

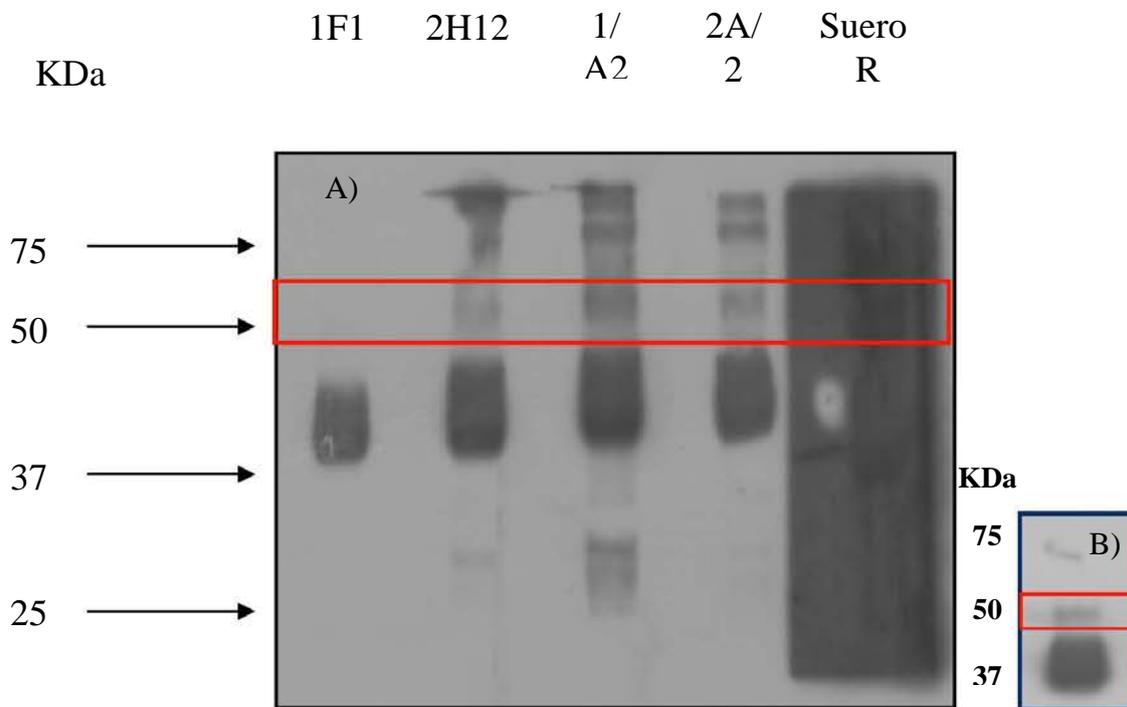


Figura 20. Inmunoensayo tipo “western blot” de extractos totales de mitocondria con sobrenadantes de los hibridomas, 1F1, 2H12, 1/A2, 2A/2 (subclonas de las colonias de la figura 17), y suero de ratón inmunizado contra el complejo F_1F_0 ATP sintasa. A) Los sobrenadantes se utilizaron a una dilución 1: 500, en el último carril el suero de ratón se utilizó a una dilución 1:1000. En cada carril se cargaron 15 μ g de proteína de extracto mitocondrial de corazón de bovino y se corrieron en un gel de acrilamida al 12%. El recuadro indica la posible posición según su peso, de la subunidad beta del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa. B) Carril 1F1 del mismo inmunoensayo con 5 min de sobreexposición.

El sobrenadante de la clona 1F1, generó una banda en la posición esperada para la subunidad β (Fig. 20). Este sobrenadante generó menos bandas inespecíficas que los demás sobrenadantes. El suero del ratón 3 inmunizado contra el complejo F_1F_0 ATP sintasa se utilizó sólo con fines comparativos. Este identificó una banda muy tenue a la misma altura de los demás carriles que podría corresponder a la subunidad β (Fig. 20). Este resultado fue importante ya que en el caso de la clona 1F1, se logró la eliminación de varias bandas inespecíficas, lo que permitiría la obtención de la subclona específica para la subunidad β en pocos pasos a partir de esta clona.

En el proceso de expansión de la clona 1F1 ocurrió una falla en el abastecimiento eléctrico durante el fin de semana que afectó a la incubadora donde se tenían las clonas expandidas. Esto provocó la pérdida del lote de clonas obtenidos. Cabe destacar que durante cada expansión una parte del lote era preservada, por lo que se recurrió a expandir el lote guardado de la clona 1F1 que se tenía. Sin embargo, al intentar reproducir los resultados obtenidos anteriormente, no se obtuvieron resultados satisfactorios.

Se probó el sobrenadante de la clona 1F1 poco diluido por inmunoensayo tipo “western blot” contra la subunidad β de *T. thermophilus* y extracto mitocondrial de corazón de bovino. El sobrenadante 1F1 no reconoció ninguna banda utilizando la subunidad β de *T. thermophilus* como antígeno (Fig. 21). Contra extracto mitocondrial de corazón de bovino, se obtuvieron dos bandas (77 y 37 KDa) que no correspondían a la posición esperada para la subunidad β (Fig.21). Por lo que se puede decir que con el sobrenadante 1F1 no se pudieron reproducir los resultados anteriores (Fig. 20). Por lo tanto, se recurrió a la expansión de clonas alternativas que se tenían también almacenadas.

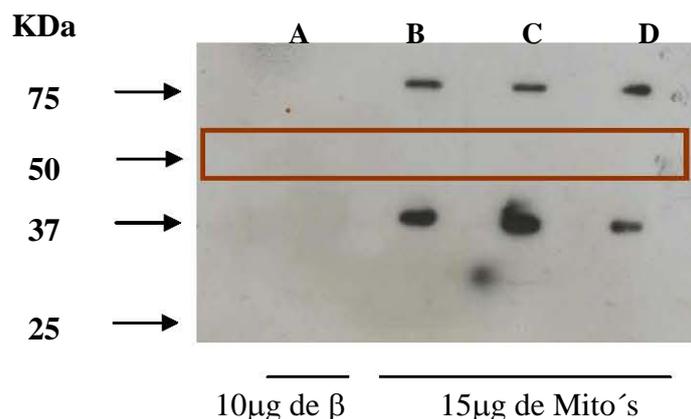


Figura 21. Inmunoensayo tipo “western blot” con el sobrenadante la subclona 1F1, probando la subunidad beta de *T. thermophilus* purificada o extracto mitocondrial de corazón de bovino. El sobrenadante de la clona 1F1 se empleó a una dilución 1:100. En el carril A se cargaron 10 µg de subunidad beta de *T. thermophilus* purificada (β), y en los carriles B, C y D, se cargaron 15µg de extracto mitocondrial de corazón de bovino (Mito’s). Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 12%. Los números de la izquierda corresponden a los marcadores de peso molecular en KDa. El recuadro indica la posición esperada de la subunidad beta del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa

