



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DEL DETERMINANTE FUNCIONAL DE LA VASOINHIBINA:  
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS Y FISIOLÓGICAS**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. MARÍA MAGDALENA ZAMORA CORONA**

TUTORES PRINCIPALES:

**DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ L.**

*INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA*

**DR. JUAN PABLO ROBLES ÁLVAREZ**

*INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA*

COMITÉ TUTOR:

**DRA. ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO**

*INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA*

**DR. JEAN-LOUIS JOSEPH MARIE CHARLI CASALONGA**

*INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA*

JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO. JUNIO DE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



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 del Dr. Juan Pablo Robles Álvarez bajo el auspicio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (proyecto A1-S-9620B) y de la UNAM (405PC). La alumna recibió la beca CONACYT con número de CVU 768182.

## Índice

Índice.....	iv
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Agradecimientos.....	x
Tabla de abreviaturas.....	xii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1. La angiogénesis como blanco terapéutico.....	4
2.2. La vasoinhibina.....	4
2.2.1. Definición.....	4
2.2.2. Efectos y mecanismo de acción.....	5
2.2.3. Fisiopatología.....	5
2.2.4. Generación.....	6
2.2.5. Estructura-función.....	6
3. Justificación.....	9
4. Pregunta de investigación.....	11
5. Hipótesis.....	11
6. Objetivos.....	11
6.1. Objetivo general.....	11
6.2. Objetivos específicos.....	11
7. Métodos.....	14
7.1. Reactivos.....	14
7.2. Simulación por dinámica molecular (DM).....	14
7.3. Cultivo celular.....	14
7.4. Mutaciones puntuales por alanina en la vasoinhibina y en la PRL.....	15
7.5. Proliferación de células endoteliales.....	17
7.6. Motilidad de células endoteliales.....	17
7.7. Invasión de células endoteliales.....	17
7.8. Ensayo de formación de tubos endoteliales en Matrigel.....	18

7.9. Permeabilidad vascular <i>in vitro</i> .....	18
7.10. Distribución de F-actina.....	18
7.11. Resistencia al calor y a la pepsina.....	19
7.12. Modelos animales.....	19
7.13. Ensayo de angiogénesis con implante de Matrigel plug.....	19
7.14. Modelo tumoral.....	19
7.15. Incubación de PRL con trombina.....	20
7.16. SDS-PAGE tricina.....	20
7.17. Tinción de azul de Coomassie para proteína total.....	20
7.18. Western blot.....	21
7.19. Espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF.....	21
7.20. Generación de la vasoinhibina de 5.6 kDa por la trombina endógena durante la coagulación.....	22
7.21. Producción y purificación de la vasoinhibina de 48 aminoácidos (5.6 kDa).....	23
7.22. Proliferación, invasión y permeabilidad endotelial <i>in vitro</i> con la vasoinhibina de 48 aminoácidos (5.6 kDa).....	24
7.23. Ensayo de fibrinólisis.....	24
7.24. Análisis estadístico.....	25
8. Resultados.....	26
8.1. Identificación del determinante funcional de la vasoinhibina.....	26
8.1.1. El motivo HGR es el determinante antiangiogénico de la vasoinhibina.....	26
8.1.2. Mecanismo molecular que encripta al motivo HGR en la PRL.....	29
8.1.3. El heptapéptido Vi45-51 que contiene al motivo HGR inhibe la angiogénesis y la permeabilidad vascular.....	32
8.2. Optimización y caracterización del análogo de la vasoinhibina para su aplicación terapéutica.....	36
8.2.1. La administración oral de un heptapéptido cíclico retro-inverso que contiene al motivo HGR reduce el crecimiento y la vascularización tumoral.....	36
8.3. Implicaciones fisiológicas del determinante funcional de la vasoinhibina.....	41

8.3.1. La trombina corta a la PRL rápidamente y genera un fragmento N-terminal de 6 kDa.....	41
8.3.2. El fragmento de PRL N-terminal de ~6 kDa se genera por la trombina endógena durante la coagulación.....	43
8.3.3. El fragmento de 5.6 kDa (~ 6 kDa) corresponde a los residuos 1 al 48 de la prolactina.....	44
8.3.4. El fragmento N-terminal de 5.6 kDa (48 aminoácidos) generado por trombina es una vasoinhibina.....	46
8.3.5. La vasoinhibina de 5.6 kDa generada por trombina es profibrinolítica.....	47
9. Discusión.....	49
10. Referencias.....	54
11. Índice de figuras.....	62
12. Anexos.....	64
12.1.    Nomenclatura de los aminoácidos.....	64
12.2.    Artículos de investigación derivados de esta tesis.....	65





## Resumen

La hormona prolactina adquiere propiedades inhibitorias sobre la proliferación (angiogénesis) y permeabilidad de los vasos sanguíneos después de ser procesada proteolíticamente hacia vasoinhibina, un fragmento endógeno de la prolactina de 123 aminoácidos o más, que inhibe la acción de múltiples factores proangiogénicos. Evidencias preclínicas y clínicas respaldan el potencial terapéutico de la vasoinhibina contra enfermedades dependientes de la angiogénesis, como la retinopatía diabética, la cardiomiopatía del periparto, la artritis reumatoide y el cáncer. Sin embargo, el uso directo de la vasoinhibina en la clínica se ha visto limitado por dificultades en su producción recombinante. Aquí, eliminamos la barrera para usar a la vasoinhibina como agente terapéutico al mostrar que un motivo lineal corto de sólo tres aminoácidos (His46-Gly47-Arg48) (HGR) es su determinante funcional. La mutación del motivo HGR condujo a la pérdida de función de la vasoinhibina, mientras que oligopéptidos que contienen esta secuencia, inhibieron la angiogénesis y la permeabilidad vascular con la misma potencia que la vasoinhibina completa. Además, revelamos el mecanismo que oculta al motivo HGR en la prolactina y que explica las diferencias funcionales entre ambas moléculas. Más aún, encontramos que la administración oral de un heptapéptido cíclico retro-inverso optimizado que contiene al HGR inhibe el crecimiento y la vascularización del tumor de melanoma en ratones y exhibe una potencia antiangiogénica igual o mayor que otras moléculas antiangiogénicas utilizadas actualmente como fármacos contra el cáncer en la clínica. Con base a esta nueva información estructural, describimos que la proteasa trombina genera una vasoinhibina de 48 aminoácidos a partir de la prolactina que es la isoforma de vasoinhibina endógena más pequeña reportada hasta el momento. Estos hallazgos identifican a los análogos de la vasoinhibina como medicamentos potenciales para el control de las enfermedades angiogénico-dependientes; y nos permiten anticipar su uso para el desarrollo de anticuerpos específicos de la vasoinhibina que permitan medir sus niveles endógenos con fines diagnósticos e intervencionistas, el diseño de antagonistas de la vasoinhibina para controlar la angiogénesis insuficiente y la identificación de otras proteínas terapéuticas putativas que contienen al motivo HGR.

## **Abstract**

The hormone prolactin acquires antiangiogenic and antivasopermeability properties after proteolytic cleavage to vasoinhibin, an endogenous prolactin fragment of 123 or more amino acids that inhibits the action of multiple proangiogenic factors. Preclinical and clinical evidence supports the therapeutic potential of vasoinhibin against angiogenesis-related diseases including diabetic retinopathy, peripartum cardiomyopathy, rheumatoid arthritis, and cancer. However, the use of vasoinhibin in the clinic has been limited by difficulties in its production. Here, we removed the barrier to using vasoinhibin as a therapeutic agent by showing that a short linear motif of just three residues (His46-Gly47-Arg48) (HGR) is the functional determinant of vasoinhibin. The mutation of the HGR led to vasoinhibin loss of function, whereas oligopeptides containing this sequence inhibited angiogenesis and vasopermeability with the same potency as whole vasoinhibin. In addition, we unveiled the mechanism that hides the HGR motif in prolactin, explaining the functional differences between both molecules. The oral administration of an optimized cyclic retro-inverse vasoinhibin heptapeptide containing HGR inhibited melanoma tumor growth and vascularization in mice and exhibited equal or higher antiangiogenic potency than other antiangiogenic molecules currently used as anti-cancer drugs in the clinic. Based on this new structural information, we found that the protease thrombin cleaves prolactin into a 48 amino acid vasoinhibin, the smallest endogenous vasoinhibin isoform known so far. These findings identify vasoinhibin analogs as potential drugs for the treatment of angiogenesis-dependent diseases; and anticipate their use for the development of vasoinhibin-specific antibodies to measure endogenous vasoinhibin levels for diagnostic and interventional purposes, the design of vasoinhibin antagonists for managing insufficient angiogenesis, and the identification of other putative therapeutic proteins containing HGR.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez, del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por su colaboración conceptual y técnica en la caracterización de la vasoinhibina generada por trombina.

Al excelente apoyo técnico de la Dra. Xarubet Ruiz-Herrera y del Nut. Fernando López Barrera.

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

A Martín García Servín, Alejandra Castilla y María Antonieta Carbajo Mata por el magnífico apoyo del Laboratorio Universitario del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, para la obtención y manejo de los animales experimentales.

Al invaluable apoyo técnico de Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Al apoyo de Luis Aguilar Bautista, Alejandro De León Cuevas, Carlos Flores y Jair García del Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada.

A la asistencia y asesoramiento del Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas por parte de Carmen Mendoza López y Nuri Aranda López; de la Unidad de Cómputo y Videoconferencia del Instituto de Neurobiología de la UNAM a través de María Eugenia Rosas Alatorre, Moisés Mendoza Baltazar, Ramón Martínez Olvera, Omar González Hernández, y del Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela de la Biblioteca del Campus Juriquilla UNAM.

A la M. en C. Lucía del Carmen Márquez, Q. Eréndira García de los Ríos y M. en C. Lucero Ríos Ruiz del Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la UNAM, por su asistencia técnica en el análisis de MALDI-TOF.

Al Dr. Miguel Lara Flores, Biol. Erika Patricia Meneses Romero y Q.I. Lorena Hernández Orihuela del Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por su apoyo técnico en el análisis e identificación de proteínas.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la UNAM (matrícula estudiantil 518010865).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 768182).

Al CONACYT por el financiamiento otorgado (Proyecto A1-S-9620B).

A la UNAM por el financiamiento otorgado (Apoyo 405PC).

## Tabla de abreviaturas

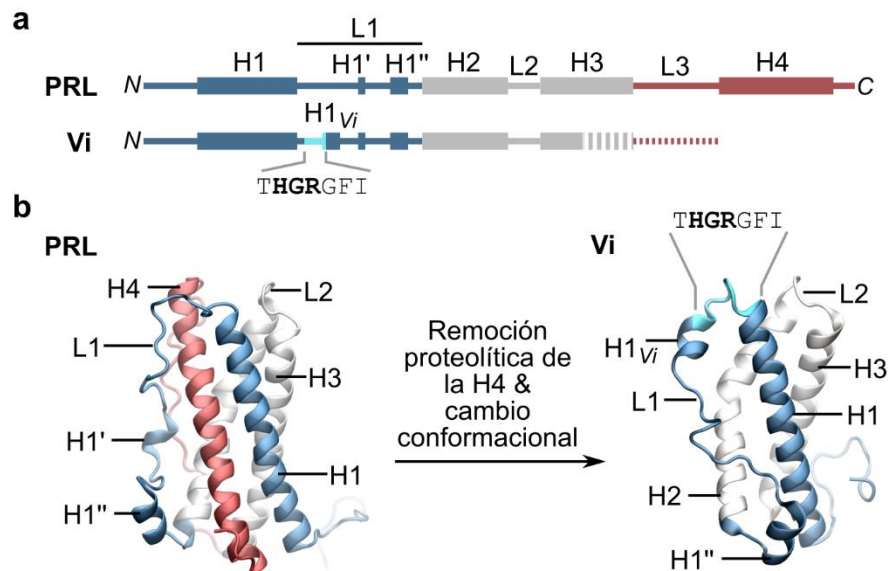
<b>B16-F10</b>	Línea celular de melanoma de ratón
<b>bFGF</b>	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
<b>BK</b>	Bradicinina
<b>BMP-1</b>	Proteína morfogenética de hueso 1
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CathD</b>	Catepsina D
<b>CD31</b>	Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas
<b>cDNA</b>	ADN complementario
<b>CRIVi45-51</b>	Análogo de la vasoinhibina cíclico retro-inverso (correspondiente a los aminoácidos 45-51 de la vasoinhibina)
<b>DM</b>	Simulación por dinámica molecular
<b>DMEM</b>	Medio “Eagle” modificado por Dulbecco
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECGS</b>	Suplemento de crecimiento de células endoteliales
<b>eNOS</b>	Sintasa de óxido nítrico endotelial
<b>F12K</b>	Medio de cultivo Ham's (Kaighn's)
<b>H1-4</b>	alfa-hélices 1 a la 4 de la PRL
<b>HB</b>	Puente de hidrógeno
<b>HEK293T/17</b>	Subclona 17 de células humanas de riñón embrionario
<b>HGR</b>	Motivo funcional de la vasoinhibina (Histidina46-Glicina47-Arginina48)
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>HUVEC</b>	Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>L1-3</b>	Asas conectoras o “loops” del 1 al 3 de la PRL
<b>MALDI-TOF</b>	Técnica de espectrometría de masas “Desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de iones de tiempo de vuelo”
<b>MAPK</b>	Proteína cinasas activadas por mitógenos
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas de matriz
<b>mRNA</b>	ARN mensajero

<b>NG2</b>	Proteoglicano condroitín- sulfato expresado en la superficie de los pericitos
<b>PAI-1</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas
<b>ppPRL</b>	PRL producida en <i>Pichia pastoris</i>
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PRL E161A</b>	PRL con el ácido glutámico de la posición 161 mutado hacia alanina
<b>PRL E162A</b>	PRL con el ácido glutámico de la posición 162 mutado hacia alanina
<b>PRL E161A/E162A</b>	PRL con los ácidos glutámicos de la posición 161 y 162 mutados hacia alanina
<b>RMSF</b>	Fluctuación estándar de la media cuadrática
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TEER</b>	Resistencia eléctrica transendotelial
<b>Th</b>	Trombina
<b>TKIs</b>	Inhibidores de los receptores de tirosin-cinasa
<b>tPA</b>	Activador de plasminógeno tisular humano
<b>uPA</b>	Activador del plasminógeno de tipo urocinasa
<b>uPAR</b>	Receptor de la urocinasa
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VE-Cad</b>	Cadherina endotelial vascular
<b>Vi</b>	Vasoinhibina de 123 aminoácidos
<b>5.6 Vi</b>	Vasoinhibina de 5.6 kDa generada por trombina
<b>Vi45-51</b>	Heptapéptido que contiene al motivo HGR de la vasoinhibina correspondiente a los aminoácidos 45 al 51 de la molécula
<b>Vi H46A</b>	Vasoinhibina con la histidina de la posición 46 mutada hacia alanina
<b>Vi R48A</b>	Vasoinhibina con la arginina de la posición 48 mutada hacia alanina
<b>Vi H46A/R48A</b>	Vasoinhibina con la H46 y R48 mutadas hacia alanina



## 1. Introducción

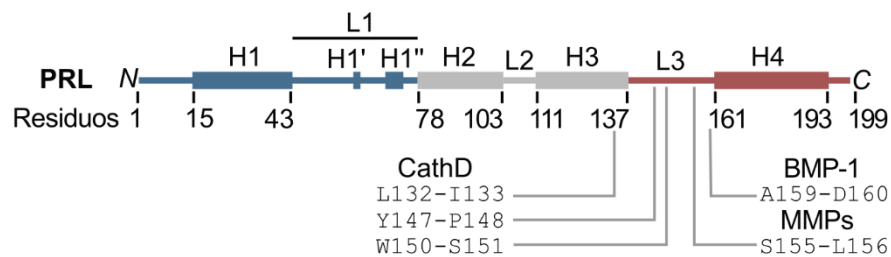
La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente<sup>1</sup>. Este proceso ocurre muy activamente durante el desarrollo de los organismos acompañando el crecimiento y diferenciación de los tejidos, pero en la vida adulta la angiogénesis está esencialmente restringida a la remodelación de tejidos (procesos reproductivos en las hembras) y a la reparación de heridas como consecuencia de lesiones o fracturas<sup>1</sup>. La regulación fisiológica de la angiogénesis es el resultado de un delicado balance entre factores positivos y negativos que la promueven o inhiben<sup>1</sup>, y una angiogénesis exacerbada, contribuye al desarrollo de enfermedades como el cáncer, las retinopatías vasoproliferativas y la artritis reumatoide<sup>1,2</sup>. Entre los factores que pueden inhibir el crecimiento y la función vascular están hormonas como la vaso inhibina<sup>3</sup>.



**Figura 1. Estructura de la prolactina y de la vaso inhibina.** Diagramas de las estructuras secundaria (a) y terciaria (b) de la prolactina (PRL) y de la vaso inhibina (Vi). Se indican las cuatro  $\alpha$ -hélices (H1-4), las asas conectoras o “loops” (L1-3) y la secuencia de los aminoácidos 45 al 51 (THGRGFI) que contiene el determinante funcional (HGR) de la vaso inhibina. La vaso inhibina se origina cuando la H4 es removida por proteólisis específica causando cambios conformacionales en el L1 que incluyen la formación de una nueva  $\alpha$ -hélice (H1<sub>Vi</sub>).



La vasoinhibina es una proteína endógena que inhibe la angiogénesis y la permeabilidad vascular<sup>4,5</sup> y que deriva de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL)<sup>4,5</sup>. La PRL humana comprende 199 aminoácidos organizados en cuatro  $\alpha$ -hélices (H1-4) conectadas por tres asas o “loops” (L1-3)<sup>6</sup> (Figura 1). La vasoinhibina se origina cuando la cuarta  $\alpha$ -hélice (H4) de la prolactina es removida por proteólisis específica a lo largo del loop 3 por la catepsina D (CathD)<sup>7</sup>, las metaloproteinasas de matriz (MMPs)<sup>8</sup> o la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1)<sup>9</sup> (Figura 2). Dependiendo de la proteasa que la genere, será el tamaño de la isoforma de vasoinhibina producida. Existen diversas isoformas de vasoinhibina, que van desde los 14 a los 18 kDa, comprendiendo segmentos que abarcan desde 123 hasta 159 aminoácidos a partir del extremo N-terminal de la PRL<sup>5</sup>. Todas las isoformas de vasoinhibina tienen en común que conservan el extremo N-terminal de la PRL y que han perdido la cuarta  $\alpha$ -hélice<sup>5</sup>.



**Figura 2. Sitios de corte en la PRL de las proteasas generadoras de la vasoinhibina.**

Representación lineal de la estructura secundaria de la PRL. Se indican las cuatro  $\alpha$ -hélices (H1-4), los tres loops (L1-3) y los extremos N- y C-terminales. También se indican los sitios de corte de las proteasas generadoras de las distintas isoformas de la vasoinhibina: catepsina D (CathD), metaloproteinasas de matriz (MMPs) y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1).

El determinante funcional de la vasoinhibina es desconocido. A pesar de que la vasoinhibina comparte entre el 60 al 80% de su secuencia con la PRL, se sabe que ésta carece de los efectos inhibitorios de la vasoinhibina sobre la vasculatura<sup>5</sup>, lo que sugiere que el determinante funcional de la vasoinhibina está oculto en la PRL y se expone tras la remoción de la  $\alpha$ -hélice 4 (H4). La razón principal que ha obstaculizado la identificación del determinante funcional de la vasoinhibina es que se desconoce su estructura tridimensional; sin embargo, tomando como base la estructura reportada de la PRL<sup>6</sup>, se modeló mediante simulación por dinámica molecular a la vasoinhibina y se observó que la pérdida de la H4 induce una nueva

conformación en la primera mitad del L1 que es diferente a la presente en la PRL intacta y en la que podría residir el determinante funcional de la vasoinhibina<sup>10</sup>.

La vasoinhibina tiene relevancia en la clínica, pues se conoce que la desregulación de sus niveles fisiológicos contribuye a la progresión de la retinopatía diabética<sup>11</sup>, la retinopatía del prematuro<sup>12</sup>, la cardiomiopatía del periparto<sup>13</sup>, la pre-eclampsia<sup>14</sup> y la artritis reumatoide<sup>15</sup>. De hecho, la prolactina y su conversión hacia vasoinhibina sustenta las bases de un blanco terapéutico de un ensayo clínico ya finalizado en pacientes con cardiomiopatía del periparto (ClinicalTrial.gov, NCT00998556)<sup>16</sup> y de un protocolo clínico en curso en pacientes con retinopatía diabética y edema macular diabético (ClinicalTrial.gov, NCT03161652)<sup>17</sup>. En dichos ensayos clínicos se regula de manera indirecta los niveles de vasoinhibina mediante la reducción<sup>16</sup> o el incremento<sup>11,17</sup> de los niveles circulantes de la PRL. A pesar de la relevancia de la vasoinhibina en diferentes patologías, uno de los principales obstáculos para su traslación a la clínica es que no se cuenta con suficiente proteína funcional para su uso terapéutico directo debido a dificultades inherentes a su producción recombinante<sup>18</sup>.

En esta tesis propusimos investigar el dominio funcional de la vasoinhibina con el propósito final de favorecer el desarrollo de análogos de esta proteína que permitan su traslación a la clínica. Encontramos que a pesar de que la vasoinhibina comprende más de 123 residuos, su determinante funcional reside en tan sólo tres aminoácidos His46-Gly47-Arg48 (HGR)<sup>19</sup> (Figura 1). Descubrimos cómo es que este motivo HGR está oculto en la molécula de PRL y desarrollamos un heptapéptido que contiene el motivo HGR y lo optimizamos para su administración oral y su traslación a la clínica. Finalmente, con base a esta información estructural, encontramos que la trombina procesa proteolíticamente a la PRL a un fragmento que comprende los primeros 48 aminoácidos de la molécula y que corresponde a la isoforma de vasoinhibina endógena más pequeña conocida. La generación de la vasoinhibina por trombina abre una nueva esfera de acción para esta proteína en el contexto de la reparación de heridas<sup>20</sup>.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. La angiogénesis como blanco terapéutico.**

La angiogénesis anormal subyace al desarrollo de múltiples enfermedades caracterizadas por una proliferación excesiva o insuficiente de los vasos sanguíneos que incluyen al cáncer, las retinopatías vasoproliferativas, la artritis reumatoide, las úlceras diabéticas y desórdenes cardiovasculares<sup>21</sup>. La idea de prevenir la progresión de enfermedades a través de inhibir la angiogénesis ha sido extensamente validado tanto preclínica como clínicamente para el tratamiento del cáncer y de las retinopatías vasoproliferativas<sup>21-23</sup>.

Los inhibidores de los receptores de tirosin-cinasa (TKIs)<sup>24</sup> y anticuerpos monoclonales contra el VEGF<sup>22</sup> son los principales compuestos antiangiogénicos utilizados en la clínica, aunque presentan inconvenientes como resistencia, efectos secundarios y toxicidad<sup>21,25</sup>. De manera similar, varias proteínas antiangiogénicas endógenas o fragmentos proteicos antiangiogénicos, que derivan de moléculas precursoras inactivas en angiogénesis, han sido identificados como agentes terapéuticos potenciales<sup>26-28</sup>. Estos últimos tienen ventajas como su carácter endógeno, tamaño pequeño, menor inmunogenicidad, especificidad más alta y menor riesgo de resistencia<sup>26,29,30</sup>. Sin embargo, algunas de estas proteínas presentan dificultades para su producción además de que muestran un desempeño clínico incierto<sup>28,29</sup>. Por tal motivo, es muy importante la identificación de nuevos agentes antiangiogénicos que permitan superar los inconvenientes de los fármacos ya existentes<sup>25</sup>.

### **2.2. La vasoinhibina.**

#### **2.2.1. Definición.**

La vasoinhibina es un regulador endógeno de la función vascular que deriva de la proteólisis de la hormona PRL<sup>3</sup>, y sus acciones más conocidas son la inhibición de la angiogénesis y la permeabilidad vascular<sup>4,5</sup>. Por ello, la vasoinhibina tiene un potencial

terapéutico en enfermedades como la retinopatía diabética, la artritis reumatoide y el cáncer<sup>4,5</sup>.

### **2.2.2. Efectos y mecanismo de acción.**

La vasoinhibina ejerce sus efectos vasculares al actuar directamente sobre su blanco principal, la célula endotelial, inhibiendo su proliferación, migración y supervivencia<sup>4,5</sup>. Hasta ahora no se conoce el receptor a través del cual la vasoinhibina ejerce sus efectos; sin embargo, se ha descrito que se une a un complejo multimérico formado por el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), el activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA) y el receptor de la urocinasa (uPAR)<sup>31</sup>; también se ha reportado la unión de la vasoinhibina a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ <sup>32</sup> y a otras proteínas de membrana aún no identificadas<sup>33</sup>. Con respecto a los mecanismos de señalización, la vasoinhibina antagoniza las vías de transducción Ras-Raf-MAPK<sup>34</sup>, Ras-Tiam1-Rac1-Pak1<sup>35</sup>, PI3K-Akt<sup>36</sup> y PLC $\gamma$ -IP3-eNOS<sup>37-39</sup> activadas por factores proangiogénicos que incluyen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)<sup>40</sup>, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF)<sup>41</sup>, la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )<sup>35</sup> y la bradicinina<sup>37</sup>.

Adicionalmente a sus efectos vasculares, la vasoinhibina también tiene acciones profibrinolíticas que se asocian a la producción de plasmina responsable de digerir al coágulo de fibrina mediante el bloqueo de la acción de PAI-1<sup>31</sup>. Asimismo, se han reportado acciones de la vasoinhibina sobre otros blancos celulares, tales como los fibroblastos en los que promueve la inflamación<sup>42-44</sup>, los leucocitos en los que favorece su infiltración al tejido tumoral<sup>45</sup> y las neuronas en las que inhibe la emisión de neuritas<sup>36</sup>.

### **2.2.3. Fisiopatología.**

La vasoinhibina se genera en el hipotálamo, la pituitaria y los tejidos blanco, lo que define al eje prolactina-vasoinhibina<sup>46</sup>. La desregulación de este eje contribuye a la progresión de distintas enfermedades angiogénico-dependientes<sup>11-15</sup>, por lo que la vasoinhibina es el blanco terapéutico de dos ensayos clínicos en cardiomiopatía del periparto

(ClinicalTrial.gov, NCT00998556)<sup>16</sup> y en retinopatía diabética y edema macular diabético (ClinicalTrial.gov, NCT03161652)<sup>17</sup>. En estos ensayos clínicos se utilizan medicamentos agonistas o antagonistas del receptor D2 de la dopamina, que producen hipo-prolactinemia o hiper-prolactinemia, respectivamente, lo cual resulta en la reducción<sup>16</sup> o incremento<sup>11,17</sup> de los niveles de vasoinhibina. Esta estrategia indirecta se debe a que uno de los principales obstáculos para el uso terapéutico directo de la vasoinhibina es que no se cuenta con suficiente proteína funcional por dificultades en su producción recombinante, que incluyen la presencia de modificaciones postraduccionales que interfieren con su plegado tridimensional, conducen a su inestabilidad, agregación y a la reducción de su actividad biológica<sup>18</sup>.

#### **2.2.4. Generación.**

Como ya se mencionó, la vasoinhibina se genera por proteólisis específica de la hormona PRL y, en realidad, comprende una familia de distintas isoformas que contienen desde los primeros 123 hasta los primeros 159 aminoácidos de la PRL<sup>4,5</sup>. Las isoformas de vasoinhibina se han generado de manera recombinante, pero también por el procesamiento enzimático de la PRL a través de proteasas como la catepsina D (CathD)<sup>7</sup>, las metaloproteinasas de matriz (MMPs)<sup>8</sup> y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1)<sup>9</sup> (Figura 2). Estas proteasas procesan a la PRL a lo largo del L3 que conecta las  $\alpha$ -hélices 3 y 4, lo que resulta en la pérdida de la  $\alpha$ -hélice 4 (H4) y en la generación de isoformas de vasoinhibina que van desde los 14 a los 18 kDa (Figura 2). La vasoinhibina, por lo tanto, corresponde al fragmento N-terminal de la PRL y con esta nueva configuración estructural adquiere sus efectos inhibitorios sobre la angiogénesis y la permeabilidad vascular, ausentes en la molécula íntegra de PRL<sup>5,46</sup>.

#### **2.2.5. Estructura- función.**

El que la PRL, la hormona precursora de la vasoinhibina, carezca de efectos antiangiogénicos sugiere que el dominio funcional de la vasoinhibina está oculto en la PRL y se expone tras su procesamiento proteolítico<sup>10</sup> (Figura 1). A diferencia de la vasoinhibina,

la estructura tridimensional de la PRL ya se conoce<sup>6</sup>. La PRL humana comprende 199 residuos organizados en cuatro  $\alpha$ -hélices que adoptan una configuración arriba-arriba-abajo-abajo, conectadas por tres asas o loops y flanqueada por dos loops pequeños que corresponden a las regiones N- y C-terminales. Adicionalmente, el L1 contiene dos hélices pequeñas, una tipo  $3_{10}$  (H1') y la otra tipo  $\alpha$  (H1''). La molécula está estabilizada por tres enlaces disulfuro que forman dos loops pequeños (C4-11 y C191-199) en las regiones terminales y un loop largo (C58-174) que une al L1 con la H4 (Figura 1).

Tomando como base la estructura de la PRL ya reportada<sup>6</sup> y mediante una simulación por dinámica molecular (DM), modelamos a la vasoinhibina<sup>10</sup>, bajo la premisa de que la zona en la que se observe la mayor diferencia estructural podría corresponder al determinante funcional de la vasoinhibina.

A través de remover virtualmente a la H4 de la PRL mediante DM y sometiendo a la molécula a un ambiente acuoso bajo condiciones “fisiológicas” simuladas (pH neutro y 37°C de temperatura), se observó el cambio principal en el L1 (residuos 44 al 77 de la PRL), específicamente en la primera mitad<sup>10</sup>. Así, cuando la PRL se procesa hacia vasoinhibina, el L1 se acerca a la H1 y forma una nueva  $\alpha$ -hélice pequeña en el L1<sup>10</sup>. Tras analizar las propiedades de dicha región, se encontró que fue la que presentó mayor movimiento y las propiedades electrostáticas e hidrofóbicas más distintas con respecto a la PRL íntegra, por lo que se propuso que el L1 pudiera contener el dominio funcional de la vasoinhibina. Esta posibilidad se validó al mostrar que una proteína recombinante constituida por los primeros 79 aminoácidos de la PRL que contiene a la H1 y L1 tiene propiedades antiangiogénicas<sup>10</sup>. Además, un estudio previo en la PRL de búfalo reportó que un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 45 al 58 de la PRL tiene actividad antiangiogénica<sup>47</sup>.

Por lo tanto, en esta tesis se buscó identificar y caracterizar el determinante funcional de la vasoinhibina con el fin último de desarrollar análogos de fácil producción para su uso clínico potencial. Además, se investigó la posibilidad de que una vasoinhibina pequeña, que contenga el dominio funcional descrito, sea generada en condiciones naturales por la trombina, una proteasa determinante del proceso de coagulación y reparación tisular. La

información obtenida nos permitió una mejor comprensión de la relación estructura-función y de la fisiología de la vasoinhibina.

### 3. Justificación

La angiogénesis patológica es un sello distintivo de enfermedades de alto impacto como el cáncer, la retinopatía diabética, enfermedades autoinmunes, la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la isquemia cerebral, enfermedades cardiovasculares, las úlceras crónicas y fallas en la cicatrización de heridas. Por lo tanto, desde hace varios años se ha considerado a la angiogénesis como un blanco terapéutico en el tratamiento de estos padecimientos<sup>48,49</sup>. A pesar de ello, los abordajes actuales para inhibir la angiogénesis patológica son limitados, ya que esencialmente corresponden a los inhibidores de los receptores de tirosin-cinasa (TKIs)<sup>24</sup> y anticuerpos monoclonales contra el VEGF<sup>22</sup>, los cuales tienen el gran inconveniente de presentar resistencia, efectos secundarios y toxicidad<sup>21,25</sup>. Por tal motivo, se requiere identificar nuevos agentes antiangiogénicos que permitan superar los inconvenientes de los fármacos ya existentes<sup>25</sup>. Los péptidos terapéuticos son una clase de agentes farmacéuticos prometedores ya que su optimización permite introducir modificaciones que aumentan su estabilidad, especificidad y efectividad, al tiempo que reducen su toxicidad y resistencia<sup>30,50</sup>.

Hace poco más de 30 años se descubrió a la vasoinhibina y sus funciones inhibitorias sobre el crecimiento de los vasos sanguíneos<sup>3-5</sup>. En la actualidad, la regulación de sus niveles fisiológicos es blanco terapéutico potencial para el tratamiento de diversos padecimientos angiogénico-dependientes como las retinopatías vasoproliferativas<sup>17</sup>, la cardiomiopatía del periparto<sup>16</sup>, la preeclampsia, la artritis reumatoide y el cáncer<sup>51</sup>. Sin embargo, la traslación clínica de la vasoinhibina se ha visto obstaculizada por las dificultades de su producción recombinante<sup>18</sup>.

Los resultados de esta tesis permitirán la resolución del uso terapéutico directo de la vasoinhibina, pues la identificación del motivo lineal corto de la vasoinhibina, de sólo tres residuos His46-Gly47-Arg48, derivó en el desarrollo de análogos de esta proteína que son potentes, fáciles de producir, estables y oralmente activos para el tratamiento de enfermedades angiogénico-dependientes. La naturaleza endógena de dichos análogos sugiere una toxicidad baja o inexistente y su uso terapéutico se ha protegido mediante solicitudes de



patente<sup>52</sup> en México (MX/a/2019/013819), la Unión Europea (EP 20140261.1), EUA (US 17/778,396), China (202080080809.3) y Japón (2022-529833).

No menos importante es el hecho de que la diferencia estructural observada entre la vasoinhibina y la PRL ha derivado en el desarrollo de anticuerpos específicos capaces de discriminar entre ambas proteínas<sup>53</sup> y anticipamos su uso para resolver el reto de medir los niveles endógenos de la vasoinhibina con el propósito de auxiliar en el diagnóstico y pronóstico de diversas enfermedades. Además, los hallazgos estructurales obtenidos facilitaron el descubrimiento de una nueva vasoinhibina endógena. Se encontró que la trombina, una proteasa importante en la coagulación y reparación tisular, genera a una vasoinhibina de tan sólo 48 aminoácidos que, por ende, conserva el dominio funcional descrito.

Finalmente, los resultados derivados de esta tesis brindarán herramientas para guiar la investigación sobre las acciones moleculares y fisiopatológicas de la vasoinhibina y otras proteínas que contengan al motivo HGR y motivos relacionados.

#### **4. Pregunta de investigación**

¿Cuál es el determinante funcional de la vasoinhibina?

#### **5. Hipótesis**

El determinante funcional de la vasoinhibina es un motivo lineal corto localizado en la primera mitad del asa 1, el cual está encriptado en la PRL. Dicho determinante funcional es responsable de los efectos inhibitorios de la vasoinhibina sobre la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Péptidos pequeños que contienen este motivo son estables, potentes, fáciles de producir y pueden ser desarrollados como nuevos medicamentos contra enfermedades angiogénico-dependientes. La identificación del determinante funcional de la vasoinhibina abre la posibilidad de que existan isoformas de vasoinhibina endógenas más pequeñas.

#### **6. Objetivos**

##### **6.1. Objetivo general**

Identificar el determinante funcional de la vasoinhibina y evaluar sus implicaciones terapéuticas y fisiológicas.

##### **6.2. Objetivos específicos**

###### **6.2.1. Identificar el determinante funcional de la vasoinhibina a través de:**

6.2.1.1. Evaluar mediante escaneo peptídico la actividad antiangiogénica de la región comprendida entre los residuos 45 al 58 de la PRL humana en un ensayo de proliferación de células endoteliales.

- 6.2.1.2. Determinar los residuos esenciales para la actividad de los péptidos sintéticos activos mediante la técnica de escaneo de alanina.
- 6.2.1.3. Evaluar si la mutación dirigida del motivo funcional resulta en la pérdida de la función de la vasoinhibina.
- 6.2.1.4. Comprender por qué el determinante funcional de la vasoinhibina no es activo en la PRL a través del análisis visual de la estructura tridimensional de la PRL.
- 6.2.1.5. Validar el mecanismo molecular que encripta al motivo funcional de la vasoinhibina en la PRL mediante simulación por dinámica molecular.
- 6.2.1.6. Demostrar si el bloqueo del mecanismo molecular de encriptamiento mediante mutagénesis dirigida confiere propiedades antiangiogénicas a la PRL
- 6.2.1.7. Evaluar el efecto inhibitorio del motivo funcional de la vasoinhibina contenido en un oligopéptido lineal en ensayos *in vitro* e *in vivo* de angiogénesis y permeabilidad vascular.

**6.2.2. Optimizar y caracterizar al análogo de la vasoinhibina para su aplicación terapéutica a través de:**

- 6.2.2.1. Sintetizar un análogo cíclico retro-inverso de la vasoinhibina con D-aminoácidos.
- 6.2.2.2. Comparar la potencia para inhibir la proliferación de células endoteliales en cultivo del análogo cíclico de la vasoinhibina con la de otras moléculas antiangiogénicas (proteínas, péptidos e inhibidores de los receptores de tirosin-cinasa) de uso en ensayos clínicos.
- 6.2.2.3. Evaluar la estabilidad al calor y resistencia a la degradación por pepsina del análogo cíclico de la vasoinhibina.
- 6.2.2.4. Evaluar el efecto de la administración intravenosa y oral del análogo circular de la vasoinhibina sobre el crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma subcutáneo.

**6.2.3. Determinar las implicaciones fisiológicas del determinante funcional de la vasoinhibina a través de:**

6.2.3.1. Evaluar la generación por trombina de una vasoinhibina con el tamaño mínimo necesario para conservar al determinante funcional en su estructura.

6.2.3.2. Evaluar si la trombina endógena genera a la vasoinhibina durante la coagulación.

6.2.3.3. Demostrar la relevancia funcional de la vasoinhibina generada por trombina mediante la evaluación de sus efectos inhibitorios sobre la angiogénesis y la permeabilidad vascular y promotores de la fibrinólisis.

## **7. Métodos**

### **7.1. Reactivos.**

Los péptidos lineales (con una pureza > 95%) se sintetizaron comercialmente y se acetilaron y amidaron en los extremos N- y C-terminal respectivamente (Tabla 1). La Vi45-51 corresponde al heptapéptido con la secuencia THGRGFI de la vasoinhibina. El péptido cíclico retro-inverso vasoinhibina 45-51 (CRIVi45-51) (pureza > 98%) se sintetizó con la secuencia  $D$ Ile- $D$ Phe-Gly- $D$ Arg-Gly- $D$ His- $D$ Thr y fue ciclado de la cabeza a la cola de los extremos amino y carboxilo (GenScript, Piscataway, NJ). La vasoinhibina recombinante de 123 residuos se produjo en células de insecto como se reportó<sup>54</sup>. La PRL humana recombinante fue donada por Michael E. Hodsdon<sup>55</sup> (Yale University, New Haven, CT). El factor de crecimiento endotelial vascular-165 (VEGF) fue proporcionado por Genentech (South San Francisco, CA), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) fue donado por Scios, Inc (Mountain View, CA). La bradicinina (BK) y la interleucina-1 $\beta$  fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y de R&D Systems (Minneapolis, MN), respectivamente. El péptido Anginex se compró de Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA) y el cilengitide, la angiostatina humana K1-3, endostatina, pazopanib, sorafenib y sunitinib de Sigma-Aldrich (St. Louis MO). Los cDNA de la vasoinhibina y la PRL fueron mutadas puntualmente por dos PCR consecutivas, clonadas dentro del vector pcDNA3 y producidas en células HEK293T/17 (ATCC, Manassas, VA) como se reportó<sup>18</sup>.

### **7.2. Simulación por dinámica molecular (DM).**

Se realizó una simulación clásica por DM mediante GROMACS<sup>56</sup> utilizando las coordenadas de la PRL humana soluble (PDB:1RW5)<sup>6</sup>, como se reportó<sup>10</sup>.

