



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE VASOINHIBINAS POR TROMBINA**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA MAGDALENA ZAMORA CORONA**

DIRECTOR DE TESIS:  
**DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:  
**DR. CARLOS GUILLERMO MARTÍNEZ MORENO**  
**DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ**  
**DR. JUAN PABLO ROBLES ÁLVAREZ**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO.  
JUNIO DE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Neurobiología**

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: María Magdalena Zamora Corona, cuyo título es: “Análisis de la generación de vasoinhibinas por trombina” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

\_\_\_\_\_

Secretario Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.

\_\_\_\_\_

Vocal Dra. Laura Cristina Berumen Segura

\_\_\_\_\_

Suplente Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

\_\_\_\_\_

Suplente Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

\_\_\_\_\_

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 en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. y bajo el auspicio de CONACYT (Proyecto 289568 y Beca de maestría número 473697, número de becario 626257).

## Resumen

La vasoinhibina es una familia de péptidos antiangiogénicos con masas moleculares que varían desde 9 hasta 18 kiloDaltones (kDa) generados por el procesamiento proteolítico de la hormona prolactina (PRL), y que tienen implicaciones terapéuticas en la retinopatía diabética, la cardiomiopatía del postparto y el cáncer. Además, la vasoinhibina tiene efectos profibrinolíticos con repercusiones en la hemostasia y en las enfermedades trombóticas. La trombina es una proteasa, perteneciente al grupo de las serín endopeptidasas, que procesa al fibrinógeno hacia fibrina, un componente esencial del coágulo sanguíneo. En este trabajo investigamos si la trombina procesa a la PRL hacia vasoinhibina como un posible mecanismo de regulación de la hemostasia y la angiogénesis. La PRL se incubó con trombina y los productos de su proteólisis se analizaron mediante *Western blot*, espectrometría de masas, purificación por HPLC y bioactividad. La unión arginina (R)-glicina (G) es un sitio de corte consenso de la trombina y nosotros encontramos que la trombina corta a la PRL a nivel de R48-G49 y R103-G104, lo que genera dos fragmentos N-terminales de 6 y 11 kDa, respectivamente. Estos fragmentos comprenden los residuos 1 al 48 y 1 al 103 de la PRL y fueron capaces de inhibir la proliferación y migración de células endoteliales en cultivo. Nuestros hallazgos extienden la familia de la vasoinhibina a proteínas más pequeñas que 9 kDa y añaden a la trombina a la lista de proteasas capaces de generar a la vasoinhibina. Futuros estudios deberán enfocarse en caracterizar la presencia endógena, los efectos y las potencias biológicas de las isoformas de vasoinhibina generadas por trombina para establecer su relevancia fisiológica.

## Summary

Vasoinhibin is a family of antiangiogenic proteins with molecular masses that range from 9 to 18 kDa, which are generated by proteolytic cleavage of the hormone prolactin (PRL). Vasoinhibin has therapeutic implications in diabetic retinopathy, postpartum cardiomyopathy, and cancer. Furthermore, vasoinhibin has profibrinolytic effects which may impact thrombotic disorders. Thrombin is a protease, belonging to the family of serine endopeptidases, which cleaves fibrinogen to fibrin, an essential blood clot component. Here, we studied whether thrombin cleaves PRL to vasoinhibin as a putative mechanism regulating hemostasis and angiogenesis in response to tissue injury. PRL was incubated with thrombin and the resulting proteolytic products were evaluated by *Western blot*, mass spectrometry, HPLC purification and bioactivity. Arginine (G) – glycine (G) is the consensus cleavage site for thrombin and we found that thrombin cleaved PRL between R48-G49 and R103-G104 to generate N-terminal fragments of 6 and 11 kDa, respectively. These PRL fragments comprise residues 1 to 48 and 1 to 103 and were capable to inhibit the proliferation and migration of endothelial cells in culture. These findings extend the vasoinhibin family to proteins smaller than 9 kDa and add thrombin to the list of proteases generating vasoinhibin. Future studies identifying the endogenous presence and biological properties of thrombin-generated vasoinhibin isoforms are needed to help establish the physiological relevance of these novel proteins.

## **Agradecimientos**

Al excelente apoyo técnico de Xarubet Ruiz-Herrera, Fernando López Barrera y Adriana González Gallardo<sup>1</sup>.

A la asistencia de los laboratoristas Antonio Prado Galán y Daniel Mondragón Huerta.

A la asistencia cotidiana de Leonor Casanova Rico<sup>2</sup>, Nuri Aranda López<sup>2</sup>, Guadalupe Amador Uribe<sup>2</sup>, Carmen Mendoza López<sup>2</sup>, Ma. De Lourdes Lara Ayala<sup>3</sup>, Ramón Martínez Olvera<sup>4</sup>, Alberto Lara Rubalcava<sup>4</sup>, Omar González Hernández<sup>4</sup> y Anel Martínez Moreno<sup>4</sup>.

A la M. en C. Lucía del Carmen Márquez<sup>5</sup>, Q. Eréndira García de los Ríos<sup>5</sup> y M. en C. Lucero Ríos Ruiz<sup>5</sup>, por su asistencia técnica en el análisis de MALDI-TOF.

Al Dr. César Ferreira Batista<sup>6</sup>, Biol. Erika Patricia Meneses Romero<sup>6</sup> y Q.I. Lorena Hernández Orihuela<sup>6</sup>, por su asistencia técnica en el análisis de Identificación de Proteínas.

Al Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (matrícula 518010865).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (473697, número de becario 626257).

Al CONACYT (289568) por el financiamiento otorgado.

- 
1. Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología, UNAM.
  2. Unidad de Enseñanza, Instituto de Neurobiología, UNAM.
  3. Unidad de Videoconferencia, Instituto de Neurobiología, UNAM.
  4. Unidad de Cómputo, Instituto de Neurobiología, UNAM.
  5. Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química, UNAM.
  6. Unidad de Proteómica, Instituto de Biotecnología, UNAM.

## Dedicatoria

## Índice

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	4
3. Justificación .....	8
4. Pregunta de investigación.....	9
5. Hipótesis .....	9
6. Objetivos .....	9
6.1. Objetivo General.....	9
6.2. Objetivos Específicos .....	9
7. Métodos .....	10
7.1. Incubación de PRL con trombina.....	10
7.2. Caracterización del corte de PRL con trombina. ....	10
7.2.1. SDS-PAGE tricina.....	10
7.2.2. Tinción de azul de Coomassie para proteína total.....	11
7.2.3. <i>Western blot</i> .....	11
7.3. Determinación de la masa y separación de los fragmentos de PRL generados .....	12
7.3.1. Análisis de los fragmentos de PRL generados mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF. ....	12
7.3.2. Purificación de los fragmentos de PRL mediante HPLC.....	13
7.4. Análisis de la bioactividad de los fragmentos de PRL generados por digestión con trombina. ....	14
7.4.1. Ensayo de proliferación de células endoteliales. ....	14
7.4.2. Ensayo de migración endotelial. ....	15
7.5. Análisis de identificación de proteínas.....	16

7.5.1.	Optimización del espectrómetro de masas (calibración externa).....	16
7.5.2.	Análisis espectrométrico. ....	16
7.5.3.	Búsqueda en PDB ( <i>Protein Data Bank</i> ) e identificación de las proteínas .....	17
7.6.	Análisis estadístico. ....	18
8.	Resultados .....	19
8.1.	Caracterización del corte de PRL con trombina. ....	21
8.2.	Determinación de la masa y separación de los fragmentos de PRL generados .....	23
8.2.1.	Análisis de los principales fragmentos de PRL mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. ....	23
8.2.2.	Purificación de los fragmentos de PRL mediante HPLC. ....	26
8.3.	Análisis de la bioactividad de los fragmentos de PRL generados por trombina .....	28
8.3.1.	Evaluación de la actividad de los fragmentos de PRL sobre la proliferación y migración de células endoteliales. ....	28
8.4.	Análisis de identificación de la secuencia de los fragmentos activos de PRL generados por trombina mediante espectrometría de masas. ....	30
9.	Discusión .....	33
10.	Conclusiones .....	39
11.	Referencias.....	40
12.	Índice de figuras y tablas .....	47
13.	Apéndices .....	49
13.1.	Lista de abreviaturas .....	49
13.2.	Código de 1 y 3 letras para representación de los aminoácidos. ....	51

## 1. Introducción

La angiogénesis es la formación de vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. Este proceso ocurre durante el desarrollo acompañando el crecimiento de los tejidos. Sin embargo, en la edad adulta la angiogénesis está altamente restringida y sólo tiene lugar en asociación a eventos reproductivos femeninos, por ejemplo, durante el ciclo ovárico y en la formación de la placenta durante el embarazo (Clapp *et al.*, 2006a). Asimismo, la angiogénesis es un evento importante para la reparación de heridas y fracturas. La estricta regulación de este proceso es el resultado de un delicado balance entre factores positivos y negativos que promueven o inhiben la angiogénesis (Carmeliet, 2005) y la desregulación de este control contribuye al desarrollo de enfermedades caracterizadas por una angiogénesis excesiva como son la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y el cáncer (Clapp *et al.*, 2006a).

Algunos de los factores que promueven la angiogénesis incluyen al factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (Esch *et al.*, 1985), al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Leung *et al.*, 1989), al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Gospodarowicz *et al.*, 1979) y a la trombina (Tsopanoglou *et al.*, 1993). Como ejemplos de factores inhibidores de la angiogénesis se encuentran la endostatina (O'Reilly *et al.*, 1997), la angiostatina (O'Reilly *et al.*, 1994), la vasostatina (Pike *et al.*, 1998) y la vasoinhibina (Clapp *et al.*, 1993).

En los últimos años, la proteasa trombina ha surgido como un potente activador de la angiogénesis que actúa a través de dos mecanismos principales: el primero es el de procesar el fibrinógeno a fibrina, lo que provee de un andamiaje para que las células endoteliales migren y se organicen en estructuras capilares; y el segundo es a través de la proteólisis/activación de los receptores activados por proteasas (PARs), desencadenando vías de señalización en las células endoteliales que conducen a su proliferación y migración (Maragoudakis *et al.*, 2002). Entonces, está claro que la trombina puede actuar como promotor de la angiogénesis.

No obstante, por su calidad de proteasa, la trombina puede generar especies con actividad antiangiogénica a partir de su actividad sobre otras proteínas. A este respecto, es bien conocido que la proteólisis enzimática puede derivar en la generación de proteínas con efectos sobre la angiogénesis (Cao, 1998). Una proporción importante de los inhibidores de la angiogénesis conocidos corresponden a fragmentos derivados de la proteólisis de proteínas que, en su forma completa, carecen de acciones sobre la angiogénesis, tales como la angiostatina, la endostatina y la vaso inhibina, derivados del plasminógeno, la colágena XVIII y la hormona prolactina, respectivamente (Cao, 2001).

La vaso inhibina comprende una familia de proteínas con masas moleculares variables (9 a 18 kDa) derivados del procesamiento proteolítico de la prolactina (PRL) (Clapp *et al.*, 1993), la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario (Struman *et al.*, 1999) con acciones inhibitorias sobre la dilatación, permeabilidad, crecimiento y supervivencia de los vasos sanguíneos (Clapp *et al.*, 2006a). La vaso inhibina ejerce sus efectos al interaccionar con distintas proteínas en las membranas de las células endoteliales (Bajou *et al.*, 2014; Clapp y Weiner, 1992), lo que deriva en la inhibición de diversas vías de señalización como la de las MAPK (D'Angelo *et al.*, 1995) y la de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) (Gonzalez *et al.*, 2004) activadas en respuesta a factores angiogénicos como el VEGF, el bFGF, la bradicinina y la acetilcolina. Adicionalmente a sus efectos vasculares, recientemente se reportó que la vaso inhibina altera la hemostasia a través de promover la fibrinólisis mediante el bloqueo de la acción del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) (Bajou *et al.*, 2014).

Hasta ahora se sabe que la PRL puede ser procesada proteolíticamente hacia vaso inhibina por la catepsina D (Piwnica *et al.*, 2004), las metaloproteasas de matriz (MMP-1, -2, -3, -8, -9 y -13) (Macotella *et al.*, 2006) y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1) (Ge *et al.*, 2007). El corte realizado por dichas proteasas ocurre a diferentes niveles en el asa que conecta la tercera y cuarta  $\alpha$ -hélices de la PRL, generando isoformas de vaso inhibina de distintos tamaños, todas conteniendo la región N-terminal de la hormona (Clapp *et al.*, 2006b).

La trombina también procesa a la PRL, pero en un asa distinta a la de las demás proteasas; sin embargo, no se sabe si genera a la vasoinhibina ya que fue reportado que como consecuencia de la proteólisis por trombina se generaba un fragmento C-terminal de 16 kDa sin actividad sobre la angiogénesis y un fragmento N-terminal de 6 kDa cuya actividad no se analizó (Khurana *et al.*, 1999). Debido a esto, es posible proponer que el fragmento de 6 kDa de la PRL generado por trombina pudiera ser una vasoinhibina. De ser así estaríamos añadiendo a la trombina a la lista de proteasas capaces de generar a la vasoinhibina y extendiendo esta familia a proteínas menores que los 9 kDa.

