

03068



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

## ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TIPO PROLACTINA POR CELULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL HUMANA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A

ANA MARIA CORBACHO RODRIGUEZ

ASESORA: DRA. CARMEN CLAPP

Campus UNAM-UAQ Juriquilla

Febrero 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

258505



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 está 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.

2  
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSGRADO

**CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA**

Análisis de la producción de proteínas tipo  
prolactina por células endoteliales de vena  
umbilical humana

**T E S I S**  
para obtener el grado de  
**MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**  
presenta  
**ANA MARÍA CORBACHO RODRÍGUEZ**  
Asesora: Dra. Carmen Clapp

Campus UNAM-UAQ Juriquilla  
Febrero 1998

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Carmen Clapp Jiménez, en el Centro de Neurobiología de la UNAM.

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por el Gobierno de México, a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores.

El jurado se integró por las siguientes personas:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Carmen Clapp Jiménez

Dr. Luis Vaca Domínguez

Dra. Ma. Magdalena Giordano Noyola

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

# INDICE

	Pág.
0. Resumen.....	0
1. Introducción.....	1
1.1. Factores angiogénicos .....	4
1.2. Factores antiangiogénicos.....	5
2. Antecedentes.....	6
2.1 Prolactina.(PRL) .....	6
2.2 PRL y angiogénesis .....	9
3. Planteamiento del problema .....	13
4. Hipótesis.....	13
5. Objetivos.....	13
6. Materiales y métodos.....	15
6.1 Células endoteliales de vena umbilical humana .....	16
6.2 Células Nb2.....	17
6.3 Incorporación de timidina al DNA.....	17
6.4 Viabilidad celular.....	18
6.5 Endotoxinas.....	18
6.6 Cocultivos de HUVEC y Nb2.....	18
6.7 Inmunocitoquímica.....	18
6.8 Marcaje metabólico.....	19
6.9 Inmunoprecipitación.....	20
6.10 Electroforesis y autorradiografía.....	20
6.11 Western blot.....	21
6.12 Cromatografía de afinidad.....	21
6.13 Inmunoadsorción.....	22
6.14 Cuantificación de proteínas.....	22
7. Resultados	
7.1 Establecimiento de los cultivos primarios.....	23

7.1.1	Caracterización de los cultivos primarios.....	25
7.2	Detección de proteínas con determinantes antigénicos de PRL.....	29
7.2.1	Análisis de las propiedades biológicas de las proteínas tipo PRL. ....	32
7.3	Análisis de los posibles efectos autócrinos de las proteínas tipo PRL sobre la proliferación de HUVEC.....	33
7.3.1	Efecto de prolactina 23K y 16K sobre la proliferación de HUVEC.....	33
7.3.2	Efecto de anticuerpos anti PRL sobre al proliferación de HUVEC.....	34
7.3.3	Viabilidad y endotoxinas.....	35
7.3.4	Efecto de IgGs anti hPRL y bPRL sobre la proliferación de HUVEC.....	40
8.	Discusión .....	46
9.	Conclusión.....	52
10.	Bibliografía.....	53

## RESUMEN

Miembros de la familia hormonal de la prolactina (PRL) tienen efectos directos sobre las células endoteliales y sobre la formación de vasos sanguíneos. Asimismo, hallazgos recientes sugieren que las PRLs podrían actuar como factores autócrinos en la regulación de la proliferación de las propias células endoteliales. Se ha demostrado que éstas células expresan el RNA mensajero completo para PRL y que anticuerpos anti PRL inhiben la proliferación de células endoteliales bovinas en cultivo. Aquí demostramos que células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) sintetizan y secretan proteínas tipo PRL. Mediante el marcaje metabólico y la inmunoprecipitación se detectaron proteínas con inmunorreactividad de PRL con un peso molecular aparente de 77, 21, 16 y 14 kDa. A diferencia de lo que se observó para células endoteliales bovinas, en células HUVEC estas proteínas tipo PRL no parecen poseer efectos autócrinos sobre la proliferación celular. IgGs dirigidas contra PRL no afectaron la proliferación de células HUVEC en cultivo. Estos resultados son consistentes con la expresión del gen de la PRL, así como la síntesis y la secreción de proteínas tipo PRL por células endoteliales de vena umbilical humana.

## INTRODUCCION

El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes se conoce con el nombre de ANGIOGÉNESIS. Este proceso contribuye a la formación de la vascularización durante gran parte del desarrollo fetal y durante la vida adulta <sup>1,2</sup>.

En el endotelio adulto normal las células raramente se dividen y la red vascular se renueva muy lentamente. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, ocurre angiogénesis durante cortos períodos como, por ejemplo, durante el desarrollo de la placenta y en el ovario durante el desarrollo del folículo y del cuerpo lúteo. También ocurre angiogénesis como parte de procesos de reparación tisular, cicatrización de heridas y reacciones inflamatorias <sup>1,2</sup>.

Asimismo, la angiogénesis se ve potenciada en procesos patológicos como la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y es muy importante en el desarrollo de tumores sólidos <sup>1</sup>. En este último caso, la formación de vasos sanguíneos actúa como un evento de amplificación que permite al tumor alcanzar una tasa de crecimiento máximo. Sin angiogénesis los tumores sólidos permanecen en estado de latencia y su crecimiento no continúa más allá de un tamaño de aproximadamente  $1\text{mm}^3$ . Además de aportar oxígeno y nutrientes y extraer las sustancias de desecho, los nuevos vasos sanguíneos constituyen una ruta que permite a las células tumorales migrar y formar tumores secundarios o metástasis <sup>1</sup>.



Dada la importancia del proceso angiogénico tanto en procesos fisiológicos como patológicos, se ha dedicado un importante esfuerzo al aislamiento, la caracterización y la purificación de factores moleculares que intervienen en su regulación. Se ha puesto especial énfasis en ello, debido a que un mayor entendimiento de los mecanismos que subyacen a la formación de nuevos vasos sanguíneos contribuiría a implementar terapias para el tratamiento de las patologías mencionadas.

El proceso angiogénico consiste en una serie de eventos que comienzan con la degradación enzimática local de la membrana basal del endotelio. Una vez que se ha perdido la integridad estructural de la membrana basal del vaso parental y la inhibición por contacto célula-célula <sup>2,3</sup>, las células endoteliales (CE) migran hacia el estímulo angiogénico, proliferan y se alargan formando un brote vascular. El proceso se completa cuando se forma el lumen vascular y las CE sintetizan una nueva lámina basal <sup>4</sup>.

Para el estudio y caracterización de la angiogénesis se han diseñado distintos bioensayos in vivo e in vitro. Los bioensayos in vivo se basan en el análisis del crecimiento de capilares en la córnea de distintas especies y en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo. Los bioensayos in vitro se realizan sobre CE en cultivo y se basan fundamentalmente en el análisis de la migración y la proliferación celular así como la degradación enzimática de la membrana basal bajo distintas condiciones de cultivo <sup>2,3,4</sup>.

Hasta el momento se han identificado muchas moléculas que intervienen en la regulación positiva o negativa de la angiogénesis. La mayoría de ellas son de naturaleza peptídica y pertenecen a familias de factores de crecimiento ampliamente estudiadas, como la del FGF (factor de crecimiento fibroblástico) y del PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) 2,3,4.

Los factores estimulantes (angiogénicos) o inhibidores (antiangiogénicos) pueden actuar sobre cualquiera de las etapas de la formación del nuevo vaso sanguíneo, como por ejemplo, sobre la migración o la proliferación de las CE.

La multiplicidad de factores, sus interacciones, su selectividad sobre el tipo de célula blanco y su compleja forma de regulación hacen muy difícil cualquier esfuerzo de realizar generalizaciones. Sin embargo, de acuerdo a su posible blanco, pueden distinguirse dos grupos: aquellos factores que actúan directamente sobre las CE para estimular o inhibir la angiogénesis y aquéllos que actúan indirectamente, por ejemplo, movilizando células como macrófagos que serían los responsables de liberar factores de crecimiento que a su vez actúen directamente sobre las CE <sup>3</sup>.

Asimismo, varios de los factores reguladores de la angiogénesis son producidos por las propias CE y tienen efectos directos sobre las mismas, por lo cual son llamados factores autócrinos. Este mecanismo de autorregulación parece ser especialmente importante en el endotelio favoreciendo la regulación local del proceso

angiogénico. Entre los factores autócrinos mejor caracterizados se encuentran el FGF<sup>5</sup>, el PDGF<sup>6</sup>, el VEGF<sup>7</sup> y la trombospondina<sup>8</sup>. La expresión de estos factores en CE puede variar según el estado fisiológico de las mismas, por ejemplo, bajo condiciones de hipoxia se ve aumentada la expresión de VEGF<sup>9</sup> (factor de crecimiento endotelial vascular).

### **Factores angiogénicos**

Uno de los primeros factores identificados como estimulantes de la angiogénesis fue el ya mencionado FGF. El FGF ácido (aFGF) y particularmente el FGF básico (bFGF) estimulan directamente la migración de las CE, la proliferación celular, la síntesis de proteasas de la membrana basal y la formación de estructuras tubulares tipo capilar<sup>2,3,4</sup>.

Otros factores, además del FGF, estimulan directamente la migración y la proliferación de CE. Entre ellos están el PDGF, el VEGF y el EGF (factor de crecimiento epidérmico)<sup>4</sup>.

Por otra parte, existen factores que tienen un efecto paradójico: el TGF $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) y el TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) inducen la angiogénesis *in vivo*, pero inhiben la migración y proliferación de CE *in vitro*<sup>2,4</sup>. Al parecer su efecto angiogénico consiste en promover la diferenciación celular, estimulando la formación de estructuras tubulares y la producción de matriz extracelular. Además el TGF $\beta$  y el TNF $\alpha$  inducen angiogénesis *in vivo* en asociación a fuertes reacciones

inflamatorias, lo que sugiere una acción mediada por otro tipo celular, probablemente macrófagos <sup>4</sup>.

Exceptuando al bFGF y al PDGF, la mayoría de los factores angiogénicos son secretados, lo que sugiere acciones parácrinas. Los genes de FGF y PDGF carecen de una secuencia que codifique para un péptido señal de secreción convencional y se desconoce cómo son liberados al medio para estimular la angiogénesis *in vivo*. Se ha propuesto que su liberación podría ser por lisis celular <sup>4,5,10</sup> o por ligamiento a otras moléculas<sup>5</sup>.

### **Factores antiangiogénicos**

Se han descrito múltiples inhibidores de la angiogénesis entre los que se incluye a la trombospondina, el factor plaquetario IV, un factor derivado del cartílago y el interferón gamma <sup>2,4</sup>. Entre los factores inhibitorios *in vitro* más importantes se encuentran los ya mencionados TGF $\beta$  y TNF $\alpha$ . Dichos factores inhiben la migración y proliferación de las CE *in vitro*, aunque como se mencionó anteriormente presentan efectos paradójicos, siendo angiogénicos *in vivo* <sup>2,3,4</sup>.

Recientemente se ha descrito al fragmento amino terminal de 16kDa de la prolactina (PRL 16K) como un nuevo y potente factor inhibidor específico de la angiogénesis<sup>11,12</sup>.

## ANTECEDENTES

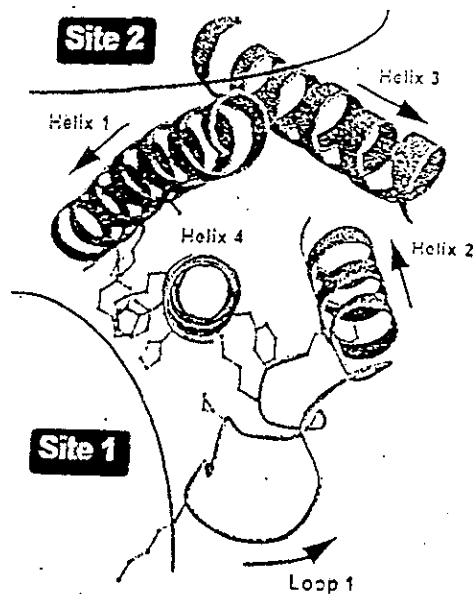
### Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica producida por la adenohipófisis, ha sido identificada en la mayoría de los vertebrados, y se le han atribuido más de 100 funciones biológicas, si bien es generalmente asociada a la inducción y el mantenimiento de la lactancia en mamíferos<sup>13</sup>. Esta hormona pertenece, por sus características estructurales y biológicas, a la familia PRL/LP/GH (GH: hormona de crecimiento, LP: lactógeno placentario), y por las características estructurales de sus receptores a la superfamilia de las citocinas<sup>13,14,15</sup>.

PRL, PL y GH son proteínas con un alto grado de homología en su secuencia primaria que probablemente se originaron a partir de un gen ancestral común. Todas están constituidas por 190-200 residuos aminoacídicos, su peso molecular es de 22-23 kDa y su estructura tridimensional es muy similar. Mientras la PRL y la GH son secretadas principalmente por la hipófisis anterior de todos los vertebrados, el PL únicamente es secretado por la placenta.

La PRL adenohipofisaria humana está constituida por una única cadena polipeptídica de 199 residuos aminoacídicos, presenta 3 puentes disulfuro y un peso molecular de 23kDa, de allí su denominación como PRL 23K<sup>13</sup>.

Su estructura tridimensional ha sido predicha en forma teórica a partir de las coordenadas cristalográficas para la GH porcina. Según este modelo, la hPRL presenta cuatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas con 2 sitios de unión al receptor localizados del mismo lado de la proteína plegada. (figura de hPRL)<sup>13,14</sup>.



Las flechas indican la orientación N- a C terminal de las hélices (la 4 apunta hacia el observador). Se indica la localización global de los sitios de unión 1 y 2. El sitio de unión 1 está compuesto por la hélice 1, el asa 1 y la hélice 4. El sitio 2 se localiza alrededor de la hendidura definida por las hélices 1 y 3.

Por otra parte, debido a sus características estructurales, los receptores de PRL han sido ligados a la superfamilia de los receptores de las citocinas. Esta superfamilia comprende dos clases: la clase 1 que incluye a los receptores de la PRL, la GH y el PL, junto a los de las interleucinas y la eritropoyetina; y la clase 2 que incluye principalmente a los receptores de los interferones<sup>14,15</sup>.

