



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Producción de las proteínas antiangiogénicas:
vasostatina, vasoinhibina y sus quimeras en
Escherichia coli y su actividad biológica ”**

Tesis que presenta

Q.F.B. Gabriela Vázquez Rodríguez

Para obtener el grado de

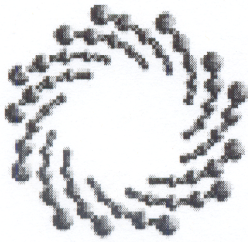
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Antonio de León Rodríguez

Dra. María del Carmen González Castillo

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto 2009



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Producción de las proteínas antiangiogénicas: vasostatina, vasoinhibina y sus quimeras en *Escherichia coli* y su actividad biológica” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fué elaborada por Q.F.B. **Gabriela Vázquez Rodríguez** y aprobada el **03 de Agosto de 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio de León Rodríguez
Director de la tesis

Dra. María del Carmen González Castillo
Codirector de la tesis

Dra. Leticia Santos Martínez
Asesor

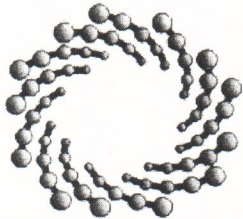
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Asesor



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Antonio de León Rodríguez y de la Dra. María del Carmen González Castillo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 211450 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 064 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 3 días del mes de agosto del año 2009, se reunió a las 09:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Antonio De León Rodríguez	Presidente	IPICYT
Dra. Maria del Carmen Gonzalez Castillo	Secretario	UASLP
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Gabriela Vázquez Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

Producción de proteínas antiangiogénicas: vasostatina, vasoinhibina y sus quimeras en Escherichia coli y su actividad biológica

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez
Dra. María del Carmen González Castillo (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:05 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes de agosto de 2009.

Mtra. Ivonne Leticia Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIAS

*A mis padres y hermanos
A Esri Hazael Juárez*

Gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maria del Carmen González Castillo por todas sus enseñanzas y asesoría durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Antonio de León Rodríguez por haberme admitido en su grupo de trabajo, además de sus consejos y asesoría.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa y la Dra. Leticia Santos Martínez por las facilidades prestadas.

Al CONACYT por la beca otorgada N° 211450

A Esri Hazael Juárez por todo su apoyo y comprensión.

A todos mis compañeros de laboratorio por todos sus consejos y sugerencias.

A Leandro Gabriel Ordóñez por todos los consejos aportados y por todo su apoyo.

CONTENIDO

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	2
Créditos institucionales	3
Acta de examen	4
Dedicatorias	5
Agradecimientos	6
Lista de tablas	9
Lista de figuras	10
Lista de anexos	11
Abreviaturas	12
Resumen	13
Abstract	14
INTRODUCCIÓN	16
1.0 Angiogénesis	16
2.0 Reguladores endógenos de la angiogénesis	17
2.1 Factores angiogénicos	18
2.1.1 Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	18
2.1.1.1 VEGF-A	18
2.1.1.2 VEGF-B	19
2.1.1.3 VEGF-C	19
2.1.1.4 VEGF-D	19
2.1.1.5 VEGF-E	20
2.1.2 Factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (FGFa y FGFb)	20
2.2 Factores antiangiogénicos	20
2.2.1 Endostatina	21
2.2.2 Vasoinhibinas	21
2.2.3 Vasostatina	23
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
METODOLOGÍA	27
1.0 Vectores de clonación	27
1.1 Vector pCR®-Blunt II-TOPO®	27
1.2 Vector pGEM®-T Easy	27
1.3 Vector pET12a	28
2.0 Clonación del ADNc de los péptidos antiangiogénicos	29
2.1 Vasostatina	29
2.2 Vasoinhibina	30
2.3 Proteínas de fusión vasostatina-vasoinhibina (VS_VI) y	30

vasoinhibina-vasostatina (VI_VS).	
3.0 Cepas bacterianas	32
4.0 METODOLOGÍA ANALÍTICA	32
4.1 Ensayos de expresión de proteínas	32
4.2 Cuantificación de proteínas totales	33
4.3 Análisis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	34
4.4 Análisis de proteínas por western blot	35
4.5 Análisis de proteínas por densitometría	36
4.6 Purificación por cromatografía de afinidad	37
4.7 Ensayos de bioactividad	38
4.7.1 Cultivo de células endoteliales de coronaria	38
4.7.2 Tratamiento con las proteínas recombinantes	39
4.7.3 Determinación de la proliferación celular por medio de la técnica de MTT	39
RESULTADOS	40
1.0 Clonación del ADNc de VS y VI	40
2.0 Clonación del ADNc de VS_VI y VI_VS	41
3.0 Clonación del ADNc de VS, VI, VS_VI y VI_VS en el vector de expresión pET12a	41
4.0 Ensayos de expresión a nivel de matraz	42
5.0 Análisis densitométrico de geles SDS-PAGE	42
6.0 Análisis por western blot de la expresión a nivel de matraz	44
7.0 Ensayos de expresión a nivel de biorreactor	45
7.1 Cinética de expresión en biorreactor de VS_VI	46
7.2 Cinética de expresión en biorreactor de VI	47
7.3 Cinética de expresión en biorreactor de VI_VS	48
8.0 Evaluación de producción de las proteínas recombinantes a nivel de matraz y biorreactor	49
9.0 Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad en columnas de níquel.	50
10.0 Evaluación de la actividad biológica.	51
10.1 Evaluación de la proliferación celular por MTT	51
DISCUSIONES Y CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS	61
ANEXOS	64

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Afecciones angiogénico-dependientes resultantes del desequilibrio en el proceso angiogénico.	17
Tabla 2. Estimuladores e inhibidores endógenos de la angiogénesis	17
Tabla 3. Estándares de BSA preparados para la curva de calibración estándar del método de Lowry	33
Tabla 4. Estándares de BSA preparados para la curva de calibración estándar para método de Densitometría	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras tridimensionales de la hPRL, GH y PL y sus sitios de corte.	22
Figura 2. Vías de señalización de las vasoinhibinas	23
Figura 3. Representación esquemática de la calreticulina y sus fragmentos antiangiogénicos	24
Figura 4. Mapa del vector pCR®-Blunt II-TOPO®	27
Figura 5. Mapa del vector de clonación pGEM-T Easy	28
Figura 6. Mapa del vector de expresión pET12a con sus principales componentes	28
Figura 7. Secuencia génica de los residuos 135-164 a.a. del extremo amino-terminal de la calreticulina y oligos del gen sintético de VS.	29
Figura 8. Secuencia génica de la prolactina humana y oligos diseñados para la amplificación del gen de la VI	30
Figura 9. Esquema del método de Overlap extension	31
Figura 10. Curva de calibración con BSA 1.32mg/mL, método de Lowry	34
Figura 11. Curva de calibración estándar de BSA 125ng para Densitometría	37
Figura 12. Amplificación por PCR del gen de la vasostatina a partir del gen sintético y su análisis por restricción	40
Figura 13. Amplificación por PCR del gen de la VI a partir del plásmido pSG-hPRL y su análisis por restricción	40
Figura 14. Obtención de los genes fusionados por Overlap extension	41
Figura 15. Análisis por restricción con las enzimas Sal I – BamH I de las construcciones obtenidas en el vector de expresión pET12a	41
Figura 16. Cinéticas de expresión en matraz de las proteínas VS, VS_VI y VI_VS	42
Figura 17. Análisis densitométrico realizado para las proteínas VS, VS_VI y VI_VS	44
Figura 18. Análisis por western blot realizados para identificar las proteínas recombinantes expresadas a nivel de matraz	45
Figura 19. Cinética de expresión de la proteína recombinante VS_VI en biorreactor	46
Figura 20. Cinética de expresión de la proteína recombinante VI en biorreactor	47
Figura 21. Cinética de expresión de la proteína recombinante VI_VS en biorreactor	48
Figura 22. Comparación de la producción de las proteínas recombinantes	49
Figura 23. Purificación por cromatografía de afinidad	50
Figura 24. Actividad de los controles utilizados en la bioactividad	51
Figura 25. Efecto inhibitorio de la vasostatina sobre células CEC	52
Figura 26. Inhibición de la proliferación de células CEC por vasoinhibina	53
Figura 27. Efecto inhibitorio de la VS_VI sobre células CEC	54
Figura 27. Efecto inhibitorio de la VI_VS sobre células CEC	55

ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLOS	65
A1. A Amplificación de ADNc con la enzima de alta fidelidad Pfu	65
A1. B Adición de Poliadeninas (PoliA)	65
A1. C Tinción de plata	65
A1. D Células rubidio competentes	66
A1. E Transformación de células rubidio competentes	66
A1. F Purificación de ADN plasmídico	66
A1. G Geles de SDS-PAGE en gradiente	66
A1. H Geles de SDS-PAGE discontinuos o tris-tricina	66
ANEXO 2. SOLUCIONES Y REACTIVOS	67
A2. A Medios de cultivo	67
A1. Medio LB	67
A2. Medio LBON	67
A3. Medio BSG	67
A2. B Soluciones para células rubidio competentes	68
B1. Solución RF1	68
B2. Solución RF2	68
A2. C Electroforesis en gel de agarosa	68
C1. TAE 50X	68
C2. Gel de agarosa al 1%	68
A2. D Soluciones para purificar ADN plasmidico por lisis alcalina	69
D1. Solución I para purificar ADN plasmidico	69
D2. Solución II para purificar ADN plasmidico	69
D3. Solución III para purificar ADN plasmidico	69
A2. E Soluciones para proteínas	69
E1. Cuantificación de proteína total (Lowry)	69
E2. Soluciones para gel de gradiente	69
E3. Soluciones para gel concentrador	70
E4. Amortiguador Tris 1.5M pH 8.8	70
E5. Amortiguador Tris 0.5M pH 6.8	70
E6. SDS 10%	70
E7. Solución de NaCl 3M	70
E8. Buffer de carga de la muestra	71
E9. Buffer de corrida Tris-glicina	71
E10. Soluciones para gel discontinuo (Tris-Tricina)	71
E11. Amortiguador de gel	71
E12. Amortiguador de ánodo	71
E13. Amortiguador de cátodo	72
A2. F Soluciones para western blot	72
F1. Buffer de transferencia Towbin	72
F2. Buffer de fosfatos PBS 1X	72
F3. Solución de bloqueo	72
F4. Amortiguador para la enzima alcalino fosfatasa	72

F5. Solución de revelado	73
F6. Solución de desteñido	73

ABREVIATURAS

CALR	Calreticulina
CEC	Células endoteliales de coronaria
CEs.	Células endoteliales.
eNOS	Sintetasa de oxido nítrico
FI	Fracción insoluble
FS	Fracción soluble
FT	Fracción total
Fig.	Figura
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HG	Hormona del crecimiento
KDR	Receptor con dominio cinasa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitogeno
MMP	Metaloproteasas de matriz
NO	Oxido nítrico
NRP-1	Neurofilina 1
OmpT	Outer membrane proteins
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PL	Lactógeno placentario
PRL	Prolactina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio
VI	Vaso inhibina
VS	Vasostatina
VS_VI	Proteína de fusión Vasostatina_Vaso inhibina
VI_VS	Proteína de fusión Vaso inhibina_Vasostatina
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VPF	Factor de permeabilidad vascular

Resumen

“ Producción de proteínas antiangiogénicas: vasostatina, vasoinhibina y sus quimeras en *Escherichia coli* y su actividad biológica”

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente se conoce como angiogénesis, participa en la reparación de tejidos y en respuestas inflamatorias. En condiciones normales existe un balance entre factores pro- y antiangiogénicos. Sin embargo, un desequilibrio en este proceso, conlleva en algunas circunstancias a una hiperproliferación de vasos sanguíneos, determinantes en patologías como el cáncer, la retinopatía diabética y en enfermedades cardiovasculares. Por estas implicaciones clínicas, ha despertado un interés considerable la búsqueda de nuevos agentes antiangiogénicos endógenos y sus mecanismos de acción. Las vasoinhibinas (VI) y la vasostatina (VS) son inhibidores naturales de la angiogénesis, que corresponden a fragmentos de grandes proteínas que por si mismas han perdido su capacidad angiogénica, derivan del extremo amino terminal de la prolactina (PRL) y de la calreticulina (CALR), respectivamente. El propósito del presente estudio fue llevar a cabo la producción de los fragmentos recombinantes activos: VI, VS y sus quimeras, vasoinhibina-vasostatina (VI-VS) y vasostatina-vasoinhibina (VS-VI) en *Escherichia coli*. Las proteínas recombinantes fueron expresadas en *E. coli* BL21SI mediante el vector de expresión pET12a, fueron analizadas en SDS-PAGE y cuantificadas por densitometría y western blot. Todas las proteínas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en columnas de níquel. La producción de cada una de las proteínas a nivel de matraz fue de (mg/L): VS 6.87, VI 0.65, VS-VI 3.77 y VI-VS de 3.06, a nivel de biorreactor fue de (mg/L): VI 2.02, VS_VI 4 y VI_VS 0.39, lo que indica que la producción de las proteínas en este trabajo fue más eficiente en matraz que en biorreactor, no así para VI en donde su producción en biorreactor se vio incrementada, esto sugiere que es necesario optimizar las condiciones de cultivo a este nivel con el fin de mejorar la expresión de las proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos mostraron que cada una de estas proteínas recombinantes, y sus quimeras, contienen los fragmentos activos antiangiogénicos, cuyo blanco biológico son las células endoteliales al mostrar un bloqueo en la proliferación de células endoteliales coronarias estimulada por sustancias vasoactivas como la Bradicidina. Estos hallazgos abrirán nuevas líneas de investigación en el desarrollo de novedosas herramientas biológicas en la terapia angiogénica.

PALABRAS CLAVE.

Proteínas de fusión, endotelio, angiogénesis, biorreactor.

Abstract

“Production of the antiangiogenic proteins: vasostatin, vasoinhibin, and its fusion proteins in *Escherichia coli* and biological activity”

The formation of new blood vessels from the existing vasculature is known as angiogenesis, play a key role during wound healing process, tissues growth and inflammatory responses. In normal conditions a balance between pro- and antiangiogenic factors exist, however, a desbalance in this process, leads to, in some circumstances, an hiperproliferation of blood vessels, important in pathological diseases such as cancer, vasoproliferative retinopathies, rheumatoid arthritis and cardiovascular diseases. By these clinical implications, a considerable interest in search of novel antiangiogenic factors and its action mechanisms has awaked. The vasoinhibins (VI) and vasostatin (VS) are fragments released from N-terminal end of the human prolactin (hPRL) and calreticulin (CALR), respectively, those fragments are natural antiangiogenics. The aim of this study is the production of active recombinant fragments: VI, VS and their fusion proteins, vasostatin_vasoinhibin (VS_VI) and vasoinhibin-vasostatin (VI_VS). The recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21SI with the expression vector pET12a, the protein production were analyzed by SDS-PAGE, and Western blot quantification at bioreactor and flask level, also we quantified by densitometry in flask level. All proteins were purified by nickel affinity chromatography; the biological activity was evaluated in coronary endothelial cells (CEC). The protein production at flask level was (mg/L): VS 6.87, VI 0.65, VS-VI 3.77 and VI-VS 3.06; and at bioreactor level was (mg/L): VI 2.02, VS_VI 4.0 and VI_VS 0.39. In this study the protein production is more efficient in flask than bioreactor level, nevertheless, VI was able to improve its production at bioreactor level. We need optimize culture conditions at bioreactor level to improve the production of recombinant proteins. The results show that each recombinant proteins contain the active corresponding antiangiogenic fragments, whose biological target are endothelial cells that show an inhibition proliferation stimulated by vasoactive substances like Bradykinin (BK), fact that will open new lines of investigation for the development of novel biologic tools in the angiogenic therapy.

KEY WORDS.

Fusion proteins, endothelia, angiogenesis, bioreactor.

INTRODUCCIÓN

1.0 ANGIOGÉNESIS

Es el proceso mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente, consta de una serie de pasos que incluyen la migración y proliferación de células endoteliales (CEs), la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables¹.

El proceso angiogénico se lleva a cabo principalmente por los siguientes pasos: (a) las CEs preexistentes son sometidas a la presencia de factores de crecimiento endotelial; (b) las CEs activadas liberan enzimas proteolíticas que degradan la membrana basal; (c) éstas proliferan y se extienden en el lecho basal, mientras que las metaloproteasas de matriz liberadas disuelven la matriz extracelular; (d) el plexo vascular se expande de manera progresiva debido al nacimiento de los vasos; (e) el cual se remodela formando un red vascular altamente organizada de vasos grandes que se ramifican en vasos pequeños; (e) los canales recién formados por CEs maduran al reclutar células de músculo liso y pericitos, células altamente especializadas que regulan la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos, proporcionando resistencia y permitiendo la regulación de la perfusión de los vasos².

Durante el proceso embriogénico la angiogénesis representa un evento negativo activo como parte del desarrollo gestacional normal y continúa después del nacimiento en el desarrollo temprano postnatal, para proveer de manera adecuada el oxígeno y los nutrientes requeridos por los órganos en crecimiento, además de proporcionar señales promotoras morfológicas y siendo fundamental para el crecimiento del esqueleto. En la etapa adulta, la angiogénesis ocurre únicamente en el ovario en mujeres menstruantes, debido a que el crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo dependen de la proliferación de nuevos vasos capilares, y en la placenta durante el embarazo; también está presente en el proceso regenerativo de reparación y cicatrización de heridas. Este mecanismo fisiológico se mantiene en equilibrio debido a la presencia de factores promotores e inhibidores de la angiogénesis e implica una estructura y funcionamiento jerárquico bien ordenado de la vasculatura corporal¹.

Sin embargo, la alteración del balance angiogénico que sobrepasa el umbral entre estimuladores e inhibidores angiogénicos, muestra dos escenarios: aquella en la cual se encuentra un mayor número de estimuladores y el proceso angiogénico se ve activado; por otro lado, cuando los agentes antiangiogénicos se encuentran aumentados, el proceso angiogénico se ve inhibido. Ambas situaciones conllevan a diversas enfermedades angiogénico-dependientes (Tabla 1)¹.

Tabla 1. Afecciones angiogenico-dependientes resultantes del desequilibrio en el proceso angiogénico.

ANGIOGÉNESIS	
Activada	Inhibida
Hemangiomas	Inhibición en vasos colaterales:
Psoriasis	-Isquemia del miocardio
Sarcoma de Kaposi	-Isquemia periférica
Neovascularización ocular	-Isquemia cerebral
Artritis reumatoide	
Endometriosis	
Aterosclerosis	
Cáncer	

Modificado de: Martínez-Ezquerro, J. D. & Herrera, L. A. (2006). ANGIOGÉNESIS: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer. *Cancerología* 1, 83-96.

2.0 REGULADORES ENDÓGENOS DE LA ANGIOGÉNESIS

Existen una serie de factores endógenos, tanto físicos como moleculares, que participan en la regulación del proceso angiogénico, entre los factores físicos se encuentran: el mantenimiento de la forma celular, las interacciones célula-célula y el flujo sanguíneo. Entre los factores moleculares se encuentran, la acción de los factores antiangiogénicos endógenos (Tabla 2)³.

Dentro de los factores angiogénicos más estudiados en cuanto a localización celular, mecanismos de acción y sus implicaciones en el proceso angiogénico se encuentra el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), seguido del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), angiopoietina, proliferina, entre otros (Tabla 2). Por otro lado, el bloqueo fisiológico de la angiogénesis, se lleva a cabo por fragmentos de proteínas endógenas completas, que, por si mismas han perdido esta capacidad antiangiogénica, o bien, moléculas que participan en otras funciones y que actualmente se les ha identificado como potentes agentes antiangiogénicos^{4; 5}.

