



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (Neurobiología)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM Campus Juriquilla

**“GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE VECTORES LENTIVIRALES QUE
TRANSDUCEN VASOINHIBINAS MENORES A 123 AMINOÁCIDOS”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA MIRIAM TOVAR HERNÁNDEZ

TUTOR

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

COMITÉ TUTOR

DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS
DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

JURIQUILLA, QUERÉTARO,
NOVIEMBRE 2018



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: María Miriam Tovar Hernández, cuyo título es: “Generación y caracterización funcional de vectores lentivirales que transducen vasoinhibinas menores a 123 aminoácidos” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias 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. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ-L

DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS

DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Maricela Luna Muñoz

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, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. y del M. en C. Juan Pablo Robles Alvarez.

RESUMEN

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados del procesamiento proteolítico de la hormona prolactina (PRL) y que inhiben la proliferación de vasos sanguíneos (angiogénesis). Se conoce la actividad antiangiogénica de los fragmentos de PRL iguales o mayores a 14 kDa, pero no de los menores a este tamaño. En este trabajo se produjeron los fragmentos de PRL recombinantes menores a 14 kDa comprendiendo los aminoácidos de 1-53, 1-79 y 1-111 además del fragmento 1-123 (14 kDa) y la PRL como controles, por transfección celular y transducción lentiviral con la intención de permitir el análisis de sus propiedades biológica. Se encontró que todos los fragmentos se transcriben y se traducen por células HEK293T/17, pero el fragmento de 1-53 aminoácidos no se detectó en el medio condicionado. La falta de secreción del fragmento de 1-53 aminoácidos pudo deberse a una baja traducción debido a las características de la estructura secundaria del mRNA o a su degradación. No obstante, la transducción lentiviral de células endoteliales podría ayudar a evaluar la bioactividad de estos fragmentos. De manera preliminar, encontramos que la expresión de una vasoinhibina de 1-79 aminoácidos disminuyó la tasa de proliferación de las células endoteliales (CPAE) en cultivo. En conclusión, es posible generar de manera recombinante fragmentos de PRL menores a 14 kDa. Asimismo, el uso de vectores lentivirales para expresar estas vasoinhibinas tanto *in vitro* como *in vivo* permitirá evaluar su función.

SUMMARY

Vasoinhibins are a family of peptides with a variety of molecular masses generated by the proteolytic cleavage of the hormone prolactin (PRL) that inhibit the proliferation of blood vessels (angiogenesis). Although the molecular weight of endogenous proteins range from 5 to 18 kDa, the vasoinhibin activity of PRL fragments smaller than 14 kDa is unknown. The aim of this study was to produce recombinant lentiviral vectors to transduce cells to produce and secrete PRL fragments comprising the first 53, 79, and 111 amino acids for the future evaluation of their vasoinhibin-like activity. The recombinant proteins of 79 and 111 amino acids and a conventional vasoinhibin (123 amino acids, 14 kDa) were efficiently produced and secreted by transient transfection of HEK293T/17 cells and by lentiviral transduction of HEK293T/17. In contrast, the 53 amino acids fragment was produced at a low yield and was not secreted. The low efficiency may relate to the secondary structure mRNA properties affecting translation or to degradation. Initial studies, showed that bovine pulmonary aortic endothelial cells (CPAE) expressing the 79 residue PRL secreted the protein and stopped proliferating seven days after transduction. In conclusion, the lentiviral vectors may be used *in vitro* and *in vivo* to study the vasoinhibin properties of smaller PRL fragments and will help dissect the structure-function relationship of vasoinhibins.

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo técnico del Lic. en Nutrición Fernando López Barrera y de la Dra. Xarubet Ruíz Herrera.

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 técnico recibido.

Al Ing. Ramón Martínez Olvera, al M. en C. Alberto Lara Rubalcava, al Ing. Omar González Hernández y al Lic. Anel Martínez Morales de la Unidad de Cómputo del Instituto de Neurobiología de la UNAM por el apoyo recibido.

A la Lic. Ma. De Lourdes Lara Ayala de la Unidad de Videoconferencia del Instituto de Neurobiología de la UNAM por el apoyo constante en las aulas de posgrado durante clases y presentaciones tutorales.

Al MVZ. José Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla León del Laboratorio Universitario de Bioterio 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 (Becario No. 613418) y la subvención del trabajo de investigación (Proyecto 220574), así como al Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por el apoyo recibido.

ÍNDICE

| | Contenido | Página |
|-------------|--|---------------|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | ANTECEDENTES | 4 |
| | II.1. Generación endógena de vasoinhibinas | 4 |
| | II.2. Procesamiento de la PRL hacia fragmentos N-terminales menores a 14 kDa | 5 |
| | II.3. Producción recombinante de vasoinhibinas | 6 |
| | II.4. Vectores lentivirales | 8 |
| | II.5. Relación estructura función de las vasoinhibinas | 9 |
| III. | JUSTIFICACIÓN | 11 |
| IV. | HIPÓTESIS | 12 |
| V. | OBJETIVOS | 13 |
| | V.1. General | 13 |
| | V.2. Específicos | 13 |
| VI. | MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| | VI.1. Sub-clonación de los fragmentos de hPRL que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79, 1 a 111 y 1 a 123 en el plásmido pLenti CMV GFP Puro | 14 |
| | VI.2. Generación del plásmido pLenti CMV-Vacío-Puro (pCMV-V-Puro) | 16 |
| | VI.3. Transfección de células HEK293T/17 | 19 |
| | VI.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA | 20 |
| | VI.5. PCR tiempo real | 21 |
| | VI.6. Extracción de proteínas a partir de células transfectadas | 21 |
| | VI.7. SDS PAGE- <i>Western blot</i> | 22 |
| | VI.8. Desglicosilación | 22 |
| | VI.9. Producción de partículas lentivirales | 22 |
| | VI.10. Transducción lentiviral en células HEK293T/17, células endoteliales de la arteria pulmonar bovina (CPAE) y células tipo fibroblasto de ratón (3T3-L1) | 23 |

| | | |
|--------------|--|----|
| VI.11. | Titulación de partículas lentivirales | 24 |
| VI.12. | Optimización de la transducción de CPAE | 25 |
| VI.13. | Cuantificación de la viabilidad mediante MTT | 25 |
| VI.14. | Análisis estadístico | 26 |
| VII. | RESULTADOS | 27 |
| VII.1. | Sub-clonación de los cDNAs que codifican los fragmentos de hPRL que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79, 1 a 111 y 1 a 123 en el plásmido pCMV-GFP-Puro | 27 |
| VII.1.1. | Construcción del plásmido vacío (pCMV-V-Puro) | 31 |
| VII.2. | Capacidad de las células HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos recombinantes para producir los fragmentos de hPRL | 33 |
| VII.3. | Generación y caracterización de los vectores lentivirales que transducen a la proteína GFP (LV-GFP) y los fragmentos de 123 (LV-123), 111 (LV-111), 79 (LV-79) y 53 (LV-53) aminoácidos de la hPRL | 39 |
| VII.4. | Capacidad de las células HEK293T/17 transducidas con los lentivirus recombinantes para secretar los fragmentos de hPRL | 42 |
| VII.5. | Evaluación de la expresión y secreción de los fragmentos de hPRL con LV-79 y LV-123 en CPAE | 44 |
| VII.6. | Evaluación de la proliferación de células CPAE transducidas con LV-79 | 45 |
| VIII. | DISCUSIÓN | 47 |
| IX. | CONCLUSIONES | 52 |
| X. | REFERENCIAS | 53 |
| XI. | ABREVIATURAS | 61 |
| XII. | ÍNDICE DE FIGURAS | 63 |
| XIII. | ÍNDICE DE TABLAS | 65 |
| XIV. | APÉNDICE | 66 |
| XIV.1. | Mapa de los plásmidos de empaquetamiento lentiviral | 66 |

I. INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente. Este proceso está finamente regulado por factores estimuladores, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Adams and Alito, 2007) la angiopoyetina-1 y -2 (Buglioni et al., 1999) y el factor de crecimiento básico de fibroblasto (bFGF) (Seghezzi et al., 1998), y por factores inhibidores como la angiostatina y la endostatina (O'Reilly et al., 1994). La angiogénesis ocurre activamente durante el desarrollo embrionario, fetal, y postnatal (Carmeliet, 2005). Sin embargo, en la vida adulta, los vasos sanguíneos permanecen quiescentes y la angiogénesis únicamente ocurre en condiciones específicas, como en eventos reproductivos de las hembras, tales como en el crecimiento del endometrio durante el ciclo menstrual y la formación de la placenta. Asimismo, la angiogénesis participa de manera fisiológica en la reparación de heridas y fracturas. No obstante, la progresión de enfermedades como el cáncer, la psoriasis, la artritis, las retinopatías vasoproliferativas, la obesidad y la aterosclerosis, entre otras, es dependiente de la vascularización excesiva producida por el desbalance de los mecanismos reguladores de la angiogénesis (Carmeliet, 2005). Por ende, los agentes inhibidores de la angiogénesis se han propuesto como agentes terapéuticos para diversas enfermedades (Folkman, 2006). En las últimas décadas, distintos estudios han identificado una variedad de reguladores negativos de la angiogénesis, muchos de ellos derivados del corte proteolítico de proteínas precursoras sin actividad en la angiogénesis (Cao, 2001), como la angiostatina, la endostatina (O'Reilly et al., 1994), el dominio kringle 5 del plasminógeno (Cao et al., 1997) y las vaso inhibinas (Clapp et al., 1993).

Las vaso inhibinas son una familia de péptidos N-terminales derivados del procesamiento proteolítico de la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH), y el lactógeno placentario (PL), que inhiben la angiogénesis. Actualmente, la mayor información sobre estas moléculas concierne a las procedentes de la PRL (Struman et al., 1999, Clapp et al., 2006) las cuales se revisan bajo el término "vaso inhibinas" en este proyecto.

Los efectos antiangiogénicos de las vaso inhibinas ocurren a través de inhibir la proliferación (D'Angelo et al., 1999), supervivencia (Martini et al., 2000) y migración (Lee

et al., 1998) de las células endoteliales. Asimismo, las vasoinhibinas también tienen efecto regulando la homeostasis vascular mediante la inhibición de la vasodilatación y la vasopermeabilidad (Clapp et al., 2009).

Las células endoteliales son el blanco de las vasoinhibinas. Se conoce que las vasoinhibinas se unen a las membranas de células endoteliales (Clapp and Weiner, 1992). Sin embargo existe poca información acerca de sus receptores y sus vías de señalización. Recientemente, el inhibidor tipo-1 del activador del plasminógeno (PAI-1), conocido por su papel en la hemostasis, se identificó como una proteína a la que se unen las vasoinhibinas para mediar sus efectos antiangiogénicos y las vasoinhibinas a su vez inhiben a PAI-1 lo que deriva en efectos profibrinolíticos (Lee et al., 1998).

Aunado a esto, las vasoinhibinas descritas a la fecha comprenden péptidos con masas moleculares que van de 14 a 18 kDa (Triebel et al., 2015). Esta diversidad se genera debido a que varias proteasas procesan a la PRL en diferentes sitios de la molécula. La catepsina D genera péptidos de ~9 kDa (1-80-85 aminoácidos) a ~17 kDa (1-150 aminoácidos) (Piwnica et al., 2004), las metaloproteasas de matriz (MMP) generan péptidos de ~12 kDa (1-111 aminoácidos) a ~17 kDa (1-155 aminoácidos) y la proteína morfogenética de hueso 1 (BPM-1) genera un fragmento de ~18 kDa (1-159 aminoácidos). No obstante, sólo los fragmentos mayores a 14 kDa (123 aminoácidos) han sido evaluados biológicamente. La actividad antiangiogénica de los fragmentos iguales o mayores a 14 kDa los coloca como miembros de la familia de las vasoinhibinas. Sin embargo no hay información sobre los fragmentos de menor peso molecular generados, por lo que no se han incluido en esta familia. Por lo tanto, este proyecto tiene como objetivo abordar este problema.

En este trabajo se produjeron fragmentos recombinantes N-terminales de PRL menores 14 kDa que comprenden los aminoácidos de 1-53, 1-79 y 1-111 (6, 9 y 12 kDa) mediante la mutación y clonación de los cDNAs correspondientes, esto en vectores lentivirales. Se conoce que estos fragmentos se pueden generar por acción de la catepsina D (9 kDa) (Piwnica et al., 2004), las MMP (12 kDa) (Macotella et al., 2006) y la trombina (6 kDa) (Khurana et al., 1999). Mostramos que los vectores son eficaces para lograr la expresión y secreción de los fragmentos de PRL de 9 y 12 kDa, aunque no del fragmento de 6 kDa.

Además, llevamos a cabo una caracterización preliminar de los efectos antiangiogénicos de la PRL de 9 kDa expresada en células endoteliales.

II. ANTECEDENTES

II.1. Generación endógena de vasoinhibinas

La PRL humana es una hormona proteica de 199 aminoácidos con una masa molecular de 23 kDa, organizada en cuatro α -hélice antiparalelas y estabilizadas mediante tres enlaces disulfuro intramoleculares entre los residuos Cys4-Cys11, Cys58-Cys174 y Cys191-Cys199 (Nicoll et al., 1986, Teilum et al., 2005, Brooks, 2012).

Las vasoinhibinas derivadas del corte proteolítico de la PRL se observaron por primera vez en 1980, cuando se reportó la presencia de dos fragmentos hipofisarios de PRL en condiciones reductoras (8 y 16 kDa) (Mittra, 1980). En 1991 se observó que un fragmento de 16 kDa de la PRL (16K PRL) inhibe la angiogénesis *in vitro* (Ferrara et al., 1991) y en 1993 se comprobaron sus efectos antiangiogénicos *in vitro* e *in vivo* (Clapp et al., 1993). Fue hasta 1999 que se determinó que el efecto antiangiogénico de las vasoinhibinas radica en la región N-terminal y no en la C-terminal (Khurana et al., 1999).

Asimismo, diversos estudios se enfocaron a dilucidar las proteasas involucradas en la generación de las vasoinhibinas. En 2004, se encontró que la catepsina D era capaz de procesar a la hPRL en 4 sitios, para producir vasoinhibinas de 1-80-85 (9 kDa), 1-150 (17 kDa), 1-147 (16.5 kDa) y 1-132 (15 kDa) aminoácidos (Piwnica et al., 2004). Macotela y col. en el 2006 demostraron que las MMP también procesan a la PRL hacia vasoinhibinas de 1-150 (17.7 kDa), 1-132 (15 kDa), 1-124 (14.1 kDa), y 1-111 (12.5 kDa) con un corte que predomina entre los aminoácidos 155 y 156 (Macotela et al., 2006). Finalmente, en el 2007, se reportó que la BMP-1 genera una vasoinhibina de 18kDa (Ge et al., 2007). La relevancia fisiológica de estos hallazgos radica en que varios de estos fragmentos de la PRL están presentes endógenamente y, por ende, que estas enzimas podrían participar en regular el balance entre los factores proangiogénicos y los antiangiogénicos.

El corte proteolítico de la PRL, ocurre principalmente a distintos niveles del asa que conecta la tercera y cuarta α -hélices de la PRL, por su naturaleza expuesta y desorganizada (Teilum et al., 2005, Nguyen et al., 2006). La diversidad en los sitios de corte genera diferentes fragmentos N-terminales de tamaños que van desde los 5 hasta los 18 kDa (Clapp et al., 2006, Triebel et al., 2015). Únicamente los fragmentos iguales o mayores a 14kDa (123 aminoácidos) han sido caracterizados y clasificados como

vasoinhibinas por sus propiedades antiangiogénicas no así los fragmentos de la PRL menores a 14 kDa. Por lo que no se conoce si tienen efectos antiangiogénicos, y por ende, si pertenecen a la familia de las vasoinhibinas.

II.2. Procesamiento de la PRL hacia fragmentos N-terminales menores a 14 kDa

En 1987 se demostró que mientras que la PRL de rata era cortada en un sitio para generar un fragmento N-terminal de 16 kDa después de ser procesada con una fracción de glándula mamaria de rata enriquecida en catepsina D, la PRL humana era procesada en diversas regiones y resultaba en fragmentos más pequeños (Clapp, 1987). Estos hallazgos se confirmaron cuando se procesó a la PRL humana con la catepsina pura (Piwnica et al., 2004).

La catepsina D es una aspartil endoproteínasa distribuida en vesículas intracelulares como lisosomas, requiere un pH ácido (<5.5) para convertirse de pro-catepsina a catepsina D activa (Cruz-Soto et al., 2009). La catepsina D procesa la PRL humana en fragmentos que comprenden los residuos 1-150 (17 kDa), 1-147 (16.5 kDa) y 1-132 (15 kDa) que producidos en forma recombinante mostraron propiedades antiangiogénicas. Sin embargo, la catepsina D también genera un fragmento de un peso aproximado de 9 kDa con un sitio de corte poco claro que se ubica alrededor de los residuos 80-85. Este fragmento, no se evaluó biológicamente (Piwnica et al., 2004).

Otro fragmento menores a 14 kDa se generan mediante la proteólisis de la PRL con MMPs (Macotela et al., 2006). Las MMP son una familia de enzimas estructuralmente relacionadas pero genéticamente distintas que degradan la matriz extracelular y los componentes de la membrana basal. Las MMP se clasifican basándose en la especificidad del sustrato y su estructura molecular. Su expresión y actividad en la vida adulta es baja, pero aumenta en diversas condiciones patológicas como en los tumores o en la inflamación. Las MMP producidas por los condrocitos del cartílago son capaces de cortar la PRL y generar fragmentos de 1-150 (17.7 kDa), 1-132 (15 kDa), 1-124 (14.1 kDa), y 1-111 (12.5 kDa). El corte principal ocurre en la Ser155-Leu156, el cual es un sitio altamente conservado en la PRL de distintas especies. Los fragmentos conformados por los residuos de 1-150 (17.7 kDa), 1-132 (15 kDa), y 1-124 (14.1 kDa) inhiben la proliferación de células endoteliales. Sin embargo, no se ha caracterizado la actividad

biológica del fragmento de 12.5 kDa generado por la MMP (Macotela et al., 2006). Las MMP también llegan a procesar a la PRL hacia un fragmento de 9 kDa no se ha caracterizado estructural ni funcionalmente (Macotela et al., 2006).

La PRL también puede ser procesada por trombina, una enzima proteolítica fundamental en la coagulación y en la fisiología endotelial. El procesamiento de PRL por trombina, genera un fragmento que comprende los residuos 1-53 de la PRL humana (6 kDa), y un fragmento C-terminal de 16 kDa (aminoácidos 53-198). El fragmento C-terminal de 16 kDa no es bioactivo y se desconoce si el N-terminal de 6 kDa lo es (Khurana et al., 1999). Esta observación ha sido la base para definir a las vasoinhibinas como fragmentos N-terminales de la PRL (Khurana et al., 1999).

Consistentemente con su producción por acción de proteasas endógenas, fragmentos N-terminales menores de 14 kDa (de 9 y 12 kDa) se han detectado en fluidos biológicos, como en el líquido amniótico de mujeres con preclamsia (González et al., 2007), lo que evidencia la necesidad de identificar su posible naturaleza de vasoinhibinas.