### **7.3. Cultivo celular.**

Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) se obtuvieron<sup>57</sup> y cultivaron en medio F12K suplementado con 20% de suero fetal bovino

(SFB), 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de heparina (Sigma-Aldrich) y 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de suplemento de crecimiento endotelial (ECGS, Corning, NY). La línea celular de células de melanoma de ratón B16-F10 (CRL-6475, ATCC) se cultivó en medio DMEM con 10% de SFB. Todos los medios contuvieron 100 U  $\text{ml}^{-1}$  de penicilina-estreptomicina.

**Tabla 1.** Péptidos sintéticos.

Nombre	Alias	Secuencia	Masa molecular (Da)
Vasoinhibina 45-51	Vi45-51	THGRGFI	827.93
Vasoinhibina 46-48	Vi46-48	HGR	409.45
Des-G <sup>47</sup> -vasoinhibina 45-51	<i>des-G<sup>47</sup></i>	THRGFI	770.83
[Ala <sup>45</sup> ]-vasoinhibina 45-51	T45A	AHGRGFI	797.91
[Ala <sup>46</sup> ]-vasoinhibina 45-51	H46A	TAGRGFI	761.87
[Ala <sup>47</sup> ]-vasoinhibina 45-51	G47A	THARGFI	841.96
[Ala <sup>48</sup> ]-vasoinhibin 45-51	R48A	THGAGFI	742.83
[Ala <sup>49</sup> ]-vasoinhibina 45-51	G49A	THGRAFI	841.96
[Ala <sup>50</sup> ]-vasoinhibina 45-51	F50A	THGRGAI	751.84
[Ala <sup>51</sup> ]-vasoinhibina 45-51	I51A	THGRGFA	785.85
Scramble 1	Scr1	GIGHFRT	827.93
Scramble 2	Scr2	THIRGGF	827.93
Scramble 3	Scr3	GTRIHFG	827.93
Vi45-51 cíclico retro-inverso	CRIVi45-51	<sub>D</sub> I- <sub>D</sub> F-G- <sub>D</sub> R-G- <sub>D</sub> H- <sub>D</sub> T	768.87

Scramble, péptidos sintetizados al azar con los aminoácidos 45 al 51 de la vasoinhibina.

#### 7.4. Mutaciones puntuales por alanina en la vasoinhibina y en la PRL.

El cDNA de la PRL humana, incluyendo el péptido señal, se clonó dentro del plásmido pcDNA3 entre los sitios BamH1 y NotI bajo el promotor del citomegalovirus (CMV) (pcDNA3::hPRL). La generación de la vasoinhibina con las mutaciones puntuales se realizó en dos pasos como se describe a continuación. Primero, los fragmentos de PCR se generaron del pcDNA3::hPRL utilizando el cebador inicial del pCMV (5'-cccacttggcagctacatca-3') y los cebadores reversos de: H46A (5'-cccggccagcgggtataccgt-3'), R48A (5'-gtaatgaaccccgcgcatgggtata-3'), o el H46A/R48A (5'-tgaaccccgcgcccagcgggtataccgtttatcg-3'). Segundo, se generaron los fragmentos de PCR

utilizando los cebadores de inicio de H46A (5'-tataccgctggccgggggttc-3'), R48A (5'-tataccatggcgcggggttcattac-3') o H46A/R48A (5'-taccgctggcgcggggttcattacaa-3'), y como cebador reverso se utilizó al 123-His-NotI (5'-aaaaagcggccgcttaatgatgatgatgatgatgatgggttgcctcaatctctacagc-3'), el cual introduce un codón de paro en la posición 124. Los dos fragmentos correspondientes obtenidos de cada una de las tres construcciones de vasoinhibina se amplificaron juntos mediante PCR sin los cebadores y se clonaron dentro de los sitios BamHI y NotI del pcDNA3. Las mutaciones puntuales a alanina en la PRL se realizaron con un procedimiento similar. Los fragmentos de PCR se amplificaron del pcDNA3::hPRL con el cebador inicial pCMV (5'-cccacttggcagtagcatca-3') y los cebadores reversos E161A (5'-aggcgagactctgcatcagccatc-3'), E162A (5'-aaaggcgagacgcttcacagccatctgc-3'), o E161A/E162A (5'-aaaggcgagacgctgcatcagccatctgc-3'). Enseguida, los fragmentos de PCR se generaron utilizando los cebadores iniciales de E161A (5'-gatggctgatgcagagtctcgct-3'), E162A (5'-gatggctgatgaagcgtctcgcttt-3'), o E161A/E162A (5'-gatggctgatgcagcgtctcgcttt-3'), y el cebador reverso PolyA (5'-gaatagaatgacacctactcagac-3'). La secuencia de los plásmidos se verificó por el método de Sanger<sup>58</sup>. Los plásmidos con los cDNA mutados para la vasoinhibina y la PRL y el plásmido no mutado de la PRL (pcDNA3::hPRL) se transfectaron en células HEK293T/17 (ATCC, Manassas, VA) cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y antibióticos. La mezcla de transfección contuvo al plásmido (40 µg) y 125 mM de CaCl<sub>2</sub> en amortiguador HBSS. Después de 24 horas, se refrescó el medio agregando sólo el 50% del volumen inicial, y después de 48 horas, el medio condicionado se cosechó, se separó en alícuotas y almacenó a -70°C. El medio condicionado de células transfectadas sin plásmido sirvió como control negativo. La presencia de la PRL y de las isoformas de vasoinhibina recombinantes en el medio condicionado de las HEK293T/17 transfectadas se evaluó mediante SDS PAGE-tricina en un gel al 16% de acrilamida seguido de Western blot con un antisuero anti-PRL humana (HC1)<sup>59</sup> realizado como se reportó<sup>10</sup>. La detección se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el anticuerpo anti-IgG de conejo, generado en asno, acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), el kit SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific, Waltham, MA) y el documentador Protein simple fluorchem image (ProteinSimple, San Jose, CA). El software Quantity One 1-D (Bio-Rad, Hercules,

CA) determinó los valores de densidad óptica, los cuales se interpolaron a una curva estándar de PRL para cuantificar la cantidad de proteína presente en los medios condicionados.

### **7.5. Proliferación de células endoteliales.**

Células HUVEC se sembraron a una confluencia de 14,000 células  $\text{cm}^{-2}$  en placas de 96 pozos y, después de 24 h, se estacionaron con 0.5% de SFB por 12-14 h. El medio se reemplazó con F12K al 20% de SFB y se incubaron las células con 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  heparina junto con 25  $\text{ng ml}^{-1}$  de VEGF y 20  $\text{ng ml}^{-1}$  de bFGF por 24 h en combinación con una sola dosis o diferentes concentraciones de PRL, vasoinhibina o los oligopéptidos sintéticos. La síntesis de DNA se cuantificó por la incorporación al DNA del análogo de la timidina 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU, Sigma-Aldrich), el cual se detectó mediante una reacción de click con una azida fluorescente (Azide Fluor 545, Sigma-Aldrich) como se reportó<sup>10,60</sup>.

### **7.6. Motilidad de células endoteliales.**

El ensayo por cierre de herida<sup>61</sup> se utilizó para evaluar la motilidad celular. Las células HUVEC se crecieron a confluencia en placas de 6 pozos y se realizó una “herida” con la punta de un raspador celular en el centro de la monocapa. Se refrescó el medio (F12K 20% SFB) y se le agregan 10  $\text{ng ml}^{-1}$  de IL-1 $\beta$  para estimular la motilidad junto con 100 nM de la vasoinhibina recombinante o de la Vi45-51. Después de 16 h, se fotografió la migración de las HUVEC con un microscopio invertido y el área de cierre de la herida se calculó con el software CellProfiler<sup>62</sup>. El área de cierre de la herida se expresó relativo al área inicial de la herida y se comparó contra las células tratadas solamente con IL-1 $\beta$ .

### **7.7. Invasión de células endoteliales.**

Se utilizó el ensayo de migración *transwell* con una barrera de Matrigel<sup>63</sup> para evaluar la invasión celular. Las HUVEC se sembraron a una confluencia de 14,000 células  $\text{cm}^{-2}$  en la cara superior (luminal) de un inserto tipo transwell con un poro de 8  $\mu\text{m}$  cubierto con 0.38  $\text{mg ml}^{-1}$  de Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) en medio de estación (0.5 % de SFB y



sin ECGS) con 100 nM de vasoinhibina recombinante o la Vi45-51. El medio condicionado de células 3T3-L1 conteniendo 10% SFB y VEGF (50 ng ml<sup>-1</sup>) se agregó en el lado inferior del transwell (abluminal) y sirvió como quimioatrayente. Después de 16 h, las células que invadieron el lado inferior del transwell se fijaron, permeabilizaron, tiñeron y contaron.

### **7.8. Ensayo de formación de tubos endoteliales en Matrigel.**

Se evaluó la formación de redes de células endoteliales tubulares por el ensayo de formación de tubos en Matrigel como se reportó<sup>64</sup>. Células HUVEC (26,500 células cm<sup>-2</sup>) se sembraron sobre una capa sólida de Matrigel (1.2 mg cm<sup>-2</sup>) en un plato de 24 pozos en presencia de 200 nM de la vasoinhibina recombinante o la Vi45-51, y se incubaron por 6 h. La formación de tubos fue cuantificada por el templado Angiogenesis Analyzer para el software ImageJ<sup>65</sup>.

### **7.9. Permeabilidad vascular *in vitro*.**

Se crecieron monocapas de células HUVEC en insertos tipos transwell de 6.5 mm de diámetro con un poro de 0.4 µm. La resistencia eléctrica transendotelial (TEER) se midió con el voltímetro/ohmetro epitelial EVOM2 (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Las monocapas se trataron con 100 nM de vasoinhibina recombinante la Vi45-51 por 1 h antes de agregar 50 ng ml<sup>-1</sup> de VEGF. Se midió la TEER por un período de 120 min. También se evaluó el tránsito de albúmina a través de las monocapas de HUVEC 10 min después de la adición de VEGF mediante la adición del colorante azul de Evans acoplado a albúmina en la cámara superior del transwell y la medición de su tránsito hacia la cámara inferior del transwell.

### **7.10. Distribución de F-actina.**

Células HUVEC se sembraron en placas Millicell EZ Slides y se crecieron hasta la formación de la monocapa. (Millipore, Burlington, MA). Se trataron por 1 h con 100 nM de la vasoinhibina recombinante o con la Vi45-51 seguido de 200 ng ml<sup>-1</sup> de VEGF por 1 h. Las

células se fijaron, permeabilizaron y se tiñeron para F-actina con rodamina faloidina (Thermo Fisher Scientific).

### **7.11. Resistencia al calor y a la pepsina.**

Concentraciones (2  $\mu$ M) de vasoinhibina recombinante, Vi45-51 o CRIVi45-51 se inactivaron con calor (97°C, 15 min). Concentraciones (4  $\mu$ M) de cada vasoinhibina se digirieron mediante su incubación con pepsina (Sigma-Aldrich) en una relación molar final de 1:20 proteasa-sustrato, en 40 mM de HCl a 37°C por 5 h.

### **7.12. Modelos animales.**

Ratones hembra y macho C57BL/6 se alojaron en condiciones estándar de laboratorio. Todas las intervenciones se llevaron a cabo bajo 2.5% de isoflurano como anestesia (SomnoSuite system, Kent Scientific, Torrington, CT). Los experimentos se aprobaron por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), de acuerdo a la US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Octava Edición, National Academy Press, Washington, D.C., USA).

### **7.13. Ensayo de angiogénesis con implante de Matrigel plug.**

El ensayo de implantes de Matrigel se realizó<sup>66</sup> y se cuantificó como se reportó<sup>67</sup>. El implante de Matrigel (0.5 ml, BD Biosciences) se suplementó con 300 ng ml<sup>-1</sup> de bFGF y 1  $\mu$ M de la vasoinhibina recombinante o de la Vi45-51.

### **7.14. Modelo tumoral.**

El modelo murino de desarrollo de tumor primario basado en el uso de células de melanoma B16-F10 se realizó como se reportó previamente<sup>68</sup>. Ratones hembra C57BL/6 (8-12 semanas de edad) se anestesiaron e inocularon en el flanco derecho con 10<sup>5</sup> células B16-

F10. Cinco días después de la inoculación, los animales se trataron diariamente por 8 días con vehículo (NS) o CRIVi45-51 inyectados en la vena lateral de la cola o vía una cánula intragástrica. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores pesados y procesados para evaluar los vasos sanguíneos por inmunofluorescencia o RT-qPCR.

#### **7.15. Incubación de PRL con trombina.**

La PRL humana recombinante fue la proporcionada por Michael E. Hodsdon<sup>55</sup> (Yale University) y la trombina humana purificada de plasma fue de Sigma-Aldrich. La PRL y la trombina 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 de un amortiguador de bicarbonato de amonio 50 mM (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) a pH 7.4. Los controles fueron la PRL y la trombina, incubadas en las mismas condiciones, pero de manera independiente.

#### **7.16. SDS-PAGE tricina.**

Las distintas mezclas de incubación se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) a una concentración de 16% Acrilamida y 6% Bis-acrilamida, modificado por el uso de tricina<sup>69</sup> para permitir una mayor resolución de proteínas de bajo peso molecular. Se utilizaron tanto condiciones reductoras (15.5 mg ml<sup>-1</sup> de 2-mercaptoetanol) como no reductoras. El amortiguador de carga 6X (seis veces concentrado) se adicionó a las muestras y éstas se incubaron a 97 °C durante 15 min con una agitación de 550 rpm. Se utilizó el marcador de peso molecular preteñido Dual Xtra (Bio-Rad) para verificar en tiempo real la distribución de las bandas durante la electroforesis e inferir el tamaño de los fragmentos resultantes.

#### **7.17. 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) sin solventes orgánicos ni ácido acético<sup>70</sup>. 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 segundos, hasta justo antes del hervor. Finalmente, se colocó el gel en la solución de tinción y se calentó por última vez en el microondas 40 segundos 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.

### **7.18. 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, 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). Posteriormente se incubaron toda la noche con el antisuero anti-PRL humana (HC1)<sup>59</sup> a una dilución 1:500 en 1% de albúmina sérica bovina en PBST. A continuación, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Jackson ImmunoResearch) a una dilución de 1:5000 y, finalmente, la reacción se reveló utilizando un estuche comercial (AP Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad). Para la detección de epítopes particulares dentro de la molécula se usaron anticuerpos monoclonales: el anticuerpo monoclonal dirigido contra la región N-terminal de la PRL humana (5602) (RRID:AB:2391503) fue de Diagnostics Biochem Canada Inc<sup>7</sup>, y el dirigido contra el extremo C-terminal de la PRL humana (INN-368) fue generado<sup>71</sup> y caracterizado como se reportó<sup>72</sup>.

### **7.19. Espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF.**

Se digirieron 20 µg de PRL con 10 µg de trombina por 24 horas en un volumen final de 250 µl 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 del Dr. Manuel B. Aguilar, del 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  $\text{min}^{-1}$ . 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 ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) con o sin 80 mM de ditioneitol (DTT) como agente reductor. La concentración de las muestras resuspendidas se evaluó mediante un SDS PAGE-tricina seguido por una tinción con azul de Coomassie. Sólo se recuperó el 50% de la concentración inicial de proteína, quedando a una concentración final de 1.75  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ , como reveló un análisis de cuantificación con reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se mezcló 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra con 1  $\mu\text{l}$  de solución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo: $\text{H}_2\text{O}$  (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) 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<sup>73</sup>, 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. El análisis MALDI-TOF se llevó a cabo en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la UNAM.

#### **7.20. Generación de la vasoinhibina de 5.6 kDa por la trombina endógena durante la coagulación.**

La PRL humana recombinante (generada en *Escherichia coli*) se añadió a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$  a 120  $\mu\text{l}$  de plasma humano sano en presencia o ausencia de 10 unidades de hirudina, un inhibidor de trombina (Sigma-Aldrich). La coagulación se indujo

mediante la adición de 10 mM de CaCl<sub>2</sub> y una incubación a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación, se removió el coágulo y se evaluaron los fragmentos de PRL en el plasma mediante inmunoprecipitación-Western blot. Brevemente, se resuspendió el plasma coagulado y se inmunoprecipitaron 100 µl de éste con 2 µl del antisuero anti-PRL humana (HC1)<sup>59</sup> a 4°C durante toda la noche, seguido de una incubación de 2 h a 4 °C con proteína A-Sefarosa (40 µl; Sigma-Aldrich). La muestra se centrifugó y se lavó, y el sedimento se resuspendió en el amortiguador de carga Laemmli en condiciones reductoras, se calentó a 97°C durante 15 min con agitación (550 rpm), se centrifugó durante 5 min (3000 xg, a 4°C) y se evaluó por SDS PAGE-tricina. Después las muestras se electrotransfirieron para evaluarlas por Western blot, revelado tanto para el antisuero HC1 o para el extremo N-terminal de la PRL humana (5602) (RRID:AB:2391503). La detección utilizó anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina y un kit colorimétrico (Bio-Rad).

#### **7.21. Producción y purificación de la vasoinhibina de 48 aminoácidos (5.6 kDa).**

La vasoinhibina de 5.6 kDa se generó por trombina a partir de PRL producida en *Pichia pastoris* para tener suficiente proteína para evaluar su actividad sobre la angiogénesis y la permeabilidad vascular de acuerdo al siguiente procedimiento. La secuencia del mRNA de la PRL humana (NM\_001163558.2), sin el péptido señal (aminoácidos 1-28), fue optimizada (o.hPRL) con el software GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific). Un sitio de corte para la proteasa KEX (conteniendo un sitio XhoI), una cola de 6 histidinas (6xHis) seguida de un sitio de corte para Xa (IEGR) fueron insertados en el extremo 5' de la o.hPRL, mientras que en el extremo 3' se insertó un sitio de restricción XbaI. La secuencia se sintetizó artificialmente (GeneOracle) y se subclonó dentro del plásmido pPICZαA río arriba y en el marco con la señal de secreción del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (EasySelect Pichia Expression kit, Invitrogen) con las enzimas de restricción XhoI y XbaI. El plásmido se transformó en *Escherichia coli* de la cepa XL-Blue y se expandió en medio LB bajo en sales con 25 µg ml<sup>-1</sup> de zeocina (Invitrogen). El plásmido purificado se linearizó con la enzima SacI y se electroporó en la cepa de *Pichia pastoris* GS115. Al menos 30 colonias que hubiesen crecido en 500 µg ml<sup>-1</sup> o más de zeocina se incubaron en extracto líquido de levadura peptona-dextrosa y se evaluó la producción de PRL. La cepa con mayor producción

de PRL se seleccionó y creció en medio BMGY con  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  de zeocina a  $30^\circ\text{C}$  con agitación (200 rpm). Después de 48 h, 1 litro de cultivo se centrifugó ( $3000 \times g$ ) por 20 min y el *pellet* se resuspendió en 200 ml de medio BMMY. Un total de 4 ml de metanol estéril se añadió diariamente al cultivo por dos días (cuando la inducción de la PRL alcanzó  $>100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Los 200 ml del cultivo se centrifugaron para remover la levadura. La PRL en el sobrenadante se purificó por cromatografía de afinidad utilizando columnas de  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarosa (Qiagen) y desalada utilizando la columna HiTrap Desalting (GE Life Sciences) y el sistema ÄKTA Prime FPLC (Amersham BioSciences). La pureza de la PRL producida en *Pichia pastoris* (ppPRL) se evaluó por SDS PAGE-tricina utilizando la tinción de plata (Sigma-Aldrich).

Enseguida, la PRL producida en *Pichia pastoris* (ppPRL) ( $200 \mu\text{g}$ ) se incubó con trombina ( $100 \mu\text{g}$ ) en 2.5 ml de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 7.4) por 30 h a  $37^\circ\text{C}$  bajo agitación (550 rpm). El fragmento marcado con la cola de 6 histidinas (6xHis) se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarosa (Qiagen) en presencia y ausencia de 80 mM de DTT. La muestra eluida se desaló (HiTrap Desalting columna y el sistema ÄKTA Prime FPLC), concentró (Savant SpeedVac) y se evaluó por SDS PAGE-tricina teñido para proteína total (Coomassie y plata) y por Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-6xHis (abcam 18184) a una dilución 1:200. Las muestras desaladas, sin DTT, se concentraron y cuantificaron para proteína total (Coomassie y Bradford), se diluyeron en ddH<sub>2</sub>O estéril y se evaluó su bioactividad.

#### **7.22. Proliferación, invasión y permeabilidad endotelial *in vitro* con la vasoinhibina de 48 aminoácidos (5.6 kDa).**

Los ensayos de proliferación, invasión y permeabilidad en las células endoteliales HUVEC para evaluar la actividad de la vasoinhibina de 48 aminoácidos se realizaron como se reportó previamente (arriba) pero tratando a las células con 100 nM de la vasoinhibina de 48 aminoácidos generada a partir de la PRL producida *Pichia pastoris* y 100 nM de la vasoinhibina de 123 aminoácidos utilizada como control positivo.

### **7.23. Ensayo de fibrinólisis.**

Se recolectó sangre humana sana en un tubo de plástico con citrato de sodio al 3.2% (BD Vacutainer). El plasma se obtuvo por centrifugación (1,200 xg durante 10 min a 4°C) y se mantuvo a 4°C durante la manipulación. Se añadió plasma (24 µl/pozo) a una placa de 96 pozos, en la que cada pozo contenía 20 µl de 50 mM de CaCl<sub>2</sub>. La absorbencia a 405 nm evaluó la turbidez como un índice de formación de coágulos inmediatamente después de la adición de plasma y a intervalos de 5 min. Antes de la coagulación, se preincubaron 0.5 µM de PAI-1 (Thermo Fisher Scientific) en 10 mM de Tris con 0.01 % de Tween 20 (pH 7.5) a 37°C durante 10 min con o sin 3 µM de la vasoinhibina de 5.6 kDa producida a partir de la ppPRL, o del control positivo de vasoinhibina. Una vez que se formó el coágulo (~20 min), se agregaron los tratamientos para dar la siguiente concentración final por pozo: 24% v/v de plasma, 10 mM de CaCl<sub>2</sub> ± 60 pM de activador de plasminógeno tisular humano (tPA, Sigma-Aldrich) en 100 µl de 10 mM Tris con 0.01% de Tween 20 (pH 7,5). El tratamiento con tPA se realizó en ausencia o presencia de PAI-1 (0.05 µM) con o sin 0.3 µM de la vasoinhibina de 5.6 kDa o del control positivo de vasoinhibina. La lisis del coágulo se evaluó mediante la medida de la absorbencia a 405 nm cada 5 minutos durante 80 minutos.

### **7.24. Análisis estadístico**

Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados con un modelo de pendiente variable calculado con al menos 54 puntos. La prueba t no pareada se utilizó para dos grupos independientes. Para comparar más de dos grupos se utilizó ANOVA de una o dos vías seguida de la prueba de Dunnett (cuando se comparó al control) o de la prueba de Bonferroni o Tukey (cuando se comparó contra cada uno de los grupos). Todas las pruebas se realizaron en el software GraphPad Prism versión 8.4.3 para MacOS (GraphPad, Software, San Diego, CA, USA). El umbral de significancia se estableció a  $P < 0.05$ , a menos que se indique lo contrario.

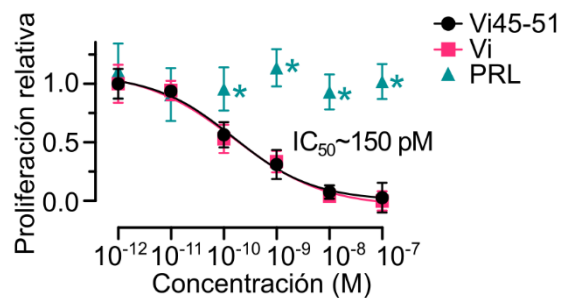


## 8. Resultados

### 8.1. Identificación del determinante funcional de la vasoinhibina.

#### 8.1.1. El motivo HGR es el determinante antiangiogénico de la vasoinhibina.

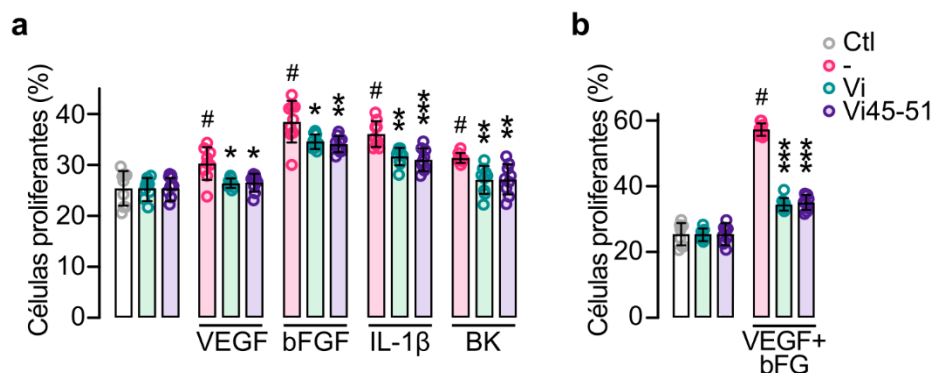
Para localizar de manera precisa al determinante antiangiogénico de la vasoinhibina, escaneamos con oligopéptidos sintéticos la región que va del residuo 45 al 58 de la PRL humana por su capacidad para inhibir la proliferación de células endoteliales en cultivo. Encontramos que un heptapéptido correspondiente a los residuos 45-51 de la vasoinhibina (Vi45-51) que comprende a los residuos THGRGFI inhibió la proliferación inducida por VEGF+bFGF con la misma potencia ( $IC_{50} \sim 150$  pM) que una vasoinhibina convencional de 123 residuos (Figura 3).



**Figura 3. El heptapéptido THGRGFI (Vi45-51) posee la misma potencia que la vasoinhibina.** Inhibición dosis-respuesta de la proliferación de células HUVEC por el heptapéptido THGRGFI que comprende los residuos 45 al 51 de la Vi (Vi45-51), la vasoinhibina de 123 residuos (Vi) y la PRL. La inhibición fue sobre la proliferación de HUVEC inducida por la mezcla de VEGF+bFGF. Se indica el valor de la  $IC_{50} \sim 150$  pM tanto de la Vi como de la Vi45-51. La proliferación se indica relativa a la de las dosis más baja y alta de la curva con Vi como control positivo,  $n = 9$ ,  $*P < 0.001$  versus Vi. (ANOVA de dos vías, Dunnett). Las curvas dosis-respuesta se ajustaron por medio de un análisis de regresión de mínimos cuadrados ( $r^2 > 0.9$ ).

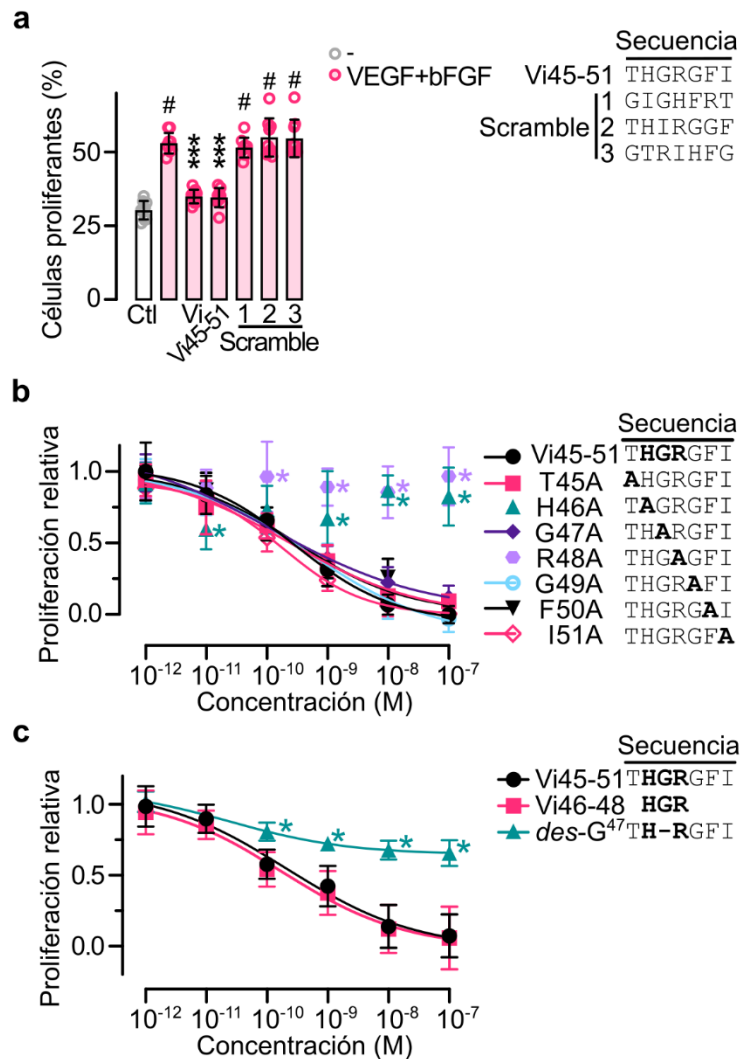
El heptapéptido Vi45-51 conserva el amplio espectro de la vasoinhibina para inhibir la señalización de diversos factores proangiogénicos, ya que inhibió la proliferación de las células HUVEC inducida por los factores (VEGF, bFGF, IL-1 $\beta$  y bradicinina) cuya

señalización es inhibida por la vasoinhibina (Figura 4a), así como la proliferación inducida por la mezcla de VEGF y bFGF, a pesar de que la combinación de ambos factores estimuló al doble la proliferación endotelial (Figura 4b). Al igual que la vasoinhibina<sup>3,5</sup>, la Vi45-51 no afectó la proliferación basal de las células endoteliales en cultivo (Figura 4).



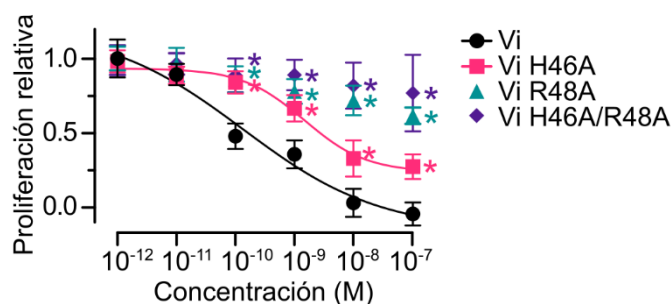
**Figura 4. El heptapéptido THGRGFI (Vi45-51) mimetiza el efecto antiangiogénico de la vasoinhibina.** Porcentaje de proliferación de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) estimulada por los factores proangiogénicos VEGF, bFGF, IL-1β o bradicinina (BK) (a), o la mezcla de VEGF+bFGF (b), y su inhibición por el cotratamiento con 100 nM de Vi o de la Vi45-51. Se indica también el efecto basal de 100 nM de Vi o de Vi45-51. \* $P < 0.033$ , \*\* $P < 0.002$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus el control estimulado (-); # $P < 0.001$  versus la proliferación basal de células sin tratamiento (Ctl) (ANOVA de dos vías, Tukey). Los valores son las medias  $\pm$  SD,  $n = 9$ ).

La secuencia primaria de la Vi45-51 es necesaria para conservar su actividad. Esto se demuestra pues tres diferentes péptidos con los mismos residuos que la Vi45-51 pero en diferente orden (“scramble”) no inhibieron la proliferación de células endoteliales (Figura 5a). Además, nuestros resultados mostraron que el motivo HGR es esencial para la actividad de la vasoinhibina, pues la sustitución por alanina de cada uno de los residuos de la Vi45-51 reveló que H46A y R48A fueron las únicas sustituciones que suprimieron la actividad del heptapéptido (Figura 5b), en tanto que la delección de la G47 (*des-G*<sup>47</sup>) resultó en una reducción de la función, y el tripéptido HGR (Vi46-48) tuvo la misma actividad para inhibir la proliferación que la Vi45-51 (Figura 5c).



**Figura 5. El efecto antiangiogénico del heptapéptido THGRGFI (Vi45-51) reside en su secuencia.** (a) Efecto de 100 nM de Vi, la Vi45-51 y tres diferentes heptapéptidos con los residuos de la Vi45-51 pero en un orden aleatorio (scramble) sobre la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF+bFGF. El porcentaje de las células proliferantes es relativo a las células totales. \*\*\* $P < 0.001$  versus el control estimulado (-); # $P < 0.001$  versus la proliferación basal de células sin tratamiento (Ctl) (ANOVA de dos vías, Tukey). Inhibición dosis-respuesta de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF+bFGF por: la Vi45-51 sujeta a una sustitución conservada por alanina de sus residuos (b); la Vi45-51, el tripéptido HGR y por la Vi45-51 sin la G47 (*des-G<sup>47</sup>*) (c). Los valores son relativos a los de las dosis más baja y alta de la curva de Vi45-51 como control positivo. \* $P < 0.001$  versus Vi45-51 (ANOVA de dos vías, Dunnett). Las curvas dosis-respuesta se ajustaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados ( $r^2 > 0.8$ ). Los valores son las medias  $\pm$  SD,  $n = 9$ .

Nuestros resultados se apoyaron en el hallazgo de que mutaciones puntuales por alanina de la R48 y de tanto la H46 como la R48 (H46A/R48A) de la vasoinhibina de 123 residuos resultaron en una pérdida total de su efecto antiangiogénico, mientras que la mutación solamente de la H46 hacia alanina produjo una reducción de la función (Figura 6). Estos resultados identifican al motivo HGR como el elemento esencial responsable de la actividad antiangiogénica de la vasoinhibina.

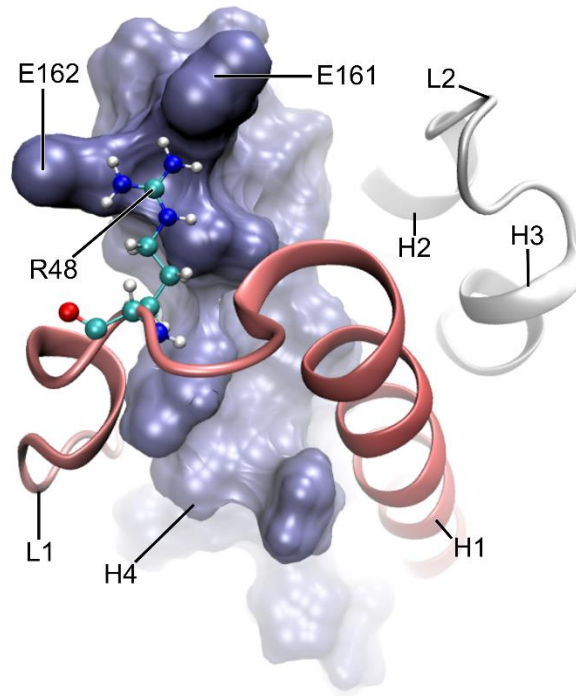


**Figura 6. El motivo HGR es el determinante antiangiogénico de la vasoinhibina.**

Inhibición dosis-respuesta de la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF+bFGF de la vasoinhibina de 123 aminoácidos (Vi) o las mutantes de vasoinhibina-alanina H46A, R48A o H46A/R48A. La mutación por alanina de la R48 y de ambas H46 y R48 (H46A/R48A) elimina por completo la actividad antiangiogénica de la vasoinhibina. Los valores son relativos a los de las dosis más baja y alta de la curva de Vi como control positivo. \* $P < 0.001$  versus Vi (ANOVA de dos vías, Dunnett). Las curvas dosis-respuesta se ajustaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados ( $r^2 > 0.8$ ). Los valores son las medias  $\pm$  SD,  $n = 9$ .

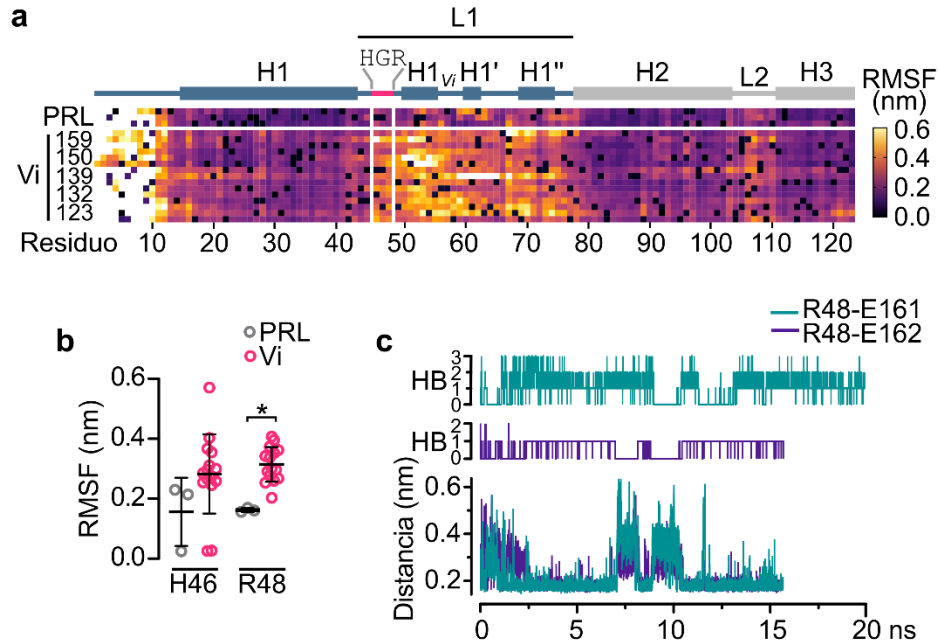
### 8.1.2. Mecanismo molecular que encripta al motivo HGR en la PRL.

El hecho de que la PRL no sea antiangiogénica<sup>3,5</sup> (Figura 3) implica que el motivo HGR está oculto en la estructura tridimensional de la PRL y se expone solamente después de la remoción proteolítica de la H4<sup>6,55</sup>. El análisis de la región donde se ubica el HGR en la estructura de la PRL humana<sup>6,55</sup> reveló que la R48 está en contacto con los ácidos glutámicos 161 y 162 (E161 y E162) (EE) localizados en la región amino terminal de la H4 (Figura 7).

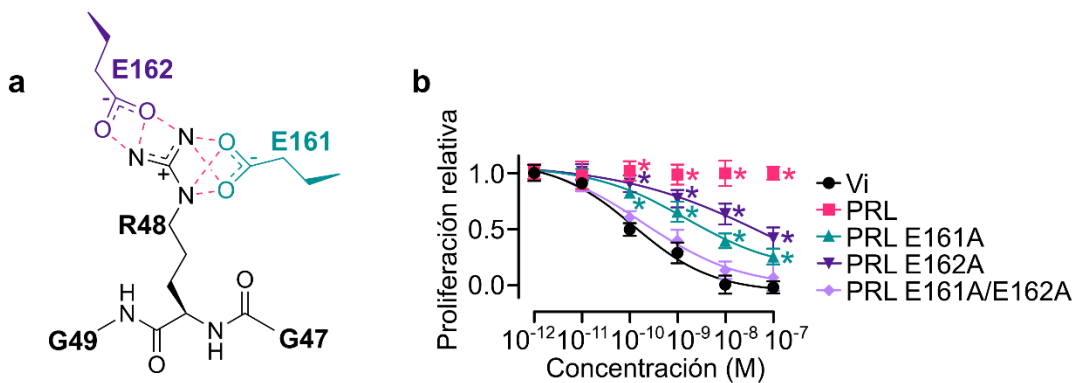


**Figura 7. Los residuos E161 y E162 de la PRL ocultan al motivo HGR.** Detalle de la interacción entre la R48 (bolas y palos) y el E161 y E162 en la región N-terminal de la  $\alpha$ -hélice 4 (H4) (superficie azul) de la PRL. La R48 está localizada en el loop 1 (L1) cerca de la  $\alpha$ -hélice 1 (H1) (listón rojo).