Tabla 2. Estimuladores e inhibidores endógenos de la angiogénesis⁶

Estimuladores	Inhibidores
Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	Angiostatina
Factor de crecimiento fibroblástico básico y ácido (bFGF y aFGF)	Endostatina
Factor de crecimiento de hepatocitos	Vasostatina
Factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PDGF)	Canstatina
Factor de crecimiento transformante β (TGF β)	Tumstatina
Angiogenina	Receptor soluble del VEGF
Proliferina	Inhibidores de metaloproteasas de matriz extracelular
Interleucina-8	Vaso inhibinas
Angiopoietina	Interleucina-12
Leptina	Arrestina
Factor estimulante de colonias de granulocitos	Factor plaquetario 4
Folistatina	Restina
Factor de necrosis tumoral α	Maspina
Pleiotropina	Interleucina-18

Entre los factores más estudiados y conocidos se encuentran:

2.1 Factores angiogénicos.

2.1.1 Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

El sistema que incluye al VEGF y sus receptores es reconocido como el principal regulador de CEs vasculares y de la formación de vasos sanguíneos. El VEGF es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las CEs; es miembro de la súper familia de genes VEGF-PDGF que incluye al VEGF-A, -B, -C, -D y -E, así como al factor de crecimiento de placenta (PIGF). El VEGF se identificó en el año de 1983 como un factor de permeabilidad vascular (VPF) y como un factor de crecimiento específico de CEs vasculares codificado por el gen VEGF, por lo que es referido como VEGF, VEGF/VPF o simplemente VPF¹

El VEGF responde a estímulos como hipoxia/ isquemia mediante el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), a distintos factores de crecimiento (EGF, TGF- α y - β , KGF o factor de crecimiento derivado de queratinocitos, IGF-1 o factor de crecimiento insulínico tipo 1, FGF y PDGF), a oncogenes activados (por ejemplo Ras) así como a distintas citosinas (IL-1- α y IL-6), p53 mutado, estrógeno y óxido nítrico (NO)¹.

El VEGF promueve la migración celular e inhibe la apoptosis, incrementa la permeabilidad de vasos sanguíneos a través de las uniones celulares, induce vasodilatación de las células musculares lisas al promover la síntesis de NO, estimula la angiogénesis y participa en la vasculogénesis y en la linfangiogénesis. Contribuye al remodelamiento vascular durante el ciclo ovárico y la implantación embrionaria, a la cicatrización y reparación de heridas, por otro lado, se ha encontrado que en condiciones patológicas puede contribuir al desarrollo de tumores sólidos al promover la angiogénesis, además de participar en distintas afecciones angiogénico-dependientes como la psoriasis, artritis reumatoide, retinopatía diabética y diabetes mellitus.

El hecho de que se hayan descubierto receptores para el VEGF en neuronas y astrocitos, así como también neurofilinas (receptores para proteínas de la familia de las semaforinas) como k.o.-receptor de algunos miembros de la familia VEGF, sugiere que, el VEGF puede actuar como un factor neuroprotector y neurotrófico tanto en el sistema nervioso central como periférico a través de estimular la angio y astrogenesis⁷.

2.1.1.1 VEGF-A. Es el más estudiado de esta familia de genes. El VEGF-A emplea sitios de unión simétricos en cada polo del dímero para unirse tanto al VEGFR-1 como al VEGFR- 2 y puede inducir heterodímeros entre estos dos receptores. Hasta el momento se han reportado seis isoformas del VEGF en seres humanos las cuales contienen 121, 145, 165, 183, 189 y 206 residuos de aminoácidos, generados como resultado del splicing alternativo del RNA mensajero, que difieren tanto en su masa molecular como en sus propiedades biológicas¹. La isoforma más común y mejor estudiada es la VEGF₁₆₅, esta cuenta con dominio de unión a

heparina, lo que indica un reconocimiento hacia proteoglicanos heparan sulfato (PHS), componentes de la superficie celular y la matriz extracelular altamente conservados que juegan un papel muy importante en la formación y modulación de gradientes de factores de crecimiento que presentan dominio de unión a heparina. El grado de dominios de unión es un indicativo de la correcta distribución en la matriz extracelular durante la formación de los vasos sanguíneos, además, la heparina también promueve la unión del VEGF₁₆₅ a sus receptores KDR y NRP1. De las isoformas del VEGF-A mencionadas, solo la isoforma VEGF₁₂₁ carece de este dominio de unión a heparina⁸. El VEGF-A es producido por muchos tipos celulares incluyendo, células tumorales, macrófagos, plaquetas, queratinocitos, y células mesangiales renales⁹.

2.1.1.2 VEGF-B. Se conocen dos isoformas, el VEGF-B₁₆₇ y el VEGF-B₁₈₆, cada una con 167 y 186 residuos de aminoácidos, respectivamente. La expresión del VEGF-B no es regulada por hipoxia y está implicado en la angiogénesis por su papel en la regulación de la degradación de matriz extracelular, adhesión celular y migración de CEs⁷, incrementa niveles de uPA y PAI-1 en células BME¹⁰. Es un ligando tanto para el VEGFR-1 como para el receptor neurofilina-1 (NRP-1) y se expresa en distintos tejidos humanos normales, principalmente en el miocardio en desarrollo, en el músculo esquelético, en cerebro de humano y ratón, además de expresarse en tumores humanos benignos y malignos^{1;7}.

2.1.1.3 VEGF-C. Es un factor potente de permeabilidad, es 4-5 veces menor que el VEGF-A debido posiblemente al grado de afinidad a la heparina, cuenta con un tamaño de 61 KDa por subunidad, que mediante la maduración proteolítica forma un homodímero de 21 KDa. Este factor estimula la migración y proliferación de CEs Sf9; su unión al VEGFR-3 regula la señalización del VEGFR-2 actuando de manera sinérgica con el VEGF-A, *in vitro*, el VEGF-C muestra un efecto quimiotáctico y mitogénico dosis-dependiente sobre CEs, particularmente sobre la microvasculatura. El VEGF-C estimula la liberación de NO de CEs e incrementa la permeabilidad vascular en el ensayo de Miles, incrementa la permeabilidad vascular y promueve la angiogénesis en un modelo de conejo con isquemia en el miembro posterior¹¹; Además, está asociado a las células neuroendocrinas (NE) aunque sin participación aparente en el desarrollo de la vasculatura del sistema neuroendocrino¹.

2.1.1.4 VEGF-D. Induce proliferación de CEs y se une tanto al VEGFR-2 como al VEGFR-3. Es un compuesto linfoangiogénico de menor potencia que el VEGF-C, así como también se encuentra asociado con las células NE.

Tanto el VEGF-C como el -D, son elementos esenciales para el desarrollo del sistema linfático y pueden inducir la angiogénesis y aumentar la permeabilidad vascular. Se unen al receptor VEGFR-3 que se expresa en regiones capilares de tejidos con alto grado de intercambio de moléculas, entre estos tejidos se encuentran, las glándulas endocrinas y el riñón, además, el hecho de que las NE expresen estos factores de crecimiento en algunos tejidos, sugiere que ambos factores podrían tener un papel especial en la liberación de péptidos de gránulos secretores hacia capilares circundantes¹².

2.1.1.5 VEGF-E. Éste factor también es referido como VEGF_{Forf} ya que se descubrió en el genoma del parapoxivirus Orf (cepa NZ-7), carece del dominio de unión a heparina encontrado en el VEGF-A y se une y activa específicamente al VEGFR-2, resultando en un efecto mitogénico y en actividad de permeabilidad vascular similar al producido por el VEGF-A₁₆₅, aunque se desconocen los residuos de aminoácidos que median ésta unión. Además, induce la expresión del factor tisular (TF) y la angiogénesis¹.

2.1.2 Factor de Crecimiento Fibroblástico ácido y básico (FGFa y FGFb)

Los FGFs forman un grupo muy similar de mitógenos polipeptídicos, descritos en 1986 e incluyen a 22 miembros. Los primeros y los más estudiados son el FGF1 (FGF ácido ó aFGF) y el FGF2 (FGF básico ó bFGF), los otros 20 se describieron como FGF3-FGF23, por otro lado, se sabe que el FGF19 se encuentra solo en humanos y el FGF15 solo en ratones. El peso molecular de todos los miembros de ésta familia oscila entre 17 y 34kDa, algunos de ellos presentan glicosilaciones en su estructura molecular, interactúan con tres diferentes tipos de moléculas: proteoglicanos heparan sulfato, una proteína transmembranal de unión a FGF rica en cisteína y cuatro receptores de unión a FGF de alta afinidad pertenecientes a la familia de las tirosin cinasas con dos o tres dominios tipo inmunoglobulina y una secuencia de unión a heparina en la región extracelular del receptor.

Normalmente tienen efecto sobre células de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico, el FGF7 tiene acción únicamente sobre células epiteliales, también presentan la capacidad de regular la migración y diferenciación *in vitro* e *in vivo*⁷. Se encuentran presentes en procesos angiogenico-dependientes como en la reparación de heridas. Al igual que los VEGFs, cuando ocurre el proceso de reparación de heridas, el pico de expresión bFGF se encuentra después de 5 días y a los 7 días posteriores al trauma regresa a sus niveles basales en sangre², los niveles de aFGF aumentan en pared de venas varicosas y su sobreexpresión via FGFR y MAPK influencia la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de la matriz extracelular y juega un papel importante en el remodelamiento de pared de venas¹³.

2.2 Factores antiangiogénicos

Los péptidos endógenos con capacidad antiangiogénica, que en su mayoría provienen de proteínas mayores debido a una proteólisis enzimática, específica y selectiva, generando fragmentos peptídicos con capacidad inhibitoria sobre la proliferación y migración de CEs¹⁴. Algunos de ellos están bien caracterizados y se encuentran ya en ciertas fases de investigación clínica, sin embargo, otros más se clasifican como péptidos novedosos, no caracterizados, propuestos como potentes agentes en la terapia antiangiogénica. Algunos ejemplos de éstos reguladores negativos de la angiogénesis son:

2.2.1 Endostatina

Es un inhibidor endógeno de la angiogénesis que corresponde al dominio NC1 del extremo carboxilo terminal de la colágena tipo XVIII, fue identificado y purificado de la línea celular de hemangioendotelioma murino¹⁵ y posteriormente caracterizado en ratón. Es un fragmento de 20-22kDa originado proteolíticamente por al menos dos enzimas: la elastasa y la catepsina, se produce inicialmente en una forma trimérica que posteriormente es convertida a forma monomérica¹⁶.

La endostatina bloquea la angiogénesis, suprime el crecimiento de tumores primarios y metástasis en modelos de animales experimentales sin ningún efecto secundario aparente, toxicidad ó resistencia, actualmente se encuentra en fase clínica II¹⁷. Los mecanismos moleculares por los cuales la endostatina bloquea el crecimiento tumoral incluyen la interferencia en la transducción de señales inducida por bFGF, bloquea la migración de CEs al interferir con la interacción célula-célula y la adhesión de éstas a la matriz celular¹⁸, induce apoptosis, causa arresto de CEs en fase G1 del ciclo celular al inhibir a la ciclina D1¹⁹ y bloquea la señalización mediada por el VEGF al interactuar directamente con su receptor VEGF-R2 en células HUVEC. Además se ha visto que inhibe la producción de óxido nítrico al activar a la fosfatasa-2A e inhibir la fosforilación de la eNOS en el residuo 1177 (S1177D)²⁰.

2.2.2 Vasoinhibinas

Es una familia de péptidos antiangiogénicos provenientes de la región amino terminal de la prolactina (PRL), hormona del crecimiento (GH) y lactógeno placentario (PL). La proteólisis de la prolactina por la catepsina-D genera péptidos antiangiogénicos de 1–132 (15.0 kDa), 1–147 (16.8 kDa) y 1–150 (17.2 kDa)²¹, las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13) por su parte generan péptidos de 17kDa que posteriormente son procesados por otras MMPs a fragmentos de 16kDa y 14kDa. Por otro lado, las vasoinhibinas (VI) derivadas tanto de la GH como del PL son originadas por el corte de la plasmina entre los residuos 134-135, la trombina actúa sobre la GH en los mismo sitios generando un péptido de 15kDa, de igual manera, la GH es cortada por la subtilisina en los residuos 139, 146 y 149, y por la quimiotripsina en el residuo 143 (Fig. 1). Todos estos fragmentos poseen actividad antiangiogénica¹⁴.

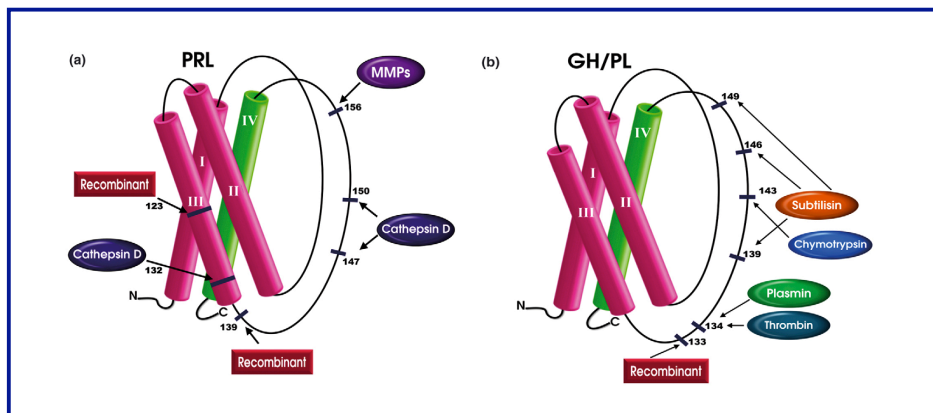


Figura 1. Estructura tridimensional de (a) la prolactina humana y (b) la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario. Se indican los sitios de corte y las enzimas de reconocimiento de lo cual se generan las vasoinhibinas, así mismo se indica el sitio de corte de las proteínas recombinantes. Modificado de Clapp, C., Aranda, J., González, C., Jeziorski, M. C. & Martínez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17, 301-7.

De las proteínas antes mencionadas, las VI provenientes de la PRL humana son los péptidos más estudiados en cuanto a caracterización en diversos modelos experimentales, dando un enfoque general a todos los péptidos provenientes de estas tres proteínas.

Las VI generadas a partir de la prolactina son originadas a través de proteólisis enzimática por enzimas del tipo de la cathepsina D *in vitro* a pH ácido (pH 5.5). *In vivo* actúa sobre la superficie de CEs cerca de la bomba de ATP/H⁺ e intercambiadores de Na⁺/H⁺ las cuales proveen un ambiente propicio para que se lleve a cabo esta reacción²².

Las VI inhiben la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* presentando diversos mecanismos de acción mediante los cuales inhiben la migración y proliferación de CEs, entre los que se encuentran la inducción de apoptosis celular a través de la activación del factor nuclear NF- κ B al inducir la degradación de su inhibidor I κ B α para así, activar la vía de las caspasas 8, 9 y 3 tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la ruta apoptótica²³ lo que conlleva a una regresión vascular. Bloquea la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) vía Bradicidina y acetilcolina, al interferir en la movilización del calcio intracelular inducido por estas dos vías, inhibiendo la unión del calcio a la calmodulina (Ca²⁺-CaM), unión que es necesaria para la activación de eNOS²⁴, además de inhibir fosforilación de eNOS en el residuo 1177. Bloquean la proliferación celular inducida por VEGF a nivel de MAPK por la traslocación de Raf, sin embargo, también se sabe que las acciones del VEGF son mediadas en parte por el NO, que es bloqueado por las VI²⁵. Bloquean el uPA (Activador del plasminógeno urocinasa) basal induciendo la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) por lo que inhiben migración celular²⁶, previenen la transición de fases G0-G1 y G2-M del ciclo celular al interferir con las ciclinas D1 y B1 y (Fig. 2)²⁷.

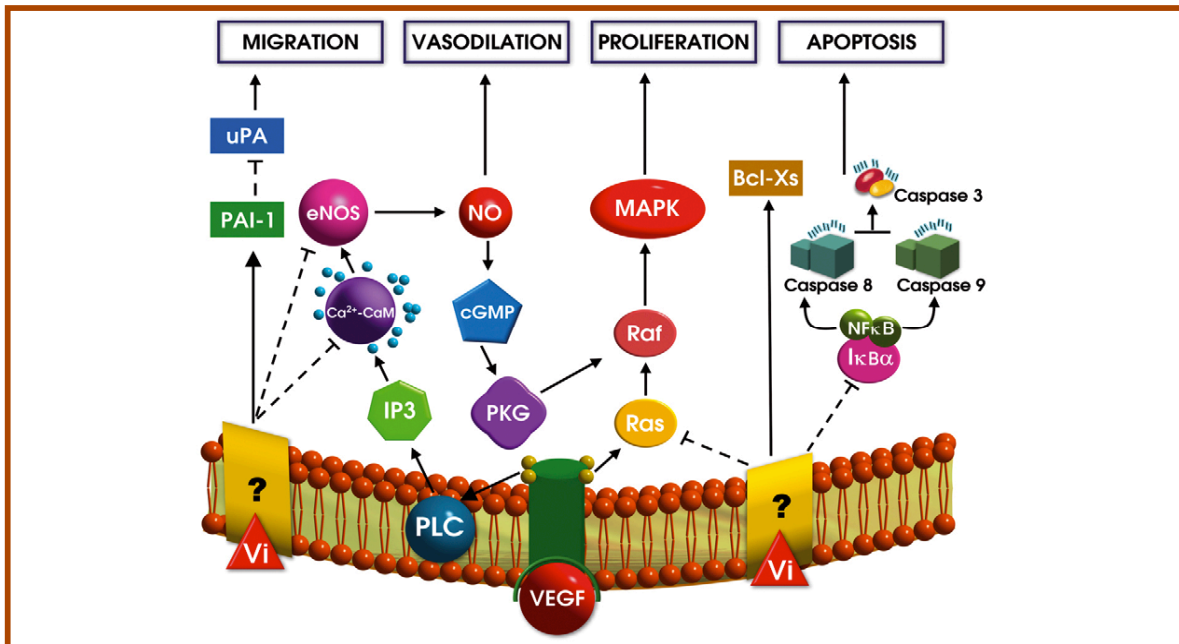


Figura 2. Vías de señalización conocidas para las vasoinhibinas en donde se ilustra la inhibición de la migración celular a través de la activación de PAI-1, la unión a su receptor hipotético lo cual conlleva a interferir con la actividad de la eNOS y a su vez con la vasodilatación, además de bloquear la vía de las MAPK inducida por el VEGF e inducir apoptosis al activar a NF-κB y/o Bcl-Xs²⁷.

Los estudios biológicos de las Vi se ha llevado a cabo también en animales de experimentación en los cuales se encontró que las Vi previenen la vasopermeabilidad de la retina asociada a la retinopatía diabética, esto por sus mecanismos antes descritos de inhibir la vasopermeabilidad inducida por acción del VEGF, interferir con la activación de la eNOS vía Bradicidina y principalmente por activación de la fosfatasa-2A la cual desfosforila a la eNOS en el residuo Ser¹¹⁷⁷ inactivándola²⁸.