Se expandieron las clonas 1/A2 y 2/H12 en las que ya se habían obtenido patrones de bandeo que concordaban con las posiciones esperadas (Fig. 20). El sobrenadante obtenido de la clona 2/H12, mostró un patrón de bandeo similar al obtenido anteriormente, donde se observa una banda muy tenue en la posición esperada para la subunidad β (Fig. 22). El sobrenadante de la clona 1/A2 reconoció una banda relativamente más intensa que 2/H12 (Fig. 22). Con los resultados obtenidos, se optó por la expansión y subclonación de la clona 1/A2 ya que mostraba una señal más intensa. Se realizaron paneles comparativos entre inmunoensayos tipo “western blot” para determinar el lugar aproximado esperado de la subunidad β (Fig.23). En el panel se muestra una banda en el lugar esperado para la subunidad β del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa.

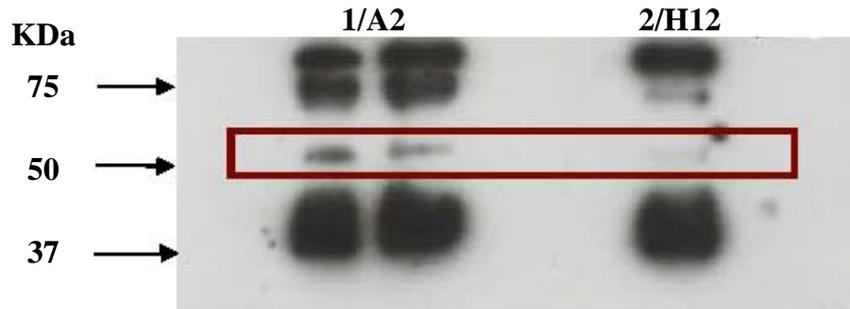


Figura 22. Inmunoensayo tipo “western blot” probando los sobrenadantes de las clonas 1/A2 (por duplicado) y 2/H12. Los sobrenadantes se emplearon a una dilución 1:200. En cada carril se cargaron 15 µg de extracto mitocondrial de corazón de bovino. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 10%. Los números de la izquierda corresponden a los marcadores de peso molecular en KDa. En el recuadro se indica la posición de la subunidad beta del complejo F₁F₀ de la ATP sintasa.

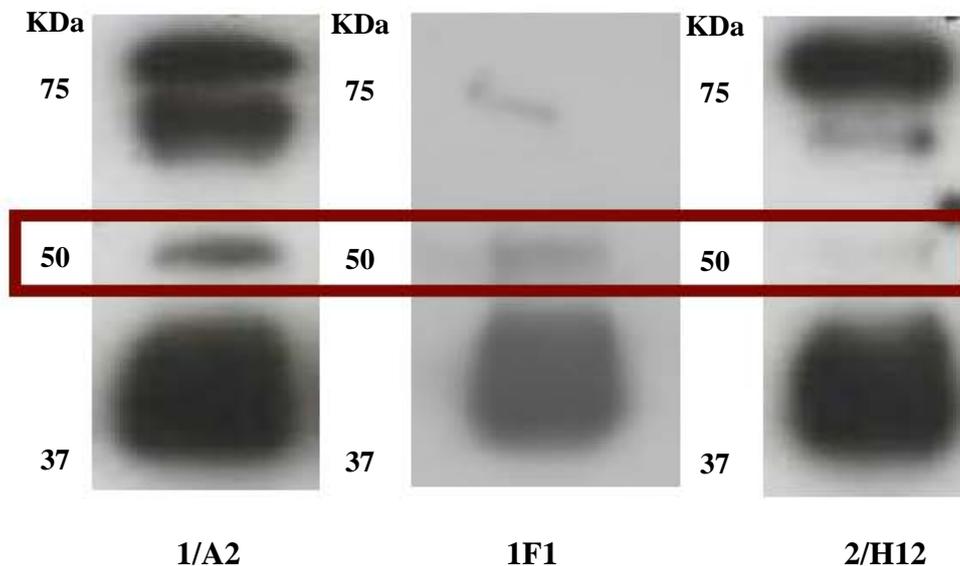


Figura 23. Cuadro comparativo de inmunoensayos tipo “western” de los sobrenadantes de las clonas A2, 1F1 y 2/H12. En todos los casos se utilizó una dilución 1:100. En cada carril se cargaron 10 µg de extracto de mitocondrial de corazón de bovino. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 12%. Los números indican la posición de los marcadores de peso molecular. El recuadro indica la posible posición según su peso, de la subunidad beta del complejo F₁F₀ de la ATP sintasa.

La clona 1/A2 al ser expandida y clonada, generó varias subclonas. El sobrenadante con mejores resultados fue el de la subclona C7. Este se utilizó en un inmunoensayo tipo “western blot” con dos condiciones, una utilizando extracto mitocondrial de corazón de bovino y otra con el complejo F₁F₀ purificado. Contra el extracto mitocondrial de corazón de

bovino, el sobrenadante de la clona C7 identificó una banda en la posición esperada para la subunidad β del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa (Fig. 24). También identificó bandas dobles inespecíficas y algunas inclusive de mayor intensidad. Contra el complejo F_1F_0 enriquecido, el sobrenadante identificó una banda única, aunque tenue, en la posición esperada para la subunidad β del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa (Carril F_1F_0 de la figura 24), lo cual confirmaría el reconocimiento de la subunidad β del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa.

También se realizó un ejercicio comparativo similar al de la figura 23, anexando el resultado de la subclona C7. En la figura 25 se muestra la identificación de una banda en cada carril en la posición aproximada esperada para la subunidad β del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa.