## 2. Antecedentes

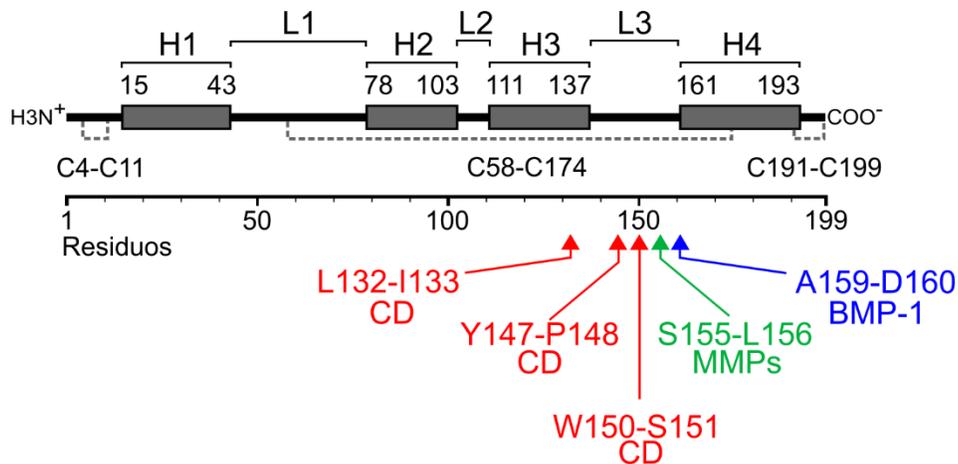
La vasoinhibina es sólo un ejemplo de diversas moléculas antiangiogénicas endógenas derivadas de la proteólisis de moléculas precursoras que, en su forma intacta, no tienen acciones sobre la angiogénesis (Tabla 1) (Cao, 2001).

Tabla 1. Inhibidores endógenos de la angiogénesis que resultan del procesamiento proteolítico de proteínas precursoras.

<b>Inhibidores endógenos de la angiogénesis</b>	<b>Proteasa</b>	<b>Precursor</b>	<b>Referencias</b>
Angiostatina	Elastasa	Plasminógeno	(O'Reilly <i>et al.</i> , 1994)
Endostatina	Catepsina L	Colágeno XVIII	(Felbor <i>et al.</i> , 2000; O'Reilly <i>et al.</i> , 1997)
Kininostatina (Dominio 5 del HK)	Calicreína plasmática	Cininógeno de alto peso molecular (HK)	(Colman, 2006)
Dominio kringle-2 de la protrombina (PtK2)	Factor Xa	Protrombina	(Lee <i>et al.</i> , 1998)
PF4 <sup>17-70</sup>	Elastasa	Factor plaquetario 4	(Gupta <i>et al.</i> , 1995)
Vasostatina	Elastasa	Calreticulina	(Mans <i>et al.</i> , 2012; Pike <i>et al.</i> , 1998)
Fragmento de 29 kDa de fibronectina	Trombina	Fibronectina	(Homandberg <i>et al.</i> , 1985)
aaAT (Antitrombina antiangiogénica)	Trombina, elastasa	Antitrombina	(O'Reilly <i>et al.</i> , 1999)
Parstatina	Trombina	PAR-1	(Zania <i>et al.</i> , 2009)
Vasoinhibina (14-18 kDa)	Catepsina D MMPs BMP-1	Prolactina	(Clapp <i>et al.</i> , 1993; Ge <i>et al.</i> , 2007; Macotela <i>et al.</i> , 2006; Piwnica <i>et al.</i> , 2004)

El efecto antiangiogénico de la vasoinhibina fue descubierto en un intento por determinar a los factores involucrados en la regulación de la vasculatura de la hipófisis anterior. Se observó que el fragmento N-terminal de 16 kDa de la PRL inhibía la proliferación de células endoteliales de manera muy potente y dependiente de la dosis (Clapp *et al.*, 1993), demostrando por primera vez el efecto antiangiogénico de estos péptidos que junto con otros efectos sobre la vasculatura descritos posteriormente, sería lo que llevaría a darle a esta familia el nombre de vasoinhibina (Clapp *et al.*, 2006b).

La vasoinhibina puede ser generada en la hipófisis anterior de varias especies, incluida la humana (Sinha y Gilligan, 1984; Sinha *et al.*, 1985) y, en tejidos extrahipofisarios, por la acción de enzimas como la catepsina D (Piwnica *et al.*, 2004), las metaloproteasas de matriz (MMPs) (Macotela *et al.*, 2006) y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1) (Ge *et al.*, 2007). Estas proteasas cortan a diferentes niveles del asa que conecta la tercera y la cuarta  $\alpha$ -hélice de la PRL generando isoformas de vasoinhibina de diferentes tamaños que corresponden a la región N-terminal de la PRL (Figura 1) (Clapp *et al.*, 2006b).



**Figura 1. Representación esquemática que ilustra los sitios de corte proteolítico en la molécula de PRL que generan las distintas isoformas de vasoinhibina.** Representación lineal de la estructura secundaria de la PRL humana. Se indican las cuatro  $\alpha$ -hélices principales (H1, H2, H3 y H4), las tres asas o *loops* (L1, L2 y L3), los tres puentes disulfuro intramoleculares (C4-C11, C58-C174 y C191-C199), los extremos N- y C-terminal (H<sub>3</sub>N<sup>+</sup> y COO<sup>-</sup>, respectivamente). También se indican los sitios de corte de las enzimas que hasta ahora se conocían que generaban a la vasoinhibina: de la catepsina D (CD) (en rojo) los sitios son L132-I133, Y147-P148 y W150-

S151; el sitio de corte de las metaloproteasas de matriz (MMPs) (en verde) es entre los residuos S155-L156; y el de la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1) (en azul) es entre A159-D160.

La catepsina D contribuye a generar a la vasoinhibina en los gránulos de secreción de los lactótopos adenohipofisarios donde se almacena la PRL y en donde se reúnen las condiciones ácidas necesarias para la actividad de esta enzima (Cruz-Soto *et al.*, 2009). La catepsina D genera fragmentos de PRL que comprenden los aminoácidos 1-132 (15 kDa), 1-147 (16.5 kDa) y 1-150 (17 kDa) (Figura 1). La caracterización de estos fragmentos fue determinada usando tres enfoques complementarios: 1) análisis de su migración en el sistema de geles de acrilamida bajo condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE); 2) secuenciación N-terminal y 3) espectrometría de masas (Piwnica *et al.*, 2004). Finalmente, la naturaleza de vasoinhibina de estos fragmentos se demostró a través de su efecto inhibitorio sobre la proliferación de células endoteliales en cultivo inducida por factores angiogénicos, mediante el bloqueo de la activación de la vía de las MAPK (Piwnica *et al.*, 2004).

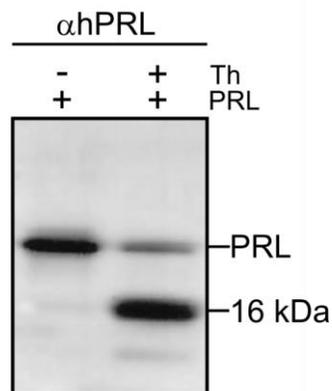
La vasoinhibina también puede ser generada por acción de algunas metaloproteasas de matriz (MMPs) en los tejidos blanco de la PRL bajo el pH neutro que caracteriza al ambiente extracelular. Se demostró que MMPs secretadas por cultivos primarios de células del cartílago (condrocitos), o las MMP-8, 13, 3, 1, 2 y 9 puras, procesan a la PRL hacia fragmentos de 17, 16, 15 y 14 kDa. La presencia de la región N-terminal de la PRL en dichos fragmentos se determinó mediante el uso de anticuerpos monoclonales y secuenciación de Edman. Además, la secuenciación permitió discernir que el principal sitio de corte ocurre entre los aminoácidos S155 y L156 de la PRL (Figura 1). Por último, se corroboró la actividad antiangiogénica mediante el ensayo de proliferación de células endoteliales en cultivo (Macotela *et al.*, 2006).

La proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1) también genera una vasoinhibina de 17 kDa bajo condiciones de pH neutro. La determinación de la estructura N-terminal de la PRL en dicho fragmento se hizo mediante secuenciación de Edman, mostrando que el corte ocurre entre los aminoácidos A159 y D160 de la PRL (Figura 1). Esta proteína se

produjo también de manera recombinante y se mostró que posee efectos antiangiogénicos, siendo capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales en cultivo y la vascularización de la membrana corioalantoidea del pollo (Ge *et al.*, 2007).

Como un intento de analizar otras proteasas de importancia fisiológica para la generación de vasoinhibina, Khurana y colaboradores en 1999 investigaron a la trombina, y reportaron que a diferencia de otras proteasas que generan fragmentos de PRL que contienen el extremo N-terminal de la hormona, la trombina genera un fragmento mayoritario de 16 kDa que corresponde al extremo C-terminal de la PRL y que este fragmento C-terminal no inhibe la angiogénesis (Figura 2) (Khurana *et al.*, 1999). Este hallazgo se interpretó como que la trombina no es capaz de generar a la vasoinhibina. Sin embargo, en dicho estudio no se analizó la actividad biológica del fragmento N-terminal de 6 kDa remanente.

Los efectos de la trombina y de la vasoinhibina en la angiogénesis y la hemostasia, aunados al hecho de que esta enzima genera un fragmento de PRL N-terminal, que no había sido evaluado, nos llevaron a retomar la hipótesis de que la trombina puede ser una enzima generadora de la vasoinhibina.



**Figura 2. Western blot de PRL humana cortada con trombina.** Western blot en condiciones reductoras con un antisuero anti-PRL humana ( $\alpha$ hPRL) que muestra el fragmento de 16 kDa de PRL generado luego de la digestión con trombina (Th). También se indica la PRL. Figura modificada de Khurana *et al.*, 1999.

### **3. Justificación**

La identificación de nuevas proteasas generadoras de vaso inhibina permitirá extender su participación en procesos biológicos distintos a los que se han descrito hasta ahora. Nuestros hallazgos permiten añadir a la trombina a la lista de proteasas capaces de generar a la vaso inhibina y han ampliado a la familia de la vaso inhibina a péptidos más pequeños que pudieran favorecer su uso con fines terapéuticos en enfermedades angiogénesis-dependientes y trombóticas. La generación de vaso inhibina por trombina da un nuevo contexto funcional a la participación endógena de estos péptidos en la hemostasia ya que, de acuerdo al efecto profibrinolítico de la vaso inhibina recién reportado, es posible que este evento sea parte de un asa de retroalimentación negativa en el proceso de la coagulación con relevancia funcional.

#### **4. Pregunta de investigación**

¿La trombina genera a la vasoinhibina?

#### **5. Hipótesis**

La trombina genera a la vasoinhibina a partir de la PRL.

#### **6. Objetivos**

##### 6.1. Objetivo General

Determinar si la trombina genera a la vasoinhibina a partir de la PRL.

##### 6.2. Objetivos Específicos

6.2.1. Caracterizar el corte de PRL por trombina a través de la determinación del peso molecular aparente e inmunoreactividad de los fragmentos de PRL generados.

6.2.2. Determinar la masa y separar mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF y HPLC, respectivamente, los fragmentos de PRL generados por trombina.

6.2.3. Evaluar la actividad de los fragmentos de PRL generados por trombina sobre la migración y proliferación de células endoteliales en cultivo.

6.2.4. Identificar la secuencia de los fragmentos bioactivos de PRL mediante espectrometría de masas

## 7. Métodos

### 7.1. Incubación de PRL con trombina.

La PRL recombinante humana (PRL) generada en *E. Coli* (proporcionada por Michael E. Hodsdon, Universidad de Yale, New Heaven, CT, USA) y la trombina purificada de plasma humano (Sigma-Aldrich, catálogo #6884, Saint Louis, Missouri, USA) se colocaron en una mezcla de reacción a 37 °C durante 24 h con agitación (550 rpm) en una relación de 2 µg de PRL con 1 µg de trombina en un volumen total de 25 µl a pH 7.4, ajustado con un amortiguador de bicarbonato de amonio 50 mM (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich, catálogo #6141). Los controles fueron la PRL y la trombina incubadas en las mismas condiciones pero de manera independiente así como una mezcla de PRL con trombina inactivada por calor (90°C durante 30 min, a 550 rpm).

### 7.2. Caracterización del corte de PRL con trombina.

#### 7.2.1. SDS-PAGE Tricina.

Las distintas mezclas de incubación se analizaron mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una concentración de 16% Acrilamida y 6% Bis-acrilamida, modificado por el uso de tricina (Bio-Rad, catálogo #1610713, Hercules, CA, USA) (Schagger, 2006; Schagger y von Jagow, 1987) para permitir una mayor resolución de proteínas de bajo peso molecular. Se utilizaron tanto condiciones reductoras (15.5 mg/ml de β-mercaptoetanol) como no reductoras. El amortiguador de carga 6X (seis veces concentrado) se adicionó a las muestras y estas se incubaron a 97 °C durante 15 min con una agitación de 550 rpm. Las muestras se cargaron en geles de 1.5 mm de grosor y se corrieron inicialmente a 80 V por 1 h y posteriormente a 110 V por 2.5 h. Se utilizó el marcador de peso molecular preteñido Dual Xtra (Bio-Rad, catálogo #1610377) para verificar en tiempo real la distribución de las bandas durante la electroforesis e inferir el tamaño de los fragmentos resultantes.

