



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LAS VASOINHIBINAS RECOMBINANTES**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

**PRESENTA**

JUAN PABLO ROBLES ALVAREZ

**TUTORES**

DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ-LABORA

DRA. BIBIANA MORENO-CARRANZA

DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA

DR. FRANCISCO VÁZQUEZ CUEVAS

*INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM*

JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO.  
MÉXICO ENERO 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Neurobiología**

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Juan Pablo Robles Alvarez, cuyo título es: “Relación Estructura-Función de las Vasoinhibinas Recombinantes” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ-LABORA

\_\_\_\_\_

DRA. BIBIANA MORENO-CARRANZA

\_\_\_\_\_

DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA

\_\_\_\_\_

DR. FRANCISCO VÁZQUEZ CUEVAS

\_\_\_\_\_

Aprobado por el Comité Académico

\_\_\_\_\_  
DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA  
Coordinador del Programa

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. y la Dra. Bibiana Moreno Carranza.

## Resumen

Las vasoinhibinas son péptidos con propiedades antiangiogénicas derivados del corte proteolítico de la prolactina. Actualmente, se generan mediante estrategias recombinantes en las cuales la cisteína en la posición 58 (C<sup>58</sup>) es sustituida comúnmente por serina (S<sup>58</sup>) para evitar la formación de puentes disulfuro no deseados. Además se generan de distintos tamaños (123, 139 y 142 aminoácidos). Sin embargo, no existen estudios que evalúen la relevancia funcional de estas modificaciones. En este trabajo se comparó la secreción y bioactividad de vasoinhibinas de 123 y 139 aminoácidos conteniendo C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> o alanina (A<sup>58</sup>) producidas en células HEK293T/17. Las vasoinhibinas con C<sup>58</sup> y A<sup>58</sup> tuvieron los pesos moleculares esperados (14 kDa y 16 kDa para los péptidos de 123 y 139 aminoácidos, respectivamente). En contraste, las vasoinhibinas con S<sup>58</sup> tuvieron isoformas con pesos moleculares mayores y se secretaron en mayor proporción. Las isoformas de mayor peso molecular corresponden a variantes glicosiladas, pues la mutación a S<sup>58</sup> introduce un nuevo sitio potencial de glicosilación. Las vasoinhibinas con C<sup>58</sup> y A<sup>58</sup> mostraron efectos antiangiogénicos similares y mayores a los de las vasoinhibinas con S<sup>58</sup> sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo. En conclusión, la sustitución de C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup>, incrementa la glicosilación y la secreción de las vasoinhibinas pero la glicosilación parece interferir con su bioactividad. Queda por determinar si la sustitución por A<sup>58</sup> es una alternativa mejor. Este estudio pone de manifiesto la necesidad de mayores estudios sobre la relación estructura-función de las vasoinhibinas para su futura producción, análisis y aplicación clínica.

## Summary

Vasoinhibins are peptides with antiangiogenic properties derived from prolactin proteolytic cleavage. Recombinant vasoinhibins of 123, 139, and 142 aminoacids have been produced in which cysteine at position 58 (C<sup>58</sup>) is replaced with Serine (S<sup>58</sup>) to prevent the formation of anomalous disulfide bonds. Nevertheless, the functional implication of this mutation is not well documented. Here, we compared the secretion and biological activity of recombinant vasoinhibins of 123 and 139 aminoacids containing C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup>, or alanine A<sup>58</sup> produced in HEK293T/17 cells. C<sup>58</sup> and A<sup>58</sup> vasoinhibins had the expected size (14 kDa and 16 kDa for vasoinhibins of 123 and 139 aminoacids, respectively), whereas vasoinhibins containing S<sup>58</sup> resulted in several isoforms with higher molecular weights and an increased secretion rate. The larger weights were due to glycosylation. *In silico* analysis revealed an additional glycosylation site (N<sup>56</sup>) after S<sup>58</sup> substitution, and exposure to N-glycosidase-F increased the mobility of all S<sup>58</sup>-containing isoforms such that only the vasoinhibins of the expected size were observed. Vasoinhibins with C<sup>58</sup> and A<sup>58</sup> showed similar antiangiogenic properties that were higher than those of S<sup>58</sup> vasoinhibins as revealed by inhibition of the proliferation of endothelial cells in culture. In conclusion, S<sup>58</sup> substitution increases the glycosylation and secretion of vasoinhibins and glycosylation interferes with their antiangiogenic properties. Further research is needed to substantiate the A<sup>58</sup> substitution as a good alternative to avoid anomalous disulfide bonds and the increased glycosylation. This study has unveiled important aspects of the structure-function relationship of recombinant vasoinhibins relevant to their generation for basic and clinical studies.

## **Agradecimientos**

*Al apoyo técnico del M. en C. Gabriel Nava Pinto y del Lic. en Nutrición Fernando López Barrera.*

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

*A la M. en C. Adriana González Gallardo, la Dra. Anaid Antaramian Salas y al Dr. Michael C. Jeziorski de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM por el apoyo recibido.*

*A la Lic. Leonor Casanova Rico de la Unidad de posgrado por su asistencia y apoyo cotidiano a lo largo de estos estudios.*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT), por la beca otorgada (No. 275668) y el financiamiento al trabajo de investigación (proyecto 127496).*

*Al Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (Becario No.: 513004009).*

It is this future, I hope, whose past is documented here.

*Mark Pilkington*

Dedico esta tesis principalmente a mi familia, por su gran dedicación, por su educación y por enseñarme el valor de la responsabilidad y el trabajo. Por darme el coraje que me permite alcanzar cualquier meta propuesta sin importar la naturaleza o magnitud de los obstáculos. Por su gran apoyo e impulso durante este tiempo, sin los cuales este trabajo hubiera carecido de significado.

Asimismo dedico este trabajo a todas las personas que coincidieron conmigo en estos últimos años, y que me ayudaron de una forma u otra a dar todos los pasos para culminar esta etapa.

## Índice

I.	<b>Introducción</b> .....	1
II.	<b>Antecedentes</b> .....	3
III.	<b>Justificación</b> .....	7
IV.	<b>Hipótesis</b> .....	8
V.	<b>Objetivos</b> .....	9
VI.	<b>Metodología</b> .....	10
VI.1.	Construcción de vasoinhibinas recombinantes e inserción en el vector de expresión.....	10
VI.2.	Transfección de células HEK293T .....	12
VI.3.	Extracción de proteínas de las células transfectadas .....	13
VI.4.	SDS-PAGE Western blot.....	13
VI.5.	Deglicosilación .....	14
VI.6.	Ensayo de proliferación .....	15
VII.	<b>Resultados</b> .....	16
VII.1.	Predicción <i>in silico</i> de los sitios de glicosilación y de posibles cambios en la estructura secundaria debidos a la sustitución de la C58 por S o A .....	16
VII.2.	Predicción <i>in silico</i> de cambios en la estructura secundaria debido a la sustitución de la C58 por S58 o A58. ....	16

<b>VII.3.</b>	Transfección de vasoinhibinas recombinantes. ....	16
<b>VII.4.</b>	Efecto de la sustitución del aminoácido 58 sobre la producción y secreción de las vasoinhibinas recombinantes. ....	19
<b>VII.5.</b>	La S58 aumenta la glicosilación de las vasoinhibinas recombinantes.....	21
<b>VII.6.</b>	La bioactividad de las vasoinhibinas recombinantes disminuye con el cambio de C a S en la posición 58 .....	23
<b>VIII.</b>	<b>Discusión</b> .....	30
<b>IX.</b>	<b>Conclusión</b> .....	35
<b>X.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	36
<b>XI.</b>	<b>Lista de abreviaturas</b> .....	42
<b>XII.</b>	<b>Índice de figuras</b> .....	43

## I. Introducción

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados del corte proteolítico de la hormona prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH) y el lactógeno placentario que inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) (Clapp et al., 2006). En contraste con las vasoinhibinas, las hormonas madre (PRL, GH y lactógeno placentario) estimulan la proliferación de células endoteliales (Clapp et al., 2009). En particular, la PRL es procesada proteolíticamente hacia vasoinhibinas por la catepsina D (Piwnica et al., 2004), las metaloproteasas de matriz (MMPs) (Macotela et al., 2006) y la proteasa morfogenética de hueso 1 (BMP-1)(Ge et al., 2007). Estas proteasas cortan a la PRL en el asa que conecta la  $\alpha$ -hélice 3 con la 4 a diferentes niveles generando vasoinhibinas de diferentes tamaños.

Existe interés en el potencial clínico de las vasoinhibinas para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con la sobreproducción de vasos sanguíneos como son el cáncer (Cross and Burmester, 2006) y las retinopatías vasoproliferativas (Cross and Claesson-Welsh, 2001). No obstante, su estructura básica y tamaño esencial para la actividad antiangiogénica no están completamente dilucidados. Para poder estudiar sus acciones es necesario contar con estos péptidos en grandes cantidades. En este sentido, en los estudios donde se ha generado a las vasoinhibinas de manera recombinante se les ha producido de dos tamaños diferentes (123 y 139 aminoácidos). Además, para evitar la formación de puentes disulfuro anómalos, se ha sustituido a la cisteína en posición 58 (C<sup>58</sup>) por serina (S<sup>58</sup>). Sin embargo, a pesar de que estos péptidos mostraron ser bioactivos, la influencia de estos cambios estructurales sobre la secreción y bioactividad de las vasoinhibinas no ha sido validada sistemáticamente (Clapp et al., 1993; Galfione et al., 2003) Recientemente, en un estudio de nuestro laboratorio, se comparó el efecto de la modificación de C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> en una vasoinhibina de 123 aminoácidos y se obtuvieron resultados preliminares que sugieren que la presencia de S<sup>58</sup> incrementa la secreción pero también la glicosilación de la molécula y que dicha glicosilación parece disminuir su bioactividad. En el presente trabajo analizamos el efecto del cambio de C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> y alanina (A<sup>58</sup>) sobre la secreción, glicosilación y bioactividad de vasoinhibinas recombinantes de 123 y 139 aminoácidos. Si bien es la primera vez que

se evalúa el cambio a A<sup>58</sup>, los resultados sugieren que la sustitución de la C<sup>58</sup> por A<sup>58</sup> representa una alternativa eficaz al uso de la S<sup>58</sup>, ya que evita la formación de puentes disulfuro anómalos y una excesiva glicosilación capaz de interferir con la bioactividad de estos péptidos.

## **II. Antecedentes**

La angiogénesis es el proceso mediante el cual tiene lugar la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente. Este proceso ocurre muy activamente durante el desarrollo determinando el crecimiento y la diferenciación de los tejidos (Clapp et al., 2009). Sin embargo, en la vida adulta la angiogénesis es prácticamente inexistente y está confinada a condiciones fisiológicas específicas como las asociadas a la reparación de tejidos a consecuencia de lesiones o fracturas o a eventos reproductivos de las hembras como la vascularización del endometrio uterino durante el ciclo menstrual o el desarrollo de la placenta y de la glándula mamaria durante el embarazo (Clapp et al., 2009; Piwnica et al., 2004). El grado de vascularización de los tejidos está determinado por el balance que existe entre factores que estimulan y factores que inhiben la proliferación de las células endoteliales. En condiciones patológicas, el equilibrio angiogénico puede verse alterado, propiciando una vascularización excesiva como sucede en el cáncer o en las retinopatías vasoproliferativas como la diabética (Carmeliet, 2005; Cross and Burmester, 2006; Cross and Claesson-Welsh, 2001). Una gran variedad de hormonas, factores de crecimiento, citocinas, enzimas y moléculas de adhesión controlan el equilibrio angiogénico. Entre los factores anti-angiogénicos endógenos conocidos, se incluyen las vasoinhibinas, péptidos derivados del corte proteolítico de la PRL, la GH y el lactógeno placentario (Clapp et al., 2009). A partir de este punto nos avocaremos a las vasoinhibinas derivadas de la PRL que han sido las más estudiadas.

Las vasoinhibinas inhiben la vascularización de la membrana corioalantoidea (Struman et al., 1999), la córnea (Duenas et al., 1999), la retina (Aranda et al., 2005) y el corazón (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). Su sobre-expresión por células de cáncer de colon (Bentzien et al., 2001) o de próstata (Kim et al., 2003) interfiere con la capacidad de estas células para generar tumores vascularizados en ratones inmunosuprimidos. Asimismo, la administración de vasoinhibinas (Garcia et al., 2008) o su transferencia génica utilizando adenovirus (Nguyen et al., 2011) o virus adenoasociados (Ramirez et al., 2011) recombinantes reduce la retinopatía diabética experimental.