Los receptores incluidos en la clase 1 son glicoproteínas transmembranales, orientadas con su extremo N-terminal hacia el exterior y con un solo dominio transmembranal. Las regiones de

mayor homología entre los receptores ocurre en el dominio extracelular y consisten en dos pares de cisteínas unidas por puentes disulfuro localizadas hacia el extremo N-terminal y un motivo conservado llamado WS (Trp-Ser-X-Trp-Ser) localizado junto a la membrana<sup>14,15</sup>.

En la superfamilia de los receptores de citocinas la dimerización u oligomerización del receptor es una regla general y es un requerimiento absoluto para que se inicie la transducción de la señal. La dimerización ocurre cuando una hormona unida a un receptor se une a una segunda molécula de receptor a través de un segundo sitio de unión. La PRL posee dos sitios de unión: el sitio 1 involucra a las hélices 1 y 4 y al asa 1 que conecta hélices 1 y 2, mientras que el sitio 2 incluye a la hélice 3 e interviene en la dimerización del receptor<sup>14,15</sup>.

Además de que los receptores presentan similitudes tanto estructurales como en su mecanismo de activación por dimerización, sus ligandos también se agrupan en la superfamilia de las citocinas debido a que presentan un motivo común que consiste en una agrupación de 4  $\alpha$  hélices antiparalelas<sup>14,15</sup>.

## **PRL y angiogénesis**

La PRL existe en múltiples formas moleculares, la mayoría de las cuales es producto de modificaciones postraduccionales como glicosilación, fosforilación, proteólisis y agregamiento. Esta variabilidad estructural se correlaciona con su alta gama de acciones biológicas, desde el desarrollo y la iniciación de la lactancia en mamíferos, la osmorregulación en peces, el comportamiento de nidación en aves, el crecimiento y la metamorfosis en anfibios. Se ha sugerido que tal vez la PRL es una prohormona, sintetizada como una molécula precursora y luego convertida a distintas formas bioactivas<sup>13</sup>.

Entre las variantes moleculares de PRL descritas se encuentran la prolactina cortada (PRLc) y la prolactina de 16 kDa (PRL 16K). La PRL 23K puede ser procesada por enzimas proteolíticas para dar una forma de PRL cortada (PRLc) con dos fragmentos conectados por un puente disulfuro, y posteriormente, mediante la reducción del mismo, dar lugar a los fragmentos N-terminal de 16kDa y C-terminal de 8kDa <sup>16, 17,18</sup>. La PRLc ha sido localizada en diversos tejidos incluyendo a la adenohipófisis, el sistema nervioso central y en la circulación<sup>16,17</sup>.

La PRL 16K presenta efectos similares a los de la PRL 23K, por ejemplo, estimula la proliferación del epitelio mamario y las células Nb2 (células derivadas de un linfoma murino, cuya proliferación es dependiente de PRL<sup>19,20</sup>), pero también presenta efectos que no comparte con la PRL nativa. Clapp y col. han demostrado que la PRL



16K inhibe la angiogénesis tanto *in vivo*<sup>12</sup> como *in vitro*<sup>11,12</sup>. *In vivo* inhibe el crecimiento de capilares sobre la membrana corioalantoidea del embrión de pollo. *In vitro* inhibe la proliferación de CE en cultivo<sup>11,12</sup>, e interfiere con la organización del capilar<sup>12</sup> desorganizando las estructuras tubulares que se forman cuando las células son cultivadas en geles tridimensionales de colágena<sup>21</sup>. Experimentos de unión y desplazamiento de ligando en membranas aisladas de endotelio indicaron que este efecto de la PRL 16K sobre CE involucra la activación de receptores distintos a los ya conocidos para PRL 23K <sup>11</sup>. Los resultados mencionados demostraron por primera vez la participación de miembros de la familia de la prolactina en la regulación de la formación de vasos capilares sanguíneos. Estos hallazgos sugirieron que esta familia de hormonas podría constituir un nuevo grupo de moléculas reguladoras de la angiogénesis.

Más tarde y en apoyo a esta hipótesis, Linzer y col. mostraron que dos proteínas placentarias relacionadas con la PRL, la proliferina (PLF) y la proteína relacionada a la proliferina (PRP) estimulan e inhiben, respectivamente, la migración de CE<sup>22,23</sup>. Estas proteínas presentan un 37-39 % de homología en secuencia aminoacídica con PRL<sup>22</sup>.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha localizado, en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo<sup>24a</sup>, en la neurohipófisis<sup>24a</sup> y en el suero de la rata<sup>24b</sup>, una variante de PRL de 14kDa, denominada PRL 14K, que presenta un efecto inhibitorio sobre

la proliferación de CE similar al que se observa para la PRL 16K<sup>24a,c</sup>. En conjunto, estos hallazgos confirmaron la participación de moléculas de la familia de la PRL en la regulación del proceso angiogénico.

El hecho de que muchos de los factores que regulan la angiogénesis, son producidos por las propias CE, nos hizo pensar que la PRL podría ser un factor autócrino a nivel del endotelio, esto más aun considerando que la PRL es un factor autócrino en otros sistemas como lo son el epitelio mamario<sup>25</sup> y el sistema inmune<sup>26a,26b,44</sup>. Con el propósito de responder esta pregunta se analizó la expresión del gen de la PRL en CE de capilar de cerebro bovino (BBCEC), encontrándose que el mismo se expresa y que se sintetizan y secretan proteínas tipo PRL con efectos autócrinos sobre la proliferación.

La expresión del gen de la PRL se estudió mediante la extracción de ARN total de las células BBCEC, la retrotranscripción del ARNm (poli A+) y su amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), obteniéndose transcritos del tamaño esperado para esta hormona. Por otra parte, en estudios preliminares, el análisis por Northern blot, detectó una señal positiva del tamaño esperado para el ARNm de la PRL<sup>27</sup>.

Adicionalmente se estudió el efecto autócrino de las PRLs endoteliales. En varias oportunidades se ha demostrado que mediante la utilización de anticuerpos específicos contra un factor autócrino,

es posible capturarlo e inhibir su efecto. Asimismo, tal inhibición desaparece cuando se utiliza un exceso del factor administrado exógenamente para saturar el pegado al anticuerpo <sup>5,28</sup>. Siguiendo este razonamiento, se determinó que anticuerpos dirigidos contra la PRL bovina (bPRL) inhiben, en forma dependiente de la dosis, la proliferación basal de células BBCE, así como la estimulada por bFGF y que esta inhibición es bloqueada por adición de bPRL al medio. Estos hallazgos mostraron que antígenos tipo PRL secretados al medio participan en la regulación de la proliferación de este tipo celular. Con el propósito de determinar la bioactividad de dichos antígenos se utilizó un bioensayo mitogénico específico en el que se midió de proliferación de células Nb2 por estimulación con las PRLs endoteliales. Células Nb2 fueron cocultivadas con CE sembradas a densidades confluentes y subconfluentes. Se determinó que la proliferación de las células Nb2 fue estimulada por los cultivos semiconfluentes de células BBCE, pero no por los confluentes<sup>29</sup>. Esto implica que este factor tipo PRL sería secretado por las células BBCE durante su fase proliferativa.

Estas evidencias mostraron que las células endoteliales de capilar de cerebro bovino expresan el gen de la PRL y que la proteína se secreta durante la fase celular proliferativa. Más aún, las evidencias obtenidas indicaron que dicha PRL tendría efectos mitogénicos autócrinos.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Miembros de la familia de la PRL y proteínas relacionadas tienen distintos efectos sobre CE. Adicionalmente, se ha determinado que CE bovinas expresan el gen de la PRL y producen proteínas con inmunorreactividad y actividad biológica tipo PRL. Este conjunto de evidencias hace pensar que estas proteínas podrían constituir un nuevo grupo de factores autócrinos reguladores de la angiogénesis.

Dada la importancia que tiene la angiogénesis, tanto en procesos fisiológicos como patológicos y especialmente en el crecimiento de tumores, consideramos de gran importancia analizar si células endoteliales humanas producen PRLs con efectos autócrinos.

## **HIPÓTESIS**

*Células endoteliales de vena umbilical humana producen proteínas tipo PRL capaces de modular de forma autócrina el proceso de angiogénesis.*

## **OBJETIVOS**

Con el propósito de analizar la hipótesis anterior nos propusimos los siguientes objetivos:

- I. Establecer cultivos primarios de Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Miembros de la familia de la PRL y proteínas relacionadas tienen distintos efectos sobre CE. Adicionalmente, se ha determinado que CE bovinas expresan el gen de la PRL y producen proteínas con inmunorreactividad y actividad biológica tipo PRL. Este conjunto de evidencias hace pensar que estas proteínas podrían constituir un nuevo grupo de factores autócrinos reguladores de la angiogénesis.

Dada la importancia que tiene la angiogénesis, tanto en procesos fisiológicos como patológicos y especialmente en el crecimiento de tumores, consideramos de gran importancia analizar si células endoteliales humanas producen PRLs con efectos autócrinos.

## **HIPÓTESIS**

Células endoteliales de vena umbilical humana producen proteínas tipo PRL capaces de modular de forma autócrina el proceso de angiogénesis.

## **OBJETIVOS**

Con el propósito de analizar la hipótesis anterior nos propusimos los siguientes objetivos:

- I. Establecer cultivos primarios de Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Miembros de la familia de la PRL y proteínas relacionadas tienen distintos efectos sobre CE. Adicionalmente, se ha determinado que CE bovinas expresan el gen de la PRL y producen proteínas con inmunorreactividad y actividad biológica tipo PRL. Este conjunto de evidencias hace pensar que estas proteínas podrían constituir un nuevo grupo de factores autócrinos reguladores de la angiogénesis.

Dada la importancia que tiene la angiogénesis, tanto en procesos fisiológicos como patológicos y especialmente en el crecimiento de tumores, consideramos de gran importancia analizar si células endoteliales humanas producen PRLs con efectos autócrinos.

## **HIPÓTESIS**

Células endoteliales de vena umbilical humana producen proteínas tipo PRL capaces de modular de forma autócrina el proceso de angiogénesis.

## **OBJETIVOS**

Con el propósito de analizar la hipótesis anterior nos propusimos los siguientes objetivos:

- I. Establecer cultivos primarios de Células Endoteliales de Vena Umbilical Humana (HUVEC).

**II.** Analizar la producción de PRLs por células HUVEC.

1. Determinar la producción de proteínas con determinantes antigénicos de PRL mediante el marcaje metabólico y la inmunoprecipitación con anticuerpos dirigidos contra hPRL.
2. Determinar el peso molecular de las proteínas tipo PRL mediante el análisis electroforético y su comparación con marcadores de peso molecular.
3. Determinar la presencia de factores con propiedades biológicas de PRL mediante el cocultivo de células HUVEC con células Nb2.

**III.** Analizar los posibles efectos autócrinos de las PRLs endoteliales mediante la utilización de anticuerpos específicos dirigidos contra PRL.

## MATERIALES Y METODOS

### *Prolactinas*

Se utilizó una preparación de referencia de prolactina adenohipofisaria de 23kDa humana grado biológico (hPRL, Institutos Nacionales de Salud, EUA), así como PRL recombinante humana (hrPRL, donada por el Dr. Joseph Martial, Universidad de Lieja, Bélgica).

### *Anticuerpos*

#### Antisueros

Se utilizaron antisueros dirigidos contra hPRL y bPRL adquiridos también a través de Institutos Nacionales de Salud, EUA (J. Parlow, Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, CA).

#### IgGs

Se utilizaron IgGs aisladas de sueros preinmunes así como de antisueros generados en nuestro laboratorio contra las PRLs humana y bovina (grado biológico) donados por los Institutos Nacionales de Salud de EUA.

#### Anticuerpo monoclonal

Se utilizó un anticuerpo dirigido contra PRL 16K humana: 168 (donado por Dr. Susan Richards, Genzyme Corporation).



### **Células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)**

Cordones umbilicales humanos fueron colectados en el momento del parto y conservados en solución salina de Hank's con penicilina-estreptomicina (1.000 unidades/ml -1.000 ug/ml, Gibco BRL). A las 24-48hrs se lavó la vena umbilical con PBS, se ligó un extremo, se perfundió con 0.05% tripsina-EDTA (Gibco BRL) en solución salina de Hank's (Gibco BRL), se ligó el segundo extremo y se incubó durante 15 min a 37 °C. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 800 rpm por 10 min. Las células fueron cultivadas en F12K (Gibco BRL), 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco BRL), 0.1 mg/ml de heparina, 1.000 unidades/ml de penicilina-1.000 ug/ml estreptomicina (Gibco BRL), 25 ug/ml de ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement, Sigma), utilizando 10ug/ml de fibronectina plasmática humana como sustrato (HPFN, Gibco BRL). Los cultivos fueron mantenidos a 37°C, en atmósfera de 5%CO<sub>2</sub> - 95% O<sub>2</sub>. Las células alcanzaron la confluencia en 6-7 días y fueron utilizadas entre los pases 3 y 7<sup>30</sup>.

Los cultivos primarios fueron mantenidos en F12K suplementado con 10% SBF, 0.1 mg/ml de heparina, 1.000 unidades/ml de penicilina-1.000 ug/ml estreptomicina, 10ug/ml de HPFN. Se analizó la proliferación de HUVEC en los medios F12K o D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) suplementados con 10% SBF, 0.1 mg/ml de heparina, 1.000 unidades/ml de penicilina - 1.000 ug/ml estreptomicina y en un sistema libre de suero SFMS (Human Endothelial-SFM System, Gibco BRL), suplementado con 10ng/ml

hrEGF  $\pm$  5ng/ml hrbFGF<sup>31</sup>. Las células HUVEC siempre fueron sembradas sobre platos cubiertos con 10ug/ml de HPFN.

### **Células Nb2**

Células Nb2 (donadas por P. Gout, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, BC, Canada), fueron cultivadas hasta una confluencia de  $10^6$  células/ml en medio DMEM-alto en glucosa, 10% de suero fetal de ternera (SFT), 10% de suero equino (SE), , 1.000 unidades/ml de penicilina - 1.000 ug/ml estreptomina y  $10^{-4}$  M de  $\beta$ -mercaptoetanol. 24h antes del ensayo se sincronizaron en DMEM-alto en glucosa, 1% de SFT. El bioensayo se realizará en ausencia de SFT 19,20.

