



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD JURIQUILLA
LICENCIATURA EN TECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL EFECTO DIRECTO DE LA VASOINHIBINA Y SUS ANÁLOGOS SOBRE
LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MDA-MB-231**

TESIS DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA

PRESENTA:
JESSICA IVONNE MARTÍNEZ URBINA

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

JURIQUILLA, QUERÉTARO, QRO. JUNIO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

La vasoinhibina comprende una familia de proteínas que van de los 5.6 a los 18 kDa, todas ellas inhibitoras de la permeabilidad y el crecimiento (angiogénesis) de los de vasos sanguíneos y promotoras de la fibrinólisis. La vasoinhibina se genera por la proteólisis de la hormona prolactina (PRL) por acción de diversas proteasas, incluida la trombina. La trombina es una proteasa con múltiples acciones. Es conocida por su efecto promotor de la coagulación vía la formación del coágulo de fibrina, pero también estimula la vasopermeabilidad, angiogénesis y la proliferación, invasión y metástasis de las células cancerosas. El hecho de que la trombina genera a la vasoinhibina y que ambas proteínas ejercen acciones antagónicas sobre la coagulación, la vasopermeabilidad y la angiogénesis condujo a investigar si dicho antagonismo se extiende a acciones sobre las células de cáncer. A este respecto, se sabe que la vasoinhibina es antitumoral debido a su efecto inhibitorio sobre la angiogénesis, pero hasta la fecha no se ha reportado una acción directa de la vasoinhibina sobre las células de cáncer. En este trabajo se evaluó si la vasoinhibina y péptidos análogos de la vasoinhibina pueden antagonizar los efectos estimulatorios de la trombina sobre la proliferación, migración e invasión de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 en cultivo. Se encontró que la vasoinhibina y sus análogos de 3, 4 y 7 aminoácidos no modifican la actividad basal de las células MDA-MB-231 pero si bloquean la acción de la trombina promotora de la proliferación, migración e invasión de las células cancerosas. Estos resultados muestran una acción directa de la vasoinhibina y sus análogos sobre las células de cáncer y, por ende, su capacidad de ejercer acciones duales directas e indirectas (inhibición de la angiogénesis) para frenar el desarrollo tumoral. Queda por evaluar el mecanismo que subyace al antagonismo funcional entre la vasoinhibina (y sus análogos) y la trombina.

Subvención

Este trabajo fue subvencionado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT A1-S-9620B).

Agradecimientos

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

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

A la M. en C. María Magdalena Zamora Corona, al Dr. Juan Pablo Robles Alvarez y a Mauricio Chaveste Zavala por su constante enseñanza y apoyo dentro del laboratorio.

A la asistencia cotidiana del personal administrativo de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Juriquilla (ENES).

Índice

1. Introducción	5
2. Antecedentes	7
2.1. Vasoinhibina	7
2.2. Generación de Vasoinhibina e Isoformas	7
2.3 Efectos biológicos y mecanismo de acción de la vasoinhibina	8
2.4 Efectos de la vasoinhibina en el cáncer	9
2.5 Oligopéptidos análogos de la vasoinhibina y su potencial terapéutico	10
2.6 Trombina: efectos y receptor	12
3. Pregunta de investigación	13
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	13
5.1.1. General	13
5.1.2. Específicos	13
6. Metodología	14
6.1. Reactivos.	14
6.2. Cultivo celular.	14
6.3. Proliferación celular	14
6.4. Migración celular	15
6.5. Invasión celular en soporte permeable tipo <i>transwell</i>	15
7. Resultados	16
7.1. La vasoinhibina y sus análogos (7 ^a , 4 ^a y 3 ^a) inhiben la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina	16
7.2. La vasoinhibina y sus análogos (7 ^a , 4 ^a y 3 ^a) inhiben la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina	16
7.3. La vasoinhibina y sus análogos (7 ^a , 4 ^a y 3 ^a) inhiben la invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina	18
8. Discusión	20
9. Conclusiones	23
10. Referencias	24
11. Tabla de figuras	31
12. Índice de tablas	31

1. Introducción

La vasoinhibina es una proteína endógena generada a partir de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL) que actúa directamente sobre las células endoteliales para inhibir la vasopermeabilidad y la proliferación (angiogénesis) de los vasos sanguíneos (Clapp et al., 2015; Clapp, C, et. al., 2006). La vasoinhibina ejerce sus efectos a través de unirse al complejo proteico formado por el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), el activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA) y su receptor (uPAR) (Bajou et al., 2014), a la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Morohoshi et al., 2018) y a otras proteínas aún no identificadas (Clapp y Weiner, 1992) presentes en las membranas de las células endoteliales. Adicionalmente, la vasoinhibina es profibrinolítica ya que promueve la disolución del coágulo de fibrina que se forma ante una lesión vascular (Bajou et al., 2014).

Inicialmente se describió que la vasoinhibina se genera cuando la catepsina D (Piwnica et al., 2004), las metaloproteinasas de matriz (Macotela et al., 2006) y la proteína morfogenética de hueso 1 (Ge et al., 2007) cortan a la PRL a lo largo del asa 3 que conecta las alfa hélices 3 y 4 de la molécula, resultando en la pérdida del alfa hélice 4 y en isoformas de vasoinhibina que van desde los 14 a los 18 kDa (Figura 1). Mas recientemente se demostró que la trombina genera a la vasoinhibina (Zamora et al., 2021) pero que, a diferencia de las otras proteasas, corta a la PRL en el asa 1 que conecta las alfa hélices 1 y 2 resultando en una vasoinhibina de 5.6 kDa que es la isoforma más pequeña conocida (Zamora et al., 2021). La vasoinhibina de 5.6 kDa conserva las mismas propiedades y potencia antiangiogénica y profibrinolítica que las isoformas de vasoinhibina más grandes. Esto se explica gracias al descubrimiento del determinante funcional de la vasoinhibina en un dominio linear pequeño de sólo tres residuos (Histidina46-Glicina47-Arginina48) (Robles et al., 2022), presente en todas las isoformas de la vasoinhibina, incluida la de 5.6 kDa. También se mostró que la vasoinhibina de 5.6 kDa se genera durante la coagulación del plasma (Zamora et al., 2021), lo que sugiere su participación como un mecanismo de autorregulación de las acciones coagulantes de la trombina sobre la hemostasia y reparación de tejidos ante un daño vascular. De hecho, se sabe que mientras la trombina promueve procesos como la coagulación (Davie & Kulman, 2006), la angiogénesis (Tsopanoglou & Maragoudakis, 2009) y

la vasopermeabilidad (DeMichele & Minnear, 1992) los cuales son necesarios para la reparación de tejidos, la vasoinhibina los puede antagonizar al promover la fibrinólisis (Bajou et al., 2014) e inhibir la angiogénesis y la vasopermeabilidad (Clapp et al., 2015; Clapp, C, et. al., 2006). El hecho de que la vasoinhibina y la trombina tengan acciones contrarias sobre la coagulación, la angiogénesis y la vasopermeabilidad, nos llevó a preguntarnos si esta interacción pudiera extenderse a otras acciones de la trombina, específicamente en el cáncer.