II.3. Producción recombinante de vasoinhibinas

Las vasoinhibinas han sido generadas por métodos enzimáticos (Clapp, 1987) o recombinantes (Clapp et al., 1993), siendo estos últimos los más usados para su caracterización biológica. Las vasoinhibinas recombinantes generadas comprenden los residuos 1-123 (Clapp et al., 1993), 1-139 (Struman et al., 1999) y 1-142 (Ramírez et al., 2011) de la PRL humana, con masas moleculares de 14, 15.8 y 16.1 kDa respectivamente. Las diferencias en el tamaño de las vasoinhibinas recombinantes con respecto a las endógenas, se debe a que las recombinantes se generaron antes de caracterizar los sitios de corte.

Inicialmente las vasoinhibinas recombinantes se produjeron en bacterias (*E. coli*), un sistema de alto rendimiento. Sin embargo, la utilidad del sistema recombinante en bacterias es limitada en estudios de angiogénesis debido a la posible contaminación de las preparaciones con endotoxinas (Galfione et al., 2003) que reduce la angiogénesis y promueve la apoptosis del endotelio (Martini et al., 2000). Asimismo, la expresión en *E. coli* no proporciona las modificaciones post-traduccionales que puede presentarse de manera fisiológica en las vasoinhibinas, como es la glicosilación (Galfione et al., 2003) ni

la correcta formación de puentes disulfuro. Las vaso inhibinas también se han producido en células de insecto utilizando un vector vaculoviral (Galfione et al., 2003), y mediante la generación de una línea celular estable de mamífero (Bentzien et al., 2001), donde su purificación y estabilidad se traduce en una variabilidad importante de los diferentes lotes producidos que afecta la reproducibilidad de sus efectos biológicos, observado en nuestro laboratorio.

Una opción adicional ha sido el producir a las vaso inhibinas *in situ* mediante el uso de vectores virales. Las vaso inhibinas producidas utilizando adenovirales han resultado efectivas para inhibir la angiogénesis en modelos de cáncer de próstata (Kim et al., 2003) y retinopatía diabética (Pan et al., 2004). Asimismo, virus adeno-asociados tipo 2 recombinantes que codifican vaso inhibinas (AAV2-Vi) interfieren con la vasopermeabilidad en la retina de ratas diabéticas (Ramírez et al., 2011). Estos sistemas han resultado útiles pues se reducen los problemas de variabilidad funcional resultado de los procesos de purificación.

Los adenovirus y virus adeno-asociados no se integran en el genoma de la célula, por lo que la expresión de las vaso inhibinas es sólo transitoria.

Tabla 1. Fragmentos N-terminales de la PRL. Número de residuos de los fragmentos N-terminales de la PRL, su masa molecular y la enzima que los genera.

| Fragmentos N-terminales de la PRL | | Producción | |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------|-------------------------|
| Residuos (Número de aminoácidos) | Masa molecular (kDa) | Enzima | Referencia |
| 1-53 | 6.09 | Trombina | (Khurana et al., 1999) |
| 1-80-85 | 9.05/9.64 | Catepsina D | (Piwnica et al., 2004) |
| 1-111 | 12.43 | MMP-3 | (Macotela et al., 2006) |
| 1-123 | 13.92 | Recombinante | (Clapp et al., 1993) |
| 1-124 | 14.07 | Catepsina D/MMP | (Macotela et al., 2006) |
| 1-132 | 14.86 | Catepsina D | (Piwnica et al., 2004) |
| 1-139 | 15.65 | Recombinante | (Lee et al., 1998) |
| 1-142 | 15.9 | Recombinante | (Piwnica et al., 2004) |
| 1-147 | 16.51 | Catepsina D/MMP | (Macotela et al., 2006) |
| 1-150 | 16.88 | Catepsina D | (Piwnica et al., 2004) |
| 1-155 | 17.32 | MMP | (Macotela et al., 2006) |
| 1-159 | 17.77 | BMP-1 | (González et al., 2007) |

II.4. Vectores lentivirales

Los lentivirus son derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) perteneciente a la familia retroviridae (Jiang et al., 2015). Se han hecho modificaciones y deleciones diseñadas para eliminar los elementos de virulencia accesoria y la capacidad de autoreplicarse.

Los vectores lentivirales pueden transducir tanto células quiescentes como en división sin generar una respuesta inmune significativa. Se integran de manera estable en el genoma de la célula permitiendo una expresión sostenida del transgén. Estos vectores

son de los más útiles y seguros para usar en investigación, por lo tanto, se han convertido en vehículos prometedores en la terapia génica clínica (Kotterman et al., 2015).

Los vectores lentivirales se han propuesto para tratar enfermedades monogénicas y crónicas mediante la sustitución de un transgén deficiente con un transgén terapéutico. La incorporación de estos vectores al genoma mediante la integrasa viral y los sitios terminales de repeticiones largas (LTR) evita que el transgén se diluya al duplicarse el DNA en la mitosis, como sucede con aquellos genes extracromosómicos introducidos por vectores virales como adenovirus y AAV2 (Kotterman et al., 2015). Así, la tecnología de los lentivirus se ha convertido en una herramienta eficiente en la administración de genes exógenos en distintos tipos de células tanto *in vivo* como *in vitro*.

En este estudio se pretende usar vectores lentivirales para una expresión sostenida de vasoinhibinas, que transduzca una alta variedad de células y permita evaluar tanto *in vitro* como *in vivo* la actividad de isoformas de las vasoinhibinas menores a 14 kDa.

II.5. Relación estructura función de las vasoinhibinas

Las vasoinhibinas, a través de interactuar con mediadores en la membrana celular de células endoteliales, como integrinas (Morohoshi et al., 2018), el complejo de PAI-1, urokinasa y su receptor (uPAR) (Bajou et al., 2014), además de otros mediadores desconocidos (Clapp and Weiner, 1992), inhiben la proliferación deteniendo las células endoteliales en G0 y G2 por la inhibición de las ciclina D1 y ciclina B1 y estimulan los inhibidores de la quinasa dependiente de la ciclina p21 cip1 y p27kip1. Esta inhibición puede implicar la inhibición de la activación de MAPK (Ras-Raf-MEK-MAPK) (D'Angelo et al., 1999) y las vías de proliferación dependientes de eNOS (NO-cGMP-PKG-Raf-MAPK) (González et al., 2004). Además, las vasoinhibinas interfieren con la migración de las células endoteliales a través del complejo PAI-1/uPA/uPAR donde las vasoinhibinas se unen a PAI-1 (Bajou et al., 2014) y a través de bloquear la vía de señalización de Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 (Lee et al., 2007). También, las vasoinhibinas inhiben la supervivencia de las células endoteliales activando proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Martini et al., 2000) y la activación de las caspasas mediada por NFB (Tabruyn et al., 2003). Asimismo, las vasoinhibinas bloquean la vasodilatación y la vasopermeabilidad al interferir con la activación dependiente de Ca²⁺ de eNOS (González et al., 2004) y por la

activación de la proteína fosfatasa A, que desfosforila e inactiva la eNOS (Garcia et al., 2008).

Existe muy poca información de la relación estructura-función de las vasoinhibinas. Una de las propuestas sobre el sitio activo de las vasoinhibinas es que este involucra una secuencia de 14 aminoácidos hidrofóbicos contenida en la segunda α -hélice de la PRL (residuos 80-93) y que tiene como característica una orientación inclinada ("tilted"), la cual en interfases lípido/agua puede desestabilizar membranas celulares (Brasseur et al., 1997). Además, péptidos similares ("tilted") derivados de la proteína beta-amiloide tienen actividad antiangiogénica (Lins et al., 1999), lo cual apoya esta hipótesis. Cuando los 14 aminoácidos hidrofóbicos de la PRL se clonaron fusionados a la proteína de unión de maltosa (MBP), se mostró que dicho complejo proteico inhibe la angiogénesis *in vitro*, pero con una potencia tres a cuatro veces menor a la de la vasoinhibina íntegra (Nguyen et al., 2006).

En este trabajo se evaluó la producción y secreción de fragmentos de PRL menores a 123 aminoácidos (1-53, 1-79, y de 1-111 aminoácidos) en células HEK293T/17 transducidas por vectores lentivirales.

III. JUSTIFICACIÓN

Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la proteólisis enzimática de la PRL. Los fragmentos N-terminales ≥ 14 kDa de la PRL poseen acciones antiangiogénicas pero se desconoce si fragmentos de masas moleculares menores tienen actividad de vasoinhibinas. Dado que fragmentos < 14 kDa pueden ser generados por las enzimas que producen a las vasoinhibinas y se han observado en fluidos corporales en condiciones patológicas, es importante investigar su posible actividad de vasoinhibinas. Este estudio tuvo como objetivo la generación de vectores lentivirales recombinantes capaces de lograr la transducción de fragmentos < 14 kDa de la PRL que comprenden de los aminoácidos de 1-53, 1-79 y 1-111 en diversos tipos celulares para eventualmente evaluar sus propiedades biológicas. El uso de esta herramienta deberá contribuir al entendimiento de la fisiología de las vasoinhibinas en condiciones normales o de enfermedad, así como a la comprensión de su relación estructura-función, ayudando a esclarecer el sitio activo, al definir la vasoinhibina de menor tamaño con acciones antiangiogénicas.

Este trabajo es el primero donde se transducen vasoinhibinas utilizando vectores lentivirales para tener una producción sostenida de vasoinhibinas en células que se replican activamente como las células del endotelio vascular bajo condiciones de angiogénesis. Además el uso de estos vectores abre la posibilidad de generar líneas celulares que produzcan a estos péptidos de manera estable (Barde et al., 2010).

Consistentemente con su producción por acción de proteasas endógenas, fragmentos N-terminales menores de 14 kDa (de 9 y 12 kDa) se detectan en fluidos biológicos, como en el líquido amniótico de mujeres con preclamsia (González et al., 2007), lo que evidencia la necesidad de identificar su posible naturaleza de vasoinhibinas

IV. HIPÓTESIS

La transducción lentiviral de fragmentos de la PRL humana (hPRL) que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79 y 1 a 111, es eficaz para producir y secretar estos péptidos por células de mamífero.

V. OBJETIVOS

V.1. General

Evaluar si la transducción lentiviral de fragmentos de hPRL que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79 y 1 a 111 es eficaz para producir y secretar estos péptidos por células de mamífero.

V.2. Específicos

V.2.1. Clonar los fragmentos de hPRL que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79 y 1 a 111 en el plásmido pCMV-Puro (pCMV-53, 79 o 111-Puro).

V.2.2. Evaluar la expresión, traducción y secreción de los fragmentos de hPRL en células HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos (pCMV-53,79 o 111-Puro).

V.2.3. Evaluar la transducción lentiviral y la secreción de los fragmentos de hPRL en células HEK293T/17 con los vectores lentivirales (LV-53, LV-79 o LV-111).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Sub-clonación de los fragmentos de hPRL que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79, 1 a 111 y 1 a 123 en el plásmido pLenti CMV GFP Puro

Los fragmentos de hPRL del residuo 1 al 53, 79, 111 o 123 fueron obtenidos a partir del cDNA de la hPRL previamente clonada en el plásmido pcDNA3 (Figura 1A). Para este propósito se insertó un codón de paro (TAA) en la secuencia de la hPRL en el sitio de los aminoácidos 54, 80, 112 o 124, para cada vasoinhibina, respectivamente. Subsecuentemente al codón de paro se insertó un sitio de restricción para la enzima Sall (5'-GTCGAC-3'). Los distintos cDNAs para las vasoinhibinas recombinantes se amplificaron mediante una PCR en el termociclador *Mastercycler eppgradient* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), utilizando el oligonucleótido *forward* pCMV-fwd y los respectivos oligonucleótidos *reverse* (Tabla 2) conteniendo el codón de paro y el sitio Sall (Figura 1B) y el *Dream Taq PCR Master Mix (2X)* (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) en un volumen final de 50 μ L. Posteriormente, se llevó a cabo una restricción de los fragmentos con la enzima BamHI y la enzima Sall para la generación de extremos cohesivos. El total de la reacción se procesó en un gel de agarosa al 1% y las bandas del tamaño correspondiente al cDNAs de las vasoinhibinas (228, 336, 432, 468 y 696 pb) se cortaron y purificaron utilizando el estuche comercial *Wizard SV Gel & PCR clean-up system* (Promega, USA). Estos fragmentos fueron ligados en el vector pLenti CMV-GFP-Puro (658-5) (Addgene # 17448), cortado con las mismas enzimas de restricción, bajo el promotor de citomegalovirus (CMV). Este plásmido contiene una secuencia WPRE ("Posttranscriptional Regulatory Element") que cuando se transcribe, aumenta la estabilidad del mRNA creando una secuencia terciaria que aumenta la traducción (Figura 1).

Los fragmentos se ligaron al plásmido pLenti CMV-GFP-Puro, en una proporción de 1:3 (plásmido: inserto) en una reacción de 15 μ L volumen final, conteniendo 1 unidad de ligasa T4 (England Biolabs; Ipswich, USA) y 1.5 μ L de amortiguador de ligación 2X (132 mM Tris-HCL, pH7.6; 20 mM MgCl₂, 2 mM ditiotretitol, 2 mM ATP, 15% polietilenglicol) (New England Biolabs, USA).

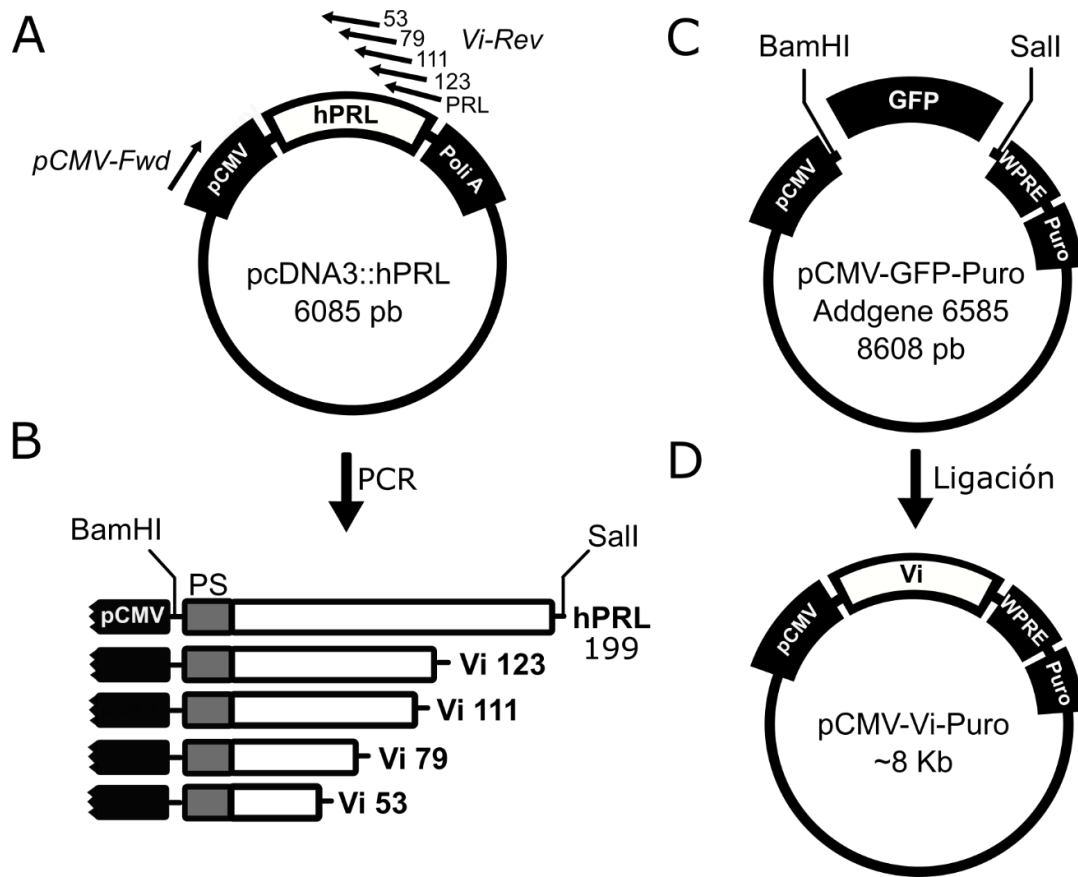


Figura 1. Construcción de los plásmidos codificantes para fragmentos de la hPRL de diferentes tamaños (Vi 53, 79, 111 y 123). **A)** Los fragmentos de hPRL de los diferentes tamaños se amplificaron por PCR a partir del plásmido pcDNA3:hPRL utilizando el oligonucleótido *forward* pCMV (pCMV-Fwd) y distintos oligonucleótido *reverse* conteniendo el codón de paro en distintos residuos. **B)** Los fragmentos generados fueron obtenidos mediante digestión con las enzimas BamHI y Sall. (PS, péptido señal de secreción) **C)** El vector pLenti CMV-GFP-Puro fue digerido con BamHI y Sall para remover la secuencia de GFP. **D)** Las distintas secuencias que codifican los fragmentos de hPRL fueron ligados en el vector pLenti CMV-Puro, dando lugar al pCMV-Vi-Puro. El término “Puro” corresponde a la secuencia del plásmido que confiere resistencia a puromicina.

La reacción se incubó por 16 horas a una temperatura de 37°C. Bacterias competentes XL-Blue transformadas con el total del volumen de la reacción se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron por 16 horas a 37°C.

Las colonias que crecieron en la placa evaluaron mediante PCR con el oligonucleótido pCMV-fwd (5'-CCCACTTGGCAGTACATCA-3') y el oligonucleótido WPRE-rev (5'-AGAGACAGCAACCAGGATTT-3'). Las colonias positivas se crecieron, el DNA plasmídico se extrajo mediante el estuche comercial de purificación *Plasmid Plus Maxi Kit* (QIAGEN, Alemania) y se caracterizó mediante patrones de restricción por las enzimas BamHI (Jena Bioscience, USA)-Sall (New England Biolabs, USA), y BamHI-EcoRI (New England Biolabs, USA) y por secuenciación.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para generar las distintas secuencias que codifican los distintos fragmentos de hPRL. Se muestra la secuencia de paro (verde) y la del sitio de restricción Sall para los oligonucleótidos *reverse* (rev).

| Nombre | Sentido | Secuencia (5' – 3') |
|--------------|---------|--|
| pCMV* | Fwd | CCCACTTGGCAGTACATCA |
| Vi53-Sall** | Rev | TTTTTTGTCTGACTTACTTGGTAATGAACCCCG |
| Vi79-Sall** | Rev | TTTTTTGTCTGACTTAGTCTTTTTGATTCATCTGTTGGGC |
| Vi111-Sall** | Rev | TTTTTTGTCTGACTTAGCCTCCGGGGCTTCTTGCATA |
| Vi123-Sall** | Rev | TTTTTTGTCTGACTTAGGTTTGCTCCTCAATCTCTACAGC |

* Para clonar y secuenciar.