Las vasoINHIBINAS ejercen sus efectos a través de inhibir la proliferación (D'Angelo et al., 1999), supervivencia (Martini et al., 2000) y migración (Lee et al., 1998; Lee et al., 2007) de las células endoteliales (Clapp et al., 2006). Asimismo, las vasoINHIBINAS reducen la dilatación y permeabilidad de los vasos sanguíneos (Clapp et al., 2009). Las vasoINHIBINAS inhiben la síntesis de DNA en células endoteliales a través de reducir los niveles de ciclínas B1 y D1, lo cual interfiere con la progresión del ciclo celular en las fases de transición G0/G1 y la G2/M (Tabruyn et al., 2005). Estas acciones antiproliferativas involucran el bloqueo de la vía de las MAPK a nivel de Ras (D'Angelo et al., 1999) y la inhibición de la producción de óxido nítrico por inactivación de la óxido nítrico sintasa endotelial (Gonzalez et al., 2004). Además, la disminución en la producción de óxido nítrico por vasoINHIBINAS, inhibe la vasodilatación y vasopermeabilidad necesarias para la homeostasis vascular (Clapp et al., 2009). También se sabe que las vasoINHIBINAS reducen la migración endotelial a través de estimular al inhibidor del activador de plasminógeno (Lee et al., 1998). Por su parte, el efecto pro-apoptótico de las vasoINHIBINAS sobre el endotelio vascular involucra la activación de las caspasas 1 y 3 y la expresión de miembros de la familia proapoptótica de las Bcl-2 mediante mecanismos dependientes de NFκB (Martini et al., 2000).

En apoyo a las acciones fisiológicas de las vasoINHIBINAS, se ha reportado su presencia en la hipófisis, la circulación y en sitios donde la vascularización es restringida o ausente como la retina (Aranda et al., 2005), la córnea (Duenas et al., 1999) y el cartílago (Macotela et al., 2006). Además, las vasoINHIBINAS endógenas pueden participar en mantener inhibida la vascularización de algunos de estos tejidos ya que su inmunoneutralización se traduce en la proliferación de nuevos vasos sanguíneos en la retina (Aranda et al., 2005) y en la córnea (Duenas et al., 1999).

Si bien se tienen evidencias claras de sus propiedades antiangiogénicas se desconocen las posibles implicaciones funcionales de la diversidad estructural de las vasoINHIBINAS. Las vasoINHIBINAS endógenas derivadas de la PRL comprenden fragmentos amino-terminales de la hormona que varían de tamaño en función de la proteasa que las genera. Así se conoce que la catepsina D corta a la PRL a nivel de los aminoácidos 132, 147 y 150 generando vasoINHIBINAS de 15, 16.5 y 17 kDa,

respectivamente (Piwnica et al., 2004). Por su parte, las metaloproteasas de matriz cortan a la PRL entre los aminoácidos 155 y 156 lo que resulta en una vasoinhibina de 17.6 kDa (Macotella et al., 2006) y la proteasa morfogenética de hueso a nivel del aminoácido 159 aminoácidos generando a una vasoinhibina de 18 kDa (Ge et al., 2007). Si bien se conoce que cada una de estas vasoinhibinas es biológicamente activa, no se sabe si su tamaño y estructura les confiere potencias o propiedades funcionales diferentes.

Los efectos antiangiogénicos llevaron a proponer el posible valor terapéutico de las vasoinhibinas en enfermedades angiogénico-dependientes como el cáncer y las retinopatías vasoproliferativas y, por ende, a intentar producirlas en grandes cantidades. Las primeras preparaciones de vasoinhibinas se obtuvieron tras la incubación de una preparación estándar de PRL pura con una fracción subcelular (lisosomal) proveniente de la glándula mamaria de la rata. Para evitar la formación de puentes disulfuro anómalos intra- e inter- moleculares, se sometió a la vasoinhibina resultante a un proceso de carbamido-metilación del grupo SH<sup>-</sup> de la C<sup>58</sup> seguido de purificación por cromatografía de filtración en gel, diálisis y concentración (Ferrara et al., 1991). La vasoinhibina resultante fue biológicamente activa, pero el procedimiento tuvo un rendimiento muy bajo (menor al 10%) lo que hizo que este procedimiento fuera muy costoso. Con la intención de incrementar la disponibilidad de las vasoinhibinas a un menor costo se optó por su producción recombinante en bacterias. Para ello, se insertó un codón de paro en la secuencia de la PRL en el sitio de la lisina 124 (K<sup>124</sup>) para la producción de una vasoinhibina de 123 aminoácidos (Clapp et al., 1993) o en la glicina 140 (G<sup>140</sup>) para una vasoinhibina de 139 aminoácidos (Struman et al., 1999) y en ambos casos se mutó la C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> para evitar la formación de puentes disulfuro anómalos. Las vasoinhibinas recombinantes fueron solubilizadas de los cuerpos de inclusión de las bacterias y purificadas mediante cromatografía en gel. Si bien estas preparaciones fueron biológicamente activas, la presencia de endotoxinas contaminó su efecto biológico (Clapp et al., 1993).

Para descartar la contaminación con endotoxinas, se recurrió a sistemas heterólogos eucariontes, como las células de insecto. Estas células han probado su efectividad para generar vasoinhibinas de 123 aminoácidos, con sustitución de la C<sup>58</sup> por

S<sup>58</sup>, con actividad biológica (Galfione et al., 2003). Si bien la producción recombinante de vasoinhibinas produce cantidades suficientes para experimentos *in vitro* y algunos experimentos *in vivo*, existe una alta variabilidad en la actividad biológica de los diferentes lotes producidos que pudiera estar relacionada con las modificaciones estructurales introducidas a la molécula.

Recientemente, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio preliminar en células HEK293T en el cual se evaluó el efecto de la modificación de C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> sobre la secreción y bioactividad de una vasoinhibina recombinante de 123 aminoácidos (Cruces-Solis, 2011). En este estudio se observó que la vasoinhibina con S<sup>58</sup> se secretaba de forma más eficiente que la que contenía C<sup>58</sup>, pero parecía glicosilarse en mayor proporción. La idea de la glicosilación se reforzó mediante el análisis *in silico* donde se encontró que la incorporación de la S<sup>58</sup> introduce un nuevo sitio potencial de glicosilación en la molécula (Cruces-Solis, 2011). Se tienen resultados controversiales en torno a la influencia de la glicosilación de las vasoinhibinas. En nuestro laboratorio, una observación preliminar realizada en un solo experimento, mostró que la vasoinhibina con la S<sup>58</sup> tiene una bioactividad menor que la que contiene la C<sup>58</sup> (Cruces-Solis, 2011). En contraste, Piwnica y colaboradores no mostraron diferencias en la bioactividad de ambas isoformas (Piwnica et al., 2004). Estos datos no son contradictorios cuando se tiene en cuenta que en este último estudio se utilizaron células COS-7 para la producción de vasoinhibinas, una línea celular que tiene una actividad de glicosilación menor que la de las células HEK293T (Loignon et al., 2008; Piwnica et al., 2004).

En el presente trabajo comparamos la secreción, glicosilación y bioactividad de vasoinhibinas recombinantes de dos tamaños diferentes (139 y 123 aminoácidos), con la sustitución o no de la C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup>, expresadas en células HEK293T/17. Además, evaluamos si la sustitución de la C<sup>58</sup> por A<sup>58</sup> en la vasoinhibina de 139 aminoácidos resulta en una mejor opción que la S<sup>58</sup> para evitar tanto la formación de puentes disulfuro anómalos como la excesiva glicosilación.

### **III. Justificación**

El avance en el conocimiento de la relación estructura-función de las vasoinhibinas recombinantes podría ayudar al estudio de sus efectos biológicos y terapéuticos. En particular, el investigar características moleculares que faciliten la secreción y actividad antiangiogénica de estos péptidos tiene implicaciones fundamentales para la generación de vectores virales capaces de transducirlas *in vivo*. Esta estrategia constituye una opción muy conveniente para la administración sostenida de cantidades suficientes de vasoinhibinas y, por ende, para estudiar sus efectos en modelos experimentales de padecimientos angiogénico dependientes como los de cáncer (Kim et al., 2003) y retinopatía diabética (Ramirez et al., 2011).

#### **IV. Hipótesis**

La sustitución de la C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> incrementa la secreción y glicosilación de vasoinhibinas recombinantes de 123 y 139 aminoácidos expresadas en células derivadas de epitelio humano (HEK293T/17) pero reduce su bioactividad.

La sustitución de la C<sup>58</sup> por A<sup>58</sup> mejora la bioactividad de una vasoinhibina de 139 aminoácidos al no modificar la glicosilación normal de la molécula.

## **V. Objetivos**

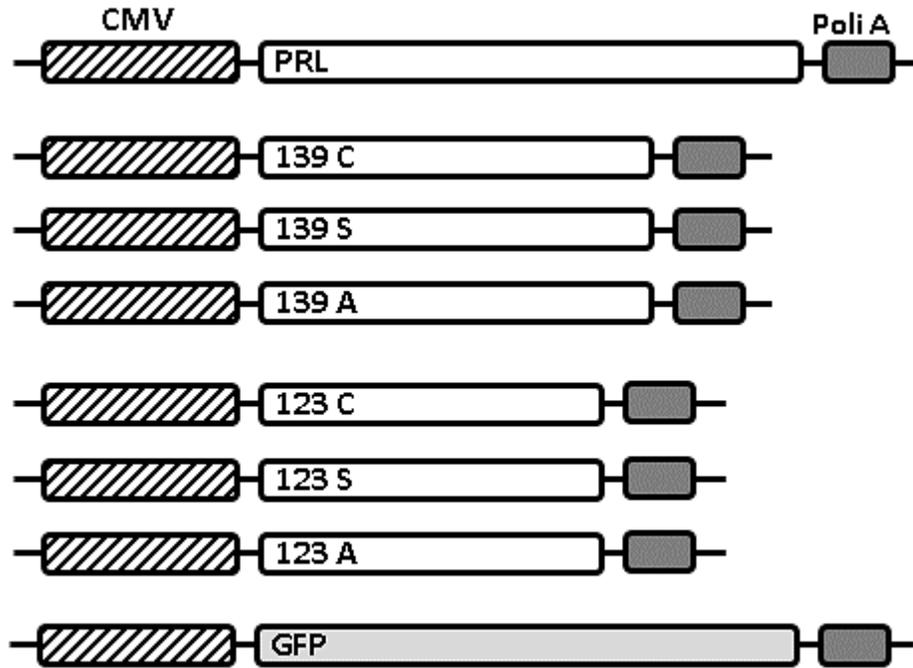
Comparar la secreción, glicosilación y actividad biológica de las vaso-inhibinas de 123 aminoácidos con C<sup>58</sup> o S<sup>58</sup>, y de 139 aminoácidos con C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>

## VI. Metodología

### VI.1. Construcción de vasoinhibina recombinante de 139 aminoácidos con A<sup>58</sup> e inserción en el vector de expresión pcDNA3

La vasoinhibina recombinante 139 A se clonó a partir del cDNA de la prolactina humana (PRL). Para este propósito, se insertó un codón de paro en la secuencia de la PRL en el sitio de la glicina 140 (G<sup>140</sup>) para una vasoinhibina de 139 aminoácidos (Struman et al., 1999). Se incluyeron los sitios de restricción BamHI (5'-GGATCC-3') y NotI (5'-GCGGCCGC-3') al principio y al final de la secuencia respectivamente. Se insertó la secuencia *Kozak* silvestre de la PRL justo antes del codón de inicio (ATG). El intercambio del codón C<sup>58</sup> por A<sup>58</sup>, se realizó con una mutación puntual y con la técnica de PCR. La construcción se insertó en el vector de expresión pcDNA3, bajo el promotor del citomegalovirus (CVM) (Figura 1). Las vasoinhibinas de 123 y 139 aminoácidos conteniendo C<sup>58</sup> o S<sup>58</sup>, ya se tenían en el vector pcDNA3.