Debido a lo anterior, especulamos que la formación de puentes de sal formados por la carga positiva de la R48 y el potencial electrostático negativo del E161 y del E162 restringen la movilidad del motivo HGR previniendo así su exposición y actividad antiangiogénica en la PRL. De hecho, la simulación por DM mostró que la fluctuación de los residuos que se encuentran en el L1, incluyendo la H46 y la R48, es más alta en varias isoformas de vasoinhibina que en la PRL (Figura 8a y b), ya que en esta última la R48 forma hasta 3 o 2 puentes de hidrógeno con el E161 y el E162 a una distancia mínima, respectivamente (Figura 8c y Figura 9a). El papel del motivo EE sobre la restricción de la actividad antiangiogénica de la PRL se apoya en forma contundente por la demostración de que la eliminación de estas cadenas laterales ácidas mediante la sustitución por alanina de E161 y E162 confiere a la proteína propiedades antiangiogénicas (Figura 9b). Por lo tanto, concluimos que puentes de sal que se forman entre la R48 y el E161 y el E162 ocultan al motivo HGR en la PRL, haciéndola incapaz de inhibir la angiogénesis.



**Figura 8. La R48 se encuentra restringida por los residuos E161 y E162 de la PRL.** (a) Raíz de la fluctuación media cuadrática (RMSF) de los primeros 123 residuos de la PRL y de la vasoinhibina (Vi) de diferentes longitudes (159, 150, 139, 132 y 123 residuos) a través de 20 ns de simulación por dinámica molecular (DM). La localización del HGR,  $\alpha$ -hélices (H1-3) y loops (L1-2) están indicados arriba. (b) RMSF de la H46 y la R48 en la PRL y las isoformas de Vi. Los valores son la media  $\pm$  SD,  $n = 3-9$ ,  $*P = 0.042$  (ANOVA de dos vías, Bonferroni). (c) Formación de puentes de hidrógeno (HB) entre la R48 y el E161, y entre la R48 y el E162 en la PRL y su correlación con la distancia mínima entre los pares de residuos revelado por DM.



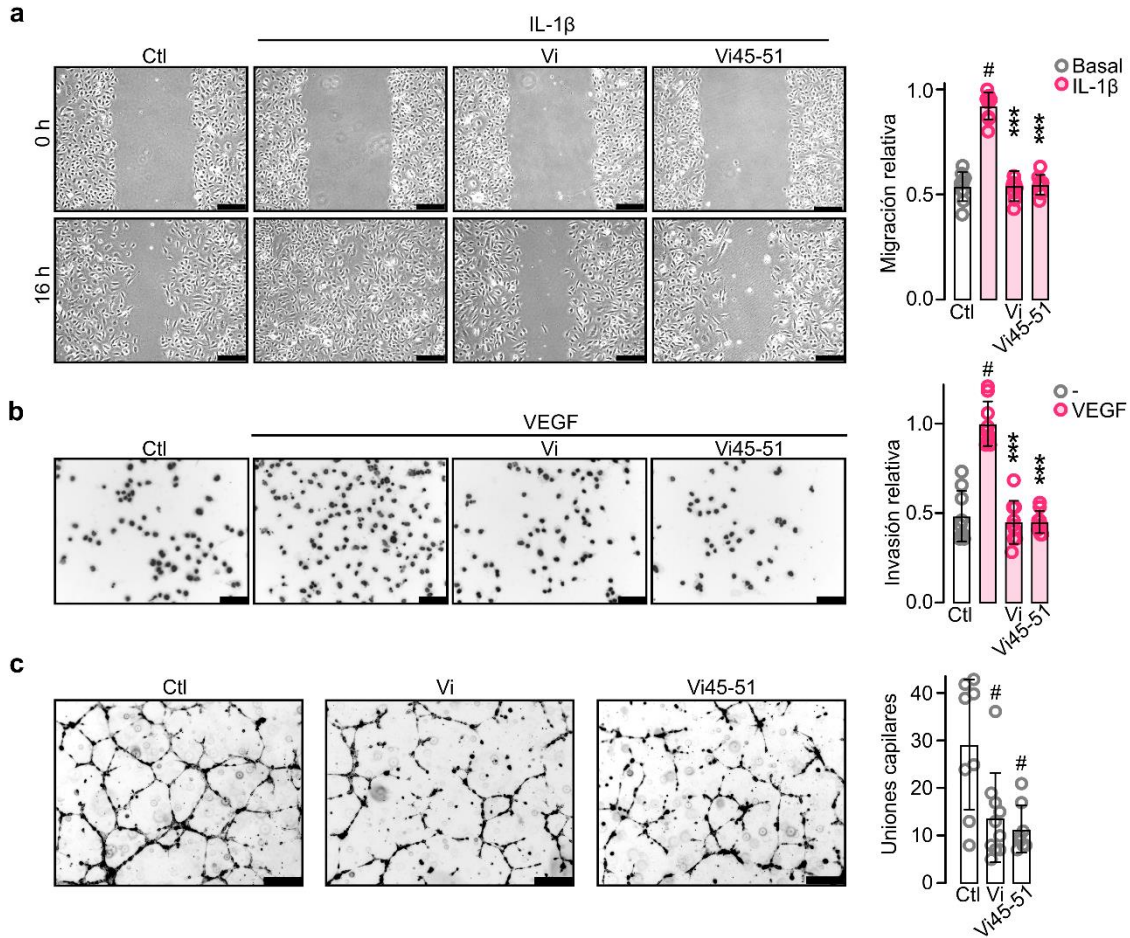
**Figura 9. La formación de puentes de sal entre la R48 y el E161 y el E162 oculta al motivo HGR en la PRL.** (a) Esquema molecular que muestra la posible presencia de 3

y 4 puentes de hidrógeno (líneas punteadas rojas) entre las cadenas laterales de la R48 y el E162 y E161, respectivamente. **(b)** Inhibición dosis respuesta por la vasoinhibina de 123 residuos (Vi), la PRL, o las mutantes de PRL donde el E161, el E162, o ambos E161 y E162 se reemplazaron por alanina, sobre la proliferación de HUVEC inducida por VEGF+bFGF. Los valores son las medias  $\pm$  SD, relativos a los de las dosis más baja y alta de la curva de Vi como control positivo.  $n= 9$ ,  $*P < 0.001$  versus Vi (ANOVA de dos vías, Dunnett). Las curvas dosis-respuesta se ajustaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados ( $r^2 > 0.9$ ).

### **8.1.3. El heptapéptido Vi45-51 que contiene al motivo HGR inhibe la angiogénesis y la permeabilidad vascular.**

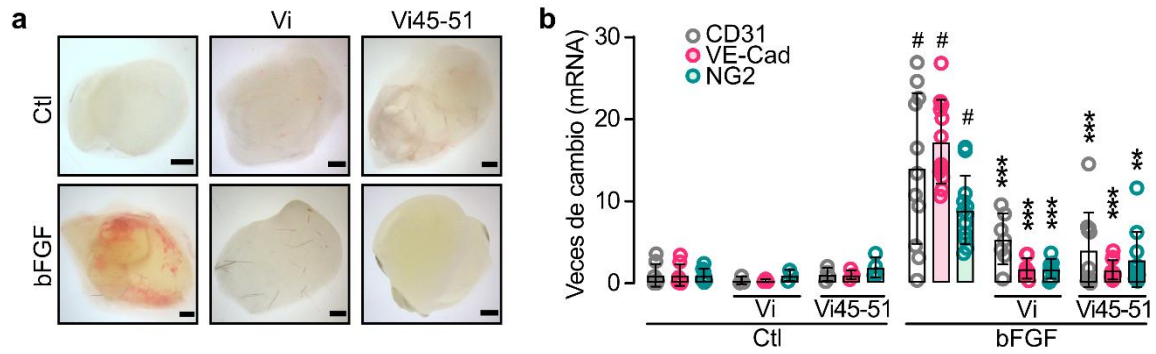
La angiogénesis es un proceso que involucra varias fases que incluyen la proliferación, la migración y la formación de estructuras tubulares por las células endoteliales, todas las cuales son inhibidas por la vasoinhibina<sup>3-5</sup>. Consistentemente con que el HGR es el determinante antiangiogénico de la vasoinhibina, la Vi45-51 inhibió la migración de células endoteliales inducida por la IL-1 $\beta$  (Figura 10a), así como la invasión endotelial inducida por VEGF (Figura 10b) y la formación de tubos endoteliales en una matriz tridimensional de Matrigel (Figura 10c). Además, la Vi45-51 inhibió el proceso completo de la angiogénesis que tiene lugar *in vivo*, pues bloqueó la invasión de vasos sanguíneos inducida por el factor angiogénico bFGF presente en implantes de Matrigel colocados subcutáneamente en el ratón (Figura 11).

La vasoinhibina también inhibe la excesiva permeabilidad vascular presente en enfermedades como el edema macular diabético, la retinopatía diabética<sup>74-76</sup> y la artritis inflamatoria<sup>15</sup>. Al igual que la vasoinhibina<sup>75,76</sup>, la Vi45-51 bloqueó la hiperpermeabilidad de monocapas de células endoteliales inducida por VEGF, la cual se evaluó mediante la distribución del citoesqueleto de actina (Figura 12a), la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) (Figura 12b) y el paso de azul de Evans acoplado a albúmina (Figura 12c).

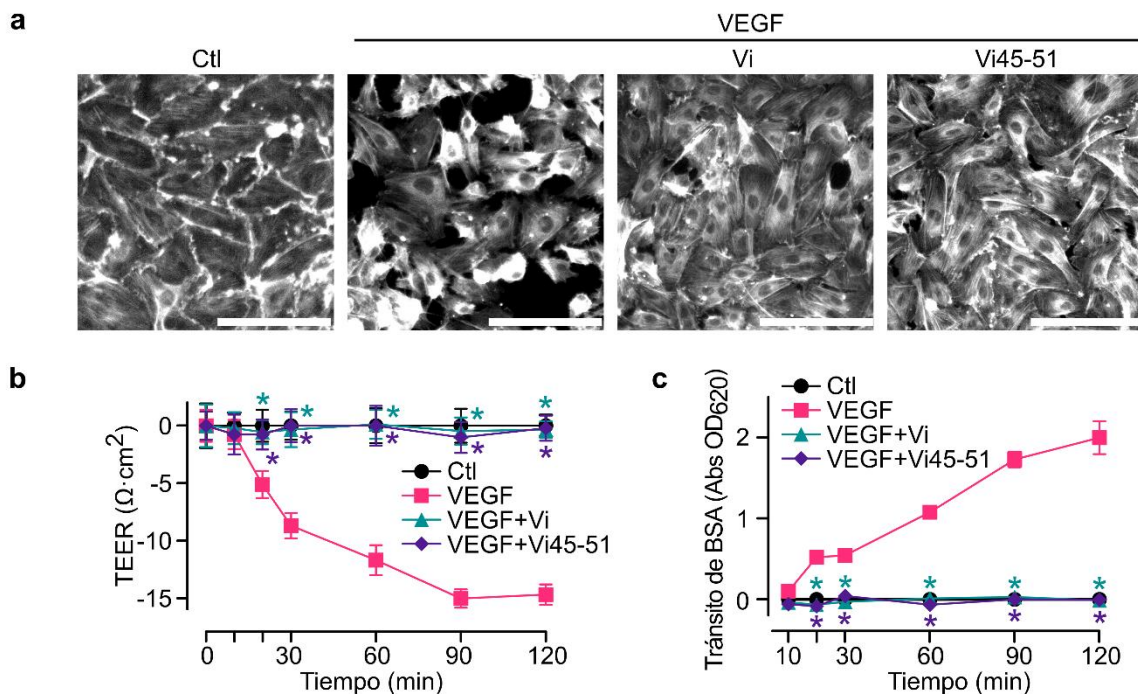


**Figura 10. El heptapéptido Vi45-51 que contiene al motivo HGR inhibe la angiogénesis *in vitro*.** (a) Monocapas de células HUVEC a las 0 y 16 horas después de realizar una herida en ausencia (Ctl) o presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) sola o en combinación con 100 nM de la vasoinhibina de 123 residuos (Vi) o la Vi45-51. Los valores representan el área ocupada por las células migrantes relativa al área inicial de la herida. (b) Inhibición de la invasión de HUVEC a través de una matriz de Matrigel por 100 nM de Vi o la Vi45-51. VEGF (50 ng ml<sup>-1</sup>) se usó como quimioatrayente. Los valores son el número de células invasoras relativas a aquellas tratadas solamente con VEGF. (c) Inhibición de la formación de tubos por células HUVEC por 200 nM de Vi o la Vi45-51 cuantificada a través del número de uniones capilares. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus el control estimulado, # $P < 0.01$  versus el Ctl. Los valores son las medias  $\pm$  SD,  $n = 9$ , comparados por un ANOVA de dos vías-Dunnett. La barra de escala indica 300  $\mu$ m.





**Figura 11. El heptapéptido Vi45-51 que contiene al motivo HGR inhibe la angiogénesis *in vivo*.** (a) Implantes de Matrigel sin (Ctl) o con bFGF conteniendo o no a la vasoinhibina de 123 aminoácidos o a la Vi45-51 después de 6 días de que ser colocados subcutáneamente en el ratón. (b) Expresión del mRNA de los marcadores de células endoteliales (CD-31 y VE-Cad) y de pericitos (NG2) en los implantes de Matrigel. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus bFGF; # $P < 0.001$  versus Ctl (ANOVA de dos vías, Dunnett).



**Figura 12. El heptapéptido Vi45-51 que contiene al motivo HGR inhibe la permeabilidad vascular *in vitro*.** Efecto del VEGF o del VEGF en combinación con 100 nM de la vasoinhibina de 123 aminoácidos (Vi), o del heptapéptido Vi45-51 sobre:

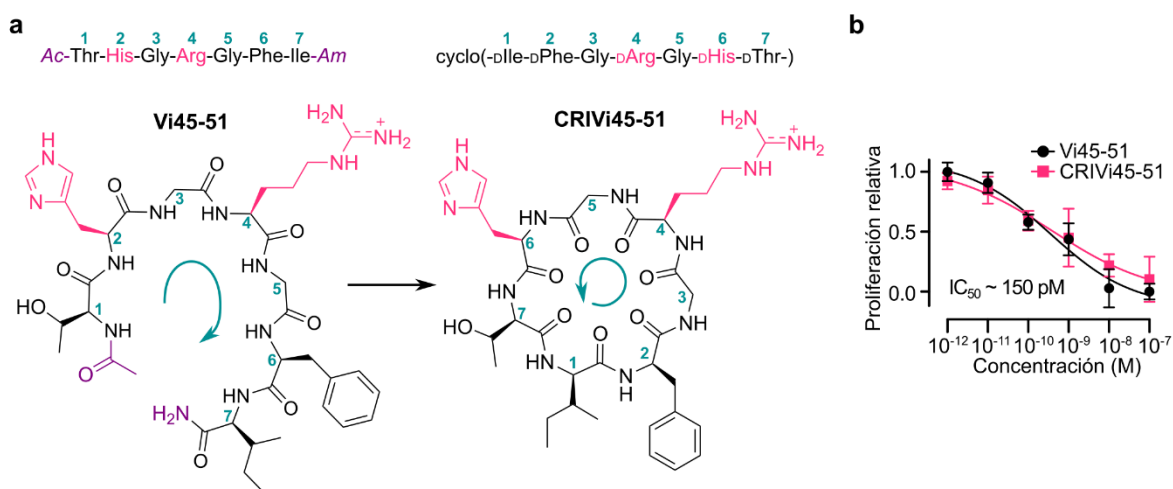
(a) la distribución del citoesqueleto de actina, (b) la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$  VEGF) y (c) el flujo de azul de Evans acoplado a albúmina (BSA) ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$  VEGF), en monocapas de células HUVEC.  $*P < 0.001$  versus VEGF. Los valores son las medias  $\pm$  SD,  $n = 9$ , comparados por ANOVA de dos vías-Dunnnett. La barra de escala indica  $300 \mu\text{m}$ .

En conjunto, nuestros resultados indican que el motivo HGR es el elemento estructural común responsable de las acciones vasculares de la vasoinhibina y que oligopéptidos que contienen al HGR poseen relevancia potencial para el tratamiento de enfermedades que dependen de la angiogénesis y de la excesiva permeabilidad vascular. Sin embargo, la comparación entre datos *in vitro* e *in vivo* no proporciona información sobre la relevancia de una intervención terapéutica, a menos que se cuente con los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos que sirvan para establecer el vínculo entre ambos ensayos.

## 8.2. Optimización y caracterización del análogo de la vasoinhibina para su aplicación terapéutica.

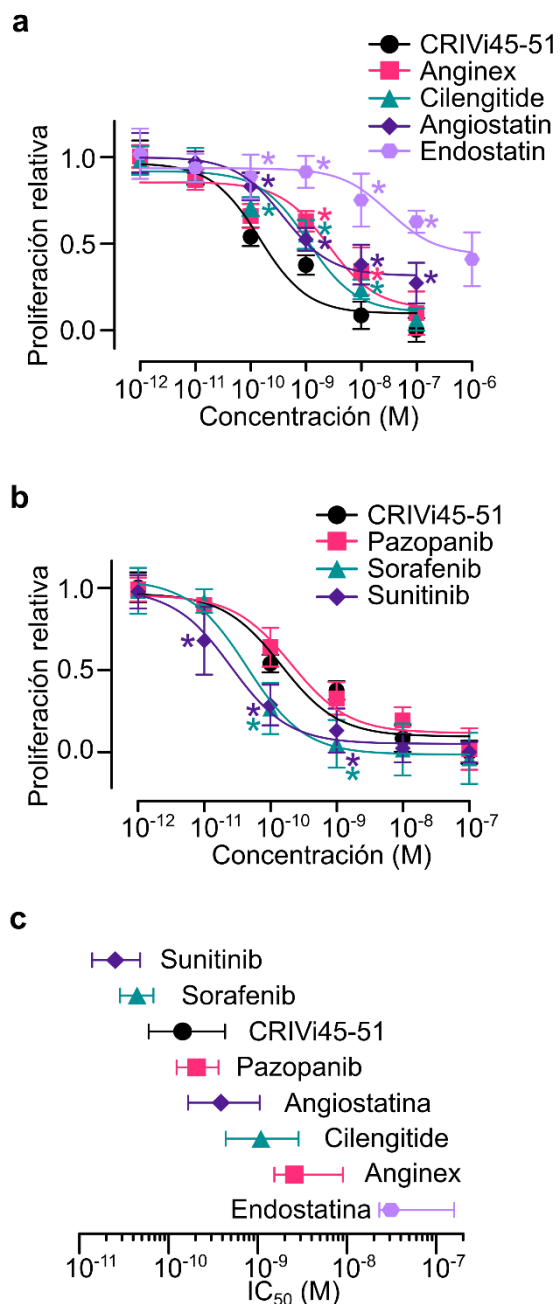
### 8.2.1. La administración oral de un heptapéptido cíclico retro-inverso que contiene al motivo HGR reduce el crecimiento y la vascularización tumoral.

En términos generales, los péptidos tienen una aplicación terapéutica limitada debido a su baja estabilidad y biodisponibilidad oral<sup>30</sup>; sin embargo, las sustituciones con D-aminoácidos y la ciclación de su secuencia pueden superar estas limitaciones<sup>77</sup>. La Vi45-51 se optimizó hacia un péptido cíclico retro-inverso (CRIVi45-51) compuesto por D-aminoácidos ensamblados en el orden inverso de su secuencia nativa para conservar la configuración de sus cadenas laterales, al mismo tiempo que se le confiere resistencia a la proteólisis (Figura 13a). El CRIVi45-51 inhibió la proliferación de células endoteliales con una potencia similar ( $IC_{50} \sim 150$  pM) a la de la Vi45-51 (Figura 13b).



**Figura 13. Optimización y caracterización del heptapéptido Vi45-51 hacia su versión cíclica retro-inversa con D-aminoácidos (CRIVi45-51).** (a) La Vi45-51 está conformada por L-aminoácidos, acetilada (Ac) y amidada (Am) en los extremos N- y C- terminal, respectivamente. CRIVi45-51 se compone de D-aminoácidos ciclados y ensamblados en orden inverso. Los números indican los carbonos  $\alpha$  y las flechas verdes el sentido de la síntesis. Nótese que se conserva la configuración de las cadenas laterales del motivo HGR (magenta) en los dos heptapéptidos. (b) Inhibición dosis-respuesta de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF+bFGF por la Vi45-51 o CRIVi45-51. CRIVi45-51 tiene la misma potencia ( $IC_{50} \sim 150$  pM) para inhibir la angiogénesis que

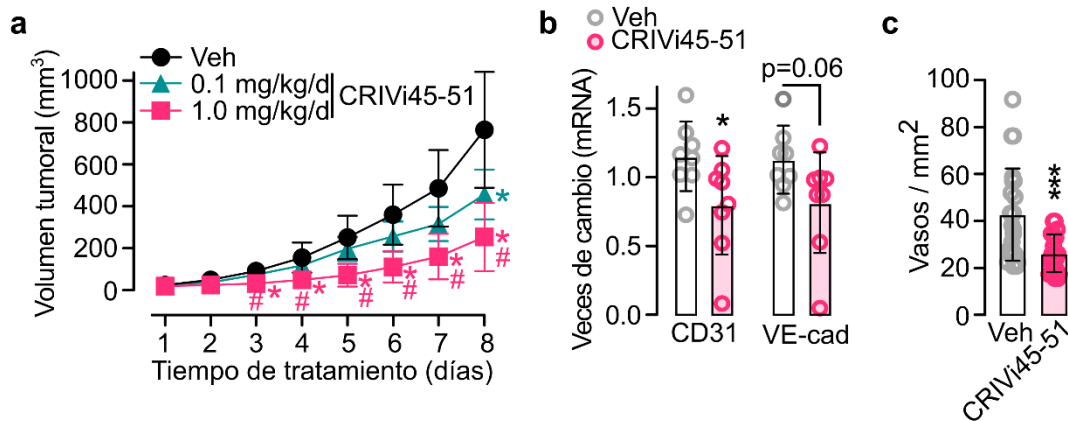
la Vi45-51. Todos los valores son la media  $\pm$  SD,  $n = 9$ . (ANOVA de dos vías, Dunnett). Las curvas dosis-respuesta se ajustaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados ( $r^2 > 0.9$ ).



**Figura 14. Potencia del CRiVi45-51 comparada con la de otros fármacos anticancerígenos y antiangiogénicos.** Inhibición dosis-respuesta de la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF+bFGF (**a** y **b**) y los respectivos valores de IC<sub>50</sub> (**c**) de CRiVi45-51, las proteínas antiangiogénicas (angiostatina y endostatina), los péptidos antiangiogénicos (anginex, cilengitide) y los inhibidores de los receptores de tirosin-

cinasa (pazopanib, sorafenib, sunitinib).  $*P < 0.001$  versus CRiVi45-51, ANOVA de dos vías-Dunnett. La proliferación de las HUVEC es relativa a la de las dosis más baja y alta del tratamiento con CRiVi45-51 como control positivo de inhibición. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron por mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados ( $r^2 > 0.7$ ). Todos los valores son las medias  $\pm$  SD,  $n = 9$ .

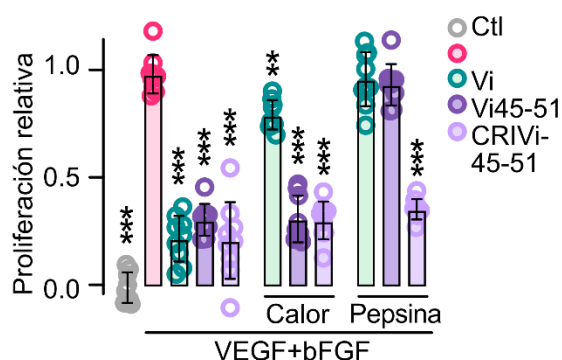
Además, el CRiVi45-51 mostró una potencia mayor para inhibir la proliferación de células endoteliales que otras proteínas antiangiogénicas (endostatina y angiostatina) y péptidos antiangiogénicos (anginex y cilengitide) evaluados en ensayos clínicos<sup>29</sup>; su potencia es similar a la del antiangiogénico inhibidor de los receptores de tirosin-cinasa pazopanib, y más baja que la de los inhibidores de dichos receptores multi-blanco sunitinib y sorafenib, los cuales fueron discontinuados de ensayos clínicos en cáncer debido a su toxicidad excesiva<sup>78</sup> (Figura 14).



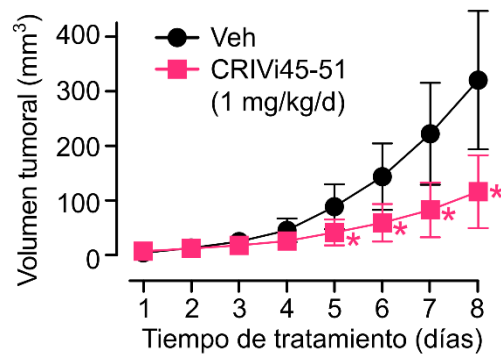
**Figura 15. La administración intravenosa de CRiVi45-51 reduce el crecimiento y la vascularización tumoral.** (a) Curvas de crecimiento de tumores de células de melanoma B16-F10 inoculadas intradérmicamente en ratones inyectados intravenosamente con vehículo (Veh) o con diferentes dosis de CRiVi45-51 después de la aparición del tumor.  $*P < 0.002$  versus Veh,  $\#P < 0.002$  versus  $0.1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . ANOVA de dos vías-Dunnett. (b) Expresión de mRNA de marcadores de células endoteliales (CD-31 y VE-Cad) y densidad vascular (c) en tumores.  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  versus Veh. Todos los valores son la media  $\pm$  SD,  $n = 9$ . Prueba de t no pareada.

La inhibición de la angiogénesis por la vasoinhibina suprime el crecimiento de tumores de colon, próstata y melanoma<sup>68,79,80</sup>. Dadas sus propiedades antiangiogénicas y mayor estabilidad, el CRiVi45-51 puede ser un compuesto anticancerígeno muy atractivo. Ratones C57BL/6 se inyectaron intradérmicamente con células de melanoma B16-F10 y después de la aparición del tumor, se sometieron a inyecciones intravenosas diarias de CRiVi45-51. Encontramos que CRiVi45-51 redujo el crecimiento tumoral de manera dependiente de la dosis, y este efecto (Figura 15a) se asoció con una angiogénesis reducida. El CRiVi45-51 no inhibió el crecimiento de células de melanoma *in vitro* (resultados no mostrados), pero sí redujo la densidad vascular tumoral y la expresión de CD31 (Figura 15 b y c).

Enseguida evaluamos si efectivamente la configuración espacial absoluta de CRiVi45 compuesto por D-aminoácidos le confirió mayor estabilidad y resistencia. Observamos que tanto la Vi45-51 como CRiVi45-51 mantuvieron su actividad antiangiogénica después de su inactivación por calor, pero que solamente el CRiVi45-51 fue resistente a la degradación por pepsina (Figura 16) lo cual apoya la administración oral de CRiVi45-51. Efectivamente, la administración oral del CRiVi45-51 disminuyó el crecimiento tumoral con una eficacia similar a la de su administración intravenosa (Figura 17), lo cual indica sus propiedades farmacológicas mejoradas.



**Figura 16. CRiVi45-51 es resistente a la degradación por calor y pepsina.** Inhibición de la proliferación de células HUVEC inducida por VEGF+bFGF por 10 nM de la vasoinhibina de 123 residuos (Vi), la Vi45-51 o CRiVi45-51 antes o después de su inactivación con calor o de su incubación con pepsina. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus VEGF+bFGF solos. (ANOVA de dos vías, Dunnett). Todos los valores son la media  $\pm$  SD,  $n = 9$ .



**Figura 17. La administración oral de CRiVi45-51 reduce el crecimiento tumoral.**

Curvas de crecimiento de tumores de células de melanoma B16-F10 en ratones después de la administración oral de vehículo (Veh) o de CRiVi45-51 posterior a la aparición del tumor. \* $P < 0.001$  versus Veh, ANOVA de dos vías-Dunnett. Todos los valores son la media  $\pm$  SD,  $n = 9$ .

### **8.3. Implicaciones fisiológicas del determinante funcional de la vasoinhibina.**

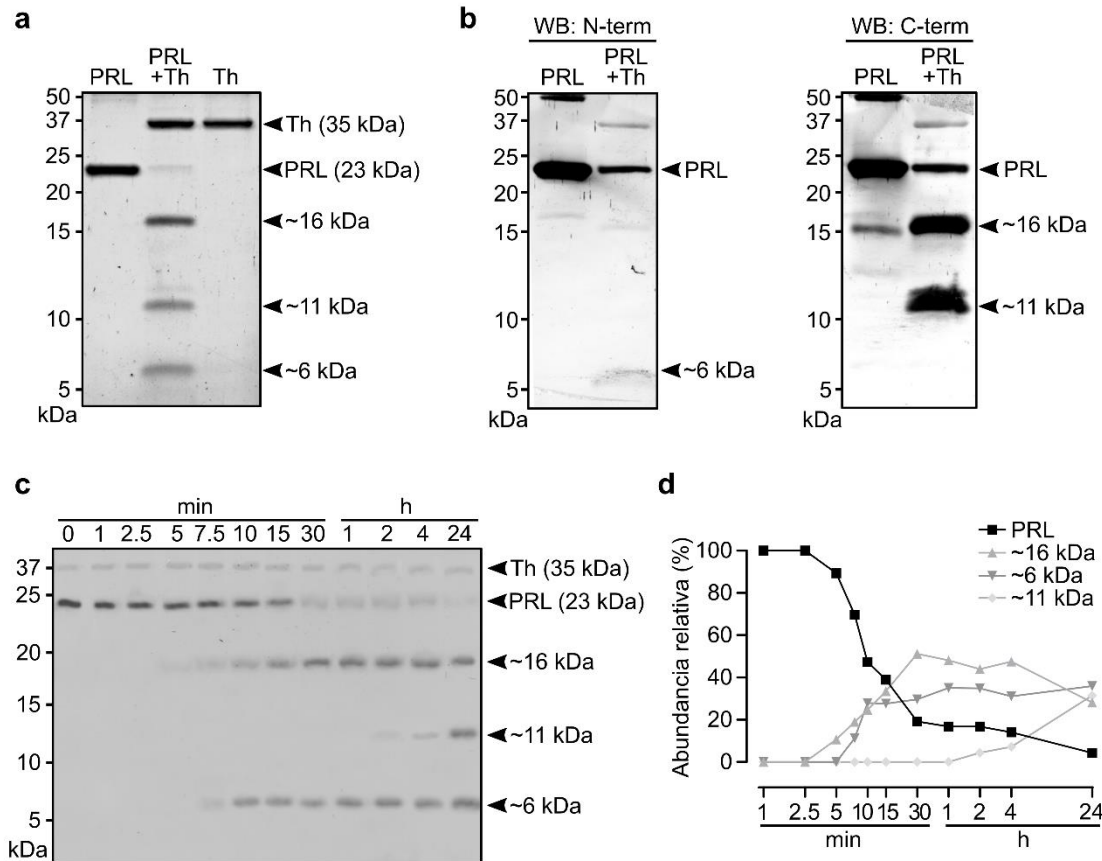
Además de su relevancia terapéutica, la identificación del determinante funcional de la vasoinhibina tiene importantes implicaciones fisiológicas ya que sugiere la posible existencia de vasoinhibinas endógenas más pequeñas a las ya reportadas. Hasta ahora se sabe que las proteasas generadoras de la vasoinhibina (catepsina D<sup>7</sup>, las metaloproteinasas de matriz<sup>8</sup> y la proteína morfogenética de hueso 1<sup>9</sup>) cortan a la PRL a lo largo del loop 3 que conecta la H3 con la H4. Sin embargo, dados nuestros hallazgos, ahora sabemos que cualquier proteasa que corte a la PRL después del motivo HGR y remueva al motivo EE de la PRL, tiene el potencial de generar una vasoinhibina.

Hace más de veinte años se estudió a la trombina, enzima central en la coagulación, como una proteasa generadora de la vasoinhibina; sin embargo, se descartó esta posibilidad ya que la trombina cortó a la PRL entre los aminoácidos Lys53 y Ala54 (K53-A54) para generar un fragmento C-terminal (aminoácidos 54-199) de 16.8 kDa, que se reportó sin actividad antiangiogénica<sup>81</sup>. Sin embargo, en esa ocasión el fragmento N-terminal remanente de 6.2 kDa (aminoácidos 1-53) no se identificó ni se investigó su bioactividad. Dicha omisión es relevante, pues ahora sabemos que el determinante funcional de la vasoinhibina comprende sólo tres residuos (His46-Gly47-Arg48)<sup>19</sup> presentes en el fragmento N-terminal remanente de 6.2 kDa. Tomando esto como base, indagamos si el fragmento N-terminal generado por trombina corresponde a una vasoinhibina y obtuvimos los siguientes resultados:

#### **8.3.1. La trombina corta a la PRL rápidamente y genera un fragmento N-terminal de ~6 kDa.**

Para determinar si la trombina genera a la vasoinhibina, incubamos PRL humana con trombina y los productos proteolíticos se evaluaron mediante SDS PAGE-tricina teñidos para proteína total. La trombina generó un fragmento de ~16 kDa, el cual ya había sido reportado previamente<sup>81</sup>, así como su contraparte esperada de ~6 kDa y un fragmento adicional de ~11 kDa que no había sido descrito (Figura 18a).



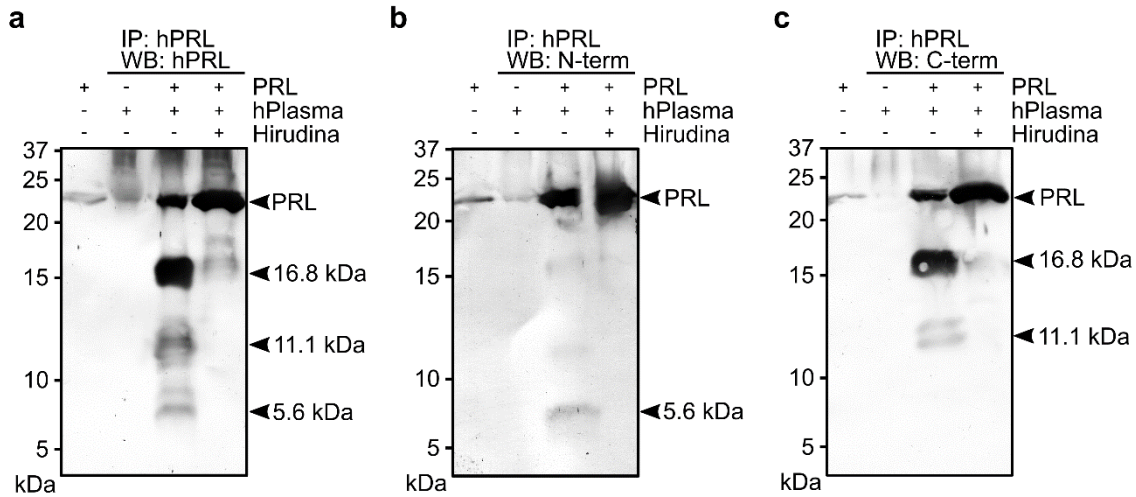


**Figura 18. La trombina corta a la PRL rápidamente generando un fragmento N-terminal de ~6 kDa.** Se incubaron durante 24 horas 2  $\mu\text{g}$  de PRL con 1  $\mu\text{g}$  de trombina (Th) y los productos proteolíticos se evaluaron por SDS PAGE-tricina y se tiñeron para proteína total (**a**) o se analizaron por Western blot (**b**) con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región N- o C- terminal de la PRL. La PRL y la Th se incubaron independientemente como controles de la reacción de corte. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares de las proteínas marcadoras. (**c**) SDS PAGE-tricina teñido con azul de Coomassie para proteína total de los fragmentos de PRL generados a diferente tiempo de incubación con la trombina (cada punto en el tiempo representa una incubación diferente). (**d**) Densitometría de los fragmentos de PRL generados a través del tiempo, relativa a la PRL incubada con Th al tiempo cero. La escala del tiempo en el eje X se indica en logaritmo base 10. Los resultados se confirmaron con 3 experimentos independientes.

La identidad de dichos fragmentos se investigó mediante Western blot utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región N- o C-terminal de la PRL (Figura 18b). Los Western blots confirmaron la naturaleza N- y C-terminal de los fragmentos de ~6 kDa y ~16 kDa, respectivamente. El fragmento de ~11 kDa correspondió a la región C-terminal de la PRL, lo que indica que posiblemente la trombina corta a la PRL justo a la mitad de la molécula, aunque la contraparte complementaria N-terminal de ~11 kDa no se detectó (Figura 18b). Un análisis a través del tiempo mostró que los fragmentos de ~6 y ~16 kDa se generan muy rápidamente ya que son detectados a los 7.5 minutos post-incubación con trombina (Figura 18c). En cambio, la tasa de generación del fragmento de ~11 kDa fue mucho más lenta y empezó a detectarse hasta las 2 horas post-incubación con trombina. La disminución y el aumento concomitantes de los fragmentos de ~16 kDa y ~11 kDa, respectivamente, observado entre las 4 y 24 horas (Figura 18d), sugirió que el fragmento de ~16 kDa es el precursor del fragmento de ~11 kDa.

### **8.3.2. El fragmento de PRL N-terminal de ~6 kDa se genera por la trombina endógena durante la coagulación.**

Para apoyar la relevancia fisiológica de la generación del fragmento de PRL N-terminal de ~6 kDa, investigamos si dicho proceso ocurría de manera endógena durante la coagulación. Para ello, agregamos PRL a plasma humano e indujimos su coagulación *in vitro*, en ausencia o presencia del inhibidor específico de la trombina, hirudina. Una inmunoprecipitación seguida de Western blot mostró que la PRL fue cortada parcialmente hacia el fragmento N-terminal de ~6 kDa y hacia los fragmentos C-terminales de ~11 y 16 kDa, el patrón esperado de corte de la trombina. En cambio, la hirudina previno el corte de la PRL durante el proceso de coagulación (Figura 19). Estos resultados sugieren que el fragmento N-terminal de ~6 kDa se genera durante la formación del coágulo y, de ser una vasoinhibina, podría ser parte de los mecanismos por los cuales la trombina regula la coagulación y la reparación de tejidos.

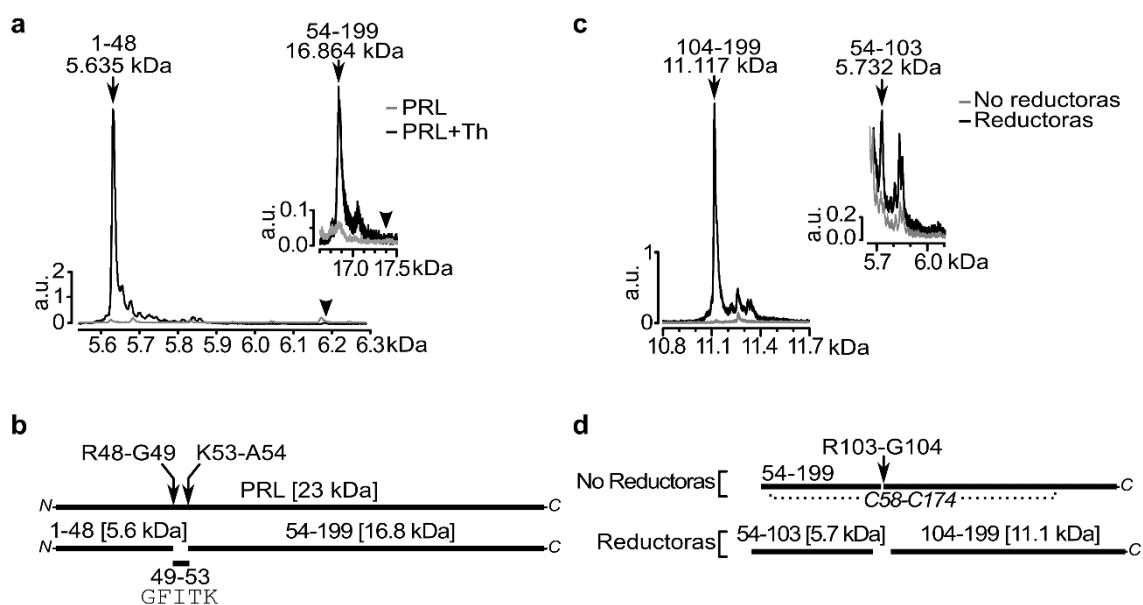


**Figura 19. El fragmento de PRL N-terminal de ~6 kDa se genera por la trombina endógena durante la coagulación.** PRL humana se añadió (+) o no (-) durante la coagulación de plasma humano (hPlasma) en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor de la trombina, hirudina. Los productos proteolíticos de la PRL se inmunoprecipitaron (IP) con antisuero anti-PRL y se resolvieron por (a) Western blot en condiciones reductoras (WB) contra antisuero anti-PRL; (b) anticuerpos monoclonales contra el extremo N-terminal o (c) C-terminal de la PRL. Se indica el peso molecular aproximado. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares de las proteínas marcadoras. El peso molecular estimado de los fragmentos indicados se indica (cabeza de flecha).