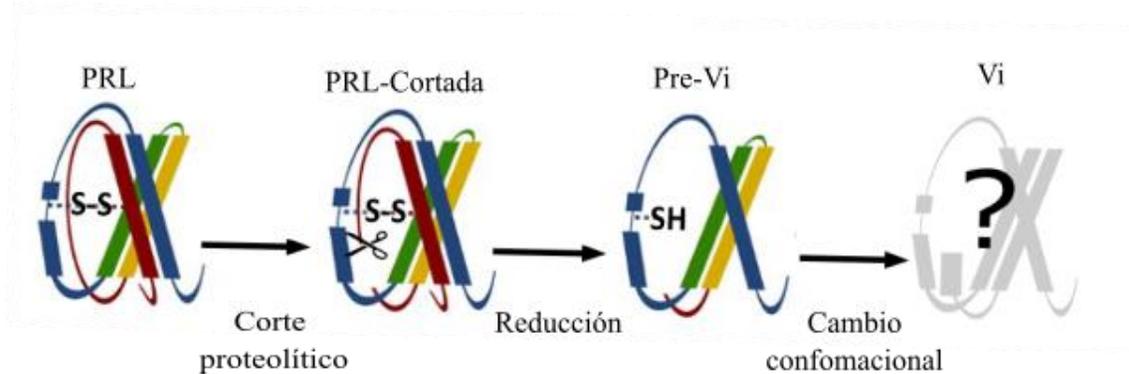


Figura 1. Diagrama secuencial de la generación de la vasoinhibina (Vi) a partir de la prolactina (PRL). Modificado de (Robles et al., 2018).

La trombina puede actuar sobre distintos blancos celulares a través de activar a una familia de receptores acoplados a proteínas G denominados receptores activados por proteasas (PARs) (Coughlin, 2000). En las células de cáncer, la trombina activa a los PARs para promover su proliferación, invasión y metástasis (Nierodzik & Karpatkin, 2006), siendo un factor importante para la progresión tumoral (Arakaki et al., 2018). A este respecto, se ha descrito que la vasoinhibina tiene efectos antitumorales sobre distintos modelos de cáncer que incluyen al cáncer de colon (Bentzien et al., 2001), próstata (Kim et al., 2003), mama (Faupel-Badger et al., 2010) y melanoma (Kinet et al., 2009; Nguyen et al., 2007). En dichos estudios se atribuyó el efecto antitumoral de la vasoinhibina a su efecto antiangiogénico pues no se encontraron efectos directos de la vasoinhibina sobre las células tumorales.

La traslación clínica de la vasoinhibina se ha visto limitada por dificultades en su producción recombinante ((Moreno-Carranza et al., 2019)). Estas dificultades se superaron recientemente gracias a la identificación del determinante antiangiogénico de la vasoinhibina (Robles et al., 2022) en tan solo 3 aminoácidos (Histidina45-Glicina46-Arginina47) lo que permitió sintetizar péptidos

de 3 a 7 aminoácidos que conservan todas las propiedades vasculares y la potencia de la vasoinhibina para ser desarrollados como agentes terapéuticos.

En este proyecto analizamos si la vasoinhibina y tres de sus análogos pueden antagonizar los efectos de la trombina sobre la proliferación, migración e invasión de la línea humana de cáncer de mama MDA-MB-231 en cultivo.

2. Antecedentes

2.1. Vasoinhibina

La vasoinhibina es una proteína endógena presente en diversos órganos y tejidos (hipotálamo, hipófisis, retina, corazón, cartílago, endotelio vascular) y fluidos corporales (sangre, vítreo, líquido amniótico) (Clapp et al., 2015; Clapp, C, et. al., 2006). En un principio se describió que la generación de vasoinhibina ocurre cuando la PRL pierde su cuarta α -hélice y el extremo C-terminal mediante el corte proteolítico con catepsina D, por lo que, debido a su tamaño, recibió el nombre de PRL 16K. Años más tarde se describieron isoformas de diversos tamaños lo que aunado a sus efectos inhibitorios sobre la angiogénesis, la vasodilatación y la vasopermeabilidad derivó en el término “vasoinhibina” el cual describe a esta sustancia vasoactiva con mas precisión (Clapp, C, et. al., 2006).

2.2. Generación de Vasoinhibina e Isoformas

La PRL es una hormona de 23 kDa que estructuralmente consta de 199 aminoácidos organizados en 4 alfa hélices conectadas por tres asas (Teilum et al., 2005). Se conocen hasta la fecha, cuatro proteasas generadoras de vasoinhibina, las cuales procesan a la PRL ya sea en el asa 1 o el asa 3, generando fragmentos de PRL que va desde los 5.6 kDa hasta los 18 kDa, los cuales tienen en común que conservan la región N-terminal de la PRL en su estructura. Dependiendo la proteasa que la genere, la producción de vasoinhibina puede verse afectada bajo diferentes condiciones y microambientes tisulares.

En el 2004, Piwnica y colaboradores demostraron que la catepsina D procesa a la PRL en tres sitios a lo largo del asa 3 para generar isoformas de vasoinhibina que comprenden los aminoácidos 1-132 (15 kDa), 1-147 (16.5 kDa) y 1-150 (17 kDa) (Piwnica et al., 2004). Para que la catepsina D tenga

actividad requiere estar en un ambiente con pH ácido, y se ha demostrado que precisamente contribuye a generar a la vasoinhibina en los gránulos de secreción de los lactótrofos adenohipofisarios donde se almacena la PRL y en donde se reúnen las condiciones ácidas necesarias para la actividad de esta enzima (Cruz-Soto et al., 2009).

La vasoinhibina también puede generarse en microambientes con pH neutro. En el 2006, Macotela y colaboradores demostraron que las metaloproteinasas de matriz (MMP) producidas y secretadas por los condrocitos, procesan a la PRL en sus tejidos blanco a lo largo del asa 3 para generar isoformas de vasoinhibina de 14, 15, 16 y 17 kDa, en dicho trabajo se demostró que el sitio principal de corte ocurre entre los aminoácidos 155 y 156 de la PRL (Macotela et al., 2006).

La proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1), es otra proteasa que produce vasoinhibina a pH neutro. En el 2007, Ge y colaboradores demostraron que la BMP-1 corta a la PRL en el asa 3 para generar un fragmento N-terminal de PRL de aproximadamente 18 kDa, el cual al ser antiangiogénico se definió como vasoinhibina. La BMP-1 corta a la PRL entre los aminoácidos 159 y 160 (Ge et al., 2007).

Más recientemente se describió que la trombina, una enzima central en la coagulación, también procesa a la PRL para generar vasoinhibina, pero a diferencia de las proteasas anteriores, la trombina corta a la PRL en el asa 1, no en el asa 3, específicamente entre los aminoácidos 48 y 49 para generar una isoforma de vasoinhibina de 5.6 kDa, la cual es la más pequeña descrita hasta ahora que conserva las propiedades y potencia antiangiogénicas y profibrinolíticas de la vasoinhibina (Zamora et al., 2021).

2.3 Efectos biológicos y mecanismo de acción de la vasoinhibina

La vasoinhibina inhibe la angiogénesis bloqueando la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales (Clapp, C, et. al., 2006). La vasoinhibina actúa directamente sobre las células endoteliales a través de unirse a un complejo conformado por el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), el activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA) y su receptor (uPAR) (Bajou et al., 2014) . Adicionalmente se ha reportado que la vasoinhibina se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Morohoshi et al., 2018) y a otras proteínas de membrana aún no identificadas

(Clapp & Weiner, 1992). La vasoinhibina ejerce sus efectos inhibitorios sobre la angiogénesis y la vasopermeabilidad a través de antagonizar las vías de señalización Ras-Raf-

MAPK; Ras-Tiam1-Rac1-Pak1; PI3K-Akt; y PLC γ -IP3-eNOS activadas por distintos factores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (D'Angelo et al., 1995), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (Ferrara et al., 1991), la interleucina 1-beta (IL-1 β) (Lee et al., 2007) y la bradicinina (BK) (Thebault et al., 2011). Además de sus efectos vasculares, se reportó que la vasoinhibina altera la hemostasia al promover la lisis del coágulo de fibrina que se forma ante una lesión vascular, proceso conocido como fibrinólisis. Dicho efecto lo ejerce a través de inhibir a PAI-1 (Bajou et al., 2014).