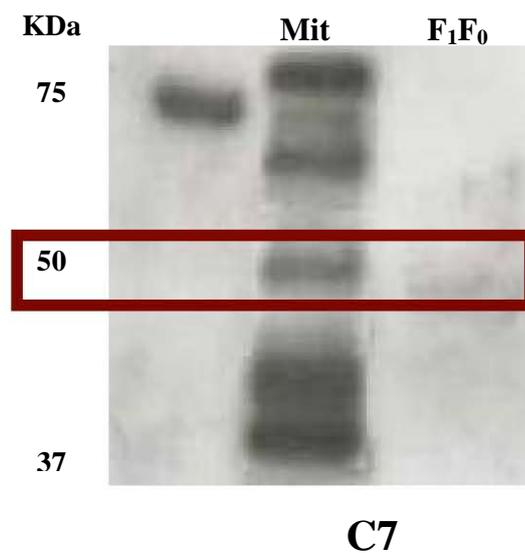


Figura 24. Inmunoensayo tipo “western blot” probando el sobrenadante de la subclona C7, contra extracto mitocondrial de corazón de bovino y complejo F_1F_0 purificado. Se utilizó el sobrenadante de la clona C7 a una dilución 1:100. En el carril (Mit) se cargaron 10 μ g de extracto mitocondrial de corazón de bovino y 6 μ g de F_1F_0 purificada. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 10%. En la columna de la izquierda se indican los marcadores de peso molecular en KDa. El recuadro muestra la posición de la subunidad beta del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa.

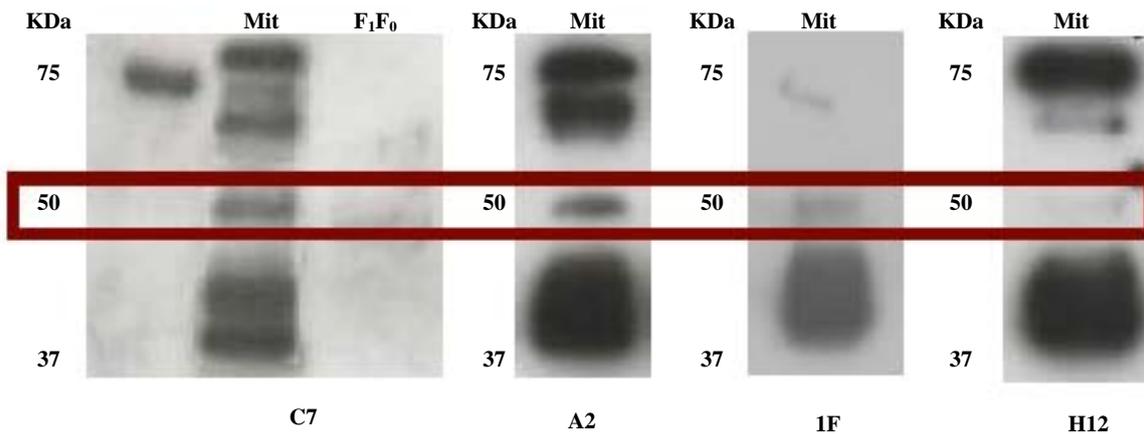


Figura 25. Cuadro comparativo de diferentes clonas obtenidas hasta el momento (C7, A2, 1F y H12). En todos los caso los sobrenadantes se probaron contra 10-15 μ g de proteína de extracto mitocondrial de corazón de bovino (Mit). Para el caso de la subclona C7, también se probaron 6 μ g de proteína de F₁F₀ purificada. Los números indican los pesos moleculares en KDa. El recuadro indica la posición de la subunidad beta del complejo F₁F₀ de la ATP sintasa.

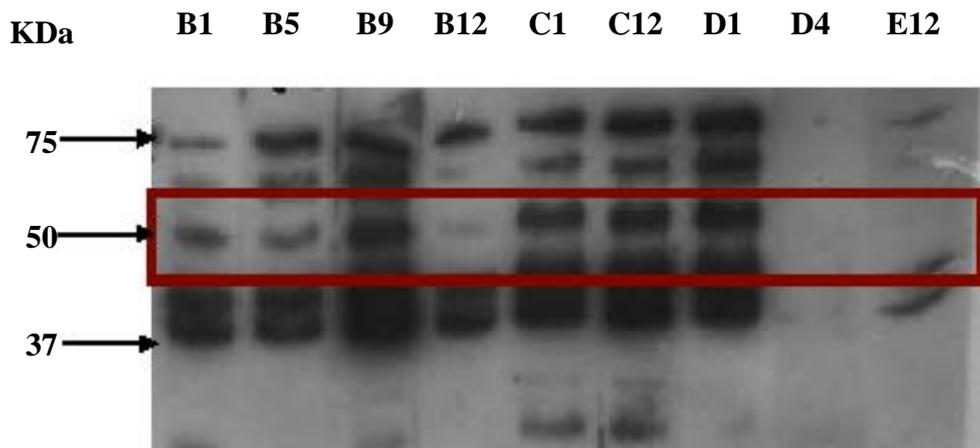


Figura 26. Inmunoensayo tipo “western blot” probando 9 de los 24 sobrenadantes de la subclona C7. Los sobrenadantes de las clonas B1, B5, B9, B12, C1, C12, D1, D4 y E12 se utilizaron a una dilución 1:100. En cada carril se cargaron 10 μ g de extracto mitocondrial de corazón de bovino. Las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 10%. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en KDa. El recuadro indica la posición de la subunidad beta del complejo F₁F₀ de la ATP sintasa.

Durante el proceso de selección de clonas, posterior a los problemas mencionados, llegó un momento en el cual el patrón de bandeo generado por los sobrenadantes de las clonas seleccionadas era idéntico (Fig. 26). A partir de este punto, en ninguna de las subclonas obtenidas se pudieron eliminar las demás bandas inespecíficas.

Sería necesario expandir clonas que se tienen almacenadas, sin embargo, debido al prolongado proceso de selección y expansión de clonas que se requiere y al pronostico desfavorable que se tiene hasta el momento, se optó por detener dicho proceso. Ya que el continuar implicaría prolongar de manera indefinida la selección de clonas que generan resultados que con el tiempo desaparecen.

VII. DISCUSIÓN

El objetivo central del proyecto se enfocaba en determinar mediante anticuerpos, cambios de expresión en cada una de las subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa sobre la superficie de células HUVEC. Dada la falta de anticuerpos comerciales para nuestro propósito, se utilizaron en primera instancia antisueros policlonales. Durante el desarrollo del proyecto el empleo de estos antisueros fue poco práctico dadas las complicaciones motivos ya mencionados, esto motivó el cambio de los objetivos iniciales a la generación de anticuerpos monoclonales. Sin embargo, durante su generación se encontraron nuevas complicaciones que impidieron obtener clonas de alta especificidad y avidéz. Por lo anterior los resultados presentados en este trabajo fueron producto de una serie de circunstancias negativas que motivaron el replanteamiento del proyecto.