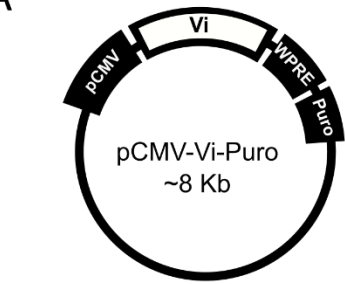
** Para insertar el sitio restricción Sall y el codón de paro en el aminoácido consecutivo al indicado

VI.2. Generación del plásmido pLenti CMV-Vacío-Puro (pCMV-V-Puro)

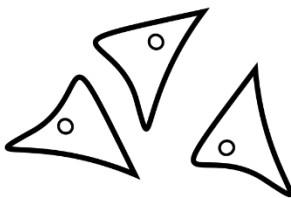
Para la generación de plásmido pCMV-Vacío-Puro se realizó el apareamiento de los oligonucleótidos *forward* (5' **GATCCTAACGAGCAAAACACGCATAAG** 3') y *reverse* (5' **TCGACTTATGCGTGTGTTTGCTCGTTAG** 3') para formar los extremos cohesivos mezclando: 5 µL del oligonucleótidos 1 (200 µM), 5 µL del oligonucleótido 2 (200 µM), 2 µL de amortiguador de hibridación 10X (100 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA, 1 M de NaCl) y 2 µL de agua para ajustar volumen. La mezcla de hibridación se calentó a 94 °C durante 5 minutos y se dejó enfriar hasta llegar a 25 °C (Tiscornia et al., 2006). Se tomó una alícuota de 5 µL de la mezcla de hibridación se diluyó 1:1'000, se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 4% y la banda de interés se eluyó utilizando el

estuche comercial *Wizard SV Gel & PCR clean-up system* (Promega, USA). El fragmento de DNA hibridado se ligó al plásmido pCMV-GFP-Puro (donde el fragmento correspondiente al GFP se había removido previamente), en una proporción de 1:3 (plásmido: inserto) en una reacción de 15 μ L volumen final, conteniendo 1 unidad de ligasa T4 (New England Biolabs; Ipswich, USA) y 1.5 μ L de amortiguador de ligación 2X (132 mM Tris-HCL, pH7.6; 20 mM MgCl₂, 2 mM ditiotreitolo, 2 mM ATP, 15% polietilenglicol) (New England Biolabs, USA). La reacción se incubó por 16 horas a una temperatura de 37°C. Bacterias competentes XL-Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformadas con el total del volumen de la reacción se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron por 16 horas a 37°C. Las colonias que crecieron en la placa, se analizaron mediante PCR con el oligonucleótido pCMV-fwd (5' CCCACTTGGCAGTACATCA 3') y el oligonucleótido WPRE-rev (5' AGAGACAGCAACCAGGATTT 3'). Las colonias positivas se cultivaron, el DNA plasmídico se extrajo mediante el estuche comercial de purificación *Plasmid Plus Maxi Kid* (QIAGEN, Alemania) y se caracterizaron mediante patrones de restricción con las enzimas EcoRI y Apal (New England Biolabs, USA).

A



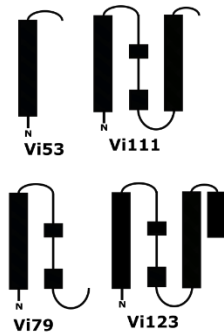
Transfección:
Fosfato de calcio



HEK293T/17

Células:

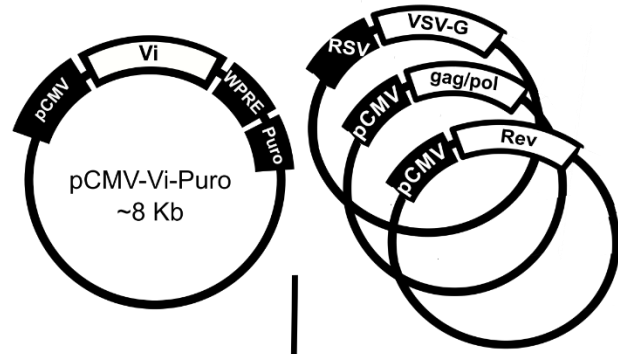
- *Western Blot (proteínas)
- *PCR tiempo real (mRNA)



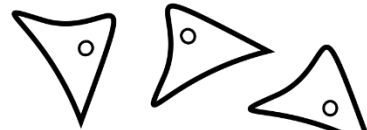
Fragmentos de hPRL

- Medio condicionado:
- *Western Blot (proteínas)
 - *Desglicosilación

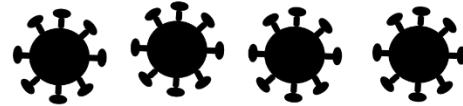
B



Transfección:
Fosfato de calcio



HEK293T/17



Lentivirus

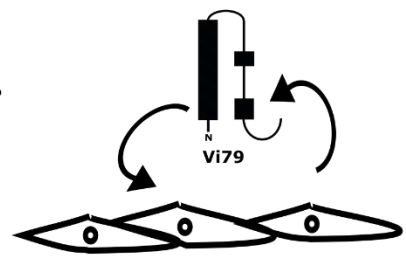
Eficiencia en:
*HEK293T/17
*3T3L-L1
*CPAE

Transducción

Línea celular productora

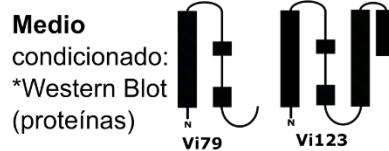


HEK293T/17



CPAE

- Células:
- *PCR tiempo real (mRNA)
 - Medio condicionado:
 - Western Blot
 - MTT



Medio condicionado:
*Western Blot (proteínas)

Fragmentos de hPRL

Figura 2. Diagrama de la metodología empleada para evaluar la expresión, traducción y secreción de los fragmentos de hPRL y generación lentiviral y eficiencia de transducción. A) Las diferentes construcciones de plásmidos pCMV-Puro (pCMV-53, 79, 111, 123 o hPRL-Puro) se transfectaron con fosfato de calcio en células HEK293T/17. A las 48 horas postransfección, el medio condicionado se recolectó y se lisaron las células para obtener mRNA o proteína. El medio condicionado y el lisado proteico fue analizado mediante *Western blot* en condiciones reductoras. Además, el medio condicionado se desglicosiló. El mRNA obtenido fue cuantificado mediante PCR tiempo real. **B)** Para la producción de partículas lentivirales, los plásmidos pCMV-Puro (pCMV-53, 79, 111, 123 o hPRL-Puro) se co-transfectaron utilizando fosfato de calcio con los plásmidos de empaquetamiento lentiviral. EL medio condicionado conteniendo las partículas lentivirales se recolectó a las 48 horas y se evaluó su eficiencia de transducción en las líneas celulares HEK293T/17, 3T3-L1 y CPAE. Se evaluó la expresión de los péptidos en el medio condicionado de las células HEK293T/17 transducidas con los vectores lentivirales (LV-53, LV-79 o LV-111) mediante *Western blot* en condiciones reductoras. Finalmente se evaluó la bioactividad del fragmento de hPRL que comprende de 1-79 aminoácidos mediante la transducción de células CPAE con LV-79, la evaluación del péptido en el medio condicionado (*Western blot* en condiciones reductoras), el mRNA (en PCR tiempo real) y la viabilidad celular (ensayo de MTT).

VI.3. Transfección de células HEK293T/17

Para verificar las construcciones de los plásmidos conteniendo el cDNA de los fragmentos de hPRL que resultan en la expresión de los correspondientes péptidos (Figura 2), cada plásmido se transfectó en células HEK293T/17 utilizando fosfato de calcio, y se analizó la expresión y secreción de los distintos fragmentos recombinantes en extractos celulares y medios condicionados respectivamente. Brevemente, las células HEK293T/17 (células humanas derivadas de riñón embrionario) se sembraron en una placa de 60 mm con 2 mL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de penicilina-estreptomicina y 24 horas después se transfectaron. La mezcla

de transfección se preparó con 10 µg del plásmido de interés y 25 µL de cloruro de calcio (2.5 M CaCl₂) en un volumen final de 250 µL con 1[H₂O]:2[0.1 M TE]. A esta mezcla se le adicionaron gota a gota (~1 gota/ segundo) 250 µL de amortiguador HBSS 2X (“*Hank’s Balanced Salt Solution*”) al tiempo que se le introdujo aire con una pipeta de 1 mL a lo largo de 1 minuto. Las células se incubaron por 16 horas a 37°C y posteriormente se les reemplazó el medio reduciendo en un 50% su volumen. Después de 48 horas el medio condicionado se recolectó, se hicieron alícuotas y se congelaron a -70 °C. A las células se les realizó extracción de RNA o proteínas.

VI.4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Después de 48 horas de la transfección, las células HEK293T/17 se lisaron con 500 µL de *Trizol* (Ambion Life-Tecchnologies, USA) seguido de la adición de 200 µL de cloroformo (JT Bakeredo, Edo. México, México), agitación vigorosa durante 15 segundos e incubación a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente la muestra se centrifugó a 13´400 xg por 20 minutos a 4°C, y la fase acuosa conteniendo el RNA se recuperó y precipitó con 250 µL de isopropanol 100% (JT Bake, Edo. México, México) a temperatura ambiente por 10 minutos. En una segunda centrifugación (13´400 xg por 20 minutos a 4°C) se removió el sobrenadante por decantación y se dejó el precipitado conteniendo el RNA. El precipitado se lavó con 500 µL de 75% etanol (JT Bake, Edo. México, México), se agitó vigorosa y brevemente, se centrifugó (13´400 xg por 20 minutos a 4°C) y se descartó el sobrenadante por decantación. Subsecuentemente, el precipitado se centrifugó (13´400 xg a 4°C por 2 minutos), se retiró el exceso de etanol con pipeta y se secó al aire durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en 20 µL de agua libre de RNA-asas, se incubó durante 10 minutos a 4°C y el RNA se cuantificó en el espectrofotómetro (*NanoDrop*, Thermo-Fisher, Massachusetts, USA). Todo fue realizado a una temperatura 4°C para evitar degradación de RNA. El cDNA se sintetizó utilizando un estuche comercial (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kids*, Applied-Biosystems, Thermo Fisher) con un volumen final de 5 µL para cada reacción conteniendo: 2 µL de 10X RT amortiguador de retrotranscripción (RT), 2 µL de 10X RT oligonucleótidos al azar (“random primers”), 0.8 µL de 25X de una mezcla de deoxinucleótidos (dNTP mix, 100 nM) y 1 µL (1 unidad) de transcriptasa reversa en una

reacción de PCR estándar (10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, 5 minutos a 85°C y termina a 4°C).

VI.5. PCR tiempo real

La expresión relativa del mRNA que codifica los distintos fragmentos de la hPRL se evaluó en las células HEK293T/17 mediante PCR tiempo real. El cDNA se diluyó a una concentración de 4 ng/μL para utilizarse como molde. Para la amplificación del cDNA molde se utilizó un estuche comercial de *SYBR Green qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Fisher). A un volumen final para cada reacción de 5 μL se le adicionaron 2.5 μL del master mix SYBR Green (conteniendo Taq DNA polimerasa, dNTPs, dUTPs y SYBR Green), 0.125 μL 20 nM de los oligonucleótidos *forward* Vi 53-2 (5' GTGACCCTTCGAGACCTGTT 3') y *revers*" Vi 53-2 (5' GCCATGGGTATACCGTTTAT 3') y 2.5 μL del molde bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C, 10 segundos a 90°C, 30 segundos a 57°C, 30 segundos a 72°C por 40 ciclos en el termociclador (CFX96 *Real time-system*, Bio-Rad, USA). Se utilizó Hprt-1 (Hipoxantina fosforibosiltransferasa-1) como housekeeping para normalizar los datos. Los datos se analizaron haciendo una normalización contra el gen housekeeping (Hprt-1), y obteniendo la expresión relativa, como se muestra en las siguientes fórmulas.

$$\Delta Ct = Ct_{gen\ muestra} - Ct_{housekeeping}$$

$$Expresión\ relativa = 2^{-\Delta Ct}$$

VI.6. Extracción de proteínas a partir de células transfectadas

Después de 48 horas de la transfección, las células HEK293T/17 se lisaron con 100 μL de amortiguador de lisis [50 nM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS y 1 μL (dilución 1/10) de inhibidor de proteasas p8340 (Sigma-Aldrich, USA)]. Los lisados en los platos de cultivo se incubaron en hielo durante 15 minutos y se rasparon con espátula. El lisado fue transferido a un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 9'300 xg a 4°C durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y la proteína se cuantificó por el método de Bradford, utilizando una curva de albumina de suero bovino (BSA) y se analizó por *Western blot*.

VI.7. SDS PAGE-*Western blot*

Los fragmentos de la hPRL en los medios condicionados obtenidos de las células HEK293T/17 o de las CPAE transfectadas con los cDNA o transducidas con los vectores lentivirales que las codifican, respectivamente, se evaluaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, transferencia e inmunotinción (*Western blot*). Se cargaron 50 µL de medio condicionado en geles de poliacrilamida al 16% y se separaron bajo una corriente de 100 V por 4 horas. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa bajo una corriente de 25 V durante 40 minutos. Las membranas se bloquearon durante 1 hora con amortiguador de fosfatos – 1% Tween 20 y 3% leche (Bio-Rad, USA) y se incubaron durante 16 horas con anticuerpos policlonales anti-PRL (CL-1) a una dilución de 1:500 en 1% de BSA en PBS-Tween. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 hora con anticuerpos secundarios anti-conejo acoplados a fosfatasa alcalina a una dilución 1:2'500 y, finalmente, se revelaron utilizando el estuche comercial de revelado *AP conjugate substrate kit* (Bio-Rad, USA).

VI.8. Desglicosilación

La desglicosilación de los fragmentos de la hPRL contenidos en los medios condicionados de las HEK293T/17 se llevó a cabo mediante la incubación con enzima deglicosilasa PNGase-F (*Peptide-N-Glycoside F*, New England Biolabs Inc, Ipswich, MA) que corta la manosa unida a la asparagina. Brevemente, se desnaturalizaron 9 µL de medio condicionado de las HEK293T/17 con amortiguador SDS al 5% y 0.4 M de DTT (ditioteitol: agente reductor), a una temperatura de 100°C durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se les adicionaron 4 µL de H₂O, 2 µL de amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M, 2 µL de Nonidet P-40 al 10% y 1 µL de PNGase (500 U). La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. El volumen total de la reacción se analizó por *Western blot*.

VI.9. Producción de partículas lentivirales

Para la producción de las partículas lentivirales (Figura 2) se sembraron 4 x 10⁶ células HEK293T/17 en pozos de 100 mm² con 10 mL de medio de cultivo y se co-transfectaron con fosfato de calcio con los plásmidos conteniendo los transgenes de los fragmentos de la hPRL (20 µg) y con los plásmidos de empaquetamiento pMDLg/pRRE (10 µg, Addgene

#12251), pRSV-Rev (5 µg, Addgene #12253) y pMD2.G (6 µg, Addgene #12259), obsequiados por Didier Trono (Dull et al., 1998) ver en apéndice. La mezcla de transfección contuvo 50 µL de cloruro de calcio (2.5 M CaCl₂), se ajustó a 500 µL con 1[H₂O]:2[0.1 M TE] y se adicionó gota a gota 500 µL de amortiguador HBSS 2X al tiempo se le introdujo aire a la mezcla con una pipeta de 1 mL a lo largo de 1 minuto. La mezcla de transfección se retiró 16 horas después y las células se incubaron con el 50% del volumen inicial de medio (DMEM 10% SFB). Después de 48 horas, el medio condicionado se colectó, filtró (0.22 µm), se hicieron alícuotas y guardaron a -70 °C. La transfección se monitoreó utilizando como control vectores lentivirales reporteros (que codifican la proteína GFP) cuya fluorescencia se observó directamente en las células bajo una longitud de onda de excitación de 395 nm.

VI.10. Transducción lentiviral en células HEK293T/17, células endoteliales de la arteria pulmonar bovina (CPAE) y células tipo fibroblasto de ratón (3T3-L1)

La eficacia de transducción de los vectores lentivirales en células de mamífero se analizó en las líneas celulares HEK293T/17, CPAE y 3T3-L1. Primeramente se determinó la concentración mínima letal de puromicina para poder seleccionar a las células transfectadas con el uso del antibiótico. Se sembraron 10,000 células CPAE y 3T3-L1, y 50,000 células HEK293T/17 por pozo en una caja de 96 pozos, y 24 horas después se adicionaron dosis crecientes de puromicina (µg/mL). Se determinó la viabilidad celular mediante la reducción del compuesto MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) este ensayo mide la actividad de deshidrogenasas mitocondriales necesarias para la vida (Van Meerloo et al., 2011). La eficacia de la transducción lentiviral para conferir resistencia a la puromicina se evaluó utilizando el vector lentiviral reportero que codifica la GFP. Brevemente, se sembraron 10,000 células CPAE y 3T3-L1, y 50,000 células HEK293T/17 por pozo en caja de 96 pozos y se les adicionó el medio condicionado de células HEK293T/17 conteniendo las partículas lentivirales respectivas (LV-GFP). Después de 96 horas se les adicionó la concentración mínima letal de puromicina, previamente determinada para cada tipo celular y se evaluó el número de células bajo microscopía de campo claro y fluorescencia (395 nm).

VI.11. Titulación de partículas lentivirales

La concentración de las partículas lentivirales se determinó en función de la resistencia que confieren a la puromicina. Para esto, se sembraron 50'000 células HEK293T/17 por pozo en una caja de 96 pozos. Un día después se les adicionó el medio condicionado conteniendo las partículas lentivirales a distintas diluciones y se incubó por 24 horas; posteriormente se sustituyó el medio por uno fresco con puromicina (3 µg/mL) y al cabo de 24 horas se midió la viabilidad mediante el ensayo de MTT.

Antes, se obtuvo el límite de detección de las células HEK293T/17 para el ensayo de MTT, Sembrando un número creciente de células (100 a 2000 células /pozo) en una placa de 96 pozos, se incubó por 2 horas para que las células se pegaran a la placa y enseguida se midió viabilidad mediante el ensayo de MTT.

El límite de detección se calculó con la siguiente ecuación:

$$LD = \bar{x}_{blanco} + 3\sigma$$

El ensayo con MTT tuvo un límite de detección de 0.2 de absorbancia lo cual corresponde a 600 células HEK293T/17:

$$LD = 0.2 \text{ absorbancia} = 600 \text{ células HEK293T/17}$$

Para calcular el título lentiviral: Se obtuvo la ecuación de la línea recta para la región lineal de la curva dosis-respuesta a la puromicina de las células HEK293T/17 transducidas con distintas dosis de cada vector lentiviral (LV-GFP, LV-V, LV-hPRL, LV, 123, LV-111, LV-79 y LV53) y seleccionadas con puromicina.

$$Y = mX + b$$

Dónde: Y= Absorbancia, X = Factor de dilución,

Tomando en cuenta el LD:

$$Y = 0.2$$

Entonces:

$$0.2 = mX + b$$

El factor de dilución (X) está determinado por:

$$X = \frac{(0.2 - b)}{m}$$

Las unidades de transducción (TU) por pozo se obtienen por la multiplicación del factor de dilución por el número de células en el límite de detección:

$$TU = X * 600 \text{ células}$$

El título viral se corrigió por el volumen del medio condicionado inicial (50 μ L):

$$\frac{TU}{\mu L} = \frac{TU}{50\mu L}$$

VI.12. Optimización de la transducción de CPAE

Para aumentar la eficiencia de la transducción celular se utilizó polibreno (bromuro de hexadimetrina), un polímero catiónico que facilita la unión del virus a la membrana celular y con ello su absorción celular (Han et al., 2015). Para caracterizar el efecto del polibreno sobre las células endoteliales, se realizaron curvas dosis-respuesta. Brevemente, se sembraron 10´000 CPAE por pozo en una placa de 96 pozos y se incubaron durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio (EMEM 20% SFB) y se le sustituyó por medio fresco adicionado con diferentes concentraciones de polibreno (0.5, 1, 2, 4, 8 y 10 μ g/mL) y 20 μ L del medio condicionado conteniendo las LV-GFP. Después de 72 horas se evalúa la eficiencia de transducción.