### 8.3.3. El fragmento de 5.6 kDa (~6 kDa) corresponde a los residuos 1 al 48 de la prolactina.

Un análisis de espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF determinó la masa molecular exacta de los fragmentos de PRL generados por trombina. El fragmento 6.2 kDa (residuos 1 al 53) esperado del estudio previo que reportó que la trombina corta a la PRL entre la K53-A54<sup>81</sup>, no fue observado. En su lugar, observamos un fragmento que va de los residuos 1 al 48 con una masa molecular exacta de 5.635 kDa (Figura 20a), lo que indica que el sitio de corte ocurre entre los residuos R48-G49 (Figura 20b). Sin embargo, el fragmento de ~16 kDa sí coincidió con el reportado previamente<sup>81</sup>, y comprendió de los residuos 54 al 199 con una masa molecular de 16.864 kDa (Figura 20a), lo cual confirmó el sitio de corte

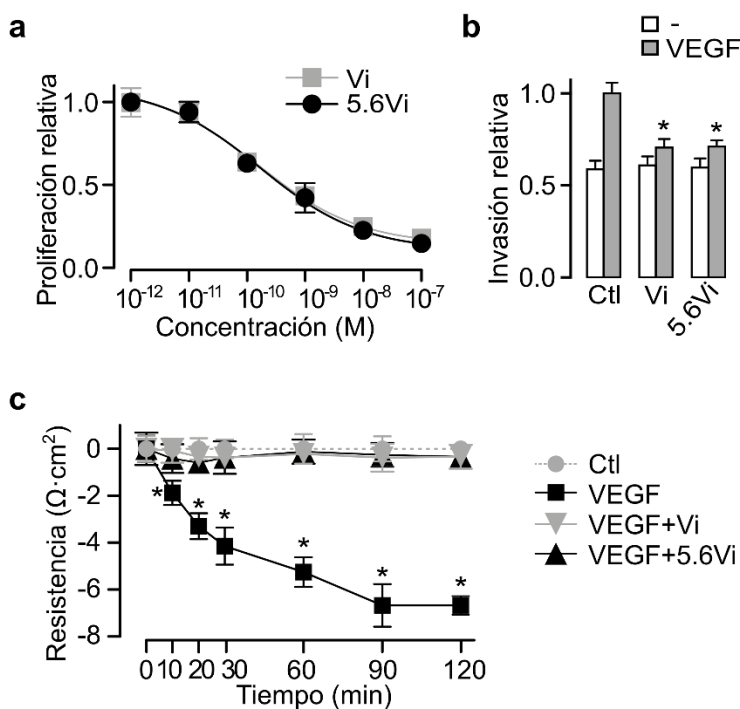
entre K53-A54. Por lo tanto, la trombina cortó a la PRL en ambos sitios (R48-G49 y K53-A54), lo cual resultó en la liberación de un péptido de 5 aminoácidos (residuos 49 al 53) (Figura 20b). Además, un sitio de corte previamente no identificado se encontró entre R103-G104, el cual corta al fragmento que va del residuo 54 al 199 hacia fragmentos de 11.117 kDa (residuos 104-199) y 5.732 kDa (residuos 54-103) (Figura 20 c y d). Este patrón de corte confirmó que el fragmento de 16.8 kDa es el precursor del fragmento de 11.1 kDa. Como se esperaba por la localización del enlace disulfuro entre C58-C174, los fragmentos de 11.1 y 5.7 kDa sólo se detectaron bajo condiciones reductoras (Figura 20d), mientras que el fragmento que va del 1 al 48 se detectó sin necesidad de reducción (Figura 20a).



**Figura 20. La trombina corta a la PRL entre la R48 y la G49 para generar al fragmento N-terminal de 5.6 kDa (~6 kDa).** (a) El espectro de MALDI-TOF bajo condiciones no reductoras indica (flechas) fragmentos de 5.635 kDa y 16.864 kDa los cuales comprenden los aminoácidos 1 al 48 y 54 al 199 de la PRL, respectivamente. (b) Diagrama que muestra los sitios de corte de la trombina (Th) en R48-G49 y K53-A54 en la PRL y los fragmentos resultantes, así como el pentapéptido liberado correspondiente a los aminoácidos 49 al 53 de la PRL. (c) Espectro de MALDI-TOF que muestra los fragmentos que van de los aminoácidos 104 al 199 y del 54 al 103 que sólo fueron visibles bajo condiciones reductoras. (d) Diagrama que muestra la localización del sitio de corte de la Th en R103-G104 en el fragmento 54-199. El enlace disulfuro que va del aminoácido C58 al C174, y los fragmentos resultantes después de su reducción están indicados.

### 8.3.4. El fragmento N-terminal de 5.6 kDa (48 aminoácidos) generado por trombina es una vaso inhibidora.

Enseguida evaluamos la actividad de vaso inhibidora del fragmento N-terminal de 5.6 kDa generado por trombina. Encontramos que dicho fragmento inhibió la proliferación inducida por VEGF+bFGF de células endoteliales en cultivo con la misma potencia ( $IC_{50} \sim 150$  pM) que la de la vaso inhibidora convencional de 123 aminoácidos (Figura 21a), lo cual indica que el fragmento N-terminal de 5.6 kDa es una vaso inhibidora. Asimismo, confirmamos que la vaso inhibidora de 5.6 kDa conserva las propiedades de la vaso inhibidora para inhibir la invasión de células endoteliales estimulada por VEGF a través de una matriz de Matrigel (Figura 21b), y mediante la medición de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) se observó que, al igual que la vaso inhibidora estándar, la vaso inhibidora de 5.6 kDa inhibió la vasopermeabilidad inducida por VEGF de una monocapa de células HUVEC (Figura 21c). Nuestros hallazgos indican que la vaso inhibidora de 5.6 kDa, correspondiente a los primeros 48 aminoácidos de la vaso inhibidora, conserva la potencia y propiedades de la vaso inhibidora para inhibir la angiogénesis y la permeabilidad vascular.



**Figura 21. El fragmento de PRL N-terminal de 5.6 kDa es una vaso inhibidora. (a)** Inhibición dosis-respuesta de la proliferación de HUVEC inducida por VEGF+bFGF

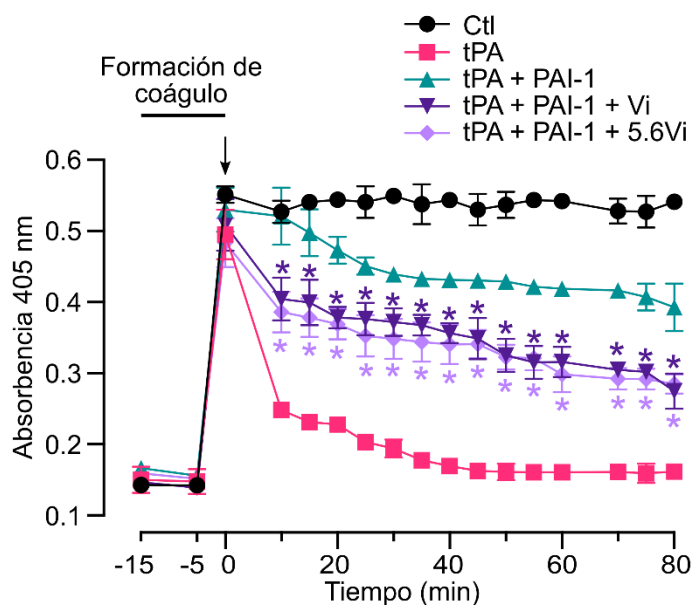
por la vasoinhibina de 123 residuos (Vi) y la vasoinhibina de 5.6 kDa generada por trombina (5.6Vi). La proliferación de las HUVEC es relativa a la de las dosis más baja y alta del tratamiento con Vi como control positivo de inhibición. Los valores son las medias  $\pm$  SD,  $n= 9$ . Las curvas dosis-respuesta se ajustaron mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados ( $r^2>0.96$ ). **(b)** Inhibición de la invasión de células HUVEC inducida por VEGF a través de una matriz de Matrigel por la Vi y la 5.6Vi. Los valores son relativos a la estimulación por VEGF y representan la media  $\pm$  SD.  $*P < 0.001$  versus el Ctl,  $n= 9$ , ANOVA de dos vías-Tukey. **(c)** Efecto a través del tiempo del VEGF o de VEGF+Vi o de VEGF+5.6Vi sobre la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) de una monocapa de HUVEC.  $*P < 0.001$  versus el Ctl,  $n= 9$ , ANOVA de dos vías-Dunnett.

### **8.3.5. La vasoinhibina de 5.6 kDa generada por trombina es profibrinolítica.**

Adicionalmente a sus efectos inhibitorios sobre la angiogénesis y la permeabilidad vascular, la vasoinhibina tiene un efecto profibrinolítico al originar un aumento en la producción de plasmina, enzima responsable de digerir al coágulo sanguíneo. Esto lo hace a través de unirse al inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en la circulación y así bloquear su acción<sup>31</sup>.

Para determinar si la vasoinhibina de 5.6 kDa conserva los efectos antagónicos de la vasoinhibina sobre la coagulación inducida por trombina, evaluamos su efecto profibrinolítico mediante la lisis *in vitro* de un coágulo de fibrina formado a partir de plasma humano (Figura 22). Una vez que el coágulo se formó (tiempo cero), la adición del agente profibrinolítico, tPA, promovió la lisis del coágulo, y este efecto se previno por la coadición de PAI-1. Más aún, la inhibición de PAI-1 fue contrarrestada tanto por la vasoinhibina de 5.6 kDa como por la vasoinhibina estándar (Figura 22). Estos hallazgos indican que la vasoinhibina de 5.6 kDa generada por trombina inhibe el efecto procoagulante de la trombina, demostrando que conserva las propiedades profibrinolíticas de la vasoinhibina convencional.

Este resultado aunado a que la Vi de 5.6 kDa se genera por la trombina endógena durante la coagulación del plasma (Figura 19), abre la posibilidad de que esta vasoinhibina pequeña podría ser parte de los mecanismos por los cuales la trombina regula negativamente sus efectos sobre la coagulación, la angiogénesis y la vasopermeabilidad, introduciendo así una nueva esfera de acción para la vasoinhibina en el concepto de la reparación de tejidos. Pues parece ser que la vasoinhibina y la trombina tienen efectos antagónicos sobre los mismos procesos. Ya que mientras la vasoinhibina inhibe la angiogénesis<sup>3</sup> y la permeabilidad vascular<sup>74-76</sup>, y promueve la fibrinólisis<sup>31</sup>; la trombina estimula la angiogénesis<sup>82,83</sup> y la permeabilidad vascular<sup>84</sup>, y promueve la coagulación<sup>85,86</sup>. Por lo que no resulta descabellado pensar que la generación de la vasoinhibina de 5.6 kDa por trombina es parte de un mecanismo de retroalimentación negativa de la trombina para autorregular sus funciones en el contexto de la reparación de heridas.



**Figura 22. La vasoinhibina de 5.6 kDa es profibrinolítica.** El coágulo formado a partir del plasma humano se lisó al tiempo 0 con el activador tisular del plasminógeno (tPA) ± el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) en presencia o ausencia de la vasoinhibina de 123 residuos (Vi) o la vasoinhibina de 5.6 kDa (5.6Vi). La lisis del coágulo se monitoreó mediante la absorbancia medida a 405 nm, \* $P < 0.001$  versus el tPA+PAI-1,  $n = 3$ , ANOVA de dos vías-Dunnett.

## 9. Discusión

La vasoinhibina es un inhibidor natural de la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Está presente en diversas estructuras (hipotálamo, pituitaria, retina, corazón, cartílago) y fluidos corporales (suero, líquido subretiniano, líquido amniótico, orina) donde se ha propuesto su participación en el mantenimiento del estado quiescente de la vasculatura<sup>3</sup>. Esta contribución es particularmente relevante en órganos y tejidos donde la angiogénesis está altamente restringida. Por ejemplo, varias estructuras del ojo (córnea, cristalino, vítreo y cara externa de la retina) no se vascularizan lo que proporciona la transparencia necesaria para la visión. La inmunoneutralización local de la vasoinhibina produce angiogénesis en la córnea<sup>87</sup> y en la retina<sup>72</sup> y conlleva a la supervivencia del sistema vascular hialoideo que irriga los tejidos oculares fetales<sup>88</sup>. Asimismo, el cartílago es avascular y contiene isoformas de vasoinhibina que son generadas por múltiples metaloproteinasas locales<sup>8</sup>. Además de generar conocimiento sobre la fisiología de los procesos de vascularización, existe un gran interés por estudiar a los factores antiangiogénicos, como la vasoinhibina, debido a sus importantes implicaciones en el control de las enfermedades angiogénico-dependientes.

Un obstáculo importante para el desarrollo terapéutico de la vasoinhibina ha sido la falta de suficiente proteína funcional. Las modificaciones postraduccionales, el plegamiento de la proteína, la inestabilidad y la agregación complican la producción recombinante de la vasoinhibina<sup>18</sup>. La terapia génica utilizando vectores adenovirales o liposomas catiónicos, ha permitido la administración eficiente de vasoinhibina y la demostración de su eficacia en el control de la retinopatía diabética, la artritis reumatoide, y el cáncer en estudios con animales<sup>68,74</sup>, pero está lejos de permitir su traslación clínica. En el presente trabajo mostramos que la actividad antiangiogénica e inhibidora de la permeabilidad vascular de la vasoinhibina reside en un motivo lineal corto de sólo 3 aminoácidos His46-Gly47-Arg48 (HGR) ubicado en la porción temprana del L1 y cuya mutación conduce a la pérdida de función de la vasoinhibina. Además, oligopéptidos de 3 a 7 aminoácidos que contienen la secuencia HGR conservan todas las propiedades y potencia vascular de la vasoinhibina, son fáciles de producir, estables y activos por vía oral para inhibir la vascularización y el crecimiento de tumores de melanoma.



El determinante antiangiogénico de la vasoinhibina ha sido un tema controversial. Consistente con nuestros hallazgos, un péptido de 14 aminoácidos ubicado en la primera parte del L1 de la PRL de búfalo, descubierto debido a su homología con la somatostatina humana que es antiangiogénica, exhibió propiedades antiangiogénicas<sup>47</sup>. Sin embargo, otro trabajo ubicó la actividad de la vasoinhibina dentro de la  $\alpha$ -hélice 2 (H2) de la PRL, específicamente en una secuencia de 14 aminoácidos con características de péptido inclinado (“tilted peptide”)<sup>89</sup>. La secuencia “tilted” es muy hidrofóbica, debe sintetizarse fusionada a la proteína de unión a maltosa para mejorar su solubilidad, e inhibe la angiogénesis, pero con una potencia de 4 a 32 veces menor a la de la vasoinhibina. Además, su mutación sólo resulta en una pérdida parcial de la función antiangiogénica de la vasoinhibina<sup>89</sup>.

El que la PRL completa carezca de propiedades antiangiogénicas implica que el motivo HGR no está activo en la PRL. Encontramos que la exposición del HGR está restringida en la PRL debido a la formación de puentes de sal entre la R48 y los residuos E161 y E162 ubicados en la H4. Demostramos la acción restrictiva de esta interacción al encontrar que la sustitución del E161 y el E162 por alanina confiere propiedades antiangiogénicas a la PRL. Estos hallazgos aclaran el mecanismo preciso que bloquea las acciones antiangiogénicas en la PRL.

El dominio funcional de la vasoinhibina es un ejemplo de motivos lineales cortos (SLiM, por sus siglas en inglés). Los SLiM suelen tener entre 3 y 10 aminoácidos, de los cuales, por lo general, sólo dos o tres son importantes para la función<sup>90</sup>. Los SLiM son muy comunes. La base de datos de SLiM actualizada (2018) incluye >1 millón de minimotivos en >180,000 de proteínas únicas<sup>91</sup>. En particular, el motivo HGR aparece en algunas proteínas, incluidos los péptidos derivados del colágeno que son antiangiogénicos, como la pentastatina-3 y la tetrastatina<sup>92</sup>. Sin embargo, estos motivos no han sido validados de forma experimental o causalmente relacionados con la angiogénesis. Al igual que en la PRL, los SLiM (como el HGR) podrían estar bajo una estricta regulación, por lo que su presencia puede o no conferir propiedades antiangiogénicas. Por ejemplo, el motivo de unión a SH3 RxPxxP aparece en 1 de 20 proteínas seleccionadas al azar, de las cuales sólo unas pocas son funcionales<sup>90</sup>. La funcionalidad de los SLiM depende del contexto, incluida la compartimentación celular, la

expresión temporal o, como lo revela nuestro estudio, las modificaciones postraduccionales (proteólisis, glicosilación, fosforilación) a las que están sujetas las proteínas.

La identificación del motivo lineal corto de la vasoinhibina tiene muchas implicaciones relevantes. Primero, el motivo puede explorarse para el desarrollo de fármacos, ya que sólo se requerirían algunas modificaciones estructurales para generar agonistas y antagonistas solubles fáciles de producir, con baja toxicidad y propiedades farmacocinéticas mejoradas. En segundo lugar, el número limitado de residuos del motivo funcional podría ayudar a identificar proteínas de unión de la vasoinhibina en los procesos de señalización celular y modificaciones postraduccionales que afecten sus propiedades. Y en tercer lugar, y ya en proceso, el desarrollo de anticuerpos capaces de discriminar entre la vasoinhibina y la PRL<sup>53</sup>, lo cual puede permitir la cuantificación de los niveles de vasoinhibina endógena con fines de diagnóstico e intervención.

Con respecto a la primera implicación, en este trabajo optimizamos el análogo Vi45-51 de la vasoinhibina transformándolo en un heptapéptido cíclico retro-inverso resistente a la degradación por pepsina y oralmente activo para inhibir la vascularización y el crecimiento de tumores de melanoma en el ratón. Este análogo inhibió la proliferación de células endoteliales con una potencia (IC<sub>50</sub>) en el rango picomolar 2.7 a 214 veces mayor que la de otras proteínas (endostatina y angiostatina) y péptidos (anginex y cilengitide) antiangiogénicos evaluados en ensayos clínicos<sup>29</sup>. Sin embargo, la significancia de comparar la IC<sub>50</sub> de varios inhibidores de la angiogénesis está limitada pues estos factores no comparten los mismos receptores, co-receptores, o componentes celulares para su señalización<sup>93</sup>.

La vasoinhibina es el objeto de un ensayo clínico finalizado sobre la cardiomiopatía del parto (ClinicalTrial.gov, NCT00998556)<sup>16</sup> y de un ensayo clínico en curso sobre la retinopatía diabética y el edema macular diabético (ClinicalTrial.gov, NCT03161652)<sup>17</sup>. Estos ensayos utilizaron medicamentos agonistas o antagonistas de los receptores de dopamina D2 que causan hipoprolactinemia o hiperprolactinemia para regular indirectamente a la baja<sup>16</sup> o al alza<sup>17</sup> los niveles de vasoinhibina, respectivamente. El presente estudio introduce un análogo potente de la vasoinhibina que es pequeño, estable, eficaz vía

oral y fácil de producir para el tratamiento clínico directo de trastornos dependientes de la angiogénesis. Dado que la vasoinhibina es una proteína natural<sup>3,5,46</sup> se esperaría una toxicidad baja o inexistente para sus análogos; sin embargo, aún falta esto por evaluar. Además, el amplio espectro de acción de la vasoinhibina contra diversos factores proangiogénicos implicaría una menor resistencia a su acción. También se anticipa el desarrollo de antagonistas que podrían aumentar las opciones clínicas para controlar la angiogénesis insuficiente y la regresión vascular anormal.

La identificación del determinante funcional de la vasoinhibina impacta sobre la biología de esta proteína. Se habían descrito isoformas de la vasoinhibina que variaban entre los primeros 123 a 159 aminoácidos de la PRL en función del sitio de corte de proteasas conocidas (catepsina D<sup>7</sup>, metaloproteinasas de matriz<sup>8</sup> y la proteína morfogenética de hueso 1<sup>9</sup>). Nuestros hallazgos indican que la trombina también contribuye a la generación de la vasoinhibina. Encontramos que la trombina corta a la PRL humana entre la R48-G49 para generar a una vasoinhibina de 5.6 kDa con potentes acciones antiangiogénicas y profibrinolíticas y cuyos últimos tres residuos corresponden al motivo HGR. La generación de la vasoinhibina por trombina es consistente con que el sitio de corte (RG) se encuentra en el fibrinógeno que es el principal blanco de la trombina<sup>94</sup>. Además la trombina corta rápidamente (< 10 minutos) a la PRL hacia vasoinhibina, un tiempo similar al tiempo de su acción sobre otros sustratos naturales de esta proteasa<sup>95,96</sup>. El procesamiento tan rápido se asocia a que el sitio de corte (R48-G49) de la trombina se localiza antes del enlace disulfuro intramolecular (C58-C174) que une el L1 con la H4 en la PRL, por lo que la vasoinhibina de 5.6 kDa se libera sin necesidad de reducción del enlace disulfuro. Esto contrasta con las isoformas de vasoinhibina más grandes en las que se requiere la acción de las reductasas de enlace disulfuro para la pérdida de la H4 esencial para la adquisición de las propiedades de la vasoinhibina<sup>10</sup>.

El descubrimiento de la trombina como una proteasa generadora de vasoinhibina amplía la esfera de acción de la vasoinhibina al campo de la hemostasia y reparación tisular, donde las acciones profibrinolíticas y antiangiogénicas de la vasoinhibina se opondrían a los efectos coagulantes y proangiogénicos de la trombina favoreciendo un ajuste fino. En apoyo a la

generación natural de la vasoinhibina por trombina, mostramos que la trombina endógena corta a la PRL hacia vasoinhibina durante el proceso de coagulación del plasma. Proponemos que la generación de la vasoinhibina sería parte de los mecanismos por los cuales la trombina ejerce acciones duales sobre la reparación tisular<sup>83,97-100</sup>.

La vasoinhibina generada por trombina solamente posee 48 aminoácidos y es la isoforma endógena más pequeña conocida hasta ahora. La presencia de la secuencia HGR confirma a este motivo como el determinante funcional de la vasoinhibina. El haber identificado a una vasoinhibina endógena de 48 aminoácidos con implicaciones funcionales reafirma la adecuación del término “vasoinhibina” utilizado para definir los fragmentos proteolíticos de la PRL con propiedades inhibitoras vasculares<sup>3-5</sup>. Por muchos años se denominó a la vasoinhibina bajo el término claramente obsoleto de “PRL 16K” que no sólo pasa por alto su bioactividad contrastante con respecto a la PRL sino la diversidad estructural de la familia de la vasoinhibina.

En conclusión, el motivo His46-Gly47-Arg48 (HGR) es el determinante funcional de la vasoinhibina. Este descubrimiento se tradujo en el desarrollo de un análogo de la vasoinhibina, potente, estable, fácil de producir y oralmente activo para ser desarrollado como un nuevo medicamento en el tratamiento de enfermedades angiogénico-dependientes. El motivo HGR permite determinar el tamaño mínimo necesario que debe tener una vasoinhibina endógena y favoreció el descubrimiento de la trombina como proteasa de PRL y, con ello, la reparación tisular como nuevo blanco de acción de la vasoinhibina. Más aún, la identificación del motivo HGR brinda herramientas para guiar la investigación sobre las acciones moleculares y fisiopatológicas de la vasoinhibina y de otras proteínas que contengan el motivo HGR.

## 10. Referencias

1. Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932–936. 10.1038/nature04478.
2. Marrelli, A., Cipriani, P., Liakouli, V., Carubbi, F., Perricone, C., Perricone, R., and Giacomelli, R. (2011). Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation? *Autoimmun Rev* 10, 595–598. 10.1016/j.autrev.2011.04.020.
3. Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M.C., and Martínez De La Escalera, G. (2009). Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiological Reviews* 89, 1177–1215. 10.1152/physrev.00024.2009.
4. Clapp, C., Aranda, J., González, C., Jeziorski, M.C., and de la Escalera, G.M. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17, 301–307. 10.1016/j.tem.2006.08.002.
5. Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., and Martínez de la Escalera, G. (2015). Regulation of Blood Vessels by Prolactin and Vasoinhibins. In *Recent Advances in Prolactin Research Advances in Experimental Medicine and Biology.*, M. Diakonova, PhD, ed. (Springer International Publishing), pp. 83–95. 10.1007/978-3-319-12114-7\_4.
6. Teilum, K., Hoch, J.C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J.A., and Kragelund, B.B. (2005). Solution Structure of Human Prolactin. *Journal of Molecular Biology* 351, 810–823. 10.1016/j.jmb.2005.06.042.
7. Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J.A., Kelly, P.A., and Goffin, V. (2004). Cathepsin D Processes Human Prolactin into Multiple 16K-Like N-Terminal Fragments: Study of Their Antiangiogenic Properties and Physiological Relevance. *Molecular Endocrinology* 18, 2522–2542. 10.1210/me.2004-0200.
8. Macotela, Y. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of Cell Science* 119, 1790–1800. 10.1242/jcs.02887.
9. Ge, G., Fernandez, C.A., Moses, M.A., and Greenspan, D.S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 10010–10015. 10.1073/pnas.0704179104.
10. Robles, J.P., Zamora, M., Velasco-Bolom, J.L., Tovar, M., Garduño-Juárez, R., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., and Clapp, C. (2018). Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Sci Rep* 8, 17111. 10.1038/s41598-018-35383-7.
11. Nuñez-Amaro, C.D., Moreno-Vega, A.I., Adan-Castro, E., Zamora, M., Garcia-Franco, R., Ramirez-Neria, P., Garcia-Roa, M., Villalpando, Y., Robles, J.P., Ramirez-Hernandez, G., et al. (2020). Levosulpiride Increases the Levels of Prolactin and Antiangiogenic Vasoinhibin in the Vitreous of Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Transl Vis Sci Technol* 9, 27. 10.1167/tvst.9.9.27.

12. Zepeda-Romero, L.C., Vazquez-Membrillo, M., Adan-Castro, E., Gomez-Aguayo, F., Gutierrez-Padilla, J.A., Angulo-Castellanos, E., Barrera de Leon, J.C., Gonzalez-Bernal, C., Quezada-Chalita, M.A., Meza-Anguiano, A., et al. (2017). Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 81, 473–479. 10.1038/pr.2016.241.
13. Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., Forster, O., Quint, A., Landmesser, U., Doerries, C., et al. (2007). A Cathepsin D-Cleaved 16 kDa Form of Prolactin Mediates Postpartum Cardiomyopathy. *Cell* 128, 589–600. 10.1016/j.cell.2006.12.036.
14. González, C., Parra, A., Ramírez-Peredo, J., García, C., Rivera, J.C., Macotela, Y., Aranda, J., Lemini, M., Arias, J., Ibarguengoitia, F., et al. (2007). Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* 87, 1009–1017. 10.1038/labinvest.3700662.
15. Ortiz, G., Ledesma-Colunga, M.G., Wu, Z., García-Rodrigo, J.F., Adan, N., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2020). Vasoinhibin reduces joint inflammation, bone loss, and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-induced arthritis. *Lab Invest* 100, 1068–1079. 10.1038/s41374-020-0432-5.
16. Hilfiker-Kleiner, D., Haghikia, A., Berliner, D., Vogel-Claussen, J., Schwab, J., Franke, A., Schwarzkopf, M., Ehlermann, P., Pfister, R., Michels, G., et al. (2017). Bromocriptine for the treatment of peripartum cardiomyopathy: a multicentre randomized study. *European Heart Journal* 38, 2671–2679. 10.1093/eurheartj/ehx355.
17. Robles-Osorio, Ma.L., García-Franco, R., Núñez-Amaro, C.D., Mira-Lorenzo, X., Ramírez-Neria, P., Hernández, W., López-Star, E., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., et al. (2018). Basis and Design of a Randomized Clinical Trial to Evaluate the Effect of Levosulpiride on Retinal Alterations in Patients With Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Front. Endocrinol.* 9, 242. 10.3389/fendo.2018.00242.
18. Moreno-Carranza, B., Robles, J.P., Cruces-Solís, H., Ferrer-Ríos, M.G., Aguilar-Rivera, E., Yupanki, M., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2019). Sequence optimization and glycosylation of vasoinhibin: Pitfalls of recombinant production. *Protein Expression and Purification* 161, 49–56. 10.1016/j.pep.2019.04.011.
19. Robles, J.P., Zamora, M., Siqueiros-Marquez, L., Adan-Castro, E., Ramirez-Hernandez, G., Nuñez, F.F., Lopez-Casillas, F., Millar, R.P., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., et al. (2022). The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: implications for a therapeutic orally active oligopeptide. *Angiogenesis* 25, 57–70. 10.1007/s10456-021-09800-x.
20. Zamora, M., Robles, J.P., Aguilar, M.B., Romero-Gómez, S. de J., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., and Clapp, C. (2021). Thrombin Cleaves Prolactin Into a Potent 5.6-kDa Vasoinhibin: Implication for Tissue Repair. *Endocrinology* 162, bqab177. 10.1210/endo/bqab177.
21. Jayson, G.C., Kerbel, R., Ellis, L.M., and Harris, A.L. (2016). Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* 388, 518–529. 10.1016/S0140-6736(15)01088-0.

22. Apte, R.S., Chen, D.S., and Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* *176*, 1248–1264. 10.1016/j.cell.2019.01.021.
23. Fallah, A., Sadeghinia, A., Kahroba, H., Samadi, A., Heidari, H.R., Bradaran, B., Zeinali, S., and Molavi, O. (2019). Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomed Pharmacother* *110*, 775–785. 10.1016/j.biopha.2018.12.022.
24. Qin, S., Li, A., Yi, M., Yu, S., Zhang, M., and Wu, K. (2019). Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol* *12*, 27. 10.1186/s13045-019-0718-5.
25. Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* *8*, 592–603. 10.1038/nrc2442.
26. Rao, N., Lee, Y.F., and Ge, R. (2015). Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin* *36*, 1177–1190. 10.1038/aps.2015.73.
27. Nyberg, P., Xie, L., and Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* *65*, 3967–3979. 10.1158/0008-5472.CAN-04-2427.
28. Cao, Y. (2001). Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *33*, 357–369. 10.1016/S1357-2725(01)00023-1.
29. V. Rosca, E., E. Koskimaki, J., G. Rivera, C., B. Pandey, N., P. Tamiz, A., and S. Popel, A. (2011). Anti-Angiogenic Peptides for Cancer Therapeutics. *CPB* *12*, 1101–1116. 10.2174/138920111796117300.
30. Lau, J.L., and Dunn, M.K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem* *26*, 2700–2707. 10.1016/j.bmc.2017.06.052.
31. Bajou, K., Herkenne, S., Thijssen, V.L., D'Amico, S., Nguyen, N.-Q.-N., Bouché, 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. 10.1038/nm.3552.
32. Morohoshi, K., Mochinaga, R., Watanabe, T., Nakajima, R., and Harigaya, T. (2018). 16 kDa vasoinhibin binds to integrin alpha5 beta1 on endothelial cells to induce apoptosis. *Endocrine Connections* *7*, 630–636. 10.1530/EC-18-0116.
33. Clapp, C., and Weiner, R.I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *7*.
34. D'Angelo, G., Martini, J.F., Iiri, T., Fantl, W.J., Martial, J., and Weiner, R.I. (1999). 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol* *13*, 692–704. 10.1210/mend.13.5.0280.
35. Lee, S.-H., Kunz, J., Lin, S.-H., and Yu-Lee, L. (2007). 16-kDa Prolactin Inhibits Endothelial Cell Migration by Down-Regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 Signaling Pathway. *Cancer Res* *67*, 11045–11053. 10.1158/0008-5472.CAN-07-0986.

36. Castillo, X., Melo, Z., Varela-Echavarría, A., Tamariz, E., Aroña, R.M., Arnold, E., Clapp, C., and Martínez de la Escalera, G. (2018). Vasoinhibin Suppresses the Neurotrophic Effects of VEGF and NGF in Newborn Rat Primary Sensory Neurons. *Neuroendocrinology* *106*, 221–233. 10.1159/000477768.
37. Thebault, S., González, C., García, C., Zamarripa, D.A., Nava, G., Vaca, L., López-Casillas, F., De la Escalera, G.M., and Clapp, C. (2011). Vasoinhibins Prevent Bradykinin-Stimulated Endothelial Cell Proliferation by Inactivating eNOS via Reduction of both Intracellular Ca<sup>2+</sup> Levels and eNOS Phosphorylation at Ser1179. *Pharmaceuticals* *4*, 1052–1069. 10.3390/ph4071052.
38. García, C., Nuñez-Anita, R.E., Thebault, S., Arredondo Zamarripa, D., Jeziorsky, M.C., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2014). Requirement of phosphorylatable endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 for vasoinhibin-mediated inhibition of endothelial cell migration and proliferation in vitro. *Endocrine* *45*, 263–270. 10.1007/s12020-013-9964-4.
39. Gonzalez, C., Corbacho, A.M., Eiserich, J.P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Muñoz, 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. 10.1210/en.2004-0647.
40. D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *92*, 6374–6378. 10.1073/pnas.92.14.6374.
41. Ferrara, N., Clapp, C., and Weiner, R. (1991). The 16K Fragment of Prolactin Specifically Inhibits Basal or Fibroblast Growth Factor Stimulated Growth of Capillary Endothelial Cells. *Endocrinology* *129*, 896–900. 10.1210/endo-129-2-896.
42. Macotela, Y., Mendoza, C., Corbacho, A., Cosío, G., Eiserich, J., Zentella, A., and Clapp, C. (2002). 16K Prolactin induces NF- $\kappa$ B activation in pulmonary fibroblasts. *Journal of Endocrinology*, *6*.
43. Corbacho, A.M., Nava, G., Eiserich, J.P., Noris, G., Macotela, Y., Struman, I., Martínez de la Escalera, G., Freeman, B.A., and Clapp, C. (2000). Proteolytic Cleavage Confers Nitric Oxide Synthase Inducing Activity upon Prolactin. *J. Biol. Chem.* *275*, 13183–13186. 10.1074/jbc.275.18.13183.
44. Ortiz, G., Ledesma-Colunga, M.G., Wu, Z., García-Rodrigo, J.F., Adan, N., Martinez-Diaz, O.F., De Los Ríos, E.A., López-Barrera, F., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2022). Vasoinhibin is Generated and Promotes Inflammation in Mild Antigen-induced Arthritis. *Endocrinology* *163*, bqac036. 10.1210/endo/bqac036.
45. Tabruyn, S.P., Sabatel, C., Nguyen, N.-Q.-N., Verhaeghe, C., Castermans, K., Malvaux, L., Griffioen, A.W., Martial, J.A., and Struman, I. (2007). The Angiostatic 16K Human Prolactin Overcomes Endothelial Cell Anergy and Promotes Leukocyte Infiltration via Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation. *Molecular Endocrinology* *21*, 1422–1429. 10.1210/me.2007-0021.



46. Triebel, J., Bertsch, T., Bollheimer, C., Rios-Barrera, D., Pearce, C.F., Hübner, M., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2015). Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 309, R1193–R1203. 10.1152/ajpregu.00256.2015.
47. Lee, J., Majumder, S., Chatterjee, S., and Muralidhar, K. (2011). Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. *J Biosci* 36, 341–354. 10.1007/s12038-011-9073-6.
48. La Mendola, D., Trincavelli, M.L., and Martini, C. (2022). Angiogenesis in Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 10962. 10.3390/ijms231810962.
49. Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6, 273–286. 10.1038/nrd2115.
50. Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R., and Fu, C. (2022). Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Sig Transduct Target Ther* 7, 1–27. 10.1038/s41392-022-00904-4.
51. Triebel, J., Robles-Osorio, M.L., Garcia-Franco, R., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., and Bertsch, T. (2017). From Bench to Bedside: Translating the Prolactin/Vasoinhibin Axis. *Front. Endocrinol.* 8, 342. 10.3389/fendo.2017.00342.
52. Clapp, C., Triebel, J., Bertsch, T., Robles Alvarez, J.P., Zamora Corona, M.M., and Martinez De La Escalera Lorenzo, G. (2021). Oligopeptide That Inhibits Angiogenesis and Vascular Function.
53. Müller, N., Robles, J.P., Zamora, M., Ebnet, J., Markl-Hahn, H., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., Bertsch, T., and Triebel, J. (2021). Development of Vasoinhibin-Specific Monoclonal Antibodies. *Front. Endocrinol.* 12. 10.3389/fendo.2021.645085.
54. Galfione, M., Luo, W., Kim, J., Hawke, D., Kobayashi, R., Clapp, C., Yu-Lee, L.-Y., and Lin, S.-H. (2003). Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr. Purif.* 28, 252–258. 10.1016/s1046-5928(02)00639-3.
55. Keeler, C., Dannies, P.S., and Hodsdon, M.E. (2003). The Tertiary Structure and Backbone Dynamics of Human Prolactin. *Journal of Molecular Biology* 328, 1105–1121. 10.1016/S0022-2836(03)00367-X.
56. Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., and Berendsen, H.J.C. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26, 1701–1718. 10.1002/jcc.20291.
57. Baudin, B., Bruneel, A., Bosselut, N., and Vaubourdolle, M. (2007). A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2, 481–485. 10.1038/nprot.2007.54.
58. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467. 10.1073/pnas.74.12.5463.
59. Corbacho, A., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., Noris, G., Morales, M., Martinez De La Escalera, G., and Clapp, C. (2000). Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *Journal of Endocrinology* 166, 53–62. 10.1677/joe.0.1660053.

60. Salic, A., and Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 2415–2420. 10.1073/pnas.0712168105.
61. Liang, C.-C., Park, A.Y., and Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* *2*, 329–333. 10.1038/nprot.2007.30.
62. 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. 10.1186/gb-2006-7-10-r100.
63. Justus, C.R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., and Yang, L.V. (2014). In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J Vis Exp*. 10.3791/51046.
64. Brown, R.M., Meah, C.J., Heath, V.L., Styles, I.B., and Bicknell, R. (2016). Tube-Forming Assays. In *Angiogenesis Protocols Methods in Molecular Biology.*, S. G. Martin and P. W. Hewett, eds. (Springer), pp. 149–157. 10.1007/978-1-4939-3628-1\_9.
65. Carpentier, G., Berndt, S., Ferratge, S., Rasband, W., Cuendet, M., Uzan, G., and Albanese, P. (2020). Angiogenesis Analyzer for ImageJ — A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay.” *Sci Rep* *10*, 11568. 10.1038/s41598-020-67289-8.
66. Malinda, K.M. (2009). In vivo matrigel migration and angiogenesis assay. *Methods Mol Biol* *467*, 287–294. 10.1007/978-1-59745-241-0\_17.
67. Coltrini, D., Di Salle, E., Ronca, R., Belleri, M., Testini, C., and Presta, M. (2013). Matrigel plug assay: evaluation of the angiogenic response by reverse transcription-quantitative PCR. *Angiogenesis* *16*, 469–477. 10.1007/s10456-012-9324-7.
68. Nguyen, N.-Q.-N., Cornet, A., Blacher, S., Tabruyn, S.P., Foidart, J.-M., Noël, A., Martial, J.A., and Struman, I. (2007). Inhibition of Tumor Growth and Metastasis Establishment by Adenovirus-mediated Gene Transfer Delivery of the Antiangiogenic Factor 16K hPRL. *Molecular Therapy* *15*, 2094–2100. 10.1038/sj.mt.6300294.
69. Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* *1*, 16–22. 10.1038/nprot.2006.4.
70. Lawrence, A.-M., and Besir, H.U.S. (2009). Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. *J Vis Exp*, 1350. 10.3791/1350.
71. Staindl, B., Berger, P., Kofler, R., and Wick, G. (1987). Monoclonal antibodies against human, bovine and rat prolactin: epitope mapping of human prolactin and development of a two-site immunoradiometric assay. *Journal of Endocrinology* *114*, 311–318. 10.1677/joe.0.1140311.
72. Aranda, J., Rivera, J.C., Jeziorski, M.C., Riesgo-Escovar, J., Nava, G., Lo´pez-Barrera, F., Quiro´z-Mercado, H., Berger, P., Martı´nez de la Escalera, G., and Clapp, C. (2005). Prolactins Are Natural Inhibitors of Angiogenesis in the Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *46*, 2947. 10.1167/iovs.05-0173.
73. Niedermeyer, T.H.J., and Strohalm, M. (2012). mMass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra. *PLoS One* *7*, e44913. 10.1371/journal.pone.0044913.