### 7.2.2. Tinción de azul de Coomassie para proteína total.

Los fragmentos obtenidos de la reacción de corte de PRL con trombina, separados mediante SDS-PAGE tricina, se observaron utilizando la tinción para proteína total con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad, catálogo #1610406) sin solventes orgánicos ni ácido acético (Lawrence y Besir, 2009). Brevemente, se eliminó el SDS del gel mediante tres incubaciones sucesivas de 5 min con agua destilada que se calentó en un horno de microondas por 40 s, hasta justo antes del hervor. Finalmente, se colocó el gel en la solución de tinción y se calentó por última vez en el microondas durante 40 s y se dejó toda la noche en dicha solución. Después de eso, el gel se lavó con agua destilada hasta dejar el fondo transparente y las bandas con el mayor contraste.

### 7.2.3. *Western blot*.

Se analizó la inmunoreactividad de los fragmentos derivados del corte de PRL con trombina separados mediante SDS-PAGE tricina a través de *Western blot*. Los geles SDS-PAGE se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, catálogo #1620112) a 23 V durante 40 min en una cámara de transferencia semi-húmeda. Las membranas se bloquearon por 1 h con amortiguador de fosfatos PBS y 1% de Tween 20 (PBST) y utilizando como bloqueador leche en polvo descremada de grado molecular al 4% m/v (Bio-Rad, catálogo #1706404). Posteriormente se incubaron toda la noche con un anticuerpo policlonal anti-PRL humana (CL-1) (Duenas *et al.*, 2004) a una dilución 1:500 en 1% de albúmina sérica bovina en amortiguador de fosfatos-salina-tween (PBST). A continuación se incubó la membrana con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson ImmunoResearch, catálogo #111055003, West Grove, PA, USA) a una dilución de 1:5,000 y, finalmente, la reacción se reveló utilizando un estuche comercial (AP Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad catálogo #1706432). Para la detección de epítopes particulares dentro de la molécula se usaron anticuerpos monoclonales: el anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo N-terminal de la PRL fue el 5602 (Piwnica *et al.*, 2004) y el dirigido contra el extremo C-terminal fue el INN-368 (Aranda *et al.*, 2005); ambos anticuerpos fueron utilizados a una dilución 1:250

y posteriormente se empleó un anticuerpo secundario se usó el anti-IgG de ratón acoplado a AP (Jackson ImmunoResearch, catálogo #115055003); para el revelado de las bandas inmunorreactivas se utilizó el mismo estuche comercial previamente descrito.

### 7.3. Determinación de la masa y separación de los fragmentos de PRL generados.

#### 7.3.1. Análisis de los fragmentos de PRL generados mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF.

Se digirieron 20  $\mu\text{g}$  de PRL con 10  $\mu\text{g}$  de trombina por 24 h en un volumen final de 250  $\mu\text{l}$  del amortiguador pH 7.4 descrito antes; como controles de incubación se utilizó a la PRL y a la trombina incubadas por separado. Antes del análisis por espectrometría de masas, las sales del amortiguador se removieron por HPLC (Agilent 1100, Santa Clara, CA, USA) en una columna analítica C18 (Vydac 218TP54; 4.6 x 250 mm, con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ) en el Laboratorio de Farmacología Marina en el Instituto de Neurobiología de la UNAM. Para ello primero se equilibró la columna con solución A y luego se empleó un paso isocrático de 0% de solución B por 5 min, seguido de un gradiente lineal de 0 a 100% de solución B en 5 min y, después, un paso isocrático de 100% de solución B por 20 min, a un flujo de 1 ml/min. La solución A consistió en 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético en agua desionizada y la solución B en 0.09% de ácido trifluoroacético (v/v) en 90% (v/v) de acetonitrilo acuoso. Las muestras fueron liofilizadas en un concentrador Savant SpeedVac y resuspendidas en 10  $\mu\text{l}$  de agua destilada y desionizada (ddH<sub>2</sub>O) con o sin 80 mM de ditiotretol (DTT). La concentración de las muestras resuspendidas se evaluó mediante un SDS-PAGE Tricina seguido por una tinción con azul de Coomassie. Sólo el 50% de la concentración inicial de proteína se recuperó quedando a una concentración final de 1.75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , como reveló un análisis de cuantificación con reactivo de Bradford (Bio-Rad, catálogo #5000006). Se mezcló 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra con 1  $\mu\text{l}$  de solución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo:H<sub>2</sub>O (60:40 vol:vol)-0.1% ácido trifluoroacético y 1  $\mu\text{l}$  de esta mezcla se depositó en el portamuestras del equipo. El espectro de iones positivos fue obtenido en un Microflex MALDI-TOF

(Bruker, Billerica, MA, USA) en el modo lineal usando la extracción retardada. Los calibradores utilizados fueron la angiotensina II, el citocromo C, la mioglobina y la melitina. El software utilizado para analizar el espectro fue el mMass 5.5.0, los picos relevantes fueron seleccionados por análisis visual y con la herramienta de secuencia, utilizando la secuencia de la PRL como referencia y la herramienta de fragmentación (Niedermeyer y Strohm, 2012). El análisis MALDI-TOF se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la UNAM.

### 7.3.2. Purificación de los fragmentos de PRL mediante HPLC.

Para el aislamiento de los péptidos presentes en la mezcla de digestión de PRL con trombina se utilizó HPLC en fase reversa (Agilent 1100, Santa Clara, CA, USA), este análisis fue realizado en el Laboratorio de Farmacología Marina en el Instituto de Neurobiología de la UNAM. La solución A consistió en 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético en agua desionizada y la solución B en 0.09% de ácido trifluoroacético (v/v) en 90% (v/v) de acetonitrilo acuoso. Dos alícuotas de la digestión reducida (35  $\mu$ g y 95  $\mu$ g en 300  $\mu$ l y 800  $\mu$ l, respectivamente) fueron llevadas por separado a un volumen de 5 ml con agua desionizada y cargadas en una columna analítica para RP-HPLC C-18 (Vydac 218TP54; 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula). Los componentes fueron eluidos a temperatura ambiente, primero isocráticamente (5% de solución B por 10 min), y luego con un gradiente lineal (0-100% de solución B por 100 min) a un flujo de 1 ml/min. La absorbencia de los eluatos fue monitoreada a 210 nm. Una alícuota (1.6 ml) del amortiguador de reducción se procesó previamente por cromatografía como referencia para identificar los picos relevantes de la digestión. Las fracciones de las dos corridas fueron colectadas manualmente y las correspondientes a los picos relevantes equivalentes entre sí fueron combinados, llevados a sequedad en el concentrador centrífugo y disueltos en 50  $\mu$ l de agua destilada; luego se llevaron nuevamente a sequedad (2 veces) con el fin de dejar la muestra libre de solventes. Finalmente, las fracciones fueron resuspendidas en agua desionizada para cuantificarlas y caracterizarlas mediante Bradford y *Western blot* para la evaluación de su actividad.

#### 7.4. Análisis de la bioactividad de los fragmentos de PRL generados por digestión con trombina.

El primer paso para que ocurra la angiogénesis es mediado por la migración de las células endoteliales de la punta y la proliferación de las células endoteliales de los vasos ya existentes (Norton y Popel, 2016). Se conoce que la vasoinhibina inhibe la proliferación (Clapp *et al.*, 1993) y migración (Lee *et al.*, 2007) de células endoteliales en cultivo. Debido a esto, el efecto antiangiogénico de los fragmentos de PRL generados por trombina, fue evaluado mediante un ensayo de proliferación y uno de migración de células endoteliales, los cuales se describen a continuación.

##### 7.4.1. Ensayo de proliferación de células endoteliales.

Para evaluar la actividad antiangiogénica de los fragmentos de la PRL generados por la acción de la trombina en un ensayo de proliferación, se usaron células endoteliales de la arteria pulmonar bovina (CPAE) (ATCC, catálogo #CCL209, Manassas, VA, USA) sembradas a una densidad de 6,250 células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pozos (Costar, catálogo #3599, NY, USA), en 100 µl de medio de cultivo Eagle's *minimum essential medium* (EMEM) (ATCC, catálogo #302003) adicionado con 20% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) y 2% (v/v) de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Inicialmente, se detuvo el ciclo celular mediante la incubación por 24 h en medio de cultivo con una concentración baja de suero (0.5%). Posteriormente, se adicionó el tratamiento con las distintas fracciones obtenidas del HPLC diluidas en medio estacionario (0.5 % SFB) a una concentración de 100 nM de proteína total en presencia y ausencia de 40 ng/ml del factor pro-angiogénico bFGF. Como control positivo se utilizó un estándar de vasoinhibina de 14 kDa que contiene los primeros 123 aminoácidos de la PRL humana y una cola de siete histidinas generado de manera recombinante en células de insecto (Galfione *et al.*, 2003). Al mismo tiempo que los tratamientos, se adicionó el análogo de la timidina, 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) (Sigma-Aldrich, catálogo #T511285), a una concentración de 10 µM. Después de 24 h, las células se lavaron con PBS estéril a 37°C por 2 min, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min, se lavaron durante 2 min con TBS, se

permeabilizaron con una solución al 0.5% de Tritón X-100 en TBS durante 1 h y se lavaron de nuevo con TBS por dos min. El EdU incorporado en el DNA fue detectado mediante la reacción de *click*, (por sus siglas en inglés “*copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*”) (Salic y Mitchison, 2008) empleando una azida fluorescente en una reacción de 20 min protegida de la luz. La mezcla de tinción preparada en fresco consistió de 100 mM Tris, 0.5 mM de CuSO<sub>4</sub>, 50 mM de ácido ascórbico y 20 μm de Azida Flúor 545 (Sigma-Aldrich, catálogo #760757), seguida de un paso de lavado de 90 min con la solución de 0.5% de Tritón X-100 en TBS. El DNA nuclear fue contrateñido con 5 mg/ml de bisBenzamida Hoechst 33342 triclorohidratado (Sigma-Aldrich, catálogo #B2261) como se reportó previamente (Chazotte, 2011). Todos los pasos se realizaron con una agitación de 35 rpm. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio básico invertido (Olympus IX51, Tokio, Japón) con un espejo dicróico de fluorescencia reflejada utilizando los filtros DM400 y DM570 para Hoechst y EdU respectivamente. La cuantificación de la proliferación se realizó utilizando el software CellProfiler (Carpenter *et al.*, 2006).

#### 7.4.2. Ensayo de migración endotelial.

Para evaluar la actividad antiangiogénica de los fragmentos de la PRL generados por trombina, las CPAE fueron sembradas a una confluencia de 7,500 células/cm<sup>2</sup> en soportes permeables tipo *transwell* de un tamaño de poro de 8 μm y un diámetro de 6.5 mm (Corning, catálogo #3422). Previo a la siembra de las células, los *transwell* fueron cubiertos con matrigel (Corning, catálogo #354234) diluido en medio EMEM sin adiciones a una concentración de 70 ng/ml e incubados a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, se retiró el exceso de medio y las células se sembraron sobre los *transwell* en EMEM al 0.5% de SFB. Como quimioatrayente se utilizó medio condicionado filtrado de células CPAE con 20% de SFB, el cual fue agregado en el pozo debajo del *transwell*. Los tratamientos con las distintas fracciones se adicionaron en el compartimento celular del *transwell* a una concentración 100 nM de proteína total para cada fracción y como estándar se utilizó la vasoinhibina recombinante descrita arriba. La placa se incubó durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se prosiguió a aspirar el medio dentro y fuera del *transwell* y se fijaron las células con metanol al 100% durante 10 min. Posteriormente,

las células se permeabilizaron con una solución de 0.5% Tritón X-100 en TBS por 1 h a 35 rpm y se tiñó el DNA con Hoechst como se describió previamente. Las fotografías fueron tomadas en el mismo microscopio básico invertido ya mencionado con el filtro DM400. La cuantificación del número de células se realizó con el software CellProfiler (Carpenter *et al.*, 2006).

## 7.5. Análisis de identificación de proteínas.

### 7.5.1. Optimización del espectrómetro de masas (calibración externa).

Este análisis se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El ajuste de los parámetros para asegurar que el instrumento funcionara dentro de las especificaciones fue realizado con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína), Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 (Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution). Estos calibradores se utilizaron para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (*Fourier Transform*) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se utilizó para extender la calibración de masas a valores menores de  $m/z$  (73.14 Da). Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con variación de exactitud menor a 5 ppm (partes por millón).

### 7.5.2. Análisis espectrométrico.

Las muestras fueron aplicadas en un sistema LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) compuesto de una bomba Accela (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI). En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-85 % (acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 min utilizando una columna capilar RP-

C18 hecha en casa (0.75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 15 cm de largo). El flujo del sistema LC fue de 300 nl/min.