VI.13. Cuantificación de la viabilidad mediante MTT

Este ensayo mide la actividad metabólica celular y puede reflejar cambios en sobrevivencia y proliferación. Es un método colorimétrico que evalúa la actividad de oxidoreductasas dependientes de NADPH capaces de reducir el MTT a formazán que es insoluble y de color morado. Para este ensayo, se sembraron 10´000 células por pozo en una placa de 96 pozos en 100 μ L de medio DMEM suplementado con 20% de SFB y 1% de penicilina-estreptomina. A las 24 horas se les adicionaron dosis crecientes de puromicina (0-10 ng/ μ L) y 24 horas después se llevó a cabo la adición de 10 μ L de MTT (5 mg/mL) (Thermo Fisher) y se les incubó a 37°C durante 2 horas. El medio se removió

y se adicionaron 200 μ L de DMSO (Dimetil sulfoxido) (Sigma-Aldrich). En un lector de ELISA (Mark Microplate Reader, Bio-Rad) se midió la absorbancia de una longitud de onda de 540 nm corregida con 655 nm.

VI.14. Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos se valoraron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Bonferroni. Las diferencias entre las medias de dos muestras se analizaron mediante la prueba *t* de Student no pareada. Se consideraron diferencias significativas para $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

VII.1. Sub-clonación de los cDNAs que codifican los fragmentos de hPRL que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79, 1 a 111 y 1 a 123 en el plásmido pCMV-GFP-Puro

Las secuencias de hPRL se obtuvieron a partir del plásmido pcDNA que contenía el cDNA de la hPRL humana. Mediante una PCR con el oligonucleótido pCMV-fwd y los distintos oligonucleótidos *reverse* conteniendo el codón de paro y el sitio Sall (Tabla 2) se obtuvieron productos correspondientes a los fragmentos de hPRL comprendidos entre los residuos 1 a 53, 1 a 79, 1 a 111 y 1 a 123 y la hPRL completa. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa. Las bandas obtenidas para cada producto tuvieron los tamaños de 709, 787, 883 y 919 pb que es el esperado para la combinación de la secuencia amplificada del pCMV y la de los 4 diferentes fragmentos de la hPRL (Figura 3A) y de 1147 pb para de hPRL (Figura 3B). La restricción con las enzimas BamHI y Sall, generaron el fragmento pCMV de 451 pb y los fragmentos correspondientes a las diferentes hPRLs en sus tamaños esperados (228, 336,432, 468 y 696 pb). Estos productos fueron extraídos del gel y purificados. En paralelo, se realizó la restricción con BamHI y Sall del plásmido pCMV-GFP-Puro para eliminar GFP (Figura 3C). Finalmente, los fragmentos de la hPRL se ligaron en el vector pCMV-Puro en sustitución de la GFP (Figura 1C-D).

Se transformaron bacterias competentes con las ligaciones mencionadas y se sembraron en placas LB agar con ampicilina, 3 colonias de cada uno se cultivaron en medio LB y se extrajo el DNA plasmídico. Las distintas construcciones fueron verificadas por patrón de restricción con distintas combinaciones de enzimas de restricción (Figura 4).

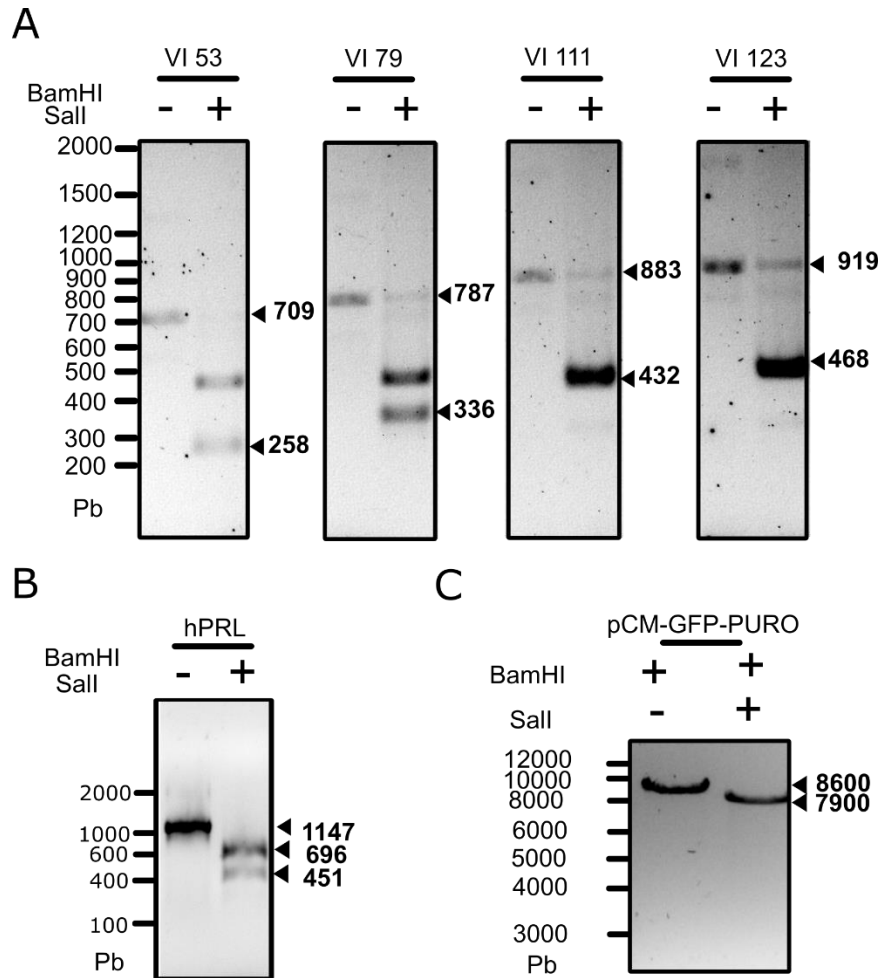


Figura 3. Clonación de los cDNAs que codifican los fragmentos de hPRL recombinantes de 1-53, 1-79, 1-111 y 1-123 aminoácidos en el pCMV-GFP-Puro. A) Electroforesis en geles de agarosa de las amplificaciones por PCR de los fragmentos de hPRL con el oligonucleótido *forward* (pCMV-fwd) y distintos oligonucleótidos *reverse* para cada fragmento de hPRL conteniendo un codón de paro para introducir en el cDNA de la hPRL y un sitio de restricción Sall. En el primer carril de cada gel se cargó producto de la PCR sin digerir, y en el segundo carril los fragmentos esperados para los fragmentos de hPRL digeridos con BamHI y Sall (228, 336, 432 y 468 pb) separados del producto amplificado del pCMV (451 pb). **B)** Similar que en A pero para la secuencia completa de la hPRL. **C)** pCMV-GFP-Puro sin digerir (8,600 pb) y digerido con las enzimas de restricción BamHI-Sall que elimina la secuencia de la GFP (7,900 pb).

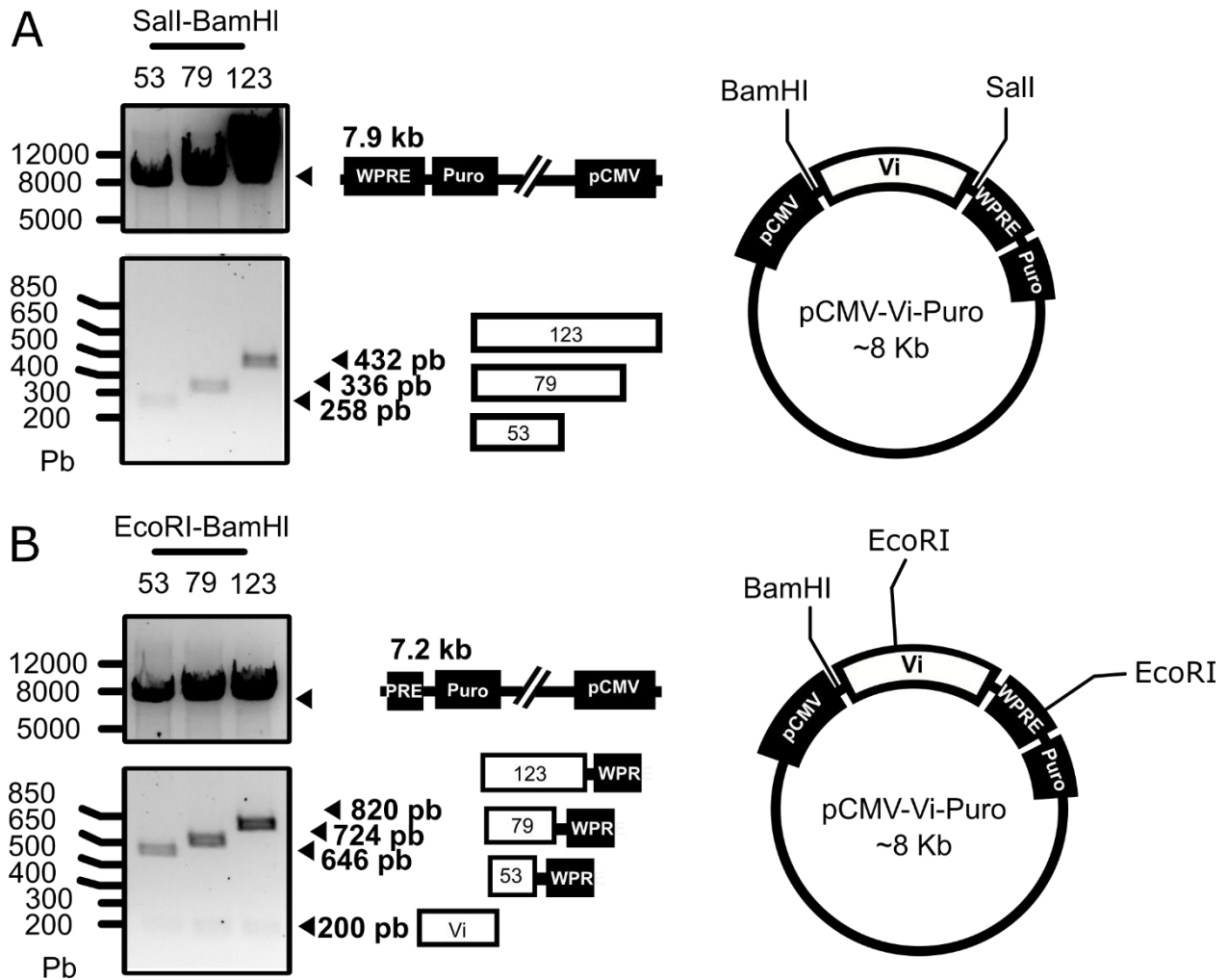


Figura 4. Verificación por restricción de los productos clonados en el plásmido pCMV-Vi-Puro. **A)** Productos de la digestión de los distintos plásmidos pCMV-Vi-Puro con las enzimas de restricción BamHI y Sall. El tamaño de los fragmentos (228, 336 y 432 pb) corresponden a los cDNAs que codifican las hPRLs de 53, 79 y 123 aminoácidos, respectivamente. Los sitios de restricción de las enzimas se ilustran en el plásmido circular (derecha) y el tamaño de los fragmentos de la hPRL derivados de los cortes (centro). **B)** Productos de la digestión de los plásmidos pCMV-Vi-Puro con enzimas de restricción BamHI y EcoRI (esta última tiene 2 sitios de corte, uno de ellos pertenece a las Vi).

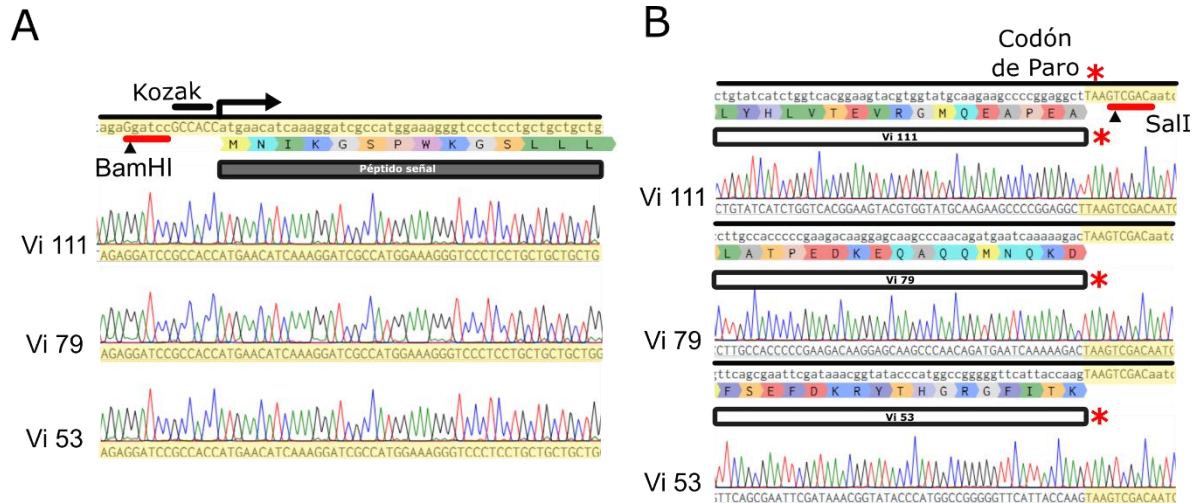


Figura 5. Análisis de secuencia de los distintos productos clonados en el pCMV-Vi-Puro. A) Secuencia inicial de la transcripción de los tres fragmentos de hPRL que incluye el sitio de restricción para BamHI (flecha), la secuencia consenso Kozak, el codón de inicio (TGA) y la secuencia que traduce al péptido señal. Las tres secuencias muestran homogeneidad con la secuencia consenso (resaltado en amarillo). **B)** Secuencia correspondiente a la parte final de los fragmentos de hPRL para 111, 79 y 53 respectivamente, el codón de paro (TAA) y el sitio de restricción para Sall (flecha). Se ilustra que para las 3 secuencias no hay homogeneidad en las secuencias que traducen el péptido debido a que son distintos sitios de la secuencia y si la hay en el codón de paro y sitio de restricción (resaltado en amarillo).

Los plásmidos fueron digeridos con una doble restricción con las enzimas BamHI-Sall. Se obtuvieron dos fragmentos por cada construcción ya que cada enzima tiene sólo un sitio de corte dentro del plásmido. Los fragmentos obtenidos de 228, 336,432 y 468 pb corresponden a las secuencias que codifican las hPRLs de 53, 79, 111 y 123 aminoácidos, respectivamente (Figura 4A).

Adicionalmente, se hizo una segunda digestión con BamHI-EcoRI con un total de tres sitios de restricción que genera 3 fragmentos (Figura 4B). El primer segmento es constante y corresponde a los primeros 200 pb de los fragmentos de hPRL, el segundo segmento, que representa a la parte final de cada fragmento de hPRL, tiene tamaños variables dependiendo de la construcción de 646, 724, y 820 pb para las hPRLs de 53,

79 y 123 respectivamente. El segmento de ~7.9 kb corresponde al resto del plásmido (Figura 4B).

La secuenciación de los distintos plásmidos mediante el método de terminación (Sanger) verificó la adecuada inserción en el plásmido (pCMV-Vi-Puro) de los productos clonados. La Figura 5 ilustra la secuencia correcta de los plásmidos al inicio y al final de la transcripción. Así, al inicio de la secuencia de las hPRLs se observó el sitio de restricción BamHI, necesario para la clonación y la secuencia consenso Kozak (necesaria para aumentar la traducción del mRNA) y la secuencia ATG que codifica la metionina del inicio de la traducción (Figura 5A). De igual manera, al final de cada secuencia que codifica los diferentes fragmentos de hPRL, se observó una homogeneidad en el codón de terminación (TAA) y en el sitio de restricción para Sall usado en la clonación. Como se esperaba, se observaron diferencias entre secuencias río abajo al codón de paro, debido a los diferentes tamaños de los fragmentos clonados. Estos resultados comprueban que la construcción de los plásmidos lentivirales conteniendo las secuencias de los fragmentos de hPRL fue adecuada.

VII.1.1. Construcción del plásmido vacío (pCMV-V-Puro)

También se construyó un plásmido no codificante (vacío) para generar un vector lentiviral control. Para esto, se utilizó una reacción de hibridación que permitió el apareamiento de los oligonucleótidos *forward* y *reverse* que generaron una secuencia corta no traducible con extremos cohesivos para BamHI y Sall respectivamente. Para verificar el apareamiento correcto, el producto de digestión se corrió en un gel de agarosa al 4%. Se obtuvo una banda con un peso aproximado de 27 pb que corresponden al tamaño esperado (Figura 6B). El producto fue purificado y se ligó al plásmido pCMV-GFP-Puro, al cual previamente se le eliminó la secuencia correspondiente a la proteína GFP con las enzimas de restricción BamHI y Sall.

La construcción de la ligación fue verificada mediante restricción enzimática. Como se muestra en la Figura 6A el plásmido presenta sitios de restricción para Apal y EcoRI este último sólo corta una vez dentro del plásmido pCMV-V-Puro y no dos veces como en el caso del plásmido pCMV-Vi-Puro. El plásmido fue linealizado con la enzima BamHI (Figura 6C) y procesado con una doble digestión con BamHI-Apal que generó 2

fragmentos de 6,689 y 1,194 pb (Figura 6C) que corresponden a los esperados. Estos resultados comprueban que la construcción del plásmido lentiviral conteniendo una secuencia no traducible fue adecuada.