A. Caracterización de sueros policlonales de conejo contra subunidades purificadas del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa

A pesar de que en experimentos preliminares los antisueros mostraron especificidad (Cortés, *et al.* 2005), esta se fue perdiendo durante el desarrollo del trabajo en todos los antisueros, obteniéndose patrones de reconocimiento inespecíficos (fig. 8). Sólo los antisueros contra las subunidades α , β y γ , presentaron un patrón de reconocimiento más restringido y similar a los esperados (Fig. 10). La alta inespecificidad de los antisueros podría resultar de una combinación de circunstancias entre las que podríamos incluir: la forma de obtención de los antígenos, deterioro por descongelación, reacción cruzada como resultado de que los conejos ya inmunizados hubieran entrado en contacto con antígenos miméticos a los de nuestro interés.

Se sabe que uno de los problemas en el estudio de las diferentes subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa, es la dificultad que representa la separación completa de algunas subunidades del complejo y que inclusive puede ser necesaria una separación en geles de doble dimensión (Belogradov *et al.* 1996). Lo anterior abre la posibilidad de que cada subunidad pudiera llevar una pequeña contaminación con otras de las proteínas que forman el complejo. También, procesos infecciosos posteriores a la inmunización pudieron haber provocado una respuesta inmune contra antígenos desconocidos que por reacción cruzada podrían haber reconocido epítopes similares presentes en el extracto mitocondrial. La reacción cruzada es un fenómeno común al generar anticuerpos contra antígenos estrechamente relacionados entre sí, ya que podrían presentar epítopes similares (Janeway, 2003).

Otro factor a tomar en cuenta es el fenómeno de desnaturalización producto de la congelación y descongelación de los antisueros. También, podría estar ocurriendo que los antisueros pudieran contener pequeñas proporciones de anticuerpos capaces de reconocer otros antígenos, de ahí las modificaciones que se realizaron asumiendo que los anticuerpos específicos dentro de los antisueros se encontraban en mayor proporción que los inespecíficos. Esto nos haría esperar que al haber más anticuerpos de una sola clase, hubiera mayor avidéz para su antígeno, contrarrestando posibles reacciones cruzadas y el resultado fue satisfactorio (Fig.11). Al emplear estos antisueros en ensayos de citometría en células HUVECs y de una línea celular de microvasculatura (HMEC-1), para detectar variaciones en la presencia o ausencia de la subunidad β , en células estimuladas y no estimuladas con TNF, sólo se detectaron cambios en la fluorescencia de de las células HUVECs (Fig. 12). La ausencia de variaciones en la presencia o ausencia de la subunidad β en células HMEC-1, podría ser debido a la poca

presencia del complejo en la superficie de estas células o incluso a su ausencia. Sin embargo, estos resultados no pueden ser concluyentes, ya que un factor a tomarse en cuenta es que, para un reconocimiento específico por inmunoensayo era necesaria una gran dilución del antisuero (1:3200). Por el contrario, para la observación de una señal en el ensayo de citometría fue necesario emplearlo a una mayor concentración (1:100), lo cual nos hace pensar que, bajo estas condiciones el reconocimiento lejos de ser específico es altamente inespecífico. Este razonamiento nos llevó a dudar sobre la interpretación de los cambios aparentes de la subunidad β , sin que pudiéramos descartar que la señal estuviera contaminada por otras subunidades o inclusive por proteínas ajenas al complejo cuya abundancia relativa en la superficie celular pudiera cambiar con el tratamiento.

Otro punto a resaltar, es que desafortunadamente, la alícuota del antisuero empleado hasta ese instante se terminó y ninguna otra alícuota fue capaz de reproducir los resultados hasta entonces obtenidos. Esto es un fenómeno común en lo referente a anticuerpos policlonales presentes en antisueros, siendo común que en solución tienden a deteriorarse rápidamente perdiendo la capacidad de reconocimiento (Nelson, *et al.* 2000). La presencia de anticuerpos policlonales contra el antígeno de interés, además de la presencia de anticuerpos inespecíficos, aunado al rápido deterioro, provocan diferentes rangos de variación en el repertorio de epítopes que pueden ser reconocidos entre lote y lote. Esto conlleva a diferencias en la respuesta y título del anticuerpo, por lo que, comparados con los anticuerpos monoclonales, los reactivos de los anticuerpos policlonales en general sufren de falta de reproducibilidad (Nelson, *et al.* 2000). En nuestro caso, una salida a este problema hubiera sido la generación de un lote fresco, sin embargo, esto complicó debido a la muerte del conejo con el que se había trabajado. Además, aun generando nuevos antisueros se tendría de

nuevo el problema de que los resultados obtenidos a partir de estos no generarían la confiabilidad y reproducibilidad requerida para realizar este trabajo.

Por estos motivos, se decidió dejar de emplear los antisueros y buscar una alternativa, como una mejor herramienta que nos permitiera tener certeza y reproducibilidad en los resultados. De ahí la idea de generar anticuerpos monoclonales contra las subunidades del complejo, única herramienta asequible que nos permitiría obtener los resultados deseados.

B. Generación de anticuerpos monoclonales

Con base a lo anterior y en vista de la ausencia de anticuerpos monoclonales comerciales disponibles, se buscó la generación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada una de las subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa, lo que nos permitiría analizar la posible presencia de todas las subunidades de este complejo en la superficie de las células endoteliales.

En primera instancia se seleccionarían hibridomas que generaran anticuerpos monoclonales contra la subunidad β del complejo, ya que esta subunidad era la de mayor interés para nuestro trabajo. Después de varias selecciones, nos fue posible identificar una clona denominada 1F1 que identificó una banda en la posición esperada para la subunidad β (Fig. 20 A y B), aunque todavía con un reconocimiento inespecífico en la parte inferior de la banda. Este resultado nos dio indicios de que se tenía identificada la clona portadora del gen capaz de identificar a alguno de los epítopes de la subunidad β del complejo enzimático.

Lamentablemente, se perdió parte de la clona 1F1 por las razones técnicas ya mencionadas. Es entonces que se trató de reestablecer el cultivo de estas a partir de células almacenadas durante las etapas tempranas de selección de los hibridomas para reclonar la 1F1. Sin embargo, en experimentos posteriores, no fue posible reproducir los resultados que ya se habían obtenido (fig. 21).