El escaneo total de iones (*Full Scan*) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas ( $\text{RP}=\text{m}/\text{FWHM}$ ) de 30,000. Para la fragmentación de los péptidos se aplicaron los métodos de CID (*Collision-Induced Dissociation*) y HCD (*High-energy Collision Dissociation*) con un poder de resolución de masas (*Resolution Power*,  $\text{RP}=\text{m}/\text{FWHM}$ ) de 15,000. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas predeterminadas (se fragmentaron iones con carga superiores a  $z^{2+}$ ) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 5 ms y tiempo máximo de inyección de 10 ms por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos se utilizó la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 s y (iii) tiempo de exclusión de 70 s.

### 7.5.3. Búsqueda en PDB (*Protein Data Bank*) e identificación de las proteínas.

La identificación de los fragmentos de la PRL se realizó con los datos espectrométricos en formato .raw en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos invertida (Decoy database) de uniprot-prolactin-*Homo sapiens*; con un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo). La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando se comparan los valores teóricos contra los experimentales (*precursor mass tolerance*) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (*fragment mass tolerance*) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron establecidas modificaciones variables como oxidación de metioninas y desaminación de asparagina y glutamina. La búsqueda también se realizó con la BD de uniprot-Thrombin, pero no se observó ningún péptido en las 6 muestras.

## 7.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* Bonferroni de comparaciones múltiples ( $n = 3$ ). Fue graficada la media de los datos y el error estándar de la media (EEM). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa para  $p < 0.001$ . El análisis se llevó a cabo con el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

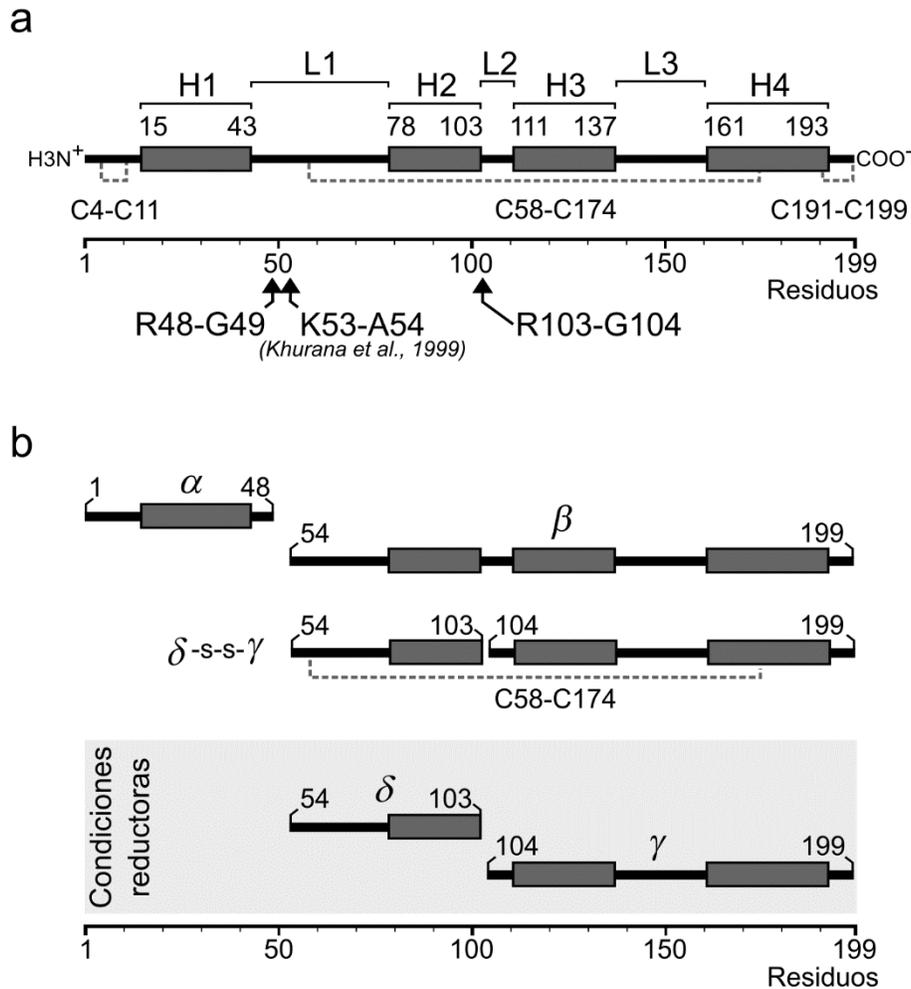
## 8. Resultados

Antes de presentar los resultados y con el fin de favorecer su comprensión, se adelanta la integración de los hallazgos del análisis por *Western blot* y MALDI-TOF, que permiten identificar los sitios de corte de trombina en la PRL en un esquema.

La PRL es una hormona de 199 aminoácidos organizados en cuatro  $\alpha$ -hélices principales conectadas por tres asas o *loops* y estabilizada por tres puentes disulfuro, dos en los extremos de la molécula (C4-C11 y C191-C199) y uno de ellos conectando el *loop* 1 (L1) con la  $\alpha$ -hélice 4 (H4) (C58-C174) (Figura 3a). La PRL tiene una estructura terciaria de racimo compacto donde las cuatro  $\alpha$ -hélices presentan una topología “arriba-arriba-abajo-abajo”. Los *loops* que conectan estas hélices son estructuras expuestas y desorganizadas (Teillum *et al.*, 2005). En particular, en el L3 ocurre el procesamiento proteolítico de la PRL hacia vasoinhibina (Clapp *et al.*, 2006a) por enzimas como la catepsina D (Piwnica *et al.*, 2004), las metaloproteasas de matriz (MMPs) (Macotella *et al.*, 2006) y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1) (Ge *et al.*, 2007). La trombina corta a la PRL en el L1 entre los residuos K53-A54 (lisina 53-alanina 54) para generar un fragmento de 16 kDa C-terminal sin actividad de vasoinhibina y un fragmento de 6 kDa N-terminal cuya actividad no fue evaluada previamente (Khurana *et al.*, 1999).

Esencialmente encontramos que la trombina corta a la PRL en tres sitios, en el L1 entre los residuos R48-G49 y K53-A54 (Khurana *et al.*, 1999) y en el L2 entre R103-G104 (Figura 3a). Los dos nuevos sitios de corte identificados en este trabajo (R48-G49 y R103-G104) son más favorecidos que el previamente reportado (K53-A54), presumiblemente porque corresponden a la secuencia consenso (R-G) de corte de la trombina (LTPR'GVRL) (Gallwitz *et al.*, 2012). De hecho, la trombina corta al fibrinógeno, su sustrato natural, entre R y G. El corte por trombina en estos sitios da lugar a cuatro fragmentos principales de PRL en cuanto a su abundancia relativa: el fragmento  $\alpha$  que va del residuo 1 al 48 y tiene una masa de 6 kDa; el fragmento  $\beta$  que va del residuo 54 al 199 y una masa de 16 kDa (Figura 3b); además, la trombina genera los fragmentos  $\delta$  (residuos 54 al 103) y  $\gamma$  (residuos 104 al 199), de 6 y 11 kDa respectivamente, derivados

del corte del fragmento  $\beta$  en el L2, por lo que bajo condiciones no reductoras ambos fragmentos permanecen covalentemente unidos por un enlace disulfuro entre C58-C174 en un fragmento de 16 kDa (Figura 3b).

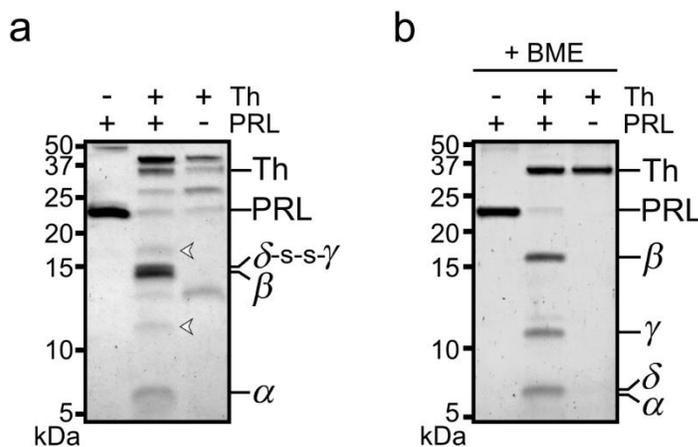


**Figura 3. Esquema que ilustra los tamaños de los principales fragmentos de PRL generados por trombina derivado del análisis por SDS-PAGE-Western blot y MALDI-TOF.**

**a.** Representación lineal de la estructura secundaria de la PRL humana donde se indican los sitios de corte de la trombina en el *loop* 1 (L1) (R48-G49 y K53-A54) y en L2 (R103-G104). El esquema y abreviaturas se describen en la Figura 1. **b.** Principales fragmentos de PRL generados por el corte proteolítico con trombina denotados con letras griegas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ). Se indica el primer y último aminoácido de cada fragmento. El puente disulfuro C58-C174 mantiene unidos los fragmentos  $\delta$  y  $\gamma$  ( $\delta$ -s-s- $\gamma$ ) los cuales se separan en condiciones reductoras.

### 8.1. Caracterización del corte de PRL con trombina.

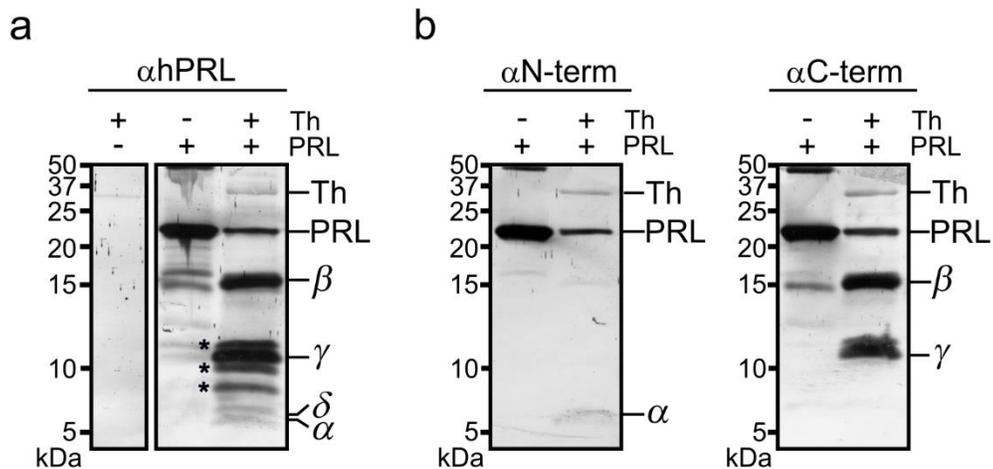
La separación electroforética por SDS-PAGE tricina de la mezcla de reacción de PRL y trombina bajo condiciones no reductoras (Figura 4a) dio como resultado cuatro fragmentos principales: el fragmento  $\alpha$  (~6 kDa), el fragmento  $\beta$  (~16 kDa), y los fragmentos  $\delta$  y  $\gamma$  (de ~6 y ~11 kDa, respectivamente). En condiciones no reductoras los fragmentos  $\delta$  y  $\gamma$  permanecen unidos por el enlace disulfuro C58-C174 ( $\delta$ -s-s- $\gamma$ ). Se observaron bandas de menor intensidad, la mayoría de las cuales son contaminantes ya que están presentes en la trombina incubada en ausencia de PRL. Se observaron también dos bandas de ~12 y ~18 kDa presuntamente derivadas del corte por trombina de la PRL (indicadas con flechas en la Figura 4a). En el SDS-PAGE tricina procesado en presencia de beta-mercaptoetanol (BME), es decir en condiciones reductoras (Figura 4b), se observaron los fragmentos  $\alpha$  y  $\beta$  con sus pesos esperados de ~6 kDa y ~16 kDa, respectivamente y también se observaron los productos de la reducción del fragmento  $\delta$ -s-s- $\gamma$  de ~6 y ~11 kDa (Figura 4b).



**Figura 4. Separación electroforética de los fragmentos generados del corte de PRL con trombina revelados para proteína total con azul de Coomassie. a.** Gel en condiciones no reductoras de la mezcla de reacción de PRL (~23 kDa), PRL+Th y Trombina (Th) (~36 kDa). Se indican con letras griegas las bandas correspondientes a los diferentes fragmentos de PRL derivados del corte proteolítico ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y los fragmentos  $\delta$  y  $\gamma$  unidos por un enlace bisulfuro  $\delta$ -s-s- $\gamma$ ), así como la PRL y Th remanentes de la proteólisis. Se indican bandas más tenues de ~12 y ~18 kDa correspondientes a fragmentos de PRL ( $\triangleleft$ ). **b.** Con la adición de  $\beta$ -mercaptoetanol

(+BME) se observan separados los fragmentos  $\delta$  y  $\gamma$ , así como los fragmentos  $\alpha$  y  $\beta$ . Igualmente se observan la PRL y Th remanentes de la reacción de corte.