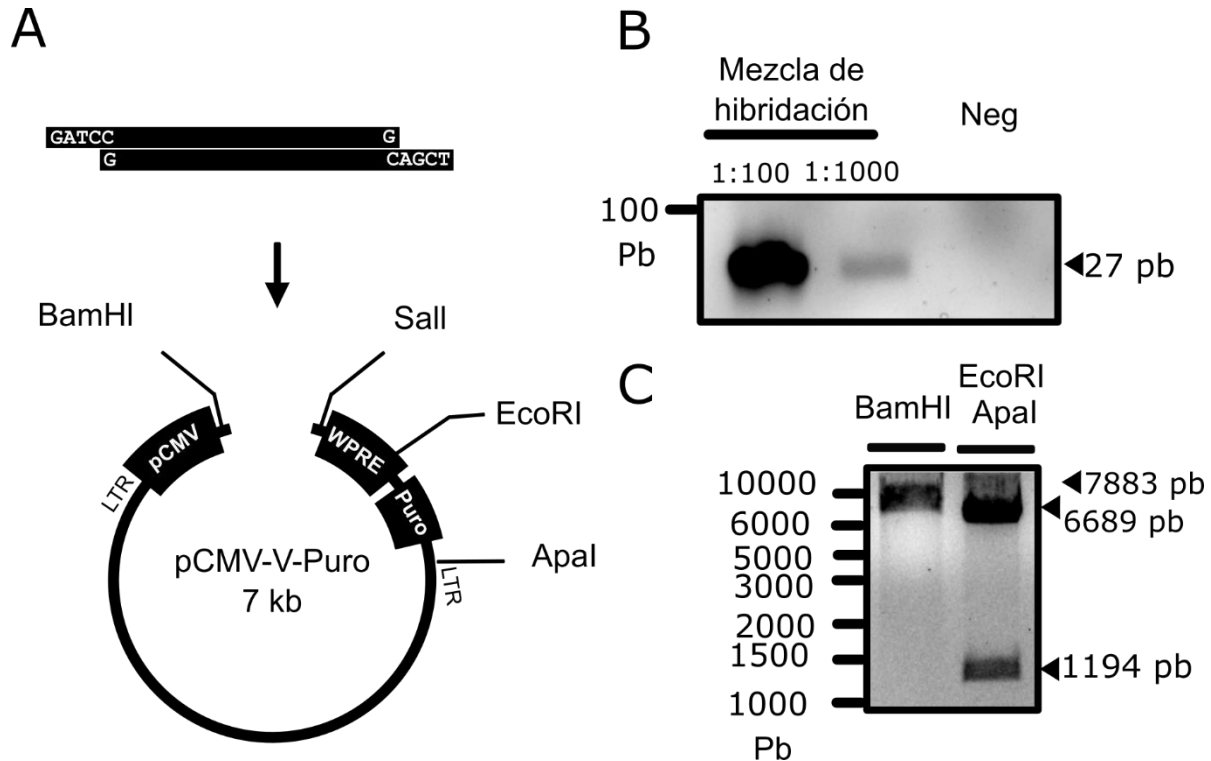


Figura 6. Construcción del plásmido pCMV-V-Puro no codificante (vacío) y verificación por restricción. **A)** Esquema de hibridación de 2 oligonucleótidos traslapados con una secuencia no traducible, y desfasados con extremos cohesivos para sitios BamHI y Sall. Esta construcción se insertó en el plásmido pCMV-Puro. Se muestran los sitios de restricción para las enzimas de restricción BamHI, Sall, EcoRI y Apal. **B)** Producto (27 pb) de la reacción de hibridación del apareamiento de los oligonucleótidos a una dilución de 1:100 y 1:1'000 con un control negativo en un gel de agarosa al 4%. **C)** Productos de digestión del plásmido pCMV-V-Puro con BamHI (linearizado), y EcoRI y Apal. El plásmido lineal tuvo 7,883 pb. La doble digestión con EcoRI y Apal generó los fragmentos esperados de 1,194 y 6,689 pb.

VII.2. Capacidad de las células HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos recombinantes para producir los fragmentos de hPRL

Con el fin de evaluar la funcionalidad de los plásmidos pCMV-Vi-Puro, células HEK293T/17 fueron transfectadas con los distintos plásmidos utilizando fosfato de calcio. Como control se usó el plásmido reportero pCMV-GFP-Puro el cual permitió evaluar la eficiencia de la transfección celular para expresar a la proteína GFP codificada por el transgén, siendo de ~95% (Figura 7). En las HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos pCMV-Vi-Puro se analizó la transcripción, traducción y secreción de los diferentes fragmentos de la hPRL, presuntas vasoinhibinas (Vi), mediante la cuantificación relativa de los mRNA, y de las proteínas en lisados celulares y en medio condicionado de células HEK293T/17.

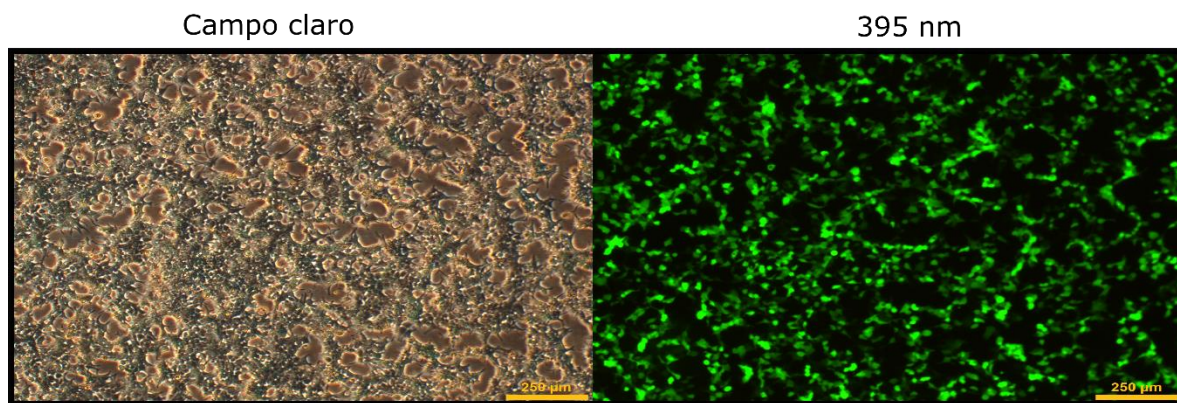


Figura 7. Transfección de las células HEK293T/17 con el plásmido pCMV-GFP-Puro. Imagen representativa de las células HEK293T/17 transfectadas con el pCMV-GFP-Puro mediante la técnica de fosfato de calcio bajo microscopía en campo claro (panel izquierdo) y fluorescencia (395 nm, panel derecho).

Con el objetivo de evaluar la transcripción de los transgenes, se realizó la cuantificación relativa de los respectivos mRNAs mediante PCR en tiempo real (Figura 8) de las células HEK293T/17 transfectadas con diferentes los plásmidos pCMV-Vi-Puro. Se encontró que el transgén se transcribe a los mRNA correspondientes para cada una de las construcciones. Sin embargo, la expresión del mRNA de la vasoinhibina 123 es

significativamente mayor comparada con la de los fragmentos de la hPRL de 1-111, 1-79 y 1-53 aminoácidos.

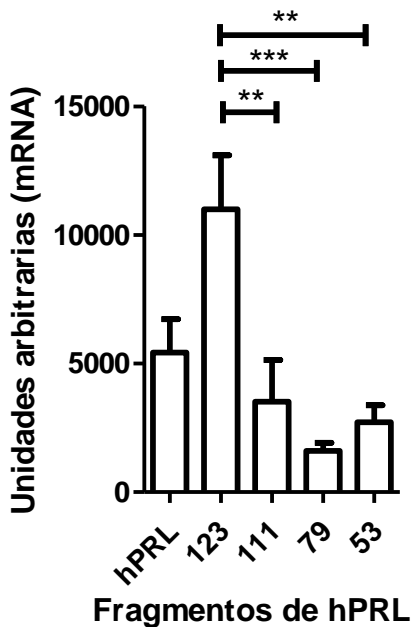


Figura 8. Cuantificación de la expresión relativa de los mRNAs de las hPRLs en las células HEK293T/17 transducidas con los diferentes plásmidos que las contienen. Expresión relativa de mRNA en las células HEK293T/17 transfectadas con los fragmentos de hPRL. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Subsecuentemente, se evaluó si los mRNAs se traducían a péptidos y si los péptidos se secretaban respectivamente por las HEK293T/17 (Figura 9). Los análisis por *Western blot* de los extractos celulares mostraron bandas inmunoreactivas para hPRL correspondientes a los distintos fragmentos clonados (Figura 9A). La proteína más abundante correspondió a la hPRL (23 kDa) (10 veces más) y a la vasoinhibina de 123 aminoácidos (14 kDa), lo que es consistente con la expresión de sus mRNAs. El péptido con menor traducción corresponde al fragmento de 53 aminoácidos de la hPRL, esto sugiere que su mRNA se podría estar degradando antes de poder traducirse o que no se transduce de manera adecuada.

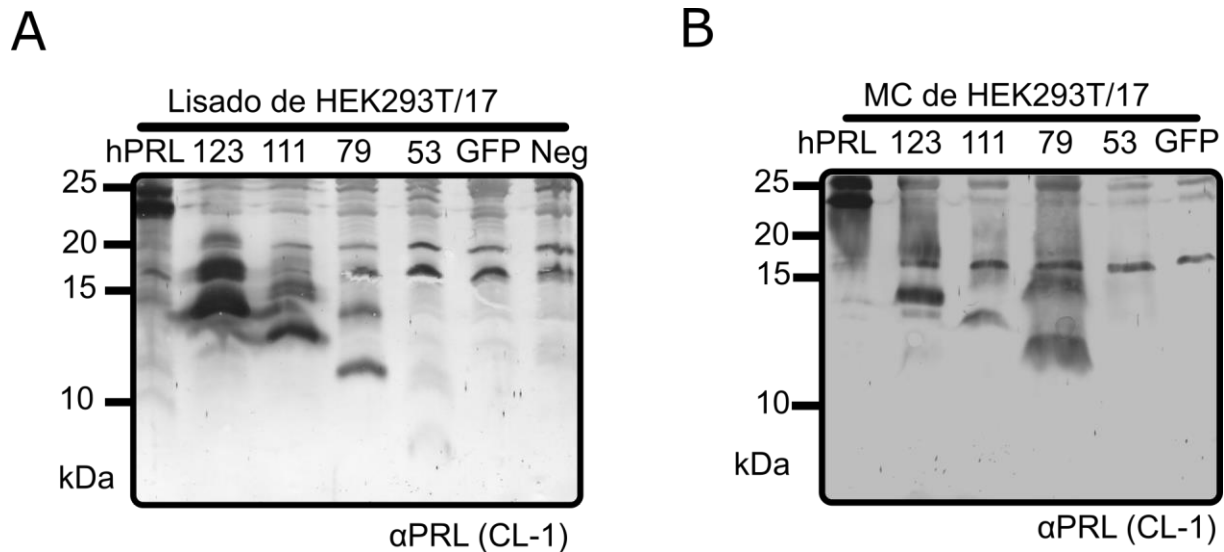


Figura 9. Presencia en extractos celulares y secreción al medio condicionado (MC) de los fragmentos de hPRL codificados por los plásmidos transfectados a HEK293T/17. **A)** *Western blot* representativo de los extractos de células HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos clonados conteniendo las secuencias de los distintos fragmentos de hPRL: pCMV-123-Puro (carril 2), pCMV-111-Puro (carril 3), pCMV-79-Puro (carril 4), pCMV-53-Puro (carril 5). Como controles incluyen el medio condicionado de células transfectadas con el pCMV-GFP-Puro (GFP) (carril 6) y el pCMV-hPRL-Puro (carril 1); y el medio condicionado de las células sin transfectar (negativo, Neg) (carril 7). **B)** *Western blot* representativo de los medios condicionados de células HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos conteniendo las secuencias de los distintas fragmentos de hPRL: pCMV-123-Puro (carril 2), pCMV-111-Puro (carril 3), pCMV-79-Puro (carril 4), pCMV-53-Puro (carril 5). Se incluye el medio condicionado de células transfectadas con el pCMV-GFP-Puro (GFP) (carril 6) y pCMV-hPRL-Puro (PRL humana) (carril 1).

La secreción de los fragmentos de hPRL se analizó mediante la evaluación de su presencia en el medio condicionado de las células HEK293T/17. La Figura 9B muestra bandas inmunoreactivas para hPRL de los tamaños esperados en los carriles correspondientes a las células transfectadas con los plásmidos que codifican todos los fragmentos de hPRL, excepto para la de 1-53 aminoácidos. Su cantidad fue más

abundante para los fragmentos de 79 y 123 aminoácidos, a pesar de que la expresión del mRNA de la vasoinhibina 123 es 3 veces mayor.

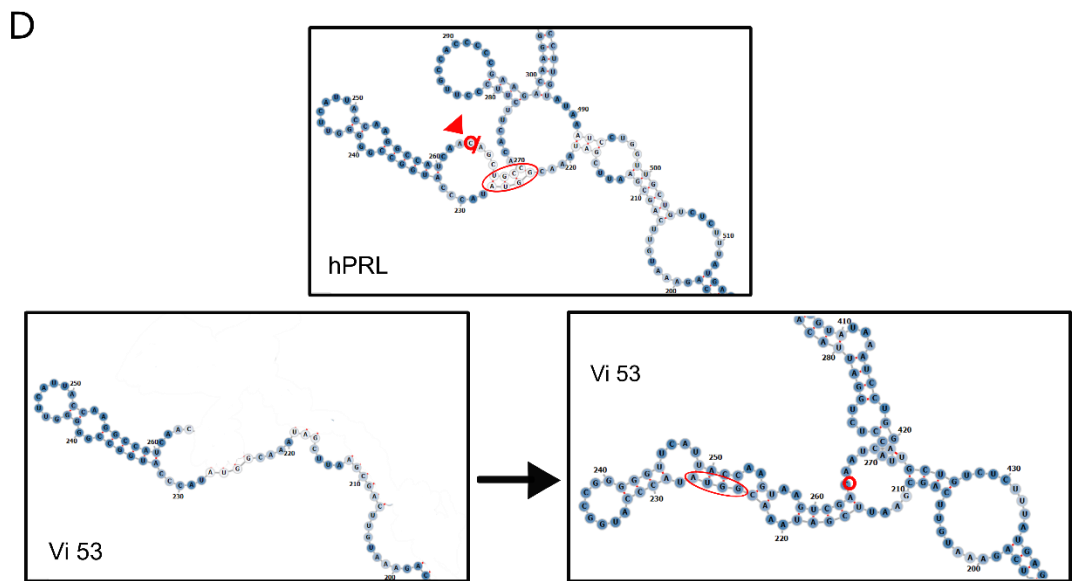
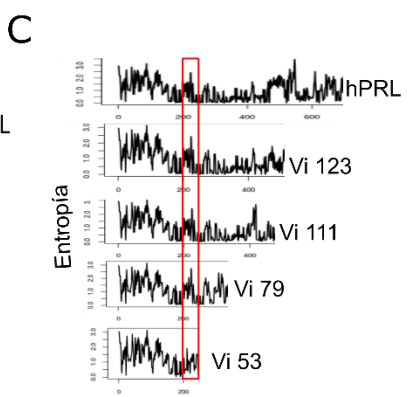
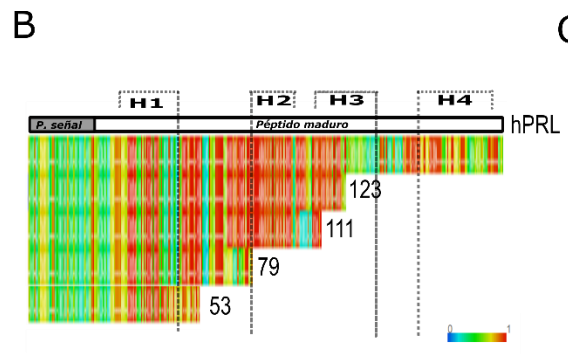
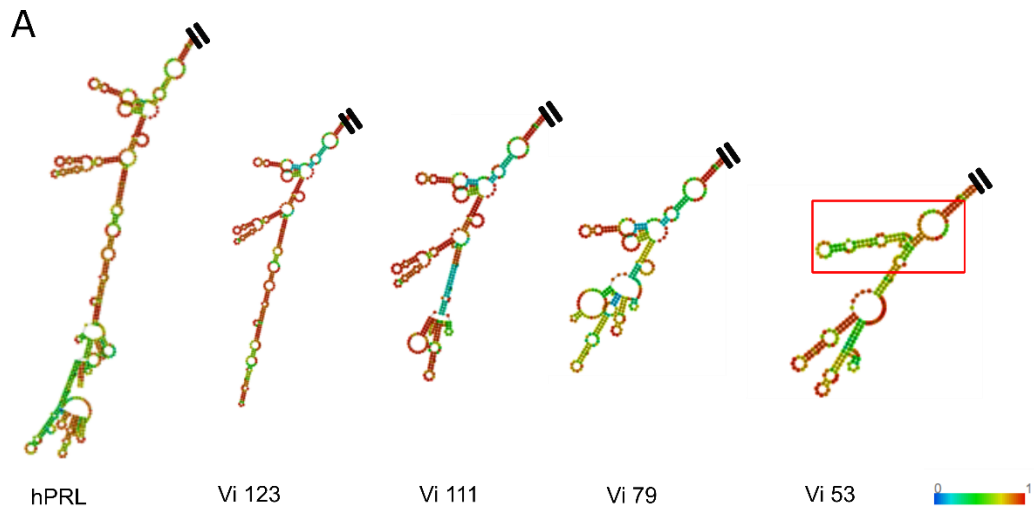


Figura 10. Análisis *in silico* de la estructura secundaria de los mRNA que codifica los fragmentos de hPRL. Estructura secundaria de mínima energía libre del mRNA que codifica los fragmentos de hPRL **A)** Notación de su secuencia **B)** Notación en forma de corchetes (forma comprimida) con respecto a la estructura de la hPRL. La barra de colores de 0 a 1 denota las bases emparejadas y/o libres, respectivamente. **C)** Se presenta el nivel de entropía de cada posición de los nucleótidos de la estructura del mRNA. **D)** Esquema de la zona perteneciente a la estructura del mRNA de la hPRL (que coincide para los fragmentos 123, Vi 111, Vi 79) y para la Vi53, donde se ilustra la pérdida de los nucleótidos excedentes (la flecha indica a partir de donde se produce la eliminación de nucleótidos) para esta última estructura y el reacomodo que sufre a consecuencia.

Además, el nivel de expresión de los mRNA de las demás fue comparable y permite descartar que una diferencia en el nivel de transcripción explique la diferente secreción de los fragmentos de hPRL. Desconocemos por qué no se secretaron al medio los fragmentos de 53 aminoácidos, esto podría ser atribuible a un problema durante la traducción del mRNA. Para evaluar posibles razones de las diferencias en la traducción se analizó *in silico* la conformación de la estructura secundaria del mRNA (Figura 10).

La predicción de la estructura secundaria de mínima energía libre de los mRNAs para las distintas hPRLs permite apreciar que, a excepción del fragmento de 53 residuos, su estructura es similar a nivel de la tercera horquilla después del corte, formando una ramificación pequeña en todas ellas. Sin embargo, en el fragmento de 53 residuos la ramificación ocurre en la horquilla anterior y tiene una estructura diferente con un mayor reacomodo (indicado por el cambio de colores) de los nucleótidos (Figura 10A y B) y, además, el nivel de entropía disminuye en esta región pero no para el resto de los fragmentos de hPRL (Figura 10C). Asimismo, se muestra que precisamente esta región de la estructura del mRNA sufre un reacomodo para el fragmento de 53 aminoácidos porque no tiene los nucleótidos codificantes para los aminoácidos consecutivos al aminoácido 54 (TAA), a diferencia de los fragmentos de 79, 111, 123 aminoácidos (Figura 10D).

Cabe mencionar que todos los extractos celulares como los medios condicionados muestran bandas inmunoreactivas de tamaños mayores a los esperados para los fragmentos de las hPRLs, excepto para la Vi 123 donde, además de las bandas de mayor tamaño, también se observa la del tamaño esperado (14 kDa). La especificidad de la detección se validó mediante la ausencia de bandas inmunoreactivas equivalentes en los controles transfectados con el plásmido que codifica la GFP como en cultivos no transfectados (negativo, Neg).