Se hicieron 2 reacciones de PCR por separado utilizando la el cDNA de la prolactina como templado y los oligos hP-Koz-pC3-2 (5'-AAAAAGGATCCGCCACCA TGAACATCAAAGGATCGCCATGG-3', *forward*) y 3'hPRL-C58A-2 (5'-GAAGTCTGGG CGCTGTTGATG-3', *reverse*) para el primer fragmento, y 5'hPRL-C58A-1 (5'-ATCAA CAGCGCCCACACTTCTT-3', *forward*) y el hPRL-16K-139 (5'-AAAAAAGCGGCCG CTTAAGGATGAACCTGGCTGACTAT-3'). Posteriormente se mezclaron los productos limpios de ambas reacciones y se corrieron otros 20 ciclos de PCR sin oligos, en el cual ambos extremos de las moléculas en los que se insertó la mutación se unieron a sus complementarios y funcionaron como oligos. Posteriormente estos fragmentos se amplificaron mediante una reacción de PCR estándar con los oligos hP-Koz-pC3-2 y hPRL-16K-139, el termociclador *Mastercycler egradient* (Eppendorf; Hamburgo, Alemania). La reacción se realizó en un volumen de 25 µl con JumpStart REDTaq PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich Co.; St. Louis, USA). El total de la reacción se corrió en un gel de agarosa al 1% y las bandas del tamaño adecuado se cortaron y eluyeron del gel mediante el estuche comercial *Wizard SV Gel & PCR clean-up system* (Promega; Madison, USA).



**Figura 1. Representación esquemática de los vectores usados en la transfección de las células HEK293T/17.** Todas las construcciones tienen el promotor del citomegalovirus (CMV) y el sitio de poliadenilación de la  $\beta$ -globina (Poli A). La hormona prolactina humana (PRL) de 199 aminoácidos (aa) y los diferentes tamaños de vasoinhibinas (139 aa y 123 aa) con C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>, contienen un péptido señal de 28 aminoácidos. La proteína verde fluorescente optimizada (eGFP) y la PRL fueron utilizadas como controles de transfección.

Tanto el producto de la reacción de PCR de la 139A, como el vector pcDNA3 fueron incubados con las enzimas de restricción BamHI y NotI por 16 horas a 37°C. Después, se separaron los fragmentos mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se eluyeron las bandas de interés mediante el estuche comercial *Wizard SV Gel & PCR clean-up system* (Promega, USA). Posteriormente se ligaron los fragmentos con el vector pcDNA3, en una proporción molar de 3 a 1 (inserto a vector) mediante una reacción de 10  $\mu$ l de volumen final, en la que se incluyeron 200 Unidades de ligasa T4 (New England Biolabs; Ipswich, USA) y 5  $\mu$ l de buffer de ligación 2x (132 mM Tris-HCL, pH7.6; 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ditiotretitol, 2 mM ATP, 15% polietilenglicol) (New England Biolabs,

USA). Esta reacción se incubó por 16 h a 21°C. Posteriormente se transformaron bacterias competentes XL-Blue (Stratagene; La Jolla, Ca. USA) con el total de reacción de ligación y se sembraron en placas de agar con ampicilina (100µg/ml) a 37°C por 16h. Se muestrearon las colonias presentes en la placa mediante PCR de colonias con el oligo hP-Koz-pC3-2 (*forward*) y los oligos del tamaño correspondiente a la vasoinhibina esperada hPRL-16k-123 (5'-AAAAAAGCGGCCGCTTAGGTTTGCTCCTCAATCTCTAC-3' *reverse*) y hPRL-16k-139 (*reverse*). Las colonias que fueron positivas se crecieron para la extracción de DNA plasmídico mediante el estuche comercial de purificación Qiagen Plasmid Kit (Qiagen; Hilden, Alemania). Después se analizaron los plásmidos mediante patrones de restricción y secuenciación.

## **VI.2. Transfección de células HEK293T**

Las células HEK293, son una línea celular humana derivada de epitelio renal embrionario y han sido utilizadas ampliamente en estudios de expresión heteróloga de proteínas (Thomas and Smart, 2005). Las células HEK293T son una modificación de la línea celular anterior a la que se insertó el gen del antígeno T del virus SV40. La expresión de esta proteína favorece la replicación episomal de los vectores de expresión que ingresen a la célula y que contengan la secuencia del origen de replicación de este virus. De este modo se consigue una gran mejora en la eficiencia de transfección. La clona que se utilizó para este estudio es la HEK293/17 que es una clona altamente transfectable (ATCC, USA).

Se utilizó la técnica de transfección por fosfato de calcio. Las células se sembraron 48 h antes de la transfección a una densidad de  $2 \times 10^6$  células por placa de 100 mm con 10 ml de medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y antibióticos. Tres horas antes de la transfección se cambió el medio, por medio con cloroquina 10 µM para hacer más eficiente el proceso de transfección (Cruces-Solis, 2011). Para la solución de transfección se preparó una mezcla de 40 µg de plásmido de interés, 50 µl de cloruro de calcio (2.5 M CaCl<sub>2</sub>), se ajustó a 500 µl con 1[H<sub>2</sub>O]:2[0.1 M TE] y se le adicionaron gota a gota 500 µl de buffer 2X HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) al mismo tiempo que se introdujo aire a la mezcla con una pipeta por 1 minuto. Inmediatamente después se

agregó la totalidad de la mezcla (1 ml) a la placa de manera homogénea. Después de 16 horas se cambió el medio para eliminar la alta concentración de calcio que podría resultar tóxica para las células y se agregaron 5 ml de medio DMEM. Después de 48 horas se recolectó el medio, se filtró (0.22  $\mu\text{m}$ ), se alicuotó y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

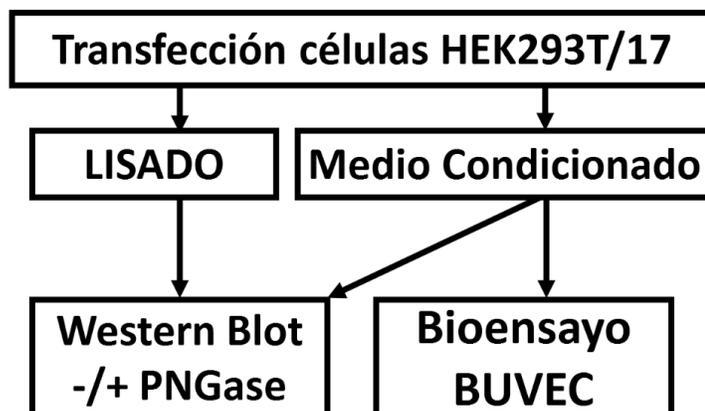
La eficiencia de transfección fue calculada mediante el método de *enmascaramiento* (alto contraste) del software ADI (AnalyzingDigitallImages; Copyright 2003, 2009, 2012 by the Regents of the University of California); generando una relación de un *enmascaramiento* de las células transfectadas con eGFP, en campo claro y otro de las mismas células bajo la luz en el espectro azul-violeta, en el cual se observa la proteína verde fluorescente, lo cual permite saber el porcentaje de células transfectadas.

### **VI.3. Extracción de proteínas de las células transfectadas**

A las 48 horas de la transfección, las células se lisaron y sus proteínas se extrajeron con 400  $\mu\text{l}$  de buffer RIPA [50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS e inhibidor de proteasas P854 (Sigma-Aldrich, USA)]. La monocapa de células se raspó con una espátula en presencia del buffer RIPA, se homogenizó el lisado con un *vortex* y se incubó 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10,000 x g y se colectó el sobrenadante.

#### **I.1. SDS-PAGE Western blot**

La presencia de PRL y de las diferentes vasoinhibinas en los medios de cultivo y en los lisados de células HEK293T/17 transfectadas con los respectivos cDNAs, se analizó mediante SDS-PAGE Western blot. Se colectaron 5ml de Medio condicionado y 400  $\mu\text{l}$  de Lisado. Se cargaron 37.5  $\mu\text{l}$  de medio condicionado y lo equivalente en volumen de lisado, 5.9  $\mu\text{l}$ , en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa bajo una corriente de 25 V durante 37 minutos. Las membranas se bloquearon por 2 horas con buffer de fosfatos PBS con 1% detergente Tween 20 (*Polyoxyethylene sorbitan monolaurate*) (PBST) y leche en polvo al 3% (Bio-Rad, USA) y



**Figura 2. Diagrama de la metodología empleada evaluar la secreción, glicosilación y bioactividad de las diferentes vasoinhibinas.** Las diferentes construcciones de vasoinhibinas se transfectaron mediante el método de fosfato de calcio a células HEK293T/17. Al cabo de 48 horas, el medio condicionado se recolectó y se preparó un lisado proteico de las células transfectadas. El medio condicionado y el lisado fueron analizados mediante Western blot en condiciones reductoras. El medio condicionado fue sometido a su vez a una deglicosilación y se analizó mediante Western blot. Además, se evaluó la bioactividad del medio condicionado mediante un ensayo de inhibición de la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC).

se incubaron por 16 h con el anticuerpo policlonal anti-PRL (CL-1) (Duenas et al., 1999), a una concentración de 1:500 y 1% de Albumina Bovina Sérica (ABS) en PBST. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios respectivos conjugados con fosfatasa alcalina a una concentración de 1:5000 y finalmente se revelaron utilizando el estuche comercial de revelado *AP Conjugate Substrate Kit* (Bio-Rad, USA) (Aranda et al., 2005). La concentración de las proteínas en el Western blot, fue evaluada a través de un análisis densitométrico.

## I.2. Deglicosilación

La deglicosilación de proteínas en el medio condicionado de células HEK293T/17 se llevó a cabo usando la enzima deglicosilasa PNGase-F (*Peptide-N-Glycosidase F*, New England Biolabs Inc, Ipswich, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se desnaturalizaron 9  $\mu$ l de medio condicionado de las células transfectadas (5% SDS, 0.4 M DTT) a 100°C por 10 minutos. Posteriormente se añadieron: 4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l de buffer

de fosfato de sodio 0.5 M, 2  $\mu$ l de Nonidet P-40 al 10% y 1  $\mu$ l de PNGase (500 U). La mezcla se incubó a 37°C por 1 hora. La totalidad de la reacción fue analizada por SDS-PAGE-Western blot.

### **I.3. Ensayo de proliferación**

Cultivos primarios de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) obtenidos de acuerdo al método descrito (Cajero-Juarez et al., 2002), se sembraron a una densidad de 3,500 células/pozo en placas de 48 pozos con 200  $\mu$ l del medio de cultivo F-12 HAM (Sigma-Aldrich, USA) adicionado con 10% suero fetal bovino y antibióticos. Su ciclo celular fue sincronizado y la proliferación detenida mediante incubación por 24 horas en medio de cultivo con bajo suero (0.5%). Posteriormente, se aumentó la concentración del suero (10%) y se agregaron 40 ng/ml del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en presencia o ausencia de 100  $\mu$ l de medio condicionado obtenido de los cultivos de células HEK293T/17 transfectadas con vectores que contienen el cDNA de vasoinhibinas. Veinticuatro horas después se agregaron 5  $\mu$ Ci de  $^3$ H-timidina por pozo y 24 horas después, las células fueron lavadas tres veces con ácido tricloroacético al 5% y lisadas con 250  $\mu$ l de NaOH 0.25 N. El volumen total del lisado se transfirió a viales y se adicionó con 5 ml de líquido de centelleo. Finalmente, se determinó la radioactividad asociada a la  $^3$ H-timidina (LS6500 Scintillation counter, Beckman, Pasadena Ca. USA).

## **VII. Resultados**

### **II.1. Predicción *in silico* de los sitios de glicosilación debido a la sustitución de la C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>.**

Mediante el programa NetGlyc 1.0 del Center for Biological Sequence Analysis ([www.cbs.dtu.dk](http://www.cbs.dtu.dk)) se analizó el potencial de N-glicosilación de una vasoinhibina recombinante de 123 aminoácidos conteniendo C o S en la posición 58. Este análisis *in silico* corroboró la información obtenida previamente (Cruces-Solis, 2011) de que la S<sup>58</sup> introduce un nuevo sitio potencial de glicosilación en el residuo de N<sup>56</sup> de la secuencia de la vasoinhibina recombinante. La A<sup>58</sup> no muestra cambio en el patrón de glicosilación con respecto a la vasoinhibina con la C<sup>58</sup> endógena (Figura 3) .