### **Incorporación de timidina al DNA**

Todos los bioensayos tuvieron una duración de 60 hrs. Para analizar la proliferación de HUVEC y Nb2, las células fueron sembradas con el tratamiento correspondiente a una densidad de 250.000 células/ml para HUVEC y 50.000 células/ml para Nb2 en pozos de 15mm (Costar). A las 48 hrs se colocó medio fresco e igual tratamiento y se incubaron las células con 500.000cpm de timidina tritiada por 12-15 hrs para HUVEC y 4 hrs para Nb2. Al cabo de las 60 hrs del bioensayo las células se fijaron con 5% (w/v) de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C por 30 min. Los precipitados resultantes fueron lavados dos veces con 5% TCA y solubilizados adicionando 250 $\mu$ l de NaOH 0.25M a 50°C por 30min. La radioactividad de <sup>3</sup>H fue medida en número de desintegraciones por minuto<sup>12</sup>.

### **Viabilidad celular**

Se determinó la viabilidad celular por conteo del número de células/ml capaces de excluir el azul tripano o por reducción de MTT a formazán. En este último caso las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y al término del bioensayo incubadas en presencia de MTT durante 4hrs en el incubador de células. Al cabo de este período se procedió a solubilizar el formazán precipitado con HCl-SDS durante 30 min a TA. Finalmente se midió la absorbancia de cada pozo a  $\lambda$ : 590 nm<sup>32</sup>.

### **Endotoxinas**

Se utilizó el ensayo de E-Toxate (Limulus Amebocyte Lysate) para la detección y semicuantificación de endotoxinas en los anticuerpos y SN utilizados (Sigma). Adicionalmente, se utilizó el estándar de endotoxinas incluido en el mismo para determinar su efecto sobre las células HUVEC<sup>33</sup>.

### **Cocultivos de HUVEC y Nb2**

Se realizaron bioensayos de incorporación de timidina tritiada ( $2.5 \times 10^4$ /pozos de 15 mm) cultivando células Nb2 en ausencia o presencia de hPRL (5nM), y cocultivadas con HUVEC a 3 confluencias diferentes: alta ( $25 \times 10^4$ ), media ( $12.5 \times 10^4$ ) o baja ( $6.2 \times 10^4$ ). Se midió la incorporación de timidina tritiada en Nb2.

### **Inmunocitoquímica**

Células HUVEC fueron sembradas sobre cubreobjetos cubiertos con HPFN y fueron mantenidas en F12K -SBF 10%-heparina-ECGS. A las

24 hrs las laminillas fueron lavadas con PBS a 37 °C, fijadas con paraformaldehído 4% durante 10 min a TA, lavadas con PBS e incubadas con SNCabra (1:10 en PBS-0.3% tritón X-100) durante 2 hrs. Posteriormente, fueron lavadas con PBS-tritón e incubadas con el anticuerpo policlonal contra el Factor VIII (1:50) (Factor VIII Related Antigen, Rabbit anti-Human, Accurate Antibodies) 12hrs a T.A. en cámara húmeda. Luego de la incubación con el anticuerpo primario, las laminillas fueron lavadas e incubadas con IgGs de conejo acopladas a fluoresceína (1:100) [Rabbit IgG (H+L), Fluoresceine TRITC, Accurate Antibodies ] 1 hr a T.A. Finalmente, las laminillas fueron lavadas y montadas con glicerol-PBS 50%-50%. Las preparaciones fueron observadas en microscopio con epifluorescencia Nikon Optiphot<sup>34</sup>.

### **Marcaje metabólico**

Células HUVEC fueron sembradas y mantenidas en medio F12K- 10% SFB durante 48hrs. Posteriormente, los cultivos se lavaron con PBS a 37°C y se incubaron durante 20 minutos en D-MEM libre de cisteína y metionina (D-MEM, -Met, -Cys, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) libre de suero, 0.2mg/ml BSA, seguido de la incubación por 6hrs en igual medio adicionando 100uCi/ml de una mezcla de <sup>35</sup>S-Met y <sup>35</sup>S-Cys (Dupont, Wilmington, DE). Luego de este período de incubación, se colectó el medio condicionado (MC) y se concentró 3x en centricones de corte de 3000kDa (Centricom 3, Amicon, Beverly, MA) durante 2hrs a 4.000 rpm a 4°C. Simultáneamente, las células de las cuales se obtuvo el MC se lavaron con PBS a 37°C y se incubaron con 1ml de buffer de lisis RIPA [Tris 50mM (pH 8.0),

NaCl 150 mM, NP-40 1%, SDS 0.1% , PMSF 100 ug/ml, aprotinina 1 ug/ml] durante 20 min a 4°C. Por último, los lisados celulares (LC) se centrifugaron a 4.000 rpm, durante 10 min a 4°C, y se guardó el sobrenadante a 4°C. Estos últimos y los medios condicionados concentrados fueron sometidos a inmunoprecipitación<sup>35</sup>.

### **Inmunoprecipitación**

Los LC y MC fueron prelimpiados mediante su incubación con suero normal de conejo (1:200), 1 hr a 4°C. Posteriormente la mezcla se incubó con *S. aureus* durante 30 min a 4°C y se centrifugó a 12.000g por 5min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó con  $\alpha$ hPRL o SNC (1:500), o con los anticuerpos monoclonales (1:300) durante 12 hr a 4°C. Posteriormente, se adicionó proteína A-Sepharosa y se incubó durante 1hr a 4°C. Se colectó el complejo Sepharosa-proteína A-anticuerpo-antígeno por centrifugación a 12.000g por 20 seg a 4°C. Se realizaron tres lavados consecutivos con buffer de lavado, cada uno durante 20 min a 4°C, seguido de recuperación del complejo ternario por centrifugación a 12.000g por 20seg a 4°C. Se adicionó buffer de corrida con 1% SDS. Se calentó a 100°C por 3 min. Se removió la proteína A-Sepharosa por centrifugación a 12.000g por 20seg a TA. Se analizó la alícuota por electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía<sup>35</sup>.

### **Electroforesis y autorradiografía**

Se realizó el análisis de las proteínas inmunoprecipitadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, bajo condiciones desnaturizantes (SDS ) y reductoras ( $\beta$ -Mercaptoetanol 5%) a

200V durante 45min, según el método descrito por Laemmli et al<sup>36</sup>. Los geles fueron teñidos con azul de Coomasie, secados y sometidos a autorradiografía sobre una película sensible (Hyperfilm Amersham) entre dos pantallas intensificantes por 1, 2 y 3 semanas a -70 °C. La película se reveló mediante técnicas de fotografía convencional. La intensidad de las bandas fue medida por densitometría.

### **Western blots**

Las muestras fueron fraccionadas por electroforesis en geles de acrilamida y SDS (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, de acuerdo con Laemmli (1970). Los Western de proteínas se realizaron sobre papel de nitrocelulosa y fueron teñidos con una dilución 1:500 de ahPRL, y 1 $\mu$ g/ml de IgGs. El color se desarrolló mediante el uso de un sistema para detectar anticuerpos secundarios de los laboratorios Bio-Rad (Hercules, California)<sup>37</sup>.

### **Cromatografía de afinidad**

Se utilizó como fase sólida Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (150 mg) lavada con 50-100 ml HCL 1mM y buffer de acoplamiento (50 mM  $PO_4^-$ , 0.5M NaCL, pH: 7.8). Se adicionó 474  $\mu$ g de PRL 23K y se incubó durante 24hrs a 4 °C. Se bloquearon los grupos que no reaccionaron con Tris 1M, pH: 8.0 toda la noche a 4°C y se lavó la resina con buffer de aplicación (50 mM  $PO_4^-$ , 0.9% NaCL, pH: 8.0) y buffer de elución (50 mM Glicina, 0.9% NaCL, pH: 3.0). La columna se guardó embebida en buffer de aplicación- 0.1% azida de Na<sup>35</sup>.

### **Inmunoadsorción**

Se lavó repetidamente la resina con buffer de aplicación y se le adicionó 200uls de  $\alpha$ hPRL y se dejó reaccionando 2hrs a 4°C. Posteriormente se lavó la resina con buffer de aplicación, guardándose las fracciones del antisuero desplazadas ("inespecífico"), y luego con buffer de lavado (50 mM  $\text{PO}_4^-$ , 1M NaCl, 0.01% Teen-20, pH: 7.6). Finalmente se eluyó la columna con buffer de elución, colectándose fracciones de 1 ml. La cantidad de proteínas de las distintas fracciones durante todo el experimento fue leída en un espectrofotómetro a 280 nM. Las fracciones con IgGs fueron neutralizadas con 100 mM Tris-HCl, pH: 7.5. Finalmente, se lavó la columna abundantemente con buffer de aplicación y se almacenó con 0.1% azida de Na a 4°C<sup>35</sup>.

### **Cuantificación de proteínas**

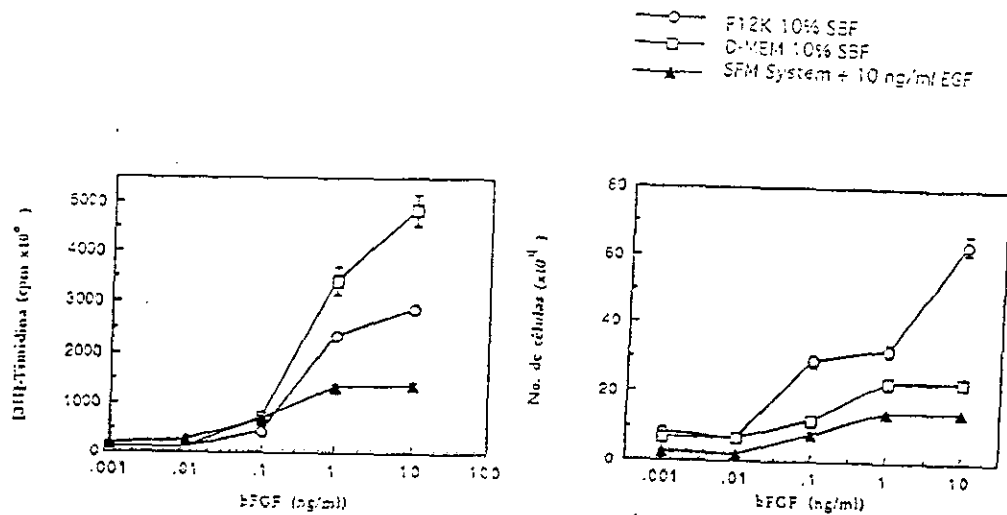
La cantidad de proteínas tanto del eluido conteniendo las IgGs- $\alpha$ hPRL como del resto del antisuero fue cuantificada por el método de Bradford<sup>38</sup>.

## RESULTADOS

### I. Establecimiento de los cultivos primarios

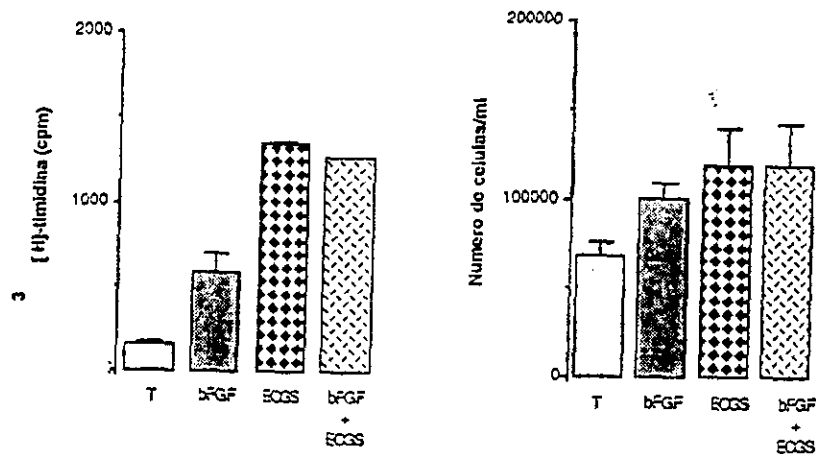
Células HUVEC fueron aisladas a partir de la vena de al menos 4 cordones umbilicales humanos y sembradas en pozos de 35mm. Los cultivos alcanzaron la confluencia durante los 3-7 días posteriores al aislamiento. Con el fin de determinar las mejores condiciones de crecimiento de los cultivos, se caracterizó la proliferación estimulada por bFGF en distintos medios comerciales (F12K, D-MEM y SFM-S ) (fig. 1). Se encontró una mejor correlación entre la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al ADN (1.a.) y el número de células (1.b.) en medio F12K, 10% SFB, medio recomendado por la ATCC (American Type Culture Collection) para el crecimiento de este tipo celular. Asimismo, se comparó el crecimiento de los cultivos en presencia de ECGS o/y bFGF (fig. 2) observándose una mejor proliferación en presencia de ECGS. Además, se observó que la adición de bFGF simultánea con ECGS no estimuló la proliferación mas allá del valor obtenido cuando sólo se adicionó ECGS, por lo que los cultivos fueron mantenidos en F12K, 10% SFB, 50mg/500ml heparina, 10ug/ml HPFN, suplementado con 25ug/ml ECGS. Por otra parte, todos los bioensayos en que se midió la proliferación de HUVEC se realizaron en ausencia de suero (excepto cuando se indica lo contrario), utilizando SFMS suplementado con 10ng/ml de EGF y 5ng/ml de bFGF.





**Figura 1**

Dosis respuesta a bFGF en medios F12K-10% SFB; D-MEM-10% SFB y SFM-S, 10ng/ml EGF. a.- Incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al ADN y b.- número de células.



**Figura 2**

Efecto de 20ng/ml bFGF y 25ug/ml ECGS sobre la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al ADN de células HUVEC sembradas en F12K-10% SFB.

### **Caracterización de los cultivos primarios**

Los cultivos primarios de HUVEC resultaron positivos para la tinción por inmunocitoquímica para detectar la presencia del antígeno relacionado con el Factor VIII, marcador de células endoteliales. Esto confirmó la identidad endotelial y la homogeneidad de los cultivos primarios (fig. 3). Asimismo, los cultivos presentaron características morfológicas típicamente endoteliales, al acercarse a la confluencia las CE se dispusieron formando estrías similares a corrientes de agua y al alcanzar la confluencia máxima adquirieron una apariencia típica de empedrado (fig. 4). Por otra parte, se observó una inhibición de la proliferación celular a mayor grado de confluencia de los cultivos, lo que indicó una inhibición por contacto célula-célula y confirmó el crecimiento en monocapa de los cultivos (fig. 5). Adicionalmente las células aisladas respondieron a VEGF, factor de crecimiento específico para CE, en forma dependiente de la dosis (fig. 6).