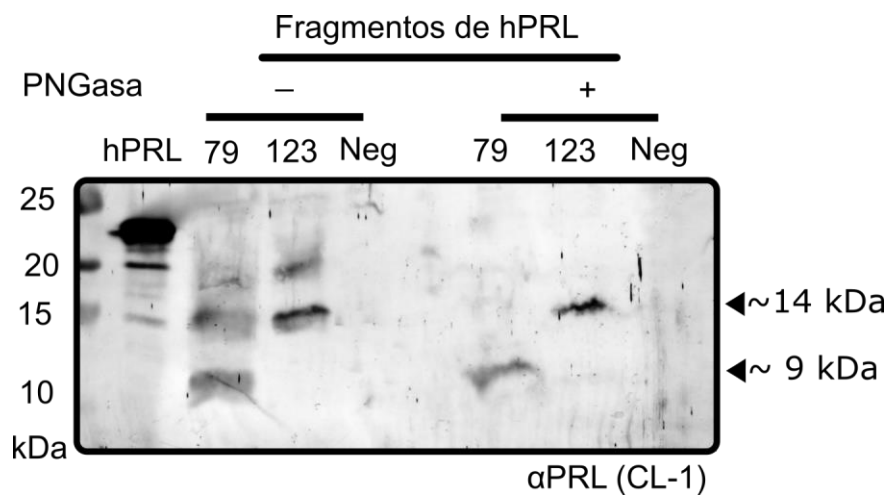


Figura 11. Desglicosilación de vasoinhibinas recombinantes. *Western blot* representativo de la desglicosilación de 9 μ L de medios condicionados de células HEK293T/17 con PNGasa. Se muestran los fragmentos de 123 y 79 aminoácidos sin (-) o con (+) la incubación de la PNGase. Se incluye el medio condicionado de las células sin transfectar (control negativo), el estándar de hPRL (carril 2) y el marcador de peso molecular (carril 1).

Se conoce que las células HEK tienen una alta capacidad de glicosilación por lo que las formas de mayor tamaño probablemente corresponde a isoformas glicosiladas de las proteínas recombinantes. Entonces, con el objetivo de determinar si las proteínas de mayor tamaño resultan de la glicosilación de los fragmentos de la hPRL, los medios condicionados fueron N-desglicosilados, mediante su incubación con la enzima PNGasa

F (desglicosilasa) previo a su análisis por medio de *Western blot*. La figura 11 muestra que las proteínas inmunreactivas de mayor tamaño presentes en la vasoinhibina 123 y 79 desaparecen después de su incubación con PNGase.

VII.3. Generación y caracterización de los vectores lentivirales que transducen a la proteína GFP (LV-GFP) y los fragmentos de 123 (LV-123), 111 (LV-111), 79 (LV-79) y 53 (LV-53) aminoácidos de la hPRL

Para la producción de partículas lentivirales, células HEK293T/17 fueron transfectadas mediante el método de fosfato de calcio con los plásmidos pCMV-GFP-Puro o pCMV-Vi-Puro que contienen la secuencia de las vasoinhibinas de interés, y con los plásmidos de empaquetamiento: pMDLg/pRRE (que codifica los genes gag/pol que proporcionan proteínas estructurales y la transcriptasa reversa), pRSV-Rev (que codifica las proteínas de la envoltura viral) y el pMD2.G (que codifica glicoproteína de la envoltura). La expresión celular de GFP 48 horas después de transducir los LV-GFP permitió evaluar la capacidad de transducción de los vectores lentivirales en tres tipos celulares distintos: HEK293T/17, 3T3-L1 tipo fibroblasto y en células endoteliales derivadas de arteria pulmonar bovina (CPAE) (Figura 12).

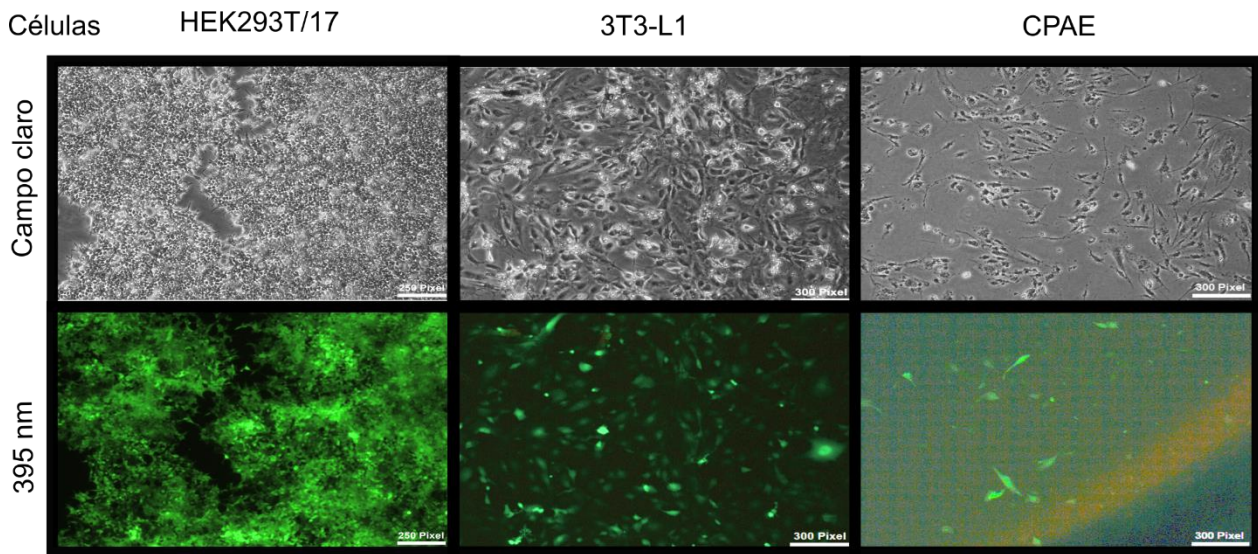


Figura 12. Imágenes representativas de células HEK293T/17, 3T3-L1 y CPAE transducidas los lentivirus que codifican GFP (LV-GFP) bajo microscopía en campo claro y fluorescencia (395 nm).

La eficiencia de transducción fue mayor en las células HEK293T/17 donde aproximadamente 95% de las células fueron positivas para GFP, mientras que las 3T3-L1 y las CPAE tuvieron una eficiencia de transducción de alrededor del 80% y 20%, respectivamente (Figura 12). Estos resultados demuestran que los lentivirus recombinantes transducen distintos tipos celulares con eficiencias diferentes. Se sabe que el tropismo de los lentivirus varía dependiendo del tipo celular entre especies se conoce que los lentivirus transducen con baja eficiencia líneas celulares de origen bovino (Ikeda et al., 2002).

Dada la baja eficiencia de la transducción de las CPAE, se utilizó un polímero denominado polibreno, que se sabe incrementa la incorporación celular de vectores lentivirales (Han et al., 2015) bajo las concentraciones crecientes de 0.5, 1, 2, 4, 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13). Setenta y dos horas después de la transducción, se observó una relación dosis-respuesta donde la mayor dosis de polibreno se asoció con una mayor expresión celular de la GFP (Figura 13).

Sin embargo, a la concentración de 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$ el polibreno resultó tóxico para las células. La concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ fue la de mayor eficiencia con toxicidad mínima y, por ende, la utilizada en los experimentos subsecuentes.

La proporción de las células transducidas aumentó mediante su selección vía la resistencia a puromicina conferida por los vectores lentivirales. Para esto se estableció la dosis de la puromicina mínima letal media en células HEK293T/17 y CPAE. Las HEK293T/17 y CPAE sin transducir se trataron con dosis crecientes de puromicina y se encontró que la mínima dosis de puromicina a la cual se muere aproximadamente el 50% de las células HEK293T/17 y el 85% de las CPAE es de 3 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14). Posteriormente, los lentivirus fueron titulados en células HEK293T/17 utilizando diluciones de medio condicionado conteniendo las partículas lentivirales y las células transducidas seleccionadas con 3 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina (Tabla 3).

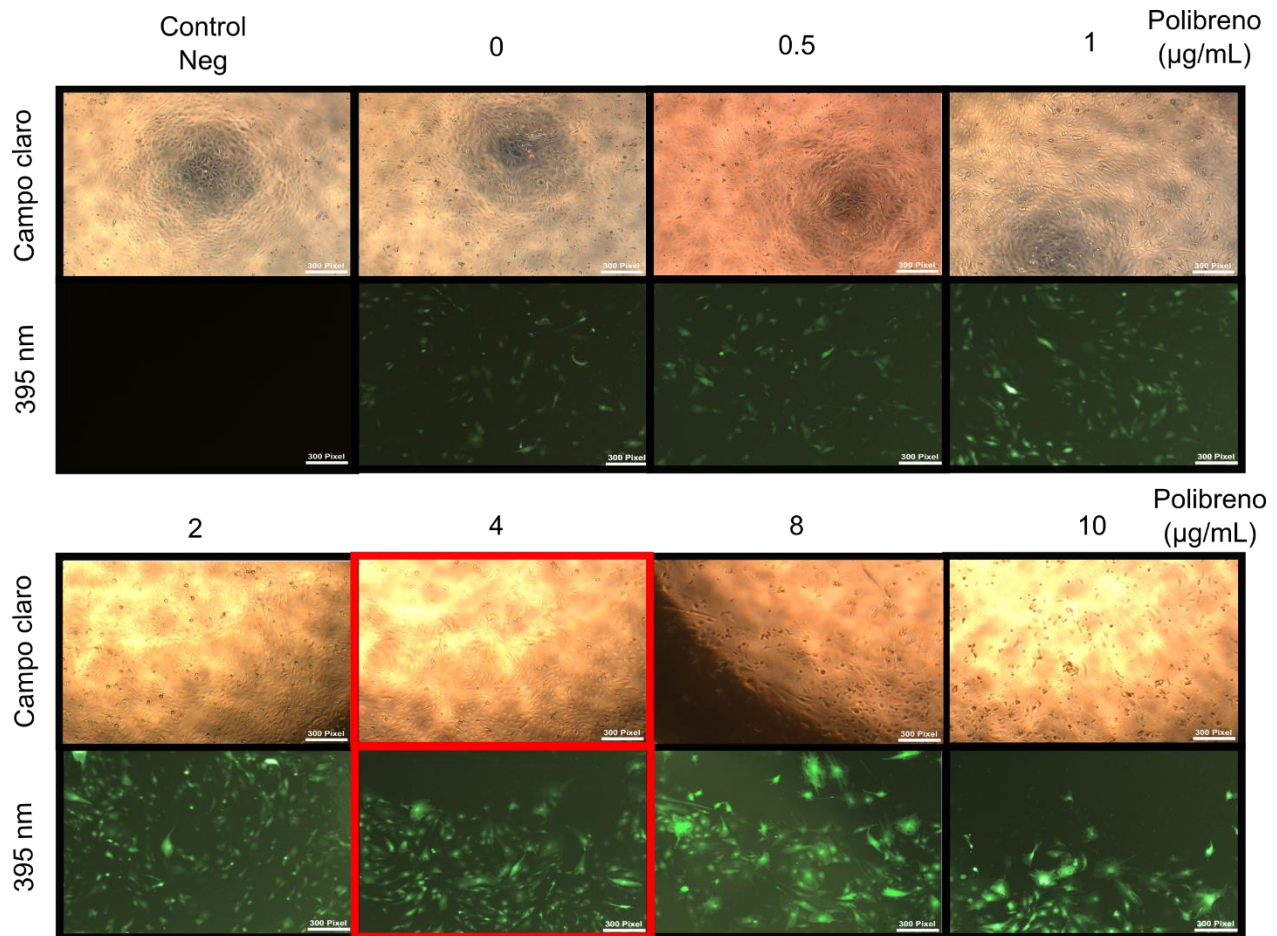


Figura 13. Optimización de transducción de células CPAE con LV-GFP con polibreno. Imágenes representativas bajo microscopía de campo claro y fluorescencia (395 nm) de CPAE 72 horas después de haber sido transducidas con LV-GFP en presencia de dosis crecientes de polibreno (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$). La fluorescencia de la GFP aumenta dependiente a la dosis de polibreno pero las concentraciones de 8 y 10 $\mu\text{g/mL}$ tienen menor cantidad celular y morfología celular senescente. La concentración que favorece una mayor transducción celular y morfología celular de monocapa (marco rojo) fue de 4 $\mu\text{g/mL}$. El control negativo (Neg) muestra células no transducidas en ausencia de polibreno.

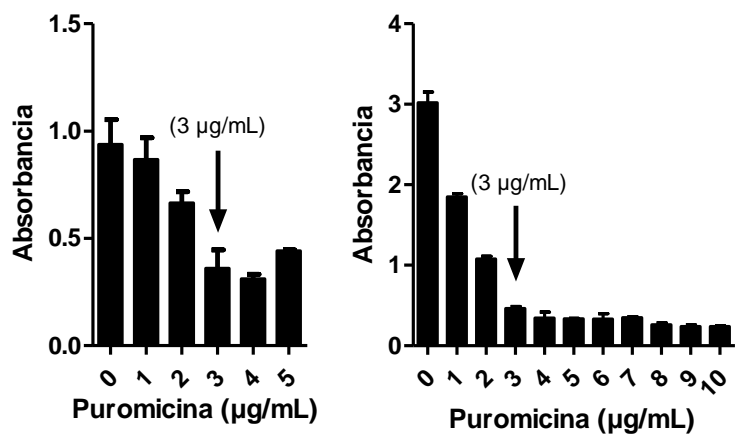


Figura 14. Viabilidad celular y resistencia a la puromicina de células HEK293T/17 y CPAE. Se muestra la curva dosis-respuesta a la puromicina para las células HEK293T/17 y CPAE y la flecha indica la dosis mínima letal media de las células. Se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. En ambos casos los cultivos son controles no transducidos.

Tabla 3. Títulos lentivirales. Distintas construcciones de lentivirus con sus respectivas titulaciones (TU/µL).

| Nombre | Título lentiviral (TU/µL) |
|---------|---------------------------|
| LV-GFP | 8.8x10 ³ |
| LV-V | 5x10 ³ |
| LV-hPRL | 1x10 ⁴ |
| LV-123 | 9.2x10 ³ |
| LV-111 | 7.6x10 ³ |
| LV-79 | 5.8x10 ³ |
| LV-53 | 8.5x10 ³ |

VII.4. Capacidad de las células HEK293T/17 transducidas con los lentivirus recombinantes para secretar los fragmentos de hPRL

Finalmente se evaluó la capacidad de secretar los fragmentos de hPRL que comprenden de 1-123, 1-111, 1-79 y 1-53 aminoácidos en células HEK293T/17 transducidas con vectores lentivirales que codifican las distintas hPRLs, LV-123, LV-111, LV-79 y LV-53, respectivamente (Figura 15). Las células HEK293T/17 transducidas con los lentivirus

recombinantes fueron seleccionadas con 3 µg/mL y su medio condicionado fue analizado mediante *Western blot*. La figura 15 muestra bandas inmunoreactivas para hPRL claras en los carriles correspondientes a los fragmentos de hPRL de 1-123, 1-111 y 1-79 aminoácidos pero poco aparentes en el carril del fragmento de 1-53 residuos. Los fragmentos de 123 y 79 aminoácidos se encuentran en mayor cantidad y todos presentan isoformas de tamaños esperados y mayores. El patrón de las bandas inmunoreactivas es similar de las células HEK293T/17 transfectadas con los plásmidos previo a su empaquetamiento en partículas virales (Figura 9B). Esto sugiere que el patrón de transcripción, traducción y secreción en células HEK293T/17 no se afecta por las diferentes vías de inserción genómica, transfección plásmidica o transducción lentiviral. Ambos sistemas fueron ineficaces para la producción del fragmento de 1 a 53 aminoácidos de la hPRL.

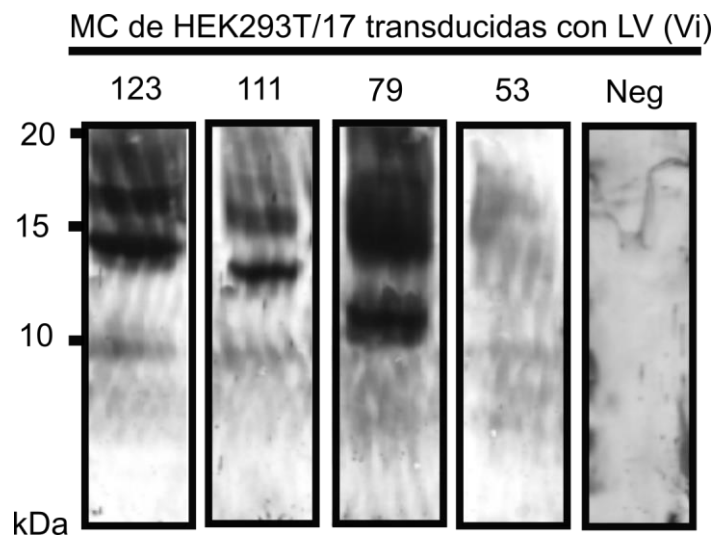


Figura 15. Secreción de fragmentos de hPRL recombinantes por células HEK293T/17 transducidas con LV. *Western blot* representativo de los medios condicionados (MC) de células HEK293T/17 transducidas con LV-123 (carril 1), LV-111 (carril 2), LV-79 (carril 3) y LV-53 (carril 4). Se incluye el medio condicionado de células no transducidas (Neg) (carril 5).

VII.5. Evaluación de la expresión y secreción de los fragmentos de hPRL con LV-79 y LV-123 en CPAE

Se evaluó la eficiencia de la transducción en las CPAE utilizando el vector lentiviral LV-GFP y observando la expresión de la proteína GFP al día 7, se observa una mayor transducción de GFP comparando con el día 3 post-transfección (Figura 16A). Por lo tanto, se evaluó la capacidad de los vectores LV-79 y LV-123 para transcribir y secretar los fragmentos de hPRL de 79 y 123 aminoácidos de la hPRL al día 7 post-transfección. La expresión del mRNA mediante PCR tiempo real mostró que ambas secuencias se transcriben, si bien la expresión del fragmento de hPRL de 79 aminoácidos fue significativamente mayor al de la vasoinhibina 123 (Figura 16B).

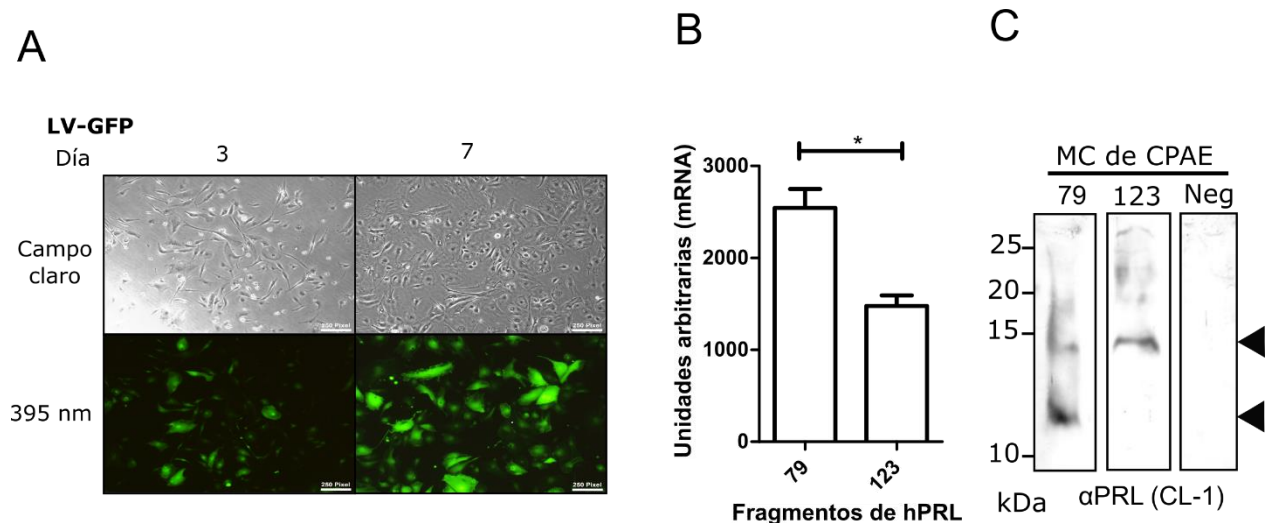


Figura 16. Expresión del mRNA y secreción de los fragmentos de hPRL por células CPAE transducidas con LV-79 y LV-123. A) Imagen representativa de células CPAE transducidas con LV-GFP a los 3 y 7 días (paneles superiores) y su fluorescencia al exponerlas a luz de 395 nm (paneles inferiores). **B)** Expresión relativa del mRNA de las células transducidas con LV-79 y LV-123. **C)** *Western blot* representativo de los medios condicionados (MC) de células CPAE transducidas con LV-79 (carril 1) y LV-123 (carril 2). Se incluye el medio condicionado de células no transducidas (Neg) (carril 3) (* $p < 0.05$).