2.2.3 Vasostatina

Es un péptido endógeno proveniente del extremo amino terminal de la calreticulina, una proteína perteneciente a la familia de las calnexinas, localizada en retículo endoplásmico relacionada con el almacenamiento de calcio intracelular y con la actividad de chaperona²⁹. La vasostatina incluye los residuos 1-180a.a. de la calreticulina, fue aislada del sobrenadante de células inmortalizadas con el virus de Epstein Barr. Estudios biológicos realizados de este péptido revelan su alto potencial como agente antiangiogénico, ya que presenta la capacidad de inhibir la proliferación de CE y no de otros linajes, inhibe la angiogénesis *in vivo*, suprime la neovascularización *in vivo* y previene o reduce el crecimiento de tumores experimentales³⁰.

El estudio de este péptido ha llevado a encontrar el dominio activo de esta

molécula a partir de los 180 aminoácidos amino-terminales provenientes de la calreticulina. Se encontró posteriormente que una reducción a 60 aminoácidos de la vasostatina, esto es, los residuos 120-180 a.a amino-terminales de la calreticulina, cuentan con una actividad antiangiogénica comparable a la vasostatina y la calreticulina indicando que esta última y sus fragmentos son inhibidores de CEs y suprimen el crecimiento tumoral³¹; una mejor actividad antiangiogénica se descubrió al fraccionar el dominio de 120-180 a.a. y encontrar que los residuos 135-164 a.a. del extremo amino-terminal de la calreticulina poseen una mayor actividad antiangiogénica, esto fue evaluado en la línea de CEs derivadas de cordón umbilical humano (ECV304) y en membranas corioalantoideas de pollo³². (Fig. 3)

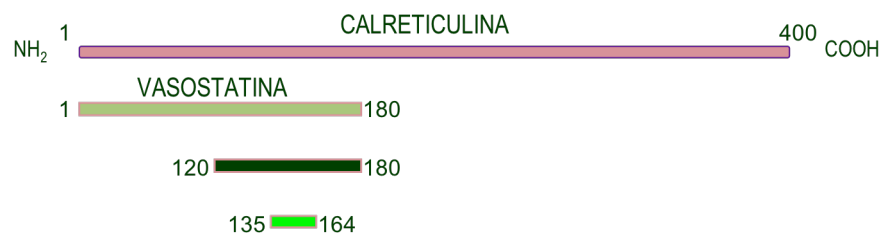


Figura 3. Representación esquemática de la calreticulina y sus fragmentos amino-terminales con actividad antiangiogénica, se detallan el numero de residuos que los conforman y los tamaños aproximados de cada uno en base a la proteína completa^{31; 32}.

La vasostatina, como péptido de 120-180 a.a. de la calreticulina, se ha producido de forma recombinante como proteína de fusión a MBP (Maltose binding protein) obteniéndose buenos rendimientos al variar las condiciones de producción^{33; 34}. Además, se ha fusionado a otros péptidos antiangiogénicos dando lugar a proteínas de fusión con una actividad de inhibición de la angiogénesis mayor en comparación con los péptidos por separado, se ha llevado acabo la fusión de la vasostatina con el fragmento activo del factor plaquetario-4, un péptido de 13 a.a. carboxilo terminales que al igual que la vasostatina presenta actividad antiangiogénica, pero con efecto sinérgico entre los dos péptidos³². Además se ha producido como proteína de fusión con el fragmento amino terminal de la urocinasa (ATF) con lo cual impide la unión del uPA a su receptor el uPAR inhibiendo la activación del plasminógeno a plasmina y por lo tanto la degradación de la matriz extracelular³⁵.

La vasostatina, al igual que las VI y la endostatina, inhibe al VEGF-A dando como resultado la inhibición de la proliferación de CEs, sin embargo, debido a esta característica también se le ha atribuido un efecto en procesos inflamatorios, ya que al inhibir a este factor reduce la permeabilidad vascular y por lo tanto el edema y la infiltración de leucocitos a los tejidos circundantes del vaso sanguíneo, también en este proceso disminuye la expresión de la angiopietina (Ang-2) un desestabilizador vascular³⁶.

Cabe mencionar que, los fragmentos proteicos antes descritos, a pesar, de que no poseen sitios conservados entre ellos y que provienen de moléculas parentales, con funciones diferentes entre ellas, tienen la capacidad de generar fragmentos con alto potencial antiangiogénico con vías de señalización en común sobre las CEs, ya que:

- a) Inhiben la proliferación celular inducida por el VEGF.
- b) Inhiben migración celular al interferir con componentes de la matriz extracelular

Los péptidos de naturaleza endógena antes mencionados, cuentan con capacidad de inhibir la angiogénesis a distintos niveles moleculares, todos se proponen como candidatos en la terapia antiangiogénica en el combate contra diversos tipos de cáncer, ya que, una de las vías a través de las cuales un tumor incrementa su tamaño se debe, en parte, a la formación de nuevos vasos sanguíneos para obtener nutrientes, por lo que un agente capaz de frenar el proceso angiogénico en una forma específica y selectiva sobre un tipo de tumor en particular, y sin afectar células y tejidos normales, podría prevenir el crecimiento tumoral y/o el proceso de metástasis sin ocasionar efectos secundarios.

JUSTIFICACIÓN

Las afecciones angiogénico-dependientes como el cáncer representan una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, el desarrollo de estrategias para prevenirlo o controlarlo esta en estudio constante a nivel básico y clínico². En tal estudio se consideran el desarrollo e identificación de nuevas moléculas que interfieren con el proceso angiogénico y que a la vez sean tejido/célula específicos. El presente trabajo se enfoca a la producción de péptidos recombinantes de naturaleza endógena, provenientes de proteínas nativas, y la obtención de sus proteínas de fusión para la búsqueda y aplicación de potentes y estables agentes antiangiogénicos.

OBJETIVO GENERAL

Producir las proteínas recombinantes con actividad antiangiogénica: Vasostatina, vasoinhibina y sus quimeras en *Escherichia coli*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir los sistemas de expresión de la VI, VS y sus quimeras en *E. coli*.
- Evaluar la producción de las proteínas recombinantes a nivel de matraz y de biorreactor.
- Purificar por cromatografía de afinidad en columnas de níquel cada una de las proteínas recombinantes.
- Evaluar *in vitro* la potencia en la inhibición de la proliferación celular en CEC de cada una de las proteínas recombinantes obtenidas.

METODOLOGÍA

1.0 VECTORES DE CLONACIÓN

1.1 VECTOR pCR®-Blunt II-TOPO®

Se utilizó el kit de clonación TOPO® Zero Blunt® de Invitrogen, este vector se basa en la actividad de la topoisomerasa para ligar genes con extremos romos provenientes de reacciones de PCR con enzimas de alta fidelidad (ej. Pfu, accuzyme, etc.)³⁷. En este vector se clonaron los genes de VS y VI (Figura 4), del cual se extrajeron los insertos con las enzimas Sal I y BamH I para posteriormente ser clonados en el vector de expresión pET12a.

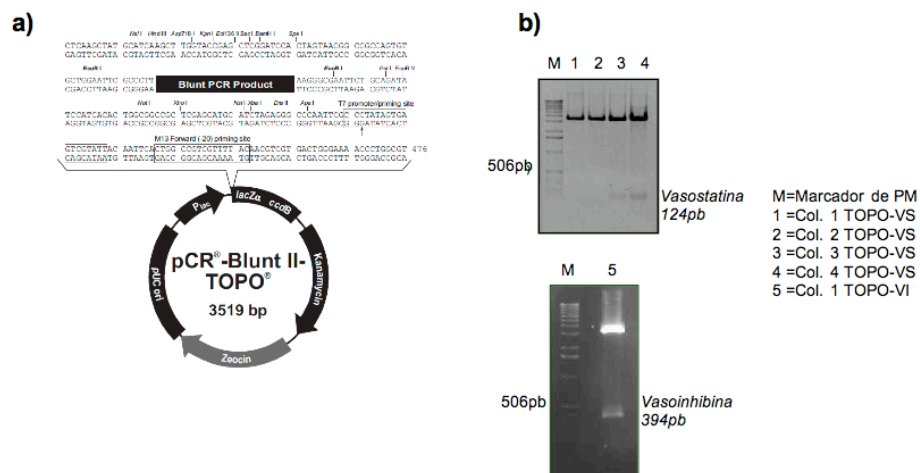


Figura 4. Mapa del vector pCR®-Blunt II-TOPO® en donde se muestran **a)** sus principales características y **b)** el análisis por restricción con las enzimas Sal I – BamH I de los insertos de la VS y la VI generando fragmentos de 124pb (colonia 3 y 4 de TOPO-VS) y 394pb (colonia 1 TOPO-VI) respectivamente, ambos clonados en este vector.

1.2 VECTOR pGEM®-T Easy

El vector pGEM®-T Easy de Promega, se basa en la ligación de productos de PCR amplificados con polimerasas termoestables que generan extremos con residuos 3' terminales de adenina (A) (ej. *Taq Polimerasa*, *Tfl*, *Tht*, *Tli*, etc), al contar con una timina (T) 3' terminal en ambos extremos del vector, proveyendo un extremo cohesivo compatible con el del producto de PCR. En este vector se clonaron los genes quiméricos VS-VI y VI-VS (Figura 5).

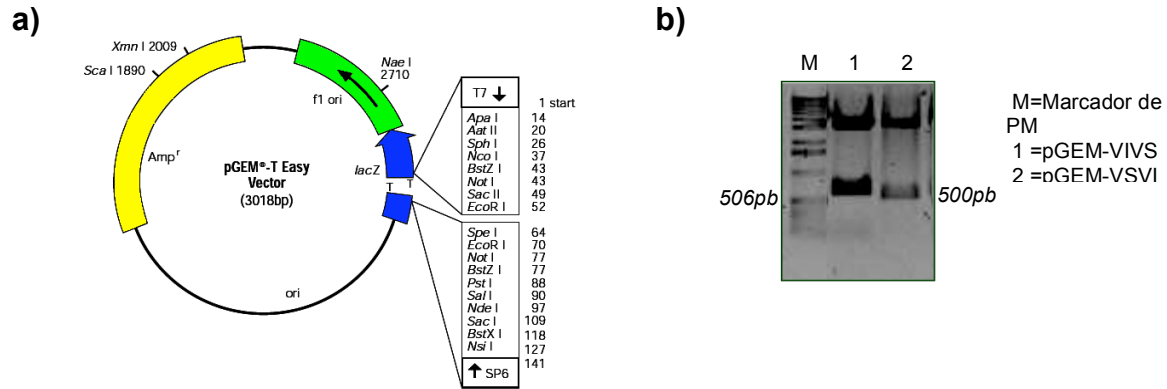


Figura 5. Mapa del vector de clonación pGEM-T Easy en donde se pueden apreciar **a)** sus características principales, así como el sitio de clonación múltiple y **b)** el análisis de restricción con la enzima EcoR I de los plásmidos que contienen los genes de las proteínas quiméricas.

1.3 VECTOR pET12a

El plásmido pET12a es un vector de expresión de proteínas que cuenta con el péptido líder de la proteína OmpT de *E. coli*, por lo cual tiene su utilidad al transportar proteínas recombinantes solubles al periplasma de la bacteria (Figura 6). Se optó por este vector de expresión para clonar los genes de las proteínas recombinantes: VS, VI, VI-VS y VS-VI.

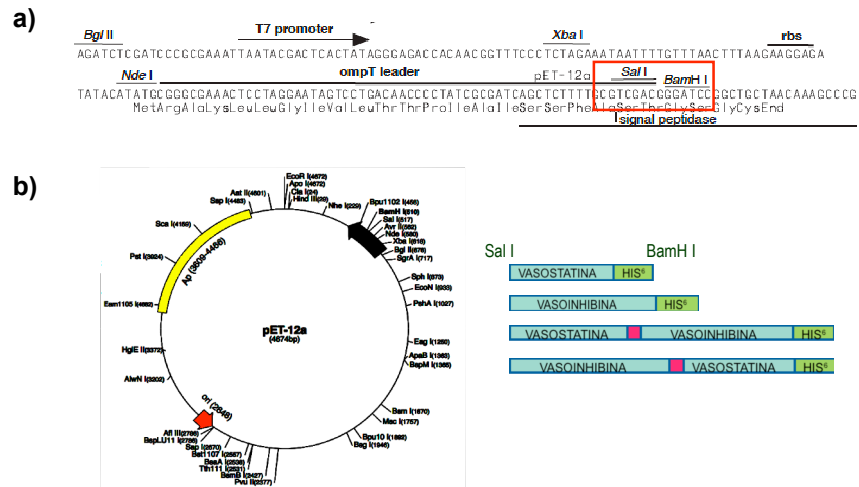


Figura 6. Región de clonación/expresión transcrita por la RNA polimerasa T7 del pET12a, además de la secuencia del péptido señal de OmpT, **a)** se resalta en recuadro rojo el sitio de clonación de los genes de las proteínas recombinantes y **b)** el mapa del pET12a con sus principales componentes y los cuatro insertos que se clonaron en este vector en los sitios Sal I-BamH I.

2.0 CLONACIÓN DEL ADNc DE LOS PÉPTIDOS ANTIANGIOGÉNICOS

2.1 VASOSTATINA.

La secuencia génica de la VS se obtuvo mediante el diseño de un gen sintético que comprendía los aminoácidos 135-164 del extremo amino-terminal de la calreticulina (Figura 7), péptido al cual sus acciones biológicas han sido confirmadas (Li et. al. 2007).

- a) 5'gacatctgtggccctggcaccagaagggtcatgtcatcttcaactacaagggcaagaacgtgctgat
caacaaggacatccgttgaag 3'
- b) **VSF**
5'catggacatctgtggccctggcaccagaagggtcatgtcatcttcaactacaagggcaagaacgtgc
tgatcaacaaggacatccgttgaagc 3'
- VSR**
5'tcgagcttgcaacggatgtcctgttgatcagcagcttctggccctgtagttgaagatgacatgaaccttct
tggtgccagggccacagatgtc 3'

Figura 7. a) Secuencia génica de los residuos 135-164 a.a. del extremo amino-terminal de la calreticulina correspondientes a la VS y b) oligos sentido (VSF) y antisentido (VSR) que se diseñaron para la síntesis del gen de la VS, en verde se señala la inserción de un atg artificial y en rosa los sitios de restricción para 5' Nco I--Xho I 3'.

Este gen sintético se utilizó de molde para amplificar por PCR el gen de la VS con una enzima de alta fidelidad Pfu DNA Polimerasa de BIOTOOLS (Protocolo A, Anexo1) con los siguientes oligos:

PVSF (sentido) 5'gtcgacggacatctgtggcc 3'
PVSR (antisentido) 5'-ggatccttacttgcaacggatgtcc-3'

En los cuales se indica el codón de stop (rojo) y los sitios de restricción para Sal I (+ una base g para entrar en fase) en el oligo sentido y para BamH I en el oligo antisentido (rosa), posteriormente el producto de PCR fue clonado en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® (TOPO-VS) y transformándose en la cepa DH5α de *E. coli*, este plásmido se utilizó como molde para amplificar nuevamente VS con los siguientes oligos:

PVSF (sentido) 5'gtcgacggacatctgtggcc 3'
PVSR (antisentido) 5'ggatccttagtggtggtggtgcttgcaacggatgtcc 3'

Se diseñaron los oligos con el mismo código de color, se añadió además al oligo antisentido una secuencia que codifica para 6 histidinas (en verde) que serán útiles en el proceso de purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en columna de níquel. El producto de PCR se clonó en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® (TOPO-VS_His6) en la cepa DH5α de *E. coli*, posteriormente el gen de la VS_His6 se subclonó en el vector de expresión pET12a (pET12a-VS) y se transformó la cepa BL21SI de *E. coli*.

2.2 VASOINHIBINA:

El gen de la vasoinhibina se obtuvo a partir del plásmido pSG-hPRL (donado por la Dra. Carmen Clapp y el Dr. Gabriel Nava del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, de la UNAM) el cual contiene el cDNA de la prolactina humana, los oligos se diseñaron de tal manera que se amplificaron los residuos 1-120 a.a. del extremo amino-terminal de la prolactina (Fig. 8).

a)

```
atgttcccactctgtccggcggggctgccgatgcca ggtgacccttcgagacctgttgaccgcccgtctgtcccacta
catcataa cctctctcaga aatgttcagcga atcgataaacggtataccatggccgggggttcattaccaaggccatcaac
agctgccacactctccctgccaccccgaa gacaa ggagcaagccc aacag atgaatcaaaa agactttctgagcctgat
agtcagca tattgcatcctggaatgagcctctgtatcatctggtcacgga agtacgtggatgcaagaagcccggagcctac
ctatccaaagctgtagagattgaggagcaaaccaaacggctcttagaggcctgagctgatagtcagccaggttcatcctga
aaccaaa gaaaatgagatctaccctgtctggtcgggactccatccctgcagatggctgatgagagctctgcctttctgtattat
aacctgctcactgcctacgcaggga tccacataaaatcgaca attatctcaagctcctgaa gtcgcaatcatccacaa caac
aactgctaa
```

b)

P-FWVI

5' **gtcgacc**ttgccatctgtcccg 3'

P-RVI

5' **ggatccttagtggtggtggtggtggt**ctcaatctctacagctttgatagg 3'

Figura 8. a) Secuencia génica de la prolactina en donde se resaltan los residuos 1-120 a.a. del extremo amino terminal pertenecientes a la vasoinhibina y **b)** los oligos sentido (P-FWVI) y antisentido (P-RVI) que se diseñaron para la amplificación del gen de la VI, se incluyó una secuencia que codifica para un tag de histidinas (verde), un codón de stop (rojo) y los sitios de restricción para 5' Sal I (+g)---BamH I 3' (rosa).

El producto de PCR se clona en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® (TOPO-VI_His6) en la cepa DH5α y posteriormente se subclonó en el vector de expresión pET12a (pET12a-VI) en la cepa BL21SI de *E. coli*.

2.3 PROTEÍNAS DE FUSIÓN VASOSTATINA-VASOINHIBINA (VS-VI) Y VASOINHIBINA-VASOSTATINA (VI-VS):

Para obtener las proteínas de fusión se utilizaron como moldes las construcciones ya clonadas en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® de VI (TOPO-VI_His6) y VS (TOPO-VS_His6), para tal propósito se diseñaron oligos especiales para fusionar los dos genes por el método de Overlap Extension (Figura 9):

Oligos para **VS-VI**:

(1) **PFWVS-vi** 5' **gtcgacc**gacatctgtggcc 3'

(2) **PRVS-vi** 5'cgggacagatgggcaacat**accacctggaccaccctt**gcaacggatgtcc 3'

(3) **PFWvs-VI** 5'ggacatccgtgcaag**ggtggtccaggtggt**atggtgccatctgtccc 3'

(4) **PRvs-VI** 5'**ggatccttagtggtggtggtggtggt**ctcaatctctacagctttgatagg 3'

Oligos para **VI-VS**:

(5) **PFWVI-vs** 5'gtcgacgttgcccatctgtcccg 3'

(6) **PRVI-vs** 5'gccagggccacagatgtccataccacctggaccaccctcaatctctacagcttggatag 3'

(7) **PFWvi-VS** 5'ctatccaaagctgtagagattgagggtggccagggtggtatggacatctgtggcctggc3'

(8) **PRvi-VS** 5'ggatccttagtggtggtggtggtgcttgcaacggatgtcc 3'

Los oligos enlistados cuentan con sitios de restricción para Sal I – BamH I (rosa), un codón de stop (rojo), un tag de histidinas (verde) y una secuencia que codifica para un puente de gly-gly-pro-gly-gly (naranja).