74. Ramírez, M., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., Jeziorski, M.C., Arnold, E., Díaz-Lezama, N., de la Escalera, G.M., Colosi, P., and Clapp, C. (2011). Vasoinhibin Gene Transfer by Adenoassociated Virus Type 2 Protects against VEGF- and Diabetes-Induced Retinal Vasopermeability. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 8944. 10.1167/iovs.11-8190.
75. Arredondo Zamarripa, D., Díaz-Lezama, N., Meléndez García, R., Chávez Balderas, J., Adán, N., Ledesma-Colunga, M.G., Arnold, E., Clapp, C., and Thebault, S. (2014). Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* 8. 10.3389/fncel.2014.00333.
76. García, C., Aranda, J., Arnold, E., Thébault, S., Macotela, Y., López-Casillas, F., Mendoza, V., Quiroz-Mercado, H., Hernández-Montiel, H.L., Lin, S.-H., et al. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J. Clin. Invest.*, JCI34508. 10.1172/JCI34508.
77. Nielsen, D.S., Shepherd, N.E., Xu, W., Lucke, A.J., Stoermer, M.J., and Fairlie, D.P. (2017). Orally Absorbed Cyclic Peptides. *Chem Rev* 117, 8094–8128. 10.1021/acs.chemrev.6b00838.
78. Haas, N.B., Manola, J., Uzzo, R.G., Flaherty, K.T., Wood, C.G., Kane, C., Jewett, M., Dutcher, J.P., Atkins, M.B., Pins, M., et al. (2016). Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 387, 2008–2016. 10.1016/S0140-6736(16)00559-6.
79. Bentzien, F., Struman, I., Martini, J.-F., Martial, J., and Weiner, R. (2001). Expression of the Antiangiogenic Factor 16K hPRL in Human HCT116 Colon Cancer Cells Inhibits Tumor Growth in Rag1<sup>-/-</sup> Mice. *Cancer Res* 61, 7356–7362.
80. Kim, J., Luo, W., Chen, D.-T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L.-Y., and Lin, S.-H. (2003). Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res.* 63, 386–393.
81. Khurana, S., Liby, K., Buckley, A.R., and Ben-Jonathan, N. (1999). Proteolysis of Human Prolactin: Resistance to Cathepsin D and Formation of a Nonangiostatic, C-Terminal 16K Fragment by Thrombin. *140*, 6.
82. Tsopanoglou, N.E., and Maragoudakis, M.E. (1999). On the Mechanism of Thrombin-induced Angiogenesis: POTENTIATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR ACTIVITY ON ENDOTHELIAL CELLS BY UP-REGULATION OF ITS RECEPTORS. *J. Biol. Chem.* 274, 23969–23976. 10.1074/jbc.274.34.23969.
83. Maragoudakis, M.E., Tsopanoglou, N.E., and Andriopoulou, P. (2002). Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochemical Society Transactions* 30, 5.
84. Vouret-Craviari, V., Boquet, P., Pouyssegur, J., and Van Obberghen-Schilling, E. (1998). Regulation of the Actin Cytoskeleton by Thrombin in Human Endothelial Cells: Role of Rho Proteins in Endothelial Barrier Function. *MBoC* 9, 2639–2653. 10.1091/mbc.9.9.2639.
85. Goldsack, N.R., Chambers, R.C., Dabbagh, K., and Laurent, G.J. (1998). Thrombin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 641–646. 10.1016/s1357-2725(98)00011-9.
86. Davie, E.W., and Kulman, J.D. (2006). An overview of the structure and function of thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* 32 *Suppl 1*, 3–15. 10.1055/s-2006-939550.

87. Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A.M., Ochoa, A., Gutierrez, G., Lopez, F., Barrios, F.A., and Berger, P. (1999). Inhibition of Rat Corneal Angiogenesis by 16-kDa Prolactin and by Endogenous Prolactin-like Molecules. *40*, 8.
88. Dueñas, Z., Rivera, J.C., Quiróz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., López-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. 10.1167/iovs.03-1346.
89. Nguyen, N.-Q.-N., Tabruyn, S.P., Lins, L., Lion, M., Cornet, A.M., Lair, F., Rentier-Delrue, F., Brasseur, R., Martial, J.A., and Struman, I. (2006). Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 14319–14324. 10.1073/pnas.0606638103.
90. Neduva, V., and Russell, R.B. (2005). Linear motifs: evolutionary interaction switches. *FEBS Lett* *579*, 3342–3345. 10.1016/j.febslet.2005.04.005.
91. Lyon, K.F., Cai, X., Young, R.J., Mamun, A.-A., Rajasekaran, S., and Schiller, M.R. (2018). Minimotif Miner 4: a million peptide minimotifs and counting. *Nucleic Acids Res* *46*, D465–D470. 10.1093/nar/gkx1085.
92. Karagiannis, E.D., and Popel, A.S. (2008). A systematic methodology for proteome-wide identification of peptides inhibiting the proliferation and migration of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 13775–13780. 10.1073/pnas.0803241105.
93. Aykul, S., and Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Anal Biochem* *508*, 97–103. 10.1016/j.ab.2016.06.025.
94. Gallwitz, M., Enoksson, M., Thorpe, M., and Hellman, L. (2012). The Extended Cleavage Specificity of Human Thrombin. *PLoS ONE* *7*, e31756. 10.1371/journal.pone.0031756.
95. Greenberg, C.S., Miraglia, C.C., Rickles, F.R., and Shuman, M.A. (1985). Cleavage of blood coagulation factor XIII and fibrinogen by thrombin during in vitro clotting. *J Clin Invest* *75*, 1463–1470.
96. Nogami, K., Zhou, Q., Wakabayashi, H., and Fay, P.J. (2005). Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site. *Blood* *105*, 4362–4368. 10.1182/blood-2004-10-3939.
97. Di Cera, E. (2008). Thrombin. *Mol Aspects Med* *29*, 203–254. 10.1016/j.mam.2008.01.001.
98. van Hinsbergh, V.W.M. (2012). Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* *34*, 93–106. 10.1007/s00281-011-0285-5.
99. Ma, L., Perini, R., McKnight, W., Dickey, M., Klein, A., Hollenberg, M.D., and Wallace, J.L. (2005). Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 216–220. 10.1073/pnas.0406682102.
100. Coughlin, S.R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* *407*, 258–264. 10.1038/35025229.

## 11. Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la prolactina y de la vasoinhibina.....	1
Figura 2. Sitios de corte en la PRL por las proteasas generadoras de la vasoinhibina.....	2
Figura 3. El heptapéptido THGRGFI (Vi45-51) posee la misma potencia que la vasoinhibina.....	26
Figura 4. El heptapéptido THGRGFI (Vi45-51) mimetiza el efecto antiangiogénico de la vasoinhibina.....	27
Figura 5. El efecto antiangiogénico del heptapéptido THGRGFI (Vi45-51) reside en su secuencia.....	28
Figura 6. El motivo HGR es el determinante antiangiogénico de la vasoinhibina.....	29
Figura 7. Los residuos E161 y E162 de la PRL ocultan al motivo HGR.....	30
Figura 8. La R48 se encuentra restringida por los residuos E161 y E162 de la PRL.....	31
Figura 9. La formación de puentes de sal entre la R48 y el E161 y el E162 oculta al motivo HGR en la PRL.....	31
Figura 10. El heptapéptido Vi45-51 que contiene al motivo HGR inhibe la angiogénesis <i>in vitro</i> .....	33
Figura 11. El heptapéptido Vi45-51 que contiene al motivo HGR inhibe la angiogénesis <i>in vivo</i> .....	34
Figura 12. El heptapéptido Vi45-51 que contiene al motivo HGR inhibe la permeabilidad vascular <i>in vitro</i> .....	34
Figura 13. Optimización y caracterización del heptapéptido Vi45-51 hacia su versión cíclica retroinversa con D-aminoácidos (CRIVi45-51).....	36
Figura 14. Potencia del CRIVi45-51 comparada con la de otros fármacos anticancerígenos y antiangiogénicos.....	37
Figura 15. La administración intravenosa de CRIVi45-51 reduce el crecimiento y la vascularización tumoral.....	38
Figura 16. CRIVi45-51 es resistente a la degradación por calor y pepsina.....	39
Figura 17. La administración oral de CRIVi45-51 reduce el crecimiento tumoral.....	40

Figura 18. La trombina corta a la PRL rápidamente generando un fragmento N-terminal de ~6 kDa.....	42
Figura 19. El fragmento de PRL N-terminal de ~6 kDa se genera por la trombina endógena durante la coagulación.....	44
Figura 20. La trombina corta a la PRL entre la R48 y la G49 para generar al fragmento N-terminal de 5.6 kDa (~6 kDa).....	45
Figura 21. El fragmento de PRL N-terminal de 5.6 kDa es una vasoinhibina.....	46
Figura 22. La vasoinhibina de 5.6 kDa es profibrinolítica.....	48

## 12. Anexos

### 12.1.Nomenclatura 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

## **12.2. Artículos de investigación derivados de esta tesis**





# The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: implications for a therapeutic orally active oligopeptide

Juan Pablo Robles<sup>1</sup> · Magdalena Zamora<sup>1</sup> · Lourdes Siqueiros-Marquez<sup>1</sup> · Elva Adan-Castro<sup>1</sup> · Gabriela Ramirez-Hernandez<sup>1</sup> · Francisco Freinet Nuñez<sup>1</sup> · Fernando Lopez-Casillas<sup>2</sup> · Robert P. Millar<sup>3,4</sup> · Thomas Bertsch<sup>5</sup> · Gonzalo Martínez de la Escalera<sup>1</sup> · Jakob Triebel<sup>5</sup> · Carmen Clapp<sup>1</sup>

Received: 29 March 2021 / Accepted: 17 May 2021  
© The Author(s) 2021

## Abstract

The hormone prolactin acquires antiangiogenic and antivasopermeability properties after undergoing proteolytic cleavage to vasoinhibin, an endogenous prolactin fragment of 123 or more amino acids that inhibits the action of multiple proangiogenic factors. Preclinical and clinical evidence supports the therapeutic potential of vasoinhibin against angiogenesis-related diseases including diabetic retinopathy, peripartum cardiomyopathy, rheumatoid arthritis, and cancer. However, the use of vasoinhibin in the clinic has been limited by difficulties in its production. Here, we removed this barrier to using vasoinhibin as a therapeutic agent by showing that a short linear motif of just three residues (His46-Gly47-Arg48) (HGR) is the functional determinant of vasoinhibin. The HGR motif is conserved throughout evolution, its mutation led to vasoinhibin loss of function, and oligopeptides containing this sequence inhibited angiogenesis and vasopermeability with the same potency as whole vasoinhibin. Furthermore, the oral administration of an optimized cyclic retro-inverse vasoinhibin heptapeptide containing HGR inhibited melanoma tumor growth and vascularization in mice and exhibited equal or higher antiangiogenic potency than other antiangiogenic molecules currently used as anti-cancer drugs in the clinic. Finally, by unveiling the mechanism that obscures the HGR motif in prolactin, we anticipate the development of vasoinhibin-specific antibodies to solve the on-going challenge of measuring endogenous vasoinhibin levels for diagnostic and interventional purposes, the design of vasoinhibin antagonists for managing insufficient angiogenesis, and the identification of putative therapeutic proteins containing HGR.

**Keywords** Vasoinhibin · 16K prolactin · Angiogenesis · Vasopermeability · Oligopeptide · Retina · Melanoma

---

Juan Pablo Robles and Magdalena Zamora have contributed equally to this work.

---

✉ Carmen Clapp  
clapp@unam.mx

- <sup>1</sup> Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, México
- <sup>2</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City, México
- <sup>3</sup> Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Department of Integrative Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, Cape Town 7925, South Africa
- <sup>4</sup> Centre for Neuroendocrinology, Department of Immunology, Faculty of Health Sciences, University of Pretoria, Pretoria, South Africa
- <sup>5</sup> Institute for Clinical Chemistry, Laboratory Medicine and Transfusion Medicine, Nuremberg General Hospital & Paracelsus Medical University, Nuremberg, Germany

## Introduction

Abnormal angiogenesis underlies multiple diseases characterized by excessive or insufficient proliferation of blood vessels including cancer, vasoproliferative retinopathies, rheumatoid arthritis, diabetic ulcers, cardiovascular disease, and many others [1]. The concept of preventing disease progression by inhibiting angiogenesis has been extensively validated preclinically and clinically for the treatment of cancer and vasoproliferative retinopathies [2–4]. Inhibitors of tyrosine-kinase receptors [5] and monoclonal antibodies against VEGF [3] are the leading antiangiogenic compounds used clinically, albeit with drawbacks such as resistance, off-target effects, and toxicity [6, 7]. Also, several endogenous antiangiogenic proteins and protein fragments have been identified as potential therapeutic agents [8–10] with advantages of small size, lower immunogenicity, higher specificity, and lower risk of drug resistance [8, 11, 12].

However, some of these proteins are difficult to produce and have poor clinical performance [10, 11].

Hormones regulate blood vessel growth and function [13]. They act directly on endothelial cells or indirectly, via the production of angiogenic and antiangiogenic mediators, and operate systemically to coordinate angiogenesis with other functions throughout the body [13]. Vasoinhibin is a proteolytically generated fragment of the hormone prolactin (PRL) that inhibits the proliferation, migration, survival, and permeability of endothelial cells [13, 14]. It binds to a multicomponent complex formed by plasminogen activator inhibitor-1, urokinase plasminogen activator, and the urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cell membranes [15] to inhibit the signaling pathways (Ras-Raf-MAPK; Ras-Tiam1-Rac1-Pak1; PI3K-Akt; and PLC $\gamma$ -IP $_3$ -eNOS) activated by several proangiogenic and vasopermeability factors (VEGF, bFGF, IL-1 $\beta$ , bradykinin) [13, 14]. Vasoinhibin is generated in the hypothalamus, the pituitary, and the target tissues defining the PRL/vasoinhibin axis [16]. Disruption of this axis can contribute to the progression of diabetic retinopathy [17, 18], retinopathy of prematurity [19], peripartum cardiomyopathy [20], pre-eclampsia [21], and rheumatoid arthritis [22]. However, translation of vasoinhibin into the clinic has been tempered by difficulties in its recombinant production [23]. We reasoned that the identification of the functional domain of vasoinhibin could lead to vasoinhibin-mimetics as alternative therapeutic molecules.

Vasoinhibin originates when the fourth  $\alpha$ -helix (H4) of PRL is removed by specific proteolysis within loop 3 (L3) [13, 14, 24]. The structure of vasoinhibin is unknown, but molecular dynamic simulation showed that loss of H4 induces a new conformation in the first half of loop 1 (L1) that is absent in PRL and could expose the functional determinant of vasoinhibin (Fig. 1a) [25]. In agreement, a 79-residue protein comprising the H1 and L1 regions of human PRL [25] and a 14-residue oligopeptide corresponding to the L1 sequence of buffalo PRL [26] are antiangiogenic. Here, we have identified the functional determinant of vasoinhibin and translated it into easily produced soluble oligopeptides that inhibit angiogenesis and vasopermeability with the same potency as vasoinhibin.

## Materials and methods

Materials and methods are detailed in the “Supplementary methods” section.

### Reagents

Linear peptides (>95% pure) were commercially synthesized acetylated and amidated at the N- and C-termini, respectively

(Supplementary Table S2). The cyclic-retro-inverse-vasoinhibin-(45–51)-peptide (CRIVi45–51) (>98% pure) was synthesized with the sequence  $_D$ Ile- $_D$ Phe-Gly- $_D$ Arg-Gly- $_D$ His- $_D$ Thr and head-to-tail cyclization (GenScript, Piscataway, NJ). Recombinant vasoinhibin of 123 residues was produced as reported [27]. Recombinant human PRL was provided by Michael E. Hodsdon [28] (Yale University, New Haven, CT). Recombinant human vascular endothelial growth factor-165 (VEGF) was a gift from Genentech (South San Francisco, CA) and basic fibroblast growth factor (bFGF) was donated by Scios, Inc. (Mountain View, CA). Bradykinin (BK) and interleukin-1 $\beta$  were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) and R&D Systems (Minneapolis, MN), respectively. Anginex peptide was acquired from Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA), and cilengitide, human angiotensin K1-3, endostatin, pazopanib, sorafenib and sunitinib from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Vasoinhibin and PRL cDNA were point-mutated by the two-step PCR technique, cloned in the pcDNA3 vector and produced by HEK293T/17 (ATCC, Manassas, VA) cells as reported [23].

### Molecular dynamic simulation

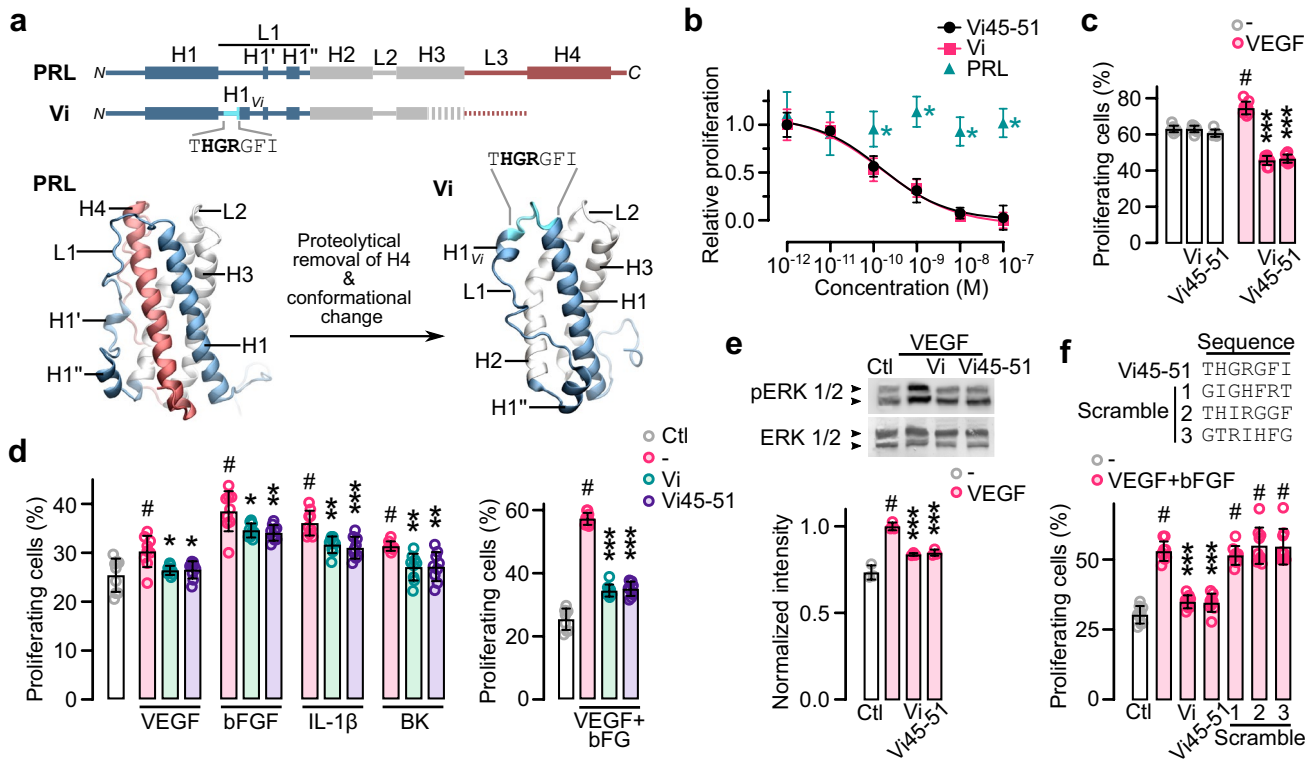
Classical MD simulation was performed using GROMACS [29] using the coordinates of soluble human PRL (PDB: 1RW5) [30], as reported [25].

### Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained [31] and cultured in F12K medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 100  $\mu$ g mL $^{-1}$  heparin (Sigma-Aldrich), and 25  $\mu$ g mL $^{-1}$  ECGS (Corning, NY). The mouse melanoma B16-F10 cell line (CRL-6475, ATCC) was cultured in DMEM medium with 10% FBS. All media contained 100 U mL $^{-1}$  penicillin–streptomycin.

### Endothelial cell proliferation

HUVEC were seeded at 14,000 cells cm $^{-2}$  in a 96-well plate and, after 24 h, starved with 0.5% FBS for 12 h. The medium was refreshed with 20% FBS-F12K and incubated with 100  $\mu$ g mL $^{-1}$  heparin together with 25 ng mL $^{-1}$  VEGF and 20 ng mL $^{-1}$  bFGF for 24 h in combination with a single dose (100 nM) or different concentrations of PRL, vasoinhibin, or synthetic oligopeptides. DNA synthesis was quantified by the DNA incorporation of the thymidine analog 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, Sigma) labeled by the click reaction with fluorescent Azide Fluor 545 (Sigma-Aldrich) as reported [25, 32].



**Fig. 1** THGRGFI heptapeptide mimics vasoinhibin. **a** Diagrams of secondary and tertiary structures of prolactin (PRL) and vasoinhibin (Vi) indicating  $\alpha$ -helices (H1-4), loops (L1-3), and residues 45–51 corresponding to the THGRGFI. Vi originates when H4 is removed by specific proteolysis causing conformational changes in L1 including a new  $\alpha$ -helix (H1<sub>Vi</sub>). **b** Dose–response inhibition of HUVEC proliferation by the THGRGFI heptapeptide comprising residues 45–51 of Vi (Vi45–51), Vi of 123 residues (Vi), and PRL. Inhibition was against VEGF/bFGF-induced HUVEC proliferation. Proliferation relative to those of the lowest and highest dose of Vi positive control,  $n=9$ , \* $P<0.001$  versus Vi (Two-way ANOVA, Dunnett). Dose–response curves fitted by least square regression analysis ( $r^2>0.9$ ). Effect of 100 nM Vi or Vi45–51 on BUVEC-E6E7 basal and VEGF-

stimulated proliferation (c), or on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation stimulated by the proangiogenic factors VEGF, bFGF, IL-1 $\beta$ , or bradykinin (BK), or the VEGF + bFGF combination (d). e Representative Western blot showing the effect of Vi or Vi45–51 on VEGF-induced phosphorylation (p) and total levels of ERK 1/2 in HUVEC and the densitometric values of phosphorylated ERK 1/2 after normalization for total ERK 1/2. f Effect of 100 nM Vi, Vi45–51 and three different heptapeptides with Vi residues 45–51 in random order (scramble) on the VEGF + bFGF-induced proliferation of HUVEC. Proliferating cells are expressed relative to total cells. \* $P<0.033$ , \*\* $P<0.002$ , \*\*\* $P<0.001$  versus stimulated control; #  $P<0.001$  versus basal proliferation (Ctl) (Two-way ANOVA, Tukey). In all cases, values are means  $\pm$  SD,  $n=9$

### ERK1/2, Akt, and eNOS phosphorylation

The protein of HUVEC cells treated or not with 100 nM recombinant vasoinhibin or Vi45–51 followed by the addition or not of 100 ng mL<sup>-1</sup> VEGF, was extracted in RIPA lysis buffer supplemented with 1:100 Halt Protease-Phosphatase Inhibitor cocktail and 5 mM EDTA (both from Thermo Scientific). Proteins were resolved in SDS-PAGE followed by western blot as reported [25] with antibodies against phospho-ERK1/2 (9101, 1:500), phospho-Akt (9271, 1:500), or phospho-eNOS (9571, 1:250); and antibodies against total proteins ERK1/2 (9102, 1:500), Akt

(9272, 1:500), or eNOS (9572, 1:500), all from Cell Signaling (Danvers, MA).

### Endothelial cell motility assay

The scratch wound healing assay evaluated cell motility [33]. HUVEC were grown to confluence on a 6-well plate and scratched using the edge of a cell scraper. The medium was replaced and IL-1 $\beta$  (10 ng mL<sup>-1</sup>) was added to stimulate motility with or without 100 nM of recombinant vasoinhibin or Vi45–51. After 16 h, HUVEC migration was recorded with an inverted microscope and the

area of wound sealing was calculated with the CellProfiler software [34]. The wound sealing area was expressed relative to the wound area and compared against cells treated with IL-1 $\beta$  alone.

### Endothelial cell invasion assays

The transwell Matrigel barrier assay [35] evaluated cell invasion. HUVEC were seeded at 14,000 cells cm<sup>-2</sup> on the upper (luminal) side of an 8- $\mu$ m-pore insert coated with 0.38 mg mL<sup>-1</sup> Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) in starvation medium (0.5% FBS and no ECGS) with 100 nM recombinant vasoinhibin or Vi45–51. Conditioned medium of 3T3-L1 cells containing 10% FBS and VEGF (50 ng mL<sup>-1</sup>) added to the lower (abluminal) chamber served as chemoattractant. After 16 h, invading cells in the bottom side were fixed, permeabilized, stained and counted.

### Matrigel tube formation assay

Formation of tubular endothelial cell networks was evaluated by the Matrigel tube formation assay as reported [36]. HUVEC (26,500 cells cm<sup>-2</sup>) were seeded onto a solid layer of Matrigel (1.2 mg cm<sup>-2</sup>) in a 24-well plate in the presence of 200 nM recombinant vasoinhibin or Vi45–51 and incubated for 6 h. Tube formation was quantified by Angiogenesis Analyzer for ImageJ software [37].

### Vasopermeability in vitro assays

HUVEC monolayers were grown on 6.5 mm transwell with a 0.4  $\mu$ m pore. Trans-endothelial electrical resistance (TEER) was measured with the epithelial EVOM<sup>2</sup> Volt/Ohm meter (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Monolayers were treated with 100 nM of recombinant vasoinhibin or Vi45–51 for 1 h before adding 50 ng mL<sup>-1</sup> VEGF. TEER was measured over a 120-min period. Albumin transit across HUVEC monolayers was evaluated 10 min after VEGF addition by adding Evans blue-linked albumin into the upper chamber and measuring its transit to the lower chamber.

### Actin distribution

HUVEC cells seeded on Millicell EZ Slides (Millipore, Burlington, MA) were treated for 1 h with 100 nM recombinant vasoinhibin or Vi45–51 followed by 200 ng mL<sup>-1</sup> of VEGF for 1 h. Cells were then fixed, permeabilized, and stained for actin with rhodamine phalloidin (Thermo Fisher Scientific).

### Heat and pepsin treatments

Solutions (2  $\mu$ M) of recombinant vasoinhibin, Vi45–51, or CRIVI45–51 were heat-inactivated (97 °C, 15 min) or digested with pepsin (Sigma-Aldrich) by incubating 4  $\mu$ M of each vasoinhibin at a final 1:20 protease to substrate molar ratio in 40 mM HCl (37 °C for 5 h).

### Animals

Male Wistar rats, and male and female C57BL6 and CD1 mice were housed under standard laboratory conditions. All interventions were carried out under 2.5% isoflurane anesthesia (SomnoSuite system, Kent Scientific, Torrington, CT). Experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico (UNAM) according to the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Eighth Edition, National Academy Press, Washington, D.C., USA).

### Matrigel plug angiogenesis assay

The Matrigel plug assay was performed [38] and quantified [39] as reported. Matrigel plug (0.5 mL, BD Biosciences) was supplemented with 300 ng mL<sup>-1</sup> bFGF and 1  $\mu$ M recombinant vasoinhibin or Vi45–51.

### Retinal angiogenesis assay

Retinal angiogenesis was determined in CD1 neonate mice as reported [40]. Vi45–51 (300  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>) or vehicle were administered intraperitoneally every 12 h from postnatal day (P) 3 to 8. Pups were euthanized by carbon dioxide inhalation and decapitation at P8, and retinas flat-mounted or frozen to evaluate blood vessels by immunofluorescence or RT-qPCR, respectively.

### Retinal vasopermeability assay

The retinal vasopermeability assay was carried out as previously described [41]. Male Wistar rats (300 g) anesthetized with 70% ketamine and 30% xylazine (1  $\mu$ L g<sup>-1</sup>) were intravitreally injected with 3  $\mu$ L of vehicle (PBS) containing or not 200 ng of VEGF with or without 20  $\mu$ M recombinant vasoinhibin or Vi45–51, and retinal vasopermeability was evaluated after 24 h by fluorescein angiography or the Evans blue method.

### Tumor model

The mouse model of primary tumor development based on the use of B16-F10 melanoma cells was used as previously reported [42]. Briefly, anesthetized female C57BL6 mice (8–12 weeks-old) were inoculated into their right flank with 10<sup>5</sup> B16-F10 cells. Five days after tumor cell inoculation, mice were treated daily with vehicle (NS) or CRIVI45–51 injected into the lateral tail vein or via intragastric gavage for the 8 d following tumor cell injection. Animals were then euthanized by cervical dislocation and the tumors weighted and processed to evaluate blood vessels by immunofluorescence or RT-qPCR.

### Statistical analysis

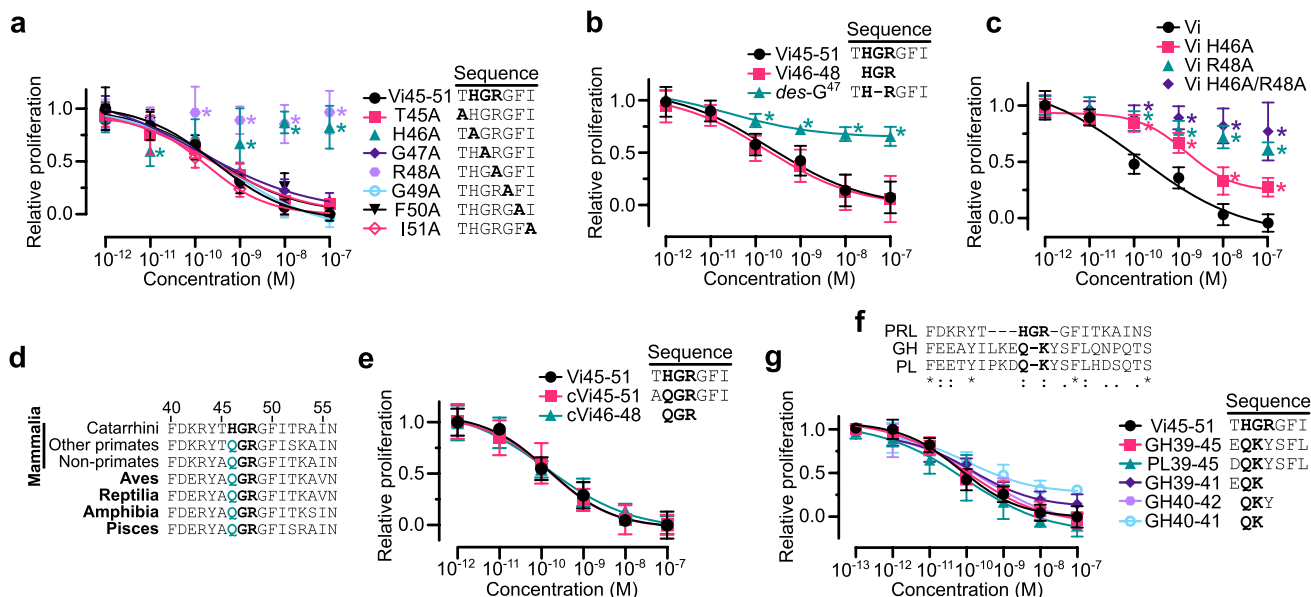
The dose–response curves were fitted by least square regression analysis with a variable slope model calculated with at least 54 points. The unpaired t-test was used when there were two independent groups. For more than two groups One-way or Two-way ANOVA followed by the Dunnett test (when compared to a control) or Bonferroni or Tukey test

(when comparing to every other group) were performed in GraphPad Prism version 8.4.3 for MacOS, GraphPad Software, San Diego, California USA. The overall significance threshold was set at *P* < 0.05.

## Results

### The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin

To precisely locate the antiangiogenic determinant of vasoinhibin, we scanned synthetic oligopeptides along the 45–58 residue sequence of human PRL for their ability to inhibit endothelial cell (EC) proliferation (Supplementary Fig. 1). A heptapeptide corresponding to residues 45–51 of vasoinhibin (Vi45–51) inhibited EC proliferation with a potency (IC<sub>50</sub> ~ 150 pM) and profile similar to a conventional vasoinhibin of 123 residues (Fig. 1b). Like vasoinhibin [13, 14], Vi45–51 did not affect basal EC proliferation (Fig. 1c), antagonized the EC proliferation induced by various proangiogenic factors (VEGF, bFGF, IL-1β, and bradykinin)



**Fig. 2** HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin. Dose–response inhibition of VEGF+bFGF-induced HUVEC proliferation by: Vi45–51 subjected to alanine scanning mutagenesis (a); by Vi45–51, HGR tripeptide (Vi46–48), and Vi45–51 with G47 deleted (*des*-G<sup>47</sup>) (b); and by vasoinhibin of 123 amino acids (Vi) or Vi alanine mutants H46A, R48A, or H46A/R48A (c). **d** Alignment of vertebrate PRL sequences. Conserved HGR residues in bold and substitution of H by Q in green. **e** Dose–response inhibition of VEGF+bFGF-induced HUVEC proliferation by Vi45–51, its Q-substituted conserved version (cVi45–51), and the QGR tripeptide (cVi46–48). **f** Alignment of human PRL, GH, and PL sequences indicating same (\*), similar (:), less similar (.), and dissimilar (blank) res-

idues. The HGR motif (residues 46–48) in PRL and the putative Q–K motif in GH and PL (residues 40–41) are in bold. **g** Dose–response inhibition of HUVEC proliferation by Vi45–51, heptapeptides comprising residues 39–45 of GH (GH39–45) and PL (PL39–45), EQK and QKY tripeptides (GH39–41 and GH40–42, respectively) and the QK dipeptide (GH40–41). Inhibition was against VEGF/bFGF-induced HUVEC proliferation. Values are means ± SD relative to those of the lowest and highest dose of Vi or Vi45–51 positive controls, *n* = 9, \**P* < 0.001 versus Vi45–51 or Vi (Two-way ANOVA, Dunnett). Dose–response curves fitted by least square regression analysis (*r*<sup>2</sup> > 0.8)

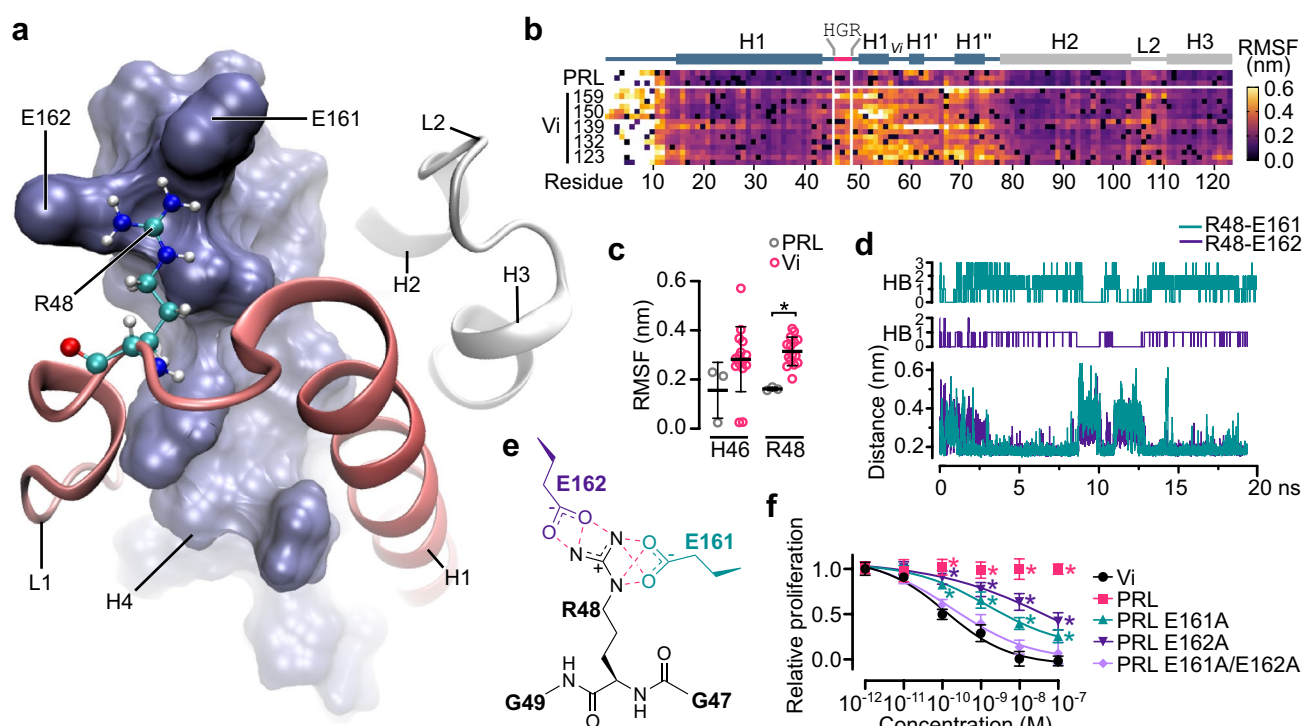
(Fig. 1d), and prevented the VEGF-induced activation of the MAPK pathway (Fig. 1e). Moreover, three different scrambled heptapeptides failed to inhibit EC proliferation indicating that the Vi45–51 sequence is required for activity (Fig. 1f).

The HGR motif is essential for vasoinhibin activity. Alanine-scanning revealed that H46A or R48A were the only mutations abolishing the activity of the heptapeptide (Fig. 2a), deletion of G47 (*des-G*<sup>47</sup>) resulted in loss of function, and the synthetic HGR tripeptide (Vi46–48) displayed full activity (Fig. 2b). Furthermore, R48A and H46A/R48A mutants of the 123-residue vasoinhibin showed no antiangiogenic activity, whereas the sole mutation of H46 to A46 resulted in a reduced effect (Fig. 2c). These findings identify HGR as the essential element responsible for the antiangiogenic activity of full-length vasoinhibin.

The essential role of HGR is further supported by its evolutionary conservation. It is conserved in the PRL of high

order primates and in other vertebrates H is replaced by glutamine (Q), a conservative substitution (Fig. 2d). The conserved heptapeptide (cVi45–51) with H46Q and the QGR tripeptide (cVi46–48) displayed activity equal to Vi45–51 (Fig. 2e).

Because PRL is structurally and functionally related to growth hormone (GH) and placental lactogen (PL), which are also cleaved to vasoinhibin [13, 43], we aligned their human sequences, synthesized two heptapeptides comprising residues 39–45 of GH and PL, and showed that both of them inhibited EC proliferation with the same potency as Vi45–51 (Fig. 2f, g). Thereby, the location of the antiangiogenic domain is similar among the three hormones and, although GH and PL lack the HGR sequence, they contain Q40–K41 as a putative HGR-like motif. Like Q and H, K is a conservative substitution for R, and tripeptides EQK and QKY and dipeptide QK displayed similar activity than Vi45–51.