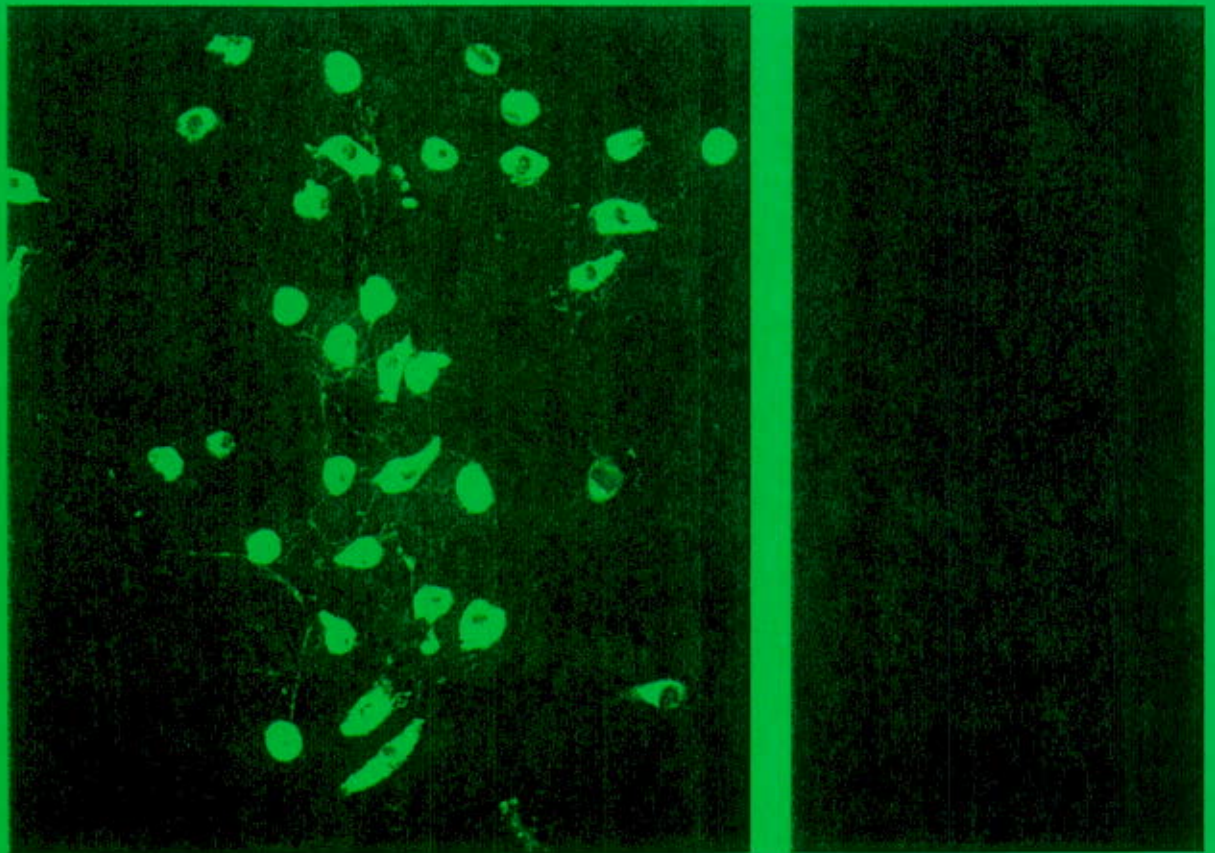


Figura 3

Microfotografías de fluorescencia de células HUVEC incubadas con  $\alpha$ hFactor VIII (a) o suero normal de conejo (SN) (b), utilizando un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína. No se detectó señal positiva en la incubación con SN y en ausencia de primer anticuerpo (no se muestra).

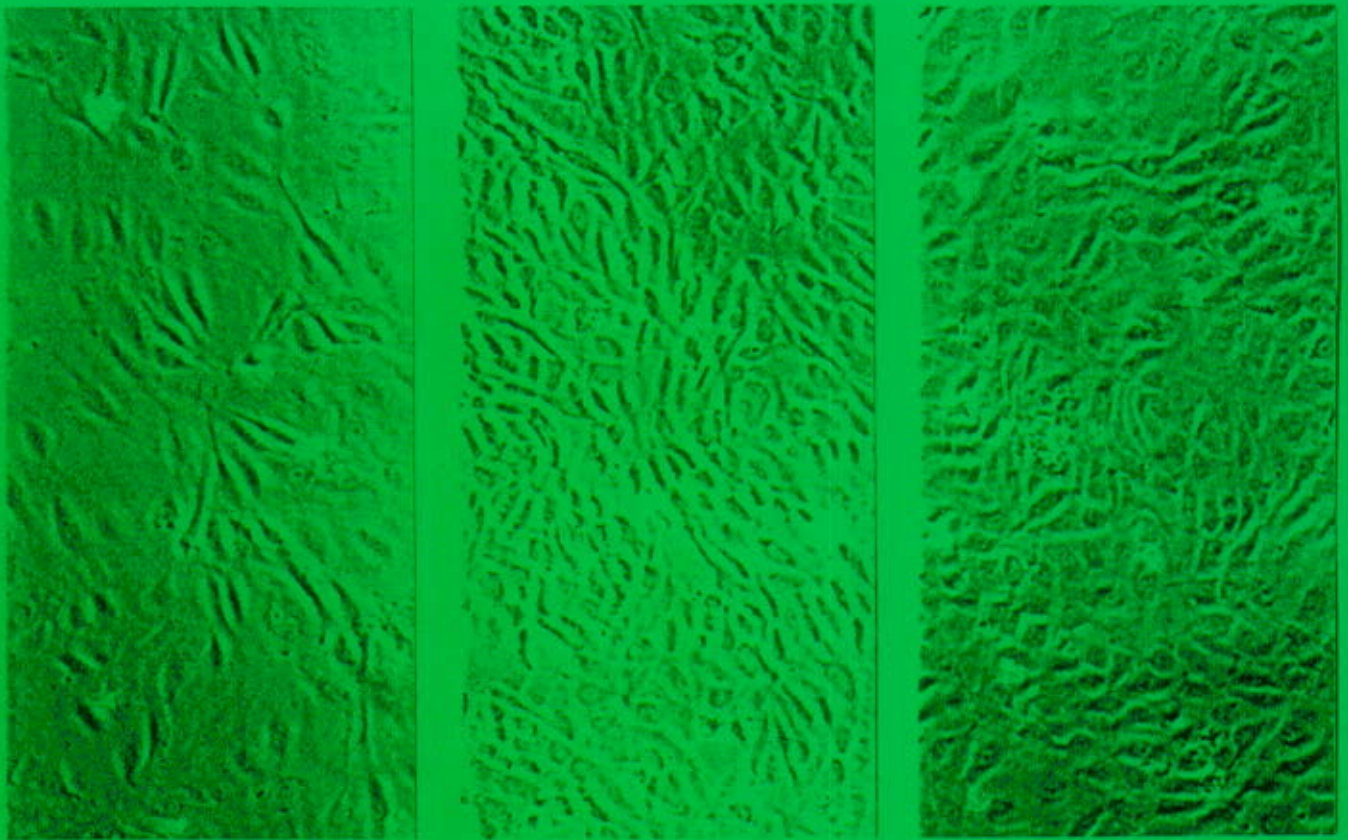
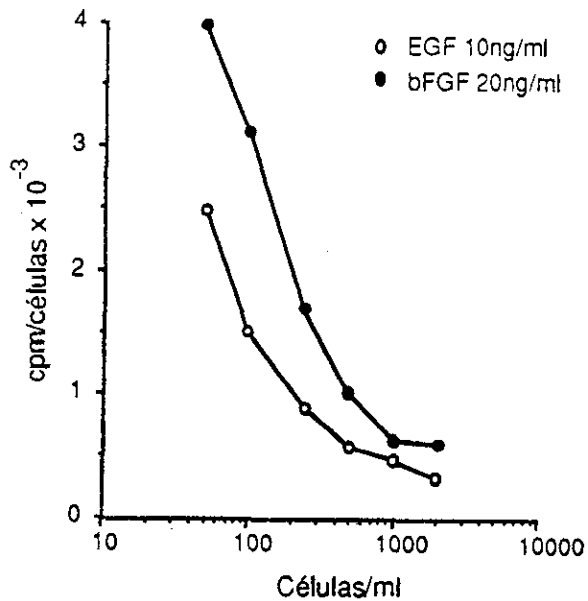


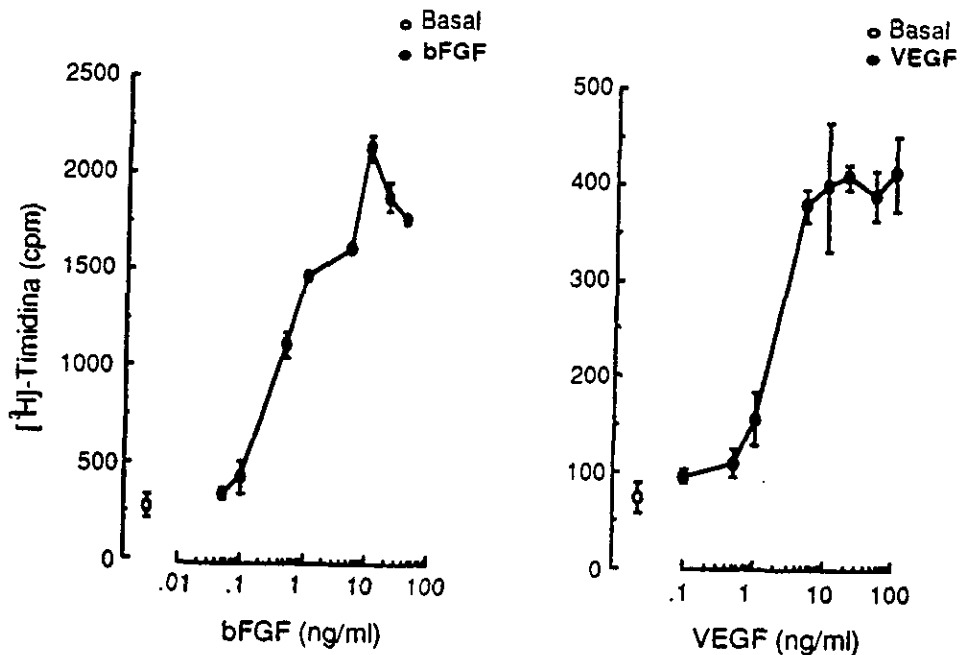
Figura 4

Microfotografías de contraste de fases de cultivos de células HUVEC a baja (a) y alta (b) subconfluencia y confluencia completa (c).



**Figura 5**

Incorporación de  $[^3\text{H}]$ -timidina según el grado de confluencia celular. Un número creciente de HUVEC fue sembrada en SFMS + EGF 10 ng/ml en ausencia o presencia de bFGF 20 ng/ml. Se observa la inhibición de la proliferación celular a mayor grado de confluencia celular.

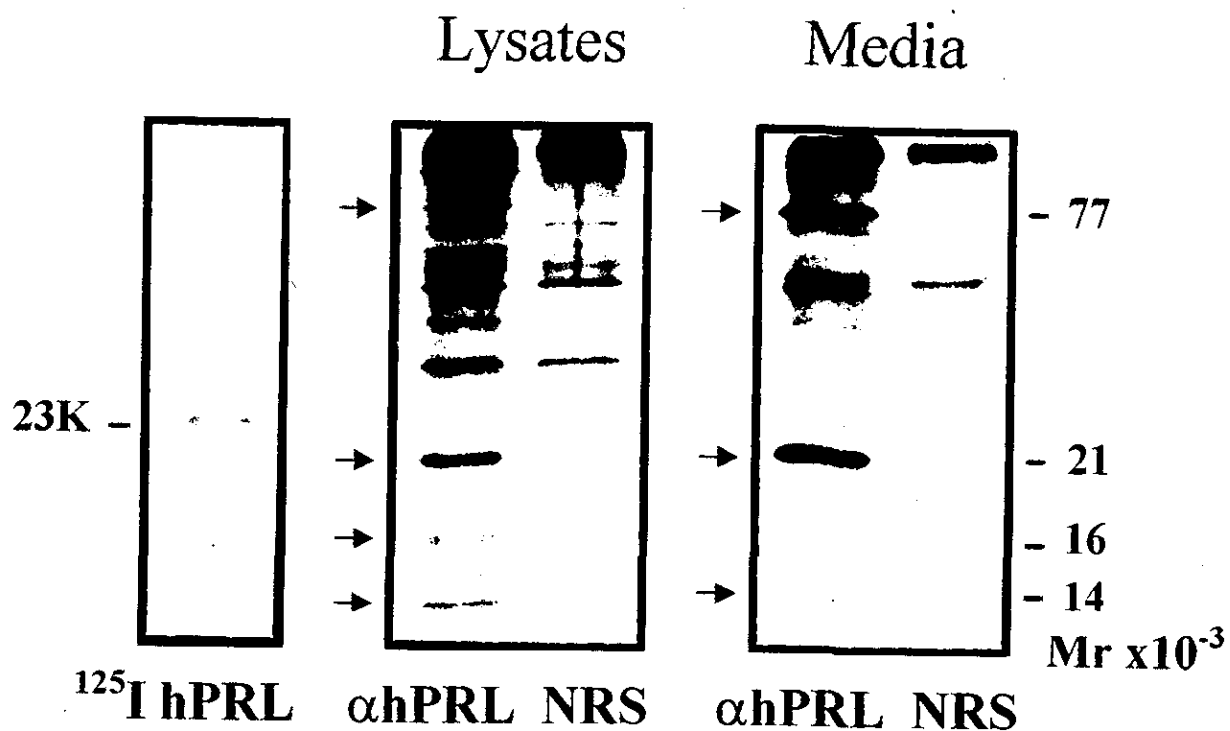


**Figura 6**

Incorporación de  $[^3\text{H}]$ -timidina al ADN de HUVEC en respuesta a concentraciones crecientes de bFGF (a) y VEGF (b).