Para determinar si estos fragmentos pertenecen a la región N-terminal o C-terminal de la PRL, se evaluó la inmunoreactividad de los fragmentos mediante *Western blot* con un anticuerpo policlonal anti-PRL y con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región N- o C-terminal. La tinción con el anticuerpo policlonal confirmó que los fragmentos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  corresponden a productos de la proteólisis de la PRL (Figura 5a). Se observaron también fragmentos PRL de aproximadamente  $\sim 12$ ,  $\sim 10$  y  $\sim 7$  kDa (indicados con asteriscos en la Figura 5a), y uno de  $\sim 37$  kDa. Este último no parece corresponder a la trombina ya que el anti-PRL no lo detectó en igual intensidad en la muestra de trombina incubada en ausencia de PRL y es probable que corresponda a la digestión del dímero de la PRL (Figura 5a).



**Figura 5. Inmunodetección de los fragmentos de PRL generados por trombina. a.** *Western blot* en condiciones reductoras con un anticuerpo policlonal anti-hPRL ( $\alpha$ hPRL) que muestra los fragmentos de PRL generados luego de la digestión con trombina (Th) denotados con letras griegas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ). Bandas correspondientes a fragmentos de PRL de  $\sim 12$ ,  $\sim 10$  y  $\sim 7$  kDa están indicadas (\*). **b.** *Western blot* en condiciones reductoras con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región N-terminal y C-terminal de la hPRL ( $\alpha$ N-term y  $\alpha$ C-term, respectivamente) donde se observa el fragmento  $\alpha$  (izquierda), así como los fragmentos  $\beta$  y  $\gamma$  (derecha).

Por otra parte, el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región N- o C-terminal de la PRL permitió conocer que la banda  $\alpha$  corresponde al extremo N-terminal y que las bandas  $\beta$  y  $\gamma$  corresponden a fragmentos que contienen el extremo C-terminal de la PRL (Figura 5b). La banda  $\delta$ , sin embargo, únicamente reaccionó con el anticuerpo policlonal (Figura 5a), lo que sugiere que es un fragmento intermedio de la molécula de PRL. Con los anticuerpos monoclonales no se detectaron los fragmentos de PRL de ~12, ~10 y ~7 kDa, lo cual podría deberse a la baja sensibilidad de estos anticuerpos.

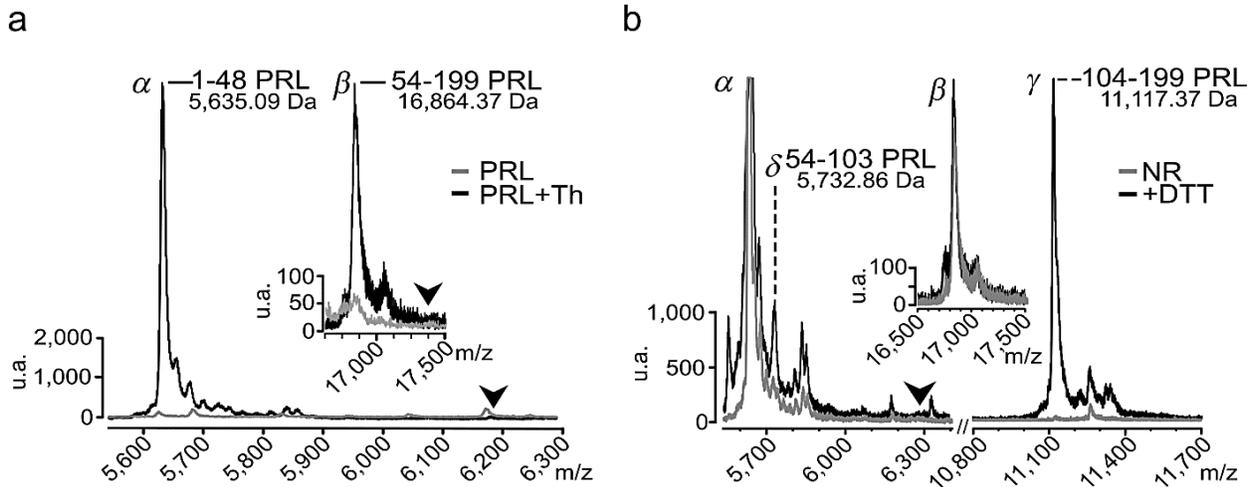
## 8.2. Determinación de la masa y separación de los fragmentos de PRL generados.

### 8.2.1. Análisis de los principales fragmentos de PRL mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Para determinar la masa molecular exacta de los fragmentos principales de PRL derivados del corte proteolítico con trombina se realizó el análisis de la mezcla de reacción por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF de la mezcla de reacción. Inesperadamente se encontró que el fragmento  $\alpha$  corresponde a un fragmento de PRL que va de los aminoácidos 1 al 48 con masa molecular experimental de 5,635.09 Da y no al fragmento sugerido por Khurana *et al.*, que va de los residuos 1 al 53 con una masa de ~6,200 Da (Figura 6a). El fragmento  $\alpha$  indicó la presencia de un nuevo sitio de corte en la secuencia de la PRL entre los residuos R48-G49.

Sin embargo, el sitio de corte reportado entre los residuos K53-A54 (Khurana *et al.*, 1998) también tiene lugar ya que el fragmento  $\beta$  comprende los aminoácidos 54 al 199 de la PRL con masa experimental de 16,864 Da (Figura 6a). La ausencia de los fragmentos que van de los aminoácidos 1 al 53 (~6,200 Da) y del 49 al 199 (~17,500 Da), sugiere que el corte en los sitios R48-G49 y K53-A54 ocurre simultáneamente en la reacción liberando un péptido de 5 aminoácidos que va de los residuos 49 al 53 de la PRL (~564.7 Da). Este fragmento de 5 residuos no se observó en el espectro del MALDI seguramente

porque se encontraba fuera del intervalo establecido *a priori* con los calibradores utilizados, el cual fue desde los 7 a los 92 kDa.



**Figura 6. Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF de los principales fragmentos de PRL generados por trombina. a.** Espectro de masas MALDI-TOF de los fragmentos de PRL  $\alpha$  y  $\beta$  en la mezcla de PRL con trombina (negro) comparado con el control (gris); se indican los residuos que comprenden y sus masas moleculares experimentales. La ausencia de los picos de  $\sim 6,200$  m/z y  $\sim 17,500$  m/z correspondientes al fragmento 1-53 reportado por Khurana, *et al.*, y al 49-199 de la PRL están indicados ( $\blacktriangledown$ ). **b.** Espectro de masas MALDI-TOF comparativo de condiciones reductoras (+DTT) y no reductoras (NR). Mientras los picos  $\alpha$  y  $\beta$  no cambian, los fragmentos  $\delta$  y  $\gamma$  sólo se observan en condiciones reductoras. Los residuos que comprenden y sus masas moleculares están indicados. La ausencia del fragmento que va del residuo 49 al 103 ( $\sim 6,300$  m/z) está indicada ( $\blacktriangledown$ ). Las unidades del eje horizontal son masa/carga (m/z) y las del eje vertical son unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm.

Por otra parte, el análisis de MALDI-TOF en condiciones reductoras y no reductoras confirmó que los fragmentos  $\delta$  y  $\gamma$ , que sólo se observaron en condiciones reductoras (Figura 6b), se mantenían unidos con el puente disulfuro C58-C174. El fragmento  $\delta$  tuvo una masa experimental de 5,732 Da que corresponde al fragmento de PRL que va de los aminoácidos 54 al 103, confirmando que se trata de un fragmento intermedio de la molécula. Este fragmento  $\delta$  y el fragmento  $\gamma$ , de 11,117 Da y que va del aminoácido 104

al 199, indican que existe un nuevo sitio de corte entre R103-G104 (Figura 3a). La ausencia del fragmento que va del aminoácido 49 al 103 (~6,300 Da) nos brindó una evidencia más de que ambos cortes en el L1 (R48-G49 y K53-A54) están ocurriendo de manera simultánea. Los fragmentos  $\alpha$  y  $\beta$  no cambiaron con la reducción.

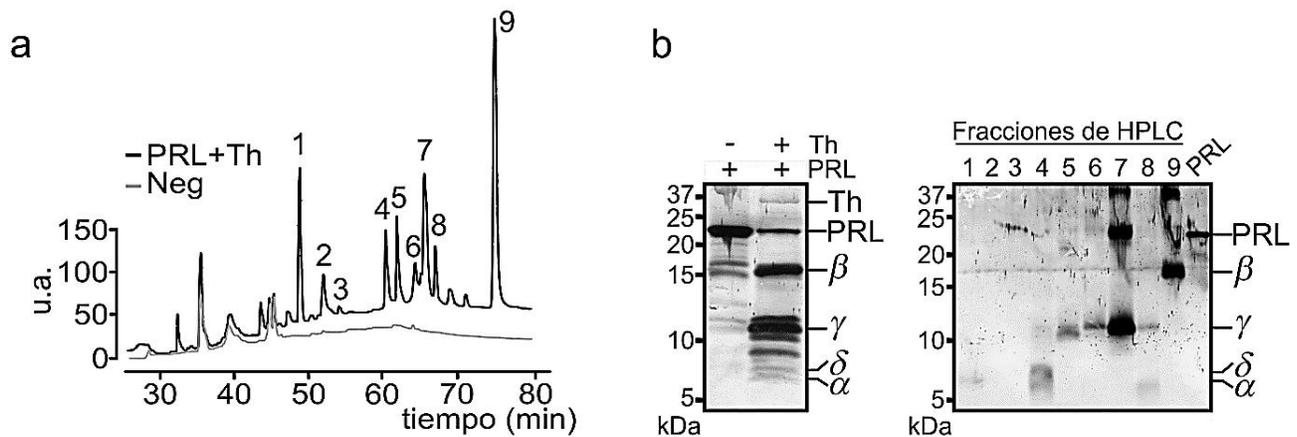
De acuerdo a estos resultados, existen tres sitios de corte para trombina en la molécula de PRL (R48-G49, K53-A54 y R103-G104) (Figura 3). Los fragmentos predominantes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) sí se observaron en el análisis de MALDI-TOF sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que se generen fragmentos menos abundantes (designados como  $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\chi$  y  $\omega$ ) derivados de las distintas combinaciones de cortes en los tres sitios (Tabla 2), los cuales se buscaron con más detalle en los espectros del MALDI, pero no se detectaron.

Tabla 2. Fragmentos de PRL generados por trombina detectados por MALDI-TOF.

<b>Fragmento generado</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Masa molecular teórica (Da)</b>	<b>Masa molecular experimental por MALDI-TOF (Da)</b>
$\alpha$	1-48	5,639.49	5,635.09
$\beta$	54-199	16,861.23	16,864.37
$\delta$	54-103	5,742.48	5,732.86
$\gamma$	104-199	11,136.76	11,117.37
$\kappa$	1-53	6,186.16	No detectado
$\lambda$	49-199	17,407.89	No detectado
$\chi$	49-103	6,289.15	No detectado
$\omega$	1-103	11,910.62	No detectado

### 8.2.2. Purificación de los fragmentos de PRL mediante HPLC.

Para evaluar si los fragmentos de PRL tienen actividad de vasoconstrictora, se les purificó mediante HPLC (Figura 7a). De manera manual se colectaron nueve fracciones correspondientes a los picos que fueron distintos del control, el cual contenía solamente el amortiguador de incubación y el agente reductor (DTT). De los nueve picos bien definidos y de altura considerable que mostró el cromatograma del HPLC (Figura 7a), seis de ellos correspondieron a bandas inmunoreactivas contra un anticuerpo policlonal anti-PRL (Figura 7b). Dos fracciones (4 y 8) mostraron fragmentos de alrededor de 6 kDa; 4 fracciones consecutivas (5-8) mostraron fragmentos de alrededor de 11 kDa; en la fracción 7, además del fragmento de 11 kDa, se detectó a la PRL de 23 kDa; y en la última fracción (9) se observó un fragmento de 16 kDa (Figura 7b). En lugar de obtener las cuatro fracciones con fragmentos de PRL que se esperaban correspondientes a los fragmentos principales, se obtuvieron seis, lo que abre la posibilidad de que efectivamente se estén generando algunos de los fragmentos minoritarios propuestos en la Tabla 2 o bien, que la separación no haya sido eficiente y algunos de los fragmentos hayan salido en más de una fracción.



**Figura 7. Separación por HPLC de los fragmentos de PRL generados por trombina. a.** Cromatograma del HPLC de los productos del corte de la PRL con trombina (PRL+Th) bajo condiciones reductoras. Se observan enumerados (1-9) los principales picos correspondientes a las fracciones colectadas y que fueron diferentes del control conteniendo solamente el

amortiguador de la reacción sin PRL ni trombina (Neg). **b.** Análisis por *Western blot* de las principales fracciones de la separación por HPLC revelado con el anticuerpo policlonal anti-PRL humana. Se indican con letras griegas la posición electroforética esperada de los principales fragmentos de PRL según la muestra control no procesada por HPLC (izquierda).