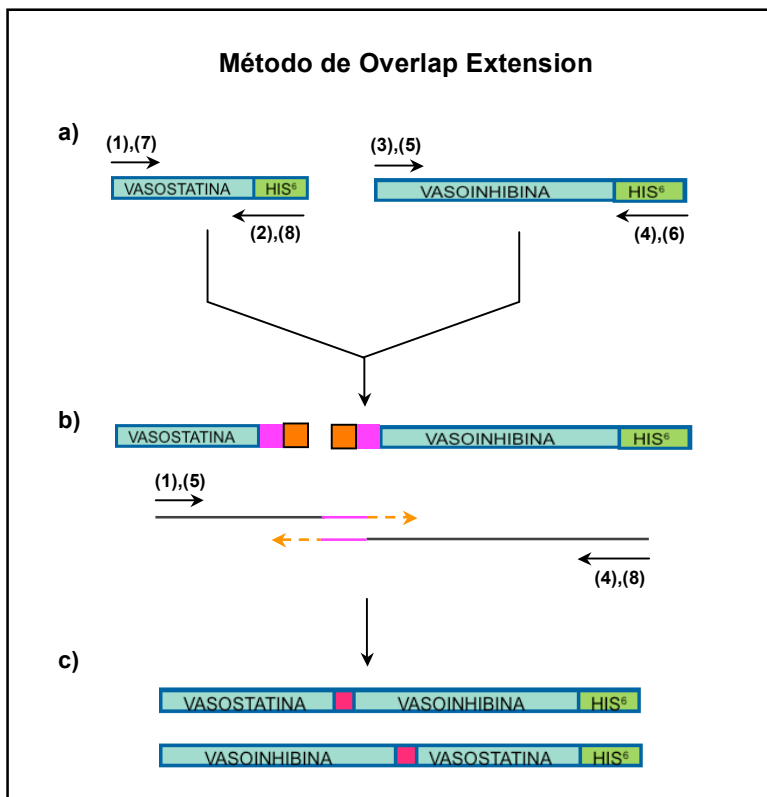


Figura 9. Esquema del método de Overlap extension por el cual se obtuvo la fusión de los genes de la VS y la VI en un sentido y en sentido inverso (VS-VI y VI-VS), en el primer paso del método **a)** se amplifican en una 1ª reacción de PCR con una enzima de alta fidelidad (Pfu) los dos genes por separado con sus respectivos oligos (1-4 para VS-VI y 5-8 para VI-VS), **b)** los productos de la 1ª reacción de PCR se mezclan de forma equitativa (1µL de c/u) para una 2ª reacción con sus respectivos oligos, (1) y (4) para VS-VI y (5) y (8) para VI-VS, **c)** finalmente como producto de la 2ª reacción de PCR se obtuvieron los genes fusionados con una secuencia interna que codifica para un puente de gly-gly-pro-gly-gly entre cada gen (indicado en color rosa).

Los productos obtenidos de la 2ª reacción de PCR fueron purificados y sometidos a una reacción de adición de poliadeninas (PoliA) (Protocolo B, Anexo 1), posteriormente se clonaron en el vector pGEM-T Easy en la cepa TOP 10 de *E. coli* y subclonados en el vector pET12a (pET12a-VS_VI, pET12a-VI_VS) en la cepa BL21SI de *E. coli*.

3.0 CEPAS BACTERIANAS

Para llevar a cabo la clonación de los genes de la VS, VI, VS-VI y VI-VS se hizo uso de diferentes cepas de *Escherichia coli* como la DH5 α , TOP 10, JM101 y la XL1 blue con resistencia a tetraciclina. Así como también se manejo la cepa Rosetta-gami de *E. coli* la cual cuenta con el plásmido pLysSRARE que codifica para genes de tRNAs de siete codones raros (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA y CGG). Dicho plásmido se extrajo de esta cepa y se transformó la cepa BL21SI de *E. coli* con la finalidad de optimizar la expresión de las proteínas recombinantes que cuentan en su secuencia con codones raros, estas son: VI, VI-VS y VS-VI, en el caso de VS, no se indujo la expresión de esta proteína en presencia del plásmido pLysSRARE ya que su secuencia génica no cuenta con estos codones raros. Una vez transformada la cepa BL21SI de *E. coli* con el plásmido pLysSRARE, se procedió a hacer células rubidio competentes, así como también de la cepa BL21SI sin transformar (Protocolo C, Anexo 1). La cepa BL21SI/pLysSRARE se transformó con los plásmidos pET12a-VI, pET12a-VI_VS y pET12a-VS_VI, por otro lado, la cepa BL21SI fue transformada con el plásmido pET12a-VS.

4.0 METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.1 ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizaron ensayos de expresión de proteínas a nivel de matraz y biorreactor para las cuatro construcciones en medio mínimo BSG (anexo 2) y a 20°C como temperatura de inducción.

- **Nivel matraz:** Se inició con un preinóculo de toda la noche en medio BSG suplementado con extracto de levadura 5g/L (BSGY) a 37°C y 200 rpm, con el que se realizó un nuevo inóculo en medio BSG, iniciando con una densidad óptica (OD) de 0.2, que se dejó crecer a 37° y 200 rpm hasta llegar a una OD de 0.5, momento en el cual se indujo con NaCl a una concentración final en el medio de cultivo de 0.3M y se ajusto la temperatura de inducción a 20°C. La inducción se siguió durante 12 horas en las que se tomaron muestras del cultivo cada 3 horas, las muestras obtenidas en los diferentes tiempos se centrifugaron y fueron resuspendidas en 250 μ l de buffer de fosfatos (PBS) 0.1X (anexo 2) para su posterior cuantificación de proteínas.
- **Nivel Biorreactor:** Se inició igualmente con un preinóculo de toda la noche en medio BSGY a 37°C y 200 rpm, con el cual se realizó un nuevo inóculo en 1 litro de medio BSG previamente esterilizado en el biorreactor, se inició con una densidad óptica (OD) de 0.2, el cultivo se creció a 37° y 170 rpm hasta llegar a una OD de 0.5, momento en el cual se indujo con NaCl a una concentración final en el medio de cultivo de 0.3M y se ajusto la

temperatura de inducción a 20°C. La cinética de crecimiento celular y producción de proteína recombinante se siguió hasta la fase estacionaria. Durante el transcurso de la cinética se tomó muestra cada 4 horas y las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 6000 rpm por 5 minutos y resuspendidas en 250µl de PBS 0.1X para su posterior cuantificación de proteínas.

4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

A las muestras obtenidas de los ensayos de expresión de proteínas a nivel de matraz y biorreactor, además de las provenientes del fraccionamiento celular, se les cuantifico proteínas totales por el método de Lowry y cols, utilizando suero de albúmina bovina (BSA) como estándar (BioRad, Hercules, CA, USA).

- Se prepararon 100mL del reactivo D (anexo 2) y del reactivo de folin en una dilución 1:2.
- Se prepararon soluciones estándar partiendo de un stock de 1.32 mg/mL de BSA (Tabla 3), con las que posteriormente se realizó una curva de calibración estándar (Figura 10).
- Sobre esta curva se extrapolaron los valores obtenidos por espectrofotometría con el método de lowry.

Tabla 3. Estándares de BSA preparados para obtener la curva de calibración estándar del método de Lowry.

Concentración de BSA (mg/mL)	Volumen (µl) de stock BSA 1.32mg/mL	Volumen (µl) de Agua destilada	Absorbancia promedio
0	0	1000	Blanco
0.035	26.5	973.5	0.0472
0.105	79.5	920.5	0.2252
0.14	106	894	0.3044
0.21	159	841	0.4502
0.28	212	788	0.5886

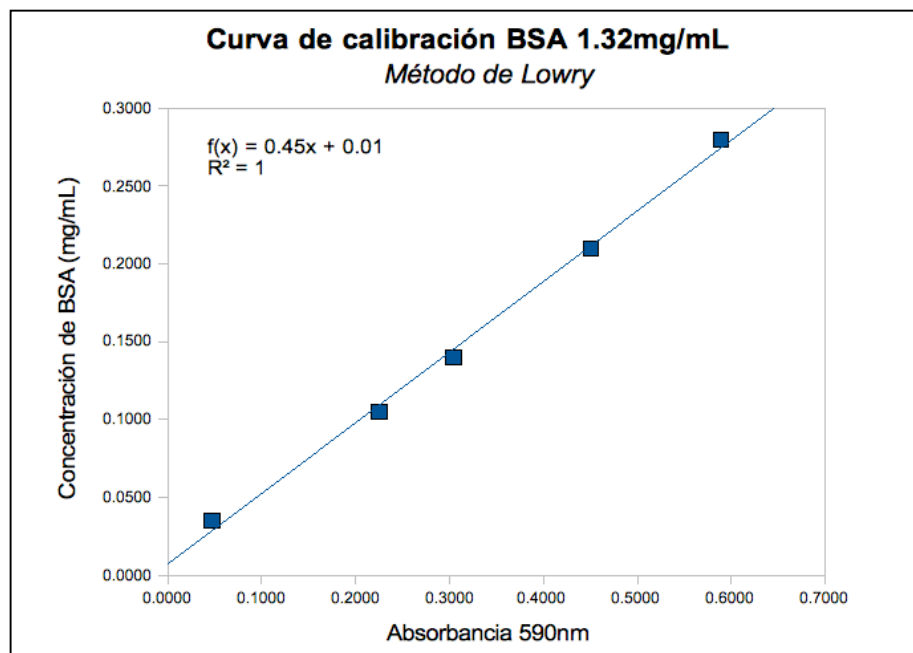


Figura 10. Curva de calibración con BSA 1.32mg/mL y la ecuación que se utilizó para conocer la concentración de las proteínas totales en las muestras problema.

Para obtener la curva de calibración, se tomaron 200 μ l de cada uno de los estándares y se les añadió 1mL del reactivo D, las muestras se dejaron reposar por 10 minutos y se agregaron 100 μ l del reactivo de Folin diluido 1:2 en agua destilada, se dejó reposar durante 30 minutos para, finalmente, tomar lectura de las absorbancias a 590nm de cada uno de los estándares en un espectrofotómetro Varian Cary BIO-50, Palo Alto, CA. El mismo procedimiento se llevó a cabo en la cuantificación de proteínas totales de las muestras problema.

4.3 ANÁLISIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-DODECIL SULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

Con la finalidad de normalizar la expresión proteica de las moléculas antiangiogénicas, las muestras provenientes de los ensayos de expresión de proteínas y fraccionamiento celular cuantificadas por el método de Lowry, se analizaron en geles de SDS-PAGE teñidos con solución de Coomassie (Anexo 2), se colocó una concentración uniforme de proteínas por carril. El tipo de geles de poliacrilamida utilizados en este trabajo fueron de gradiente 4-20% (anexo 2) para proteínas mayores a 10 kDa (VI, VI_VS y VS_VI) y de Tris-Tricina 16.3% (Anexo 2) para proteínas de bajo peso molecular (VS).

4.4 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Las proteínas recombinantes VS, VI, VS_VI y VI_VS fueron confirmadas como tales con la técnica del western blot, en la que se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo anti-His tag Millipore 1mg/mL. Las muestras provenientes de los ensayos de expresión de proteínas y fraccionamiento celular se corrieron en geles de SDS-PAGE a 80 V durante 3.5 horas para geles de gradiente y 2 horas para geles de Tris-Tricina, posteriormente los geles se sumergieron en buffer towbin (anexo2) con 20% metanol para geles de gradiente y 40% metanol para geles de Tris-tricina durante 20 minutos, la transferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado (proteínas de alto peso molecular) se indica como sigue:

1. Se colocan tres papeles filtro completamente humedecidos con el buffer towbin en la placa de ánodo de una cámara de electrotransferencia semi-seca (Bio-Rad), se eliminan burbujas entre cada papel filtro utilizando un tubo de ensayo como rodillo.
2. Se coloca la membrana de nitrocelulosa (del mismo tamaño del gel) previamente humedecida en buffer towbin, se eliminan burbujas como en el paso anterior.
3. Posteriormente, el gel previamente equilibrado 20 minutos en buffer towbin con 20% de metanol, se coloca sobre la membrana de nitrocelulosa y se eliminan burbujas como en el paso 1.
4. Se procede a colocar los tres papeles filtro restantes completamente humedecidos en buffer towbin sobre el gel, igualmente se eliminan burbujas entre cada papel filtro con un tubo de ensayo.
5. Se coloca la placa del cátodo, presionar sin causar daño al apilado.
6. Se cierra la tapa y se transfirió a 10 V durante 20 minutos
7. Al finalizar la transferencia, el gel transferido se coloca en solución de coomasie para su tinción.
8. La membrana se pone en contacto con una solución de rojo de ponceau (anexo2) para visualizar el marcador de peso molecular, que una vez detectado se procede a cortar esa sección de la membrana y se continúa con el resto.
9. La membrana se bloquea en una solución de leche al 5% durante 2 horas en agitación continua.
10. Se le aplican a la membrana 3 lavados de 15 minutos con PBS 1X en agitación.

11. El anticuerpo 1º monoclonal de ratón Anti-His tag (Millipore) se diluyó 1:4000 en un volumen de 15 mL de PBS 1X adicionado con BSA 0.5%, ésta solución se le añadió a la membrana previamente lavada y se incubó a 4°C toda la noche.
12. Se lavó la membrana como en el paso 10.
13. El anticuerpo 2º Anti-IgG de ratón se diluyó 1:3000 en un volumen de 10 mL de PBS 1X adicionado con BSA 0.5%, esta solución se puso en contacto con la membrana lavada y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas.
14. Se lavó la membrana como en el paso 10 y se dio un lavado extra con buffer de fosfatasa alcalina (anexo2).
15. La membrana se reveló con NBT y BCIP (66 y 33µl respectivamente en 10 mL).

Para proteínas de bajo peso molecular (VS) se utilizó una membrana PVDF (Polyvinylidene fluoride) de Immobilon-P^{SQ} Millipore con un poro de 0.2µm, la cual contó con un tratamiento especial antes de iniciar con la transferencia y el revelado:

1. La membrana PVDF se sumergió en metanol 100% de 2 a 3 segundos.
2. Después, se pasó a un recipiente con agua MQ en el que se sumergió durante 1 a 2 minutos para desplazar el metanol.
3. Posteriormente, se humedeció junto con los papeles filtro en buffer towbin con 40% de metanol por 5 minutos.
4. El gel, igualmente se incubó por 20 minutos en el buffer towbin con 40% de metanol en agitación continua antes de la transferencia.
5. La transferencia y el revelado se llevan a cabo de la misma manera que los puntos 1-15 anteriormente descritos para proteínas de alto peso molecular.

4.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR DENSITOMETRÍA

Los geles de poliacrilamida obtenidos para cada una de las proteínas recombinantes y teñidos con coomasie, así como los western blot obtenidos de estas proteínas fueron analizados en el software Quantity one 4.6 de BioRad. Se calcularon las concentraciones aproximadas de proteína recombinante para cada uno de los geles y membranas, para los geles de poliacrilamida se realizó una curva estándar de BSA a partir de un stock de 1.4mg/mL (Tabla 4, Figura 11).

Tabla 4. Estándares de BSA preparados para ser analizados en gel SDS-PAGE y realizar una curva de calibración para la determinación de proteínas por densitometría.

Concentración de BSA (μ g)	Volumen (μ l) de stock BSA 1.4mg/mL	Volumen (μ l) de Agua MQ	Volumen final (μ l)
25	0.178	9.822	10
75	0.536	9.464	10
100	0.714	9.286	10
125	0.892	9.108	10

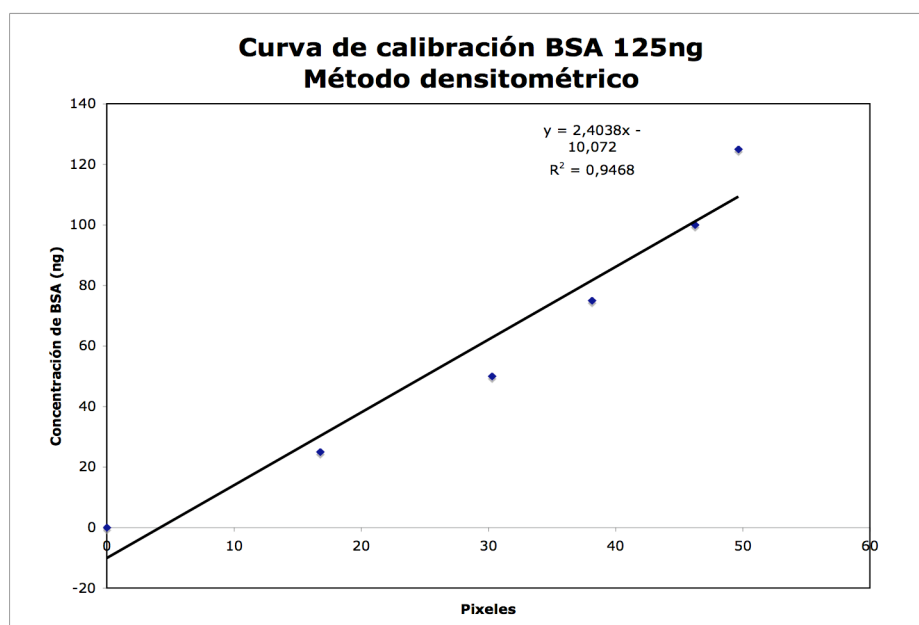


Figura 11. Curva de calibración estándar de BSA para la cuantificación de proteína recombinante por densitometría.

4.6 PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Las proteínas VS, VI, VI_VS y VS_VI analizadas y cuantificadas como se describió en secciones anteriores, se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de níquel. La resina de fue adquirida de Invitrogen (Ni-NTA Purification System, Invitrogen) y se llevó a cabo la purificación de las proteínas de acuerdo al manual de usuario, sin embargo, se cambiaron algunas condiciones de purificación con el fin de optimizar el proceso.

1. Los pellet fueron resuspendidos en el buffer de purificación nativa 1X (anexo2) con 10mM de imidazol (Resuspender 50mL de cultivo en 4mL de buffer de purificación) y sonicados en frío a 45% de amplitud y 5 pulsos de 10 segundos con sus respectivos descansos.

2. Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm 5 minutos y la fracción soluble se recuperó en el sobrenadante
3. Se preparó la columna de níquel como indica el manual.
4. Se vertió la fracción soluble a la columna de níquel y se dejó en agitación constante durante 1 hora.
5. Posteriormente, se dejó sedimentar la resina y se almacenó el sobrenadante a 4°C etiquetado como 1er eluido. La resina se lavó con las siguientes soluciones:
 - Primer lavado: buffer de lavado con 5mM de Imidazol pH ajustado a 6.5 (4mL de buffer de unión nativa 1X + 6.66µl de imidazol 3M pH 6.0)
 - Segundo lavado: buffer de lavado con 10mM de Imidazol pH ajustado a 6.5 (4mL de buffer de unión nativa 1X + 13.33µl de imidazol 3M pH 6.0)
6. Después de los lavados las proteínas se eluyeron con:
 - Elución: buffer de elución con 250mM de imidazol pH 6.5 (5.5mL de buffer de unión nativa 1X + 0.5mL de imidazol 3M pH 6.0)

Se cuantificaron proteínas de cada uno de los lavados y se analizaron en geles de SDS-PAGE con tinción de plata (Protocolo 4, Anexo 1) (BioRad Silver Stain Plus, Cat. N° 161-0449).

4.7 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD

4.7.1 Cultivo de Células Endoteliales de Coronaria

Las células endoteliales de vasos coronarios de rata (CEC) fueron donadas por el Dr. Guillermo Ceballos de la Facultad de Medicina del IPN y fueron aisladas, de acuerdo a [Sierra-Ramírez et. al, 2004].