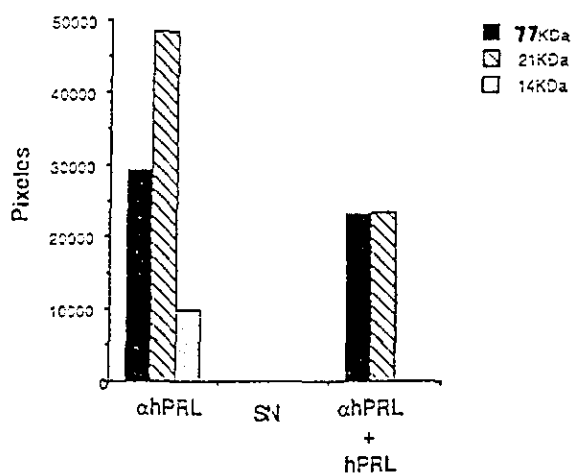
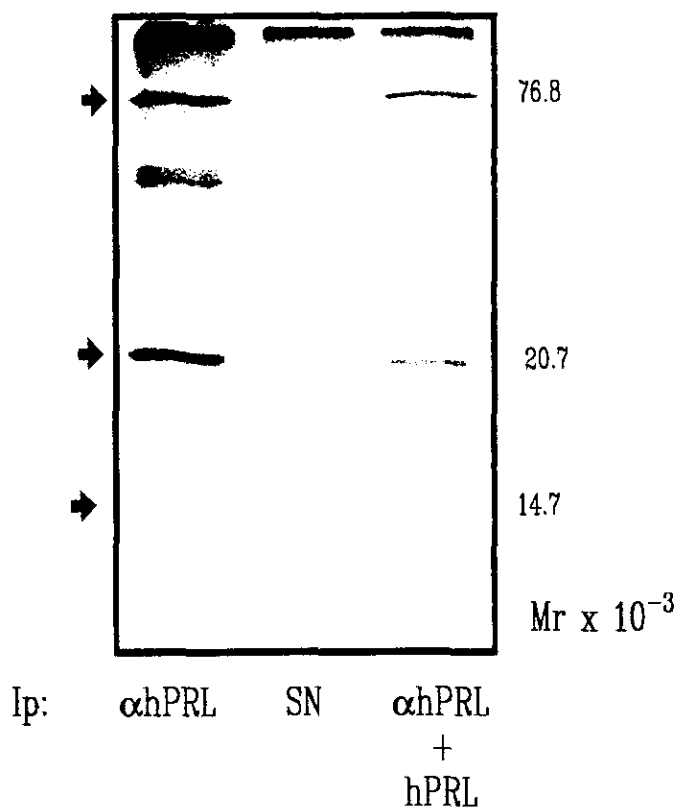
## II. Detección de proteínas con determinantes antigénicos tipo PRL.

Mediante el marcaje metabólico y la inmunoprecipitación con  $\alpha$ hPRL se detectaron, tanto en los medios condicionados como en los lisados celulares, 3 bandas con inmunorreactividad de PRL que corresponden a un peso molecular aproximado de 77, 21 y 14 kDa y no son inmunoprecipitadas por el suero normal de conejo (SN) (fig. 7). Adicionalmente se detectó una banda de 16 kDa en los lisados celulares que no se detecta en el medio condicionado. Con el propósito de demostrar la especificidad de las bandas obtenidas, se coincubó una muestra de medio condicionado con  $\alpha$ hPRL (1:500) y hrPRL (4.4  $\mu$ M). Se obtuvo una reducción parcial en la intensidad de las bandas de 77, 21 kDa y total en el caso de la banda de 14 kDa. La intensidad de las bandas se analizó por densitometría y se determinó una reducción de intensidad del 20, 52 y 100% respectivamente (fig. 8 a y b).



**Figura 7**

Electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía de proteínas marcadas con  $^{35}\text{S}$ . Inmunoprecipitación de lisados celulares (LC) y medios condicionados (MC) de cultivos subconfluentes ( $1.5 \times 10^6$  células) con  $\alpha$ hPRL o SN. Las flechas indican proteínas con inmunorreactividad tipo-PRL con pesos moleculares aparentes de 77, 21, 16 y 14 kDa. A la izquierda de la figura se observa una banda de 23kDa correspondiente a un estándar de  $^{125}\text{I}$ -hPRL.



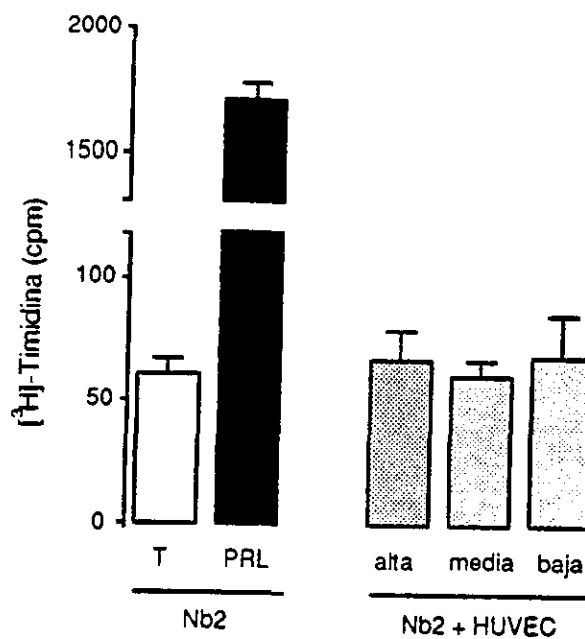
**Figura 8**

- a) Preadсорción de  $\alpha$ hPRL con hrPRL. Inmunoprecipitación de medio condicionado (MC) de HUVEC. De izquierda a derecha: MC incubado con  $\alpha$ PRL (1:500), MC incubado con SN (1:500) y MC incubado con  $\alpha$ PRL (1:500) y hrPRL (4.4nM). Las flechas indican PMs aparentes.
- b) Histograma de la densitometría de la figura a).



## Análisis de las propiedades biológicas de las proteínas tipo-PRL

Células HUVEC a distinto grado de confluencia fueron co-incubadas con células Nb2 en medio libre de lactógenos. No se detectó una modificación significativa de la proliferación de Nb2 para ninguno de los casos analizados (fig. 9).

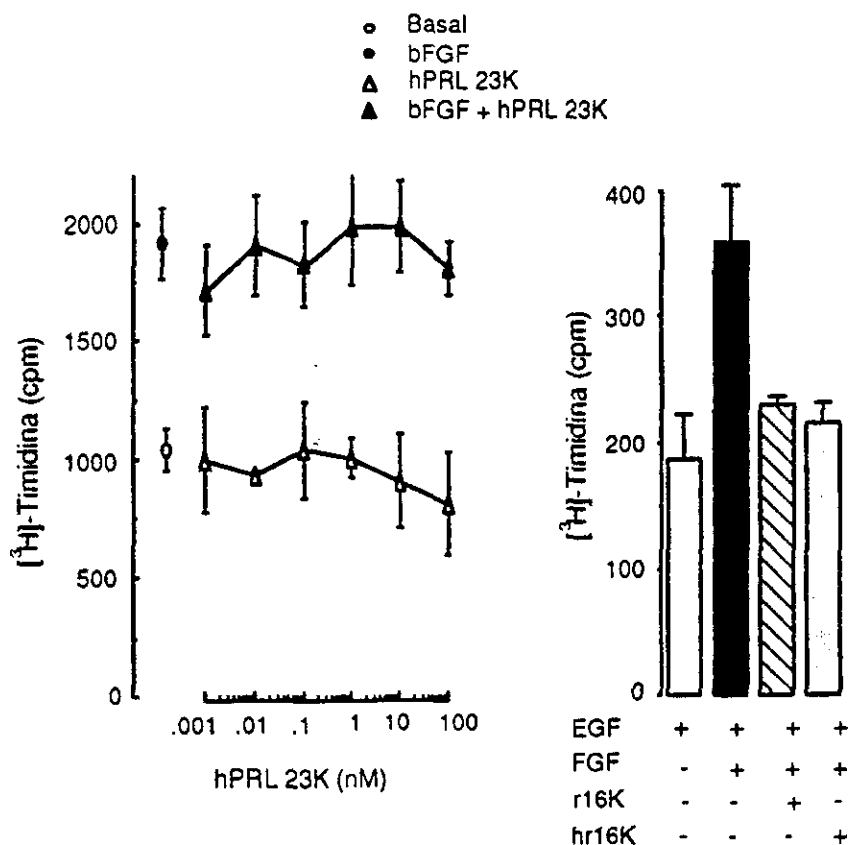


**Figura 9**

Células Nb2 fueron cocultivadas con HUVEC sembradas a tres grados de confluencia: alta, media y baja. Se midió la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en las células Nb2. No se observó modificación de la proliferación de Nb2 en presencia de HUVEC.

### III. Análisis de los posibles efectos autócrinos de las proteínas tipo-PRL sobre la proliferación de las células HUVEC.

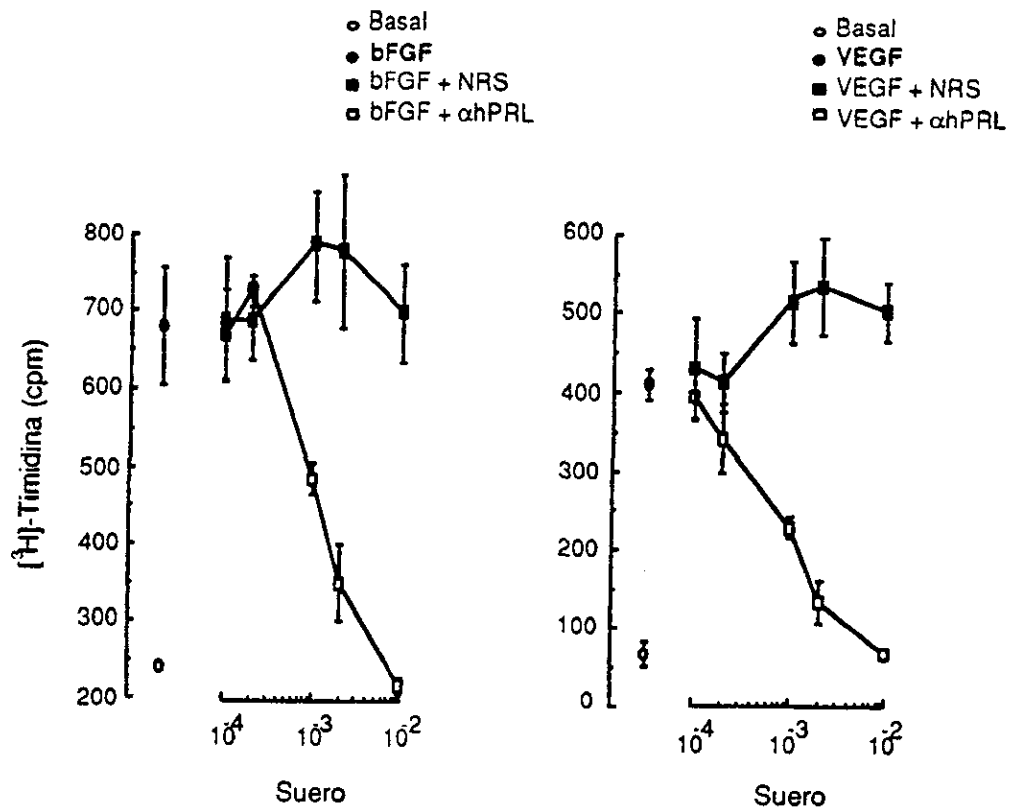
Efecto de prolactina 23K y 16K sobre la proliferación de HUVEC. Como se ha demostrado anteriormente la PRL 23K no modificó la proliferación de HUVEC, mientras que la PRL 16K, tanto de rata (rPRL 16K) como recombinante humana (hrPRL 16K), inhibieron la proliferación estimulada por bFGF (fig. 10).



**Figura 10**

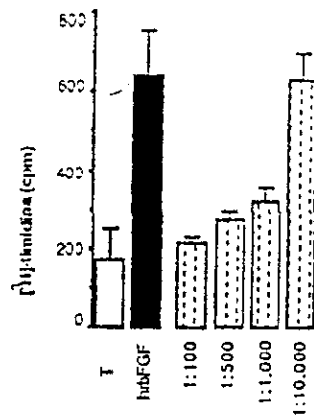
Efecto de concentraciones crecientes de hPRL 23K (a) y 100nM de PRL 16K (b) (r16K y hr16K) sobre la proliferación de HUVEC.

**Efecto de anticuerpos anti PRL sobre la proliferación de HUVEC**  
 Células cultivadas en medio libre de suero y en presencia de bFGF fueron incubadas con dos antisueros dirigidos contra PRL 23K humana y bovina y con un anticuerpo monoclonal dirigido contra hrPRL 16K. Los antisueros  $\alpha$ hPRL y  $\alpha$ bPRL (fig. 11 y 12 respectivamente) inhibieron la proliferación de HUVEC estimulada por bFGF (y VEGF para el caso de  $\alpha$ hPRL) en forma dependiente de la dosis, mientras que el anticuerpo monoclonal 1G8 no tuvo efecto (fig. 13).



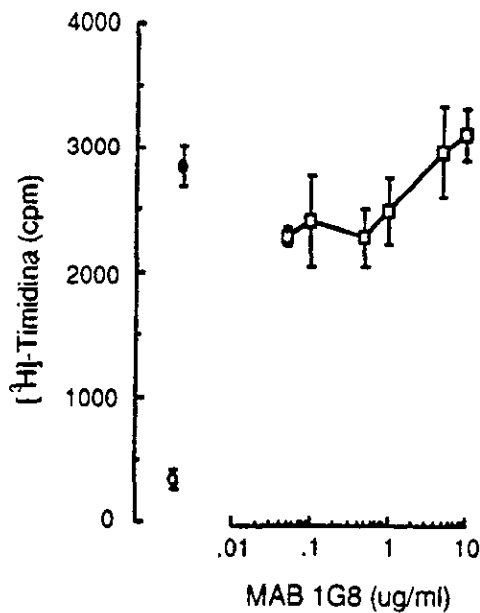
**Figura 11**

Efecto de  $\alpha$ hPRL sobre la proliferación de HUVEC estimulada por bFGF o VEGF. La figura muestra una inhibición de la proliferación dependiente de la dosis, tanto en presencia de bFGF como de VEGF, mientras que el SN no tuvo efecto.