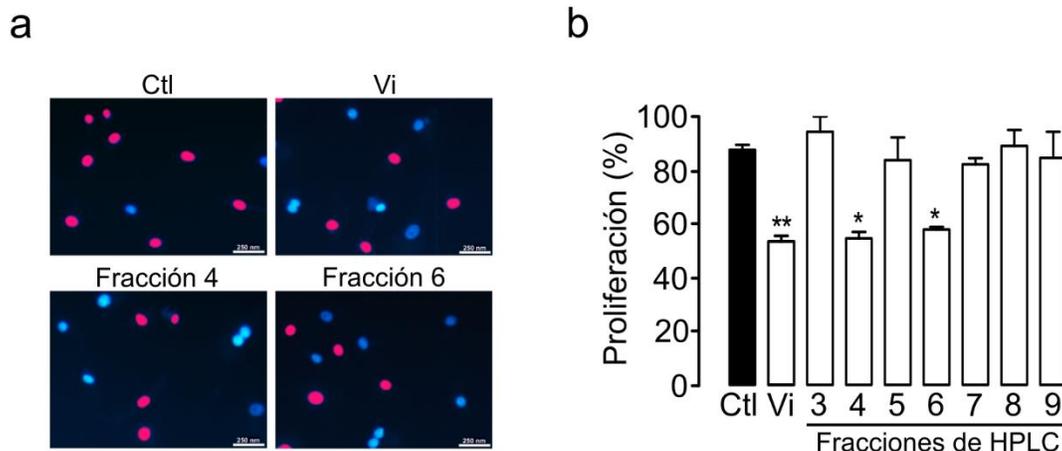
De acuerdo al tamaño de pico en el cromatograma y a la intensidad de las bandas en el *Western blot* fue posible estimar en cuál fracción del HPLC se encuentra cada uno de los fragmentos principales de PRL derivados de la reacción de corte. La fracción 4, además de ser uno de los picos de mayor tamaño, contiene la banda de 6 kDa más intensa en el *Western blot* (Figura 7); por lo tanto, dicha fracción, según estas evidencias, debe corresponder a alguno de los dos fragmentos de PRL más abundantes de 6 kDa los cuales son  $\alpha$  y  $\delta$ , y más probablemente es el  $\alpha$  por ser el único fragmento que siempre se genera a partir del corte de la PRL mientras que el  $\delta$  al generarse a partir del fragmento de  $\beta$  tendría menor abundancia. Por otra parte, es posible que el fragmento  $\gamma$  haya sido eluído en la fracción 7, donde se encontró uno de los picos de mayor tamaño y la banda de 11 kDa de mayor intensidad (Figura 7); este fragmento eluyó en combinación con PRL. El fragmento  $\beta$ , se obtuvo en la fracción 9, ya que fue el pico más grande de todos y la única fracción en la que se observó una banda de 16 kDa (Figura 7). Por último, es factible que las fracciones que mostraron picos más pequeños y bandas menos intensas (5, 6 y 8) contengan algunos de los fragmentos minoritarios que se ha sugerido se podrían estar produciendo ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\chi$  y  $\omega$ ) (Tabla 2).

Estos hallazgos nos permitieron concluir que la complejidad del corte de la PRL por trombina es superior al modelo propuesto por Khurana y colaboradores ya que observamos la generación de cuatro fragmentos principales de PRL ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) en lugar de los dos fragmentos reportados por dichos autores.

### 8.3. Análisis de la bioactividad de los fragmentos de PRL generados por trombina.

#### 8.3.1. Evaluación de la actividad de los fragmentos de PRL sobre la proliferación y migración de células endoteliales.

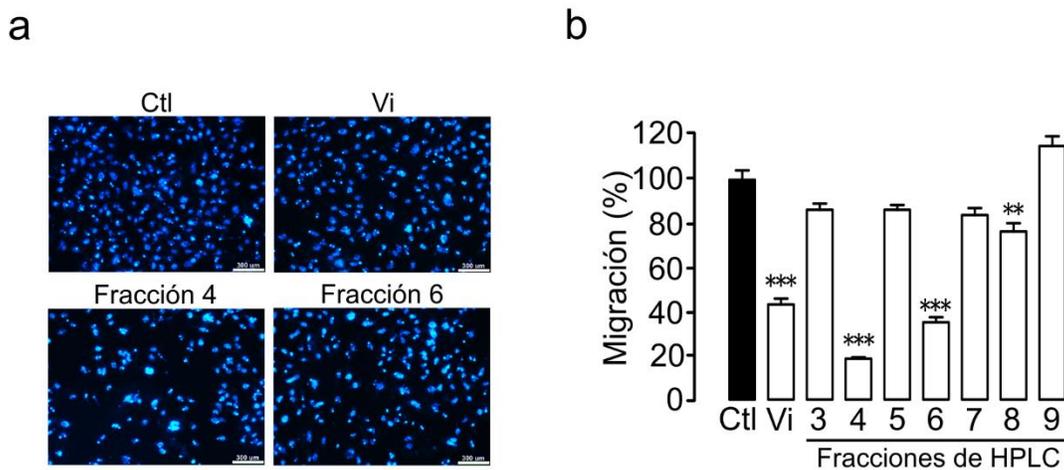
La vasoinhibina tiene actividad antiangiogénica que incluye la inhibición de la proliferación (Clapp *et al.*, 1993) y migración (Lee *et al.*, 2007) de células endoteliales. Con el fin de determinar si los fragmentos derivados de la proteólisis de la PRL con trombina tienen efectos antiangiogénicos, evaluamos la actividad de las fracciones obtenidas del HPLC sobre la proliferación (Figura 8) y migración (Figura 9) de células endoteliales bovinas (CPAE) en cultivo. La proliferación celular se cuantificó mediante la incorporación de un análogo de la timidina (EdU) al DNA sintetizado en células estimuladas con el factor proangiogénico bFGF. La proliferación endotelial disminuyó significativamente bajo tratamiento con una concentración de 100 nM del estándar de vasoinhibina (control positivo). Únicamente las fracciones del HPLC 4 y 6, que corresponden a fragmentos de 6 y 11 kDa de la PRL respectivamente, inhibieron la proliferación de las células endoteliales a una concentración equimolar a la de la vasoinhibina (~100 nM) (Figura 8a y b).



**Figura 8. Evaluación del efecto de los fragmentos de PRL generados por trombina sobre la proliferación de células endoteliales.** a. Micrografías representativas células endoteliales de arteria pulmonar bovina (CPAE) tratadas solamente con bFGF (Ctl), o con bFGF y 100 nM de un estándar de vasoinhibina (Vi) y ~100 nM de los fragmentos de la PRL presentes en las fracciones de HPLC 4 y 6 (indicadas en Figura 7b) teñidas mediante la reacción de *click*. Los núcleos en rojo

muestran las células en proliferación sobre el total de células en el cultivo teñidas para DNA (Hoechst, núcleos azules). **b.** Cuantificación del porcentaje de CPAE en proliferación incubadas solamente con bFGF (Ctl), o con bFGF y 100 nM de un estándar de vaso inhibina (Vi) y ~100 nM de los fragmentos de la PRL presentes en las fracciones de HPLC 3 a 9 (indicadas en la Figura 7b). El porcentaje se expresa en función del número total de células por campo y los resultados representan la media + EEM (error estándar de la media) (n = 3). (\*p<0.05 y \*\*p<0.01).

Un resultado similar se observó sobre la migración de las CPAE en un ensayo por *transwell* en el que la vaso inhibina estándar redujo significativamente (~55%) la migración, mientras que las fracciones 4 y 6 inhibieron la migración en un ~80% y ~60%, respectivamente (Figura 9a y b). En este ensayo, la fracción 8 redujo significativamente la migración (~20%) a pesar de no haber tenido efecto sobre la proliferación.



**Figura 9. Evaluación del efecto inhibitorio de las fracciones de PRL generadas por trombina sobre la migración de células endoteliales.** **a.** Micrografías representativas de células endoteliales de arteria pulmonar bovina (CPAE) que migraron y están presentes en la cámara inferior del *transwell*. Las CPAE fueron tratadas solamente con bFGF (Ctl), o con bFGF + 100 nM de un estándar de vaso inhibina (Vi) o + ~100 nM de los fragmentos de la PRL presentes en las fracciones de HPLC 4 y 6 (indicadas en Figura 7b). Los núcleos se tiñeron en azul con un colorante para DNA (Hoechst). **b.** Cuantificación del porcentaje de CPAE migrantes incubadas solamente con bFGF (Ctl), o con bFGF + 100 nM de un estándar de vaso inhibina (Vi) o + ~100 nM de los fragmentos de la PRL presentes en las fracciones de HPLC 3 a 9 (indicadas en Figura 7b). El porcentaje se expresa en función del número total de células migrantes por campo y el resultado expresa la media + EEM (n = 3). (\*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001).

#### 8.4. Análisis de identificación de la secuencia de los fragmentos activos de PRL generados por trombina mediante espectrometría de masas.

Para determinar la identidad de los fragmentos de PRL de las distintas fracciones obtenidas del HPLC se llevó a cabo un análisis de identificación de proteínas por espectrometría de masas en el que se obtuvo la secuencia de partes de la PRL presente en cada fracción. El análisis confirmó que la fracción 4, activa en proliferación y migración, posee la secuencia que corresponde predominantemente al fragmento  $\alpha$  y que una porción minoritaria de dicho fragmento también se observa en la fracción 8, la cual resultó activa sólo en migración.

El análisis de la fracción 6, que también fue biológicamente activa en ambos ensayos y que contiene un fragmento de masa molecular de  $\sim 11$  kDa, mostró secuencias que corresponden al extremo N-terminal de la molécula que abarcan los residuos 1 al 103 de la PRL y que, por ende, representa al fragmento  $\omega$  no principal. Este fragmento no fue observado ni en el *Western blot* con el anticuerpo N-terminal (Figura 5b), ni en el análisis de MALDI-TOF (Figura 6). Además, en el cromatograma del HPLC (Figura 7a) corresponde a un pico muy pequeño. Esto indica que dicho fragmento biológicamente activo sí se genera pero no es uno de los más abundantes (principales).

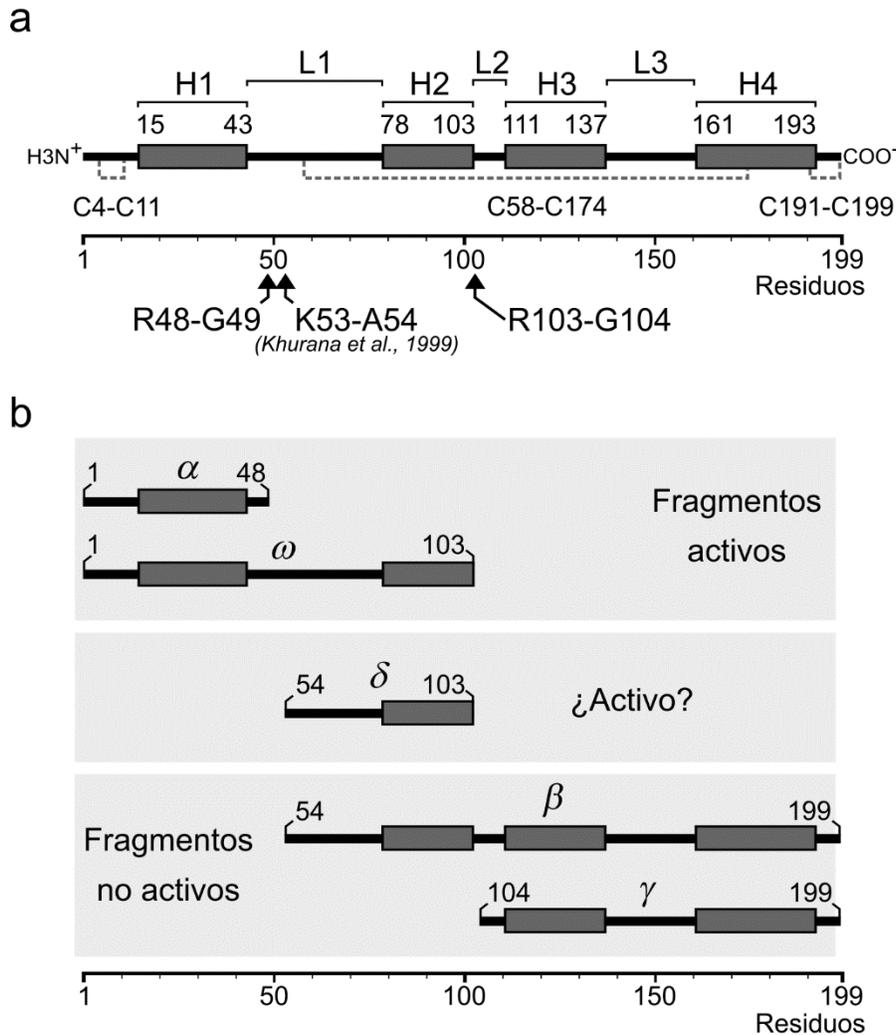
En cuanto a los fragmentos abundantes carentes de actividad antiangiogénica, la secuencia correspondiente al fragmento  $\gamma$  se observó en la fracción 7 y el nivel de su detección fue consistente con la altura del pico del cromatograma y su intensidad en el *Western blot* (Figura 7). El fragmento  $\beta$  que tampoco mostró tener actividad de vasoinhibina corresponde a la región C-terminal de la PRL como lo evidenció su secuenciación. Estos resultados apoyan la propuesta de que la actividad de vasoinhibina reside en el extremo amino terminal de la molécula de PRL (Clapp *et al.*, 2006b; Khurana *et al.*, 1999; Triebel *et al.*, 2015).