2.4 Efectos de la vasoinhibina en el cáncer

Se ha demostrado que la vasoinhibina tiene efectos antitumorales sobre distintos modelos de cáncer. En el 2001, Bentzien y colaboradores, demostraron sus efectos en el cáncer de colon, a través de transfectar células de carcinoma de colon humano (HCT116) con un vector codificante de una vasoinhibina de 16 kDa. De manera interesante, la tasa de proliferación *in vitro* de las células HCT116 que expresaban la vasoinhibina de 16 kDa (HCT116^{16K}), no fue diferente de las células no transfectadas sin embargo, el crecimiento tumoral de células HCT116^{16K} implantadas en ratones sí fue menor comparado con el crecimiento tumoral de células no transfectadas. En dicho estudio correlacionaron la inhibición del crecimiento tumoral con una disminución en la densidad microvascular, concluyendo así que el efecto antitumoral de la vasoinhibina reside en su potencial antiangiogénico y no en una acción directa sobre las células de cáncer (Bentzien et al., 2001).

De manera similar, en 2003, Kim y colaboradores estudiaron el potencial antitumoral de la vasoinhibina en un modelo de cáncer de próstata. Para ello, utilizaron un vector adenoviral para transfectar vasoinhibina en las líneas celulares de cáncer de próstata humano DU145 y PC3. Encontraron que la expresión de vasoinhibina en dichas líneas celulares redujo su capacidad para formar tumores *in vivo*, sin embargo, al no encontrar efectos directos de la vasoinhibina sobre la proliferación *in vitro* de las células DU145 o PC3, concluyeron que el efecto de la vasoinhibina es debido a su efecto antiangiogénico sobre la vascularización del tumor (Kim et al., 2003).

Además de efectos de la vasoinhibina sobre el crecimiento tumoral, en el 2007 Nguyen y colaboradores demostraron el potencial terapéutico de la vasoinhibina para inhibir el crecimiento

de metástasis. También confirmaron a través de una transferencia del gen de la vasoinhibina mediada por adenovirus en células de melanoma de ratón (B16F10), que la vasoinhibina previene el crecimiento tumoral en un 86% en modelo de melanoma subcutáneo en el ratón. En dicho trabajo se adscribió el efecto antitumoral y antimetastásico de la vasoinhibina al hecho de que se obtuvo una reducción de la vascularización tumoral de un 57% destacando así el potencial antitumoral de la vasoinhibina (Nguyen et al., 2007).

También en el modelo de melanoma de ratón subcutáneo, en 2009 Kinet y colaboradores replicaron los resultados de Nguyen y colaboradores del 2007, teniendo como diferencia el uso de método de transferencia de genes basado en liposomas catiónicos para producir a la vasoinhibina en lugar de vectores adenovirales (Kinet et al., 2009).

Consistentemente, en el 2010 Faupel-Badger y colaboradores demostraron el efecto de la vasoinhibina sobre el cáncer de mama utilizando las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, en las cuales expresaron a la vasoinhibina generando líneas celulares estables. En dicho trabajo inyectaron las líneas celulares estables productoras de vasoinhibina MCF-7 o MDA-MB-231 en la glándula mamaria abdominal de ratones hembra nu/nu para generar tumores. A pesar de que no se logró una reducción en el tamaño del tumor, se destacó la inhibición de la angiogénesis *in vivo*, concluyendo nuevamente el potencial antitumoral de la vasoinhibina como resultado de sus efectos sobre la angiogénesis (Faupel-Badger et al., 2010)

2.5 Oligopéptidos análogos de la vasoinhibina y su potencial terapéutico

Debido a los efectos vasculares de la vasoinhibina y su uso potencial en el tratamiento de enfermedades angiogénico-dependientes, como el cáncer, la retinopatía diabética y la artritis reumatoide, desde hace ya varios años se ha buscado la traslación a la clínica de esta molécula, aunque sin éxito, pues su uso terapéutico no ha sido posible por una disponibilidad limitada de cantidad suficiente de proteína para las pruebas clínicas (Moreno-Carranza et al., 2019).

Uno de los métodos en los que se producen grandes cantidades de vasoinhibina es la síntesis recombinante, sin embargo, éste llega a tener problemas al incorporar modificaciones postraduccionales inadecuadas, como la formación incorrecta de enlaces disulfuro en la estructura de la vasoinhibina (Moreno-Carranza et al., 2019), por tal motivo, se ha buscado superar este tipo

de problemas generando a la vasoinhibina en sistemas bacterianos como *Escherichia coli* para introducir mutaciones que eviten la formación incorrecta de los enlaces disulfuro, sin embargo, la producción en bacteria de la vasoinhibina introduce nuevos retos tales como la contaminación por endotoxinas, plegamientos incorrectos y falta de modificaciones postraduccionales. A su vez, los retos de la producción recombinante en bacteria han tratado de superarse utilizando baculovirus y células de insecto (Galfione et al., 2003), así como células de mamífero (Moreno-Carranza et al., 2019), pero en todos los casos el bajo rendimiento en la producción de vasoinhibina sigue siendo uno de los principales obstáculos para la traslación clínica de esta molécula.

Recientemente en nuestro laboratorio, se identificó el determinante funcional de la vasoinhibina, el cual reside en un dominio linear pequeño de sólo tres residuos (Histidina46-Glicina47-Arginina48) que conserva la misma potencia para inhibir la angiogénesis y la vasopermeabilidad que la vasoinhibina completa (Robles et al., 2022). Dicho motivo lineal se encontró principalmente en dos etapas. En 2018, Robles y colaboradores encontraron mediante simulación por dinámica molecular, que cuando la vasoinhibina se genera a partir de PRL, se induce una nueva conformación en la primera mitad del asa 1 que conecta las alfa hélices 1 y 2, la cual está ausente en la PRL, exponiendo así una región con propiedades de superficie, electrostáticas e hidrofóbicas distintas a las de la molécula de PRL (Robles et al., 2018). La identificación de esta región diferencial entre la vasoinhibina y la PRL, dio el indicio para que el escaneo en búsqueda del dominio activo de la vasoinhibina se centrara en la región que corresponde a la primera mitad del asa 1. Por lo que en una segunda etapa, y mediante el escaneo de dicha región con péptidos sintéticos de 3 a 7 aminoácidos que se traslapan en sus secuencias, se identificó que el determinante funcional de la vasoinhibina reside en el péptido HGR, el cual tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* demostró la misma actividad que la molécula de vasoinhibina completa para inhibir la angiogénesis, la vasopermeabilidad y el crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma subcutáneo (Robles et al., 2022).

Los oligopéptidos análogos de la vasoinhibina son producidos por síntesis química y, además, el hecho de que sean tan pequeños (3 a 7 aminoácidos) ofrece ventajas para producirlos con el rendimiento requerido para las pruebas preclínicas, por lo que por primera vez la traslación a la clínica del potencial terapéutico de la vasoinhibina, o en este caso, de sus análogos, es una posibilidad tangible.