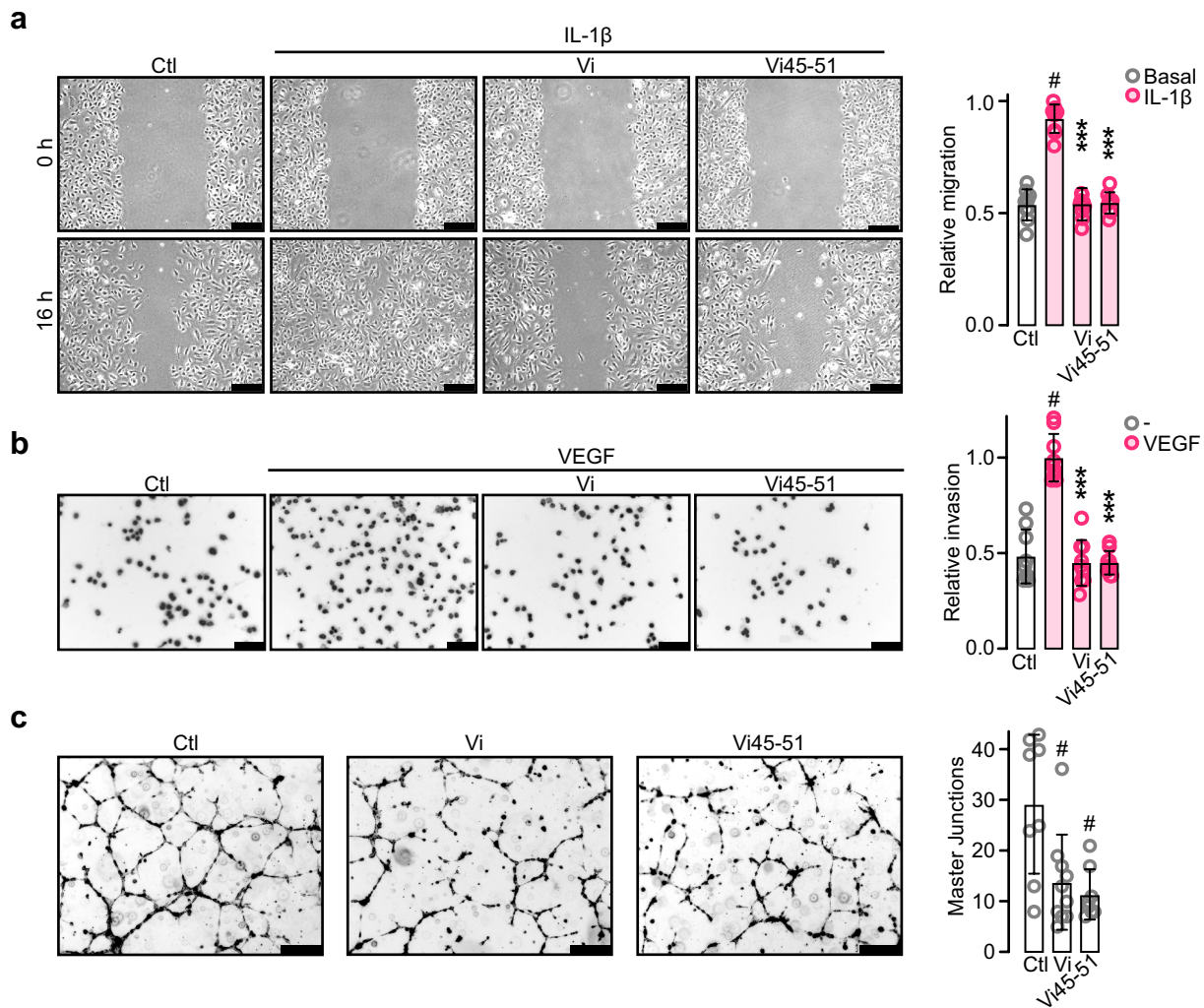
**Fig. 3** E161 and E162 in PRL obscure the HGR motif by salt bridges restraining R48. **a** Detail of the interaction between R48 (balls and sticks) and E161 and E162 in the N-terminal region of  $\alpha$ -helix 4 (H4) (blue surface). R48 is located in loop 1 (L1) near  $\alpha$ -helix 1 (H1) (red ribbon). **b** Root mean square fluctuation (RMSF) of the first 123 residues of PRL and vasoinhibin (Vi) of different lengths (159, 150, 139, 132, and 123 residues) over 20 ns molecular dynamic (MD) simulation. Location of HGR,  $\alpha$ -helices (H1–3), and loops (L1–2) are indicated in the diagram above. **c** RMSF of H46 and R48 in PRL and Vi isoforms. Values are means  $\pm$  SD,  $n=3-9$ ,  $*P=0.042$  (Two-way ANOVA, Bonferroni). **d** Formation of hydrogen bonds (HB) between

R48 and E161 and R48 and E162 in PRL and their correlation with the minimum distance between the residue pairs revealed by MD simulation. **e** Molecular scheme showing the three and four possible hydrogen bonds (red dashed lines) formed between the side chains of R48 and E162 and E161, respectively. **f** Dose-dependent inhibition by Vi of 123 residues (Vi), PRL, or PRL mutants where E161, E162, or E161 and E162 were replaced by alanine on VEGF + bFGF-induced proliferation of HUVEC. Values are means  $\pm$  SD relative to those of the lowest and highest dose of the Vi positive control,  $n=9$ ,  $*P<0.001$  versus Vi (Two-way ANOVA, Dunnett). Dose-response curves fitted by least square regression analysis ( $r^2>0.9$ )

## Molecular mechanism encrypting the HGR motif in PRL

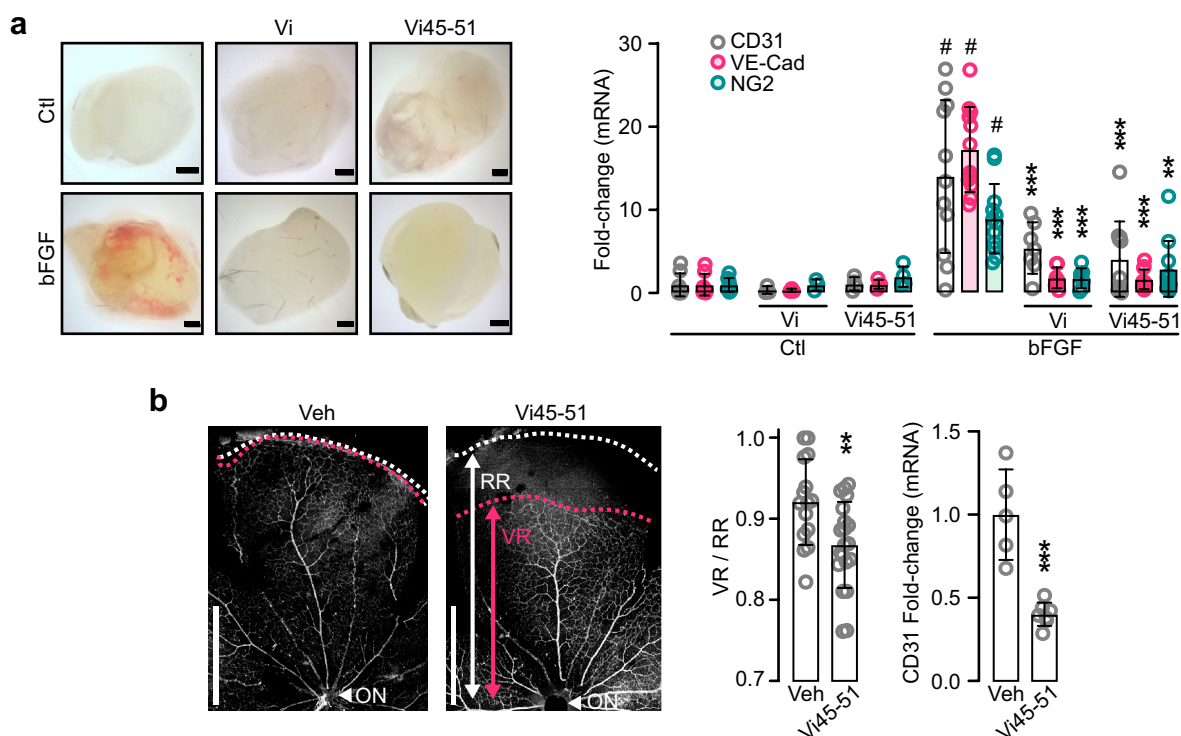
The fact that PRL is not antiangiogenic [13, 14] (Fig. 1b) implies that HGR is cryptic in PRL and only exposed after removal of H4. The analysis of the HGR region in the structure of human PRL [28, 30] revealed that R48 is in contact with glutamic acids 161 and 162 (E161 and E162) (EE) located in the amino terminal region of H4 (Fig. 3a; Supplementary Fig. 2a, b). Hence, we speculated that salt bridges involving the positive charge of R48 and the negative electrostatic potential of E161 and E162 restrict the mobility of HGR preventing its activity (Supplementary Fig. 2c).

Indeed, molecular dynamic simulation showed that the fluctuation of residues within L1, including H46 and R48, is higher in various vasoinhibin isoforms than in PRL (Fig. 3b, c) in which R48 forms up to 3 and 2 hydrogen bonds with E161 and E162 at minimum distance, respectively (Fig. 3d, e). Moreover, this EE motif is found in primates and rodents, and in all other vertebrates E162 is replaced by aspartic acid (D), a similar negatively charged residue (Supplementary Fig. 2d). The role of these residues in restraining antiangiogenic activity in full-length PRL is cogently supported by the demonstration that removal of these acidic side chains by alanine substitution confers antiangiogenic properties upon full-length PRL (Fig. 3f). We conclude that salt bridges



**Fig. 4** Vasoinhibin heptapeptide (Vi45–51) containing the HGR motif inhibits angiogenesis in vitro. **a** HUVEC monolayers at 0 and 16 h after wound scratch incubated in the absence (Ctl) or presence of IL-1 $\beta$  (10 ng mL<sup>-1</sup>) alone or together with 100 nM vasoinhibin of 123 residues (Vi) or Vi45–51. Values represent the area occupied by migrating cells relative to the initial wound area. **b** Inhibition of HUVEC invasion across a Matrigel barrier by 100 nM Vi or

Vi45–51. VEGF (50 ng mL<sup>-1</sup>) was used as chemoattractant. Values are number of invading cells relative to those with VEGF alone. **c** Inhibition of HUVEC tube-network formation by 200 nM Vi or Vi45–51 quantified by number of master junctions. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus stimulated control, #  $P < 0.01$  versus Ctl. Values are means  $\pm$  SD,  $n = 9$ , compared by Two-way ANOVA–Dunnett. Scale bar: 300  $\mu$ m



**Fig. 5** Vasoinhibin heptapeptide (Vi45–51) containing the HGR motif inhibits angiogenesis in vivo. **a** Matrigel plugs 6 d after mice implants without (Ctl) or with bFGF containing or not Vi or Vi45–51. mRNA expression of endothelial cell (CD31 and VE-Cad) and pericyte (NG2) markers in plugs. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus bFGF; #  $P < 0.001$  versus Ctl. **b** CD31-immunostained flat-mounted

retinas from postnatal d 8 neonate mice injected with vehicle (Veh) or Vi45–51. Radial vascular expansion from the optic nerve (ON) evaluated by the index between vascular (VR) and retinal (RR) ratios and by retinal CD31 mRNA levels. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus Veh. (Unpaired  $t$ -test). Values are means  $\pm$  SD,  $n = 9$ . Scale: 1 mm (**a**), 500  $\mu$ m (**b**)

between R48 and E161 and E162 obscure the HGR sequence in PRL rendering it unable to inhibit angiogenesis.

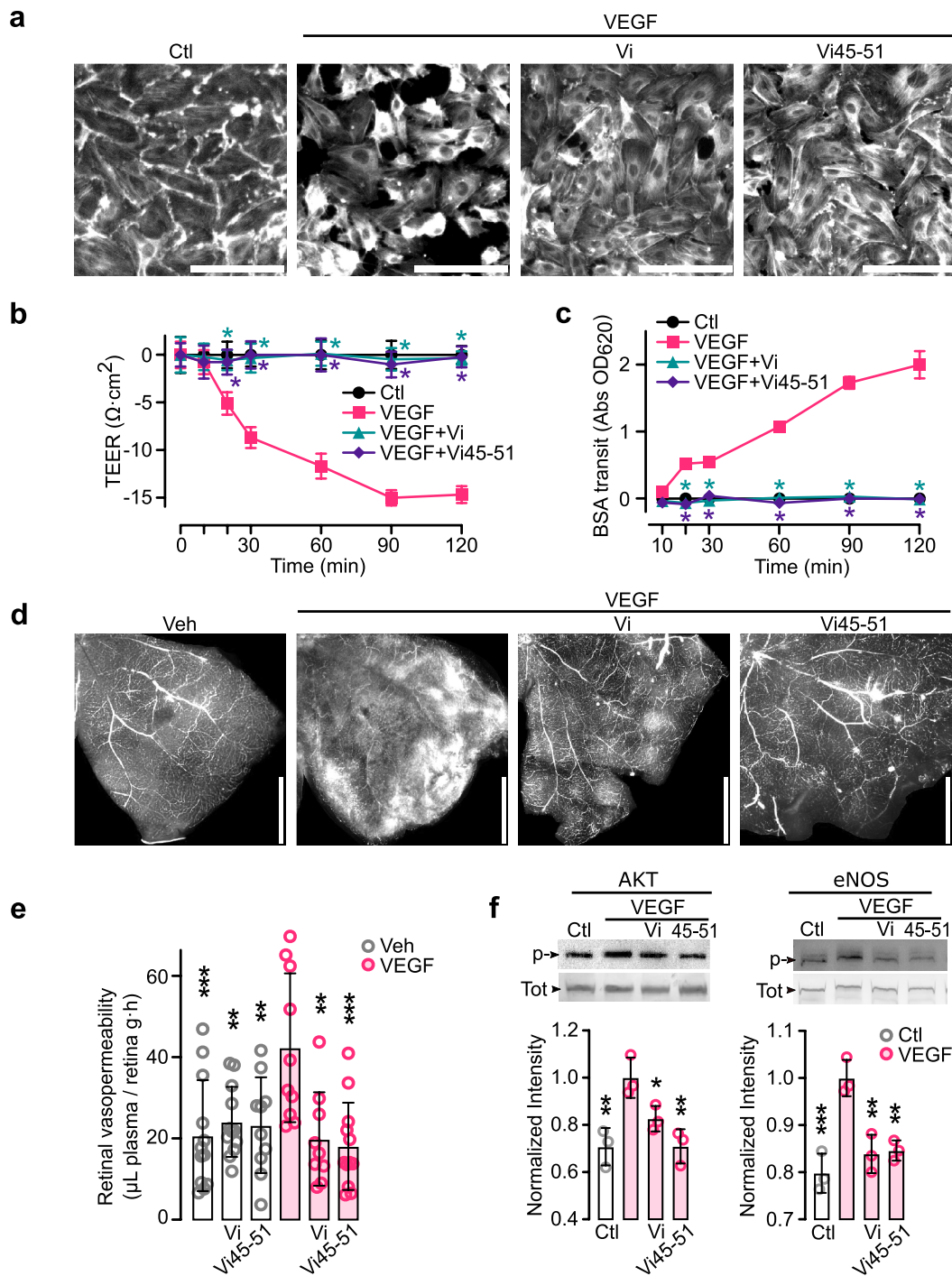
### The vasoinhibin heptapeptide (Vi45–51) containing the HGR motif inhibits angiogenesis and vasopermeability

Angiogenesis is a multistep process involving the proliferation, migration, and tube formation of EC, all of which are downregulated by vasoinhibin [13, 14, 24]. Consistent with HGR being the vasoinhibin antiangiogenic determinant, Vi45–51 inhibited IL-1 $\beta$ -induced EC motility (Fig. 4a), VEGF-induced EC invasion (Fig. 4b), and EC tube formation (Fig. 4c). Furthermore, Vi45–51 inhibited the entire process of in vivo angiogenesis. Vi45–51 blocked the bFGF-induced invasion of blood vessels into subcutaneously implanted Matrigel plugs in mice (Fig. 5a) and reduced physiological angiogenesis in the new-born mouse retina. In rodents, the retinal vasculature sprouts and spreads radially after birth completing vascularization after the first postnatal week [44]. Daily intraperitoneal injections of Vi45–51 interfered with the

completion of retinal vascularization, indicating impaired angiogenesis (Fig. 5b).

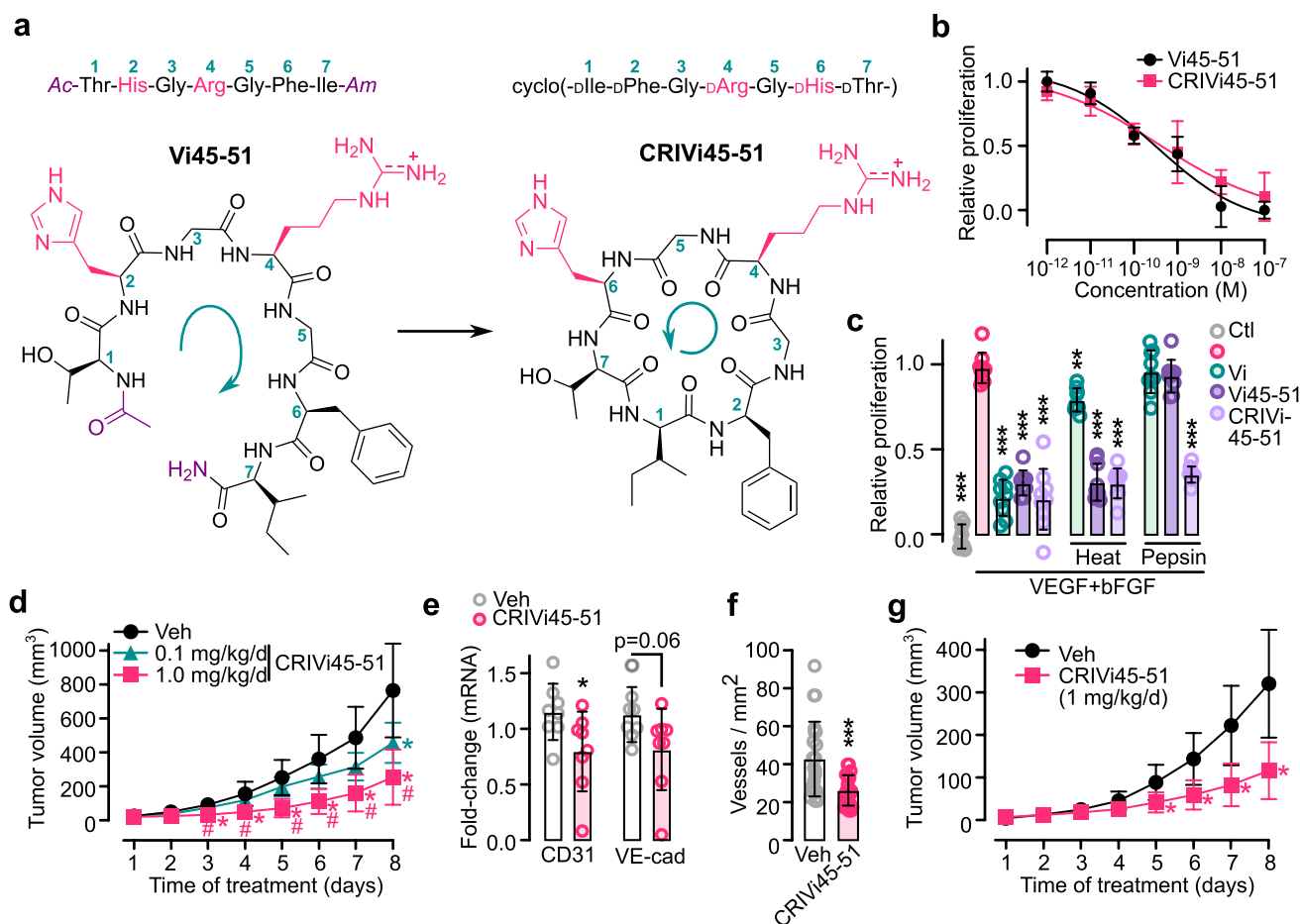
Vasoinhibin also inhibits the excessive vascular permeability present in diseases such as diabetic macular oedema, diabetic retinopathy [41, 45, 46], and inflammatory arthritis [22]. Like vasoinhibin [45, 46], Vi45–51 blocked VEGF-induced hyperpermeability of EC monolayers as assessed by actin cytoskeleton distribution (Fig. 6a), transendothelial-electrical resistance (TEER) (Fig. 6b), and flux of Evans blue-linked albumin (Fig. 6c). Furthermore, Vi45–51 reduced the retinal extravasation of fluorescent dextran and Evans blue-linked albumin in response to the intravitreal injection of VEGF in rats (Fig. 6d, e). Vasoinhibin inhibits hyperpermeability by blocking eNOS activation and the production and effects of NO on adherent junctions [45, 46], and Vi45–51 also blocked the VEGF-induced phosphorylation/activation of AKT and eNOS (Fig. 6f). Taken together our findings indicate that HGR is the common structural element responsible for vasoinhibin vascular actions, and that oligopeptides containing HGR hold promise for the treatment of angiogenesis- and vascular permeability-dependent diseases. However, the comparison between in vitro–in vivo





**Fig. 6** Vasoinhibin heptapeptide (Vi45–51) containing the HGR motif inhibits vasopermeability in vitro and in vivo. Effect of VEGF, or VEGF and 100 nM Vi, or VEGF and 100 nM Vi45–51 on: actin cytoskeleton distribution (200 ng mL<sup>-1</sup> VEGF) (a), transendothelial-electrical resistance (TEER) (50 ng mL<sup>-1</sup> VEGF) (b), and flux of Evans blue-linked albumin (BSA) (50 ng mL<sup>-1</sup> VEGF) (c) in HUVEC monolayers. \**P* < 0.001 versus VEGF. Extravasation of fluo-

rescein-labeled dextran in flat-mounted retinas (d) and of Evans blue-linked albumin in retinal extracts (e) from rats injected intravitreally with vehicle (Veh), 200 ng VEGF, or VEGF and 20 μM Vi, or VEGF and 20 μM Vi45–51. \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 versus VEGF. Values are means ± SD, *n* = 9, compared by Two-way ANOVA-Dunnett Scale bar: 300 μm (a), 1 mm (d)



**Fig. 7** Oral administration of the cyclic retro-inverse vasoinhibin heptapeptide (CRIVi45–51) reduces tumor growth and vascularization. **a** Vi45–51 is composed of L-amino acids and acetylated (Ac) and amidated (Am) at the N- and C-termini, respectively. CRIVi45–51 is composed of D-amino acid in reverse order. Numbers indicate the  $\alpha$ -carbons and green arrows the synthesis sense. Note the conserved configuration of HGR side chains (magenta) in the two heptapeptides. **b** Dose-dependent inhibition of VEGF + bFGF-induced HUVEC proliferation by Vi45–51 or CRIVi45–51. **c** Inhibition of VEGF + bFGF-induced HUVEC proliferation by 10 nM vasoinhibin of 123 residues (Vi), Vi45–51, or CRIVi45–51 before or after heat inactivation or

pepsin incubation. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus VEGF + bFGF alone. **d** Growth curves of B16–F10 tumors in mice intravenously injected with vehicle (Veh) or with different doses of CRIVi45–51 after tumor appearance. \* $P < 0.002$  versus Veh, # $P < 0.002$  versus 0.1 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. mRNA expression of endothelial cell markers (CD31 and VE-Cad) (**e**) and vascular density (**f**) in tumors. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus Veh. **g** Growth curves of B16–F10 tumors in mice after oral administration of vehicle (Veh) or CRIVi45–51 after tumor appearance. \* $P < 0.001$  versus Veh. All values are mean  $\pm$  SD,  $n = 9$

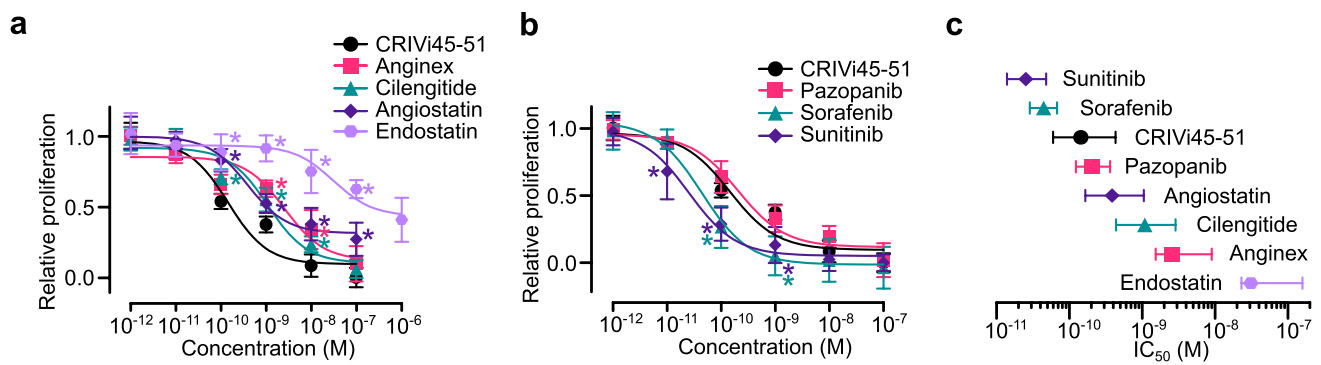
data provides no information regarding the relevance of a therapeutic intervention, unless pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters establish the link between both assays.

### Oral administration of a cyclic retro-inverse vasoinhibin heptapeptide containing the HGR motif reduces tumor growth and vascularization

Peptides have limited therapeutic application due to reduced stability and oral bioavailability [12] but substitutions with D-amino acids and cyclization can overcome these limitations [47]. Vi45–51 was optimized into a cyclic retro-inverse

peptide (CRIVi45–51) composed of D-amino acids assembled in the reverse order of their native sequence to conserve the configuration of the side chains while conferring resistance to proteolysis (Fig. 7a). CRIVi45–51 inhibited EC proliferation with a similar potency to that of Vi45–51; both peptides retained full activity after heat inactivation, but only CRIVi45–51 was resistant to pepsin degradation (Fig. 7b, c).

Inhibition of angiogenesis by vasoinhibin suppresses the growth of colon, prostate, and melanoma tumors [42, 48, 49]. In view of its antiangiogenic properties and greater stability, CRIVi45–51 is an appealing anti-cancer compound. C57BL6 mice were intradermally implanted with B16–F10



**Fig. 8** Potency of the cyclic retro-inverse vasoinhibin heptapeptide (CRIVi45–51) compared to that of other anti-cancer and antiangiogenic drugs. Dose–response inhibition of VEGF+bFGF-induced HUVEC proliferation (**a**, **b**) and respective  $IC_{50}$  values (**c**) of CRIVi45–51, antiangiogenic proteins (angiostatin and endostatin),

peptides (anginex, cilengitide), and tyrosine-kinase inhibitors (pazopanib, sorafenib, sunitinib). \* $P < 0.001$  versus CRIVi45–51. HUVEC proliferation relative to that of the lowest and highest dose of the CRIVi45–51 positive control. Dose–response curves fitted by least square regression analysis ( $r^2 < 0.7$ ). All values are mean  $\pm$  SD,  $n = 9$

melanoma cells and, after tumor appearance, subjected to daily intravenous injections of CRIVi45–51. CRIVi45–51 reduced tumor growth in a dose-related manner, and this effect (Fig. 7d) was associated with reduced angiogenesis. CRIVi45–51 did not inhibit the growth of melanoma cells in vitro (Supplementary Fig. 3), but it did reduce tumor vascular density and expression of CD31 (Fig. 7e, f). Notably, the oral administration of CRIVi45–51 decreased tumor growth with similar efficacy to intravenous delivery (Fig. 7g), indicating improved pharmacological properties. Furthermore, CRIVi45–51 demonstrated a greater potency in inhibiting EC proliferation than other antiangiogenic proteins (endostatin and angiostatin) and peptides (anginex and cilengitide) already tested in cancer clinical trials [11]; its potency is similar to the antiangiogenic tyrosine-kinase inhibitor pazopanib, and lower than the multi-targeted tyrosine-kinase inhibitors sunitinib and sorafenib discontinued from cancer trials due to excessive toxicity (Fig. 8a–c; Supplementary Table 1) [50].

## Discussion

Vasoinhibin is a naturally occurring angiogenesis and vasopermeability inhibitor that holds promise for targeting abnormal growth of the vasculature. A major obstacle for vasoinhibin therapeutic application has been the lack of sufficient functional protein. Post-translational modifications, protein folding, instability, and aggregation complicate the recombinant production of vasoinhibin [23]. Gene therapy vectors have allowed the efficient delivery of vasoinhibin in animal studies [41, 42] but are distant from clinical translation. Here, we show that the antiangiogenic and antivascular permeability activities of vasoinhibin reside in a short linear motif of just 3 amino acid residues (HGR) located in the early portion of L1 that upon

mutation leads to vasoinhibin loss of function. Moreover, oligopeptides of 3–7 amino acids containing HGR are as potent as whole vasoinhibin, easy to produce, stable, and orally active for targeting angiogenesis and hyperpermeability in the retina and melanoma tumor vascularization and growth.

The antiangiogenic determinant of vasoinhibin has been a controversial topic. Consistent with our findings, a peptide of 14 amino acids located in the early part of L1 of buffalo PRL, unveiled due to its homology with antiangiogenic human somatostatin, exhibited antiangiogenic properties [26]. However, other work located the activity of vasoinhibin within  $\alpha$ -helix 2 (H2), specifically in a 14 amino acid sequence with “tilted peptide” characteristics [51]. This tilted sequence is highly hydrophobic and, when synthesized fused to maltose-binding protein to improve solubility, it did inhibit angiogenesis but with a potency 4- to 32-fold lower than that of vasoinhibin. Moreover, mutation to abolish tilted sequence characteristics only resulted in a partial loss of vasoinhibin function [51].

The fact that full-length PRL is devoid of antiangiogenic properties implies that the HGR motif is not active in full-length PRL. Indeed, we found that exposure of HGR is restricted in PRL due to the formation of salt bridges between R48 and residues E161 and E162 located in H4. We demonstrated the restrictive action of this interaction by showing that alanine substitution of E161 and E162 confers antiangiogenic properties upon PRL. These findings clarify the precise mechanism blocking the antiangiogenic actions in PRL. Notably, the HGR and EE motifs are highly conserved, indicating their convergent evolution to control the PRL effect on angiogenesis and implying that vasoinhibin inhibits blood vessels not only in mammals but also in lower vertebrates [52].

Vasoinhibin originating from PRL comprises a family of isoforms ranging from the first 80 to the first 159 amino acid

residues, depending on the site of cleavage of different proteases (cathepsin D, matrix metalloproteinases, bone morphogenetic protein 1) [14, 16, 24]. The fact that a short linear motif of only 3 residues is the bioactive determinant suggests that all vasoinhibin isoforms share the same potency. Indeed, vasoinhibin isoforms derived from PRL, GH, and PL are equally potent [43]. The amino acid sequence of PL and GH is remarkably alike (86% homology), whereas human PRL only shares 25% sequence homology with the other two hormones [13]. The location of the antiangiogenic motif is similar among the three hormones, albeit in the GH- and PL-derived vasoinhibin isoforms this motif comprises only 2 amino acid residues (QK).

The vasoinhibin domain is an example of short linear motifs (SLiM). SLiM are typically between 3 and 10 amino acids, of which usually just two or three are important for function [53]. SLiM are very common. The updated (2018) SLiM database includes > 1 million minimotifs in > 180,000 unique proteins [54]. In particular, the HGR and QGR motifs occur in some proteins, including antiangiogenic collagen-derived peptides, such as pentastatin-3 and tetrastatin [55], whereas the QK is much more common [55, 56]. However, these motifs have not been previously validated experimentally or causally related to angiogenesis. As in vasoinhibin precursor molecules, these SLiM may be under tight regulation, so that their presence may or not confer antiangiogenic properties. For example, the SH3 binding motif RxPxxP occurs in 1 out of 20 randomly selected proteins, of which only few are functional [53]. Whether or not SLiM are functional would depend on context, including cellular compartmentalization, temporal expression, or, as revealed by our study, post-translational modifications (proteolysis, glycosylation, phosphorylation).

Unveiling the short linear motif of vasoinhibin and its evolutionary conservation has many relevant implications. First, the motif can be explored for drug development, as only few structural modifications would be required to generate soluble agonists and antagonists that are easy to produce and have low toxicity and improved pharmacokinetic properties. Second, the limited number of residues of the functional motif could help identify vasoinhibin binding partners in cell signaling processes and post-translational modifications affecting their properties. Third, the motif could impact the development of antibodies able to discriminate between vasoinhibin and PRL for quantifying vasoinhibin levels in the clinic. Finally, mutations of the vasoinhibin functional motif could be linked to several diseases in humans.

Here, we show that a cyclic retro-inverse heptapeptide is an optimized vasoinhibin analog that is resistant to pepsin degradation and orally active to inhibit vascularization and growth of melanoma tumors in mice. Furthermore, this analog inhibits endothelial cell proliferation with IC<sub>50</sub> values in the pM range that are 2.7- to 214-fold lower than those of

other antiangiogenic proteins (endostatin and angiostatin) and peptides (anginex and cilengitide) tested in cancer clinical trials [11]. However, significance of comparing the IC<sub>50</sub> values of the various angiogenesis inhibitors is limited by the fact that they do not share receptors, co-receptors, and cell components for signaling [57].

Vasoinhibin is the subject of a completed clinical trial on peripartum cardiomyopathy (ClinicalTrials.gov, NCT00998556) and an on-going trial on diabetic retinopathy and diabetic macular oedema (ClinicalTrials.gov, NCT03161652). These trials used dopamine D2 receptor agonist- or antagonist-medications causing hypoprolactinemia or hyperprolactinemia to indirectly downregulate [58] or upregulate [59] vasoinhibin levels, respectively. The current study introduces a potent vasoinhibin analog that is small, stable, orally effective, and easy to produce for the direct clinical treatment of the above diseases and other angiogenesis-related disorders. As vasoinhibin is a broadly acting natural protein [13, 14, 16], vasoinhibin analogs could counteract the action of several proangiogenic mediators with limited resistance, side effects, and toxicity. The anticipated development of antagonists may increase clinical options for managing insufficient angiogenesis and abnormal vascular regression. Furthermore, antibodies able to discriminate between vasoinhibin and PRL may be developed to solve the on-going challenge of measuring endogenous vasoinhibin levels for diagnostic and interventional purposes.

In conclusion, our findings remove the barrier to using vasoinhibin as a therapeutic agent and provide tools for guiding research into the molecular and physiopathological actions of vasoinhibin and other proteins containing the HGR and related motifs.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09800-x>.

**Acknowledgements** We thank Xarubet Ruíz-Herrera, Fernando López Barrera, Adriana González Gallardo, Valentín Mendoza Rodríguez, Alejandra Castilla León, José Martín García Servín, María A. Carbajo Mata, Ericka A. de los Ríos Arellano, Nydia Hernández-Ríos, Luis Alberto Aguilar, Alejandro de León Cuevas for their excellent technical assistance, Dorothy Pless for critically editing the manuscript, and Jessica Gonzalez Norris for helping correct its English style.

**Author contributions** JPR and CC conceived research, designed and supervised the study, interpreted the data, and wrote the manuscript. JPR and MZ performed most research. LMSM, EAC, GRH, and FFN performed research. FLC contributed reagents. RPM contributed to study design and edited the manuscript. JT, TB and GME conceived research, supervised and revised the study. All authors reviewed and approved the manuscript.

**Funding** This work was supported by grants A1-S-9620B and 289568 from “*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*” (CONACYT) and UNAM grant 405PC to C.C. Magdalena Zamora is a doctoral student from ‘*Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad*

Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 768182 from CONACYT.

**Data availability** All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare the following competing interests: C.C., J.P.R., M.Z., G.M.E., J.T., and T.B. are inventors of submitted Mexican (MX/E/2019/079075) and multinational (PCT/EP2020/069154) patent applications. The *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM) and the authors J.T. and T.B. are owners of the pending patents.

**Ethical approval** All experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology of the National University of Mexico (UNAM).

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9:653–660. <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>
- Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL (2016) Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* 388:518–529. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01088-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01088-0)
- Apte RS, Chen DS, Ferrara N (2019) VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell* 176:1248–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
- Fallah A, Sadeghinia A, Kahroba H et al (2019) Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. *Biomed Pharmacother* 110:775–785. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.022>
- Qin S, Li A, Yi M et al (2019) Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol* 12:27. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0718-5>
- Bergers G, Hanahan D (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 8:592–603. <https://doi.org/10.1038/nrc2442>
- Xu H, Zhao G, Yang J, Wen X (2019) Advances in toxicity risk analysis and effective treatments for targeted antiangiogenic drugs. *Int J Clin Exp Med* 12:12020–12027
- Rao N, Lee YF, Ge R (2015) Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin* 36:1177–1190. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.73>
- Nyberg P, Xie L, Kalluri R (2005) Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 65:3967–3979. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2427>
- Cao Y (2001) Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 33:357–369. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(01\)00023-1](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00023-1)
- Rosca EV, Koskimaki JE, Rivera CG et al (2011) Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* 12:1101–1116. <https://doi.org/10.2174/138920111796117300>
- Lau JL, Dunn MK (2018) Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem* 26:2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G (2009) Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89:1177–1215. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2009>
- Clapp C, Thebault S, Macotela Y et al (2015) Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol* 846:83–95. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_4)
- Bajou K, Herkenne S, Thijssen VL et al (2014) PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nat Med* 20:741–747. <https://doi.org/10.1038/nm.3552>
- Triebel J, Bertsch T, Bollheimer C et al (2015) Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* ajpregu 00256:2015. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00256.2015>
- Triebel J, Macotela Y, de la Escalera GM, Clapp C (2011) Prolactin and vasoinhibins: endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB Life* 63:806–810. <https://doi.org/10.1002/iub.518>
- Núñez-Amaro CD, Moreno-Vega AI, Adán-Castro E et al (2020) Levosulpiride increases the levels of prolactin and antiangiogenic vasoinhibin in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Transl Vis Sci Technol* 9:27–27. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.9.27>
- Zepeda-Romero LC, Vazquez-Membrillo M, Adán-Castro E et al (2017) Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 81:473–479. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.241>
- Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E et al (2007) A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128:589–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.036>
- Gonzalez C, Parra A, Ramirez-Peredo J et al (2007) Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* 87:1009–1017. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700662>
- Ortiz G, Ledesma-Colunga MG, Wu Z et al (2020) Vasoinhibin reduces joint inflammation, bone loss, and the angiogenesis and vasopermeability of the pannus in murine antigen-induced arthritis. *Lab Invest* 100:1068–1079. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0432-5>
- Moreno-Carranza B, Robles JP, Cruces-Solís H et al (2019) Sequence optimization and glycosylation of vasoinhibin: pitfalls of recombinant production. *Protein Expr Purif* 161:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.04.011>
- Clapp C, Aranda J, Gonzalez C et al (2006) Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17:301–307. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.002>
- Robles JP, Zamora M, Velasco-Bolom JL et al (2018) Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Sci Rep* 8:17111. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35383-7>
- Lee J, Majumder S, Chatterjee S, Muralidhar K (2011) Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. *J Biosci* 36:341–354

27. Galfione M, Luo W, Kim J et al (2003) Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr Purif* 28:252–258
28. Keeler C, Dannies PS, Hodsdon ME (2003) The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. *J Mol Biol* 328:1105–1121. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00367-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00367-x)
29. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B et al (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26:1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
30. Teilum K, Hoch JC, Goffin V et al (2005) Solution structure of human prolactin. *J Mol Biol* 351:810–823. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.042>
31. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M (2007) A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc* 2:481–485. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.54>
32. Salic A, Mitchison TJ (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2415–2420. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712168105>
33. Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2:329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
34. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR et al (2006) Cell Profiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7:R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>
35. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV (2014) In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp* 88:51046. <https://doi.org/10.3791/51046>
36. Brown RM, Meah CJ, Heath VL et al (2016) Tube-forming assays. In: Martin SG, Hewett PW (eds) *Angiogenesis protocols*. Springer, New York, pp 149–157
37. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S et al (2020) Angiogenesis analyzer for ImageJ—a comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay.” *Sci Rep* 10:11568. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67289-8>
38. Malinda KM (2009) In vivo matrigel migration and angiogenesis assay. In: Murray C, Martin S (eds) *Angiogenesis protocols*, 2nd edn. Humana Press, Totowa, pp 287–294
39. Coltrini D, Di Salle E, Ronca R et al (2013) Matrigel plug assay: evaluation of the angiogenic response by reverse transcription-quantitative PCR. *Angiogenesis* 16:469–477. <https://doi.org/10.1007/s10456-012-9324-7>
40. Vázquez-Membrillo M, Siqueiros-Márquez L, Núñez FF et al (2020) Prolactin stimulates the vascularization of the retina in newborn mice under hyperoxia conditions. *J Neuroendocrinol* 32:e12858. <https://doi.org/10.1111/jne.12858>
41. Ramírez M, Wu Z, Moreno-Carranza B et al (2011) Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:8944–8950. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8190>
42. Nguyen NQ, Cornet A, Blacher S et al (2007) Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL. *Mol Ther* 15:2094–2100. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300294>
43. Struman I, Bentzien F, Lee H et al (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
44. Stahl A, Connor KM, Sapiaha P et al (2010) The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2813–2826. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5176>
45. Arredondo Zamarripa D, Diaz-Lezama N, Melendez Garcia R et al (2014) Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8:333. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00333>
46. Garcia C, Aranda J, Arnold E et al (2008) Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 118:2291–2300. <https://doi.org/10.1172/JCI34508>
47. Nielsen DS, Shepherd NE, Xu W et al (2017) Orally absorbed cyclic peptides. *Chem Rev* 117:8094–8128. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00838>
48. Bentzien F, Struman I, Martini JF et al (2001) Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res* 61:7356–7362
49. Kim J, Luo W, Chen DT et al (2003) Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res* 63:386–393
50. Haas NB, Manola J, Uzzo RG et al (2016) Adjuvant sunitinib or sorafenib for high-risk, non-metastatic renal-cell carcinoma (ECOG-ACRIN E2805): a double-blind, placebo-controlled, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 387:2008–2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00559-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00559-6)
51. Nguyen N-Q-N, Tabruyn SP, Lins L et al (2006) Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14319–14324. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606638103>
52. Clapp C, Martínez de la Escalera L, Martínez de la Escalera G (2012) Prolactin and blood vessels: a comparative endocrinology perspective. *Gen Comp Endocrinol* 176:336–340. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.033>
53. Neduva V, Russell RB (2005) Linear motifs: evolutionary interaction switches. *FEBS Lett* 579:3342–3345. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.005>
54. Lyon KF, Cai X, Young RJ et al (2018) Minimotoif Miner 4: a million peptide minimotoifs and counting. *Nucleic Acids Res* 46:D465–D470. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1085>
55. Karagiannis ED, Popel AS (2008) A systematic methodology for proteome-wide identification of peptides inhibiting the proliferation and migration of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803241105>
56. Blanco JL, Porto-Pazos AB, Pazos A, Fernandez-Lozano C (2018) Prediction of high anti-angiogenic activity peptides in silico using a generalized linear model and feature selection. *Sci Rep* 8:15688. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33911-z>
57. Aykul S, Martinez-Hackert E (2016) Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Anal Biochem* 508:97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>
58. Hilfiker-Kleiner D, Haghikia A, Berliner D et al (2017) Bromocriptine for the treatment of peripartum cardiomyopathy: a multicentre randomized study. *Eur Heart J* 38:2671–2679. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx355>
59. Robles-Osorio ML, García-Franco R, Núñez-Amaro CD et al (2018) Basis and design of a randomized clinical trial to evaluate the effect of levosulpiride on retinal alterations in patients with diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:242. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00242>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Research Article

# Thrombin Cleaves Prolactin Into a Potent 5.6-kDa Vasoinhibin: Implication for Tissue Repair

Magdalena Zamora,<sup>1,\*</sup> Juan Pablo Robles,<sup>1,\*</sup> Manuel B. Aguilar,<sup>1</sup>  
Sergio de Jesús Romero-Gómez,<sup>3</sup> Thomas Bertsch,<sup>2</sup>  
Gonzalo Martínez de la Escalera,<sup>1</sup> Jakob Triebel,<sup>2</sup> and Carmen Clapp<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro 76230, México; <sup>2</sup>Institute for Clinical Chemistry, Laboratory Medicine and Transfusion Medicine, Nuremberg General Hospital and Paracelsus Medical University, Nuremberg 90419, Germany; and <sup>3</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro 76010, México

**ORCID numbers:** 0000-0001-5579-1004 (M. Zamora); 0000-0001-8429-1914 (J. P. Robles); 0000-0002-0315-3956 (M. B. Aguilar); 0000-0002-4309-3476 (G. Martínez de la Escalera); 0000-0002-1989-8645 (J. Triebel); 0000-0002-7670-6718 (C. Clapp).