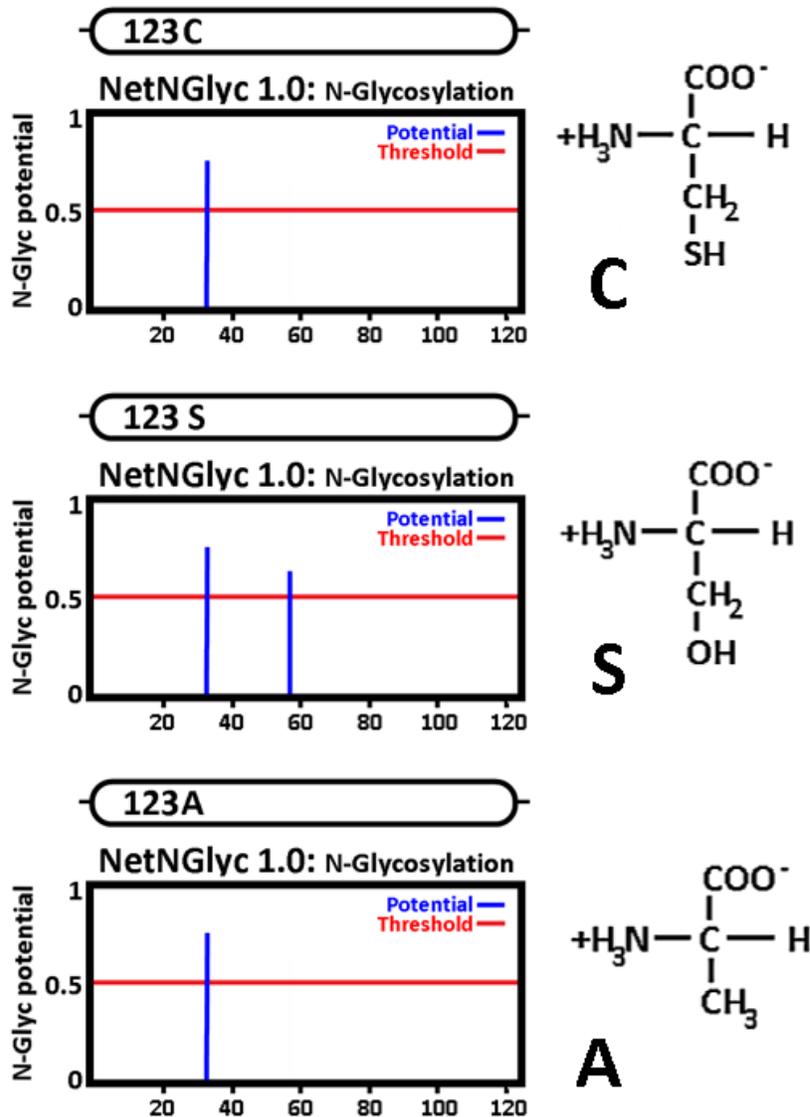
### **II.2. Predicción *in silico* de cambios en la estructura secundaria debido a la sustitución de la C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>.**

Se evaluó *in silico* la estructura secundaria de las vasoinhibinas 123 y 139 aminoácidos con C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>, mediante el programa predictor SABLE (<http://sable.cchmc.org>) y se les visualizó con el programa *Polyview-2D* de la Universidad de Cincinnati (<http://polyview.cchmc.org>). El resultado de este análisis reveló que no ocurren cambios significativos en la estructura secundaria de las vasoinhibinas de 123 y 139 aminoácidos con las distintas mutaciones (Figura 4).

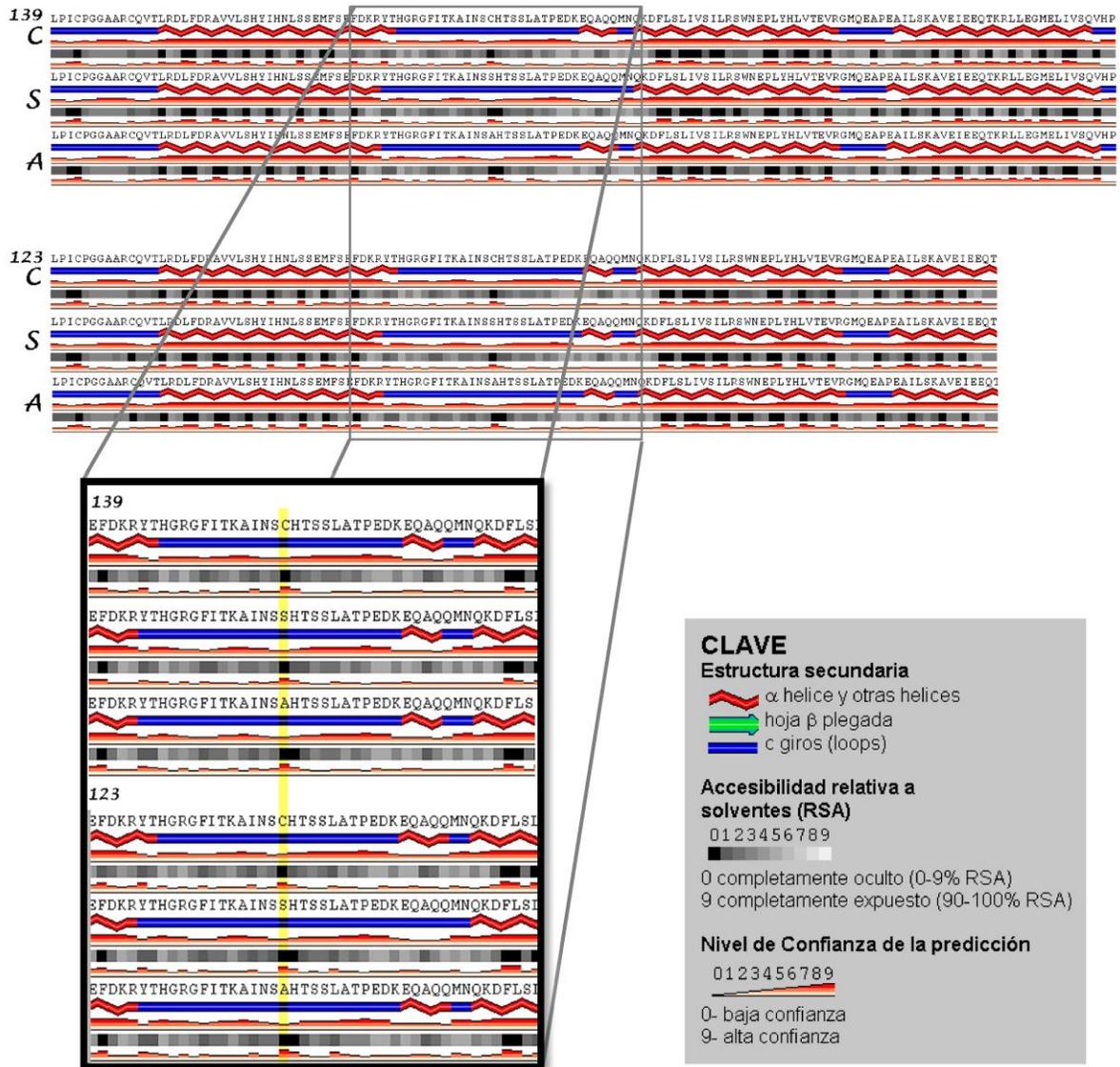
### **II.3. Transfección de vasoinhibinas recombinantes**

Las células HEK293T/17 fueron transfectadas mediante el método de fosfato de calcio con una concentración de 4 µg/ml de plásmido conteniendo la construcción de eGFP. La eficiencia de transfección se estimó a través de evaluar la fluorescencia directa debida a la GFP en un total de 4 imágenes provenientes de experimentos independientes por el método de enmascaramiento (alto contraste) usando el software **ADI** (*Analyzing Digital Images; University of California*). Con este método el total de las células visualizadas en campo claro y las zonas verdes (visualizadas bajo el microscopio de fluorescencia), se convierten en áreas claras cuantificables (Figura 5). La comparación

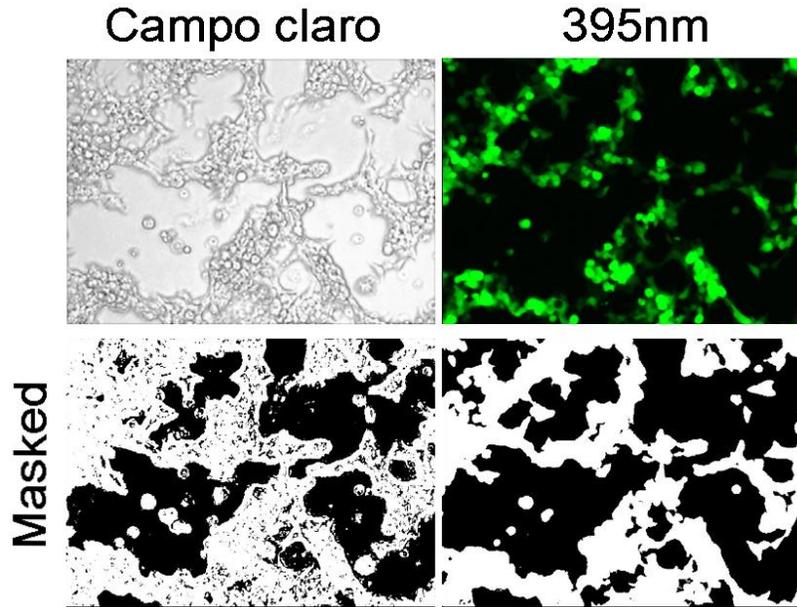
de ambas áreas permite obtener una aproximación de la proporción de las células transfectadas con respecto al total de las células cultivadas. Bajo estas condiciones se estimó que la eficiencia de transfección fue mayor al 85%.



**Figura 3.** La S<sup>58</sup>, y no así la A<sup>58</sup>, genera un nuevo sitio potencial de glicosilación en las vasoinhibinas. Resultado de análisis *in silico* del potencial de N-glicosilación en la secuencia de una vasoinhibina recombinante de 123 aminoácidos conteniendo C, S o A en la posición 58, mediante el programa NetGlyc 1.0. Las líneas de color azul muestran el sitio potencial de glicosilación en los aminoácidos correspondientes a la secuencia indicada en el eje X, y su potencial grado de glicosilación (eje Y). La línea roja marca el umbral de glicosilación.



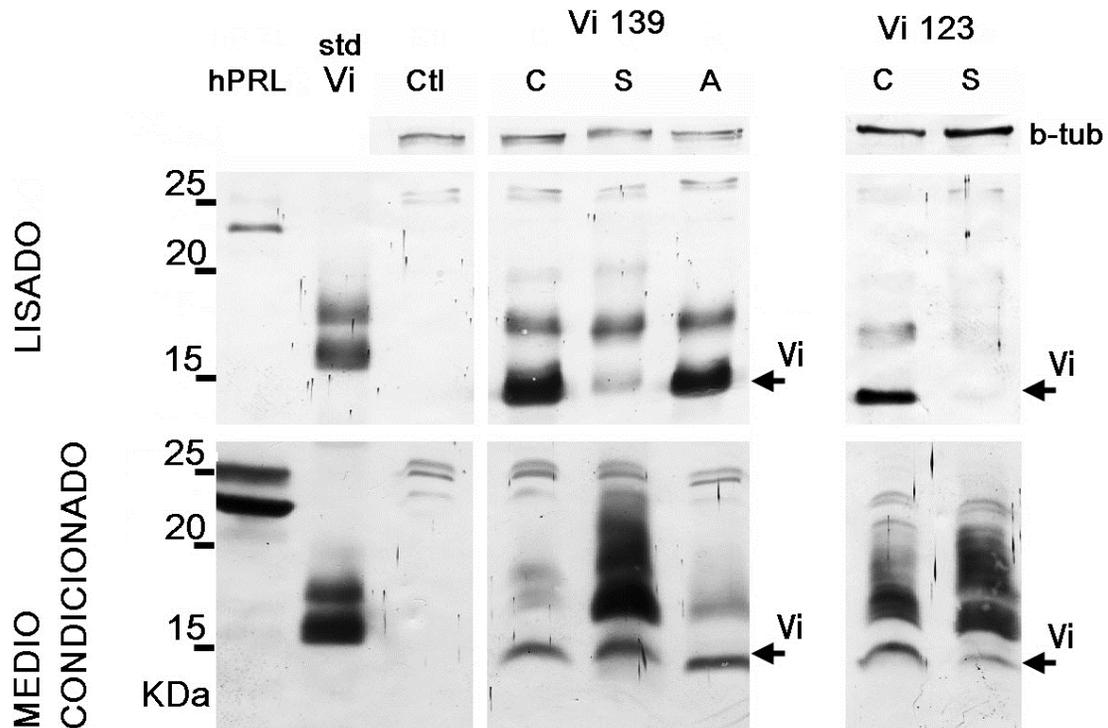
**Figura 4. El cambio de aminoácido en la posición 58 no modifica la estructura secundaria estimada *in silico* de las vasoinhibinas recombinantes.** Resultado de análisis *in silico* de la estructura secundaria de las vasoinhibinas recombinantes con C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup> mediante el programa predictor SABLE (<http://sable.cchmc.org/>) visualizadas con el programa Polyview-2D de la Universidad de Cincinnati (<http://polyview.cchmc.org/>). Se muestra la secuencia primaria de cada una de las vasoinhibinas (123 y 139 aminoácidos con las diferentes mutaciones) y un acercamiento a los aminoácidos adyacentes al aminoácido 58 (amarillo). Debajo de la secuencia de aminoácidos se indica la predicción de estructura secundaria ( $\alpha$ -hélices,  $\beta$ -plegamientos, asas), la accesibilidad relativa a solventes (RSA) y el nivel de confianza de las predicciones.