2.6 Trombina: efectos y receptor

La trombina es una enzima multifuncional y central en la coagulación. La trombina participa en el proceso final de la coagulación y tiene como objetivo generar el coágulo de fibrina que protege ante una lesión vascular. La trombina actúa a través de cortar al fibrinógeno que se encuentra soluble en la circulación en fibrina insoluble que sellará la herida, asimismo mediante un asa de retroalimentación positiva, induce la formación de más trombina mediante la activación de los factores de coagulación V, VIII, XI y XIII (Le Bonniec, 2013; Roshal, 2013).

Además de sus efectos sobre la hemostasia, la trombina tiene efectos directos sobre distintos blancos celulares a través de activar a una familia de cuatro receptores acoplados a proteínas G denominados receptores activados por proteasas (PARs) (Coughlin, 2000). El ligando de los PARs se encuentra encriptado en el extremo extracelular del mismo receptor y es inactivo hasta que la trombina corta en un sitio específico del exodominio de los PARs, exponiendo al ligando. El ligando ya funcional, si bien permanece ligado al receptor, se une intramolecularmente al cuerpo del PAR, activando su transducción (Vu et al., 1991).

Entre los blancos celulares de la trombina destacan las plaquetas, cuya agregación es inducida por la trombina cuando activa a su receptor. Asimismo, la trombina estimula la quimiotaxis de células del sistema inmune tales como monocitos, macrófagos y neutrófilos. Quizás la acción más conocida de la trombina es la reparación tisular, en la cual la trombina además de su efecto procoagulante estimula la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de células endoteliales y aumenta la vasopermeabilidad para permitir la extravasación de leucocitos. Otros efectos celulares fisiológicos de la trombina incluyen la estimulación de la proliferación de fibroblastos, células de músculo liso y células epiteliales (Goldsack et al., 1998).

Además de sus efectos sobre la inflamación y la fisiología vascular, la trombina también influencia procesos patológicos tales como el cáncer, pues se ha descrito que la trombina es generada dentro del microambiente tumoral activando a sus receptores en las células de cáncer (Arakaki et al., 2018) para promover su proliferación, invasión, migración, supervivencia y metástasis (Nierodzik & Karpatkin, 2006) y, por tanto, que es un factor importante para la progresión tumoral.

Adicionalmente a sus efectos directos sobre las células tumorales, en 2006, Nierodzik y colaboradores demostraron que la trombina también favorece la progresión tumoral y el fenotipo

invasivo del cáncer al estimular la angiogénesis, proceso necesario para el crecimiento y diseminación del tumor (Nierodzik & Karpatkin, 2006).

3. Pregunta de investigación

¿La vasoinhibina y sus análogos (de 3, 4 y 7 aminoácidos) inhiben la proliferación, migración e invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 estimuladas con trombina?

4. Hipótesis

La vasoinhibina y sus análogos (de 3, 4 y 7 aminoácidos) inhiben la proliferación, migración e invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 a través de inhibir los efectos estimulantes de la trombina.

5. Objetivos

5.1. General

Analizar si la vasoinhibina y sus análogos (de 3, 4 y 7 aminoácidos) inhiben la proliferación, migración e invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 estimuladas con trombina.

5.2. Específicos

5.1.2.1 Determinar si la vasoinhibina y sus análogos (de 3, 4 y 7 aminoácidos) inhiben la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina.

5.1.2.2. Determinar si la vasoinhibina y sus análogos (de 3, 4 y 7 aminoácidos) inhiben la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina

5.1.2.3. Evaluar si la vasoinhibina y sus análogos (de 3, 4 y 7 aminoácidos) inhiben la invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina

6. Metodología

6.1. Reactivos.

La trombina humana se obtuvo comercialmente (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), la vasoinhibina humana se produjo a través de DNA recombinante de acuerdo con el método descrito (Galfione, et.al, 2003), y los análogos de la vasoinhibina de 3, 4 y 7 aminoácidos (3 aa, 4 aa y 7 aa) fueron sintetizados comercialmente (> 95% de pureza) acetilados y amidados en los extremos N- y C-terminales, respectivamente (GenScript, Piscataway, NJ) (ver tabla 1). Los análogos de la vasoinhibina se encuentran protegidos con solicitudes de patente tanto en México (MX/E/2019/079075) como de carácter internacional (PCT/EP2020/069154) (Clapp Jimenez L. et al., 2021).

Tabla 1. Análogos peptídicos de la vasoinhibina.

Análogo de la vasoinhibina	Secuencia de aminoácidos	Masa molecular (Da)
3 aa	HGR	409.45
4 aa	THGR	510.55
7 aa	THGRGFI	827.93

aa, aminoácidos; T, Treonina; H, Histidina; G, Glicina; R, Arginina; F, Fenilalanina; I, Isoleucina

6.2. Cultivo celular.

La línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231, ATCC HTB-26) se cultivó en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos. Las células se mantuvieron a una temperatura de 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, en donde se llega a una confluencia del 100% al 4° día aproximadamente, posteriormente se hace resiembra.

6.3. Proliferación celular

La proliferación celular se determinó a través de cuantificar la incorporación del análogo de la timidina 5-Etínil-2'-desoxiuridina (EdU) al DNA agregado a una concentración de 10 µM junto con 100 nM de vasoinhibina (Vi) o sus análogos (3aa, 4aa y 7 aa) y 20 nM de trombina (Th) como tratamientos. Brevemente, se sembraron 18,000 células cm⁻² en placas de 96 pozos, y 24 h después se estacionaron con 0.5% SFB-DMEM por un plazo de 24 h, siendo este el tiempo de estación.

Terminado el tiempo de estación se agregaron los tratamientos ya descritos. Después de 24 horas, se detectó la incorporación del EdU a través de una reacción tipo click catalizado por cobre que le adicionó una azida fluorescente 545 (Salic & Mitchison, 2008). Las células se cotiñeron con $5\mu\text{g ml}^{-1}$ de Hoechst 33342 (Chazotte, 2011) y se determinó el porcentaje de células positivas a EdU respecto al número total de células. Todas las imágenes se cuantificaron a través del software CellProfiler mediante un análisis de imagen de identificación y cuantificación (Carpenter et al., 2006).

6.4. Migración celular

La migración celular se determinó por un ensayo de cierre de “herida” (Liang et al., 2007). Las células tumorales se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos. Una vez que la confluencia se alcanzó, se realizó la herida en la monocapa celular y se añadieron los tratamientos de 100 nM de vasoinhibina (Vi) o sus análogos (3aa, 4aa y 7 aa) y 20 nM de trombina (Th). A las 0 y 24 h de agregados los tratamientos se tomaron las micrografías para cuantificar el área de cierre de la herida a través del software CellProfiler mediante un análisis de imagen de identificación y cuantificación (Carpenter et al., 2006).

6.5. Invasión celular en soporte permeable tipo *transwell*

La invasión celular se evaluó a través de un ensayo de invasión de matriz (Justus et al., 2014). Las células se sembraron a una confluencia del 70% ($100,000\text{ células cm}^{-2}$) en el lado luminal o cámara superior de un inserto de categoría *transwell* con los siguientes detalles: 6.6 mm de diámetro con un poro de $8\mu\text{m}$, sobre una capa de matrigel a una concentración de 0.38 mg ml^{-1} . Los tratamientos consistieron en 100 nM de vasoinhibina (Vi) o sus análogos (3aa, 4aa y 7 aa) y 20 nM de trombina (Th), los cuales se agregaron en el compartimento luminal del inserto en medio de estación (0.5% SFB) y se incubaron las células por 20 h. El medio condicionado de células 3T3-L1 (fibroblastos aislados de células de ratón) se empleó como quimioatrayente en el compartimento inferior del pozo. Finalmente, las células que invadieron la cara abluminal del inserto se tiñeron con $5\mu\text{g ml}^{-1}$ de Hoechst 33342 (Chazotte, 2011), y se micrografieron bajo un microscopio Olympus IX51. Todas las imágenes se cuantificaron a través del software CellProfiler mediante un análisis de imagen de identificación y cuantificación (Carpenter et al., 2006).