Previo a los tratamientos correspondientes, las CEC, se cultivan bajo las siguientes condiciones:

Deben de manejarse bajo una campana de flujo laminar horizontal, en condiciones asépticas. Se cultivan y expanden en presencia de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 10% de suero Bovino Fetal (SBF), 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomina, y en presencia de las condiciones fisiológicas de Temperatura (37 °C), Humedad (90%), requerimiento de Oxígeno (95%) y de CO₂ (5%).

Se sembraron 2000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, para los ensayos de proliferación celular en presencia de los tratamientos correspondientes.

4.7.2 Tratamiento con los fragmentos antiangiogénicos y sus quimeras.

Para los ensayos de proliferación se sembraron 2000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fueron tratadas en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de cada una de las proteínas recombinantes VS, VI, VS_VI y VI_VS (0.1, 1 y 10 nM) y en presencia y ausencia de un estimulador de la proliferación celular como es la bradicidina, de igual forma estas células se trataron con sus respectivo controles durante 24 horas.

4.7.3 Determinación de la proliferación celular por medio de la técnica de MTT

La proliferación celular se determinó mediante la técnica colorimétrica, a través del uso del colorante de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), que se basa en la reducción metabólica de este compuesto, mediada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto color azul (formazán), La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Denizot y col. 1986), es decir, la actividad mitocondrial, representa una forma indirecta de medir la proliferación celular y se detectó a una DO de 570 nm.

Procedimiento:

1. Se retiraron 100 μ L de medio de cultivo de cada uno de los pozos en donde se sembraron y trataron las CEC
2. A cada uno de estos se adicionaron 10 μ L de reactivo MTT.
3. Se incubó por 4 horas a 37 °C.
4. Al cabo de este tiempo, se adicionaron 100 μ L de reactivo detergente para solubilizar la coloración formada por el MTT.
5. Se incubó por 4 horas a 37 °C o toda la noche a temperatura ambiente, al resguardo de la luz.
6. La densidad óptica se determinó mediante un lector de microplacas a una longitud de onda de 570 nm.

RESULTADOS

1.0 Clonación del ADNc de VS y VI

Los genes de las proteínas recombinantes obtenidos por PCR con oligos específicos, se clonaron en los vectores pCR®-Blunt II-TOPO® (TOPO-VS_His6 y TOPO-VI_His6) y pGEM-T Easy (pGEM-VS_VI y pGEM-VI_VS), se encontraron colonias transformantes para las construcciones antes mencionadas y resultaron positivas en el análisis de restricción con las enzimas Sal I-BamH I las cuales sus sitios fueron diseñados en los oligos sintetizados por Sigma-Aldrich Quimica, SA de CV. Para la proteína VS se obtuvieron dos colonias positivas de la clonación en pCR®-Blunt II-TOPO® (Figura 12).

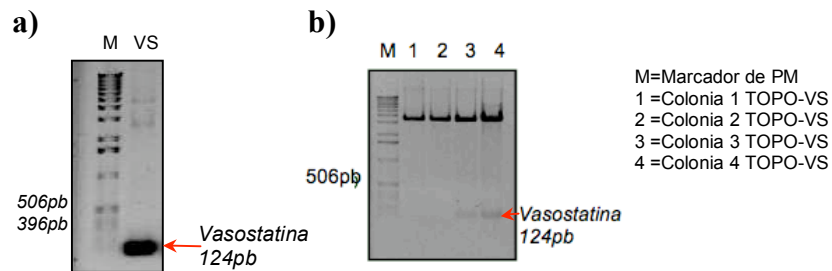


Figura 12. a) Amplificación por PCR del gen de la vasostatina a partir del gen sintético y b) análisis por restricción con las enzimas Sal I - BamH I de plásmidos de cuatro colonias transformadas con la ligación de pCR®-Blunt II-TOPO® y VS de las cuales las colonias 3 y 4 fueron positivas.

En el caso de la proteína VI sólo se obtuvo una colonia transformante la cual fue positiva para éste gen, la construcción se clonó en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® (Figura 13)

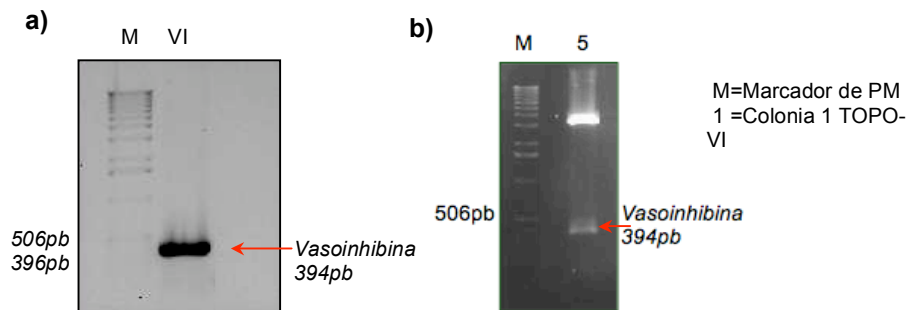


Figura 13. a) Amplificación por PCR del gen de la VI a partir del plásmido pSG-hPRL y b) análisis por restricción con las enzimas Sal I - BamH I del plásmido de una colonia transformante la cual fue positiva para VI.

2.0 Clonación del ADNc de VS_VI y VI_VS

Para las proteínas de fusión, las cuales se obtuvieron en dos reacciones de PCR, y se clonaron en el vector pGEM-T Easy, se obtuvieron colonias transformantes que se analizaron por restricción y PCR (Figura 14).

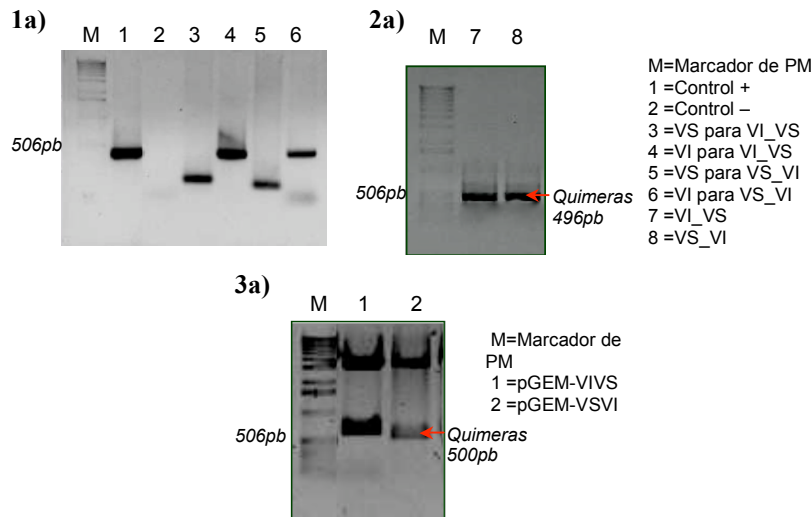


Figura 14. Obtención de las quimeras por PCR Overlap extension **1a)** primera ronda de amplificación por PCR de los genes de las proteínas VS y VI, los carriles 3 y 4 muestran la amplificación de VS y VI con los oligos diseñados para la fusión VI_VS, los carriles 5 y 6 muestran la amplificación de VS y VI con los oligos diseñados para la fusión VS_VI, **2a)** se muestran, además, los productos de la segunda ronda de PCR, en esta etapa se obtienen los genes fusionados de VI y VS, las quimeras VS_VI y VI_VS con un PM de 496pb y **3a)** el análisis de restricción con las enzimas Sal I – BamH I de los plásmidos de colonias positivas para VI_VS y VS_VI, se observa la liberación de insertos del tamaño esperado.

3.0 Clonación del ADNc de VS, VI, VS_VI y VI_VS en el vector de expresión pET12a

Los genes de las proteínas VS, VI, VI_VS y VS_VI se subclonaron en el vector de expresión pET12a y se analizaron por restricción como se muestra en la figura 15.

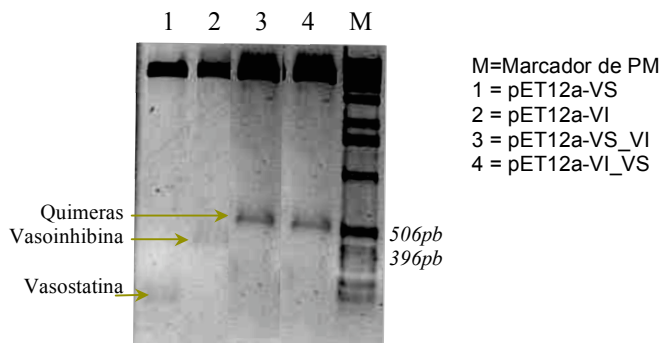


Figura 15. Análisis por restricción con las enzimas Sal I – BamH I de las construcciones obtenidas en el vector de expresión pET12a. Se indican los insertos liberados pertenecientes a cada una de las proteínas. Éstas construcciones fueron transformadas en células BL21SI de *E. coli*.

4.0 Ensayos de expresión a nivel de matraz

En los ensayos de expresión a nivel de matraz, las muestras que se tomaron a diferentes tiempos fueron analizadas en geles de SDS-PAGE teñidos con coomasie. La inducción se siguió durante 12 horas (figura 16).

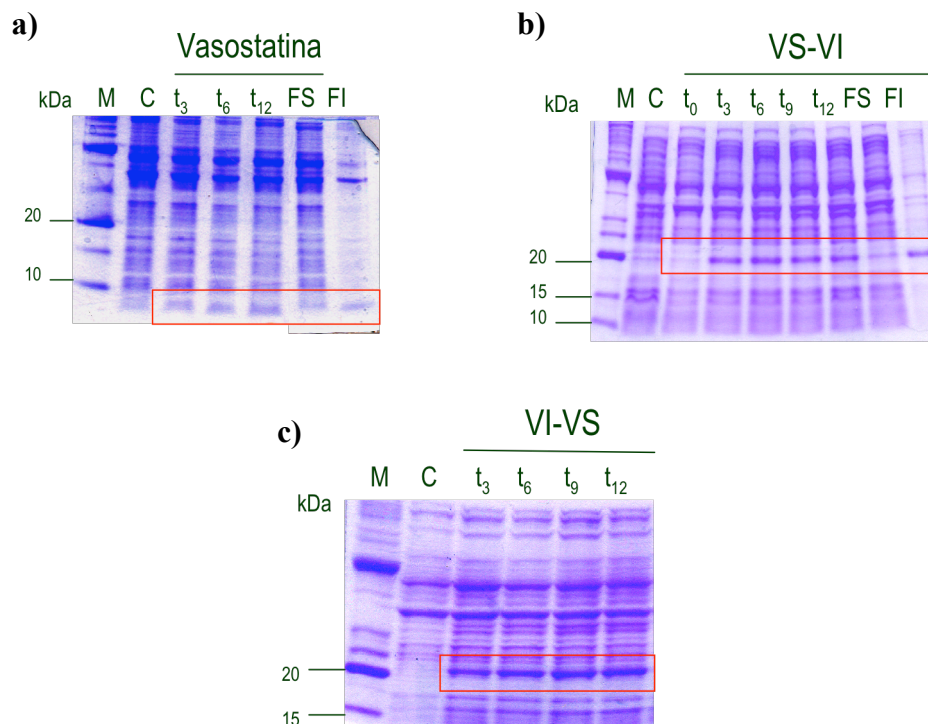


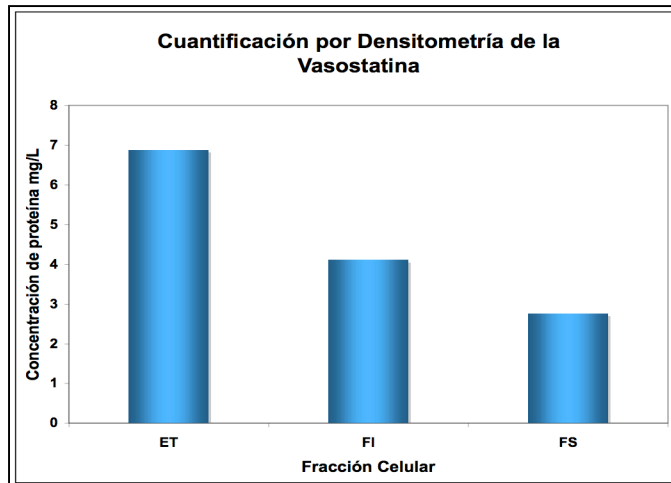
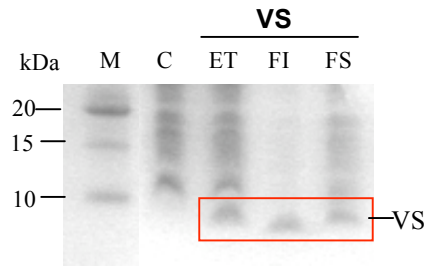
Figura 16. Cinéticas de expresión en matraz con medio BSG a 20°C de las proteínas VS, VS_VI y VI_VS, se omite VI debido a que no fue detectada por Coomassie solo por western blot, **a)** se aprecia la cinética de VS a partir de las 3 hasta las 12 horas post inducción mostrándose una mayor producción a las 12 horas, se muestran además sus fracciones soluble (FS) e insoluble (FI) en **b)** se muestra la cinética de expresión para VS_VI, se observa el comienzo de la expresión a partir de las 3 horas post inducción y se produce en mayor cantidad a las 6 horas, igualmente se indican las fracciones FS y FI, para **c)** la cinética de VI_VS se observa el comienzo de la producción a las 3 horas post inducción, ésta aumenta a lo largo de la cinética hasta mantenerse estable entre las 9 y 12 horas, la fracción soluble de ésta proteína fue visible solo por western blot.

M = Marcador de peso molecular, C = Cepa control, BL21SI/pET12a inducida por 12 horas, t = tiempo, FS = Fracción soluble y FI = Fracción insoluble.

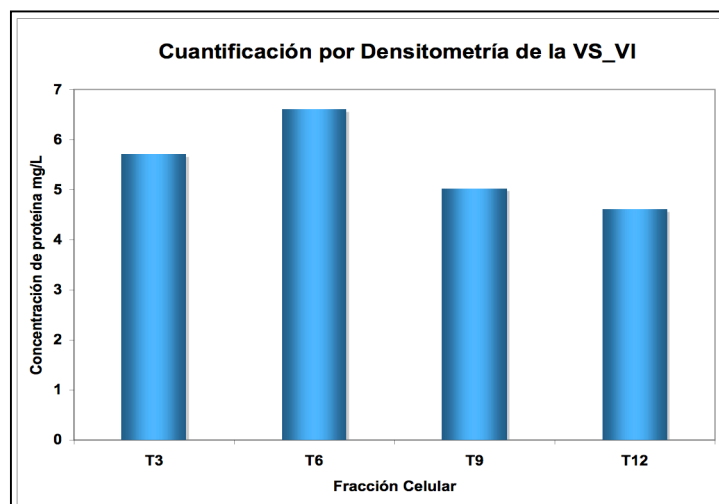
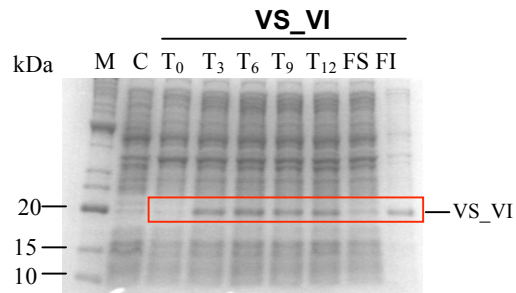
5.0 Análisis densitométrico de geles SDS-PAGE

En el análisis densitométrico se cuantificó la producción a nivel de matraz de las proteínas recombinantes utilizando una curva de calibración de BSA, la cual fue realizada a partir de un stock de 1.4mg/mL de BSA, se llevó a cabo para las proteínas VS, VS_VI y VI_VS (Figura 17).

a)



b)



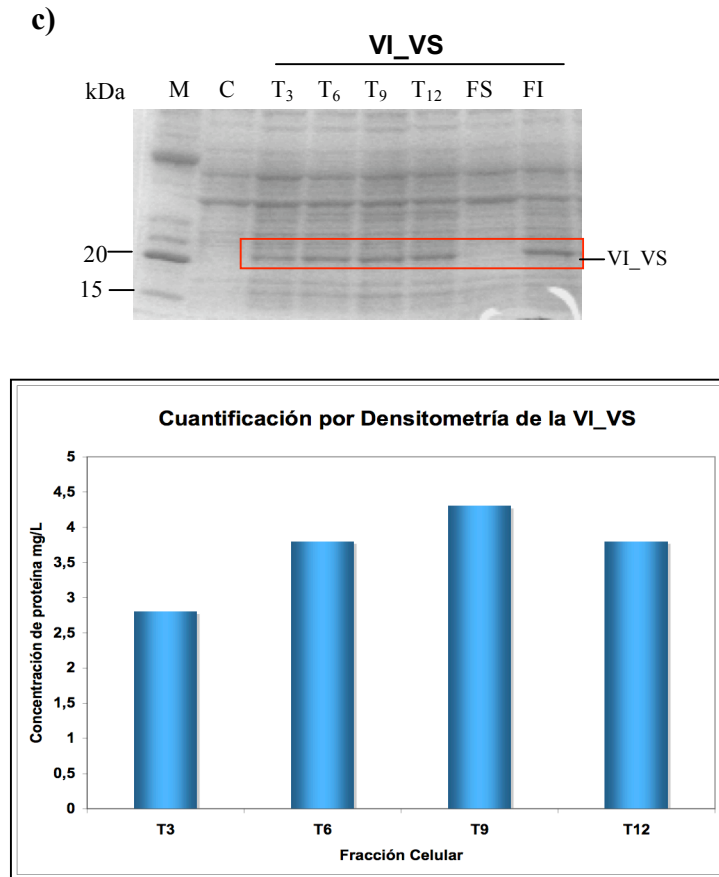


Figura 17. Análisis densitométrico realizado para a) VS en el que se observa la expresión de la proteína a las 12 horas post inducción, con una producción máxima de 68.7ng lo que representa un 1.37% de la proteína total, para b) VS_VI se muestra una producción máxima a las 6 horas post inducción de 66.25ng que representa un 1.32% de la proteína total y c) VI_VS en donde se aprecia una producción máxima de la proteína recombinante de 43.26ng a las 9 horas post inducción y esto representa 0.86% de la proteína total de *E. coli*.

M = Marcador de peso molecular, C = Cepa control, BL21SI/ρET12a inducida por 12 horas, t = tiempo, ET = Extracto soluble, FS = Fracción soluble y FI = Fracción insoluble.

6.0 Análisis por western blot de la expresión a nivel de matraz

A su vez, se analizaron las muestras provenientes de la expresión de proteínas a nivel de matraz para su análisis por western blot, con la finalidad de buscar expresión de proteína recombinante en la fracción soluble y facilitar la purificación en columnas de níquel.

El análisis en western blot indica que todas las proteínas recombinantes VS, VI, VS_VI y VI_VS se encuentran presente en la fracción soluble de la célula (Figura 18), y ésta se utilizó para su posterior purificación.