**Figura 12**

Efecto de  $\alpha$ PRL sobre la proliferación de HUVEC estimulada por bFGF. La figura muestra una inhibición de la proliferación dependiente de la dilución.



**Figura 13**

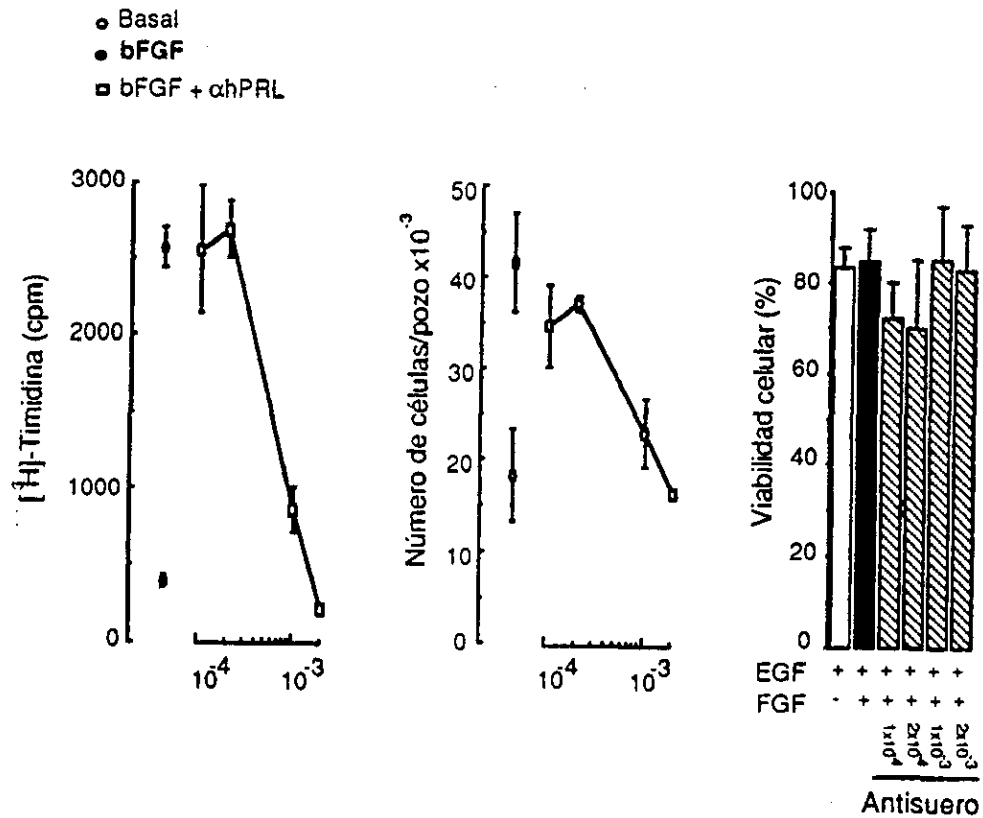
Efecto de MAb 1G8 sobre la proliferación de HUVEC estimulada por bFGF.

### Viabilidad y endotoxinas

Para determinar si el efecto inhibitorio de los antisueros sobre la proliferación de HUVEC no se debía a un efecto citotóxico por contaminación con LPS (endotoxinas), se determinó la viabilidad

celular por exclusión de azul tripano así como la presencia de endotoxinas en los anticuerpos.

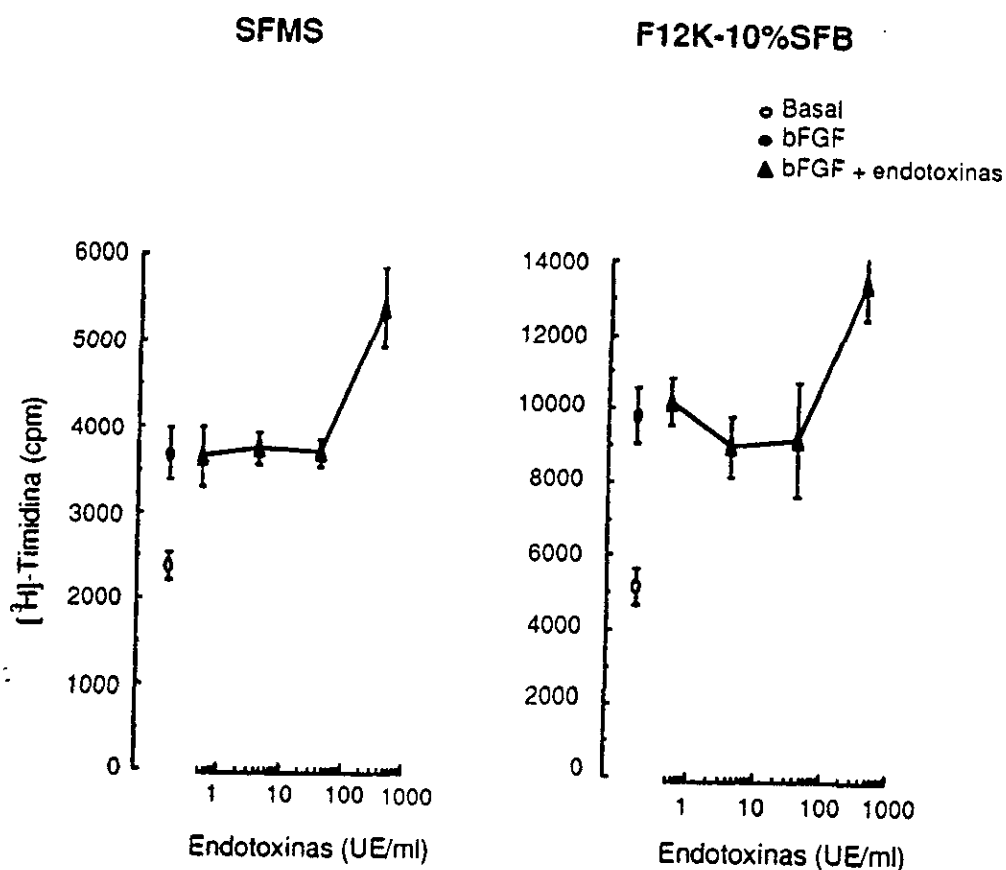
Se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul tripano de células HUVEC incubadas con  $\alpha$ hPRL. Para concentraciones del anticuerpo menores a  $2 \times 10^{-3}$  el porcentaje de células vivas fue superior al 70%, valor similar al encontrado para los controles en presencia de EGF y estimulado por FGF (fig. 14).



**Figura 14**

Efecto de  $\alpha$ hPRL. a) Incorporación de  $[^3\text{H}]$ -timidina, b) Número de células vivas, c) Porcentaje de células vivas.

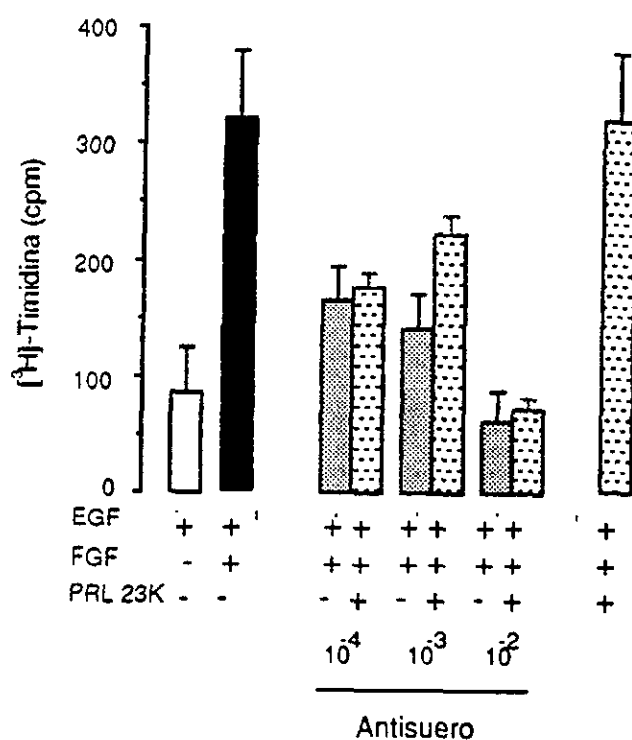
Asimismo, se determinó la presencia de endotoxinas (en forma de lipopolisacáridos de pared bacteriana gram negativa de *E. Coli*) en los anticuerpos y en el SNC utilizados. En ninguno de los casos se encontró niveles detectables de endotoxinas. Adicionalmente, se determinó el efecto de endotoxinas sobre HUVEC cultivadas en ausencia o presencia de 10% SFB sin observarse efecto inhibitorio alguno sobre la proliferación de las mismas (fig. 15).



**Figura 15**

Efecto de edotoxinas sobre la proliferación de HUVEC en ausencia de suero (a) y en presencia de 10% de SFB (b). No se observa efecto inhibitorio alguno sobre la proliferación de HUVEC.

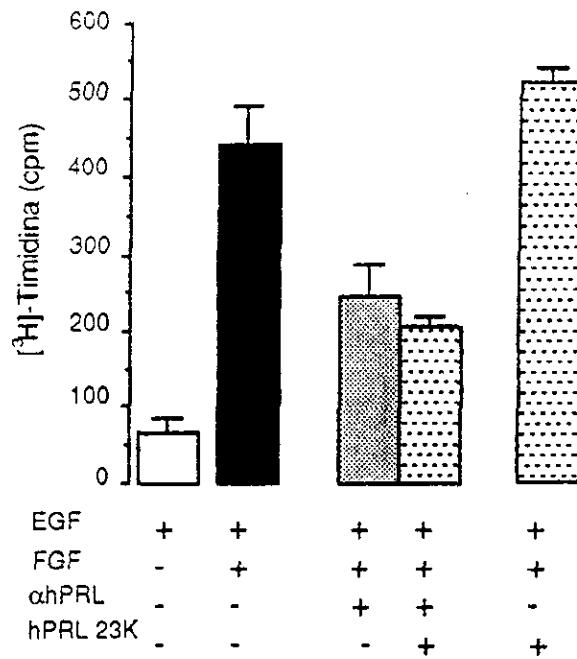
Con el fin de bloquear el efecto del ahPRL sobre la proliferación de HUVEC y de demostrar que dicho efecto se debía a la acción específica de IgGs anti hPRL, se incubó a las células en presencia del antisuero y estándares de hPRL 23K grado biológico, hPRL 23K recombinante y hPRL 16K recombinante. En ninguno de los casos se logró bloquear el efecto inhibitorio del antisuero (fig. 16a y b, 17 y 18)



**Figura 16a**

Coincubación de ahPRL con 200nM de hPRL 23K grado biológico.

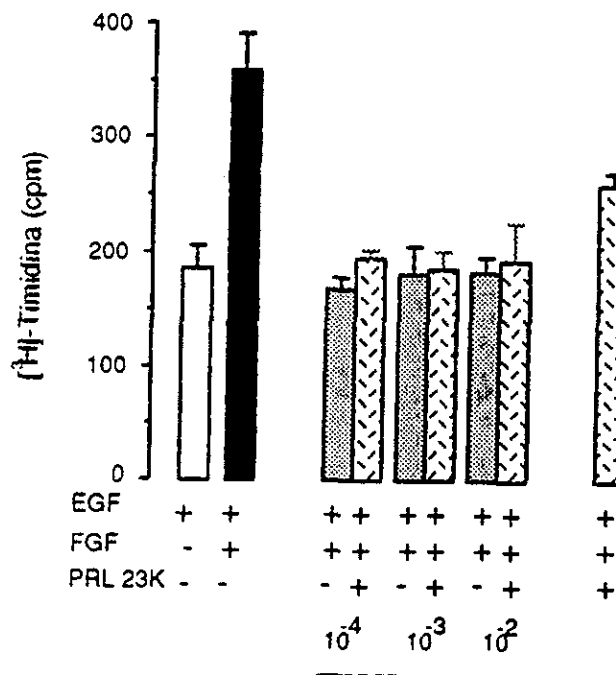
No se bloqueó el efecto inhibitorio de ahPRL en ninguno de los casos.



**Figura 16b**

Coincubación de  $\alpha$ hPRL con 1 $\mu$ M de hPRL 23K grado biológico.

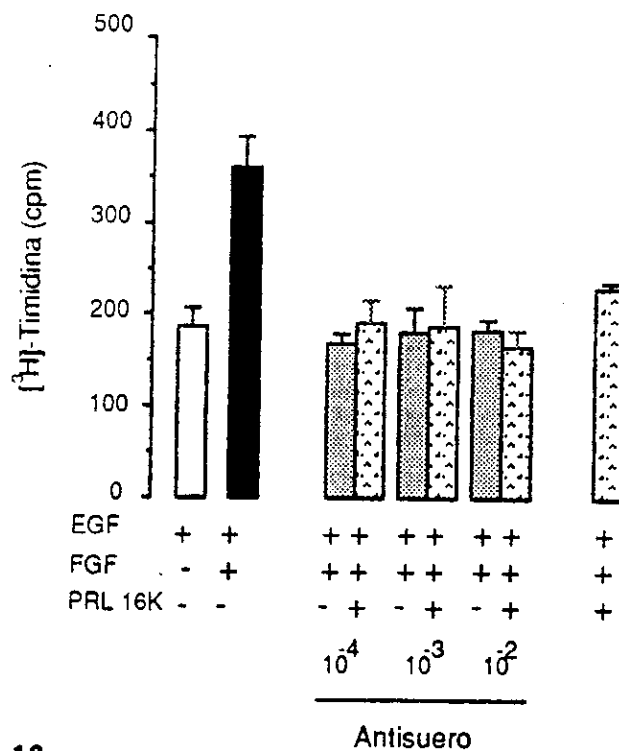
No se bloqueó el efecto inhibitorio de  $\alpha$ hPRL (1:500).



**Figura 17**

Coincubación de  $\alpha$ hPRL con hPRL 23K recombinante (200nM). No se bloqueó el efecto inhibitorio de  $\alpha$ hPRL en ninguno de los casos.





**Figura 18**

Coincubación de  $\alpha$ PRL con hPRL 16K recombinante (200nM). Se observa una inhibición de la proliferación de HUVEC en presencia de PRL 16K, sin embargo esta molécula no logró bloquear el efecto inhibitorio de  $\alpha$ PRL hasta el mismo nivel.