El fragmento  $\delta$  de 6 kDa se observó también en la fracción 4 junto con la mayor parte del fragmento  $\alpha$ ; y a pesar de que su concentración con respecto a  $\alpha$  es baja, no se puede

descartar que haya tenido algún efecto sobre la actividad biológica de la fracción 4. Un análisis de hidrofobicidad de ambos fragmentos mostró que tienen valores similares (40.82% para  $\alpha$  y 40% para  $\delta$ , calculado con el software Peptide 2.0), y esto, aunado a su masa molecular similar (Tabla 2), podría explicar que su separación por HPLC haya sido deficiente.

Únicamente la identificación de la secuencia de la fracción 5 discrepó con los resultados obtenidos que apoyan que el dominio activo de la vasoinhibina reside en el extremo amino terminal. El fragmento de 11 kDa contenido en la fracción 5 mostró la secuencia que lo identifica como extremo N-terminal de la PRL, si bien dicha fracción no tuvo efecto antiangiogénico en los dos ensayos realizados. Además, su masa molecular observada en el *Western blot* de ~11 kDa (Figura 7b) no coincide con la masa molecular teórica esperada (11,910.62 Da) para el corte R103-G104 observado en MALDI-TOF que corresponde a los aminoácidos 1 al 103 de la PRL. Es posible que parte de la secuencia N-terminal detectada por espectrometría de masas se deba a la contaminación con algo de la PRL presente en la fracción. Estos resultados deben ser corroborados mediante la repetición del análisis por espectrometría de masas.

En conjunto, los resultados obtenidos nos permiten proponer la generación de vasoinhibina a partir del corte de la PRL por trombina. La trombina genera una vasoinhibina (fragmento  $\alpha$ ) que va del residuo 1 al 48 de la PRL y tiene una masa de 6 kDa y una vasoinhibina con una masa de 11 kDa que comprende los aminoácidos 1-103 de la PRL (fragmento  $\omega$ ). Los péptidos remanentes que comprenden los residuos 54-199 y 104-199, fragmentos  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente, no tienen actividad de vasoinhibina sobre el endotelio vascular. Queda por evaluar la presencia y bioactividad del péptido que comprende los aminoácidos 49-53 de la PRL (Figura 10).



**Figura 10. Identidad de los fragmentos de PRL generados por trombina que resultó del análisis integral por *Western blot*, MALDI-TOF y espectrometría de masas clasificados según su actividad en dos bioensayos de angiogénesis. a.** Representación lineal de la estructura secundaria de la PRL humana donde se indican los sitios de corte de la trombina demostrados en este estudio (R48-G49 y R103-G104) y el reportado previamente por Khurana et al. (K53-A54). El esquema y abreviaturas se describen en la Figura 1. **b.** Fragmentos de PRL generados por el corte proteolítico con trombina denotados con letras griegas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ ). Se indica el primer y último aminoácido de cada fragmento y están clasificados según su actividad sobre la proliferación y migración de células endoteliales en cultivo.

## 9. Discusión

La vasoinhibina comprende una familia de péptidos derivados del corte proteolítico de la PRL con la capacidad de inhibir la angiogénesis, vasopermeabilidad y vasodilatación (Clapp *et al.*, 2006a; Triebel *et al.*, 2015). Hasta ahora únicamente la catepsina D (Piwnica *et al.*, 2004), las metaloproteasas de matriz (MMPs) (Macotela *et al.*, 2006) y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1) (Ge *et al.*, 2007) habían sido reportadas como enzimas generadoras de vasoinhibina a partir de la proteólisis de la PRL. Todas las isoformas de vasoinhibina generadas por dichas proteasas comparten la región amino terminal de la PRL (Triebel *et al.*, 2015) y su masa va desde los 9 kDa para una vasoinhibina que comprende los aminoácidos 1 a 79 de la PRL (Robles *et al.*, 2018), hasta los 18 kDa para una vasoinhibina con los residuos 1 a 159 (Ge *et al.*, 2007). En 1999 Khurana y colaboradores mostraron que la trombina procesa a la PRL humana hacia un fragmento de 16 kDa que no tiene actividad antiangiogénica. Además, encontraron que dicho fragmento corresponde al extremo C-terminal de la PRL y concluyeron que solamente fragmentos de PRL que contienen el extremo N-terminal de la molécula son vasoinhibina (Khurana *et al.*, 1999).

Mediante secuenciación de Edman, se reportó un único corte de la PRL por trombina que ubicaron entre los aminoácidos K53 y A54 y que resulta en el fragmento de 16 kDa C-terminal arriba descrito (Khurana *et al.*, 1999). En el presente trabajo nosotros encontramos que además del sitio de corte descrito por Khurana *et al.*, la trombina corta a la PRL entre los residuos R48-G49 y los residuos R103-G104 y que ambos sitios son más favorecidos para el corte por la trombina, dada la abundancia de los fragmentos resultantes. De acuerdo a estos cortes se generan dos fragmentos N-terminales, uno de 6 kDa y uno de 11 kDa. Ambos péptidos mostraron actividad de vasoinhibina al inhibir la proliferación y migración de células endoteliales en cultivo. El que se favorezca el corte por trombina probablemente obedece a que la unión R-G es parte de la secuencia consenso de esta proteasa para el procesamiento de diversas proteínas incluyendo su sustrato natural, el fibrinógeno (Gallwitz *et al.*, 2012).

Khurana y colaboradores identificaron el sitio de corte por trombina a través de secuenciar por degradación de Edman el extremo N-terminal del fragmento C-terminal de 16 kDa de la PRL que corresponde a los aminoácidos 54-199. A través de este hallazgo infirieron que el extremo remanente correspondía a los residuos 1-53 de la PRL y, por ende, que la trombina cortaba a la PRL entre K53 y A54. Además, en dicho estudio sólo se reportó la presencia del fragmento de 16 kDa C-terminal y no se detectaron otros productos probablemente debido a la baja resolución del SDS-PAGE para proteínas menores de 14 kDa que además en su estudio parecen haber migrado fuera del gel (Figura 2). Nuestro trabajo detecta más fragmentos de PRL debido a que usamos un sistema de geles diseñado para evaluar proteínas de bajo peso molecular (entre 5 y 20 kDa) que se basa en el uso de tricina en el amortiguador de corrida y el doble de porcentaje de bis-acrilamida (6%) que los geles convencionales (Schagger y von Jagow, 1987). Además, pudimos observar gracias al análisis de MALDI-TOF que, además del corte entre K53 y A54, existía otro entre R48 y G49 que permitía la liberación un péptido de cinco aminoácidos que va desde el G49 al K53. Finalmente, en el estudio realizado por Khurana *et al.*, 1999, únicamente se evaluó la actividad sobre la angiogénesis del fragmento de 16 kDa C-terminal, en tanto que la del fragmento de 6 kDa N-terminal no fue evaluada.

El uso de anticuerpos monoclonales contra los extremos N- y C-terminales de la PRL nos permitió explorar mediante *Western blot* la identidad y tamaño de los fragmentos derivados del corte de la PRL con trombina. Sin embargo, la sensibilidad de dichos anticuerpos fue baja y dado que los epítopes de la PRL reconocidos por estos anticuerpos monoclonales van de los residuos 1 al 9 para el N-terminal (Piwnica *et al.*, 2004) y del 132 al 199 para el C-terminal (Aranda *et al.*, 2005), sólo se detectaron los fragmentos  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y no se detectó al fragmento  $\delta$ . Por otra parte, el uso de un anticuerpo policlonal anti-PRL humana altamente sensible (CL-1) (Duenas *et al.*, 2004) hizo evidente la complejidad del corte por trombina.

El corte de PRL por trombina en los tres sitios descritos (K53-A54, R48-G49 y R103-G104) deriva en la generación de fragmentos principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) y minoritarios ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\chi$  y  $\omega$ ) en relación a su abundancia relativa. La complejidad aumenta cuando se considera

que puede tener lugar la formación de agregados por puentes disulfuro. Bajo condiciones no reductoras además de los fragmentos principales de PRL se observaron dos proteínas inmunorreactivas de ~12 y ~18 kDa, que al no ser observadas en el carril correspondiente a la trombina provienen de la PRL y probablemente corresponden a dímeros y trímeros del fragmento  $\alpha$  (~6 kDa) (Figura 4a). Esto se podría explicar debido la presencia de un “*hot spot*” de agregación en la molécula de PRL que va de la leucina 18 (L18) a la isoleucina 29 (I29) (Robles *et al.*, 2018) y dichos residuos forman parte de la secuencia del fragmento  $\alpha$ .

En el *Western blot* bajo condiciones reductoras utilizando el anticuerpo policlonal se observaron proteínas inmunorreactivas de ~7, ~10 y ~12 kDa (Figura 5a), que no hemos identificado. El fragmento de 7 kDa podría corresponder al fragmento  $\kappa$  (Tabla 2), el cual es resultado del corte únicamente en el sitio previamente descrito que corresponde a los aminoácidos 1-53 y que tendría una masa molecular de ~6,200 Da (Khurana *et al.*, 1999). Por otra parte, es frecuente encontrar a una vasoinhibina de 16 kDa en la preparación estándar de PRL, cuyo procesamiento por trombina entre R48-G49 pudiera generar precisamente un fragmento de 6 y uno de 10 kDa. Por lo que respecta a la proteína inmunorreactiva de 12 kDa (Figura 5a), esta podría corresponder a la contraparte N-terminal de la PRL cuando se da el corte único entre R103-G104 y el hecho de que esta proteína no se revele con el anticuerpo N-terminal pudiera deberse a la baja sensibilidad del mismo. La presencia de estas bandas adicionales a los fragmentos principales indica que el procesamiento proteolítico de la PRL por trombina es aún más complejo. De hecho, pensamos que dicho procesamiento puede resultar en la generación de más fragmentos en cantidades bajas ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ,  $\chi$  y  $\omega$ ) (Tabla 2), razón por la cual no fueron observados en el espectro de MALDI-TOF, en el SDS-PAGE tricina revelado para proteína total ni en el *Western blot* utilizando los anticuerpos monoclonales. A este respecto, algunos de estos fragmentos si fueron observados en las fracciones aisladas mediante HPLC.

A pesar de que la purificación por HPLC evidenció la presencia de fragmentos adicionales a los principales, no se debe ignorar que la separación no fue totalmente eficiente dado que en al menos tres de los carriles del *Western blot* se observa una combinación de dos

proteínas inmunorreactivas de diferente masa, por lo que para lograr una mejor separación aquellas fracciones que contienen más de una banda deberán someterse a técnicas de purificación posteriores tal como la cromatografía de filtración en gel, la cual separa las proteínas en función de su tamaño (Ó'Fágáin *et al.*, 2017).

No obstante que la separación de los fragmentos de PRL por HPLC no fue totalmente eficiente, un fragmento de 6 kDa y uno de 11 kDa, contenidos en la fracción 4 y 6 respectivamente, resultaron ser activos al inhibir la proliferación y migración de células endoteliales en cultivo. El análisis de estas fracciones por *Western blot* y espectrometría de masas reveló que la fracción 4 contiene al fragmento  $\alpha$  de 6 kDa que va del residuo 1 al 49. Sin embargo esta fracción también contuvo una pequeña cantidad del fragmento  $\delta$  también de 6 kDa que comprende los aminoácidos 54 al 103. Debido a esto, no se puede descartar la posible contribución del fragmento  $\delta$  a la bioactividad de la fracción 4 aunque, dado el bajo número de secuencias correspondientes a dicho fragmento  $\delta$  en relación al  $\alpha$ , se sugiere que la bioactividad reside fundamentalmente en los primeros 49 aminoácidos de la PRL. Con respecto a la fracción 6, los análisis respectivos mostraron que dicha fracción contiene al fragmento no principal  $\omega$  de 11 kDa, el cual va del aminoácido 1 al 103 y corresponde a la mitad amino terminal de la molécula de PRL. Por lo tanto, la trombina genera dos isoformas de vasoinhibina correspondientes al extremo N-terminal de la PRL de 6 y 11 kDa de masa molecular.