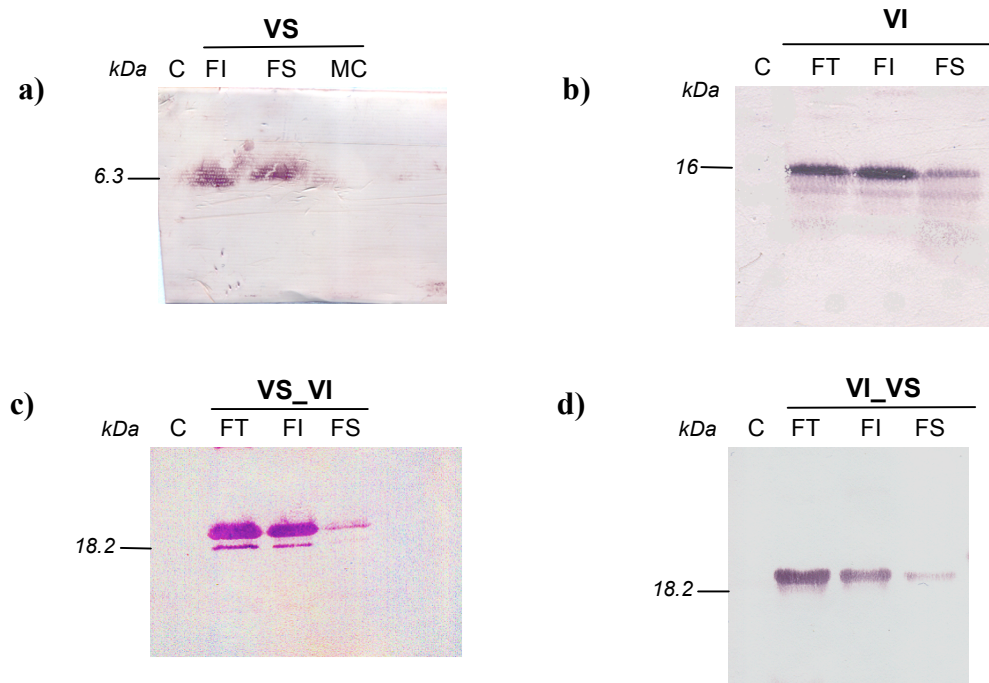


Figura 18. Análisis por western blot realizados mediante un anticuerpo monoclonal de ratón anti-His6 de Sigma, utilizado para identificar las proteínas recombinantes: **a)** VS, en donde se aprecia la identificación de la proteína en las fracciones insoluble (FI) y soluble (FS) pero no en medio de cultivo (MC), **b)** producción de la proteína VI en la fracción total (FT), FI y FS, observándose la presencia de proteína soluble, **c)** VS_VI, se muestra la producción de la proteína recombinante en las diferentes fracciones FT, FI y FS, además, se puede observar la presencia de una banda más pequeña que pertenece a la forma procesada de la proteína y **c)** VI_VS, la cual también se observa en las fracciones celulares FT, FI y FS.

M = Marcador de peso molecular, C = Cepa control, BL21SI/pET12a inducida por 12 horas, t = tiempo, FS = Fracción soluble, FI = Fracción insoluble y FT = Fracción total

7.0 Ensayos de expresión a nivel de biorreactor

Las proteínas recombinantes: VI, VS_VI y VI_VS analizadas a nivel de biorreactor mostraron un comportamiento de expresión particular durante el transcurso de la cinética de expresión de las proteínas. En los ensayos de biorreactor se observó que la producción de la forma soluble a las 7h e insoluble a las 21.5h de la proteína VI fue mayor en comparación con su producción a nivel de matraz (Figura 20), al contrario de la proteína VI_VS la cual no se obtuvo una producción mayor que a nivel de matraz, además de que no se observó la producción de la forma soluble, su mayor producción se obtuvo a las 48 horas (Figura 21). La proteína VS_VI mostró su mayor expresión a las 31.5 horas, aunque su FS se produjo mayoritariamente a las 22 horas del ensayo, sin embargo, ésta no fue equiparable a la FS producida en matraz (Figura 19). Todos los ensayos en biorreactor fueron llevados a cabo a 37°C con una temperatura de inducción de 20°C y 5% de dO₂, se omite información de producción en biorreactor de VS debido a su degradación por inestabilidad durante el ensayo.

7.1 Cinética de expresión en biorreactor de VS_VI

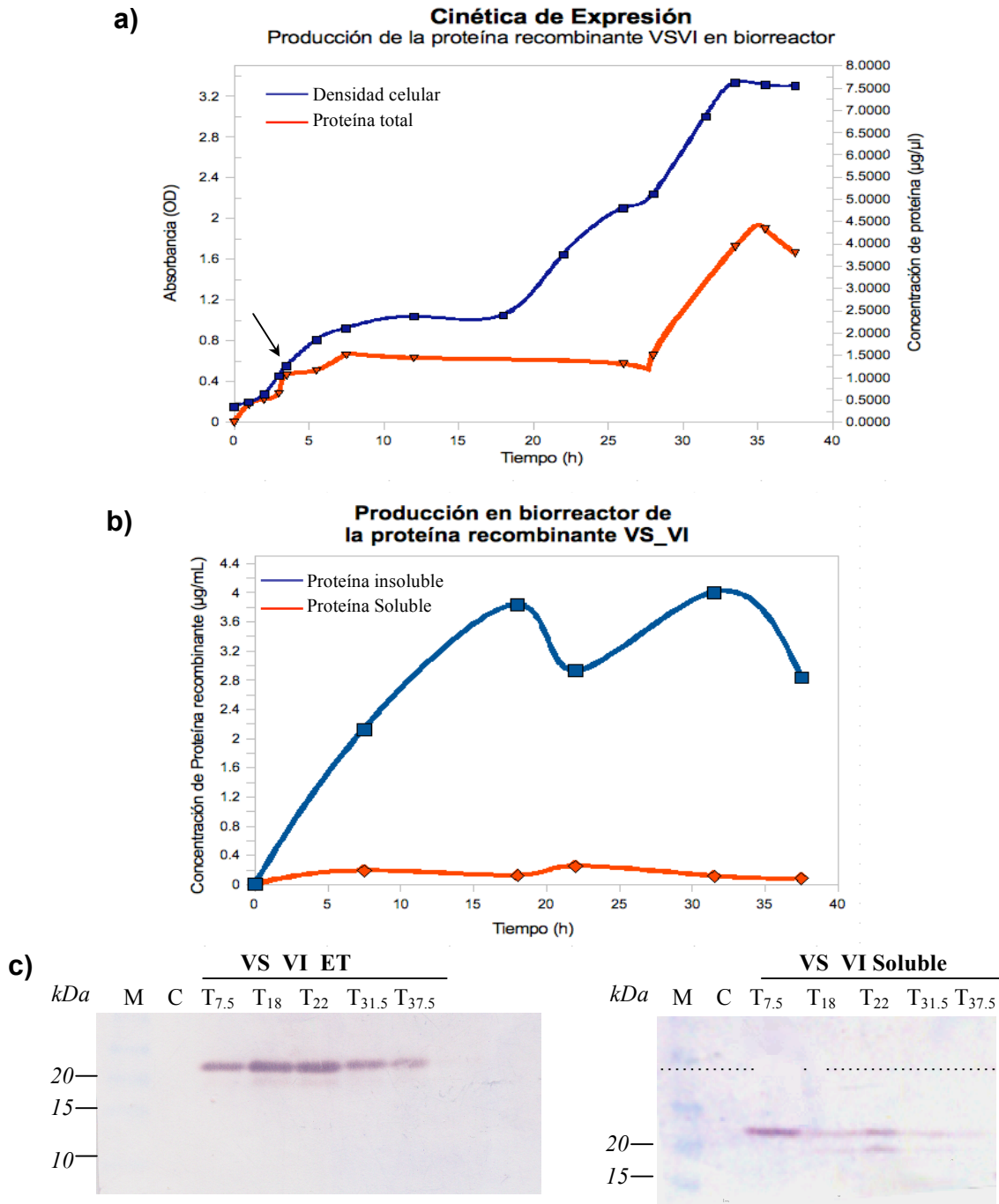


Figura 19. a) Cinética de crecimiento celular y de proteína total durante el transcurso del ensayo de expresión de VS_VI, la flecha indica inicio de inducción, **b)** se observa además que la cinética de expresión de la proteína recombinante VS_VI, se muestra la producción en la fracción soluble la cual se utilizó en los ensayos de purificación, en **c)** se muestra el análisis por western blot de una muestra de la cinética de expresión comprendida en 5 puntos de la curva de crecimiento celular, se analizaron las muestras de las 7.5, 18, 22, 31.5 y 37.5 horas en su extracto total (ET) y su fracción soluble (FS). M = Marcador de peso molecular, C = Cepa control, BL21SI/pET12a inducida por 12 horas, t = tiempo, FS = Fracción soluble y FI = Fracción insoluble.

7.2 Cinética de expresión en biorreactor de VI

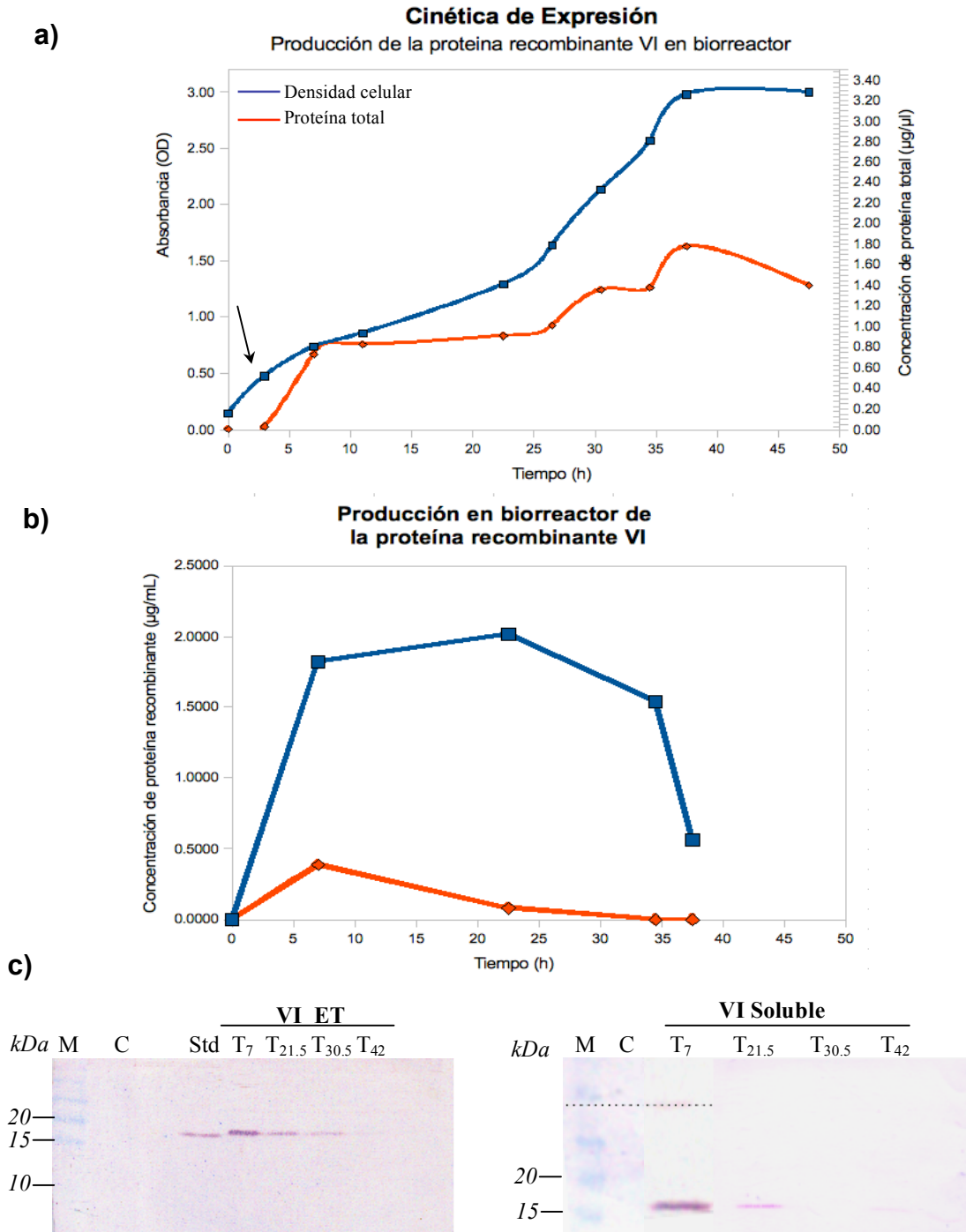


Figura 20. **a)** Cinética de crecimiento celular y de proteína total durante el ensayo de expresión de VI, **b)** cinética de expresión de la proteína recombinante indica que la mayor producción se encuentra a las 21.5 horas de cultivo, también se muestra la mayor producción a las 4 horas post inducción de la fracción soluble que se utilizó en los ensayos de purificación, **c)** análisis por western blot de una muestra de la cinética de expresión comprendida en 4 puntos de la curva de crecimiento celular, se analizaron las muestras de las 7, 21.5, 30.5 y 42 horas en su extracto total (ET) y su fracción soluble (FS). Se incluye el estándar de VI a una concentración de 10ng. M = Marcador de peso molecular, C = Cepa control, BL21SI/pET12a inducida por 12 horas, t = tiempo, FS = Fracción soluble y FI = Fracción insoluble

7.3 Cinética de expresión en biorreactor de VI_VS

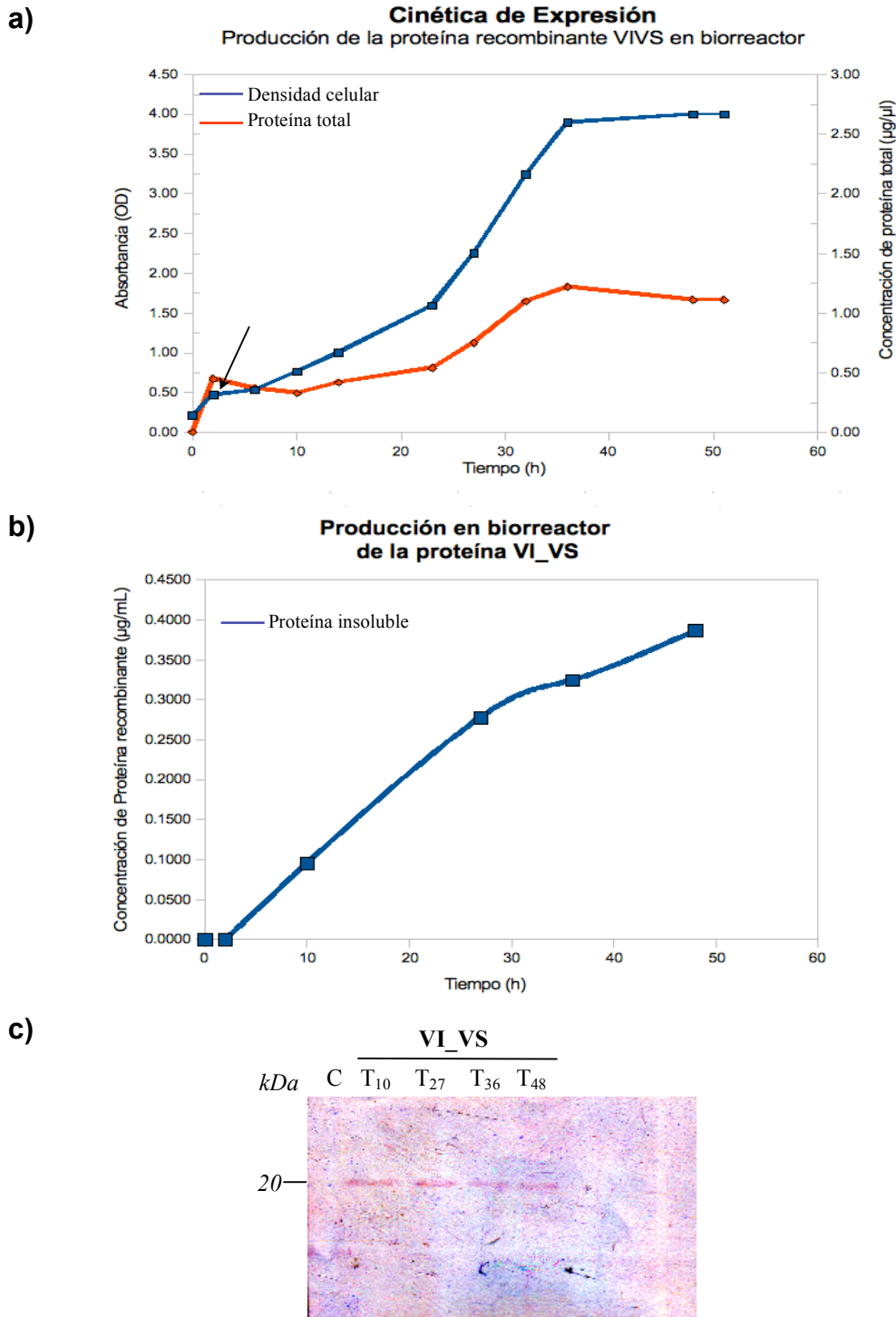


Figura 21. a) Cinética de crecimiento celular y de proteína total durante el transcurso del ensayo de expresión de VI_VS, **b)** la cinética de expresión de la proteína recombinante VI_VS es exponencial, y aumenta en fase estacionaria en poca concentración, en la FS no se observó producción, **c)** análisis por western blot de una muestra de las 10, 18, 27, 36 y 48 horas en su extracto total (ET), se observa poca expresión de VI_VS. M = Marcador de peso molecular, C = Cepa control, BL21SI/pET12a inducida por 12 horas, t = tiempo, FS = Fracción soluble y FI = Fracción insoluble.

8.0 Evaluación de producción de las proteínas recombinantes a nivel de matraz y biorreactor

De acuerdo a los resultados anteriores de la producción de las proteínas recombinantes VS, VI, VS_VI y VI_VS a nivel de matraz y de biorreactor en donde se encuentran condiciones controladas, existe una diferencia de expresión dependiendo de la proteína y de las condiciones de producción, como se indica en la figura 22, para la proteína VI su producción se vió favorecida a nivel de biorreactor aproximadamente 2 veces más, tanto la FI como la FS. Por otro lado, la expresión de la proteína VS_VI a nivel de biorreactor aumentó aproximadamente el 6% con respecto a su producción en matraz, sin embargo, la FS de la proteína en biorreactor fue un 86% menos de lo que se obtiene a nivel de matraz, la expresión de la proteína VI_VS por su parte disminuyó un 87% con respecto a su producción a nivel de matraz, además, no se detectó la proteína en FS cuando se expresó en biorreactor, pero si se logró su expresión a nivel de matraz en dónde fue posible observar la producción de la proteína en FS.