**Figura 5. Transfección de las células HEK293T/17 con el plásmido que contiene la proteína verde fluorescente GFP.** Vista representativa de campo claro de las células HEK293T/17 transfectadas con GFP con fosfato de calcio (panel sup. izq.) y su fluorescencia al exponerlas a luz de 395nm (panel sup. der.). Imágenes de alto contraste (*enmascaramiento*) de las imágenes de campo claro (panel inf. izq.) y fluorescencia (panel inf. der.), donde las áreas blancas corresponden al área total de células y al área de células transfectadas, respectivamente.

#### **II.4. Efecto de la sustitución del aminoácido 58 sobre la producción y secreción de las vasoinhibinas recombinantes**

Las secuencias de vasoinhibinas recombinantes de 139 y 123 aminoácidos con C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup> se clonaron en el vector pcDNA3 bajo el promotor de CMV (Figura 1). El cDNA de PRL se clonó en el mismo vector y se utilizó como control positivo de producción y secreción. Estas construcciones se transfectaron transitoriamente en células HEK293T/17 y se comparó la cantidad de vasoinhibinas presentes en los lisados celulares y medios condicionados por Western blot. En la Figura 6 se muestra un Western blot representativo del lisado y del medio condicionado de las diferentes transfecciones.



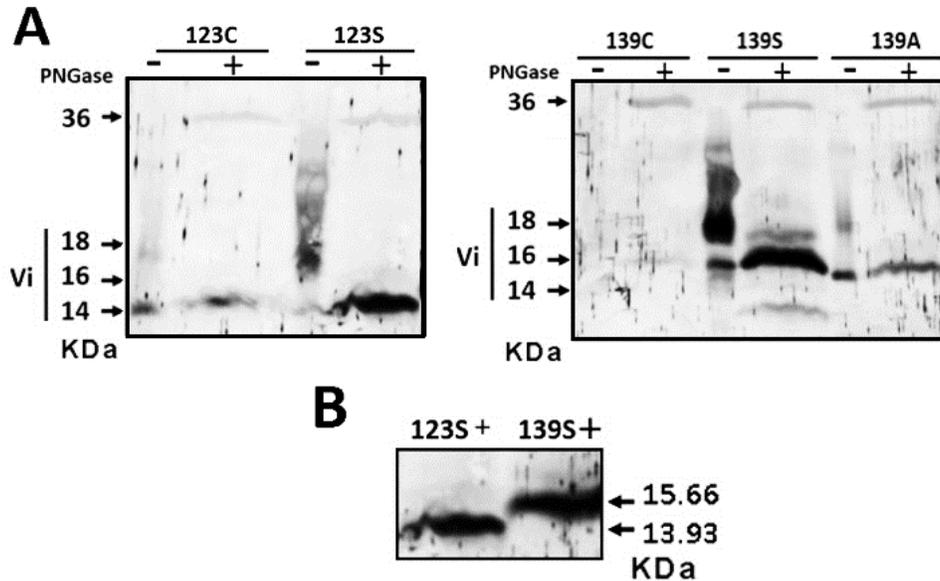
**Figura 6. La secreción de vasoinhibinas recombinantes se incrementa con la sustitución de C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup>, y la secreción es similar entre las vasoinhibinas de 139 aa que contienen C<sup>58</sup> y A<sup>58</sup>.** Western blot representativo del lisado celular y del medio condicionado de las células HEK293T/17 transfectadas con el cDNA de la PRL (carril 1), sin transfectar (carril 3), o transfectadas con el cDNA de las vasoinhibinas (Vi) de 139 aa (carriles 4, 5, 6) o de 123 aa (7, 8). Se incluye un estándar (Std) de Vi de 16KDa (carril 2). Como control de carga de los lisados celulares se reveló a la  $\beta$ -tubulina (panel superior). Los números a la izquierda denotan las posiciones de marcadores de peso molecular. Se cargaron

En los lisados de células transfectadas con el cDNA de la PRL se observa una banda inmunoreactiva con el tamaño esperado de 23 kDa. Los lisados de células transfectadas con los cDNA de vasoinhibinas de 139 aminoácidos presentaron bandas inmunorreactivas predominantes de 15 y 18 KDa, mientras que la transfección de las vasoinhibinas de 123 aminoácidos se asoció con proteínas inmunorreactivas predominantes de 14 y 17 aminoácidos (Figura 6). En los lisados celulares, se observa una reducción en la concentración de vasoinhibinas con S<sup>58</sup>, con respecto a las que contienen C<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>. En los medios condicionados, además de los tamaños mencionados, se observan bandas con una migración menor de 25 kDa para la PRL y menor de 18 kDa para las vasoinhibinas. Es de notar que el número de bandas de baja migración en el

medio es mayor para las vasoinhibinas con S<sup>58</sup>. Por otra parte, se puede apreciar que en estos medios condicionados la cantidad de vasoinhibinas con S<sup>58</sup> es notablemente mayor que la de las vasoinhibinas con C<sup>58</sup> o con A<sup>58</sup> en las vasoinhibinas de 139 aminoácidos. Es importante notar que al igual que para las vasoinhibinas de 139 aminoácidos, la vasoinhibina de 123 kDa con C<sup>58</sup> se encuentra más concentrada en los lisados celulares que la vasoinhibina con S<sup>58</sup>. Sin embargo, entre dichas vasoinhibinas no se observa una diferencia tan notable en el medio condicionado como la que se observa con las vasoinhibinas de 139 kDa.

## **II.5. La S<sup>58</sup> aumenta la glicosilación de las vasoinhibinas recombinantes**

Con el objetivo de determinar si las vasoinhibinas de mayor tamaño corresponden a isoformas glicosiladas de estos péptidos, los medios condicionados se sometieron a una N-deglicosilación mediante incubación con la enzima deglicosilasa (PNGase-F) y se analizaron mediante Western blot. En la Figura 7A se corrobora que, en ausencia de deglicosilación, la vasoinhibina de 123 con C<sup>58</sup> más abundante en el medio condicionado tiene el peso molecular de 14 kDa, mientras que la que contiene S<sup>58</sup> está principalmente conformada por isoformas con un peso molecular mayor a 16 kDa. Algo similar ocurre para las vasoinhibinas de 139 aa donde el tamaño esperado es de 15.6 kDa. En todos los casos, el tratamiento con la deglicosilasa elimina las bandas de peso molecular mayor al esperado indicando que todas ellas corresponden a formas glicosiladas de vasoinhibinas y, por ende, que la sustitución de la C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> favorece la glicosilación de estas proteínas (Figura 7A). Asimismo, cabe señalar que después de la deglicosilación, las bandas detectadas confirman el tamaño esperado en base a su composición aminoacídica, ~13.93 kDa para las vasoinhibinas de 123 y ~15.66 kDa para las vasoinhibinas de 139 (Figura 7B).



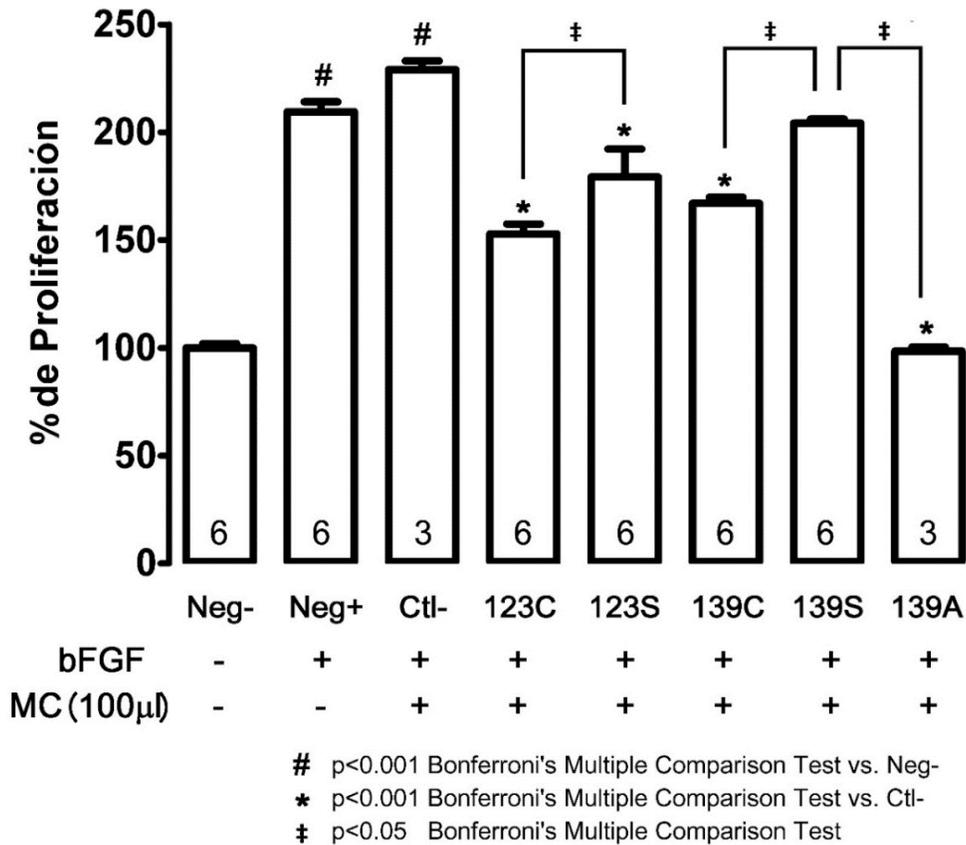
**Figura 7. Las vasoinhibinas con S<sup>58</sup> son glicosiladas más eficientemente que aquellas con C<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>.** Deglicosilación con PNGase-F de 9µl medios condicionados de las células HEK293T/17 transfectadas con las diferentes construcciones de vasoinhibinas recombinantes. A. El primer gel muestra las vasoinhibinas de 123 aminoácidos con C<sup>58</sup> o S<sup>58</sup> sin (-) o con (+) la incubación con la enzima PNGase. El segundo gel muestra las vasoinhibinas de 139 aminoácidos con C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>. Sin y con la incubación con la enzima deglicosilasa. B. Diferencia de migración de las vasoinhibinas 123S y 139S deglicosiladas.

## II.6. La bioactividad de las vasoinhibinas recombinantes disminuye con el cambio de C a S en la posición 58

Se analizó la actividad anti-angiogénica de las vasoinhibinas secretadas el medio condicionado de las células HEK293T/17 mediante el ensayo de proliferación de células BUVEC estimuladas con el factor pro-angiogénico bFGF. Como control negativo se utilizó medio condicionado de HEK293T/17 sin transfectar (CTL-).

En la Figura 8 se puede observar que el medio condicionado de las células HEK293T/17 sin transfectar (CTL-) estimula la proliferación de las células endoteliales en comparación al bFGF solo. Dada esta diferencia, tomamos al CTL- como referencia para comparar los efectos de los medios condicionados de las células transfectadas con las distintas vasoinhibinas. Encontramos que los medios que contienen las vasoinhibinas de 123 aa con C<sup>58</sup> (123C) y S<sup>58</sup> (123S) y las de 139 aa con C<sup>58</sup> (139C) y A<sup>58</sup> (139A) inhiben

significativamente la proliferación de las células BUVEC, mientras que el medio con la vasoinhibina de 139 aa con S<sup>58</sup> (139S) no tiene efecto. Cabe mencionar que la vasoinhibina de 123 con S<sup>58</sup> muestra un efecto significativamente menor que su contraparte con C<sup>58</sup>.



**Figura 8. La mutación S<sup>58</sup> reduce la actividad antiangiogénica de las vasoinhibinas recombinantes presentes en el medio condicionado.** Proliferación de células BUVEC estimuladas con bFGF y tratadas con el medio condicionado (MC) de células HEK293T/17 transfectadas con las diferentes construcciones de vasoinhibinas. Los valores son promedio  $\pm$  SEM. El número de experimentos independientes se encuentra indicado adentro de cada columna. Neg-, sin MC; Neg+, bFGF sin MC; Ctl-, MC de células HEK293T/17 sin transfectar; 123C, MC de células HEK293T/17 transfectadas con el cDNA de la vasoinhibina 123C<sup>58</sup>; 123S, MC de células HEK293T/17 transfectadas con el cDNA de la vasoinhibina 123S<sup>58</sup>; 139C, MC de células HEK293T/17 transfectadas con el cDNA de la vasoinhibina 139C<sup>58</sup>; 139S, MC de células HEK293T/17 transfectadas con el cDNA de la vasoinhibina 139S<sup>58</sup>; 139A, MC de células HEK293T/17 transfectadas con el cDNA de la vasoinhibina 139A<sup>58</sup>. Señalar que el Ctl- es significativamente mayor que el Neg+.