7. Resultados

7.1. La vasoinhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina

La tasa de proliferación es un proceso celular que resulta de la velocidad a la que una célula replica su DNA, obteniendo la duplicación celular. La proliferación celular descontrolada es uno de los procesos que caracteriza al cáncer, se ha reportado que entre más rápida es la proliferación celular, el fenotipo del cáncer es más agresivo (López-Sáez et al., 1998). La trombina es uno de los factores que puede promover la proliferación celular de células cancerosas vía la activación de los PARs (Wojtukiewicz et al., 2015). Trabajos previos describieron que las células de cáncer no son un blanco de la vasoinhibina (Bentzien et al., 2001; Kim et al., 2003; Kinet et al., 2009; Nguyen et al., 2007; Faupel-Badger et al., 2010), sin embargo en dichos trabajos únicamente evaluaron el efecto de la vasoinhibina en condiciones basales y no frente a un estímulo como la trombina.

En este trabajo, evaluamos la proliferación celular a través de cuantificar la incorporación al DNA de un análogo de la timidina a las células MDA-MB-231 tratadas con trombina en presencia de la vasoinhibina o sus análogos (3aa, 4aa y 7aa). De manera consistente a observaciones previas, la trombina estimuló casi al doble la proliferación de células MDA-MB-231 (Figura 1). Este efecto estimulante de la trombina se previno con el cotratamiento tanto con la vasoinhibina como con los análogos 3aaa, 4aa y 7aa (Figura 1), lo cual indica un efecto inhibitorio directo de la vasoinhibina y sus análogos sobre la proliferación de células de cáncer.

7.2. La vasoinhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina

La migración es un proceso determinante de la metástasis del cáncer (Justus et al., 2014), de hecho, existe evidencia de que la trombina influye en la diseminación del cáncer al promover la invasión, migración y desprendimiento del tumor de las células de cáncer (Wojtukiewicz et al., 2016).

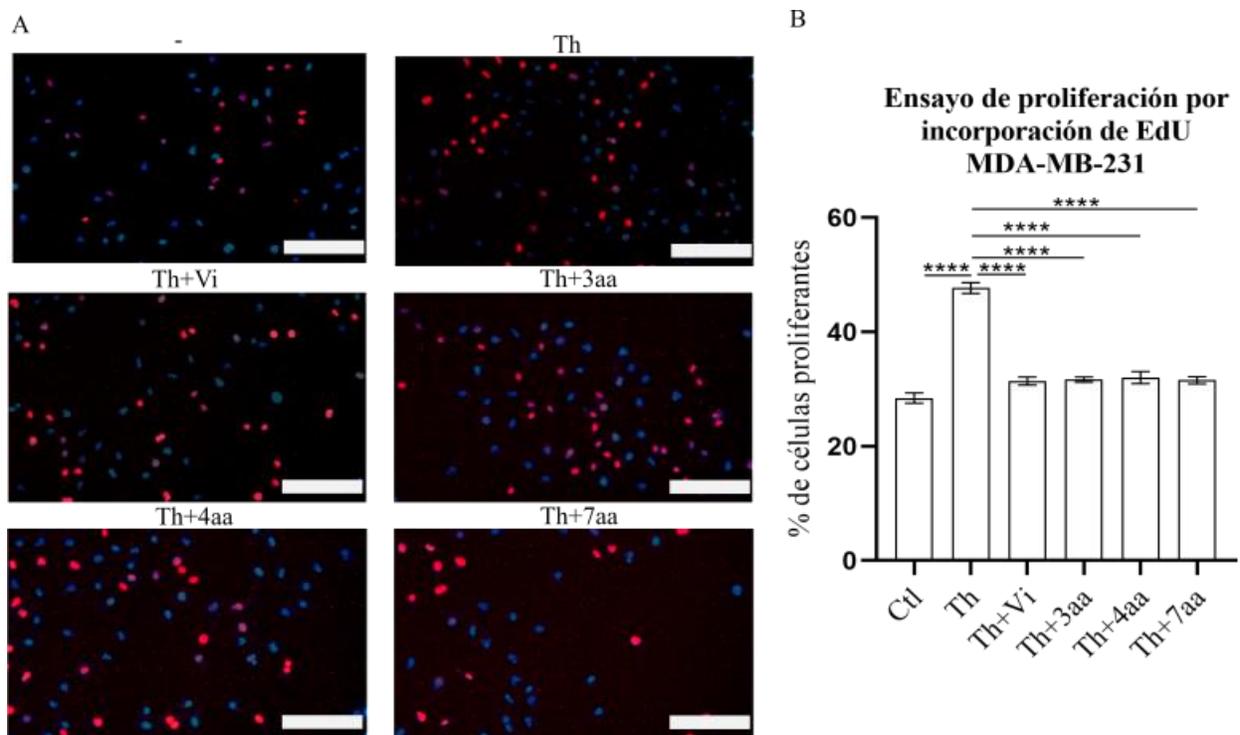


Figura 2. La vaso inhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina. **A.** Micrografías representativas de células MDA-MB-231 proliferantes (rojo) respecto a células totales (azul). Las células fueron tratadas con 20 nM de trombina (Th) en presencia y ausencia de 100 nM de vaso inhibina (Vi) o de los análogos de vaso inhibina de 3, 4 y 7 aminoácidos (3aa, 4aa y 7aa). Escala de la barra, 100 μ m. **B.** Porcentaje de células MDA-MB-231 proliferantes respecto a células totales. Los valores son las medias \pm error estándar, n=9 de 3 de experimentos independientes, ****p<0.0001 (ANOVA a una vía, prueba de Tukey).

La migración celular la evaluamos a través del ensayo de cierre de herida (Liang et al., 2007), que consiste en realizar una herida en la monocapa celular y al cabo de 24 horas evaluar el porcentaje de cerrado de la herida por las células que migran hacia ella. Como se esperaba, la trombina estimuló al doble la migración de células MDA-MB-231 con respecto al control no tratado (Figura 2), en tanto que el cotratamiento de trombina con la vaso inhibina o sus análogos 3aa, 4aa y 7aa,

inhibió el efecto de la trombina, lo que muestra que la vasoinhibina también actúa directamente sobre las células de cáncer para inhibir su migración (Figura 2).

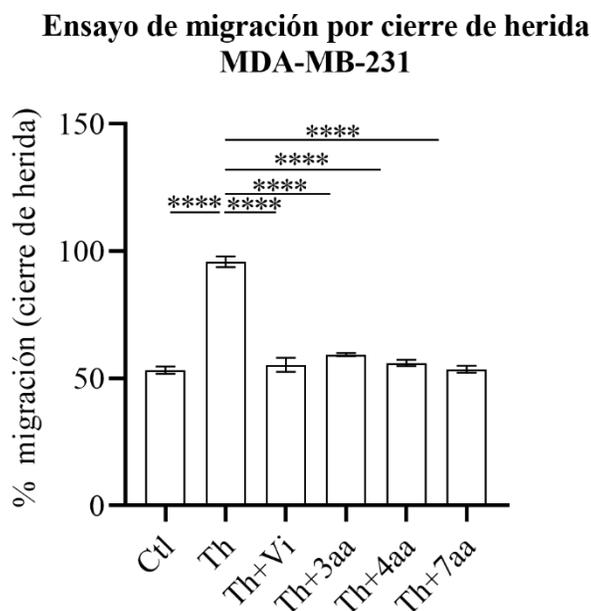


Figura 3. La vasoinhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina. Porcentaje de migración en las células MDA-MB-231 indicado por el porcentaje de cierre de la herida realizada en la monocapa celular. Las células fueron tratadas con 20 nM de trombina (Th) en combinación de 100 nM de la vasoinhibina (Vi) o de los análogos de vasoinhibina de 3, 4 o 7 aminoácidos (7aa, 4aa y 3aa). Los valores son las medias \pm error estándar, n=9 de 3 de experimentos independientes, ****p<0.0001 (ANOVA a una vía, prueba de Tukey).