En apoyo a esta conclusión, el fragmento  $\delta$  también se encuentra contenido dentro de la secuencia del fragmento  $\beta$  que, de acuerdo a lo reportado por Khurana *et al.*, y a lo encontrado en este trabajo, carece de actividad antiangiogénica. De manera que si el fragmento  $\delta$  es activo, dicha actividad debiera extenderse al fragmento  $\beta$  y esto no es así. Además, en un estudio reciente se mostró que el dominio activo de la vasoinhibina reside en los primeros 79 aminoácidos de la secuencia de la PRL (Robles *et al.*, 2018). En dicho trabajo se sintetizó un péptido recombinante que comprende solamente los primeros 79 aminoácidos de la PRL y se mostró su actividad en ensayos *in vitro* de proliferación y migración endotelial, así como en la inducción de la expresión de genes blanco de la vasoinhibina (Robles *et al.*, 2018). Asimismo, otro reporte señala que un péptido de 14

aminoácidos (residuos 45 a 58 de la PRL) tiene actividad antiangiogénica (Lee *et al.*, 2011). Sin embargo, también existe evidencia que propone la localización del determinante antiangiogénico en los residuos 80 al 93 de la PRL (Nguyen *et al.*, 2006) y el fragmento  $\delta$  es el único que cumple con dicha condición.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten añadir a la trombina a la lista de proteasas capaces de generar a la vasoinhibina a partir de PRL; queda por determinar si esto ocurre fisiológicamente y de ser así, la importancia de este evento. Debido a que recientemente se ha descrito que la vasoinhibina tiene actividad profibrinolítica (Bajou *et al.*, 2014), el hecho de que la trombina la genere abre la posibilidad de que la vasoinhibina forme parte un *loop* de retroalimentación negativa que limite la acción procoagulante de la trombina. Esto sería un ejemplo más de la eficiente regulación de procesos biológicos vía la activación de influencias opuestas por una misma molécula, en este caso la trombina.

Para que la generación fisiológica de vasoinhibina por trombina sea posible, se requiere que existan en el organismo condiciones similares a las que se utilizaron en la reacción de corte tales como la concentración de la enzima y su sustrato, así como el tiempo necesario de reacción. Las concentraciones utilizadas en la reacción de corte fueron de 3.49  $\mu\text{M}$  para PRL y 1.1  $\mu\text{M}$  para trombina y la duración de la reacción fue de 24 h. De manera endógena la producción más importante y casi exclusiva de trombina ocurre durante el proceso de coagulación de manera local donde la concentración máxima de trombina es de 1.4  $\mu\text{M}$  a los 6 min de iniciado el proceso después del cual decae rápidamente (Mann *et al.*, 2003). En cuanto a la PRL, su concentración fisiológica máxima que alcanza, por ejemplo durante el embarazo y la lactancia, es de 16.2 nM (Abbassi-Ghanavati *et al.*, 2009), que es 200 veces menor a la que se utilizó en este trabajo. Sin embargo, no se puede descartar que las condiciones fisiológicas del microambiente tisular, no reproducidas en nuestro ensayo, favorezcan aún más el procesamiento de la PRL por trombina. Con base en estas consideraciones, podemos especular que de ocurrir la generación endógena de la vasoinhibina por trombina, sus niveles pudieran ser bajos y transitorios lo que dificultaría su detección por los métodos convencionales como la

inmunoprecipitación-*Western blot*. Por tal motivo, para evaluar la presencia endógena de las isoformas de vasoinhibina encontradas en este trabajo y, por ende la relevancia fisiológica de dicho procesamiento, se requiere de métodos de cuantificación más sensibles y específicos, tales como la espectrometría de masas de muestras biológicas.

## **10. Conclusiones**

La trombina corta a la PRL humana para generar dos nuevas isoformas de vasoinhibina de 6 y 11 kDa. Gracias a este trabajo es posible incluir a la trombina dentro de la lista de proteasas capaces de generar a la vasoinhibina y así extender esta familia a proteínas menores a los 9 kDa. La generación de vasoinhibina por trombina da un contexto funcional a sus acciones profibrinolíticas y realza su posible papel en la regulación de la hemostasia y la angiogénesis durante la reparación de heridas y fracturas. Futuros estudios deberán enfocarse en la búsqueda de la presencia endógena y caracterización biológica de estas nuevas isoformas de vasoinhibina.

## 11. Referencias

Abbassi-Ghanavati, M., Greer, L.G., y Cunningham, F.G. (2009). Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol* 114, 1326-1331.

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

Bajou, K., Herkenne, S., Thijssen, V.L., D'Amico, S., Nguyen, N.Q., Bouche, A., Tabruyn, S., Srahna, M., Carabin, J.Y., Nivelles, O., *et al.* (2014). PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nat Med* 20, 741-747.

Cao, Y. (1998). Endogenous angiogenesis inhibitors: angiostatin, endostatin, and other proteolytic fragments. *Prog Mol Subcell Biol* 20, 161-176.

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

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

Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J.H., Lindquist, R.A., Moffat, J., *et al.* (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100.

Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* 2011, pdb prot5557.

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

Clapp, C., Gonzalez, C., Macotela, Y., Aranda, J., Rivera, J.C., Garcia, C., Guzman, J., Zamorano, M., Vega, C., Martin, C., *et al.* (2006b). Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res* 35, 64-73.

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

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

Colman, R.W. (2006). Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system. *Curr Pharm Des* 12, 2599-2607.

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

Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* 2011, pdb prot5557.

D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J., y Weiner, R.I. (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6374-6378.

Duenas, Z., Rivera, J.C., Quiroz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Guerrero, J.L., Suarez, A., *et al.* (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2049-2055.

Esch, F., Ueno, N., Baird, A., Hill, F., Denoroy, L., Ling, N., Gospodarowicz, D., y Guillemín, R. (1985). Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem Biophys Res Commun* 133, 554-562.

Felbor, U., Dreier, L., Bryant, R.A., Ploegh, H.L., Olsen, B.R., y Mothes, W. (2000). Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J* 19, 1187-1194.

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

Gallwitz, M., Enoksson, M., Thorpe, M., y Hellman, L. (2012). The extended cleavage specificity of human thrombin. *PLoS One* 7, e31756.

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

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

Gospodarowicz, D., Bialecki, H., y Thakral, T.K. (1979). The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 28, 501-514.

Gupta, S.K., Hassel, T., y Singh, J.P. (1995). A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7799-7803.

Homandberg, G.A., Williams, J.E., Grant, D., Schumacher, B., y Eisenstein, R. (1985). Heparin-binding fragments of fibronectin are potent inhibitors of endothelial cell growth. *Am J Pathol* 120, 327-332.

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

Lawrence, A.M., y Besir, H.U. (2009). Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. *J Vis Exp*.

Lee, T.H., Rhim, T., y Kim, S.S. (1998). Prothrombin kringle-2 domain has a growth inhibitory activity against basic fibroblast growth factor-stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 273, 28805-28812.

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

Lee, J., Majumder, S., Chatterjee, S., y Muralidhar, K. (2011). Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. *J Biosci* 36, 341-354.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., y Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.

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

Mann, K.G., Brummel, K., y Butenas, S. (2003). What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 1, 1504-1514.

Mans, S., Banz, Y., Mueller, B.U., y Pabst, T. (2012). The angiogenesis inhibitor vasostatin is regulated by neutrophil elastase-dependent cleavage of calreticulin in AML patients. *Blood* 120, 2690-2699.

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

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

Niedermeyer, T.H., y Strohm, M. (2012). mMass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra. *PLoS One* 7, e44913.

Norton, K.-A., and Popel, A.S. (2016). Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Scientific Reports* 6, 36992.

Ó'Fágáin, C., Cummins, P.M., y O'Connor, B.F. (2017). Gel-Filtration Chromatography. In *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, D. Walls, and S.T. Loughran, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 15-25.

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

O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., y Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328.

O'Reilly, M.S., Pirie-Shepherd, S., Lane, W.S., y Folkman, J. (1999). Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 285, 1926-1928.

Pike, S.E., Yao, L., Jones, K.D., Cherney, B., Appella, E., Sakaguchi, K., Nakhasi, H., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G., *et al.* (1998). Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 188, 2349-2356.

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

Robles, J.P., Zamora, M., Velasco-Bolom, J.L., Tovar, M., Garduno-Juarez, R., Bertsch, T., Martinez de la Escalera, G., Triebel, J., y Clapp, C. (2018). Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Sci Rep* 8, 17111.

Salic, A., y Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2415-2420.

Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1, 16-22.

Schagger, H., y von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.

Sinha, Y.N., y Gilligan, T.A. (1984). A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of *in vitro* synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology* 114, 2046-2053.

Sinha, Y.N., Gilligan, T.A., Lee, D.W., Hollingsworth, D., y Markoff, E. (1985). Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 60, 239-243.

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

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

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

Tsopanoglou, N.E., Pipili-Synetos, E., y Maragoudakis, M.E. (1993). Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol* 264, C1302-1307.

Zania, P., Gourni, D., Aplin, A.C., Nicosia, R.F., Flordellis, C.S., Maragoudakis, M.E., y Tsopanoglou, N.E. (2009). Parstatin, the cleaved peptide on proteinase-activated receptor 1 activation, is a potent inhibitor of angiogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 378-389.

## 12. Índice de figuras y tablas

Tabla 1. Inhibidores endógenos de la angiogénesis que resultan del procesamiento proteolítico de proteínas precursoras. .....	4
Figura 1. Representación esquemática que ilustra los sitios de corte proteolítico en la molécula de PRL que generan las distintas isoformas de vasoinhibina. .....	5
Figura 2. <i>Western blot</i> de PRL humana cortada con trombina. .....	7
Figura 3. Esquema que ilustra los tamaños de los principales fragmentos de PRL generados por trombina derivado del análisis por SDS-PAGE- <i>Western blot</i> y MALDI-TOF. .....	20
Figura 4. Separación electroforética de los fragmentos generados del corte de PRL con trombina revelados para proteína total con azul de Coomassie. .....	21
Figura 5. Inmunodetección de los fragmentos de PRL generados por trombina. .....	22
Figura 6. Identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF de los principales fragmentos de PRL generados por trombina. .....	24
Tabla 2. Fragmentos de PRL generados por trombina detectados por MALDI-TOF. .....	25
Figura 7. Separación por HPLC de los fragmentos de PRL generados por trombina. .....	26

Figura 8. Evaluación del efecto de los fragmentos de PRL generados por trombina sobre la proliferación de células endoteliales.

.....28

Figura 9. Evaluación del efecto inhibitorio de las fracciones de PRL generadas por trombina sobre la migración de células endoteliales.

.....29

Figura 10. Identidad de los fragmentos de PRL generados por trombina que resultó del análisis integral por *Western blot*, MALDI-TOF y espectrometría de masas clasificados según su actividad en dos bioensayos de angiogénesis.

.....32

## 13. Apéndices

### 13.1. Lista de abreviaturas

<b>aaAT</b>	Antitrombina antiangiogénica
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico básico
<b>BME</b>	$\beta$ -Mercaptoetanol
<b>BMP-1</b>	Proteína morfogenética de hueso 1
<b>C4-C11</b>	Enlace por puente bisulfuro que une a la cisteína 4 con la 11 de la molécula de PRL
<b>C58-C174</b>	“ “ que une a la cisteína 58 con la 174 de la molécula de PRL
<b>C191-C199</b>	“ “ que une a la cisteína 191 con la 199 de la molécula de PRL
<b>CD</b>	Catepsina D
<b>click</b>	Reacción de cicloadición alquino-azida catalizada por cobre (I)
<b>CPAE</b>	Células endoteliales de arteria pulmonar bovina
<b>Ctl</b>	Control
<b>Da</b>	Daltones
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EMEM</b>	Medio <i>Eagle</i> mínimo esencial
<b>EdU</b>	5-Etínil-2'-deoxiuridina
<b>eNOS</b>	Sintasa endotelial de óxido nítrico
<b>ESI</b>	Ionización por electroespray ( <i>Electrospray ionization</i> )
<b>H4</b>	$\alpha$ -hélice 4 de la PRL
<b>HK</b>	Quinínógeno de alto peso molecular
<b>hPRL</b>	Prolactina humana
<b>K53-A54</b>	Sitio de corte para trombina en la molécula de PRL entre la lisina 53 y la alanina 54

<b>kDa</b>	kiloDaltones
<b>L1</b>	<i>Loop</i> 1 de la PRL
<b>L2</b>	<i>Loop</i> 2 de la PRL
<b>L3</b>	<i>Loop</i> 3 de la PRL
<b>MALDI-TOF</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de iones de tiempo de vuelo
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
<b>MMP(s)</b>	Metaloproteasa(s) de matriz
<b>NR</b>	No reductoras
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1
<b>PARs</b>	Receptores activados por proteasas
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfatos
<b>PBST</b>	Amortiguador de fosfatos con Tween 20
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
<b>PF4</b>	Factor plaquetario 4
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>R48-G49</b>	Sitio de corte para trombina en la molécula de PRL entre la arginina 48 y la glicina 49
<b>R103-G104</b>	Sitio de corte para trombina en la molécula de PRL entre la arginina 103 y la glicina 104
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>TBS</b>	Amortiguador de Tris
<b>Th</b>	Trombina
<b>u.a.</b>	Unidades arbitrarias de absorbancia
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>Vi</b>	Vasoinhibina

13.2. Código de 1 y 3 letras para representación de los aminoácidos.

<b>Aminoácido</b>	<b>Código (1 letra)</b>	<b>Código (3 letras)</b>
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val