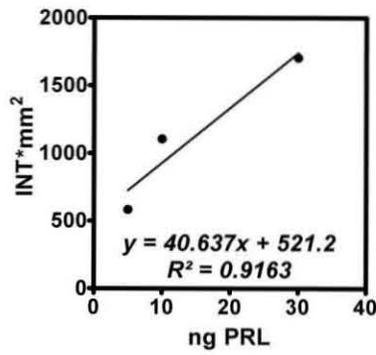
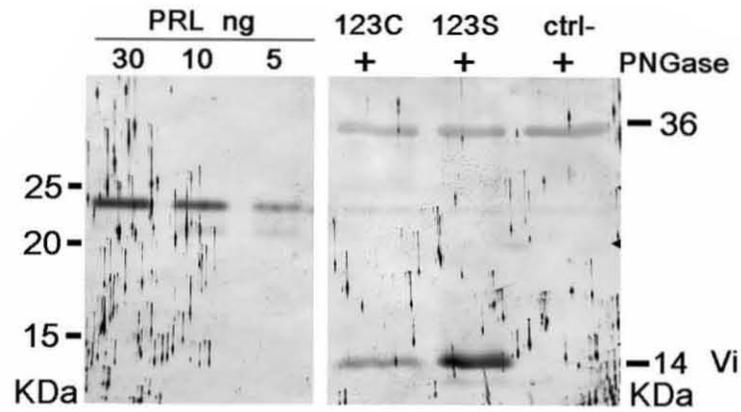
Para comparar la potencia biológica de las vasoinhibinas de 123 aminoácidos, estimamos su concentración en el medio condicionado mediante Western blot y densitometría. Para esto, deglicosilamos los medios condicionados de manera que se pudiera cuantificar fácilmente el total de la vasoinhibina producida y estimamos los  $\mu\text{g}$  de proteína correspondientes a su valor densitométrico tomando como referencia una curva estándar de PRL elaborada con concentraciones conocidas de PRL en el mismo blot (Figura 9A). La vasoinhibina 123 aminoácidos con  $\text{C}^{58}$  (123C) tuvo una concentración estimada de  $1.05 \mu\text{g/ml}$  en el MC y la de 123 con  $\text{S}^{58}$  (123S) de  $2.40 \mu\text{g/ml}$ , es decir una concentración 2.3 veces mayor que la que contiene  $\text{C}^{58}$ . Aun así, la actividad antiangiogénica de la vasoinhibina de 123 con  $\text{C}^{58}$  fue significativamente mayor que la de su contraparte con  $\text{S}^{58}$  (Figura 8). Esto indica que la sustitución de la  $\text{C}^{58}$  por la  $\text{S}^{58}$  interfiere con la actividad antiangiogénica de las vasoinhibinas de 123 aminoácidos probablemente debido a que le confiere un mayor grado de glicosilación.

Para caracterizar mejor estos hallazgos, evaluamos el efecto dosis respuesta de las dos vasoinhibinas de 123 aminoácidos sobre la proliferación de las células endoteliales en cultivo (Figura 9B). Encontramos que los medios condicionados conteniendo la vasoinhibinas con  $\text{C}^{58}$  y  $\text{S}^{58}$  inhiben la proliferación endotelial en forma dependiente de la dosis (volumen de medio condicionado). Además, observamos que la vasoinhibina con  $\text{C}^{58}$  es más potente que su contraparte con  $\text{S}^{58}$ . Esto es claro cuando se emplea el menor volumen de medio condicionado ( $5 \mu\text{l}$ ) de la vasoinhibina con  $\text{S}^{58}$ , la cual no tiene diferencia contra el control. Incluso con los volúmenes mayores ( $20$  y  $100 \mu\text{l}$ ), donde a pesar de que no hay diferencias significativas entre las vasoinhibinas de 123 aminoácidos con  $\text{C}^{58}$  y  $\text{S}^{58}$ , la vasoinhibina con  $\text{S}^{58}$  se encuentra 2.3 veces más concentrada que la que contiene la cisteína endógena.

Posteriormente, se buscó cuantificar la concentración de vasoinhibinas de 139 aminoácidos en medios condicionados deglicosilados, sin embargo este procedimiento diluye la muestra y no fue posible detectar a las vasoinhibinas con  $\text{C}^{58}$  (139C) y  $\text{A}^{58}$  (139A) en el mismo Western blot. La vasoinhibina con  $\text{S}^{58}$  (139S) se encuentra más concentrada y se le pudo estimar una concentración de  $36.9 \mu\text{g/ml}$  (Figura 10A). A pesar de estas

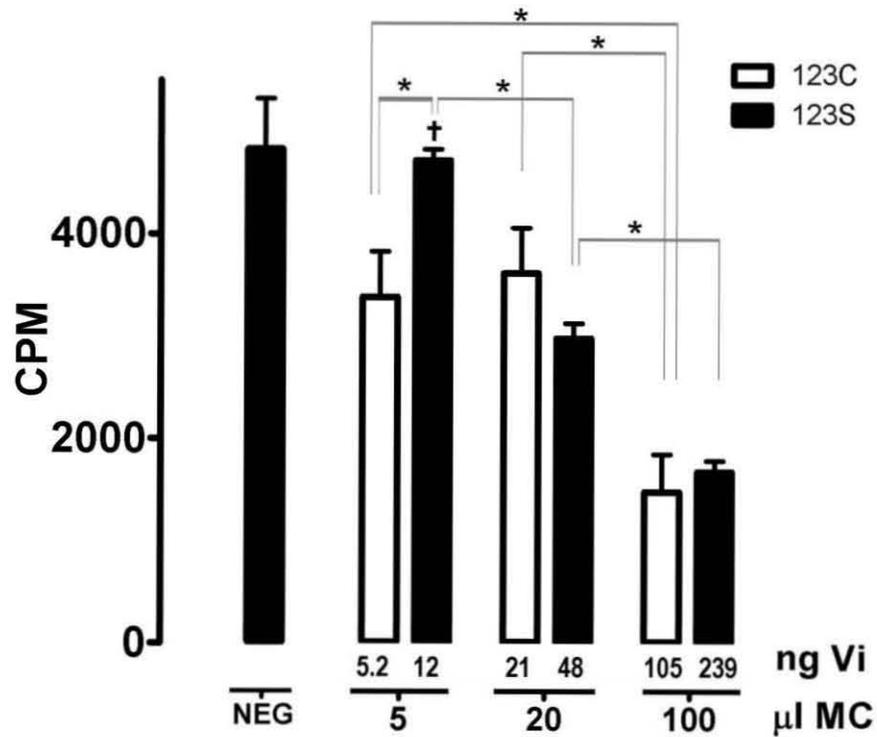
limitaciones, fue posible observar el comportamiento dosis-respuesta de los medios condicionados conteniendo las tres vaso inhibinas sobre la proliferación endotelial (Figura 10B) y resulta muy evidente que la vaso inhibina de 139 aminoácidos con S<sup>58</sup>, que es la más concentrada, tiene menor actividad antiangiogénica en las tres dosis utilizadas con respecto a los medios condicionados conteniendo las vaso inhibinas con C<sup>58</sup> y A<sup>58</sup>.

**A**



	INT*mm <sup>2</sup>	ng prot /9μl	μg de Vi /ml
5	582.6	5	-
10	1104.9	10	-
30	1704.8	30	-
123C	904.9	9.4	1.05
123S	1397.4	21.6	2.40

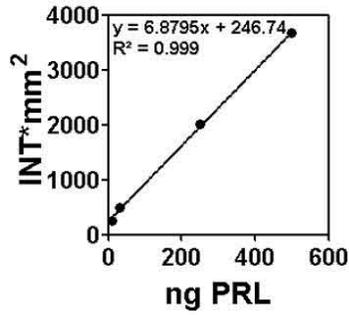
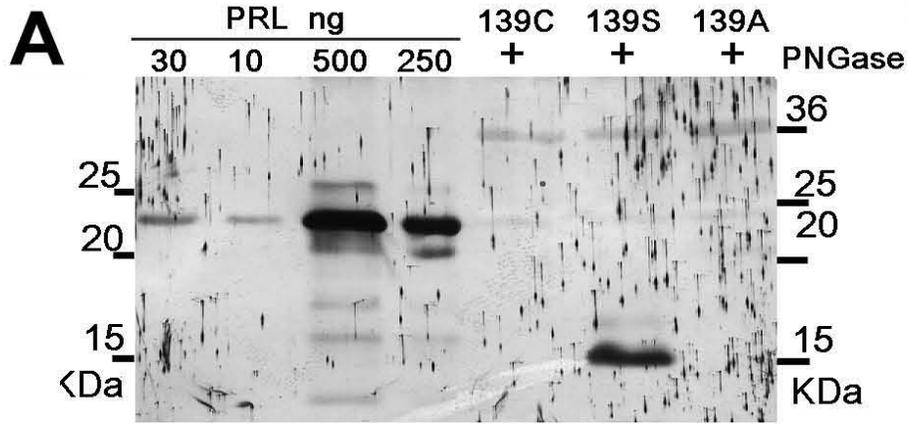
**B**



† No significant difference with NEG *Bonferroni's MTC*  $p < 0.05$

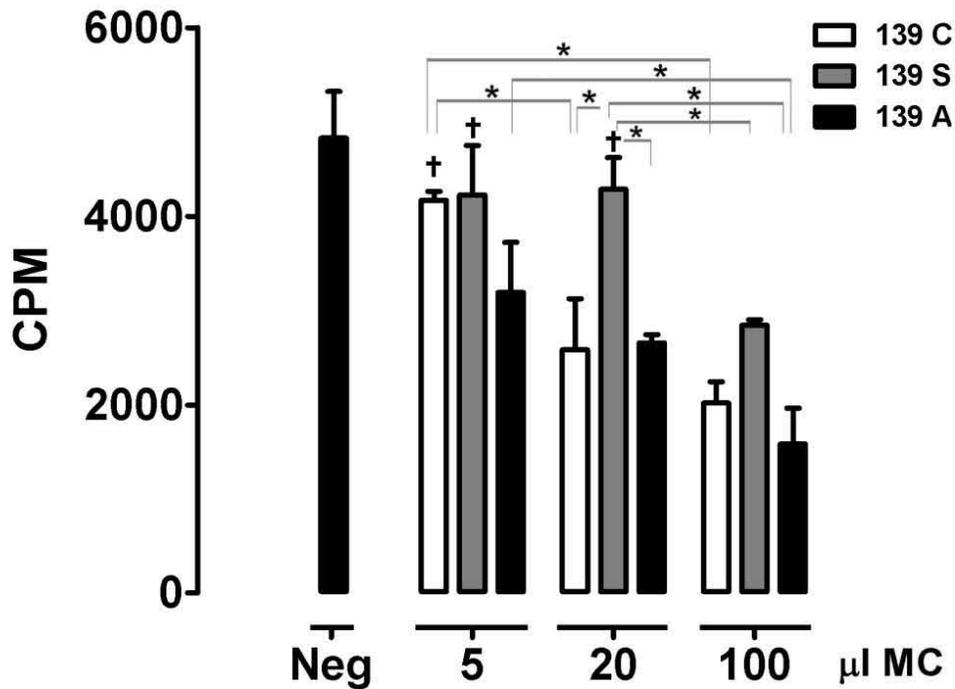
\* Significant difference *Bonferroni's MTC*  $p < 0.05$

**Figura 9. La S<sup>58</sup> disminuye la potencia antiangiogénica de las vasoinhibinas recombinantes de 123 aminoácidos.** (A) Cuantificación por densitometría de vasoinhibinas recombinantes de 123 aminoácidos con C<sup>58</sup> (123C) o con S<sup>58</sup> (123S) presentes en el medio condicionado (MC) de células HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos correspondientes. Los MC fueron deglicosilados mediante su incubación con N-deglicosilasa-F (PNGase) y los valores densitométricos de la banda inmunorreactiva de 14 kDa (tamaño esperado del producto de la traducción del cDNA de la vasoinhibina de 123 aminoácidos) presente en 9 µl del MC fueron convertidos a µg utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas de PRL procesada en el mismo blot. La INT (*intensity units*)\*mm<sup>2</sup> (suma de las intensidades de pixeles dentro de un área multiplicado por el área del pixel) guarda una correlación directa con las concentraciones de PRL y la interpolación en la curva estándar de las INT\*mm<sup>2</sup> de las vasoinhibinas definió concentraciones de 1.05 y de 2.4 µg/ml para la de 123 aa con C<sup>58</sup> y S<sup>58</sup>, respectivamente. (B) Efecto dosis-respuesta del MC conteniendo vasoinhibinas con C<sup>58</sup> o S<sup>58</sup> sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo. NEG control basal de proliferación con bFGF. Las CPM indican la cantidad de [<sup>3</sup>H] timidina incorporada al DNA celular. Se indican los µl del MC y su correspondiente cantidad de vasoinhibinas (ng) estimada como se indica en (A). Los valores son promedio ± SEM de 3 experimentos independientes.