Se siguió con el crecimiento y selección de clonas, sin embargo, durante la última parte de este proceso, las clonas y subclonas fueron presentando un patrón de bandeado muy similar entre si (fig.26). Con estos resultados concluimos que las clonas posteriores aún estaban contaminada con otro tipo de anticuerpos de alta avidéz que reconocen bandas inespecíficas que no forman parte del complejo F_1F_0 pero que están presentes en partículas mitocondriales.

El porqué ocurrió dicho fenómeno, no lo podemos decir con certeza, en primera instancia parecería un caso de reacción cruzada de los anticuerpos monoclonales, ya que se estarían reconociendo bandas que tal vez por lo menos a nivel peptídico, tendrían mucha semejanza entre sí y por ello estarían siendo reconocidas (Ferrone y Dierich, 1985). Sin embargo, esto podría ser descartado ya que dentro de las proteínas mitocondriales, la proteína más semejante a la subunidad β del complejo es la subunidad α , por lo cual se esperaría la presencia de dobles bandas en la posición esperada para dichas subunidades, lo cual no es el caso.

Por otra parte en la mayoría de los casos, la pérdida de hibridomas específicos se da entre las etapas de selección de sobrenadantes positivos y de clonación (Campbell, 1987). No se sabe con certeza la razón, sin embargo, existen dos explicaciones tentativas que podrían darnos una respuesta aproximada.

Durante el proceso de clonación de hibridomas, se deben realizar diluciones tratando de obtener aproximadamente una proporción lo más cercana a 1 célula/pozo. Con el objetivo de que una clona pueda ser capaz de crecer de manera independiente de otra clona y poder obtener así sobrenadantes con solo un tipo de anticuerpo (MAb). Sin embargo, frecuentemente, sucede que hay más de una clona por pozo, en tal caso predominará aquella clona que tenga una tasa de crecimiento mayor desplazando o fusionándose con otra clona con lo cual se estaría favoreciendo la secreción de anticuerpos que no fueran útiles (Campbell, 1987). Esto podría ser debido a que la subclonación se ha hecho de manera tardía. También, podría ser que dentro de las clona haya muy pocas que secreten los anticuerpos apropiados (Campbell, 1987). De otra forma, una clonación temprana pudiera haber conducido a una proporción más alta de clonas que secreten anticuerpos con la especificidad requerida (Campbell, 1987). Esta situación pudo haber ocurrido en nuestro caso durante el proceso.

Otra alternativa es que la clona original hubiese sido inestable y tendiera a perder el cromosoma requerido. Por lo que es probable que las células restantes del hibridoma parental ya no hicieran cantidades significativas del anticuerpo (Campbell, 1987). Para descartar esta situación es necesario expandir y subclonar de nuevo clonas positivas. También, podría ser que el cromosoma no sea el factor, sino el contexto celular en el que se desarrolla que no permitiría la autosustentabilidad de la clona, por lo cual esta tendería a desaparecer. Tomando en cuenta los resultados a partir de la figura 21, podemos atribuir la pérdida de la clona a una combinación de los posibles factores antes mencionados.

Por lo tanto, se tomó la decisión de suspender la búsqueda de clonas que produjeran anticuerpos monoclonales específicos, ya que no se tendría la certeza de un tiempo determinado para la conclusión del proceso de selección lo que implicaría seguir retrasando de manera indefinida la conclusión del proyecto.

VIII. CONCLUSIONES

Las conformación estructural del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa parece dificultar la generación de anticuerpos específicos contra cada una de las subunidades de esta enzima.

La proteína inhibidora (IP) probablemente se encuentra disociada del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa o acoplada a otra proteína sobre la superficie celular.

IX. PERSPECTIVAS

Para la caracterización del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa, es necesaria la generación de anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las subunidades del complejo, lo cual permitiría realizar lo siguiente:

Determinar el mecanismo mediante el cual la subunidad β disminuye y la proteína inhibidora aumenta, sobre la superficie de células endoteliales al ser estimuladas por $TNF-\alpha$.

Determinar la presencia y conformación de las subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa que no han sido identificadas sobre la superficie celular.

Determinar la presencia del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa sobre la superficie de otras líneas o tipos celulares.

Determinar la modulación, regulación e interacción entre estímulos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios sobre las subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa en la superficie celular.

Determinar algunas de las funciones que realizan las subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa sobre la superficie celular.

Determinar el mecanismo mediante el cual las subunidades del complejo F_1F_0 de la ATP sintasa, son destinadas a la superficie celular y no a la mitocondria.

X. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. 2002. *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. New York and London: Garland Science; c

André, T., Nagao, T., Niké, R., Toyofuku, A., Tanaka, H., Kuramoto, Y., Emoto, Y., Shibata, H., Magota, K., Higuti, T. 1998. Tumoral angiogenesis: physiopathology, prognostic value and therapeutic perspectives. *Rev Med Intern.* Dec;19(12):904-13.

Arakaki, N., Nagao, T., Niké, R., Toyofuku, A., Tanaka, H., Kuramoto, Y., Emoto, Y., Shibata, H., Magota, K., Higuti, T. 2003. Possible role of cell surface H⁺ ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Cancer Res.* 1: 931-939.

Baldwin AS Jr: 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14:649- 683.

Barnes, S., y Peterson, T. 1995. Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208: 103 – 108.

Belogradov, G., Tomich, J., y Hatefi, Y. 1996. Membrana topography and near-neighbor relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits e, f, and g. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 271. No 34, Aug 23, pp. 20340-20345.

Berne, R. M. y L. Belardinelli. 1985. Effects of hypoxia and ischaemia on coronary vascular resistance, A-V node conduction and S-A node excitation. *Acta Med Scand Suppl* **694**: 9-19.

Bicknell, R. y Harris, A. 1996. Mechanism and therapeutic implications of angiogenesis. *Curr Opin Oncol.* Jan;8(1):60-5.

Blair, A., L. Ngo, Park, J. Paulsen, I. T. Saier, M. H., Jr. 1996. Phylogenetic analyses of the homologous transmembrane channel-forming proteins of the F₀F₁-ATPases of bacteria, chloroplasts and mitochondria." *Microbiology* **142** (Pt 1): 17-32.

Bodin, P. y G. Burnstock. 1996. "ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells." *J Cardiovasc Pharmacol* **27**(6): 872-5.

Boeynaems J. y Communi, D 2006. Modulation of Inflammation by Extracellular Nucleotides. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 943–944.