7.3. La vasoinhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina

La invasión primaria es la etapa inicial del proceso metastásico, consiste en la migración activa de las células tumorales desde su origen a través de la degradación de matriz extracelular hasta alcanzar los vasos (Román Curto, 1999). En este ensayo evaluamos la invasión celular mediante un ensayo en un soporte permeable tipo *transwell*, donde se mide la capacidad de motilidad celular

e invasividad hacia un gradiente quimioatrayente (Justus et al., 2014). Consistentemente con nuestros resultados anteriores, la trombina tuvo un efecto estimulante sobre la invasión de células MDA-MB-231 a través de una matriz de matrigel (Figura 3), pues dicho tratamiento triplicó el número de células que invadieron la cara inferior del *transwell*. El cotratamiento con la vasoinhibina y con los análogos 3 aa, 4 aa y 7 aa, previno el efecto estimulante de la trombina, confirmando así un efecto directo de la vasoinhibina y sus análogos sobre las células de cáncer MDA-MB-231 para inhibir la invasión inducida por trombina.

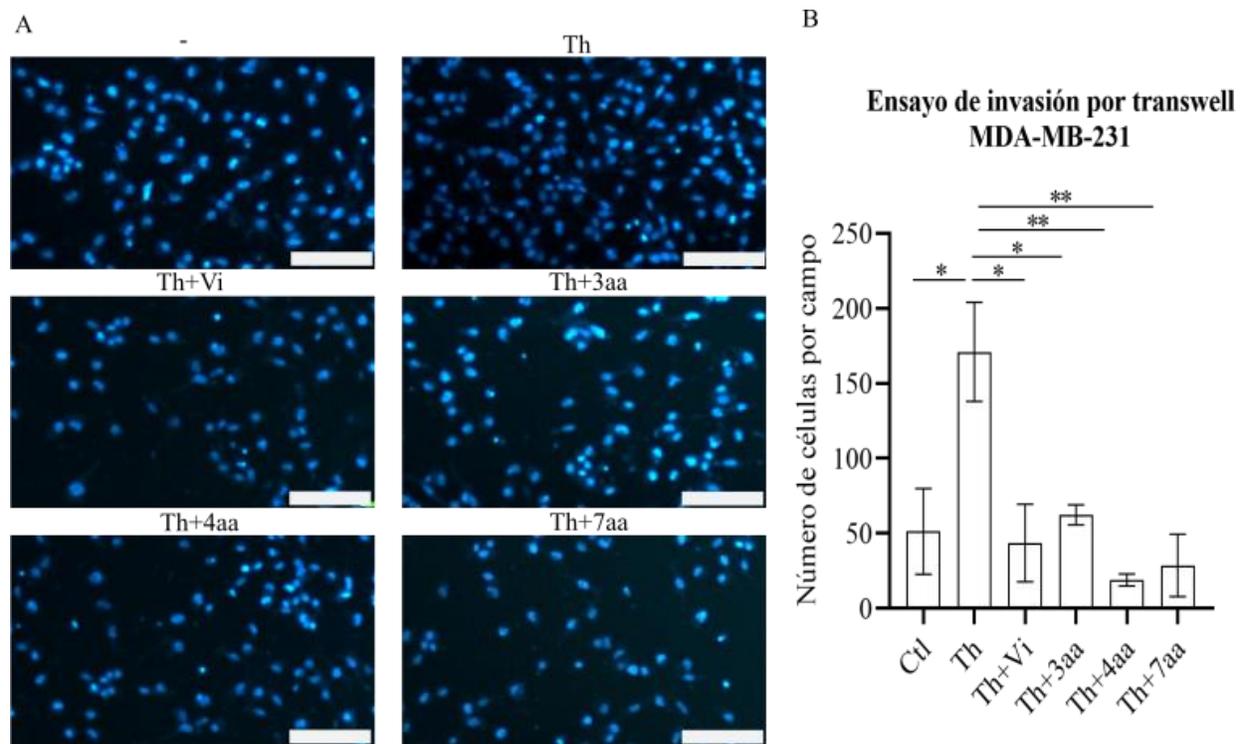


Figura 4. La vasoinhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina. **A.** Micrograffías representativas de células MDA-MB-231 que invadieron la cara abluminal del soporte permeable tipo transwell cuyo núcleo fue teñido con Hoechst 33342. Las células fueron tratadas con 20 nM de trombina (Th) con y sin 100 nM de vasoinhibina (Vi) o de los análogos de vasoinhibina de 3, 4 y 7 aminoácidos (3 aa, 4 aa y 7 aa). Escala de la barra, 100 μ m. **B.** Número de células MDA-MB-231 que invadieron la cara abluminal del transwell indicado por el número de células por campo. Los valores son las medias \pm error estándar, n=9 de 3 de experimentos independientes, *p<0.01, **p<0.05 (ANOVA a una vía, prueba de Tukey).

8. Discusión

La vasoinhibina es un inhibidor endógeno del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis (Clapp et al., 2015; Clapp, C, et. al., 2006). Debido a sus acciones inhibitorias sobre la vasculatura, su potencial como posible agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades angiogénico-dependientes como el cáncer ha sido evaluado extensivamente. De hecho, la vasoinhibina ha demostrado ser antitumoral en distintos modelos que incluyen al cáncer de colon (Bentzien et al., 2001), próstata (Kim et al., 2003), mama (Faupel-Badger et al., 2010) y melanoma (Kinet et al., 2009; Nguyen et al., 2007). En dichos trabajos se administró la vasoinhibina utilizando vectores adenovirales o liposomas catiónicos para transfectar a las células tumorales (HCT116, DU145, PC3, B16F10, MCF-7 y MDA-MB-231) con vectores codificantes de la vasoinhibina. En todos los casos, el crecimiento tumoral *in vivo* de los animales inyectados con las células que expresaban vasoinhibina fue menor, sin embargo, *in vitro* no se observó ningún efecto sobre la proliferación de las células de cáncer, por lo que en todos ellos concluyeron que las acciones antitumorales de la vasoinhibina residen exclusivamente en su efecto inhibitorio sobre la vascularización y angiogénesis tumoral, más que en una acción directa de la vasoinhibina sobre las células de cáncer.

A pesar de que trabajos anteriores habían descartado una acción directa de la vasoinhibina sobre las células de cáncer, se decidió reevaluar esto ya que, recientemente en el laboratorio se describió que la trombina, enzima central de la coagulación, es una proteasa generadora de vasoinhibina y que la generación de vasoinhibina por trombina forma parte de un antagonismo funcional entre ambas moléculas sobre procesos de angiogénesis y coagulación (Zamora et al., 2021).