	INT*mm <sup>2</sup>	ng prot /9μl	μg de Vi /ml
10	256.0	10	-
30	494.3	30	-
250	2005.9	250	-
500	3665.5771	500	-
139C	ND	-	-
139S	2532.8	332.3	36.92
139A	ND	-	-

**B**



† No significant difference with NEG *Bonferroni's MTC*  $p < 0.05$   
 \* Significant difference *Bonferroni's MTC*  $p < 0.05$

**Figura 10. La S<sup>58</sup> disminuye la potencia antiangiogénica de las vasoinhibinas recombinantes de 139 aminoácidos.** (A) Cuantificación por densitometría de las vasoinhibinas recombinantes de 139 aminoácidos con C<sup>58</sup> (139C), con S<sup>58</sup> (139S) o con A<sup>58</sup> (139A) presentes en el medio condicionado (MC) de células HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos correspondientes. Los MC fueron deglicosilados mediante su incubación con N-declicosilasa-F (PNGase) y los valores densitométricos de la banda inmunorreactiva de 16 kDa (tamaño esperado del producto de la traducción del cDNA de la vasoinhibina de 139 aminoácidos) presente en 9  $\mu$ l del MC fueron convertidos a  $\mu$ g utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas de PRL procesada en el mismo blot. La INT (*intensity units*)\*mm<sup>2</sup> (suma de las intensidades de pixeles dentro de un área multiplicado por el área del pixel) guarda una correlación directa con las concentraciones de PRL y la interpolación en la curva estándar de los INT\*mm<sup>2</sup> de la vasoinhibina S<sup>58</sup> definió una concentración de 36.9  $\mu$ g/ml. Las vasoinhibinas con C<sup>58</sup> y A<sup>58</sup> no fueron detectadas. (B) Efecto dosis-respuesta del MC conteniendo vasoinhibinas con C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> y A<sup>58</sup> sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo. NEG control basal de proliferación con bFGF. Las CPM indican la cantidad de [<sup>3</sup>H] timidina incorporada al DNA celular. Los valores son promedio  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes.

## VIII. Discusión

Actualmente existe un gran interés por el estudio de factores que regulan la angiogénesis, y en particular por aquellos que la inhiben. Entre estos últimos, las vasoinhibinas derivadas de la PRL tienen potencial terapéutico en enfermedades que involucran una vascularización excesiva como el cáncer, la artritis reumatoide y la retinopatía diabética (Clapp et al., 2006; Clapp et al., 2009). Si bien existen evidencias claras de sus propiedades antiangiogénicas, se desconocen las posibles implicaciones funcionales de la diversidad estructural de las vasoinhibinas, lo cual es fundamental para el estudio de las acciones fisiológicas de estos péptidos y para su desarrollo como agentes terapéuticos.

La necesidad de obtener vasoinhibinas en grandes cantidades derivó en la generación recombinante de estos péptidos. Las vasoinhibinas recombinantes usadas en diversos trabajos, han mostrado tener actividad antiangiogénica (Clapp et al., 1993; Galfione et al., 2003; Struman et al., 1999; Tabruyn et al., 2003), pero no existe un estudio comparativo que muestre posibles diferencias en la secreción y bioactividad de las diferentes vasoinhibinas generadas. Para esta aproximación es importante tener en cuenta que la transcripción y traducción celular de estos péptidos es anormal ya que en la naturaleza las vasoinhibinas solamente se producen a través de la proteólisis enzimática de hormonas precursoras. Por lo tanto, es probable que durante la producción recombinante, el procesamiento postraduccional y plegado de las vasoinhibinas, existan alteraciones estructurales capaces de interferir con su bioactividad y con su secreción (Kopito, 2000). Al respecto, también hay que considerar que los péptidos recombinantes no tienen necesariamente el tamaño de las vasoinhibinas endógenas pues fueron diseñados antes que se conocieran las proteasas responsables y sus sitios de corte en la molécula de PRL. Adicional a esto, la cisteína en la posición 58 (C<sup>58</sup>) se cambia comúnmente a serina (S<sup>58</sup>) con el fin de evitar la formación de puentes disulfuro anómalos y agregados moleculares que resulten en una actividad antiangiogénica inestable (Clapp et al., 1993). No obstante, el hecho de que las proteínas endógenas conservan la C<sup>58</sup> y que los lotes con la mutación a serina siguen presentando variaciones en su actividad ha

dejado clara la necesidad de estudiar mejor la relación estructura- función de las vasoinhibinas recombinantes.

Con respecto a la generación de vasoinhibinas bajo condiciones fisiológicas, cabe señalar que se desconoce dónde ocurre la proteólisis de la PRL hacia vasoinhibinas en el entorno tisular. Se ha propuesto que la catepsina D procesa a la PRL en los gránulos de secreción de las células hipofisarias productoras de esta hormona (lactotropos). Se mostró que la catepsina D está presente en el 25% de estos gránulos (Cruz-Soto et al., 2009) y se conoce que el pH en el interior de los mismos es ácido (pH 5.5) (Lorenson et al., 1984) y, por ende, corresponde al requerido para la acción de la catepsina D (Liaudet-Coopman et al., 2006). También se ha propuesto que las metaloproteasas de matriz que actúan a un pH neutro pueden procesar a la PRL en el espacio extracelular de sus células blanco (Macotela et al., 2006). Una gran interrogante de particular importancia para esta tesis se refiere a si, bajo condiciones fisiológicas, las vasoinhibinas mantienen o no la C<sup>58</sup> reducida o si ésta se oxida formando puentes disulfuro intra- e inter-moleculares. Al respecto, se ha mostrado que la PRL se empaqueta en los gránulos de secreción de los lactotropos formando agregados por puentes disulfuro y que dichos gránulos de secreción contienen una reductasa capaz de reducir los agregados a monómeros de PRL durante el proceso de exocitosis cuando el pH más alto del medio extracelular favorece la acción de estas enzimas (Lorenson et al., 1984). Por otra parte, se conoce que en el medio extracelular las metaloproteasas de matriz actúan en conjunto con reductasas para generar factores antiangiogénicos que derivan de otras proteínas precursoras, como es la angiostatina (Stathakis et al., 1999). Por lo tanto, es posible que condiciones reductoras en el ambiente celular donde se generan las vasoinhibinas favorezcan el estado reducido de la C<sup>58</sup>.

En este estudio se compararon por primera vez bajo las mismas condiciones a las vasoinhibinas recombinantes de 123 y 139 aminoácidos y se analizaron posibles consecuencias funcionales de la mutación de la C<sup>58</sup>. El objetivo de este estudio fue determinar cuál es la vasoinhibina con mayor secreción y actividad antiangiogénica. Todo esto con el fin a mediano plazo de llevar a cabo estudios *in vivo* utilizando vectores virales

capaces de transducir a la vasoinhibina de mayor potencial en modelos experimentales de padecimientos angiogénico-dependientes.

Nuestro trabajo demostró que la sustitución de la C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> aumenta la secreción de las vasoinhibinas recombinantes de 123 y 139 aminoácidos (Figura 6). Así, en los medios condicionados se observó una mayor proporción de vasoinhibinas con S<sup>58</sup> que las que contienen C<sup>58</sup> o A<sup>58</sup> y esta diferencia se asoció con su menor concentración en los lisados celulares con respecto a la de las otras dos vasoinhibinas. Queda por determinar si la cantidad total de las vasoinhibinas producidas se altera de acuerdo a las diferentes modificaciones introducidas en la molécula. Estudios en proceso están determinando la concentración total de dichas moléculas después de su deglicosilación tanto en el medio como en los lisados celulares. También es importante cuantificar el mRNA de las distintas construcciones de vasoinhibinas para confirmar que no existen cambios a nivel transcripcional. Con estas evidencias corroboramos los hallazgos previos (Cruces-Solis, 2011) que indicaban que las vasoinhibinas con S<sup>58</sup> se secretan con mayor eficiencia que aquellas que contienen C<sup>58</sup>.

Si bien la mayor secreción de las vasoinhibinas recombinantes con S<sup>58</sup> representa una ventaja para el estudio de sus efectos, las observaciones previas (Cruces-Solis, 2011) habían mostrado que las vasoinhibinas con S<sup>58</sup> tienen una bioactividad menor que las que contienen la C<sup>58</sup>. Nuestro trabajo confirmó estas observaciones al mostrar que los medios condicionados que contenían vasoinhibinas con S<sup>58</sup> tenían menor efecto inhibitorio sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo en relación a las vasoinhibinas con C<sup>58</sup>. Esta diferencia es aún más marcada cuando se considera que la vasoinhibina de 123 aminoácidos con S<sup>58</sup> se encuentran 2.3 veces más concentrada que la silvestre (C<sup>58</sup>). Incluso la vasoinhibina de 139 aminoácidos con S<sup>58</sup> con una concentración en el medio condicionado de por lo menos 4 veces más que la vasoinhibina silvestre, no mostró efectos inhibitorios sobre la proliferación endotelial. Así, a pesar de que las vasoinhibinas con la S<sup>58</sup> estaban en concentraciones más altas que las de las vasoinhibinas con C<sup>58</sup>, se requirieron volúmenes mayores de los medios condicionados que las contenían para lograr una inhibición similar a la obtenida con medios

condicionados conteniendo a las vasoinhibinas con C<sup>58</sup>. Estos resultados indican la que la S<sup>58</sup> interfiere en la bioactividad de las vasoinhibinas.

Previamente en el laboratorio se demostró que al mutar la C<sup>58</sup> a serina se incorporaba un sitio de glicosilación a la molécula y se especuló que probablemente una mayor glicosilación sería la causante de la pérdida de bioactividad. Nosotros corroboramos que existía una mayor glicosilación en las vasoinhibinas con S<sup>58</sup> debido a que estas migraban con pesos moleculares aparentemente mayores. La menor migración de estas vasoinhibinas no podía atribuirse a su agregación a través de puentes disulfuro intermoleculares, dado que las proteínas del medio condicionado se analizaron en Western blots bajo condiciones reductoras. Por otra parte, el tratamiento del medio condicionado con la enzima deglicosilasa hizo que las vasoinhibinas migraran con el peso molecular esperado (14 kDa para la vasoinhibina de 123 aminoácidos y 15.6 kDa para la de 139 aminoácidos), con lo cual confirmó que la mutación a S<sup>58</sup> se correlaciona con una mayor glicosilación de la molécula.

La mayor glicosilación de las vasoinhibinas con la S<sup>58</sup> parece ser potenciada en la línea celular HEK293, ya que se sabe que estas células poseen una mayor capacidad de glicosilación (Loignon et al., 2008). Piwnica y colaboradores en el 2004 generaron vasoinhibinas recombinantes de 132, 147 y 150 aminoácidos en células COS-7 y todas ellas inhibieron la proliferación de células endoteliales en cultivo. La actividad biológica de dichas vasoinhibinas pudo verse favorecida por su expresión en células COS-7 que se conoce tiene menor capacidad de glicosilación que las células HEK293 (Piwnica et al., 2004). Sin embargo, Kim y colaboradores mediante transducción por adenovirus generaron vasoinhibinas de 123 aminoácidos con C<sup>58</sup> o con S<sup>58</sup> en las líneas de células de cáncer de próstata DU145 y PC3. La mutación a serina también se asoció con la presencia de isoformas de mayor peso molecular, si bien en menor proporción que las detectadas en nuestro trabajo (Kim et al., 2003), dichas isoformas mostraron una mayor secreción al medio que podría atribuirse a una mayor glicosilación. Pese a esto, las vasoinhibinas con C<sup>58</sup> o S<sup>58</sup> no mostraron diferencias en la inhibición de la proliferación de células endoteliales en cultivo. Aunque es posible que la diferente bioactividad entre dichas vasoinhibinas demostrada por nosotros pudiera deberse a un patrón de

glicosilación diferente en las células HEK293 con respecto a las células COS-7, los estudios mencionados dejan abiertas interrogantes sobre la implicación funcional de la glicosilación de las vaso inhibinas.