Bradley J., Thiru, S., Pober, J. 1994. Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *Am J Pathol*, 146:27-32.

Brooks, P., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F., Cheresch, D. 1995. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.* 96, 1815–1822.

Brown, L., Detmar, M., Claffey, K., Nagy, J., FENA, D., Dvorak, A., Dvorak, H. 1997. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 79:233–269.

Burwick, N., Wahl, M., Fang, J., Zhong, Z., Moser, T., Li, B., Capaldi, R., Kenan, D., Pizzo, S. 2005. An inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface, *J. Biol. Chem.* 280 1740–1745.

Buxton, I. y Cheek, D. 1995. Adenosine and Adenine Nucleotides: From Molecular Biology to Integrative Physiology (Kluwer, New York).

Cabezón, E., Butler, P., Runswick, M., Walker, J. 2000. Modulation of the Oligomerization State of the Bovine F₁-ATPase Inhibitor Protein, IF₁, by pH. *J. Biol. Chem.* 275, 28353-28355.

Cabazon, E., Runswick, M., Leslie, A., Walker, J. 2001. The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase, *EMBO J.* 20 6990–6996.

Cabazon, E. Montgomery, M., Leslie, A., Walker, J. 2003. The structure of bovine F₁-ATPase in complex with its regulatory protein IF₁, *Nat. Struct. Biol.* 10 744–750.

Campbell, Ailsa. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: monoclonal antibody technology. ELSEVIER. 5th impresión 1987 the netherlands. Pp163-164.

Cao, Y., Ji, R., Davidson, D., Schaller, J., Marti, D., Sohndel, S., McCance, S., O'Reilly, M., Llinas, M., Folkman, J. et al. 1996. Kringle

domains of human angiostatin: characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271:29461–29467.

Claesson-Welsh, L., Welsh, M., Ito, N., Anand-Apte, B., Soler, S., Zetter, B., O'Reilly, M., Folkman, J. 1998. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(10), 5579-5583.

Collins T., Read, M., Neish, A., Whitley, M., Thanos, D., Maniatis, T. 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*, 9:899-909.

Correa, Dolores., Mandujano, América., Medina, Yolanda. Manual de técnicas modernas en inmunología: teoría y práctica. Editado por. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. SSA. México. 2000.

Cortés, P., Domínguez, L., Estrada, A., Montes, D., Zentella, A., Tuena, M., Gómez-Puyou, A., García, J. 2005. The inhibitor protein of the $F_1 F_0$ ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res Com* 330: (844-849).

Das, B., Mondragon, M., Sadeghian, M., Hatcher, V., Norin, A. 1994. A novel ligand in lymphocyte-mediated cytotoxicity: expression of the beta subunit of H^+ transporting ATP synthase on the surface of tumor cell lines, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 273–281.

DeClerck, Y. y Laug, W. 1996. Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme Protein* 49, 72–84.

Denekamp J. 1984. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* 23:217–225.

Dong Z, Kumar, R., Yang, X., Fidler, I. 1997. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*, 88:801–810

Dvorak H. 1986. Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315:1650–1659.

Engelbrecht, S. 1989. Cross-reconstitution of the F₀F₁-ATP synthases of chloroplasts and *Escherichia coli* with special emphasis on subunit delta. *Eur.J. Biochem.* 181, 485–491.

Ezekowitz, R., Mulliken, J., Folkman, J. 1992. Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. *N. Engl. J. Med.* 326, 1456–1463

Ferrara, N., y Henzel, W. 1989. Pituitary follicular cells secretes a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851–855.

Ferrara N y Keyt B. 1997. Vascular endothelial growth factor: Basic biology and clinical implications. *EXS* 79:209–232.

Soldano Ferrone y Manfred Dierich. Handbook of monoclonal antibodies, applications in biology and medicine. Noyes Publications USA 1985 p. 7.

Folkman J. 1997. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. *EXS* 79:1–8.

Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285:1182–1186.

Folkman, J. 1986. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture *Cancer Res.* 46, 467–473.

Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1: 27-31.

Folkman, J. 2000. Incipient angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 94–95.

Folkman, J. y Shing, Y. 1992. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267 10931–10934.

Forsythe, J., Jiang, B., Iyer, N., Agani, F., Leung, S., Koos, R., Semenza, G. 1996. Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604–4613.

Gaeta, M., Jonson, D., Kluger, M., Pober, J. 2000. The death domain of tumor necrosis factor receptor 1 is necessary but not sufficient for Golgi retention of the receptor and mediates receptor desensitization. *Lab Invest*, 80:1185-1194.

García, J. 2005. Estructura, regulación, disfunción y evolución de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial monomérica y dimérica. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.13 al 18 noviembre 2005; Oaxaca, Oaxaca.

García, J. et al. 2002. En: “Recent research developments in human mitochondrial myopathies”. *Research Signpost* 37/661 (2) Fort P.O. Trivandrum-695 023, Kerala, India. Pp 127-171

Gately, S., Twardowski, P., Stack, M., Patrick, M., Boggio, L., Cundiff, D., Schnaper, H., Madison, L., Volpert, O., Bouck, N. et al. 1996. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res.* 36, 4887-4890.

Gately, S., Twardowski, P., Stack, M., Cundiff, D., Grella, D., Castellino, F., Enghild, J., Kwaan, H., Lee, F., Kramer, R., et al. 1997. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10868–10872.

Gendaszewska-Darmach, E. et al. 2003. Degradation of extracellular nucleotides and their analogs in HeLa and HUVEC cell cultures. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(4):973-84.

Gonzalez-Gronow, M., Gawdi, G., Pizzo, S. 1994. Characterization of the plasminogen receptors of normal and rheumatoid arthritis human synovial fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 4360–4366

Gonzalez-Gronow, M., Grenett, H., Weber, M., Gawdi, G., Pizzo, S. 2001. Interaction of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV initiates a signal transduction mechanism which regulates expresión of matrix metalloproteinase-9 by prostate cancer cells, *Biochem. J.* 355, 397–407.

Gonzalez-Gronow, M. Grenett, H., Gawdi, G., Pizzo S. 2005. Angiostatin directly inhibits human prostate tumor cell invasion by blocking plasminogen binding to its cellular receptor, CD26. *Experimental Cell Research* 303 22–31

Graven, K. y Farber, H. 1997. Endothelial hypoxic stress proteins. *Kidney Int.* 51, 426-437.