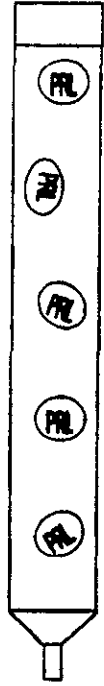
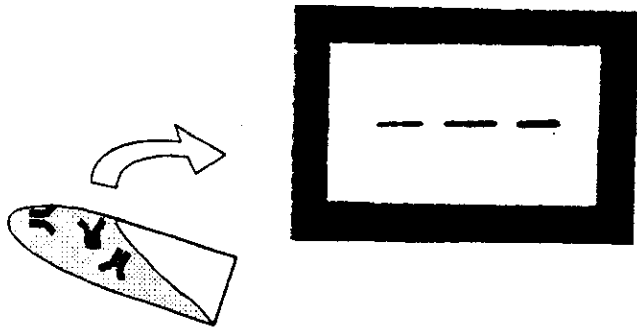
### Efecto de IgGs anti hPRL y bPRL sobre la proliferación de HUVEC

Si bien se descartó un posible efecto citotóxico de los anticuerpos por contaminación con endotoxinas, el hecho de que el efecto del  $\alpha$ PRL no fuera bloqueado por adición de hPRL exógena nos hizo poner en duda el hecho de que tal efecto se debiera en forma específica a la presencia de las IgGs- $\alpha$ PRL. Por esta razón procedimos a asilar las IgGs- $\alpha$ PRL de dicho antisuero mediante una columna de inmunoafinidad con hPRL 23K. El antisuero fue dividido en

dos fracciones, una de ellas conteniendo las IgGs- $\alpha$ hPRL (0.5 $\mu$ g proteínas/ul) y la otra el resto del suero (30 $\mu$ g proteínas/ul) al que llamaré "inespecífico". La eficiencia del aislamiento fue probada por Western Blot utilizando un estándar de hPRL 23K. La fracción conteniendo las IgGs- $\alpha$ hPRL detectó las bandas de hPRL 23K, mientras la fracción inespecífica no lo hizo (fig. 19). Ambas fracciones fueron probadas sobre cultivos de HUVEC, encontrándose que el efecto inhibitorio del antisuero residía en la fracción inespecífica (fig. 20 y 21). Estos hallazgos demostraron que el efecto inhibitorio sobre la proliferación de HUVEC no se debía en forma específica a la presencia de IgGs- $\alpha$ hPRL.

**Figura 19**

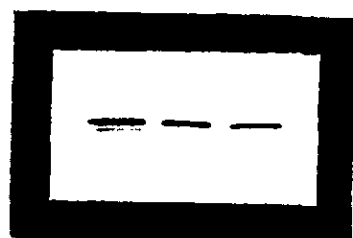
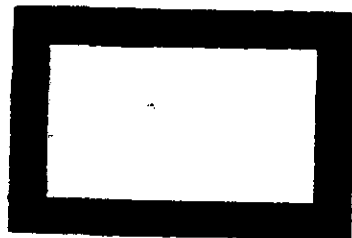
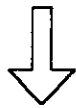
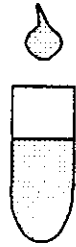
El esquema muestra el aislamiento mediante cromatografía de inmunoafinidad de las IgGs- $\alpha$ hPRL del antisuero  $\alpha$ hPRL. Se observan Western blots de hPRL 23K revelados con a)  $\alpha$ hPRL; b) "inespecífico"; c) IgGs- $\alpha$ hPRL.

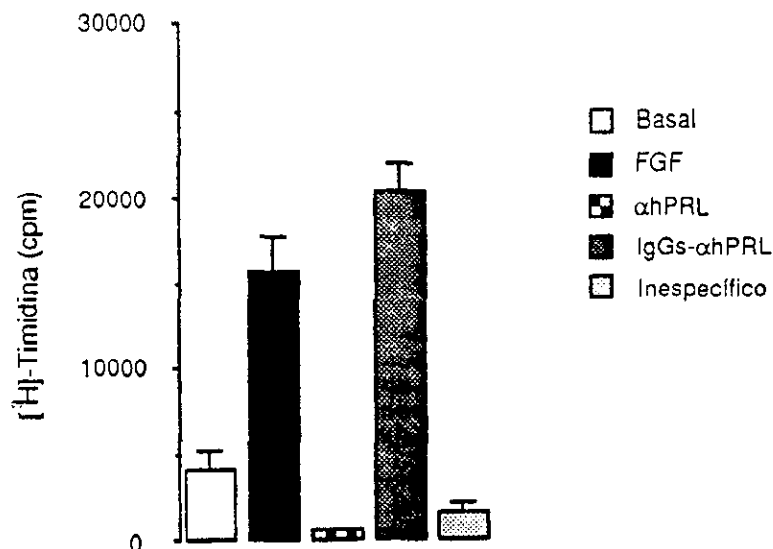


pH 7.6



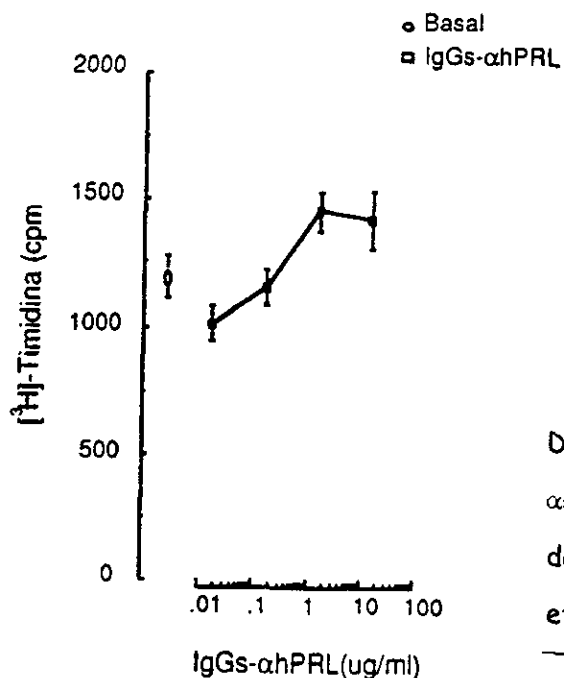
pH 3





**Figura 20**

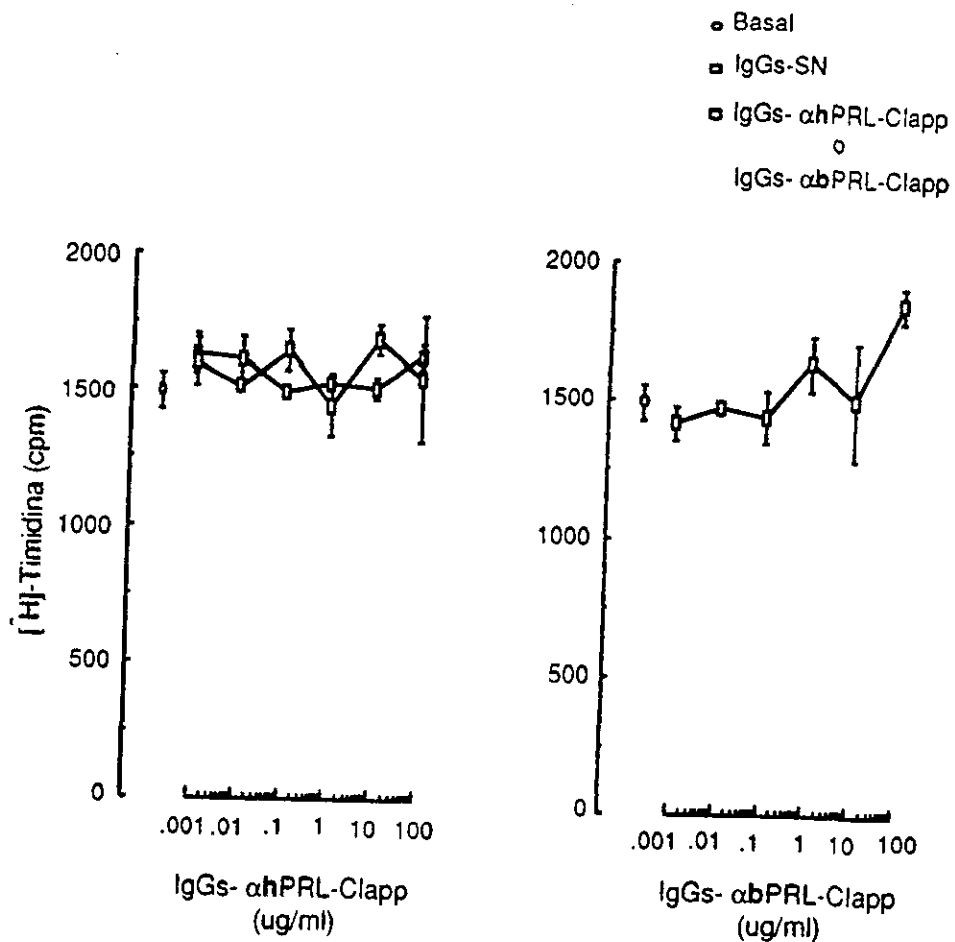
Efecto de αPRL (1:100), "inespecífico" (30ug/ml) e IgGs-αPRL (10ug/ml) sobre la proliferación de HUVEC en SFMS, 10 ng/ml EGF (basal) y 5ng/ml bFGF. Se observa una inhibición de la proliferación para el caso de αPRL e "inespecífico", pero no en el caso de IgGs-αPRL.



**Figura 21**

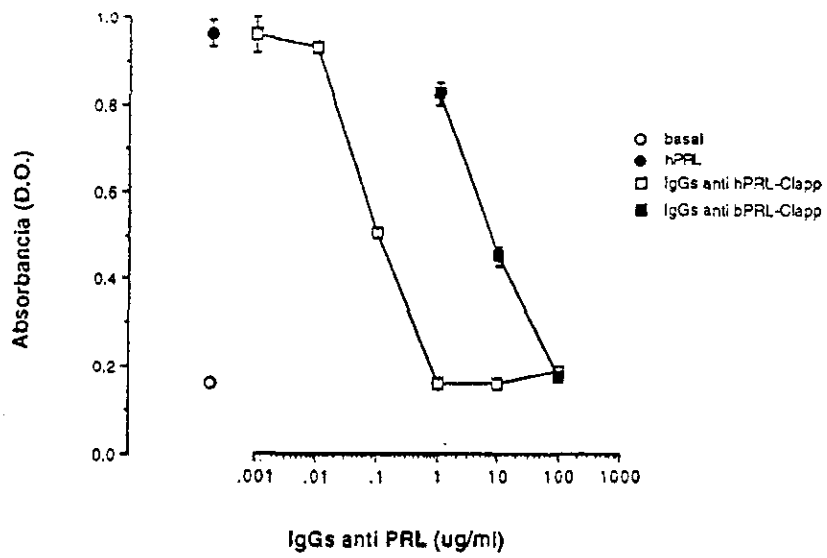
Dosis respuesta de las IgGs-αPRL sobre la proliferación de HUVEC. No se observa efecto inhibitorio alguno.

Por otra parte, se analizó el efecto de IgGs totales de dos antisueros generados en el laboratorio, uno dirigido contra hPRL (IgGs- $\alpha$ hPRL-Clapp) y el segundo contra bPRL (IgGs- $\alpha$ bPRL-Clapp), así como IgGs provenientes de un SNC (IgGs-SNC). En ninguno de los casos se encontró un efecto significativo sobre la proliferación de HUVEC (fig. 22). La capacidad de las IgGs aisladas de reconocer a la hPRL y bloquear su efecto fue probado incubando células Nb2 con hPRL (1 ng/ml) con diferentes concentraciones de IgGs (fig. 23).



**Figura 22**

Efecto de IgGs- $\alpha$ hPRL-Clapp, IgGs- $\alpha$ bPRL-Clapp e IgGs-SNC sobre la proliferación de HUVEC en SFMS, 10 ng/ml EGF.



**Figura 23**

Bloqueo de la estimulación de Nb2 por 1 ng/ml de hPRL 23K con IgGs- $\alpha$ hPRL-Clapp e IgGs- $\alpha$ bPRL-Clapp.

## DISCUSION

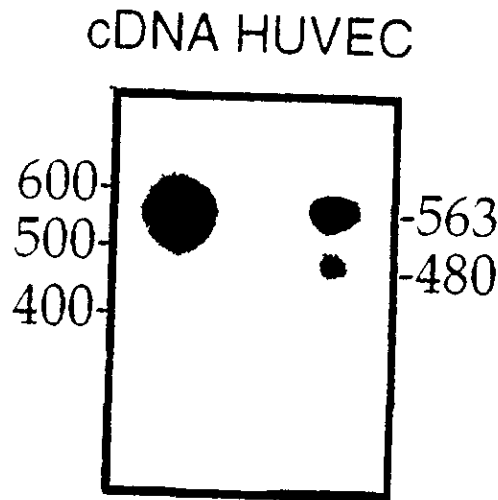
Los cultivos primarios de HUVEC presentaron características típicamente endoteliales, como lo son la presencia del factor de Von Willebrand o antígeno relacionado al Factor VIII (marcador de CE)<sup>39</sup>, la formación de monocapas tipo mosaico, la inhibición de la proliferación celular al alcanzar la confluencia, la formación de estructuras tipo capilar en matrices de colágena tipo I<sup>21</sup> y la respuesta al VEGF (factor de crecimiento específico para CE)<sup>7</sup>.

El marcaje metabólico seguido de la inmunoprecipitación de proteínas con inmunorreactividad de PRL reveló que las células HUVEC sintetizan y secretan proteínas tipo-PRL. Se detectaron 4 proteínas tipo-PRL con un peso molecular relativo de 77, 21, 16 y 14 kDa. La especificidad de las bandas se apoya en la reducción parcial de la intensidad de las mismas obtenida al realizarse la preadsorción de los anticuerpos anti hPRL con hPRL 23K. Si bien se obtuvo una preadsorción parcial utilizando hPRL 23K 4.4 $\mu$ M, todavía es posible mejorar su eficiencia utilizando una concentración de hPRL de al menos 10 $\mu$ M y aun más, eliminando los complejos antígeno-anticuerpo previamente a la inmunoprecipitación<sup>40</sup>.