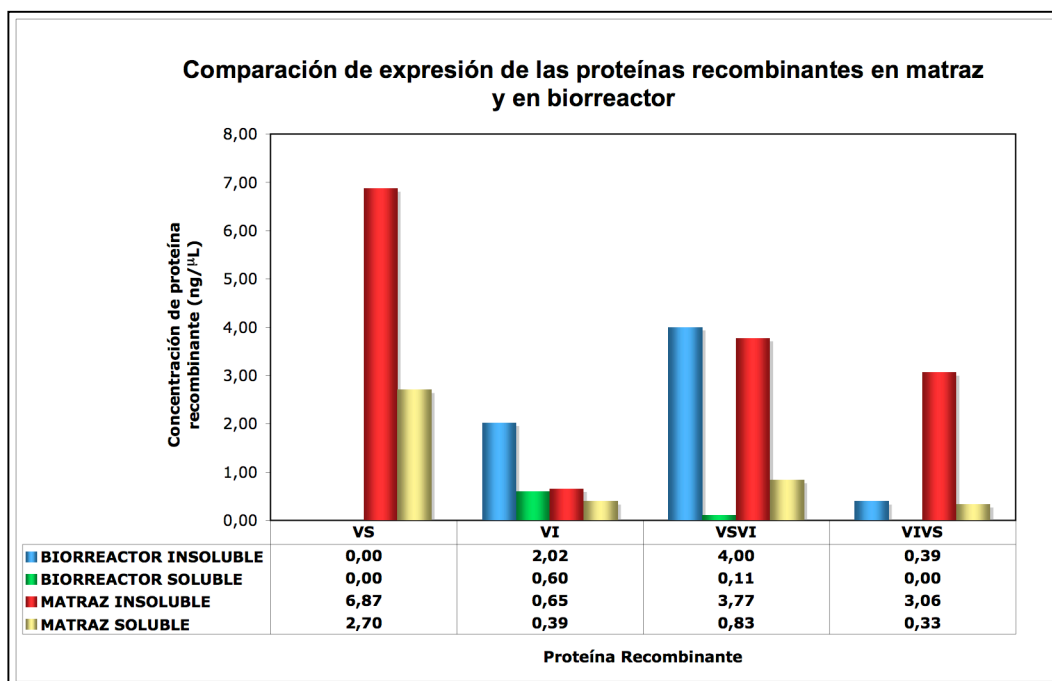


Figura 22. Diferencia de expresión de las proteínas recombinantes a nivel de matraz, en el que se controla solo la temperatura de inducción (20°C), y en biorreactor, en el que se controlan tres parámetros que son: temperatura de inducción (20°C), pH 7.0 y porcentaje de oxígeno disuelto (dO2) del 5%. Se puede apreciar que para la mayoría de las proteínas, su expresión no es favorecida a estas condiciones de biorreactor. Se omiten datos de VS en biorreactor por degradación de la proteína debido a su inestabilidad.

9.0 Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad en columnas de níquel

Las proteínas obtenidas en la FS fueron purificadas por cromatografía de afinidad en columnas de níquel, como se muestra en la figura 23. La purificación de las proteínas VS, VI, VI_VS y VS_VI, se llevó a cabo en diferentes condiciones, para el caso de la purificación de VS se ajustaron las soluciones de lavado a pH 7.5 y a concentraciones de 5 y 10mM de imidazol, para las proteínas VS_VI y VI_VS las soluciones de lavado se ajustaron a pH de 6.5 y a concentraciones de 5 y 10mM de imidazol. Todas las proteínas fueron eluidas con 250mM de imidazol.

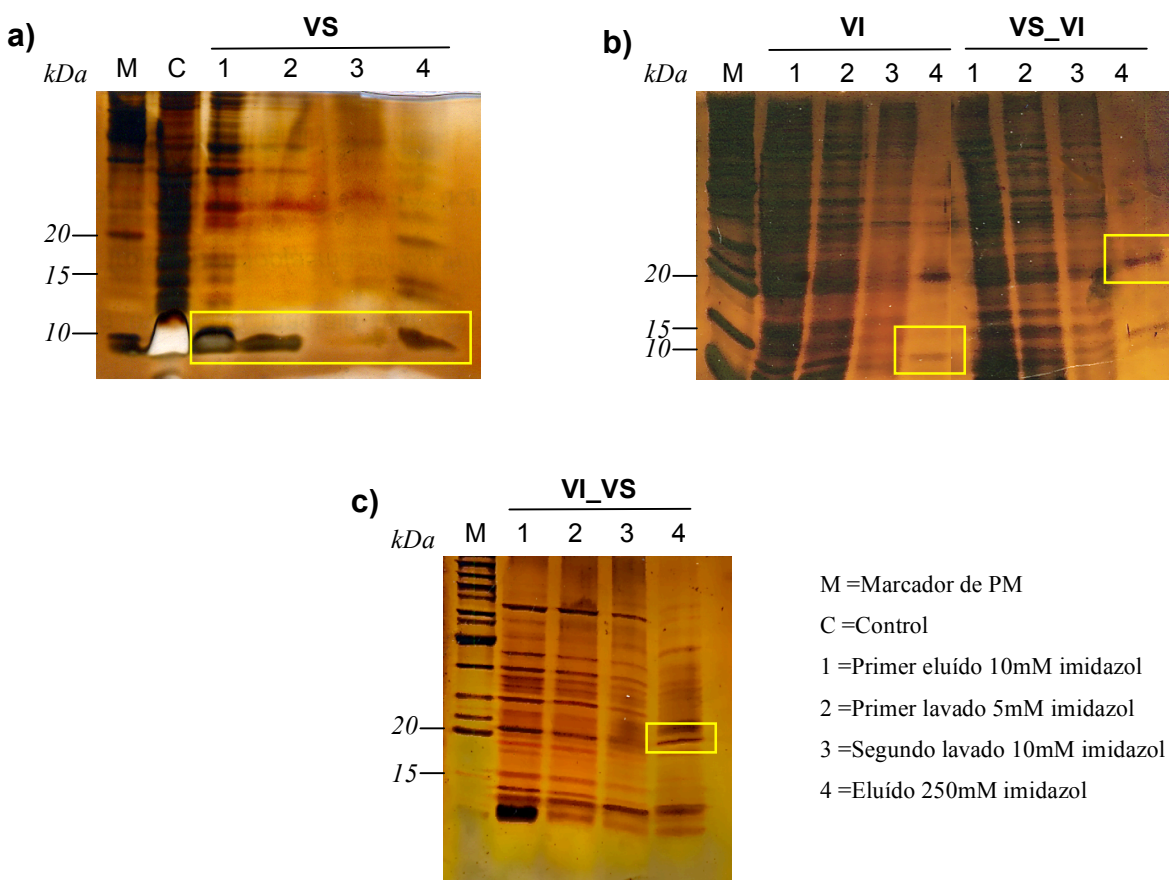


Figura 23. Purificación de las cuatro proteínas recombinantes VS, VI, VS_VI y VI_VS por cromatografía de afinidad en columnas de níquel, en **a)** se resalta la proteína VS purificada después de dos lavados con 5 y 10 mM de imidazol y eluida con 250mM de imidazol, en **b)** se señalan las proteínas VI y VS_VI purificadas, en **c)** se muestra la proteína VI_VS parcialmente purificada. Se modificaron condiciones de pH para cada una de la proteínas.

10.0 Evaluación de la actividad biológica.

10.1 Evaluación de la proliferación celular por MTT.

Los resultados de bioactividad, a través de la determinación de la proliferación de CEC de las proteínas recombinantes, evaluados en células CEC, muestran que las proteínas difieren tanto en su comportamiento como en la potencia de inhibición de proliferación celular. Para corroborar que el comportamiento observado es debido al efecto de las proteínas recombinantes VS, VI, VS_VI y VI_VS se tomaron en cuenta una serie de controles tales como PMB (inhibidores de LPS), extracto soluble de *E. coli* que contiene el vector pET12a sin inserto, como se muestra en la figura 24, en donde cada uno de estos controles no modificaron el estado basal de la proliferación, sin embargo, este efecto se vio contrarrestado por la PMB regresando, nuevamente a su basal (células con medio de cultivo). Por otro lado, al estimular la proliferación celular en presencia de BK y cada uno de los controles respectivos del extracto de *E. coli*, PMB y PMB+ *E. coli*, nuevamente observamos que el extracto de *E. coli* potencia el efecto de la BK que se bloquea con la PMB. Debido a esto, los tratamientos posteriores para evaluar la proliferación celular se realizaron siempre en presencia de PMB.

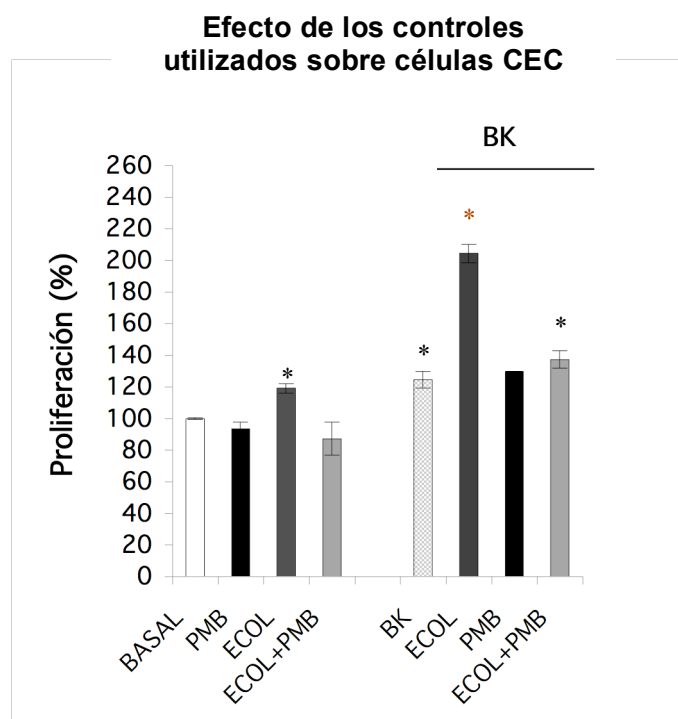


Figura 24. Actividad de los diferentes controles sobre células CEC, utilizados en los ensayos de proliferación de las proteínas recombinantes VS, VI, VS_VI y VI_VS. BASAL =Medio de cultivo, PMB =Polimixina B, ECOL =Extracto soluble de *E. coli*, BK =Bradicidina. * valor de $P < 0.05$ con respecto del basal y * valor de $P < 0.05$ con respecto de BK

El efecto de las concentraciones crecientes de VS sobre la proliferación celular muestra que en ausencia de BK no modifica la proliferación celular. En presencia de BK, las tres concentraciones evaluadas de VS, mostraron una inhibición de los efectos proliferativos de BK hasta en un 25% en presencia de BK.

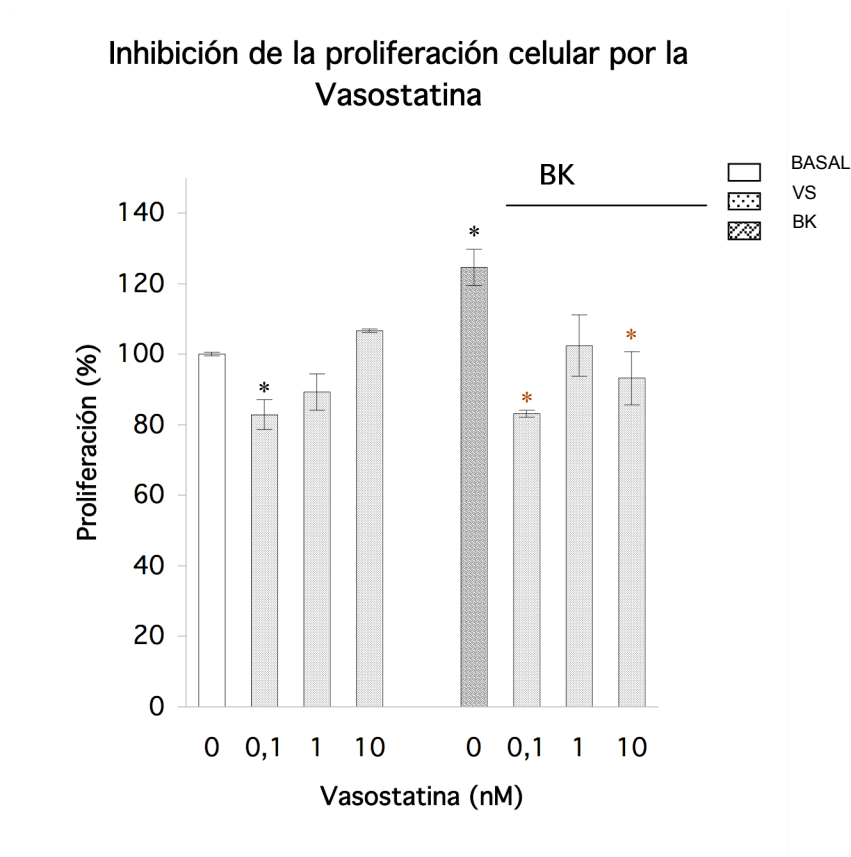


Figura 25. Efecto de la proteína recombinante VS sobre células CEC. En ausencia y en presencia de BK, en un gradiente de concentraciones de 0.1, 1 y 10nM. * valor de $P < 0.05$ con respecto del basal y * valor de $P < 0.05$ con respecto de BK

Por otro lado, y a diferencia de la VS, la VI por si sola ejerció efectos inhibitorios con respecto a su basal. El efecto de la VI sobre la proliferación de células CEC siguió un comportamiento inhibitorio del efecto inductor de la Bradicidina, logrando una inhibición de hasta un 50.5% a 10nM que fue revertido casi en su totalidad en presencia de anticuerpos anti-NhPRL (anticuerpos contra el N-terminal de la hPRL), en ausencia de BK, la VI parece tener un efecto inductor de la proliferación de CEC a 1nM, aunque no supera los niveles basales y presenta una mayor inhibición a 10nM tanto en ausencia como en presencia de BK (Figura 26). Observamos que la VI bloqueo los efectos de la BK tal como se ha reportado para otras sustancias como el VEGF²⁴ lo que indica la especificidad de los efectos de la VI.

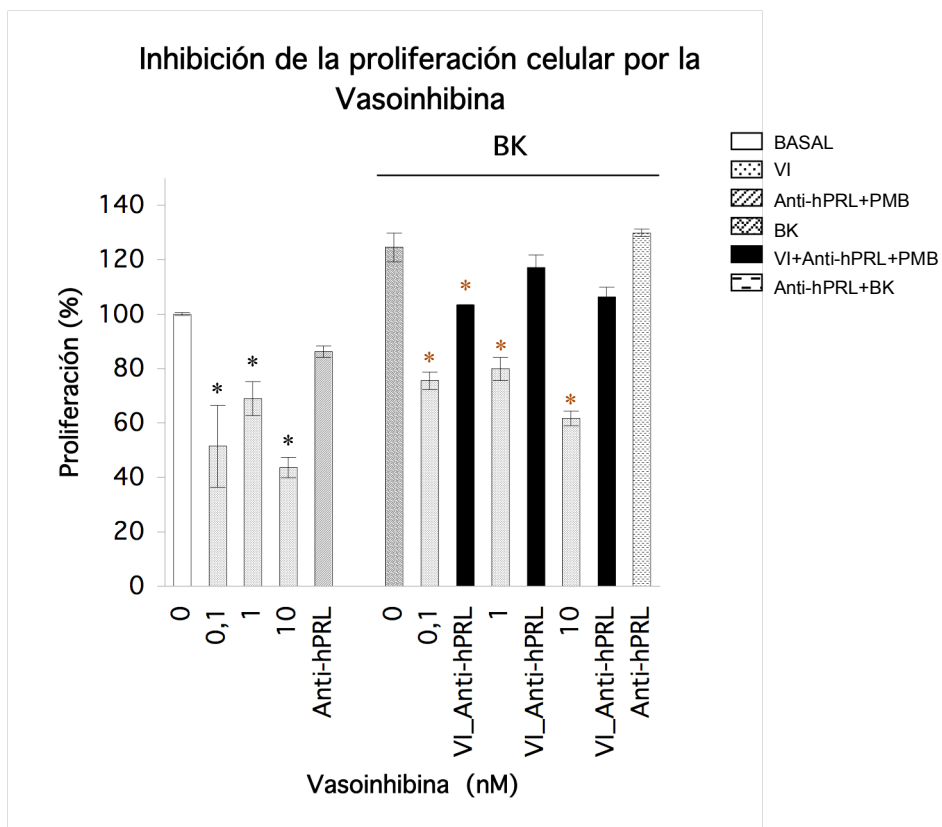


Figura 26. Inhibición de la proliferación por parte de la VI en presencia y ausencia de Bradicidina, un estimulante de la proliferación celular, con anticuerpos anti-NhPRL como controles. * valor de $P < 0.05$ con respecto del basal y * valor de $P < 0.05$ con respecto de BK

En el caso de las quimeras, VS_VI observamos efectos opuestos sobre el endotelio, uno estimulador a la concentración de 1nM, mientras que al incrementar la concentración 10 veces se produce una inhibición del 48% comparado con el basal. Por otro lado, la quimera a 10nM tiene la capacidad de inhibir los efectos de la proliferación inducida por BK en una potencia mayor que VI y VS. En presencia de BK, la proteína VS_VI demuestra tener la capacidad de inhibir el efecto estimulante al inhibir la proliferación hasta en un 65.53% e interesantemente revertirse su efecto en presencia del anti-NhPRL (Figura 27).

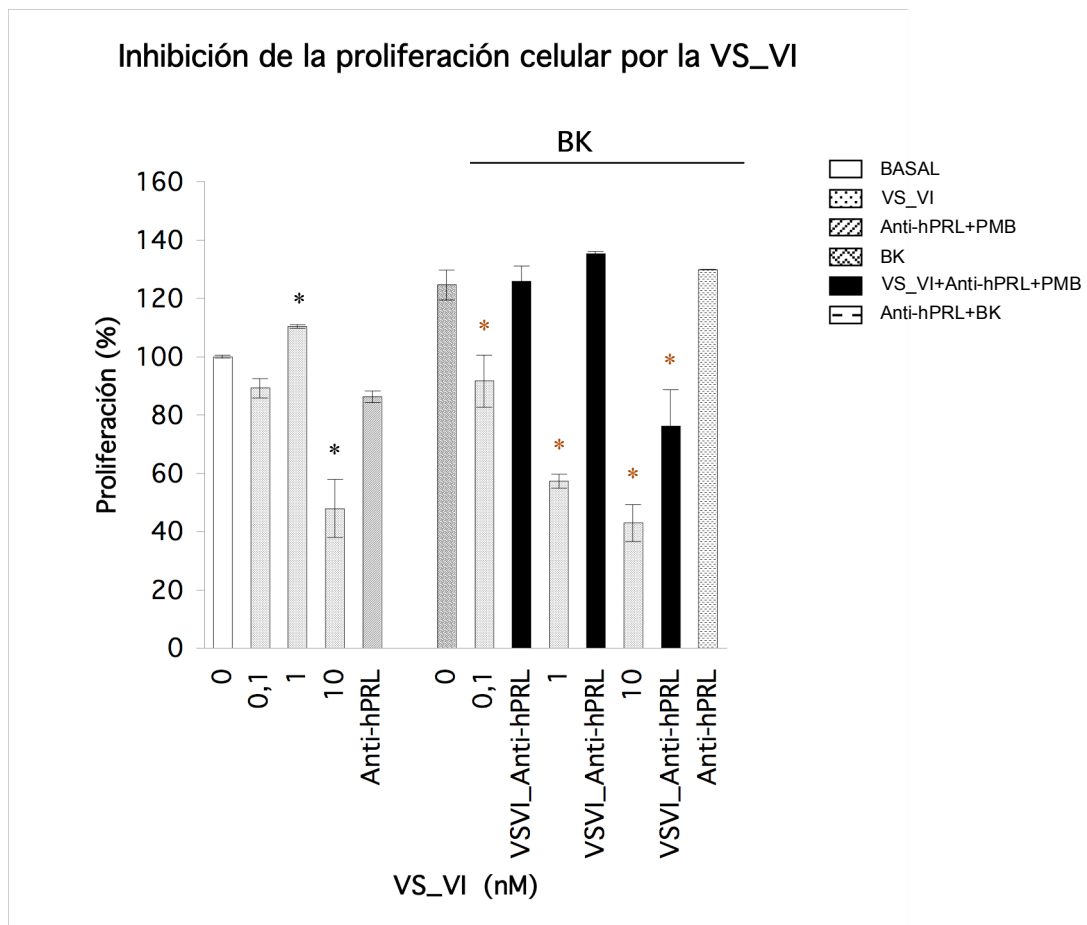


Figura 27. Evaluación de la actividad inhibitoria de la quimera VS_VI, en células CEC a diferentes concentraciones, en presencia y en ausencia del inductor BK. Anticuerpos anti-NhPRL. En diferentes condiciones como controles. * valor de $P < 0.05$ con respecto del basal y * valor de $P < 0.05$ con respecto de BK

De forma contraria, la quimera inversa VI_VS no mostró cambio en la proliferación basal y en presencia de BK, solo mostró inhibición a la concentración máxima de 10nM, este efecto fue parcialmente bloqueado por los anticuerpos anti-NhPRL.