Grey, S., Csizmadia, V., Hancock, W. 1998. Differential effect of tumor necrosis factor-alpha on thrombomodulin gene expression by human monocytoid (THP-1) cell versus endothelial cells, *Int. J. Hematol.* 67 53–62.

Griscelli, F., Li, H., Bennaceur-Griscelli, A., Soria, J., Opolon, P., Soria, C., Perricaudet, M., Yah, P., Lu, H. 1998. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth *in vivo* by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 () 6367–6372.

Gross, J., Herblin, W., Dusak, B., Czerniak, P., Diamond, M., Sun, T., Eidsvoog, K., Dexter, D., Yayon A. 1993. Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* 85(2), 121–131

Gupta, K., Kshirsagar, S., Li, W., Gui, L., Ramakrishnan, S., Gupta, P., Law, P., Hebbel. R. 1999. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* 247:495–504.

Hajjar, K., Harper, P., Jaffe, E., Nachman, R. 1986. Binding of plasminogen to cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 261, 11656-11662.

Hajjar, K., Jacovina, A., Chaco, J. 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* 269, 21191-21197.

Hansen-Algenstaedt N, Fukumura, D., Stoll, B., Hicklin, D., Jain, R. 1999. Second wave of angiogenesis during KDR/Flk-1 antibody therapy (Abstract). *Proc Am Assoc Canc Res* 40:620.

Harris, A. 1998. Anti-angiogenesis therapy and strategies for integrating it with adjuvant therapy. *Recent Results Cancer Res.* 152:341-52.

Hashimoto, T., Negawa, Y. y Tagawa, K. 1981. Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase—stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme, *J. Biochem. (Tokyo)* 90 1151–1157.

Hoyle, C. y Burnstock, G. 1991. Adenosine in the Nervous System (Academic, London).

Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S, Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H., Folkman, J. 1990. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature (London)* 348, 555–557

Ito N. y Claesson-Welsh, L. 1999. Dual effects of heparin on VEGF binding to VEGF receptor-1 and transduction of biological responses. *Angiogenesis*. 3 (2) 159-66. *J Biol Chem*, 272:20641–20645

Jang, M., Cai, L., Udeani, G., Slowing, K., Thomas, C., Beecher, C., Fong, H., Farnsworth, N., Kinghorn, A., Mehta, R., Moon, R., Pezzuto, J. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218 – 220.

Jendraschack, E. y Sage, E. 1996. Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology. *Semin Cancer Biol.* Jun;7(3): 139-146.

Ji, W., Castellano, F., Chang, Y., DeFord, M., Gray, H., Villarreal, X., Kondri, M., Marti, D., Llinás, M., Schaller, J., Kramer, R., Trail, P. 1998. Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiostatin. *The FASEB Journal*. Dec; vol. 12: 1731-1738

Johnson, D., Douglas, I., Jahnke, A., Ghosh, S., Pober, J. 1996. A sustained reduction in IkappaB-beta may contribute to persistent NF-kappaB activation in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 271:16317-16322.

Junge, W. 1999. ATP synthase and other motor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 4735–4737, April 1999

Kaim, G. y Dimroth, P. 1995. Construction, expression and characterization of a plasmid-encoded Na(+)-specific ATPase hybrid consisting of *Propionigenium modestum* F0-ATPase and *Escherichia coli* F1-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 218, 937–944.

Kandel, J., Bossy-Wetzell, E., Radvanyi, F., Klagsbrun, M., Folkman, J., Hanahan, D. 1991. Neovascularization is associated with a switch to

the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, 66: 1095-1104.

Kandel, J., Bossy-Wetzel, E., Radvanyi, F., Klagsbrun, M., Folkman, J., Hanahan, D. 1991. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell*, 66: 1095 – 1104.

Kim, K., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H., Ferrara, N. 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature (London)* 362, 841–844.

Kisker, O., Onizuka, S., Banyard, J. et al. 2001. Generation of multiple angiogenesis inhibitors by human pancreatic cancer. *Cancer Res*;61:7298-7304.

Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; c2003. *Cancer Medicine*. 6th ed. Frei III, Emil, editors. Hamilton (Canada): Fig. 11-8 BC Decker Inc;

Laubinger, W., Deckers-Hebestreit, G., Altendorf, K., Junge, W. 1990. A hybrid adenosinetriphosphatase composed of F1 of *Escherichia coli* and F0 of *Propionigenium modestum* is a functional sodium ion pump. *Biochemistry* 29, 5458–5463.

Lijnen, H., Ugwu, F., Collen, D. 1998. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry*, 37: 4699–4702.

Lill, H., Burkovski, A., Altendorf, K., Junge, W., Engelbrecht, S. 1993. Complementation of *Escherichia coli* unc mutant strains by chloroplast and cyanobacterial F1-ATPase subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1144, 278–284.

Liotta, L. 1992. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci. Am.* 266, 54–63.

López-Bojórquez, L., Arachavaleta, F., Vadillo, F., Montes, D., Ventura, J., Zentella, A. 2004. NF- κ B translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage released signals co-secreted with TNF- α and IL-1 β . *Inflamm Res* 53:567-575.

Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R., Schreiber, A. 1984. Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science*. Aug 31;225(4665):932-5.

Madge L. y Pober J. 2001. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol*, 70:317-325.

Marcus, A., Safier, L., Broekman, M., Islam, N., Fliessbach, J., Hajjar, K., Kaminski, W., Jendraschak, E., Silverstein, R., von Schacky, C. 1995. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: significance of cell-cell interactions. *Thromb Haemost.* Jul;74(1):213-7.

Martinez, L., Jacques, S., Esteve, J., Rolland, C., Cabezon, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walter, J., Terce, F., Collet, X., Perret, B., Barbaras, R. 2003. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis, *Nature* 421 75–79.

Miles, L., Dahlberg, C., Plescia, J., Felez, J., Kato, K., Plow, E. 1991. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30, 1682–1691

Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., García, J. 2002. Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase, *J. Bioenerg. Biomembr.* 34 433–443.

Moser, T., Stack, M., Asplin, I., Enghild, J., Hojrup, P., Everitt, L., Hubchak, S., Schnaper, H., Pizzo, S. 1999. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 2811–2816.

Moser, T., Kenan, D., Ashley, T., Roy, J., Goodman, M., Misra, U., Check, D., Pizzo, S. 2001. Endothelial cell surface F1- F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 6656–6661.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., Shimizu, S. 1989. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature (Lond.)*, 342: 440–443.