Estas diferencias parecen apreciarse cuando se evalúan las proteínas en el medio condicionado de las células CPAE por *Western blot* en condiciones reductoras (Figura

16C). Sin embargo, la técnica de *Western blot* es semicuantitativa y se requiere procesar diferentes diluciones de los medios condicionados para demostrar que hay una mayor secreción de la hPRL de 79 aminoácidos respecto de la de 123 aminoácidos. También se observa la presencia de proteínas inmunoreactivas de mayor tamaño a los esperados (>9 kDa y >14 kDa para las hPRLs de 79 y 123 residuos, respectivamente) que probablemente corresponden a isoformas glicosiladas de estos péptidos porque tiene un patrón de bandas inmunoreactivas similar al de las células HEK293T/17.

VII.6. Evaluación de la proliferación de células CPAE transducidas con LV-79

Dado que las células CPAE transducidas con los LV-79 producen y secretan este péptido y datos de nuestro laboratorio (no publicados) obtenidos utilizando dinámica molecular mostraron que la α -hélice 1 y el *loop* 1 tienen propiedades electrostáticas e hidrofóbicas, distintas a la de la molécula integra de la hPRL, que pudiera corresponder al dominio funcional de las vasoinhibinas, se procedió a evaluar si dicha producción se traduce en una menor proliferación celular, es decir si el fragmento de 79 residuos de la hPRL tiene actividad de vasoinhibina.

Para esto se determinó el número y la actividad metabólica de las CPAE que secretan o no a la hPRL de 79 residuos (Figura 17). Micrografías representativas de células CPAE transducidas con LV-79 y que secretan el péptido de 79 aminoácidos muestran un número menor de células desde el día 3 hasta el día 7 comparada con el control negativo de células no transducidas (Figura 17A). La cuantificación del número de células (Figura 1B) confirmó la disminución de células.

Asimismo, una cuantificación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT de las CPAE transducidas con LV-79 (Figura 17C) mostró una disminución significativa en la viabilidad de las células endoteliales que producen el fragmento de 79 aminoácidos comparadas con el control negativo. Estos resultados sugieren que el péptido de 79 aminoácidos de la hPRL comparte propiedades proapoptóticas de las vasoinhibinas.

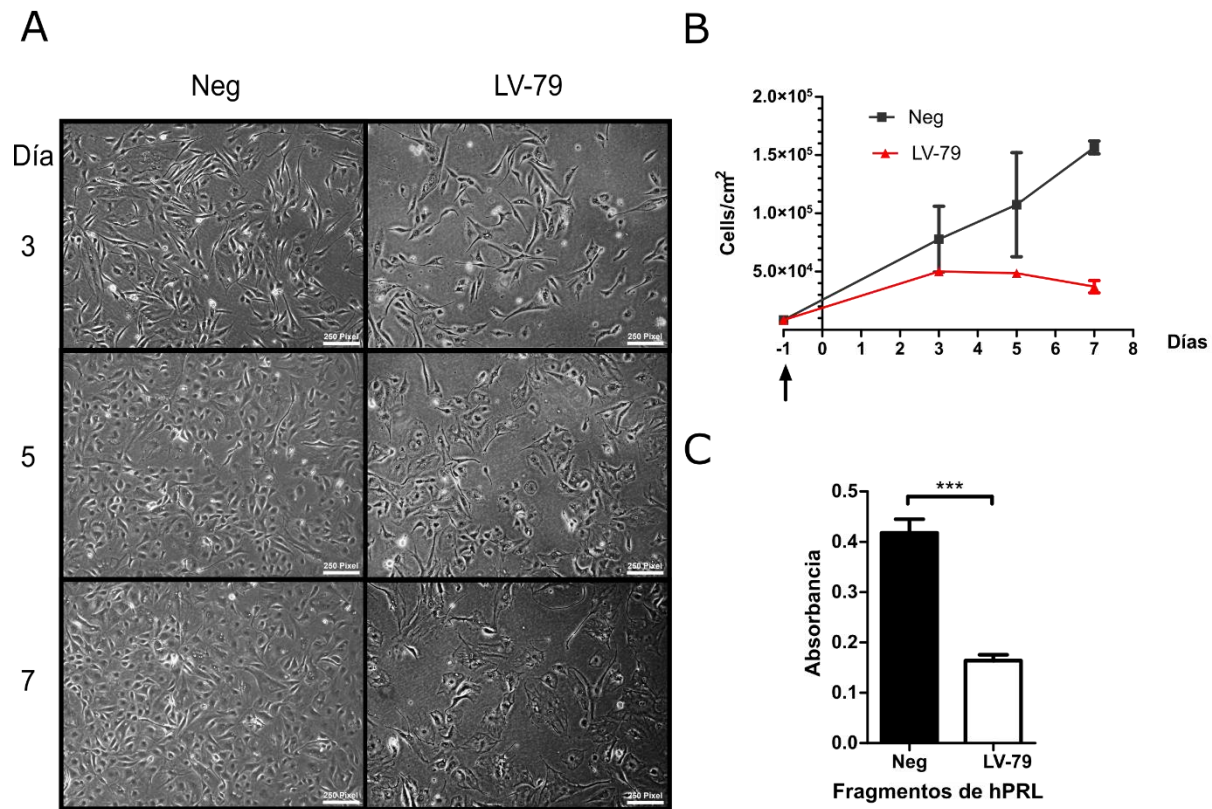


Figura 17. Disminución de la proliferación de células CPAE transducidas con el vector lentiviral que transduce a la hPRL de 79 aminoácidos (LV-79). **A)** Micrografía de CPAE transducidas con el LV-79 (panel derecho) o sin transducir (Neg, panel izquierdo), a los 7 días posteriores a su transducción. **B)** Densidad celular a los 3, 5 y 7 días después de transducir a las CPAE con los vectores que codifican la hPRL de 79 aminoácidos y de CPAE no transducidas (Neg). **C)** Cuantificación de la viabilidad celular mediante MTT de las CPAE transducidas con LV-79 (79) y no transducidas (Neg) (***) ($p < 0.001$)

VIII. DISCUSIÓN

El estudio de los factores reguladores de la angiogénesis ha ido en aumento debido a que su desbalance conlleva una vascularización excesiva, la cual es determinante para la progresión de enfermedades como cáncer, artritis y retinopatías vasoproliferativas (Carmeliet, 2003). Los reguladores negativos de la angiogénesis, son los que causan mayor interés por su potencial terapéutico (Cao, 2001). Las vasoinhibinas son una familia de péptidos N-terminales derivados del corte proteolítico específico de la hPRL, que tienen actividad antiangiogénica (Clapp et al., 2006, Clapp et al., 2009). Enzimas como la catepsina D (Piwnica et al., 2004), las metaloproteasas de matriz (Macotela et al., 2006) y la proteasa morfogénica de hueso (Ge et al., 2007) generan fragmentos de hPRL con masas moleculares de 5 a 18 kDa (Triebel et al., 2015). Sin embargo, sólo se ha investigado la actividad antiangiogénica de los fragmentos de hPRL mayores a 14 kDa. El objetivo de este trabajo fue generar un sistema de producción eficaz de fragmentos menores a 14kDa que comprenden los residuos de 1-53, 1-79 y 1-111, los cuales nunca se habían producido de manera recombinante, para posteriormente determinar si tienen efectos de vasoinhibinas. En este estudio, se clonaron estos fragmentos de hPRL menores a 14 kDa (1-53, 1-79 y 1-111 aminoácidos) y como control la vasoinhibina de 14 kDa (1-123 aminoácidos) y la hPRL, se generaron lentivirus recombinantes que expresan de manera independiente cada uno de los fragmentos de hPRL, se probó que secreten el péptido correspondiente, y se obtuvieron resultados preliminares que sugieren que el fragmento de 9 kDa (79 aminoácidos) tiene propiedades antiangiogénicas.

Fragmentos de hPRL de aproximadamente 9 y 12 kDa se han observado en líquido amniótico de mujeres con preeclampsia (González et al., 2007) y se sabe que la catepsina D (Piwnica et al., 2004) y las MMPs (Macotela et al., 2006) generan fragmentos de la hPRL de estos pesos. Por ende, es importante estudiar la actividad biológica de estos fragmentos. Además, la identificación de las vasoinhibinas más pequeñas con propiedades antiangiogénicas facilitaría su eventual empleo como estrategia terapéutica en enfermedades caracterizadas por una angiogénesis excesiva.

El estudio de las vasoinhibinas, ha utilizado preparaciones generadas bioquímicamente o mediante metodología recombinante. La producción bioquímica, vía la incubación de la

hPRL con las proteasas (Clapp, 1987), tuvo desventajas en los rendimientos y el alto costo. Solamente el 1% de un miligramo de la hPRL se traduce a una vasoinhibina utilizable y, dado el alto costo del estándar de la hormona, cada procesamiento tenía un costo aproximado de \$1000 USD. Fue entonces que se optó por la producción recombinante de vasoinhibinas en bacteria (Clapp et al., 1993), en células de mamífero (Bentzien et al., 2001) y de insecto (Galfione et al., 2003). Las vasoinhibinas generadas en bacterias no tienen modificaciones postraduccionales que pudieran ser necesarias para su actividad y presentan una importante contaminación con endotoxinas. Estas desventajas pudieron ser eliminadas mediante la producción en sistemas eucariontes. Sin embargo, todos estos sistemas se asociaron a variaciones importantes en la reproducibilidad de los efectos biológicos que se asociaron a variaciones durante los procesos de purificación y aislamiento. Para solventar estas dificultades se optó por la transferencia génica de las vasoinhibinas utilizando vectores virales como adenovirus (Kim et al., 2003) y AAV2 (Ramírez et al., 2011). No obstante, estos vectores no se integran al genoma celular por lo que se limita la transducción de células que se reproducen activamente (como el endotelio vascular); además, la producción recombinante es un reto (Moreno-Carranza et al., 2015) debido a que esta no es la manera de generar las vasoinhibinas; en la naturaleza sólo se producen a través del corte proteolítico de las hormonas precursoras y no mediante la transcripción y traducción celular.

En este trabajo, generamos las vasoinhibinas recombinantes menores e iguales a 14 kDa que comprenden los aminoácidos 1-53, 1-79 y 1-111 expresadas de manera recombinante a través del uso de vectores lentivirales. Este sistema otorga la ventaja de integrar el transgén al DNA celular permitiendo una producción constitutiva de proteínas recombinantes en células que se reproducen activamente y, con ello la posibilidad de seleccionar líneas celulares capaces de producirlas en forma estable (Barde et al., 2010). Además la eficiencia de transducción de los vectores lentivirales y su tropismo son altos en distintos tipos celulares, tanto *in vivo* como *in vitro*. De hecho, el sistema lentiviral permite evaluar la actividad de los fragmentos menores a 14 kDa, a través de la transducción directa de células endoteliales, la célula blanco de las vasoinhibinas, para analizar su actividad antiangiogénica. En este trabajo mostramos que partículas

lentivirales que transducen fragmentos de hPRL de 1-79 aminoácidos (~9kDa) resultan en la secreción de este péptido por células endoteliales en cultivo. Adicionalmente, y de manera preliminar, se observó que las partículas virales que codifican el péptido de 1-79 aminoácidos se asocian con una tasa disminuida de proliferación de cultivos primarios de células endoteliales. Asimismo, este trabajo abrió la posibilidad de generar líneas celulares de HEK293T/17 que producen vasoinhbinas recombinantes de manera estable.

Nuestro trabajo muestra la producción de fragmentos de hPRL recombinante menores e iguales a 14 kDa, que comprenden los residuos 1-53 (~6 kDa), 1-79 (~9 kDa), 1-111 (~11 kDa) y 1-123 (~14 kDa) mediante transfección de plásmidos o transducción lentiviral en células HEK293T/17 en cultivo. En las HEK293T/17, los fragmentos de 1-79 y 1-111 residuos se transcribieron en proporciones similares pero a un nivel significativamente menor que el de 123 aminoácidos; no obstante, los tres fragmentos presentaron niveles similares en extractos y medios condicionados que reflejan valores de traducción y secreción similares. En contraste, a pesar que la transcripción del fragmento de 1-53 aminoácidos fue similar al de los de 1-79 y 1-111 aminoácidos, el péptido correspondiente fue apenas perceptible en extractos celulares y no se le detectó en el medio condicionado. Resultados similares se observaron cuando se expresaron los fragmentos de la hPRL mediante transducción lentiviral en células HEK293T/17. La síntesis de vasoinhbinas recombinantes puede activar la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR), una vía de señalización que ajusta la capacidad de plegamiento de la proteína, disminuye la traducción y resulta en la degradación, vía proteosoma, de los péptidos mal plegados (Bernal et al., 2006, Moreno-Carranza et al., 2015). El hecho de que en la naturaleza las vasoinhbinas son generadas por el procesamiento proteolítico de la hPRL y no a partir de su regulación transcripcional podría explicar la activación de la UPR durante su síntesis recombinante. En particular, la menor traducción y secreción de los fragmentos de hPRL pudiera también involucrar aspectos de la estructura del mRNA que los codifica. Se exploraron las estructuras secundarias *in silico* de los mRNA que codifican estos péptidos y se observó que, a diferencia de la hPRL y de sus fragmentos de 1-79, 1-111 y 1-123 residuos, el fragmento 1-53 forma una horquilla y una ramificación en una de sus regiones que no están presentes en los otros transcritos. Se conoce que en algunos casos las horquillas pueden interferir con el ensamblaje del complejo de pre-iniciación de

traducción (Leppek et al., 2018), lo que podría explicar el bajo nivel del péptido. La hPRL de 1-53 aminoácidos es de interés ya que puede generarse mediante la proteólisis de la hPRL con trombina, una proteasa importante en procesos de coagulación y reparación tisular (Maragoudakis et al., 2002). Si bien queda pendiente resolver los problemas asociados con su producción recombinante, una alternativa es el obtener y purificar este fragmento mediante su procesamiento enzimático con trombina.

Otro aspecto importante de mencionar, es que una proporción importante de los fragmentos recombinantes se encuentra glicosilada tanto en las células HEK293T/17 como en las endoteliales. Se ha reportado que la glicosilación no afecta las propiedades biológicas de las vasoinhibinas (Piwnica et al., 2004). Sin embargo, en un estudio reciente del laboratorio se observó que la desglicosilación de las vasoinhibinas incrementa su actividad antiangiogénica (Robles, 2014). A pesar de esto, la terapia génica con vasoinhibinas utilizando vectores recombinantes derivados de adenovirus y AAV2 ha resultado efectiva para proveer vasoinhibinas con propiedades antiangiogénica (Kim et al., 2003, Pan et al., 2004, Ramírez et al., 2011) y en nuestro estudio encontramos resultados preliminares que muestran una menor proliferación en células endoteliales transducidas con los vectores lentivirales que codifican la hPRL de 79 aminoácidos.

En resumen, se produjeron por primera vez fragmentos de hPRL recombinante menores de 14 kDa. Aunque el péptido más pequeño (6 kDa) no se logró producir, por lo menos en cantidades detectables, posiblemente debido a su mala traducción o por problemas relacionados con la estructura secundaria del mRNA. Asimismo, en este trabajo mostramos que los vectores lentivirales permiten transducir vasoinhibinas en tres tipos celulares diferentes y tienen la potencialidad de generar líneas celulares que las produzcan establemente. En forma consistente, obtuvimos resultados preliminares que muestran que el fragmento de hPRL que comprende los aminoácidos 1 a 79 inhibe la proliferación endotelial, lo que lo convertiría en el miembro más pequeño de la familia de las vasoinhibinas. Sin embargo, es necesario corroborar estos resultados y compararlos con los efectos de transducir a las células endoteliales con el vector vacío (no codificante) y con el vector de la hPRL, que también se sintetizaron como parte de esta tesis, que no

tienen efectos antiangiogénicos. Estos resultados ayudarán a entender como la variedad estructural de las vasoinhibinas se relaciona con sus implicaciones funcionales.

IX. CONCLUSIONES

IX.1. Los fragmentos de hPRL menores a 14 kDa que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79 y 1 a 111 se producen de manera recombinante en células HEK293T/17.

IX.2. El sistema de expresión lentiviral es eficiente y capaz de transducir fragmentos de hPRL, iguales o menores a 14 kDa que comprenden los aminoácidos 1 a 53, 1 a 79 y 1 a 111 en las líneas celulares HEK293T/17, 3T3-L1 y CPAE.

IX.3. El fragmento que va del aminoácido 1 a 79 de la hPRL parece compartir las propiedades antiangiogénicas de las vasoinhibinas colocándola como el miembro más pequeño de la familia de las vasoinhibinas.

X. REFERENCIAS

Adams, R. H. and K. Alitalo (2007). "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis". *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(6): 464-478.

Bajou, K., S. Herkenne, V. L. Thijssen, S. D'Amico, N. Q. Nguyen, A. Bouche, S. Tabruyn, M. Srahna, J. Y. Carabin, O. Nivelles, C. Paques, I. Cornelissen, M. Lion, A. Noel, A. Gils, S. Vinckier, P. J. Declerck, A. W. Griffioen, M. Dewerchin, J. A. Martial, P. Carmeliet and I. Struman (2014). "PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin". *Nat Med* **20**(7): 741-747.

Barde, I., P. Salmon and D. Trono (2010). "Production and titration of lentiviral vectors". *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 4**: Unit 4 21.

Bentzien, F., I. Struman, J. F. Martini, J. Martial and R. Weiner (2001). "Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice". *Cancer Res* **61**(19): 7356-7362.

Bernales, S., F. R. Papa and P. Walter (2006). "Intracellular signaling by the unfolded protein response". *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 487-508.

Brasseur, R., T. Pillot, L. Lins, J. Vandekerckhove and M. Rosseneu (1997). "Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability". *Trends Biochem Sci* **22**(5): 167-171.

Brooks, C. L. (2012). "Molecular mechanisms of prolactin and its receptor". *Endocr Rev* **33**(4): 504-525.

Buglioni, S., I. D'Agnano, M. Cosimelli, S. Vasselli, C. D'Angelo, M. Tedesco, G. Zupi and M. Mottolise (1999). "Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2". *Int J Cancer* **84**(6): 545-552.