Cabe recalcar, que en los trabajos en los que se descartó un efecto directo de la vasoinhibina sobre las células de cáncer en cultivo (Bentzien et al., 2001; Faupel-Badger et al., 2010; Kim et al., 2003; Kinet et al., 2009; Nguyen et al., 2007), los efectos de la vasoinhibina se evaluaron únicamente en condiciones basales es decir, sin que las células recibieran ningún estímulo. A este respecto, este trabajo corroboró estos hallazgos dado que ni la vasoinhibina ni sus análogos modificaron la proliferación basal de la línea celular MDA-MB-231. Sin embargo, evaluar los efectos de la vasoinhibina en células de cáncer estimuladas con algún promotor (trombina) tiene sentido ya que la vasoinhibina tampoco tiene efectos sobre su blanco principal que es la célula endotelial bajo

condiciones basales donde para que los efectos de la vasoinhibina sean evidentes se requiere que las células endoteliales sean estimuladas con diversos factores proangiogénicos tales como VEGF (D'Angelo et al., 1995), bFGF (Ferrara et al., 1991), IL-1 β (Lee et al., 2007) y la bradicinina (BK) (Thebault et al., 2011).

Adicionalmente al evaluar el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre los efectos estimulantes de la trombina en las células de cáncer, se decidió también evaluar si esta propiedad la mantenían los análogos de la vasoinhibina que desarrollamos recientemente (Robles et al., 2022), pues a pesar del potencial terapéutico que ha demostrado la vasoinhibina para reducir el crecimiento tumoral, su uso en la clínica se ha visto limitado por dificultades asociadas a su producción recombinante (Moreno-Carranza et al., 2019). Afortunadamente esta limitación ha sido superada con la identificación del determinante funcional de la vasoinhibina en un dominio linear pequeño de sólo tres aminoácidos (HGR) que conserva la misma potencia y acciones vasculares que la vasoinhibina completa (Robles et al., 2022). La identificación del determinante funcional de la vasoinhibina llevó a la producción de análogos peptídicos de la vasoinhibina de 3, 4 y 7 aminoácidos que corresponden o incluyen dicho determinante funcional (HGR, THGR y THGRGFI, respectivamente). De hecho, se reportó que el tratamiento con el análogo de 7 aminoácidos redujo el crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma subcutáneo (Robles et al., 2022), demostrando que los análogos de la vasoinhibina también conservan las propiedades antitumorales de la vasoinhibina. Por tal motivo, también decidimos evaluar si estos análogos tienen acciones directas sobre las células de cáncer en cultivo estimuladas con trombina.

Al evaluar la proliferación, migración e invasión de las células de cáncer MDA-MB-231 tratadas con trombina encontramos que consistentemente a reportes previos, la trombina es un factor estimulante de dichos procesos celulares. Pero, contrario a lo previamente reportado, el tratamiento con la vasoinhibina y sus análogos sí tuvo un efecto directo sobre las células de cáncer al inhibir su proliferación, migración e invasión inducidas por trombina, comprobando que para que los efectos de la vasoinhibina y sus análogos sean evidentes sobre las células de cáncer, se requiere que dichas células se encuentren estimuladas, en este caso, por la trombina. Éste es el primer reporte de un efecto directo de la vasoinhibina sobre las células de cáncer. El hecho de que en reportes anteriores (Bentzien et al., 2001; Faupel-Badger et al., 2010; Kim et al., 2003; Kinet et al., 2009;

Nguyen et al., 2007) no se hayan estimulado a las células de cáncer con trombina, explicaría por qué los efectos de la vasoinhibina sobre dicho blanco celular no fueron evidentes.

Está reportado que la trombina promueve la proliferación, migración e invasión de las células de cáncer, y que dicho efecto lo ejerce a través de activar a sus receptores que son los receptores activados por proteasas (PARs, por sus siglas en inglés) (Arakaki et al., 2018). Como se mencionó anteriormente, nuestros resultados indican que el cotratamiento con la vasoinhibina o sus análogos inhibe el efecto estimulante de la trombina sobre los tres procesos celulares de proliferación, migración e invasión, sin embargo desconocemos el mecanismo de acción a través del cual la vasoinhibina y sus análogos antagonizan las acciones de la trombina en el cáncer. Una posibilidad es que tanto la vasoinhibina como sus análogos inhiban la señalización de los receptores de la trombina (PARs). Los PARs son receptores acoplados a proteínas G, y de hecho se sabe que la bradicinina, que es uno de los factores proangiogénicos que la vasoinhibina antagoniza (Thebault et al., 2011), actúa precisamente a través de un receptor acoplado a proteínas G, por lo que no resulta descabellado pensar que la vasoinhibina puede inhibir la señalización de dicho receptor, aunque también queda la posibilidad de una interacción directa tanto de la vasoinhibina como de sus análogos con la trombina, que pudiera impedir que la trombina active a su receptor.

Queda por determinar también si la interacción funcional entre la vasoinhibina y la trombina observada en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 se mantiene en otras líneas celulares de cáncer, lo cual nos indicaría que el efecto es robusto y nos daría indicios del mecanismo de acción que subyace esta interacción.

Los análogos de la vasoinhibina utilizados en este trabajo están protegidos por una patente nacional (MX/E/2019/079075) e internacional (PCT/EP2020/069154) (Clapp Jimenez L. et al., 2021), y se está buscando su traslación a la clínica. El hecho de que dichos análogos ejerzan acciones duales en el tratamiento del cáncer a través de acciones indirectas (inhibir la vascularización del tumor) como de acciones directas (inhibitorias de la proliferación, migración e invasión de las células de cáncer) realza su potencialidad clínica en oncología.

9. Conclusiones

La vasoinhibina y sus análogos de 3, 4 y 7 aminoácidos actúan directamente sobre las células de cáncer de mama MDA-MB-231 inhibiendo su proliferación, migración e invasión en respuesta a la trombina. Éste es el primer reporte de una acción directa de la vasoinhibina y sus análogos sobre células de cáncer. El hecho de que la vasoinhibina y sus análogos tengan acciones inhibitorias duales en el cáncer, tanto a través de inhibir la vascularización tumoral, como de inhibir directamente a las células de cáncer, apoya la traslación a la clínica de dichos análogos.

10. Referencias

- Arakaki, A., Pan, W.-A., & Trejo, J. (2018). GPCRs in Cancer: Protease-Activated Receptors, Endocytic Adaptors and Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1886. <https://doi.org/10.3390/ijms19071886>
- 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., Paques, C., Cornelissen, I., Lion, M., Noel, A., Gils, A., Vinckier, S., Declerck, P. J., Griffioen, A. W., Dewerchin, M., ... Struman, I. (2014). PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nature Medicine*, 20(7), 741–747. <https://doi.org/10.1038/nm.3552>
- Bentzien, F., Struman, I., Martini, J. F., Martial, J., & Weiner, R. (2001). Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Research*, 61(19), 7356–7362.
- 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., Golland, P., & Sabatini, D. M. (2006). CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology*, 7(10), R100. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100>
- Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb.prot5557. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5557>
- Clapp, C, et. al. (2006). *Vasoinhibins: Endogenous regulators of angiogenesis and vascular function* [Elsevier]. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.002>
- Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., & Martínez de la Escalera, G. (2015). Regulation of Blood Vessels by Prolactin and Vasoinhibins. En M.