Naldini, L. 1991. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor, *EMBO J.*; 10:2867-2878.

Noji, H. y Yoshida, M. 2001. The rotary machine in the cell, ATP synthase, *J. Biol. Chem.* 276 1665–1668.

O'Reilly, M., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R., Moses, M., Lane, W., Cao, Y., Sage, E., Folkman, J. 1994. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277–285.

O'Reilly, M. Holmgren, L., Chen, C., Folkman, J. 1996. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* 2, 689-692.

O'Reilly, M., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W., Flynn, E., Birkhead, J., Olsen, B., Folkman, J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277–285

Panchenko, M. y Vinogradov, A. 1985. Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Lett.* 184, 226–230.

Patterson B. y Sang Q. 1997. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem*; 272:28823-5.

Penefsky, H. y Cross, R. 1991. Structure and mechanism of FoF1-type ATP synthases and ATPases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 64,173-214.

Plesner L. 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol.* ;158:141-214. Review.

Pober J. y Cotran R. 1990: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*, 70:427-451.

Pober, J. 2002. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res.* 4 (suppl.3) s109 – s116.

Pullman, M. y Monroy, G. 1963. A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase *J. Biol. Chem.* 238, 3762–3769

Ralevic, V. y Burnstock, G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.

Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature (Lond)* 386:671–674.

Shing Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., Klagsbrun, M. 1984. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223, 1296–1298

Schägger y von Jagow. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199, 223-231.

Slowik, M., De Luca, L., Fiers, W., Pober, J. 1993. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am J Pathol*, 143:1724-1730.

Soderbom, F. y Loomis, W. 1998. Cell-cell signaling during Dictyostelium development. *Trends Microbiol.* 6, 402–406.

Spiecker, M., Darius, H., Liao, J. 2000. A functional role of I kappa Bepsilon in endothelial cell activation. *J Immunol*, 164: 3316-3322.

Stack, M., Gately, S., Bafetti, L., Enghild, J., Soff, G. 1999. Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J.* 340:77-84.

Stathakis P., Fitzgerald, M., Matthias, L., Chesterman, C., How, O. 1997. Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin.

Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A., Walker, J. 2000, The rotary mechanism of ATP synthase, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 672–679.

Tarui, T., Miles, L., Takada, Y. 2001. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 276. 39562–39568.

Troyanovsky, B., Levchenko, T., Månsson, G., Matvijenko, O., Holmgren, L. 2001. Angiomotin: An Angiostatin Binding Protein That Regulates Endothelial Cell Migration and Tube Formation *J Cell Biol* 152(6), 1247-1254.

Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. 1977. A simple method of purification of a soluble oligomycin-insensitive mitochondrial ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 82-86

Tzagoloff, A., Barrientos, A., Neupert, W., Herrmann, J. 2004. Atp10p assists assembly of Atp6p into the F₀ unit of the yeast mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem* 279(19): 19775-80.

Veitonmaki, N., Cao, R., Wu, L., Moser, T., Li, B., Pizzo, S., Zhivotovsky, B., Cao, Y. 2004. Endothelial cell surface ATP synthase-triggered caspase-apoptotic pathway is essential for k1-5-induced antiangiogenesis, *Cancer Res.* 64 3679–3686.

Virgilio, F., Pizzo, P., Zanovello, P., Bronte, V., Collado, D. 1990. Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today.* 11:274–277.

Wajih, N. y Sane, D. 2003. Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. *Blood* 101(5), 1857-1863.

www.expasy.ch

Wu Z., O'Reilly, M., Folkmna, J., Shing, Y. 1997. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Res Commun* , 236:651–654.

Yang, S., Cheek, D., Westfall, D., Buxton, I., 1994. K⁺ currents and K⁺ channel mRNA in cultured atrial cardiac myocytes (AT-1 cells). *Circ. Res.* 74, 401–407.

Zanovello, P., Bronte, V., Rosato, A., Pizzo, P., Virgilio, F. 1990. Responses of mouse lymphocytes to extracellular ATP. II. Extracellular ATP causes cell type-dependent lysis and DNA fragmentation. *Immunol.* 145:1545–1550.

Zheng, J. y Ramirez, V. 1999. Piceatannol, a stilbene phytochemical, inhibits mitochondrial F₀F₁-ATPase activity by targeting the F₁ complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 499 – 503.

Zheng, J., y Ramirez, V. 2000. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol.*, 130:1115 – 1123.

Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H., Donnini, S., Granger, H., Bicknell, R. 1997. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99:2625–2634.

Zimmermann H. 2000 Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Nov;362(4-5):299-309.

ANEXO

TABLA DE SOLUCIONES

MEDIOS DE CULTIVO	
RPMI con rojo fenol	M-199 suplementado
1ml/L de antibiótico-antimicótico 5% de SFB y 5% de suero de ternera	200 mM L-glutamima 0.1 mg/ml de mitógeno endotelial 0.1 mg/ml de heparina
ENZIMAS	
COLAGENASA TIPO IV (GIBCO)	TRIPSINA (SIGMA)
0.2 g en 1 L en HEPES IX Esterilizar por filtrado Preferentemente preparar y usar al momento	1 g en 1 L de Solución de verseno Esterilizar por filtrado Alicuotar y mantener en congelación Descongelar una alícuota para su uso y mantener en refrigeración
AMORTIGUADORES	
PBS (1 L)	NaCl 8g KCl 0.2g KH ₂ PO ₄ 0.2g Na ₂ HPO ₄ anhidro 2.16g pH 7.2-7.4
TBS (2L)	NaCl 17.53g Tris 4.84g pH 7.5
HEPES 20x (1 L)	NaCl 166g KCl 6.6g HEPES 52.3g Glucosa 44g La glucosa es sensible al calor, esterilizar por filtrado
AMORTIGUADOR DE CORRIMIENTO PARA PROTEÍNAS 10X (2 L)	Glicina 288g Tris 61.11g SDS 20g pH 8.3
AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS (2 L)	Glicina 29g Tris 6g Metanol 200ml Agua 1800 ml
AMORTIGUADOR DE LISIS PARA PROTEÍNAS	Tris-HCl pH 8.0 50 mM NaCl 120 mM NP-40 (IGEPAL) 0.5% NaF 100 mM (stock 1M) NaVO ₅ 200µM (stock 20mM) PMSF 1 mM (stock 100 mM) Aprotinina 2-10 µg/ml (SIGMA 4°C) Leupeptina 10µg/ml (stock 5 mg/ml)