Cao, Y. (2001). "Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications". *Int J Biochem Cell Biol* **33**(4): 357-369.

Cao, Y., A. Chen, S. S. An, R. W. Ji, D. Davidson and M. Llinas (1997). "Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth". *J Biol Chem* **272**(36): 22924-22928.

Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease". *Nat Med* **9**(6): 653-660.

Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine". *Nature* **438**(7070): 932-936.

Clapp, C. (1987). "Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms". *Endocrinology* **121**(6): 2055-2064.

Clapp, C. and R. I. Weiner (1992). "A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells". *Endocrinology* **130**(3): 1380-1386.

Clapp, C., J. A. Martial, R. C. Guzmán, F. Rentier-Delure and R. I. Weiner (1993). "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis". *Endocrinology* **133**(3): 1292-1299.

Clapp, C., J. Aranda, C. González, M. C. Jeziorski and G. M. Martínez de la Escalera (2006). "Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function". *Trends in Endocrinology and Metabolism* **17**(8): 301-307.

Clapp, C., S. Thebault, M. C. Jeziorski and G. Martínez De La Escalera (2009). "Peptide hormone regulation of angiogenesis". *Physiol Rev* **89**(4): 1177-1215.

Cruz-Soto, M. E., G. Cosio, M. C. Jeziorski, V. Vargas-Barroso, M. B. Aguilar, A. Carabez, P. Berger, P. Saftig, E. Arnold, S. Thebault, G. Martínez de la Escalera and C. Clapp (2009). "Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipophyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules". *Endocrinology* **150**(12): 5446-5454.

D'Angelo, G., J. F. Martini, T. Iiri, W. J. Fantl, J. Martial and R. I. Weiner (1999). "16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells". *Mol Endocrinol* **13**(5): 692-704.

Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R. J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono and L. Naldini (1998). "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system". *J Virol* **72**(11): 8463-8471.

Ferrara, N., C. Clapp and R. Weiner (1991). "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells". *Endocrinology* **129**(2): 896-900.

Folkman, J. (2006). "Angiogenesis". *Annu Rev Med* **57**: 1-18.

Galfione, M., W. Luo, J. Kim, D. Hawke, R. Kobayashi, C. Clapp, L. Y. Yu-Lee and S. H. Lin (2003). "Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells". *Protein Expr Purif* **28**(2): 252-258.

Garcia, C., J. Aranda, E. Arnold, S. Thebault, Y. Macotela, F. Lopez-Casillas, V. Mendoza, H. Quiroz-Mercado, H. L. Hernandez-Montiel, S. H. Lin, G. M. de la Escalera and C. Clapp (2008). "Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation". *J Clin Invest* **118**(6): 2291-2300.

Ge, G., C. A. Fernández, M. A. Moses and D. S. Greenspan (2007). "Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor". *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(24): 10010-10015.

González, C., A. M. Corbacho, J. P. Eiserich, C. García, F. López-Barrera, V. Morales-Tlalpan, A. Barajas-Espinosa, M. Díaz-Muñoz, R. Rubio, S. H. Lin, G. Martínez de la Escalera and C. Clapp (2004). "16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation". *Endocrinology* **145**(12): 5714-5722.

González, C., A. Parra, J. Ramírez-Peredo, C. García, J. C. Rivera, Y. Macotela, J. Aranda, M. Lemini, J. Arias, F. Ibarquengoitia, G. M. Martínez de la Escalera and C. Clapp (2007). "Elevated vaso-inhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia". *Lab Invest* **87**(10): 1009-1017.

Han, M., D. Yu, Q. Song, J. Wang, P. Dong and J. He (2015). "Polybrene: Observations on cochlear hair cell necrosis and minimal lentiviral transduction of cochlear hair cells". *Neurosci Lett* **600**: 164-170.

Ikeda, Y., M. K. Collins, P. A. Radcliffe, K. A. Mitrophanous and Y. Takeuchi (2002). "Gene transduction efficiency in cells of different species by HIV and EIAV vectors". *Nat Gene Ther* **9**(14): 932-938.

Jiang, W., R. Hua, M. Wei, C. Li, Z. Qiu, X. Yang and C. Zhang (2015). "An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation". *Sci Rep* **5**: 13875.

Khurana, S., K. Liby, A. R. Buckley and N. Ben-Jonathan (1999). "Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin". *Endocrinology* **140**(9): 4127-4132.

Kim, J., W. Luo, D. T. Chen, K. Earley, J. Tunstead, L. Y. Yu-Lee and S. H. Lin (2003). "Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer". *Cancer Res* **63**(2): 386-393.

Kotterman, M. A., T. W. Chalberg and D. V. Schaffer (2015). "Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook". *Annu Rev Biomed Eng* **17**: 63-89.

Lee, H., I. Struman, C. Clapp, J. Martial and R. I. Weiner (1998). "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression". *Endocrinology* **139**(9): 3696-3703.

Lee, S. H., J. Kunz, S. H. Lin and L. Y. Yu-Lee (2007). "16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway". *Cancer Res* **67**(22): 11045-11053.

Leppek, K., R. Das and M. Barna (2018). "Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them". *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**(3): 158-174.

Lins, L., A. Thomas-Soumarmon, T. Pillot, J. Vandekerckhove, M. Rosseneu and R. Brasseur (1999). "Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's beta-amyloid peptide and apolipoprotein E alpha-helices". *J Neurochem* **73**(2): 758-769.

Macotela, Y., M. B. Aguilar, J. Guzmán-Morales, J. C. Rivera, C. Zermeno, F. López-Barrera, G. Nava, C. Lavalle, G. Martínez de la Escalera and C. Clapp (2006). "Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin". *J Cell Sci* **119**(Pt 9): 1790-1800.

Maragoudakis, M. E., N. E. Tsopanoglou and P. Andriopoulou (2002). "Mechanism of thrombin-induced angiogenesis". *Biochem Soc Trans* **30**(2): 173-177.

Martini, J. F., C. Piot, L. M. Humeau, I. Struman, J. A. Martial and R. I. Weiner (2000). "The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation". *Mol Endocrinol* **14**(10): 1536-1549.

Martini, J. F., C. Piot, L. M. Humeau, I. Struman, J. A. Martial and R. I. Weiner (2000). "The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation". *Mol Endocrinol* **14**(10): 1536-1549.

Mitra, I. (1980). "A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety". *Biochem Biophys Res Commun* **95**(4): 1760-1767.

Moreno-Carranza, B., J. P. Robles, M. G. Ferrer-Rios, H. Cruces-Solis, P. Reyes-Ortega, G. Martínez de la Escalera and C. Clapp (2015). "Insights in the Production of Recombinant Vasoinhibins". *Endocrine Society's 97th Annual Meeting and Expo*.

Morohoshi, K., R. Mochinaga, T. Watanabe, R. Nakajima and T. Harigaya (2018). "16 kDa vasoinhibin binds to integrin alpha5 beta1 on endothelial cells to induce apoptosis". *Endocr Connect* **7**(5): 630-636.

Nguyen, N. Q., S. P. Tabruyn, L. Lins, M. Lion, A. M. Cornet, F. Lair, F. Rentier-Delrue, R. Basseur, J. A. Martial and I. Struman (2006). "Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(39): 14319-14324.

Nicoll, C. S., G. L. Mayer and S. M. Russell (1986). "Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties". *Endocr Rev* **7**(2): 169-203.

O'Reilly, M. S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, M. Moses, W. S. Lane, Y. Cao, E. H. Sage and J. Folkman (1994). "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor

that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma". *Cell* **79**(2): 315-328.

Pan, H., N. Q. Nguyen, H. Yoshida, F. Bentzien, L. C. Shaw, F. Rentier-Delrue, J. A. Martial, R. Weiner, I. Struman and M. B. Grant (2004). "Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(7): 2413-2419.

Piwnica, D., P. Touraine, I. Struman, S. Tabruyn, G. Bolbach, C. Clapp, J. A. Martial, P. A. Kelly and V. Goffin (2004). "Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance". *Mol Endocrinol* **18**(10): 2522-2542.

Ramírez, M., Z. Wu, B. Moreno-Carranza, M. C. Jeziorski, E. Arnold, N. Díaz-Lezama, G. Martínez de la Escalera, P. Colosi and C. Clapp (2011). "Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability". *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(12): 8944-8950.

Robles, J. P. (2014). Relación estructura-función de las vasoinhibinas recombinantes. Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.

Seghezzi, G., S. Patel, C. J. Ren, A. Gualandris, G. Pintucci, E. S. Robbins, R. L. Shapiro, A. C. Galloway, D. B. Rifkin and P. Mignatti (1998). "Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis". *J Cell Biol* **141**(7): 1659-1673.

Struman, I., F. Bentzien, H. Lee, V. Mainfroid, G. D'Angelo, V. Goffin, R. I. Weiner and J. A. Martial (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**(4): 1246-1251.

Tabruyn, S. P., C. M. Sorlet, F. Rentier-Delrue, V. Bours, R. I. Weiner, J. A. Martial and I. Struman (2003). "The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB". *Mol Endocrinol* **17**(9): 1815-1823.

Teilum, K., J. C. Hoch, V. Goffin, S. Kinet, J. A. Martial and B. B. Kragelund (2005). "Solution structure of human prolactin". *J Mol Biol* **351**(4): 810-823.

Tiscornia, G., O. Singer and I. M. Verma (2006). "Design and cloning of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs". *Nat Protoc* **1**(1): 234-240.

Triebel, J., T. Bertsch, C. Bollheimer, D. Rios-Barrera, C. F. Pearce, M. Hufner, G. Martínez de la Escalera and C. Clapp (2015). "Principles of the prolactin/vasoinhibin axis". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **309**(10): R1193-1203.

Van Meerloo, J., G. J. Kaspers and J. Cloos (2011). "Cell sensitivity assays: the MTT assay". *Methods Mol Biol* **731**: 237-245.

XI. ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|---|
| 3T3-L1 | Células tipo fibroblasto de ratón |
| BSA | Albumina de Suero Bovino |
| AAV2 | Virus adeno-asociados tipo 2 |
| bFGF | Factor de crecimiento fibroblástico básico |
| BPM-1 | Proteína morfogenética de hueso 1 |
| CMV | Promotor de citomegalovirus |
| CPAE | Células endoteliales de la arteria pulmonar bovina |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| GH | Hormona de crecimiento |
| HEK293T/17 | Línea celular humana derivada de riñón embrionario |
| hPRL | Prolactina humana |
| LV-53 | Vector lentiviral que transduce el fragmento de 1-53 aminoácidos de hPRL |
| LV-79 | Vector lentiviral que transduce el fragmento de 1-79 aminoácidos de hPRL |
| LV-111 | Vector lentiviral que transduce el fragmento de 1-111 aminoácidos de hPRL |
| LV-123 | Vector lentiviral que transduce el fragmento de 1-123 aminoácidos de hPRL |
| LV-GFP | Vector lentiviral que transduce la GFP |
| LV-hPRL | Vector lentiviral que transduce la hPRL |
| LV-V | Vector lentiviral con secuencia no traducible (vacío) |
| MBP | Proteína de unión de maltosa |
| MMP | Metaloproteasas de matriz |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol |
| PAI-1 | Inhibidor tipo-1 del activador del plasminógeno |

| | |
|--------------------------------------|---|
| pCMV-53-Puro | Plásmido pLenti con promotor para CMV codifica el fragmento de 1-53 aminoácidos de hPRL con resistencia a puromicina |
| pCMV-79-Puro | Plásmido pLenti con promotor para CMV codifica el fragmento de 1-79 aminoácidos de hPRL con resistencia a puromicina |
| pCMV-111-Puro | Plásmido pLenti con promotor para CMV codifica el fragmento de 1-111 aminoácidos de hPRL con resistencia a puromicina |
| pCMV-123-Puro | Plásmido pLenti con promotor para CMV codifica el fragmento de 1-123 aminoácidos de hPRL con resistencia a puromicina |
| pCMV-GFP-Puro | Plásmido pLenti con promotor para CMV codifica GFP con resistencia a puromicina |
| pCMV-Vi-Puro | Plásmido pLenti con promotor para CMV codifica los fragmentos de hPRL con resistencia a puromicina |
| pCMV-V-Puro o pCMV-Vacío-Puro | Plásmido pLenti con promotor para CMV con una secuencia no traducible con resistencia a puromicina |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PL | Lactógeno placentario |
| PRL | Prolactina |
| TU | Unidades de transducción |
| VEGF | Factor de crecimiento vascular endotelial |
| Vi | Vasoinhibinas |
| Vi 53 | Fragmento de 1 a 53 aminoácidos de la hPRL |
| Vi 79 | Fragmento de 1 a 79 aminoácidos de la hPRL |
| Vi 111 | Fragmento de 1 a 111 aminoácidos de la hPRL |
| Vi 123 | Fragmento de 1 a 123 aminoácidos de la hPRL (vasoinhibina) |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humana |

XII. ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Página | |
|--------|--|----|
| 1 | Construcción de los plásmidos del genoma lentiviral codificantes para fragmentos de la hPRL de diferentes tamaños (Vi 53, 79, 111 y 123) | 15 |
| 2 | Diagrama de la metodología empleada para evaluar la expresión, traducción y secreción de los fragmentos de hPRL y generación lentiviral y eficiencia de transducción | 18 |
| 3 | Clonación de los cDNAs que codifican los fragmentos de hPRL recombinantes de 1-53, 1-79, 1-111 y 1-123 aminoácidos en el pCMV-GFP-Puro | 28 |
| 4 | Verificación por restricción de los productos clonados en el plásmido pCMV-Vi-Puro | 29 |
| 5 | Análisis de secuencia de los distintos productos clonados en el pCMV-Vi-Puro | 30 |
| 6 | Construcción del plásmido pCMV-V-Puro no codificante (vacío) y verificación por restricción | 32 |
| 7 | Transfección de las células HEK293T/17 con el plásmido pCMV-GFP-Puro | 33 |
| 8 | Cuantificación de la expresión relativa de los mRNAs de las hPRLs en las células HEK293T/17 transducidas con los diferentes plásmidos que las contienen | 34 |
| 9 | Presencia en extractos celulares y secreción al medio condicionado (MC) de los fragmentos de hPRL codificados por los plásmidos transfectados a HEK293T/17 | 35 |
| 10 | Análisis <i>in silico</i> de la estructura secundaria de los mRNA que codifica los fragmentos de hPRL | 36 |
| 11 | Desglucosilación de vasoinhibinas recombinantes | 38 |
| 12 | Imágenes representativas de células HEK293T/17, 3T3-L1 y CPAE transducidas con vectores lentivirales que codifican GFP | 39 |

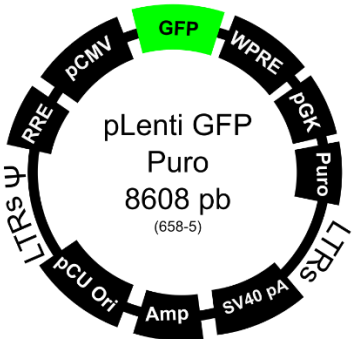
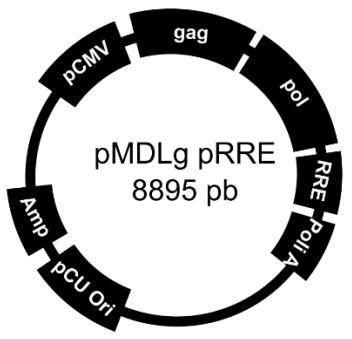
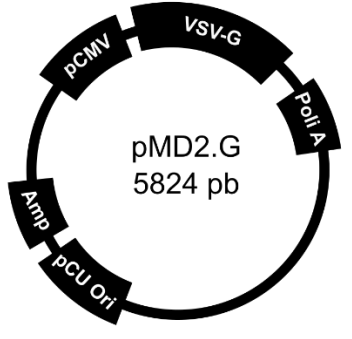
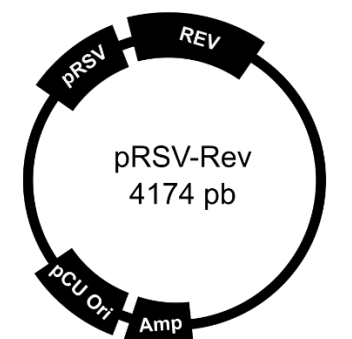
| | | |
|----|---|----|
| | (LV-GFP) bajo microscopía en campo claro y fluorescencia (395 nm). | |
| 13 | Optimización de transducción de células CPAE con LV-GFP con polibreno | 41 |
| 14 | Viabilidad celular y resistencia a la puromicina de células HEK293T/17 y CPAE | 42 |
| 15 | Secreción de fragmentos de hPRL recombinantes por células HEK293T/17 transducidas con LV | 43 |
| 16 | Expresión del mRNA y secreción de los fragmentos de hPRL por células CPAE transducidas con LV-79 y LV-123 | 44 |
| 17 | Disminución de la proliferación de células CPAE transducidas con el vector lentiviral que transduce a la hPRL de 79 aminoácidos (LV-79) | 46 |

XIII. ÍNDICE DE TABLAS

| | Tabla | Página |
|---|---|--------|
| 1 | Fragmentos N-terminales de la PRL | 8 |
| 2 | Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para generar las distintas secuencias que codifican los distintos fragmentos de hPRL | 16 |
| 3 | Títulos lentivirales | 42 |

XIV. APÉNDICE

XIV.1. Mapa de los plásmidos de empaquetamiento lentiviral

| | |
|---|--|
|  <p>pLenti GFP Puro 8608 pb (658-5)</p> | <p>GFP (Green Fluorescent Protein): Gen proteína verde fluorescente.</p> <p>WPRE: Elemento post-transcripcional Woodchuck.</p> <p>pGK: Promotor de fosfoglicerato kinasa murino.</p> <p>Puro: Gen de resistencia a puromicina.</p> <p>LTRs: Repeticiones terminales largas.</p> <p>SV40 pA: Señal de poliadenilación SV40.</p> <p>Amp: Gen de resistencia a ampicilina.</p> <p>pCU Ori: Origen de replicación.</p> <p>Ψ (psi): Señal de empaquetamiento.</p> <p>RRE: Elemento de respuesta a REV.</p> <p>pCMV: Promotor de citomegalovirus.</p> |
|  <p>pMDLg pRRE 8895 pb</p> | <p>gag: Gen de proteína estructural precursora de la cápside</p> <p>pol: Gen de proteína precursora de transcriptasa inversa e integrasa.</p> <p>RRE: Elemento de respuesta a REV.</p> <p>poli A: Señal de poliadenilación.</p> <p>pCU Ori: Origen de replicación.</p> <p>Amp: Gen de resistencia a ampicilina.</p> <p>pCMV: Promotor de citomegalovirus.</p> |
|  <p>pMD2.G 5824 pb</p> | <p>VSV-G: Gen de glicoproteína del virus de estomatitis vesículas G (proteína de envoltura)</p> <p>poli A: Señal de poliadenilación.</p> <p>pCU Ori: Origen de replicación.</p> <p>Amp: Gen de resistencia a ampicilina.</p> <p>pCMV: Promotor de citomegalovirus.</p> |
|  <p>pRSV-Rev 4174 pb</p> | <p>REV: Facilita exportación nuclear (empaquetamiento)</p> <p>Amp: Gen de resistencia a ampicilina.</p> <p>pCU Ori: Origen de replicación.</p> <p>pRSV: Promotor de Virus de sarcoma de Rous.</p> |