Por otra parte, se sabe que la glicosilación es una modificación post-traduccional que favorece la secreción de las proteínas debido a que previene la formación de agregados proteicos (Sagt et al., 2000). Por lo tanto, la mayor glicosilación debida a la S<sup>58</sup> podría explicar nuestra observación de que las vaso inhibinas con S<sup>58</sup> se secretan al medio condicionado en mayor proporción. Sin embargo, la mayor secreción de las vaso inhibinas con S<sup>58</sup> no parece representar una ventaja para su generación recombinante dado que su mayor glicosilación parece interferir con la bioactividad de estos péptidos. Nuevos experimentos deben investigar si la transducción de cultivos primarios de células normales, por ejemplo, células endoteliales, con las vaso inhibinas conteniendo a la S<sup>58</sup> también resultan en una mayor secreción y con una glicosilación incrementada capaz de interferir con sus propiedades biológicas. Estos estudios se facilitarán mediante la introducción del cDNA de dichas vaso inhibinas en vectores virales (por ejemplo lentivirus) que transducen eficientemente cualquier tipo celular.

De acuerdo a las consideraciones anteriores aún no podemos descartar el uso de las vaso inhibinas que contengan S<sup>58</sup> como opción para su producción recombinante. Sin embargo, dadas las limitaciones asociadas a la S<sup>58</sup> y la pertinencia de intentar bloquear la formación de puentes disulfuro anómalos, procedimos a bloquear la cisteína endógena con alanina, un aminoácido no polar y estéricamente pequeño, que al sustituir a la C<sup>58</sup> se evita la formación de puentes disulfuro anormales, la excesiva glicosilación y modificaciones a la estructura secundaria de la proteína. Esta vaso inhibina mostró un patrón de producción y secreción similar al de la vaso inhibina con la C<sup>58</sup>. Queda pendiente determinar con precisión su potencia biológica. Nuestro estudio preliminar mostró que incluso cuando la vaso inhibina de 139 aminoácidos con la A<sup>58</sup> era indetectable en el medio condicionado, dicho medio mostró propiedades antiangiogénicas. El tratamiento con tan sólo 5 µl de medio condicionado tuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación endotelial. Este mismo volumen de los medios condicionados conteniendo a las vaso inhibinas de 139 aminoácidos con C<sup>58</sup> o con S<sup>58</sup> no modificó la proliferación endotelial

con respecto al control negativo incubado con el medio condicionado de células no transfectadas. Falta evaluar la sustitución de la C<sup>58</sup> por A<sup>58</sup> en la vasoinhibina de 123 aminoácidos. Debido a una mutación introducida a la secuencia en el proceso de clonaje no se logró obtener la construcción de esta vasoinhibina. No obstante tanto la vasoinhibina de 123 como la de 139 aminoácidos con C<sup>58</sup> muestran secreciones y actividades biológicas comparables por lo que se espera que la incorporación de la alanina funcione en forma equivalente para ambas vasoinhibinas.

En resumen, encontramos que isoformas de vasoinhibinas de 123 y 139 aminoácidos conteniendo C<sup>58</sup>, S<sup>58</sup> o A<sup>58</sup>, difieren en su secreción, glicosilación y bioactividad cuando se producen en células HEK293T/17. Cabe reiterar que si bien estas células presentan ventajas debidas a su alta capacidad de transfección presentan como limitación su habilidad incrementada para glicosilar a las proteínas recombinantes (Hershkovitz et al., 2008). Sin embargo, estas células nos permitieron evidenciar que la mutación puntual a S<sup>58</sup> en la secuencia primaria de las vasoinhibinas resulta en su mayor glicosilación y secreción. También mostramos que las vasoinhibinas con C<sup>58</sup> o A<sup>58</sup> presentan patrones similares de secreción y glicosilación. Queda por determinar si la sustitución por alanina representa ventajas en bioactividad. Nuestros hallazgos deberán ser corroborados a través de la transfección de cultivos primarios de células similares a las que serán transducidas *in vivo*. Para esto será de gran ayuda contar con vectores virales conteniendo las diferentes construcciones de vasoinhibinas que permitan transducir de manera eficiente cualquier tipo celular.

## **IX. Conclusiones**

- IV.1.** La sustitución de la C<sup>58</sup> por S<sup>58</sup> incrementa la secreción y glicosilación de vasoinhibinas e interfiere con las propiedades antiangiogénicas de estos péptidos.
- IV.2.** La sustitución por A<sup>58</sup> parece no alterar el patrón de glicosilación normal de una vasoinhibina de 139 aminoácidos en condiciones reductoras y podría incrementar su potencia antiangiogénica.

## **X. Bibliografía**

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

Bentzien, F., Struman, I., Martini, J.F., Martial, J., and Weiner, R. (2001). Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res* 61, 7356-7362.

Cajero-Juarez, M., Avila, B., Ochoa, A., Garrido-Guerrero, E., Varela-Echavarria, A., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2002). Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol* 81, 1-8.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M.C., and Martinez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17, 301-307.

Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delure, F., and Weiner, R.I. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133, 1292-1299.

Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M.C., and Martinez De La Escalera, G. (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89, 1177-1215.

Cross, D., and Burmester, J.K. (2006). Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res* 4, 218-227.

Cross, M.J., and Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22, 201-207.

Cruces-Solis, H. (2011). Estudio sobre la relación estructura-función de las vasoinhibinas recombinantes. In *Neurobiología celular y molecular* (Universidad Nacional Autónoma de México).

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

D'Angelo, G., Martini, J.F., Iiri, T., Fantl, W.J., Martial, J., and Weiner, R.I. (1999). 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol* 13, 692-704.

Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A.M., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., Barrios, F.A., Berger, P., Martinez de la Escalera, G., and Clapp, C. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2498-2505.

Ferrara, N., Clapp, C., and Weiner, R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129, 896-900.

Galfione, M., Luo, W., Kim, J., Hawke, D., Kobayashi, R., Clapp, C., Yu-Lee, L.Y., and Lin, S.H. (2003). Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr Purif* 28, 252-258.

Garcia, C., Aranda, J., Arnold, E., Thebault, S., Macotela, Y., Lopez-Casillas, F., Mendoza, V., Quiroz-Mercado, H., Hernandez-Montiel, H.L., Lin, S.H., *et al.* (2008).

Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 118, 2291-2300.

Ge, G., Fernandez, C.A., Moses, M.A., and Greenspan, D.S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10010-10015.

Gonzalez, C., Corbacho, A.M., Eiserich, J.P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Munoz, M., Rubio, R., Lin, S.H., *et al.* (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 145, 5714-5722.

HersHKovitz, O., Jarahian, M., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Landau, G., Jivov, S., Tekoah, Y., Glicklis, R., Gallagher, J.T., Hoffmann, S.C., *et al.* (2008). Altered glycosylation of recombinant NKp30 hampers binding to heparan sulfate: a lesson for the use of recombinant immunoreceptors as an immunological tool. *Glycobiology* 18, 28-41.

Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., Forster, O., Quint, A., Landmesser, U., Doerries, C., *et al.* (2007). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128, 589-600.

Kim, J., Luo, W., Chen, D.T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L.Y., and Lin, S.H. (2003). Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res* 63, 386-393.

Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10, 524-530.

Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J., and Weiner, R.I. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 139, 3696-3703.

Lee, S.H., Kunz, J., Lin, S.H., and Yu-Lee, L.Y. (2007). 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res* 67, 11045-11053.

Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D., Garcia, M., Glondu-Lassis, M., Laurent-Matha, V., Prebois, C., Rochefort, H., and Vignon, F. (2006). Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* 237, 167-179.

Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., Afkhamizarreh, F., and Durocher, Y. (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* 8, 65.

Lorenson, M.Y., Miska, S.P., and Jacobs, L.S. (1984). Molecular mechanism of prolactin release from pituitary granules. In *Prolactin secretion: a multidisciplinary approach* M. Flavio, and V.-R. C.M., eds. (Orlando, FL: Academic Press ), pp. 141-160.

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

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

Nguyen, N.Q., Castermans, K., Berndt, S., Herkenne, S., Tabruyn, S.P., Blacher, S., Lion, M., Noel, A., Martial, J.A., and Struman, I. (2011). The antiangiogenic 16K prolactin impairs functional tumor neovascularization by inhibiting vessel maturation. *PLoS One* 6, e27318.

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

Ramirez, M., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., Jeziorski, M.C., Arnold, E., Diaz-Lezama, N., Martinez de la Escalera, G., Colosi, P., and Clapp, C. (2011). Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 8944-8950.

Sagt, C.M., Kleizen, B., Verwaal, R., de Jong, M.D., Muller, W.H., Smits, A., Visser, C., Boonstra, J., Verkleij, A.J., and Verrips, C.T. (2000). Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts. *Appl Environ Microbiol* 66, 4940-4944.

Stathakis, P., Lay, A.J., Fitzgerald, M., Schlieker, C., Matthias, L.J., and Hogg, P.J. (1999). Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin. *J Biol Chem* 274, 8910-8916.

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

Tabruyn, S.P., Nguyen, N.Q., Cornet, A.M., Martial, J.A., and Struman, I. (2005). The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases. *Mol Endocrinol* 19, 1932-1942.

Tabruyn, S.P., Sorlet, C.M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R.I., Martial, J.A., and Struman, I. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 17, 1815-1823.

Thomas, P., and Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51, 187-200.

## VI. Lista de Abreviaturas

<sup>3</sup> H	Tritio
123C	Vasoinhibina de 123 aa con cisteína en la posición 58
123S	Vasoinhibina de 123 aa con serina en la posición 58
139C	Vasoinhibina de 139 aa con cisteína en la posición 58
139S	Vasoinhibina de 139 aa con serina en la posición 58
139A	Vasoinhibina de 139 aa con alanina en la posición 58
A <sup>58</sup>	Alanina en la posición 58
aa	aminoácidos
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BMP-1	Proteasa morfogenética del hueso
BUVEC	Células endoteliales venosas umbilicales bovinas
C <sup>58</sup>	Cisteína en la posición 58
CMV	Promotor del citomegalovirus
COS-7	Célula CV-1 (riñón de mono) tipo fibroblasto, transformada
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
eGFP	Proteína verde fluorescente optimizada
GH	Hormona de crecimiento
HEK293T/17	Células de Epitelio Renal humano inmortalizadas y altamente transfectables
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
MMPs	Metaloproteasas de matriz
N <sup>56</sup>	asparagina posición 56
NF $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
O/N	Toda la noche
PBST	Buffer de Fosfatos con Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRL	Prolactina
RIPA	Solución de ensayo de radio-inmunoprecipitación
S <sup>58</sup>	Serina en la posición 58
SDS-PAGE WB	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras

## XII. Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de los vectores usados .....	11
<b>Figura 2.</b> Diagrama de la Metodología Empleada .....	14
<b>Figura 3.</b> Predicción <i>in silico</i> de cambios en la estructura secundaria debido a la sustitución de la C <sup>58</sup> por S <sup>58</sup> o A <sup>58</sup> .....	18
<b>Figura 4.</b> El cambio de aminoácido en la posición 58 no modifica la estructura secundaria estimada <i>in silico</i> de las vasoinhibinas recombinantes.....	19
<b>Figura 5.</b> Eficiencia de transfección de las células HEK293T/17 con el método de fosfato de calcio y 4 µg/ml de DNA .....	20
<b>Figura 6.</b> La secreción de vasoinhibinas recombinantes se incrementa con el cambio de C <sup>58</sup> a S <sup>58</sup> , y el patrón es similar entre las vasoinhibinas que contienen C <sup>58</sup> y A <sup>58</sup> .....	21
<b>Figura 7.</b> Las vasoinhibinas con S58 son glicosiladas más eficientemente que aquellas con C <sup>58</sup> o A <sup>58</sup> .....	23
<b>Figura 8.</b> La mutación S <sup>58</sup> reduce la actividad de las vasoinhibinas recombinantes .....	24
<b>Figura 9.</b> La mutación de C <sup>58</sup> por S <sup>58</sup> disminuye la potencia inhibitoria de las vasoinhibinas recombinantes de 123 aminoácidos. ....	27
<b>Figura 10.</b> La S <sup>58</sup> disminuye la potencia inhibitoria de las vasoinhibinas recombinantes de 139 aminoácidos.. ....	29