- Diakonova, PhD (Ed.), *Recent Advances in Prolactin Research* (Vol. 846, pp. 83–95). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_4
- Clapp, C., & Weiner, R. I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*, *130*(3), 1380–1386. <https://doi.org/10.1210/endo.130.3.1311239>
- Clapp Jimenez L., M. del C., Triebel, J., Bertsch, T., Robles Alvarez, J. P., Zamora Corona, M. M., & Martinez De La Escalera Lorenzo, G. (2021). *Oligopeptide That Inhibits Angiogenesis and Vascular Function*. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021098996>
- Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, *407*(6801), 258–264. <https://doi.org/10.1038/35025229>
- Cruz-Soto, M. E., Cosío, G., Jeziorski, M. C., Vargas-Barroso, V., Aguilar, M. B., Cárabez, A., Berger, P., Saftig, P., Arnold, E., Thebault, S., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2009). Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipophyseal vasoinhibins: Cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology*, *150*(12), 5446–5454. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0390>
- D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J., & 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 of the United States of America*, *92*(14), 6374–6378. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.14.6374>

- Davie, E., & Kulman, J. (2006). An Overview of the Structure and Function of Thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32(S 1), 003–015. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939550>
- DeMichele, M. A., & Minnear, F. L. (1992). Modulation of vascular endothelial permeability by thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 18(3), 287–295. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1002567>
- Faupel-Badger, J. M., Ginsburg, E., Fleming, J. M., Susser, L., Doucet, T., & Vonderhaar, B. K. (2010). 16 kDa prolactin reduces angiogenesis, but not growth of human breast cancer tumors in vivo. *Hormones & cancer*, 1(2), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s12672-010-0012-z>
- Ferrara, N., Clapp, C., & Weiner, R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*, 129(2), 896–900. <https://doi.org/10.1210/endo-129-2-896>
- Galfione, M., Luo, W., Kim, J., Hawke, D., Kobayashi, R., Clapp, C., Yu-Lee, L.-Y., & Lin, S.-H. (2003). Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expression and Purification*, 28(2), 252–258. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00639-3](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00639-3)
- Ge, G., Fernández, C. A., Moses, M. A., & Greenspan, D. S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 10010–10015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704179104>

- Goldsack, N. R., Chambers, R. C., Dabbagh, K., & Laurent, G. J. (1998). Molecules in focus
Thrombin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(6), 641–646.
[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00011-9)
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro Cell Migration and
Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 88, 51046.
<https://doi.org/10.3791/51046>
- Kim, J., Luo, W., Chen, D.-T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L.-Y., & Lin, S.-H. (2003).
Antitumor Activity of the 16-kDa Prolactin Fragment in Prostate Cancer. 9.
- Kinet, V., Nguyen, N.-Q.-N., Sabatel, C., Blacher, S., Noël, A., Martial, J. A., & Struman, I.
(2009). Antiangiogenic liposomal gene therapy with 16K human prolactin efficiently
reduces tumor growth. *Cancer Letters*, 284(2), 222–228.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.030>
- Le Bonniec, B. F. (2013). Chapter 643—Thrombin. En N. D. Rawlings & G. Salvesen (Eds.),
Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition) (pp. 2915–2932). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00643-8>
- Lee, S.-H., Kunz, J., Lin, S.-H., & Yu-Lee, L. (2007). 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell
migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer
Research*, 67(22), 11045–11053. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0986>
- Liang, C.-C., Park, A. Y., & Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and
inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), Article
2. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>

- López-Sáez, J. F., de la Torre, C., Pincheira, J., & Giménez-Martín, G. (1998). Cell proliferation and cancer. *Histology and Histopathology*, *13*(4), 1197–1214.
<https://doi.org/10.14670/HH-13.1197>
- Macotela, Y., Aguilar, M. B., Guzmán-Morales, J., Rivera, J. C., Zermeño, C., López-Barrera, F., Nava, G., Lavalle, C., de la Escalera, G. M., & Clapp, C. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of Cell Science*, *119*(9), 1790–1800. <https://doi.org/10.1242/jcs.02887>
- Moreno-Carranza, B., Robles, J. P., Cruces-Solís, H., Ferrer-Ríos, M. G., Aguilar-Rivera, E., Yupanki, M., Martínez de la Escalera, G., & Clapp, C. (2019). Sequence optimization and glycosylation of vasoinhibin: Pitfalls of recombinant production. *Protein Expression and Purification*, *161*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.04.011>
- Morohoshi, K., Mochinaga, R., Watanabe, T., Nakajima, R., & Harigaya, T. (2018). 16 kDa vasoinhibin binds to integrin alpha5 beta1 on endothelial cells to induce apoptosis. *Endocrine Connections*, *7*(5), 630–636. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0116>
- Nguyen, N.-Q.-N., Cornet, A., Blacher, S., Tabruyn, S. P., Foidart, J.-M., Noël, A., Martial, J. A., & 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*(12), 2094–2100. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300294>
- Nierodzik, M. L., & Karparkin, S. (2006). Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*, *10*(5), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.002>
- Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J. A., Kelly, P. A., & 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(10), 2522–2542.

<https://doi.org/10.1210/me.2004-0200>

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., Triebel, J., & Clapp, C. (2022). The HGR motif is the antiangiogenic determinant of vasoinhibin: Implications for a therapeutic orally active oligopeptide. *Angiogenesis*, 25(1), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09800-x>

Robles, J. P., Zamora, M., Velasco-Bolom, J. L., Tovar, M., Garduño-Juárez, R., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., & Clapp, C. (2018). Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35383-7>

Román Curto, C. (1999). El proceso metastásico I: Invasión local de la matriz extracelular. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 90(4), 143–155.

Roshal, M. (2013). Chapter 153—Thrombin Generation Assays. En B. H. Shaz, C. D. Hillyer, M. Roshal, & C. S. Abrams (Eds.), *Transfusion Medicine and Hemostasis (Second Edition)* (pp. 945–947). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397164-7.00153-1>

Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2415–2420. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712168105>

Teilum, K., Hoch, J. C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J. A., & Kragelund, B. B. (2005). Solution Structure of Human Prolactin. *Journal of Molecular Biology*, 351(4), 810–823. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.042>

- Thebault, S., González, C., García, C., Zamarripa, D. A., Nava, G., Vaca, L., López-Casillas, F., de la Escalera, G. M., & Clapp, C. (2011). Vasoinhibins Prevent Bradykinin-Stimulated Endothelial Cell Proliferation by Inactivating eNOS via Reduction of both Intracellular Ca²⁺ Levels and eNOS Phosphorylation at Ser1179. *Pharmaceuticals*, 4(7), 1052–1069. <https://doi.org/10.3390/ph4071052>
- Tsopanoglou, N. E., & Maragoudakis, M. E. (2009). Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes. *European Cytokine Network*, 20(4), 171–179. <https://doi.org/10.1684/ecn.2009.0166>
- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64(6), 1057–1068. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90261-v](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90261-v)
- Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., & Honn, K. V. (2015). Protease-activated receptors (PARs)—Biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 34, 775–796. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9599-4>
- Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., & Honn, K. V. (2016). Thrombin—unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 35(2), 213–233. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9626-0>
- Zamora, M., Robles, J. P., Aguilar, M. B., Romero-Gómez, S. de J., Bertsch, T., Martínez de la Escalera, G., Triebel, J., & Clapp, C. (2021). Thrombin Cleaves Prolactin Into a Potent 5.6-kDa Vasoinhibin: Implication for Tissue Repair. *Endocrinology*, 162(12), bqab177. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqab177>

11. Tabla de figuras

Figura 1. Diagrama secuencial de la generación de la vasoinhibina (Vi) a partir de la prolactina (PRL).	6
Figura 2. La vasoinhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina.	17
Figura 3. La vasoinhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la migración de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina.	18
Figura 4. La vasoinhibina y sus análogos (3 aa, 4 aa y 7 aa) inhiben la invasión de células de cáncer de mama MDA-MB-231 inducida por trombina.	19

12. Índice de tablas

Tabla 1. Análogos peptídicos de la vasoinhibina	14
--	----