\*M.Z. and J.P.R. contributed equally to this work.

**Abbreviations:** 2-ME, 2-mercaptoethanol; 6xHis, 6 histidine; bFGF, basic fibroblast growth factor; CPAEC, bovine pulmonary artery endothelial cell; DTT, dithiothreitol; ECGS, endothelial cell growth supplement; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; FBS, fetal bovine serum; GH, growth hormone; H1, first  $\alpha$ -helix; H4, fourth  $\alpha$ -helix; HPLC, high-performance liquid chromatography; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; L3, loop 3; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PL, placental lactogen; ppPRL, prolactin produced in *Pichia pastoris*; PRL, prolactin; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; TEER, transendothelial electrical resistance; tPA, tissue plasminogen activator; uPA, urokinase plasminogen activator; VEGF, vascular endothelial growth factor

Received: 21 June 2021; Editorial Decision: 18 August 2021; First Published Online: 21 August 2021; Corrected and Typeset: 30 September 2021.

## Abstract

Vasoinhibin is an endogenous prolactin (PRL) fragment with profibrinolytic, antivasopermeability, and antiangiogenic effects. The fact that blood clotting, vascular permeability, and angiogenesis are functionally linked during the wound-healing process led us to investigate whether thrombin, a major protease in tissue repair, generates vasoinhibin. Here, we have incubated human PRL with thrombin and analyzed the resulting proteolytic products by Western blot, mass spectrometry, high-performance liquid chromatography purification, recombinant production, and bioactivity. We unveil a main thrombin cleavage site at R48-G49 that rapidly (< 10 minutes) generates a 5.6-kDa fragment (residues 1-48) with full vasoinhibin activity, that is, it inhibited the proliferation, invasion, and permeability of cultured endothelial cells and promoted the lysis of a fibrin clot in plasma with a similar potency to that of a conventional 14-kDa vasoinhibin (residues 1-123). The R48-G49 cleavage site is highly conserved throughout evolution and precedes the intramolecular disulfide bond (C58-C174), thereby allowing the 5.6-kDa vasoinhibin to be released without a reduction step. Furthermore, the 5.6-kDa vasoinhibin is produced by endogenous thrombin during the clotting process. These

findings uncover the smallest vasoinhibin known, add thrombin to the list of PRL-cleaving proteases generating vasoinhibin, and introduce vasoinhibin as a thrombin-activated mechanism for the regulation of hemostasis, vasopermeability, and angiogenesis in response to tissue injury.

**Key Words:** prolactin, vasoinhibin, 16K prolactin, thrombin, antiangiogenesis, profibrinolysis

Angiogenesis, the formation of new blood vessels, is essential for many physiological processes including the repair of tissue after wounds and fractures. The different stages of tissue repair—coagulation, inflammation, angiogenesis, and tissue remodeling—are interlinked. In particular, the hemostatic plug that seals the tissue after wounding facilitates angiogenesis by acting as a scaffold for endothelial cell migration (1). Moreover, platelets in the plug provide angiogenic and antiangiogenic mediators that promote and keep vascularization in balance (1, 2). A major contributor to tissue repair is thrombin, a neutral serine protease that initiates hemostasis through platelet activation and fibrin clot formation, and acts as a growth factor to stimulate angiogenesis and vascular remodeling (3, 4). Moreover, thrombin counteracts the progress of coagulation and angiogenesis by activating anticoagulant protein C (4) and promoting the release from platelets of angiogenesis inhibitors such as thrombospondin (5) and endostatin (6). Its pivotal role in tissue repair prompted us to investigate thrombin as a candidate protease for the generation of vasoinhibin, a fragment of the hormone prolactin (PRL) that has antiangiogenic and profibrinolytic properties.

Vasoinhibin originates when the fourth  $\alpha$ -helix (H4) of PRL is removed by both specific proteolytic cleavage around loop 3 (L3) and reduction of the disulfide bond (C58-C174) that links H4 with the first  $\alpha$ -helix (H1) (7, 8). To date, endogenous vasoinhibin isoforms range from 14 to 18 kDa, which comprise the first 123 to 159 amino acid residues, respectively, depending on the cleavage site of proteases that include cathepsin D (9), matrix metalloproteinases (10), and bone morphogenetic protein 1 (11). Vasoinhibin inhibits the proliferation, survival, permeability, and dilation of blood vessels (7, 8, 12). It binds to a multicomponent complex formed by plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), urokinase plasminogen activator (uPA), and the uPA receptor on endothelial cell membranes (13) to inhibit the signaling pathways (Ras-Raf-MAPK, Ras-Tiam1-Rac1-Pak1, PI3K-Akt, and PLC $\gamma$ -IP $_3$ -eNOS) activated by several proangiogenic and vasopermeability factors (vascular endothelial growth factor [VEGF], basic fibroblast growth factor [bFGF], interleukin 1 $\beta$ , and bradykinin) (7, 8, 12). Vasoinhibin also promotes fibrinolysis by blocking PAI-1-mediated inhibition of plasmin production by uPA (13). Assuming that vasoinhibin could be generated by thrombin,

we reasoned that the profibrinolytic, antivasopermeability, and antiangiogenic properties of vasoinhibin could be valuable during tissue repair.

A previous study excluded thrombin for the generation of vasoinhibin on the basis that it cleaved PRL between K53 and A54 to generate a C-terminal fragment of 16.8 kDa (amino acids 54-199) devoid of antiangiogenic effects (14). However, the remaining N-terminal fragment of 6.2 kDa (amino acids 1-53) generated by thrombin was not identified nor investigated for bioactivity. Such omission is of relevance since the functional determinant of vasoinhibin comprises only 3 residues (H46-G47-R48) located at the N-terminal end (15). Here, we confirmed the K53-A54 cleavage site and unveiled 2 additional ones (R48-G49 and R103-G104) that resemble the thrombin consensus cleavage sequence (R-G) in fibrinogen, its natural substrate (16-18). Thrombin cleavage at R48-G49 resulted in a vasoinhibin of 5.6 kDa (amino acids 1-48) with antiangiogenic, antivasopermeability, and profibrinolytic actions. The 5.6-kDa vasoinhibin lacks C58 and, thereby, avoids the need for the reduction of the C58-C174 intramolecular disulfide bond that is required for the release of all other vasoinhibin isoforms; it is produced by endogenous thrombin during clotting and may be of functional significance during tissue repair.

## Materials and Methods

### Materials

Recombinant human PRL generated in *Escherichia coli* was provided by Michael E. Hodsdon (Yale University), bovine PRL was from National Hormone and Pituitary Program (AFP4835B, NHPP, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases [NIDDK] and AF Parlow), and recombinant vasoinhibin (corresponding to the first 123 amino acids of human PRL) was generated by site-directed mutagenesis in insect cells as previously described (19). Antihuman PRL antiserum (HC1) was obtained locally and characterized as reported (20). The monoclonal antibody against the N-terminus of human PRL (5602) (RRID:AB\_2391503) was from Diagnostics Biochem Canada Inc (9), and the monoclonal antibody against the C-terminus of human PRL (INN-368) was generated (21) and characterized (22) as reported. Antibovine



PRL antiserum (CL-2) was raised locally against NIDDK bovine PRL (23). Human thrombin purified from plasma was from Sigma-Aldrich. Recombinant human VEGF-165 was a gift from Genentech and bFGF was donated by Scios, Inc.

### Prolactin Cleavage by Thrombin

PRL (2  $\mu$ g) and thrombin (1  $\mu$ g) were incubated in a final volume of 25  $\mu$ L of 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer (pH 7.4) at 37 °C for 24 hours under agitation (550 rpm). The independent incubation of PRL and thrombin under the same conditions were used as controls. The reaction was stopped by adding Laemmli sample buffer immediately followed by tricine sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) or by storing the samples at –70 °C.

### Tricine Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis

The PRL products generated by thrombin cleavage were analyzed by 16%T and 6%C SDS-PAGE with tricine (Bio-Rad, Hercules, CA) in the running buffer instead of glycine. Tricine SDS-PAGE is the preferred electrophoretic system for the resolution of proteins smaller than 30 kDa (24). Laemmli sample buffer containing (reducing) or not (nonreducing) 1% 2-mercaptoethanol (2-ME) (v/v) was added to 25  $\mu$ L of the cleavage reaction and the samples were then incubated for 15 minutes at 97°C. Molecular weight markers (Precision Plus Protein Dual Xtra, Bio-Rad) estimated the weight of proteins smaller than 10 kDa. Gels were stained for total protein with Coomassie blue G-250 or with the ProteoSilver Plus Silver Stain kit (Sigma-Aldrich).

### Western blot

Proteins in gels were transferred to nitrocellulose membranes at 23 V for 40 minutes. Membranes were blocked (4% nonfat skimmed milk in 0.1% Tween 20 phosphate-buffered saline) for 1 hour at room temperature and probed with 1:500 antihuman PRL antiserum (HC1) or 1:500 of the antibovine PRL antiserum (CL-2). The monoclonal antibodies directed against the N-terminal end (5602) or C-terminal end (INN-368) of human PRL were used at 1:250 or 1:350, respectively. Detection used 1:5000 alkaline phosphatase-linked antirabbit or antimouse secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) in 1% bovine serum albumin, 0.1% Tween–phosphate-buffered saline for 90 minutes and the alkaline phosphatase conjugate substrate kit (Bio-Rad).

### Matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry

Human PRL (20  $\mu$ g) and thrombin (10  $\mu$ g) were incubated in a final volume of 250  $\mu$ L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer for 24 hours at 37 °C. Samples were desalted by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC; Agilent 1100) using a C18 HPLC column (Vydac 218TP54, 4.6  $\times$  250 mm, 5- $\mu$ m particle size), dried in a Savant SpeedVac concentrator (Thermo Fisher Scientific), and resuspended in 10  $\mu$ L  $\text{ddH}_2\text{O}$  with or without 80 mM dithiothreitol (DTT). The sample containing DTT was heated at 56 °C and incubated for 1 hour at 550 rpm. Protein concentration was estimated by Coomassie-stained tricine SDS-PAGE. A total of 1  $\mu$ L (1.75  $\mu$ g) of protein was mixed with 1  $\mu$ L of laser energy–absorbing matrix (sinapinic acid, 15 mg in 1 mL acetonitrile:  $\text{H}_2\text{O}$ -0.1% trifluoroacetic acid, 60:40 v/v) and 1  $\mu$ L was deposited on the sample holder. Positive ion mass spectra were acquired on a matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight (MALDI-TOF) Microflex instrument (Bruker) in the linear mode using delayed extraction. Internal and external calibration were performed using angiotensin II, cytochrome C, and myoglobin (singly  $[\text{M} + \text{H}]^+$  and doubly  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$  protonated molecules). mMass 5.5.0 software (25) was used to analyze mass spectrometric data, where visually relevant peaks were evaluated using sequence and peptide fragmentation tools and PRL sequence as reference.

### High-performance Liquid Chromatography Isolation of Thrombin-generated Prolactin Products

Human PRL (200  $\mu$ g) and thrombin (100  $\mu$ g) were coincubated in 2.5-mL  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer for 24 hours at 37 °C. Reaction mixture aliquots (300 and 800  $\mu$ L) were added with up to 5-mL deionized water, reduced with 80-mM DTT, loaded onto a C18 HPLC column (Vydac 218TP54, 4.6  $\times$  250 mm, 5- $\mu$ m particle size), and eluted under a linear gradient of 0.09% trifluoroacetic acid (v/v) in 90% (v/v) aqueous acetonitrile at a flow rate of 1 mL/min. Absorbance was monitored at 210 nm. The reduction buffer (80-mM DTT) served as a blank to identify relevant sample peaks. Fractions were manually collected, dried in a Savant SpeedVac concentrator, dissolved in 50  $\mu$ L of deionized water, and dried again. Finally, the dried fractions were resuspended in deionized water, quantified for protein using the Bradford reagent (Bio-Rad), and evaluated by Western blot and bioactivity.

### Production of 6xHis-tagged Human Prolactin in *Pichia pastoris*

The messenger RNA sequence of human PRL (NM\_001163558.2), without the signal peptide (residues 1-28), was optimized (o.hPRL) with GeneOptimizer software (Thermo Fisher Scientific). A KEX protease cleavage site (containing an XhoI site), a polyhistidine-tag (6 histidine [6xHis]) followed by an Xa cleavage site (IEGR) were inserted at the 5' extreme of the o.hPRL and an XbaI restriction site introduced at its 3' end. The sequence was then artificially synthesized (GeneOracle) and subcloned into pPICZ $\alpha$ A plasmid upstream and on frame with the  $\alpha$ -mating factor secretion signal of *Saccharomyces cerevisiae* (EasySelect Pichia Expression kit, Invitrogen) with restriction enzymes XhoI and XbaI (49). Plasmid was transformed into *E coli* XL-Blue strain and expanded in low-salt LB medium with 25- $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of zeocin (Invitrogen). The purified plasmid was linearized with enzyme SacI and electroporated into the GS115 *Pichia pastoris* strain. At least 30 colonies growing under 500- $\mu$ g mL<sup>-1</sup> or more zeocin were incubated in liquid yeast extract-peptone-dextrose and evaluated for PRL production. The highest-producing strain was selected and grown in BMGY media containing 100- $\mu$ g mL<sup>-1</sup> zeocin at 30 °C under agitation (200 rpm). After 48 hours, 1 L of culture was centrifuged (3000  $\times$  g for 20 minutes) and the pellet resuspended in 200 mL BMMY media. A total of 4 mL of sterile methanol was added daily to the culture for 2 days (when the induction of PRL reached > 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). A total of 200 mL of culture was then centrifuged to remove yeast. PRL in supernatant was purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography (Qiagen) and desalted using a HiTrap Desalting column (GE Life Sciences) and the ÄKTA Prime FPLC System (Amersham BioSciences). The purity of the PRL produced in *Pichia pastoris* (ppPRL) was evaluated by silver-stained tricine SDS-PAGE and its bioactivity determined by the Nb2 cell bioassay as reported previously (26).

### Production and Isolation of 5.6-kDa Vasoinhibin From Prolactin Produced in *Pichia pastoris*

To produce and purify the 5.6-kDa vasoinhibin (residues 1-48) from ppPRL, 200  $\mu$ g of ppPRL were incubated with thrombin (100  $\mu$ g) in 2.5-mL NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer (pH 7.4) for 30 hours at 37 °C under agitation (550 rpm). The 6xHis-tagged fragment was purified by Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography (Qiagen) in the presence or absence of 80-mM DTT. The eluted sample was desalted (HiTrap Desalting column and ÄKTA Prime FPLC System), concentrated (Savant SpeedVac), and evaluated by tricine SDS-PAGE for total protein (Coomassie blue and silver stain) and by

Western blot probed with 1:200 anti-6xHis-tag monoclonal antibody (Abcam). Desalted samples, without DTT, were concentrated and quantified for protein (Coomassie blue and Bradford reagent), diluted in sterile ddH<sub>2</sub>O, and evaluated for bioactivity.

### Dissociation of Highly Stable 5.6-kDa Vasoinhibin Homodimer and Homotrimer in Concentrated Affinity Chromatography Eluates

A homodimer and, to a lesser degree, a homotrimer of 5.6-kDa vasoinhibin in the Ni<sup>2+</sup>-NTA eluate were resistant to reducing SDS-PAGE and required the following harsher denaturing and reducing conditions to dissociate (modified from Grigorian) (27). Briefly, 1  $\mu$ g of protein eluted from the Ni<sup>2+</sup>-NTA column was treated with reducing Laemmli sample buffer plus 10% (v/v) 2-ME, 8-M urea, and 80-mM DTT and incubated for 5 hours at 97 °C at 550 rpm. Immediately after incubation, samples were resolved in tricine SDS-PAGE and silver-stained (ProteoSilver Plus Silver Stain kit) or immunoblotted with 1:200 anti-6xHis-tag antibody.

### Endothelial Cell Proliferation

Bovine pulmonary artery endothelial cells (CPAECs) from ATCC (CCL-209, Manassas, VA, USA) were cultured in Eagle's minimum essential medium (EMEM, ATCC 30-2003) supplemented with 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 100 U mL<sup>-1</sup> of penicillin-streptomycin. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained (28) and cultured in F12K medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 20% FBS, 100- $\mu$ g mL<sup>-1</sup> heparin (Sigma-Aldrich), 25- $\mu$ g mL<sup>-1</sup> endothelial cell growth supplement (ECGS), and 100-U mL<sup>-1</sup> of penicillin-streptomycin. CPAECs were seeded at a density of 6250 cells cm<sup>-2</sup> in a 96-well plate and, after 24 hours, starved with 0.5% FBS for 24 hours. Cells were then treated or not with 40 ng mL<sup>-1</sup> of bFGF in starvation medium for 24 hours with or without a 100-nM protein concentration of thrombin-derived PRL fragments in each of the HPLC fractions or a 14-kDa vasoinhibin comprising the first 123 amino acids of human PRL (positive control). HUVECs were seeded at 14 000 cells cm<sup>-2</sup> in a 96-well plate and, after 24 hours, starved with 0.5% FBS for 12 hours. The medium was refreshed with 20% FBS-F12K and incubated with 100- $\mu$ g mL<sup>-1</sup> heparin together with 25-ng mL<sup>-1</sup> of recombinant VEGF and 20-ng mL<sup>-1</sup> bFGF for 24 hours alone or in combination with different concentrations of the 5.6-kDa vasoinhibin isolated from cleaved ppPRL or the vasoinhibin-positive control. DNA synthesis was quantified by the DNA incorporation of the

thymidine analog 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU; Sigma-Aldrich) added at the time of treatments and labeled by the click reaction with fluorescent Azide Fluor 545 (Sigma Aldrich) as reported previously (29). Images were obtained in a fluorescence-inverted microscope (Olympus IX51) and quantified using CellProfiler software (30). The number of EdU-positive CPAECs over total DNA (Hoechst)-stained cells was normalized to the maximum value of proliferation of cells treated only with bFGF, whereas the number of EdU-positive HUVECs over total cells was normalized to the maximum and minimum observed proliferation values.

### Endothelial Cell Invasion Assay

The transwell Matrigel barrier assay (31) was used. CPAECs were seeded at 7500 cells  $\text{cm}^{-2}$  on the upper (luminal) side on an 8- $\mu\text{m}$  pore insert coated with 0.38- $\text{mg mL}^{-1}$  Matrigel (BD Biosciences) in starvation EMEM medium (0.5% FBS) and incubated for 24 hours at 37 °C with or without a 100-nM concentration of PRL-cleaved products in the HPLC fractions or the vasoinhibin-positive control. Filtered conditioned media from CPAECs containing 20% FBS added to the lower (abluminal) chamber served as chemoattractant. HUVECs were seeded at 14 000 cells  $\text{cm}^{-2}$  on the Matrigel-coated luminal side in starvation F12K medium (0.5% FBS and no ECGS) and incubated or not with 100 nM of the 5.6-kDa vasoinhibin isolated from cleaved ppPRL or the vasoinhibin-positive control. Conditioned medium of 3T3-L1 cells containing 10% FBS and VEGF (50 ng  $\text{mL}^{-1}$ ) in the lower chamber served as chemoattractant. After 24 hours (CPAECs) or 16 hours (HUVECs), invading cells in the abluminal side were fixed, permeabilized, stained, and counted.

### Endothelial Cell Monolayer Permeability Assay

HUVEC were seeded on 6.5-mm transwell with a 0.4- $\mu\text{m}$  pore insert in complete medium (20% FBS, heparin, and ECGS) and maintained until confluence. Transendothelial electrical resistance (TEER) was measured with the epithelial EVOM<sup>2</sup> volt/Ohm meter (World Precision Instruments). When the TEER values were stable, the endothelial cell monolayers were treated with or without 100 nM of the 5.6-kDa vasoinhibin isolated from cleaved ppPRL or the vasoinhibin-positive control for 1 hour before adding 50-ng  $\text{mL}^{-1}$  VEGF. TEER was measured for 120 minutes and the values were normalized relative to those of the control monolayer.

### Fibrinolysis Assay

Healthy human blood was collected into a 3.2% sodium citrate coagulation tube (BD Vacutainer). Plasma was

obtained by centrifugation (1200g for 10 minutes at 4 °C) and kept at 4 °C during handling. Plasma (24  $\mu\text{L}$ ) was added to a 96-well microtiter plate, on which each well contained 20  $\mu\text{L}$  of 50-mM  $\text{CaCl}_2$ . Absorbance at 405 nm evaluated turbidity as an index of clot formation immediately after plasma addition and at 5-minute intervals. Before clotting, a 0.5- $\mu\text{M}$  concentration of PAI-1 (Thermo Fisher Scientific) was preincubated in 10-mM Tris-0.01% Tween 20 (pH 7.5) at 37 °C for 10 minutes with or without a 3- $\mu\text{M}$  concentration of 5.6-kDa vasoinhibin isolated from cleaved ppPRL, the 16.8-kDa fragment (HPLC, fraction f), or vasoinhibin-positive control. Once the clot was formed (~20 minutes) treatments were added to give the following final concentration per well: 24% plasma, 10-mM  $\text{CaCl}_2$   $\pm$  60-pM human tissue plasminogen activator (tPA, Sigma-Aldrich) in 100  $\mu\text{L}$  of 10-mM Tris, 0.01% Tween 20 (pH 7.5). Treatment with tPA was in the absence or presence of PAI-1 (0.05  $\mu\text{M}$ ) with or without 0.3- $\mu\text{M}$  5.6-kDa vasoinhibin isolated from cleaved ppPRL, the 16.8-kDa fragment (HPLC, fraction f), or vasoinhibin control. Clot lysis was monitored by absorbance at 405 nm every 5 minutes throughout 80 minutes.

### Generation of 5.6-kDa Vasoinhibin by Endogenous Thrombin During Clot Formation

Human PRL generated in *E coli* was added to a final concentration of 10  $\mu\text{M}$  in 120  $\mu\text{L}$  of healthy human plasma in the presence or absence of 10 units of the thrombin inhibitor, hirudin (Sigma-Aldrich). Clotting was facilitated by 10-mM  $\text{CaCl}_2$  and incubation at 37 °C for 30 minutes. After incubation, the clot was removed and PRL fragments were evaluated in plasma by immunoprecipitation-Western blot. Briefly, the clotted plasma was resuspended and 100  $\mu\text{L}$  immunoprecipitated overnight with 2  $\mu\text{L}$  of antihuman PRL antiserum (HC1) at 4 °C, followed by a 2-hour incubation at 4 °C with protein A Sepharose beads (40  $\mu\text{L}$ ; Sigma-Aldrich). The sample was centrifuged and washed, and the pellet was resuspended in reducing Laemmli sample buffer, heated at 97 °C for 15 minutes under agitation (550 rpm), centrifuged for 5 minutes (3000g at 4 °C), and subjected to tricine SDS-PAGE-Western blot probed with the HC1 antiserum or monoclonal antibodies against the N- or C-termini of human PRL. Detection used alkaline phosphatase-coupled secondary antibodies and a colorimetric kit (Bio-Rad).

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (v 9.1.0 for MacOS, GraphPad Software). One-way or

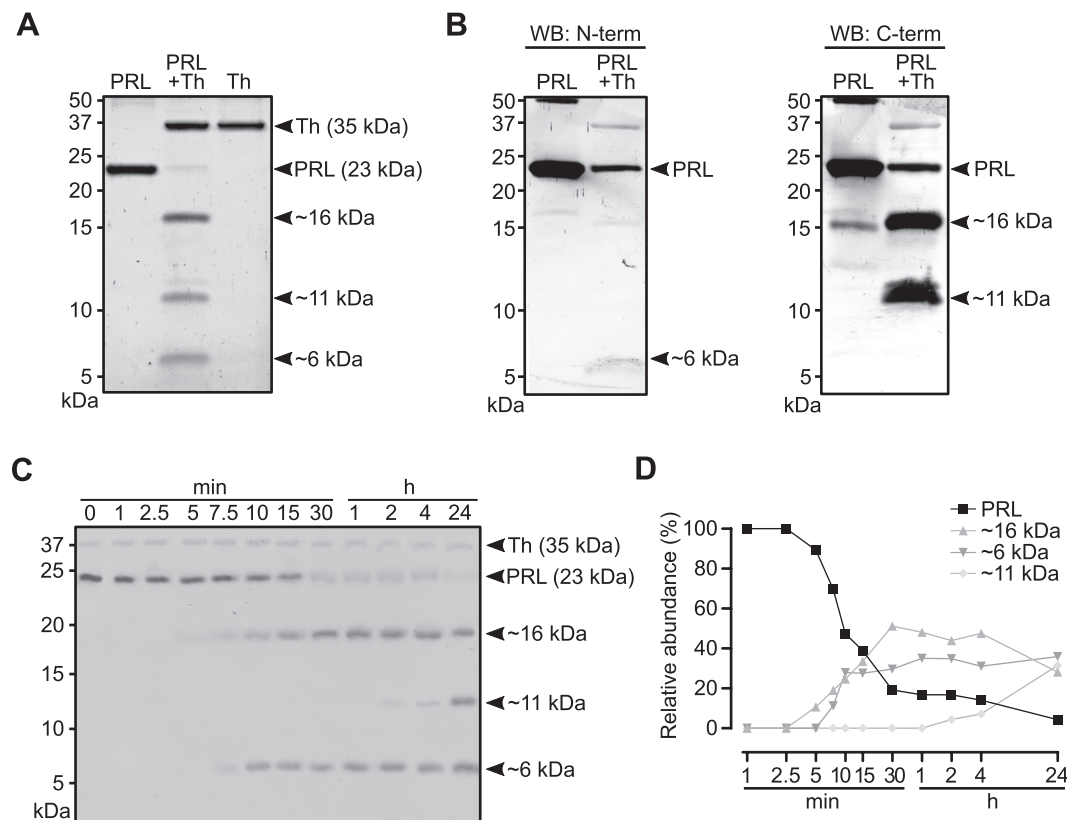
2-way analysis of variance followed by the Dunnett test (when comparing to a control) or Bonferroni or Tukey test (when comparing to every other group) were used. The dose-response curves were fitted by least square regression analysis with a variable slope model calculated with at least 54 points. The overall significance threshold was set at a *P* value less than .05, unless otherwise indicated.

## Results

### Thrombin Rapidly Cleaves Prolactin and Generates a 5.6-kDa Fragment

Human PRL was incubated with thrombin and the resulting proteolytic products were evaluated by tricine SDS-PAGE stained for total protein. Thrombin generated the reported approximately 16-kDa fragment (14), the approximately 6-kDa expected counterpart, and an additional approximately 11-kDa fragment not previously described (Fig. 1A). The identity of these fragments was

further investigated by Western blot using monoclonal antibodies directed against the N- or the C-terminal region of human PRL (Fig. 1B). Western blots confirmed the N-terminal and C-terminal nature of the approximately 6-kDa and approximately 16-kDa products, respectively. The approximately 11-kDa fragment corresponded to the C-terminal region of PRL indicating that a putative thrombin cleavage site is present around the midpoint of the PRL molecule, although the complementary approximately 11-kDa N-terminal fragment was not detected (Fig. 1B). A timeline analysis showed that the approximately 6- and 16-kDa fragments were rapidly produced and detected as early as 7.5 minutes postthrombin incubation (Fig. 1C). In contrast, the generation rate of the approximately 11-kDa fragment was much slower and began to be detected 2 hours postthrombin incubation. The concomitant decrease and increase of the approximately 16-kDa and 11-kDa fragments, respectively, observed between 4 and 24 hours (Fig. 1D), suggested that the approximately 16-kDa fragment was the precursor of the approximately 11-kDa product. Consistent with



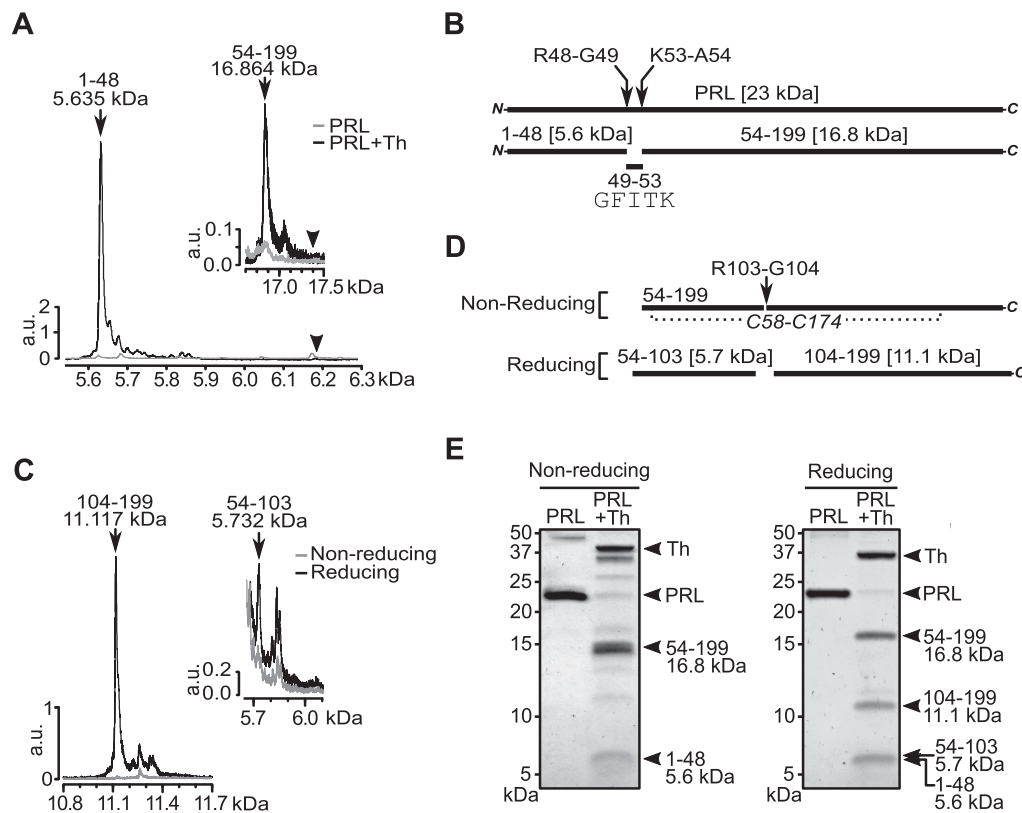
**Figure 1.** Thrombin rapidly cleaves prolactin (PRL) into approximately 6- and 16-kDa fragments and subsequently into an approximately 11-kDa fragment. Human PRL was incubated with thrombin (PRL +Th) and the resulting PRL proteolytic products were evaluated by A, reducing tricine sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) stained for total protein (Coomassie blue) or B, analyzed by Western blots probed with monoclonal antibodies against the N-terminal or C-terminal of PRL. The independent incubation of PRL or Th served as controls. Numbers on the left indicate the molecular weights of marker proteins. C, Total protein SDS-PAGE analysis of PRL proteolytic products generated by the incubation with Th at different time points. D, Densitometric values of PRL fragments relative to nonincubated PRL to indicate their generation rate throughout time. Time points are in base-10 log scale. These results were confirmed by at least 3 independent experiments.

the generation of the approximately 6-kDa and 16 kDa fragments occurring at a main cleavage site, thrombin cleaved a vasoinhibin of 14 kDa (amino acid residues 1-123) only into fragments of approximately 6 and 9 kDa (Supplementary Fig. 1) (49).

### The 5.6-kDa Fragment Corresponds to Residues 1 to 48 of Prolactin

MALDI-TOF mass spectrometry determined the precise molecular mass of the PRL fragments generated by thrombin cleavage. The 6.2-kDa fragment (residues 1-53) expected from the study by Khurana and colleagues (14) was absent. Instead, a 1 to 48 amino acid fragment having a molecular mass of 5.635 kDa was found (Fig. 2A), indicating a cleavage site between residues R48-G49 (Fig. 2B). However, the approximately

16-kDa fragment did correspond to the one previously reported (14). It comprised residues 54 to 199 and had a molecular mass of 16.864 kDa (see Fig. 2A), confirming the cleavage at K53-A54. Therefore, thrombin cleaved PRL at both sites (R48-G49 and K53-A54), resulting in the release of a 5-amino acid peptide (residues 49-53) (see Fig. 2B). Moreover, a previously unidentified cleavage site was found at R103-G104 that split the 54 to 199 fragment into fragments of 11.117 kDa (residues 104-199) and 5.732 kDa (residues 54-103) (Fig. 2C and 2D). This cleavage pattern showed that the 16.8-kDa product is the precursor of the 11.1-kDa fragment. As expected by the location of the C58-C174 disulfide bond (see Fig. 2D), the 11.1- and 5.7-kDa fragments were detected only under reducing conditions (Fig. 2C and 2E), whereas the 1 to 48 fragment was detected without reduction (see Fig. 2E).

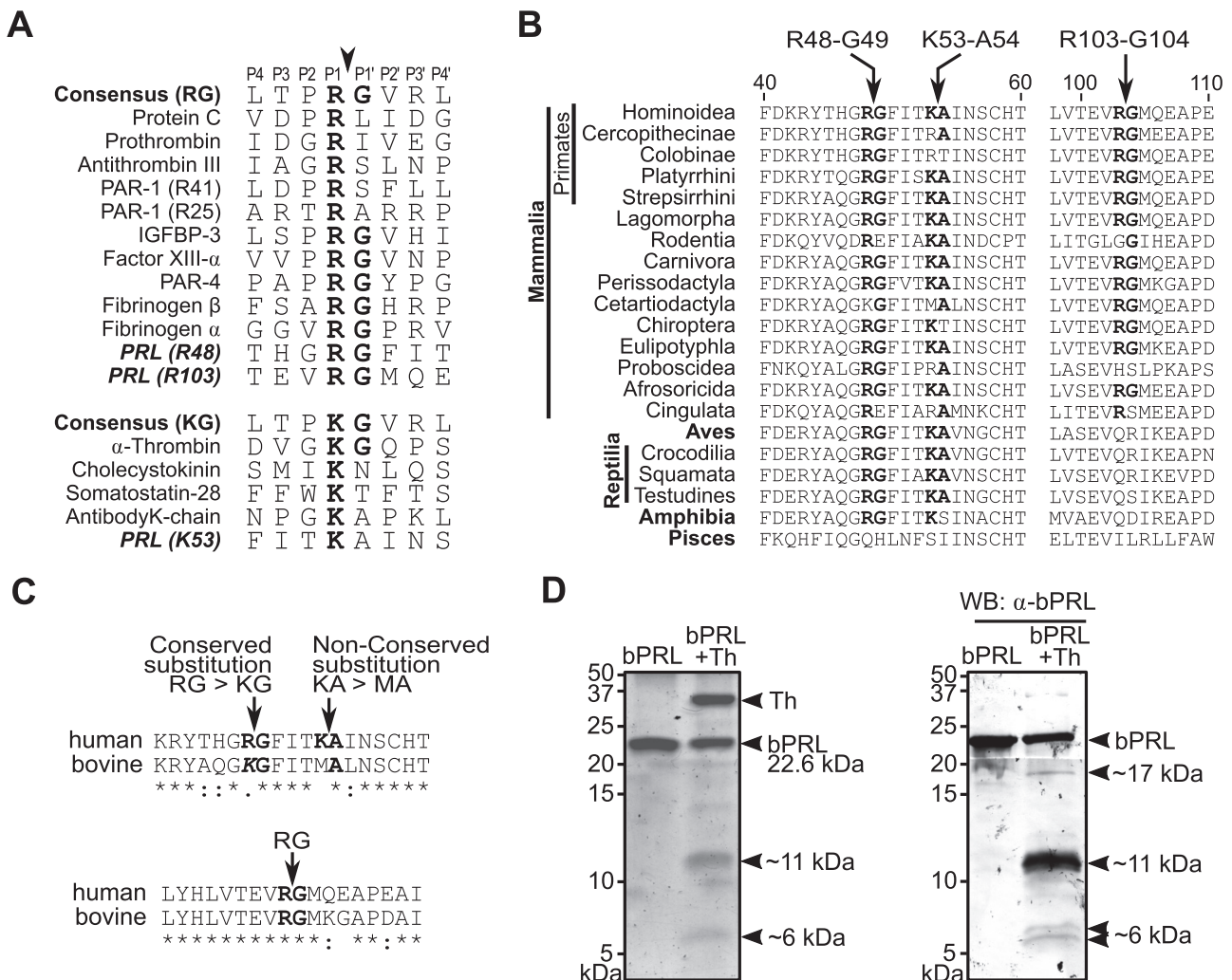


**Figure 2.** Thrombin cleaves prolactin (PRL) into an N-terminal 5.6-kDa fragment and a 16.8- and 11.1-kDa C-terminal fragments. **A**, Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) spectra under nonreducing conditions indicating (arrows) fragments of 5.635 kDa and 16.864 kDa comprising residues 1 to 48 and 54 to 199 of PRL, respectively. The position where fragments comprising residues 1 to 53 (~ 6.2 kDa) and 49 to 199 (~ 17.5 kDa) should appear, but are absent, is indicated (arrowheads). **B**, Diagram showing the location of thrombin (Th) cleavage sites R48-G49 and K53-A54 in PRL and their resulting fragments. Amino acid sequence of the 49 to 53 peptide is indicated. **C**, MALDI-TOF spectra showing that products comprising residues 104 to 199 and residues 54 to 103 were detected under reducing conditions and not under nonreducing conditions. **D**, Diagram showing the location of the Th R103-G104 cleavage site in the 54 to 199 fragment, the presence of the disulfide bond C58-C174, and the fragments that result after reduction of such disulfide bond. **E**, Representative nonreducing and reducing Coomassie blue-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis showing human PRL incubated in the absence (PRL) or presence of Th (PRL +Th). Numbers on the left indicate the molecular weights of marker proteins. The residues and molecular masses of the products (arrows) are indicated. These results were confirmed by at least 3 independent experiments.