Las bandas de 77, 21 y 14 kDa, pero no la de 16 kDa, aparecen tanto en los lisados celulares como en el medio condicionado, indicando que son sintetizadas y secretadas al medio. La forma de 16 kDa sólo se observa en los lisados celulares. Las proteínas de menor PM se asemejan en movilidad relativa a las PRL 16K y 14K descritas

anteriormente para el sistema hipotálamo-neurohipofisario<sup>24a,b,c</sup>. Este hecho es muy llamativo dado que además estas moléculas son, hasta el momento, las únicas formas moleculares de la PRL identificadas con efectos sobre la angiogénesis.

Por otra parte, la proteína de 21kDa podría traducirse a partir de un transcrito de menor tamaño encontrado en HUVEC. En el laboratorio, se ha analizado la expresión del gen de la PRL en HUVEC mediante un RT-PCR utilizando cebadores específicos para los exones 2 y 5.



La figura muestra un Southern blot de los productos del RT-PCR de HUVEC (der.) y del producto de PCR del cDNA de hPRL pituitaria (izq.). Se obtuvieron dos productos de amplificación a partir del RNA de HUVEC, el mayor tiene el mismo tamaño que el amplificado a



partir del cDNA de PRL pituitaria y corresponde al transcrito completo para PRL. Se ha secuenciado tal producto y corresponde al mensajero completo para PRL 23K. El segundo producto es unos 100 pb menor y aun no se ha secuenciado, sin embargo, en células endoteliales bovinas (BBCEC) un transcrito de unas 100 pares de bases menor al transcrito completo de la PRL corresponde al producto del procesamiento alternativo del transcrito primario y daría lugar a una proteína de un PM aproximado a 21kDa. Si bien, hasta el momento no se ha logrado secuenciar este segundo producto de amplificación encontrado en HUVEC, la posibilidad de que pudiera corresponder a un procesamiento alternativo del mensajero al que le falta el exón 3 permanece abierta.

Por otra parte, la variante de 21kDa también podría producirse por procesamiento postraducciona l de la PRL completa, sin embargo no hemos detectado la forma nativa de 23K en los lisados celulares ni en el medio condicionado, por lo que creemos que la primera posibilidad es la mas factible.

En lo concerniente a la proteína de 77kDa, variantes moleculares de alto peso molecular se han detectado anteriormente y representan dímeros, polímeros y agregados de PRL. Se forman tanto por puentes covalentes como no covalentes. Los puentes covalentes pueden incluir puentes disulfuro así como unión entre residuos de azúcares del monómero glicosilado. Las formas de alto peso molecular presentan, en general, una actividad biológica y una unión al receptor reducidas comparadas con el monómero<sup>13</sup>. Se han descrito múltiples formas

moleculares de PRL humana de alto peso molecular en la pituitaria<sup>42</sup>,<sup>43</sup> y el suero<sup>43</sup>, entre ellas la llamada "big prolactin" de 48 kDa y la "big big prolactin" de 150 kDa<sup>44</sup>. Entre las PRLs de alto peso molecular extrahipofisarias destaca una proteína inmunorreactiva tipo PRL de 60kDa, sintetizada y secretada por linfocitos humanos. Esta proteína tiene efectos autócrinos sobre la proliferación de los linfocitos<sup>44</sup>. El hecho de que células del sistema inmune produzcan prolactinas con efecto autócrino sobre su proliferación, nos hace pensar en una muy posible acción parácrina de las prolactinas endoteliales sobre células del sistema inmune. En particular, estos tipos celulares interactúan más fuertemente durante las primeras fases del proceso inflamatorio en que los leucocitos se adhieren al endotelio y se abren paso entre las CE, atravesando la membrana basal, hacia el tejido conectivo subyacente.

Si bien se detectaron proteínas tipo PRL mediante el marcaje metabólico e inmunoprecipitación, el cocultivo de células HUVEC con Nb2 no arrojó resultados positivos como en el caso de las células bovinas. Sin embargo, aun no podemos descartar que estas variantes de PRL de CE humanas no sean detectadas por las células Nb2. Para ello es necesario establecer las condiciones en que las prolactinas endoteliales sean secretadas en mayor proporción, o bien obtener una cantidad detectable de estas proteínas mediante la concentración de volúmenes mayores de medio condicionado.

Por otra parte, no fue posible determinar efectos autócrinos sobre la proliferación celular como en el caso de las CE de capilar de

cerebro bovino. En una primera aproximación determinamos que antisueros dirigidos contra hPRL y bPRL inhibían la proliferación de HUVEC, en forma similar a lo que ocurre sobre BBCEC. Sin embargo, el efecto sobre BBCEC fue bloqueado por la adición de 100nM de bPRL 23K, mientras que en el caso de HUVEC esto no se logró, aun en una concentración de 1µM. Ante este hecho, analizamos la posibilidad de que los antisueros estuvieran contaminados por endotoxinas y el efecto inhibitorio de los mismos sobre la proliferación celular se debiera a un efecto citotóxico. Sin embargo, no encontramos niveles detectables de endotoxinas en ninguno de los anticuerpos o SNC utilizados. Adicionalmente la incubación con endotoxinas no provocó efecto inhibitorio alguno sobre la proliferación de HUVEC ni signos de citotoxicidad. Estos resultados fueron consistentes con los descritos por Harlam et. al.<sup>45</sup>. En general se asume que las endotoxinas se unen a la superficie de las células y provocan su lisis por activación del complemento presente en el suero. Sin embargo, el efecto citotóxico de las endotoxinas sobre CE es dependiente de la especie. Mientras los LPS tienen un efecto citotóxico directo sobre CE bovinas provocando desadhesión, seguida de lisis celular, las CE humanas no son sensibles a las mismas aun en presencia de suero fresco como fuente de complemento. Distintas preparaciones de LPS (E. Coli, Salmonela minesota y S. typhosa) no tienen efectos citotóxicos sobre HUVEC aun en concentraciones 1000 veces mayores que las que producen citotoxicidad en células bovinas<sup>46,47</sup>.

Nuestros hallazgos, junto a estos antecedentes, nos llevaron a descartar un posible efecto citotóxico de los anticuerpos por

contaminación con endotoxinas. Sin embargo, el efecto inhibitorio de los antisueros no fue preadsorbido por la adición de estándares de PRL humana o bovina lo que nos hizo poner en duda el hecho de que tal efecto se debiera en forma específica a la presencia de las IgGs anti PRL en el medio de cultivo. Por esta razón, procedimos a aislar mediante una columna de inmunoafinidad las IgGs-hPRL presentes en el hPRL. El antisuero fue dividido en dos fracciones, una de ellas conteniendo las IgGs-hPRL y la otra el resto del suero. Ambas fracciones fueron probadas sobre cultivos de HUVEC. Los resultados mostraron que el efecto inhibitorio del antisuero residía en la porción no específica del mismo y la incubación de HUVEC con las IgGs-hPRL no mostró efectos significativos sobre la proliferación. Adicionalmente, IgGs aisladas a partir de otros dos antisueros, uno dirigido contra hPRL y el otro contra bPRL, tampoco mostraron efectos significativos sobre la proliferación de HUVEC.

Estos hallazgos, junto con los resultados del anticuerpo monoclonal 1G8, indican que las prolactinas endoteliales producidas por HUVEC no tienen efectos autócrinos sobre la proliferación, al menos detectables mediante las técnicas utilizadas. Para descartar completamente esta posibilidad es necesario purificar tales proteínas y analizar sus efectos sobre cultivos de HUVEC. En este sentido sería conveniente estudiar la expresión del gen de la PRL bajo distintas condiciones, así como su regulación mediante la utilización de genes reporteros que permitan determinar en qué momento se expresa la PRL en estas células. Por otra parte, es necesario investigar los posibles efectos autócrinos de las

prolactinas endoteliales sobre los mecanismos de adhesión, migración y asociación de las CE para formar estructuras tipo capilar.

Si bien es llamativo que, a diferencia de lo que ocurre en células BBCEC, las PRLs endoteliales no tienen efecto autócrino sobre la proliferación de las células HUVEC (al menos detectable con la metodología utilizada) no es sorprendente que células endoteliales de distinto lecho vascular y de distinta especie presenten diferencias en su fisiología. Un claro ejemplo es el ya mencionado efecto que tienen las endotoxinas sobre CE bovinas o humanas. Por otra parte en el laboratorio se ha demostrado que la proliferación de CE de retina de rata es estimulada por PRL 23K, cosa que no se observa para el caso de las células BBCEC y HUVEC. Por consiguiente, el efecto de las PRLs sobre la angiogénesis puede ser diferente entre endotelios provenientes de distintos vasos e incluso de distintas especies.

## **CONCLUSIÓN**

Cultivos primarios de células HUVEC sintetizan proteínas tipo PRL consistentes con la presencia del mensajero de PRL. Estas proteínas no parecen poseer efectos autócrinos sobre la proliferación celular

prolactinas endoteliales sobre los mecanismos de adhesión, migración y asociación de las CE para formar estructuras tipo capilar.

Si bien es llamativo que, a diferencia de lo que ocurre en células BBCEC, las PRLs endoteliales no tienen efecto autócrino sobre la proliferación de las células HUVEC (al menos detectable con la metodología utilizada) no es sorprendente que células endoteliales de distinto lecho vascular y de distinta especie presenten diferencias en su fisiología. Un claro ejemplo es el ya mencionado efecto que tienen las endotoxinas sobre CE bovinas o humanas. Por otra parte en el laboratorio se ha demostrado que la proliferación de CE de retina de rata es estimulada por PRL 23K, cosa que no se observa para el caso de las células BBCEC y HUVEC. Por consiguiente, el efecto de las PRLs sobre la angiogénesis puede ser diferente entre endotelios provenientes de distintos vasos e incluso de distintas especies.

## CONCLUSIÓN

Cultivos primarios de células HUVEC sintetizan proteínas tipo PRL consistentes con la presencia del mensajero de PRL. Estas proteínas no parecen poseer efectos autócrinos sobre la proliferación celular

## BIBLIOGRAFÍA

- 1. Folkman, J. (1976) The vascularization of tumors. *Scientific American*, 234: 58-64, 70-73.
- 2. Auerbach, W and Auerbach, R. (1994) Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac. Ther.*, 63: 265-311.
- 3. Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987) Angiogenic factors. *Science*, 235:443-447.
- 4. Klagsbrun, M. and D'Amore, P.A. (1991) Regulators of angiogenesis. *Ann. Arch. Rev. Physiol.*, 53:217-239.
- 5. Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J.A., Fiddes, J.C., Gospodarowicz, D. (1987) Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogenic that promotes their own growth. *Nature*, 325:257-259.
- 6. Vlodavsky, I., Fridman, R., Sullivan, R., Sasse, J. and Klagsbrun. (1987) Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell-associated and platelet-derived growth factor which is secreted. *J. Cell. Physiol.* 131:402-408.
- 7. Ferrara, N., Houck, K., Jackeman, L., and Leung D.W. (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Rev* 13:18-35.
- 8. Mc Phearson, J., Sage, H., and Bornstein, P. (1981) Isolation and characterisation of a glycoprotein secreted by aortic endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 256:11330-11336.
- 9. Stein, I., Neeman, M., Shweiki, D., Itin, A. and Keshet E. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, 15, 5363-5368.

- 10. Gajdusek, C.M., and Carbon, S. (1989) Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *Journal of Cellular Physiology*, 139:570-579.
- 11. Ferrara, N., Clapp, C., Weiner, R. (1991) The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*, 129:896-900.
- 12. Clapp, C., Martial, J., Guzman, R.C., Rentier-Delrue, F., Weiner, R.I. (1993) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, 133:1292-1299.
- 13. Sinha, Y.N. (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews*, 16: 354-369.
- 14. Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P. A., and Martial, J. A. (1996) Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocrine Reviews*, 17: 385-410.
- 15. Cosman, D., Lyman, S.D., Idzerda, R.L., Beckmann, M.P., Park, L.S., Goodwin, R.G., and March C.J. (1990) A new cytokine receptor superfamily. *Trends in Biochemistry*, 15:265-270.
- 16. 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: 2055-2064.
- 17. Clapp, C., Sears, P.S., Russell, D.H., Richards, J., Levay-Young, B.K., Nicoll, C.S. (1988) Biological and immunological



- 24b. Torner, L., Mejía, S., López-Gómez, F.J., Quintanar, A., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (1995) A 14-Kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology*, 136:5454-5460.
- 24c López-Gómez, F.J., Torner, L., Mejía, S., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (1995) Immunoreactive prolactins of the neurohypophyseal system display actions characteristic of prolactin and 16KK prolactin. *Endocrine*, 3:573-578.
- 25. Lkhinder, M., Delpal, S., Le Provost, F., and Ollivier-Bousquet, M. (1997) Rat prolactin synthesis by lactating mammary epithelial cells. *FEBS Letters*, 401:117-122.
- 26a O'Neal, K.D., Montgomery, D.W., Truong, T.M., and Yu-Lee, L. (1992) Prolactin gene expression in human thymocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 87:R19-R23.
- 26b Prystowsky, M.B., and Clevenger, C.V. (1994) Prolactin as a second messenger for interleukin 2. *Immunomethods*, 5:49-55.
- 27 Garay, E., Nava, G., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1995) Expresión del gen de la prolactina en células endoteliales. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.
- 28. Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1985) Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, 313: 745-747.
- 29. López-Gómez, F.J., Macotela, G. Y., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1995) Las células endoteliales producen un factor mitogénico autócrino tipo prolactina. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.

- 43. Aston, R., Young, K., van den Berg, H., and Ivanyi, J., (1984) Identification of Mr variants of prolactin with monoclonal antibodies, *FEBS* 171:192-196.
- 44. Sabharwal, P., Glaser, R., Lafuse, W., Varma, S., Liu, Q., Arkins, S, Kooijman, R., Kutz, L., Kelley, K.W., and Malarkey W.B. (1992) Prolactin synthesized by human peripheral blood mononuclear cells: An autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7713-7716.
- 45. Harlan, J.M., Harker, L.A., Striker, G.E. and Weaver, L.J. (1983) Effects of lipopolysaccharide on human endothelial cells in culture. *Thrombosis Research*, 29; 15-26.
- 46. Harlan, J. M., Harker, L. A., Reidy, M.A., Gajdusek, C.M., Schwartz, S.M., and Striker, G.E. (1983) Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro, *Lab. Invest.*, 48:269-274.
- 47. Harker, L. A., Reidy, M.A., Gajdusek, C.M., Schwartz, S.M., and Striker, G.E. (1993) Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab. Invest.*, 48:269-274.