## R48-G49 Is the Main Thrombin Cleavage Site in Prolactin

The new cleavage sites have the thrombin cleavage sequence (RG) found in its natural protein targets (16-18). The site in the substrate where cleavage occurs is conventionally defined as the bond between P1 and P1', and most thrombin substrates have R at the P1 cleavage site, whereas fibrinogens have R-G as a P1-P1' cleavage sequence (Fig. 3A). Moreover, the substitution of R for K results in only 15% of effectiveness for thrombin cleavage (18). These observations suggest that R48-G49 is the main site of thrombin cleavage in PRL and that the K53-A54 site is of

lower efficiency. The relevance of the 3 thrombin cleavage sites in PRL is supported by their high evolutionary conservation. The R48-G49 and K53-A54 sequences are conserved in the PRL of almost all vertebrates, whereas the R103-G104 site is present only in mammals (Fig. 3B). Along this line, bovine PRL has a conserved substitution of R48 to K48, a nonexistent K53-A54 site, and a conserved R103-G104 site (Fig. 3C), so the incubation of bovine PRL with thrombin resulted in a predominant approximately 11-kDa product (presumably comprising residues 104-199) and low levels of approximately 6-kDa fragments that likely correspond to residues 1 to 48 and residues 49 to 103 (Fig. 3D).

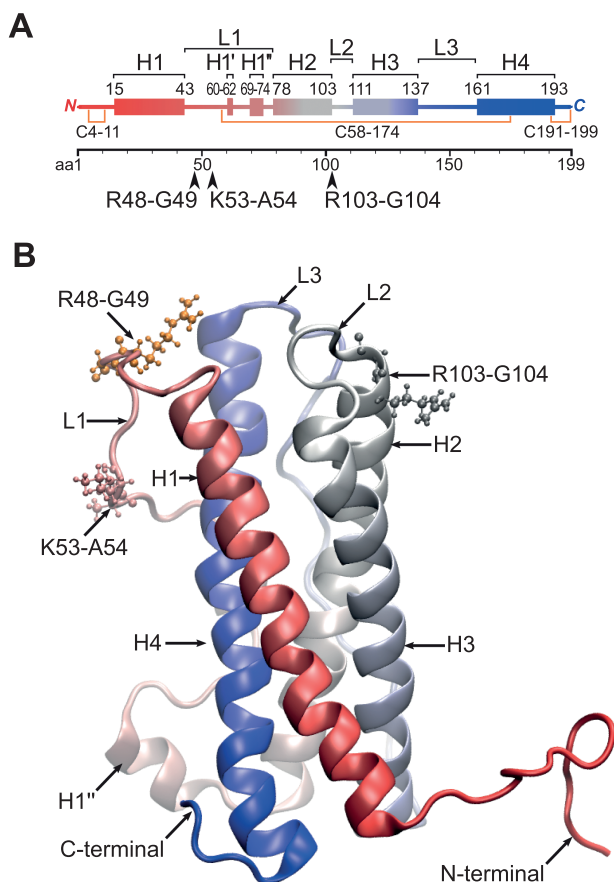


**Figure 3.** Thrombin cleavage sites in prolactin (PRL) resemble those of other thrombin substrates and are highly conserved in PRL throughout evolution. A, Alignment of thrombin (Th) natural substrates having the consensusTh RG cleavage site and its K for R substitution. The sequence of human PRL is included at the level ofTh cleavage sites R48, R103, and K53. Conserved RG and KG are indicated in bold and the cleavage site with an arrowhead. B, Alignment of vertebrate PRL sequences where conservedTh cleavage sites are in bold. C, Alignment of human and bovine PRL sequences indicating same (\*), similar (:), less similar (.), and dissimilar (blank) residues. Cleavage sites are indicated in bold; conserved substitution KG is indicated in italics. D, Representative reducing Coomassie blue-stained sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot probed with antibovine PRL antiserum showing proteolytic products of bovine PRL incubated in the absence (bPRL) or presence (bPRL +Th) of Th. Numbers on the left indicate the molecular weights of marker proteins. Estimated molecular weights of bands are indicated. These results were confirmed by at least 3 independent experiments.

The 3 thrombin cleavage sites in human PRL are located within loop 1 (R48-G49 and K53-A54) and loop 2 (R103-G104) (Fig. 4A), which are highly mobile and accessible regions of the molecule (Fig. 4B). Cleavage of human PRL at the two sites in loop 1 occurs first to generate the 5.6-kDa and 16.8-kDa fragments and, subsequently, the cleavage at loop 2 produces the 11.1-kDa fragment (Fig. 1C and 1D).

### Thrombin Generates Vasoinhibin From Prolactin

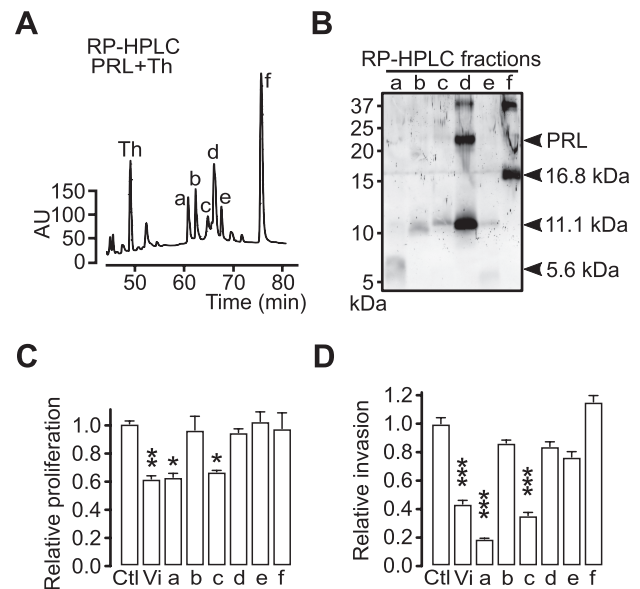
To evaluate their vasoinhibin nature, the PRL fragments derived from thrombin cleavage were purified by reverse-phase HPLC and tested for their antiangiogenic properties on endothelial cells in culture. Large amounts of PRL and thrombin were coincubated, reduced, and fractionated by reverse-phase HPLC. The chromatogram showed well-defined peaks (Fig. 5A) that were collected and analyzed by



**Figure 4.** Location of thrombin cleavage sites in the secondary and tertiary structure of prolactin (PRL). A, Diagram of the secondary structure of the human PRL indicating loops (L1-L3) and  $\alpha$ -helices (H1-H4). The amino acid residues at the beginning and end of each helix are indicated. Disulfide bonds are shown in orange and thrombin (Th) cleavage sites with arrowheads. B, Structure of soluble PRL (PDB:1RW5) indicating the location of Th cleavage sites.

Western blot (Fig. 5B). Fraction (a) contained a PRL fragment of approximately 6 kDa, fractions (b to e) contained approximately 11-kDa fragments, and fraction (f) contained the fragment of approximately 16 kDa. Uncleaved PRL was found in fraction (d) with the highest level of the approximately 11-kDa fragment (see Fig. 5B). Because of their high relative abundance, the approximately 6-kDa fragment in fraction (a) likely corresponds to the 5.6-kDa fragment (residues 1-48), and the approximately 11 kDa and 16 kDa fragments in fractions (d and f), respectively, to the 11.1-kDa fragment (residues 104-199) and 16.8-kDa fragment (residues 54-199), respectively.

The same protein concentration (100 nM) of each reverse-phase HPLC fraction was tested for its ability to inhibit the bFGF-induced proliferation of CPAECs in culture. A 100-nM concentration of the vasoinhibin standard of 14 kDa was the positive control, and proliferation was evaluated by the incorporation of the thymidine analog EdU into DNA detected by the click reaction. Fractions (a and c) inhibited bFGF-induced CPAEC proliferation to a similar level as vasoinhibin, whereas the rest of



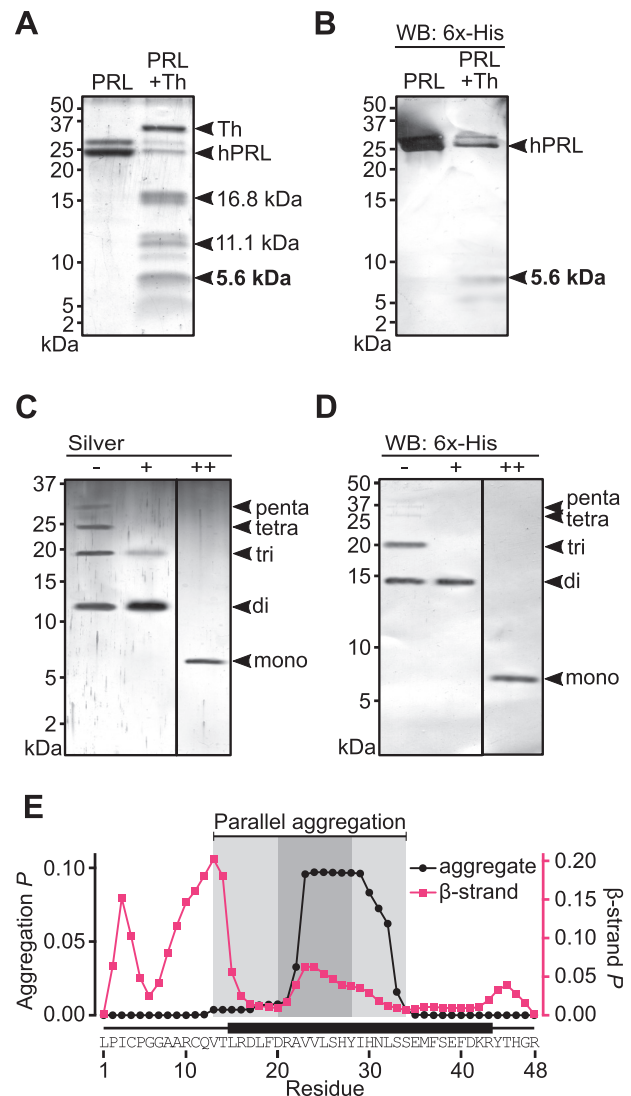
**Figure 5.** Thrombin generates vasoinhibin from prolactin (PRL). A, Reverse phase (RP)-high-performance liquid chromatography (HPLC) chromatographic purification of PRL fragments derived from thrombin cleavage. Absorbance units (AU) at OD<sub>210 nm</sub> corresponding to main fractions (a-f). B, Reducing Western blot analysis of RP-HPLC fractions (a-f). Numbers on the left indicate the molecular weights of marker proteins. C, Proliferation of bovine pulmonary artery endothelial cells (CPAECs) relative to basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulation in the absence (Ctl) or presence of 100-nM vasoinhibin standard (Vi) or PRL fragments in the RP-HPLC fractions. D, Invasion of CPAEC cells in a transwell Matrigel barrier assay relative to 20% fetal bovine serum stimulation in the absence (Ctl) or presence of 100-nM Vi or PRL fragments in the RP-HPLC fractions. \**P* less than .05, \*\**P* less than .01, and \*\*\**P* less than .001 vs Ctl. Values are means  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments.

the fractions had no effect (Fig. 5C). Likewise, and like vasoinhibin, fractions (a and c) inhibited VEGF-induced CPAEC invasion in the transwell Matrigel barrier assay and the rest of the fractions were inactive (Fig. 5D). Because fraction (a) contained only the 5.6-kDa fragment derived from thrombin cleavage, we concluded that the peptide comprising residues 1 to 48 of PRL is antiangiogenic and thereby a vasoinhibin. Lack of antiangiogenic activity in fractions (b, d, and e) was consistent with the 11.1- and 16.8-kDa proteins being C-terminal fragments of PRL and, thus, with the antiangiogenic domain being H46-G47-R48 (15). However, fraction (c) contained an approximately 11-kDa product that inhibited the proliferation and invasion of endothelial cells. The nature of this antiangiogenic approximately 11-kDa fragment is unclear. It could correspond to the N-terminal fragment generated by thrombin cleavage at the R103-G104 site, although such a fragment was not detected by Western blot (see Fig. 1B) or mass spectrometry (not shown). Alternatively, it may correspond to the 5.6-kDa vasoinhibin dimer resistant to SDS-PAGE reduction (see next section).

### Biological Characterization of 5.6-kDa Vasoinhibin

To increase the availability of sufficient amounts of the 5.6-kDa vasoinhibin (residues 1-48) for biological characterization, we attempted its recombinant production and chemical synthesis. Both procedures were unsuccessful (data not shown). The small size was a major drawback in the already challenging recombinant production of vasoinhibin in HEK293T cells (32). The chemical synthesis was not possible because of the peptide's propensity to aggregate due to its high hydrophobicity profile (Supplementary Fig. 2) (49). We then aimed to produce a recombinant human ppPRL with 6 histidine (6xHis) residues attached to the N-terminus, to facilitate the purification of the 5.6-kDa vasoinhibin generated by thrombin (Supplementary Fig. 3A and 3B) (49). Production levels as high as 100 mg/L were obtained for ppPRL, and its purification through immobilized metal affinity chromatography ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA) did not modify its biological properties in the Nb2 cell proliferation assay (Supplementary Fig. 3C) (49). Coomassie-stained SDS-PAGE showed that the cleavage of ppPRL with thrombin generated the expected 6xHis-tagged 5.6-kDa vasoinhibin, and the 11.1-kDa and 16.8-kDa fragments (Fig. 6A). Only the 5.6-kDa vasoinhibin reacted with a monoclonal antibody against the 6xHis tag, confirming its nature (Fig. 6B). The 6xHis-tagged 5.6-kDa vasoinhibin eluted from the Ni-NTA agarose column in aggregated dimeric (~ 12 kDa), trimeric (~ 18 kDa), tetrameric (~ 24 kDa), and pentameric (~ 30 kDa) isoforms when evaluated by

silver-stained tricine SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 6C). The dimer and, to a much lesser degree, the trimer were extraordinarily stable against standard



**Figure 6.** The 5.6-kDa vasoinhibin from *Pichia pastoris* prolactin (ppPRL) aggregates in multimeric isoforms. A, Representative Coomassie blue-stained sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showing the proteolytic products obtained when ppPRL was incubated in the absence (PRL) or presence of thrombin (PRL + Th). B, Representative Western blot probed with an anti-6xHis tag antibody showing the proteolytic products obtained when ppPRL was incubated in the absence (PRL) or presence of thrombin (PRL + Th). Th-generated products from ppPRL purified ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA affinity chromatography), concentrated, and processed under nonreducing conditions (-), reducing conditions (+), and stronger reducing and denaturing conditions (++) by C, silver-stained SDS-PAGE, or D, Western blot probed with an anti-6xHis-tagged antibody. E, Aggregation and  $\beta$ -strand probability ( $P$ ) of the 1 to 48 residue-sequence forming the 5.6-kDa vasoinhibin as predicted by Pasta2.0 online server. The region of predicted parallel aggregation is illustrated in light gray. The strongest  $\beta$ -aggregation (hot spot) tendency, determined by Tango and Aggrescan servers, is indicated in dark gray. The  $\alpha$ -helix region and the 1 to 48 amino acid residues are shown. These results were confirmed by at least 3 independent experiments.

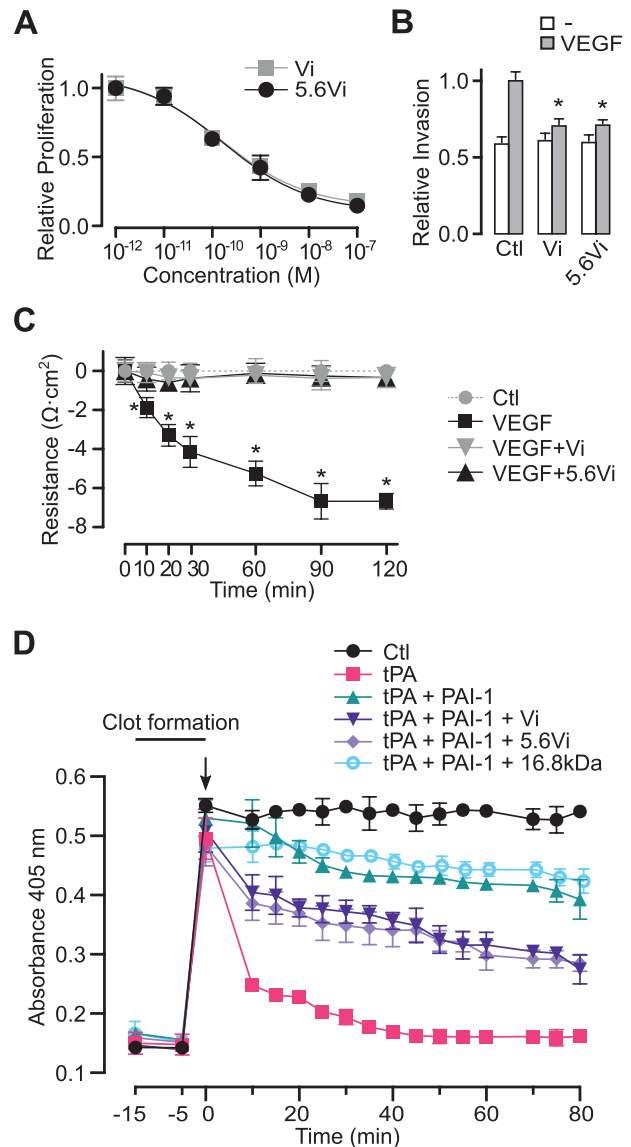


reducing conditions, and a 5-hour incubation at 97 °C in the presence of 10% 2-ME, 8-M urea, and 80-mM DTT was required to dissociate them into the 5.6-kDa vaso-inhibin monomer (see Fig. 6C). Western blots probed with the anti-6xHis-tag antibody confirmed the purity of the monomer as the 1 to 48 residue fragment of PRL generated by thrombin cleavage (Fig. 6D). The propensity to aggregate and form cross- $\beta$  pairings between different 1 to 48 residue stretches was confirmed by PASTA 2.0 software (Fig. 6E). The parallel aggregation region spanned residues 13 to 35, and a “hot spot” for aggregation within  $\alpha$ -helix residues 21 to 28 was predicted by Aggrescan 3D (33) and Tango (34) software (see Fig. 6E).

Aggregation did not modify the bioactivity of the 5.6-kDa vaso-inhibin. The 5.6-kDa vaso-inhibin in the affinity chromatography eluate inhibited bFGF and VEGF-stimulated proliferation of HUVECs with the same potency ( $IC_{50} \sim 150$  pM) as a conventional 14-kDa vaso-inhibin (Fig. 7A). Furthermore, like the vaso-inhibin control, the 5.6-kDa vaso-inhibin inhibited the VEGF-induced invasion of HUVECs through a Matrigel barrier (Fig. 7B), and the VEGF-induced increase in vasopermeability evaluated by blockage of VEGF-induced reduction of the transendothelial electrical resistance of an endothelial cell monolayer (Fig. 7C). Finally, the 5.6-kDa vaso-inhibin stimulated the in vitro lysis of a plasma clot (Fig. 7D). Once the clot was formed (time 0), addition (arrow) of the thrombolytic agent tPA promoted clot lysis, and this action was prevented by coaddition of PAI-1. PAI-1 inhibition was counteracted by the presence of the 5.6-kDa vaso-inhibin or the vaso-inhibin control but not by the 16.8 C-terminal fragment (see Fig. 7D). These findings indicate that the 5.6-kDa vaso-inhibin generated by thrombin has a high propensity to aggregate and, despite aggregation, it potently inhibits angiogenesis and vasopermeability and stimulates clot dissolution. Consistent with its lack of effect on angiogenesis (see Fig. 5C and 5D), the 16.8-kDa fragment derived from thrombin cleavage is not profibrinolytic.

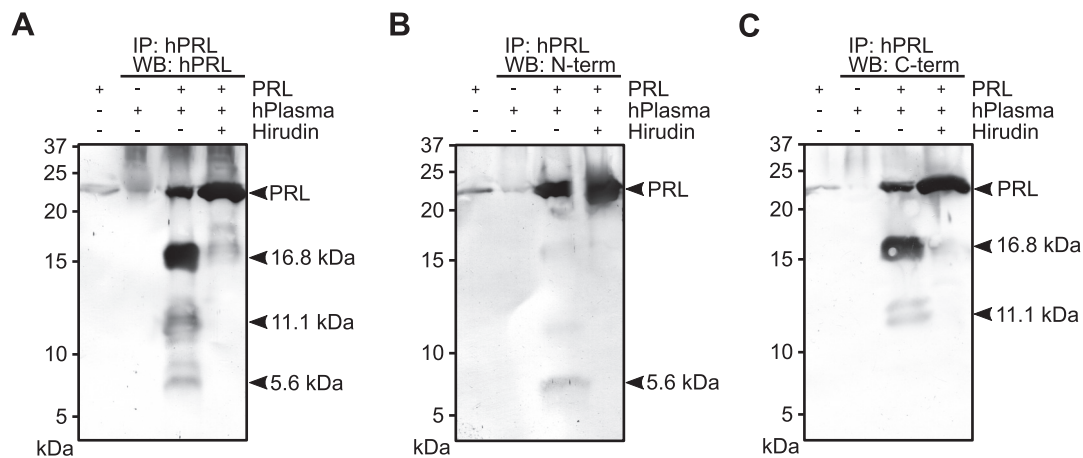
### 5.6-kDa Vaso-inhibin Is Produced by Endogenous Thrombin During Clotting

To investigate whether thrombin generates the 5.6-kDa vaso-inhibin during the clotting process, human PRL was added to human plasma during in vitro coagulation in the absence or presence of the thrombin inhibitor, hirudin. Immunoprecipitation-Western blot showed that PRL was partially converted to an N-terminal fragment of 5.6-kDa and C-terminal fragments of 11.1-kDa, and 16.8-kDa, the expected pattern of thrombin cleavage. Furthermore, hirudin prevented the cleavage of PRL during the clotting process (Fig. 8). These results suggest that 5.6-kDa



**Figure 7.** The 5.6-kDa vaso-inhibin inhibits the proliferation, invasion, and permeability of endothelial cells and promotes the dissolution of a plasma clot. **A**, Dose-response inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)/basic fibroblast growth factor-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation by the vaso-inhibin standard (Vi) and the 5.6-kDa vaso-inhibin from ppPRL (5.6Vi). Values are means  $\pm$  SD relative to the unstimulated cells and to the highest dose of Vi. Dose-response curves fitted by least square regression analysis ( $r^2 > 0.96$ ),  $n = 9$ . **B**, Inhibition of VEGF-induced invasion through a Matrigel barrier in a transwell invasion assay by Vi and the 5.6 Vi. Values are relative to VEGF stimulation ( $*P < .001$  vs Ctl),  $n = 9$ . **C**, Effect of the VEGF or VEGF with Vi, or 5 on the transendothelial-electrical resistance (TEER) of a HUVEC monolayer ( $*P < .001$  vs Ctl),  $n = 9$ . **D**, Plasma clot formed was lysed at time 0 with tissue plasminogen activator (tPA) alone or together with plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in the presence or absence of Vi, 5.6 Vi, or the 16.8-kDa C-terminal fragment. Clot lysis was monitored by absorbance at 405 nm. All experiments were performed in triplicate.

vaso-inhibin is generated during clot formation and may be part of the thrombin-mediated mechanisms regulating coagulation and tissue repair.



**Figure 8.** Cleavage of prolactin (PRL) by thrombin during coagulation. Human PRL (hPRL) was added (+) or not (–) during the clotting of human plasma (hPlasma) in the presence (+) or absence (–) of the thrombin inhibitor, hirudin. PRL proteolytic products were immunoprecipitated (IP) with anti-hPRL antiserum and resolved by A, reducing Western blot (WB) probed with anti-PRL antiserum; B, monoclonal antibodies against the N-terminal; or C, the C-terminal of hPRL. The approximate molecular weight is indicated. Numbers on the left indicate the molecular weights of marker proteins. Estimated molecular weights of the generated fragments (arrowheads).

## Discussion

Thrombin, a major regulator of tissue repair, exerts opposite actions on coagulation and angiogenesis. It promotes coagulation by converting fibrinogen into an insoluble fibrin clot that anchors platelets to the site of a lesion and counteracts coagulation by the activation of anticoagulant protein C (3, 4) and the release of tPA from vascular endothelial cells (35). In addition, thrombin regulates angiogenesis by coagulation-dependent and independent mechanisms. The fibrin and the platelet hemostatic plug support endothelial cell adhesion and are the source of proangiogenic and antiangiogenic factors that are released in response to thrombin (1, 6). Moreover, thrombin acts directly on endothelial cells to stimulate angiogenesis via protease-activated receptor–mediated signaling (36, 37), and to inhibit angiogenesis by the cleavage of the N-terminal region of protease-activated receptor 1 that releases parstatin, a peptide with antiangiogenic properties (38). Here we show that thrombin cleaves human PRL at the R48-G49 bond to generate a 5.6-kDa vaso-inhibin with potent antiangiogenic and profibrinolytic actions. This is the smallest vaso-inhibin known and may represent a new mechanism by which thrombin modulates its procoagulant and proangiogenic actions during tissue repair.

It is not surprising that such a small PRL fragment is a vaso-inhibin. The known members of the vaso-inhibin family range from 14- to 18-kDa (123-159 amino acids, respectively) and originate when the H4 of PRL is removed by specific proteolytic cleavage within L3 (7, 8, 12). Molecular dynamic simulation showed that loss of H4 induces a conformational change in L1 (amino acids 45-79) that is absent in PRL and exposes the antiangiogenic determinant

of vaso-inhibin (29). In agreement, a 79-residue recombinant protein comprising the H1 and L1 regions of human PRL (29) and a 14-residue oligopeptide corresponding to the L1 sequence of buffalo PRL (39) are antiangiogenic. Noteworthy, a short linear motif of just 3 amino acid residues (H46-G47-R48) was recently identified as the functional determinant of vaso-inhibin (15). The HGR motif is highly conserved throughout evolution, its mutation leads to vaso-inhibin loss of function, and oligopeptides containing this sequence inhibit angiogenesis and vasopermeability with the same potency as whole vaso-inhibin (15). The HGR motif corresponds to the last 3 amino acids of the 5.6-kDa vaso-inhibin, which, consistently, inhibited the proliferation, invasion, and permeability of cultured endothelial cells and promoted the lysis of a plasma clot with a potency like that of a 14-kDa vaso-inhibin.

The relevance of thrombin-mediated vaso-inhibin generation is further supported by the facts that the cleavage site (RG) is found in thrombin natural targets and is highly evolutionarily conserved in PRL, implying that thrombin generates vaso-inhibin not only in mammals but also in lower vertebrates (40). While the R48-G49 cleavage site for thrombin is absent in the PRL of rodents and cingulates, the PRL from both groups contains the second thrombin cleavage site, K53-A54 in rodents and R53-A54 in cingulates (R being a conserved substitution of K). Thereby, the vaso-inhibin generated by thrombin in these 2 vertebrate groups would be slightly bigger (6.2 instead of 5.6 kDa). Of note, PRL is rapidly (< 10 minutes) proteolyzed into vaso-inhibin, a time like that of other thrombin natural substrates (41, 42). Another reason for the rapid processing could be that the cleavage site (R48-G49) for thrombin precedes the

intramolecular disulfide bond (C58-C174) linking L1 to H4 in PRL, so the 5.6-kDa vasoinhibin is released without the need for disulfide bond reduction. This contrasts with larger vasoinhibin isoforms in which the action of disulfide bond reductases is required for the loss of H4 essential for the acquisition of vasoinhibin properties (29).

Although the 5.6-kDa vasoinhibin can be detected under nonreducing SDS-PAGE, it possesses a high propensity to aggregate as revealed by its high hydrophobicity profile and predicted aggregation “hot spots” and cross  $\beta$ -pairings within several residue stretches. Aggregation was manifested when the 6xHis-tagged vasoinhibin, eluted from the Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity column and concentrated, migrated as dimeric, trimeric, tetrameric, and pentameric isoforms under nonreducing SDS-PAGE. The nature of the aggregates is unclear. The 5.6-kDa vasoinhibin contains a disulfide bond between residues C4 and C11 and the tetrameric and pentameric aggregates disappeared under reducing SDS-PAGE, indicating the presence of intermolecular disulfide bonds. However, the dimer and, to a lesser extent, the trimer, were exceptionally resistant to reducing agents and required higher concentrations of 2 different reductants (2-ME and DTT), a denaturing agent (urea), and prolonged heating time to dissociate. Metal binding sites involving residues H27 and H30 mediate the aggregation of PRL in response to Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> (43-45). We speculate that residual Ni<sup>2+</sup> from the affinity purification column, together with hydrophobic forces, promoted the formation of the extraordinarily stable 5.6-kDa vasoinhibin dimer and trimer during the concentration process. Remarkably, the multimeric vasoinhibin isoforms were biologically active to indicate that the biological motif (HGR) continues to be exposed in spite aggregation. Similarly, a fully active 79-amino acid recombinant vasoinhibin is a dimer (29). Although the nature and extent of vasoinhibin aggregation remain elusive, the lack of interference with bioactivity highlights the need for addressing the functional relevance of vasoinhibin aggregation and the presence of vasoinhibin aggregates in biological samples.

We confirmed the observation (14) that the 16.8-kDa C-terminal fragment of PRL generated by thrombin is devoid of antiangiogenic and profibrinolytic properties, attesting to HGR being the functional motif of vasoinhibin (15). We also found that thrombin processed the 16.8-kDa PRL fragment into fragments of 11.1 and 5.7 kDa lacking antiangiogenic action. Further studies are needed to clarify whether these C-terminal fragments have other functions or are PRL-degradation products.

The discovery of thrombin as a vasoinhibin generating protease raises the possibility of a functional role for profibrinolytic and antiangiogenic vasoinhibin in

hemostasis and tissue repair. Indeed, endogenous thrombin proteolyzed PRL into vasoinhibin during the clotting of human plasma, thereby supporting the natural generation of vasoinhibin by thrombin during coagulation. Consistent with this possibility, fibrin-degradation products are elevated in patients with hyperprolactinemia and decrease with normalization of PRL levels (46). The enhanced production of vasoinhibin by thrombin due to hyperprolactinemia could help explain this observation. Along this line, it is tempting to hypothesize that vasoinhibin could be part of the mechanisms by which thrombin balances coagulation and angiogenesis during the tissue-healing process. However, it must also be acknowledged that PRL itself has effects on angiogenesis and coagulation that are opposite to those of vasoinhibin. In contrast to vasoinhibin, full-length PRL stimulates angiogenesis either directly by promoting endothelial cell proliferation, or indirectly by upregulating proangiogenic factors like VEGF (7, 8). Furthermore, PRL stimulates thrombosis by promoting the adenosine 5'-diphosphate-mediated P-selectin expression in platelets, and high circulating levels of PRL have been associated with the increased venous thromboembolism and atherosclerosis risk occurring in pregnancy, prolactinomas, and antipsychotic therapy (47). Dual actions have defined the PRL/vasoinhibin axis as a new endocrine axis in which the generation of vasoinhibin is regulated at the hypothalamus, the pituitary, and the target tissue levels (48). These opposite actions would be critically influenced by the levels of PRL and the activity of thrombin during tissue repair during health and disease.

Our findings unveil the smallest vasoinhibin known. Its presence reaffirms the adequacy of the “vasoinhibin” term used to define the proteolytic fragments of PRL-, growth hormone (GH)-, and placental lactogen (PL) with vascular inhibitory properties (7, 8, 12). The terms *16K PRL*, *16K GH*, and *16K PL* are clearly obsolete because they overlook not only contrasting bioactivity with PRL but, more important, the structural diversity of the vasoinhibin family. Evaluation of the various vasoinhibin monomers and dimers awaits the development of specific antibodies and quantitative immunoassays for studying their levels and pharmacokinetic properties during health and disease.

## Acknowledgments

We thank Xarubet Ruíz-Herrera, Fernando López Barrera, Adriana González Gallardo, Lucía del Carmen Márquez Alonso, Eréndira García Ríos, Lucero Mayra Ríos Ruiz, César Ferreira Batista, Erika Patricia Meneses Romero, Lorena Hernández Orihuela for their excellent technical assistance; and Jessica Gonzalez Norris for correcting the English style of the manuscript.

**Financial Support:** This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT) (grant No. A-S1-9620B) and National University of Mexico (UNAM) (grant 405PC) to C.C. M.Z. is a doctoral student from “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)” and received fellowship 768182 from CONACYT.

## Additional Information

**Correspondence:** Carmen Clapp, PhD, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, Blvd Juriquilla 3001, Querétaro 76230, Mexico. Email: [clapp@unam.mx](mailto:clapp@unam.mx).

**Disclosures:** The authors have nothing to disclose.

**Data Availability:** All data generated or analyzed during this study are included in this published article and the supplementary information files listed in “References.”

## References

- van Hinsbergh VW. Endothelium—role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34(1):93-106.
- Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 2008;111(3):1227-1233.
- Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(1):63-69.
- Di Cera E. Thrombin. *Mol Aspects Med.* 2008;29(4):203-254.
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(17):6624-6628.
- Ma L, Perini R, McKnight W, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(1):216-220.
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1177-1215.
- Clapp C, Thebault S, Macotela Y, Moreno-Carranza B, Triebel J, Martínez de la Escalera G. Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol.* 2015;846:83-95.
- Piwnica D, Touraine P, Struman I, et al. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol.* 2004;18(10):2522-2542.
- Macotela Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, et al. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 9):1790-1800.
- Ge G, Fernández CA, Moses MA, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(24):10010-10015.
- Clapp C, Aranda J, González C, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(8):301-307.
- Bajou K, Herkenne S, Thijssen VL, et al. PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nat Med.* 2014;20(7):741-747.
- Khurana S, Liby K, Buckley AR, Ben-Jonathan N. Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology.* 1999;140(9):4127-4132.
- Robles JP, Zamora M, Siqueiros-Marquez L, et al. The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: implications for a therapeutic orally active oligopeptide. *Angiogenesis.* Published online June 7, 2021. doi:10.1007/s10456-021-09800-x
- O’Mullan P, Craft D, Yi J, Gelfand CA. Thrombin induces broad spectrum proteolysis in human serum samples. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(6):685-693.
- Chang JY. Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur J Biochem.* 1985;151(2):217-224.
- Gallwitz M, Enoksson M, Thorpe M, Hellman L. The extended cleavage specificity of human thrombin. *PLoS One.* 2012;7(2):e31756.
- Galfione M, Luo W, Kim J, et al. Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr Purif.* 2003;28(2):252-258.
- Dueñas Z, Rivera JC, Quiróz-Mercado H, et al. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(7):2049-2055.
- Staindl B, Berger P, Kofler R, Wick G. Monoclonal antibodies against human, bovine and rat prolactin: epitope mapping of human prolactin and development of a two-site immunoradiometric assay. *J Endocrinol.* 1987;114(2):311-318.
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, et al. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(8):2947-2953.
- Clapp C, López-Gómez FJ, Nava G, et al. Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol.* 1998;158(1):137-144.
- Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 2006;1(1):16-22.
- Niedermeyer TH, Strohmalm M. mMass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra. *PLoS One.* 2012;7(9):e44913.
- LaVoie HA, Witorsch RJ. Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995;209(3):257-269.
- Grigorian AL, Bustamante JJ, Hernandez P, Martinez AO, Haro LS. Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Protein Sci.* 2005;14(4):902-913.
- Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc.* 2007;2(3):481-485.
- Robles JP, Zamora M, Velasco-Bolom JL, et al. Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Sci Rep.* 2018;8(1):17111.
- Carpenter AE, Jones TR, Lamproch MR, et al. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* 2006;7(10):R100.
- Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp.* 2014;88(88):51046.

32. Moreno-Carranza B, Robles JP, Cruces-Solís H, et al. Sequence optimization and glycosylation of vasoinhibin: pitfalls of recombinant production. *Protein Expr Purif.* 2019;161:49-56.
33. Zambrano R, Jamroz M, Szczasiuk A, Pujols J, Kmiecik S, Ventura S. AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W306-W313.
34. Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol.* 2004;22(10):1302-1306.
35. Levin EG, Marzec U, Anderson J, Harker LA. Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1984;74(6):1988-1995.
36. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. The role of thrombin in angiogenesis. In: *Thrombin: Physiology and Disease*. Springer Science+Business Media; 2009:93-113.
37. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000;407(6801):258-264.
38. Zania P, Papaconstantinou M, Flordellis CS, Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE. Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(5):C1215-C1226.
39. Lee J, Majumder S, Chatterjee S, Muralidhar K. Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. *J Biosci.* 2011;36(2):341-354.
40. Clapp C, Martínez de la Escalera L, Martínez de la Escalera G. Prolactin and blood vessels: a comparative endocrinology perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 2012;176(3):336-340.
41. Greenberg CS, Miraglia CC, Rickles FR, Shuman MA. Cleavage of blood coagulation factor XIII and fibrinogen by thrombin during in vitro clotting. *J Clin Invest.* 1985;75(5):1463-1470.
42. Nogami K, Zhou Q, Wakabayashi H, Fay PJ. Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site. *Blood.* 2005;105(11):4362-4368.
43. Christensen LF, Malmos KG, Christiansen G, Otzen DE. A complex dance: the importance of glycosaminoglycans and zinc in the aggregation of human prolactin. *Biochemistry.* 2016;55(26):3674-3684.
44. Sankoorikal BJ, Zhu YL, Hodsdon ME, Lolis E, Dannies PS. Aggregation of human wild-type and H27A-prolactin in cells and in solution: roles of Zn(2+), Cu(2+), and pH. *Endocrinology.* 2002;143(4):1302-1309.
45. Lorensen MY, Robson DL, Jacobs LS. Detectability of pituitary PRL and GH by immunoassay is increased by thiols and suppressed by divalent cations. *Endocrinology.* 1983;112(5):1880-1882.
46. Medić-Stojanoska M, Mitić G, Mitić I, et al. The influence of hyperprolactinemia on coagulation parameters in females with prolactinomas. *Srp Arh Celok Lek.* 2014;142(5-6):314-319.
47. Wallaschofski H, Donné M, Eigenthaler M, et al. PRL as a novel potent cofactor for platelet aggregation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5912-5919.
48. Triebel J, Bertsch T, Bollheimer C, et al. Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309(10):R1193-R1203.
49. Zamora M, Robles JP, Aguilar MB, et al. Supplementary data for "Thrombin cleaves prolactin into a potent 5.6 kDa vasoinhibin: implication for tissue repair." Figshare. Deposited August 5, 2021. doi:10.6084/m9.figshare.15121104.v1