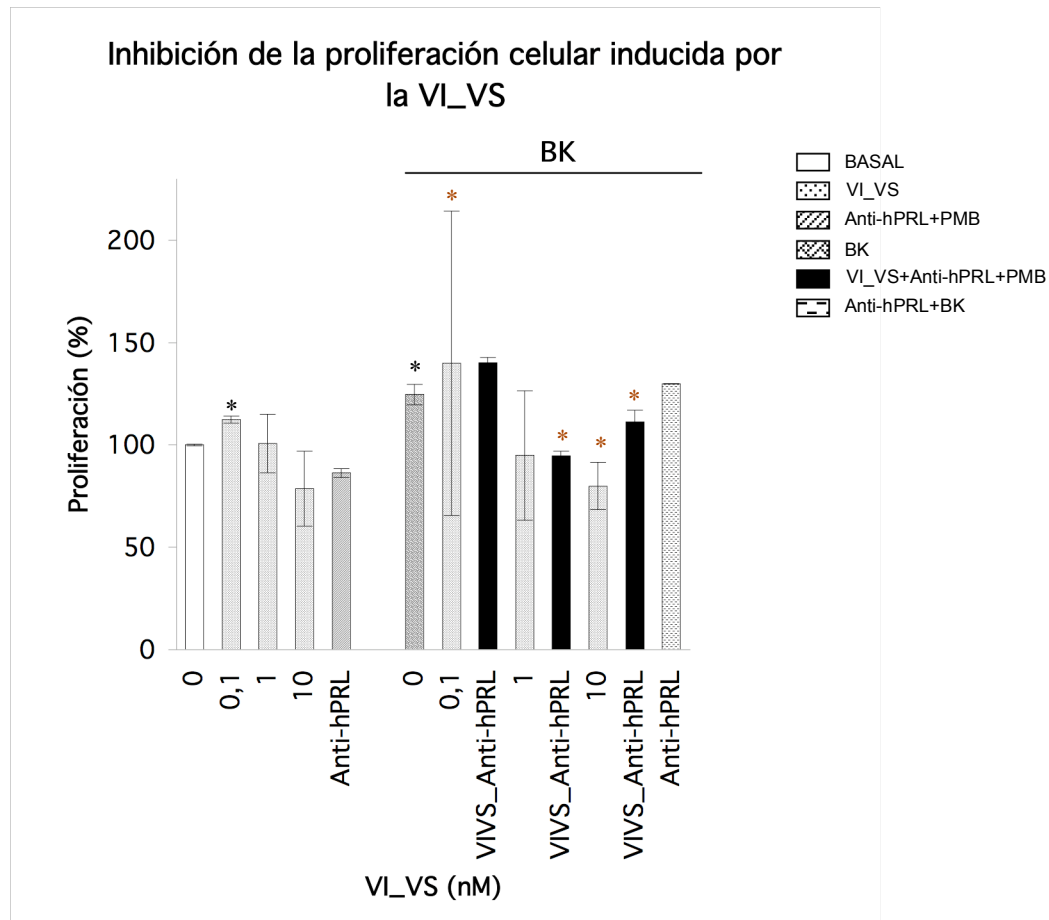


Figura 28. Ensayos de proliferación de la proteína recombinante VI_VS en presencia del inductor Bradicidina, contrarrestando con un anticuerpo anti-NhPRL a concentraciones crecientes. * valor de $P < 0.05$ con respecto del basal y * valor de $P < 0.05$ con respecto de BK

En resumen, de las cuatro proteínas recombinantes producidas, la quimera VS_VI fue la más potente y la VI_VS fue la menos activa biológicamente en este sistema siendo el orden de potencia el siguiente: VS_VI > VI > VS > VI_VS.

Para la quimera VS_VI que inhibió en un 65.53%, se sugiere una posible potenciación resultante de la fusión de estos dos péptidos antiangiogénicos. Aunque para la quimera VI_VS, que solo inhibió la mitad de lo de VS_VI, posiblemente la fusión de los dos péptidos en este sentido conllevan al bloqueo de ciertos aminoácidos esenciales para la bioactividad de las proteínas por separado.

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

El desarrollo de afecciones angiogénico-dependientes, tales como el desarrollo y progresión de cáncer, involucra la formación de nuevos vasos sanguíneos, por lo que la regulación del proceso angiogénico, se ha convertido en un blanco terapéutico prometedor³⁸. Se han estudiado diversos inhibidores de la angiogénesis, debido a su potencial aplicación en la clínica. Entre estos inhibidores se encuentran las vaso inhibinas (Vi) y la vasostatina (VS), ambos han demostrado ser péptidos con capacidad de inhibir migración y proliferación de células endoteliales, a través de diversos mecanismos de acción^{27; 31; 39; 40}.

Estos fragmentos son de origen endógeno, procesados principalmente por proteólisis enzimática del tipo de la catepsina D y metaloproteasas, a partir de moléculas mayores que por si mismas han perdido su capacidad antiangiogénica¹⁴. Tal es el caso de la prolactina que genera fragmentos amino-terminales de 12 a 17kDa conocidos actualmente como vaso inhibinas¹⁴. Por otro lado, la vasostatina proviene del procesamiento proteolítico de la calreticulina³⁰.

Por lo anterior, se han intentado obtener estos péptidos de forma recombinante, con la finalidad de generar a gran escala péptidos bioactivos a bajo costo, con el propósito de estudiar sus propiedades, efectos y mecanismos de acción en diversos modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro*, y en un futuro su aplicación como agentes terapéuticos.

[Sun et al. 2005] en un primer intento de expresar eficientemente la VS, realizo una fusión del gen optimizado de VS (120-180 a.a amino-terminales) con la glutathion-S-transferasa (GST) y co-expreso con las chaperonas GroES/EL y el factor trigger (TF) a 28°C en *E. coli* BL21(DE3) inducible por IPTG, condiciones en las que obtuvo hasta un 85% de proteína soluble, consiguiendo una producción de VS purificada de 7.2mg por litro de cultivo, además de, una inhibición en la proliferación de células HUVEC del 33% a 30nM y 95% a una concentración de 180nM de proteína recombinante purificada y una inhibición de aproximadamente del 95% en la vasculatura de membranas corioalantoideas de pollo, a una concentración de 10µg de VS³³. En un segundo intento, se incremento la producción a 21mg por litro de cultivo, al expresar la proteína sin GST y en las

mismas condiciones anteriores. En el presente trabajo, la producción para VS fue de 6.87mg por litro de cultivo, se evaluó su bioactividad en células CEC mostrando una inhibición de la proliferación celular del 25% a una concentración de 10nM, mientras que comparado a lo obtenido por [Sun et al. 2005] podría sugerir que la proteína recombinante (VS) presentaría mayor sensibilidad ya que se utiliza una concentración menor en presencia de Bradicidina.

Por otro lado, [Galfione et al. 2003] ha producido la Vi en células Sf9 de insecto, utilizando un baculovirus como vector, en el cual obtuvo 0.28mg por cada 4×10^7 células, mostrando una inhibición de aproximadamente del 66% a 10nM y 80% en células HUVEC a 40nM. La producción para VI en el presente estudio fue de 1.9µg/ml de proteína purificada por cada 50ml de cultivo, obtenidos a las 6 horas post-inducción con sal de la proteína, su bioactividad fue probada en CEC mostrando una inhibición de la proliferación de 50.5% a 10nM, esto mejora la producción obtenida por [Galfione et al. 2003] ya que se produce una mayor cantidad de proteína purificada en menor tiempo y costo, contrarrestando el nivel de bioactividad obtenido por el autor.

Al tener conocimiento de la actividad biológica de estas proteínas, y sabiendo que la actividad antiangiogénica de dos péptidos combinados se potencia⁴¹, ha surgido un interés considerable sobre la expresión y producción de proteínas de fusión, las cuales están formadas por dos péptidos provenientes de fuentes diferentes, para así obtener péptidos con una mayor capacidad antiangiogénica.

[X. Li et al. 2007] expreso en *E. coli* BL21(DE3) una proteína de fusión compuesta por un péptido proveniente del factor plaquetario-4 (C13) y la VS (135-164 a.a. amino-terminales de la calreticulina) llamada PFV, la cual ejerció una inhibición del 82% en la proliferación de células ECV304 a una concentración de 8µM, al contrario de los péptidos por separado, los que inhibieron aproximadamente un 50% la proliferación de células ECV304 a la misma concentración.

[Sun et al. 2008] realizo la proteína de fusión comprendida por vasostatina y el dominio ATF de la urocinasa denominado ALV, no menciona el rendimiento en la producción de la proteína de fusión. Sin embargo, la quimera fue bioactiva en ensayos de proliferación de células HMVEC utilizando un gradiente de

concentración desde 30 hasta 180nM, obteniendo desde un 45% a 85% de inhibición respectivamente.

En el presente trabajo se expresaron y purificaron las proteínas de fusión vasostatina-vaso inhibina (VS_VI) y vaso inhibina-vasostatina (VI_VS) conformadas por los dominios amino-terminales de la prolactina (VI 1-120a.a.) y la calreticulina (VS 135-164a.a.), estas proteínas fueron evaluadas en células endoteliales de vasos coronarios de rata, obteniendo una inhibición de la proliferación inducida por Bradicidina de 35.8% y 65.5% para VI_VS y VS_VI respectivamente a una concentración de 10nM, lo que mejora la bioactividad reportada para las quimeras mencionadas anteriormente ALV y PFV. Con esto se observa una potencia mayor en la bioactividad por parte de la quimera VS_VI que en la VI_VS, este dato podría sugerir, un posible bloqueo de aminoácidos esenciales en la actividad de uno de los dos péptidos al ubicarse en esa posición, que tendrá que comprobarse.

La expresión de proteínas en *E. coli* BL21SI (DE3) llevada a cabo por la mayoría de los autores, conlleva la inducción de la expresión con IPTG, el cual presenta la característica de inducir una mayor producción de la proteína recombinante, sin embargo, resulta difícil de eliminar, suele ser tóxico para cultivos de líneas celulares y es costoso. Además, al fusionar las proteínas recombinantes con péptidos como la GST o MBP, si bien, incrementan la fracción soluble de la proteína, implican métodos de purificación elaborados y costosos.

Los resultados presentados en este trabajo mostraron la expresión de las proteínas recombinantes con capacidad antiangiogénica: VS, VI, y sus quimeras VS_VI y VI_VS en *Escherichia coli* BL21SI inducible por sal lo cual lo hace un sistema de expresión económico. Se observó que el nivel de producción de las proteínas recombinantes depende de cada proteína ya que a las mismas condiciones de producción, tanto a nivel de matraz como de biorreactor éstas se expresaron de forma diferente. Condiciones controladas de 5% de dO₂, pH 7.0 y 20°C como temperatura de inducción no favorecen la producción a nivel de biorreactor de las proteínas quiméricas VI_VS y VS_VI, al contrario de la proteína VI que la producción de la forma soluble a nivel de biorreactor a estas condiciones se ve mejorada. Por otro lado, la proteína VS no fue posible analizarla a nivel de

biorreactor ya que resultó ser una proteína inestable que está sujeta a degradación, lo que sugiere, optimizar la producción de las proteínas recombinantes a nivel de biorreactor, variando condiciones de cultivo. Por otro lado, la purificación de éstas proteínas depende del pH utilizado, VS eluye a pH de 7.5, las proteínas VI, VS_VI y VI_VS lo hacen a pH de 6.5, todas las proteínas eluyen a 250mM de imidazol, aunque la proteína VI_VS se purificó parcialmente, es necesario encontrar las mejores condiciones de purificación al variar pH y concentraciones de imidazol en los buffer de lavado.

Los resultados obtenidos mostraron que cada una de estas proteínas recombinantes, y sus quimeras, contienen los fragmentos activos de los correspondientes agentes antiangiogénicos con diferentes potencias, cuyo blanco biológico son las células endoteliales. El entendimiento y estudio de los mecanismos de acción a diferentes niveles, tanto *in vitro* como *in vivo* de estos nuevos péptidos, abrirá nuevas líneas de investigación para el desarrollo y aplicación de novedosas herramientas biológicas en la terapia angiogénica.

REFERENCIAS

1. Martínez-Ezquerro, J. D. & Herrera, L. A. (2006). ANGIOGÉNESIS: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer. *Cancerología* **1**, 83-96.
2. William W. Li, M. & Vincent W. Li, M. (2003). Angiogenesis in wound healing. In *Contemporary surgery*, pp. 1-35.
3. Oliva, J. M. (2007). *Diagnóstico molecular en medicina*. 2 edit. ISBN 978-970-729-293-2 (970-729-293-8, I.-. & 978-970-729-293--2, I.-. Eds.), Editorial Manual Moderno, México.
4. Tang, X., Zhang, Q., Shi, S., Yun, Y., Li, X., Zhang, Y., Zhou, K. & Le, A. D. (2009). Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1alpha/VEGF signaling pathways in human breast cancer cells. *Int J Cancer*.
5. Zhang, J., Li, L., Kim, S. H., Hagerman, A. E. & Lu, J. (2009). Anti-Cancer, Anti-Diabetic and Other Pharmacologic and Biological Activities of Penta-Galloyl-Glucose. *Pharm Res*.
6. Persano, L., Crescenzi, M. & Indraccolo, S. (2007). Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects. *Mol Aspects Med* **28**, 87-114.
7. Alzheimer, C. (2002). Molecular and Cellular Biology of Neuroprotection in the CNS. In *Advances in experimental medicine and biology*, Vol. 513.
8. Vieira, J. M., Ruhrberg, C. & Schwarzw, Q. (2008). VEGF Receptor Signalling in Vertebrate Development. In *VEGF in Development*, pp. 118. Springer, London.
9. Duffy, A. M., Bouchier-Hayes, D. J. & Harmey, J. H. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. In *VEGF and Cancer*, pp. 188. Landes Bioscience, Ireland.
10. Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M. M., Shibuya, M., Alitalo, K. & Eriksson, U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11709-14.
11. Witzenbichler, B., Asahara, T., Murohara, T., Silver, M., Spyridopoulos, I., Magner, M., Principe, N., Kearney, M., Hu, J. S. & Isner, J. M. (1998). Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* **153**, 381-94.
12. Partanen, T. A., Arola, J., Saaristo, A., Jussila, L., Ora, A., Miettinen, M., Stacker, S. A., Achen, M. G. & Alitalo, K. (2000). VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *Faseb J* **14**, 2087-96.
13. Kowalewski, R., Malkowski, A., Sobolewski, K. & Gacko, M. (2008). Evaluation of aFGF/bFGF and FGF Signaling Pathway in the Wall of Varicose Veins. *J Surg Res*.
14. Clapp, C., Gonzalez, C., Macotela, Y., Aranda, J., Rivera, J. C., Garcia, C., Guzman, J., Zamorano, M., Vega, C., Martin, C., Jeziorski, M. C. & de la Escalera, G. M. (2006). Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res* **35**, 64-73.

15. O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. & Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-85.
16. HOLLAND, J. F., EMIL FREI, I., JR., R. C. B., KUFE, D. W., POLLOCK, R. E. & R. WEICHSELBAUM, R. (2003). *Cancer Medicine*, Vol. 6. B. C. Decker Inc.
17. Nyberg, P., Xie, L. & Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* **65**, 3967-79.
18. Dixelius, J., Cross, M., Matsumoto, T., Sasaki, T., Timpl, R. & Claesson-Welsh, L. (2002). Endostatin regulates endothelial cell adhesion and cytoskeletal organization. *Cancer Res* **62**, 1944-7.
19. Hanai, J., Dhanabal, M., Karumanchi, S. A., Albanese, C., Waterman, M., Chan, B., Ramchandran, R., Pestell, R. & Sukhatme, V. P. (2002). Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem* **277**, 16464-9.
20. Urbich, C., Reissner, A., Chavakis, E., Dernbach, E., Haendeler, J., Fleming, I., Zeiher, A. M., Kaszkin, M. & Dimmeler, S. (2002). Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *Faseb J* **16**, 706-8.
21. 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. *Mol Endocrinol* **18**, 2522-42.
22. Piwnica, D., Fernandez, I., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P. A. & Goffin, V. (2006). A new mechanism for prolactin processing into 16K PRL by secreted cathepsin D. *Mol Endocrinol* **20**, 3263-78.
23. Tabruyn, S. P., Sorlet, C. M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R. I., Martial, J. A. & Struman, I. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* **17**, 1815-23.
24. Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Munoz, M., Rubio, R., Lin, S. H., Martinez de la Escalera, G. & Clapp, C. (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* **145**, 5714-22.
25. Ziche, M. & Morbidelli, L. (2000). Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* **50**, 139-48.
26. Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J. & Weiner, R. I. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* **139**, 3696-703.
27. Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M. C. & Martinez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* **17**, 301-7.
28. Garcia, C., Aranda, J., Arnold, E., Thebault, S., Macotela, Y., Lopez-Casillas, F., Mendoza, V., Quiroz-Mercado, H., Hernandez-Montiel, H. L., Lin, S. H., de la Escalera, G. M. & Clapp, C. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* **118**, 2291-300.

29. Qiu, Y. & Michalak, M. (2009). Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 531-8.
30. Pike, S. E., Yao, L., Jones, K. D., Cherney, B., Appella, E., Sakaguchi, K., Nakhasi, H., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G. & Tosato, G. (1998). Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* **188**, 2349-56.
31. Pike, S. E., Yao, L., Setsuda, J., Jones, K. D., Cherney, B., Appella, E., Sakaguchi, K., Nakhasi, H., Atreya, C. D., Teruya-Feldstein, J., Wirth, P., Gupta, G. & Tosato, G. (1999). Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood* **94**, 2461-8.
32. Li, X., Jiang, L., Wang, Y., Xiao, Y., Huang, Y., Yao, Q., Yang, Y. & Wu, X. (2007). Inhibition of angiogenesis by a novel small peptide consisting of the active fragments of platelet factor-4 and vasostatin. *Cancer Lett* **256**, 29-32.
33. Sun, Q. M., Cao, L., Fang, L., Chen, C., Dai, J., Chen, L. L. & Hua, Z. C. (2005). Expression, purification of human vasostatin120-180 in *Escherichia coli*, and its anti-angiogenic characterization. *Protein Expr Purif* **39**, 288-95.
34. Sun, Q. M., Chen, L. L., Cao, L., Fang, L., Chen, C. & Hua, Z. C. (2005). An improved strategy for high-level production of human vasostatin120-180. *Biotechnol Prog* **21**, 1048-52.
35. Sun, Q., Xu, Q., Dong, X., Cao, L., Huang, X., Hu, Q. & Hua, Z. C. (2008). A hybrid protein comprising ATF domain of pro-UK and VAS, an angiogenesis inhibitor, is a potent candidate for targeted cancer therapy. *Int J Cancer* **123**, 942-50.
36. Huegel, R., Velasco, P., De la Luz Sierra, M., Christophers, E., Schroder, J. M., Schwarz, T., Tosato, G. & Lange-Asschenfeldt, B. (2007). Novel anti-inflammatory properties of the angiogenesis inhibitor vasostatin. *J Invest Dermatol* **127**, 65-74.
37. Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**, 32678-84.
38. Ferrara, N. & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**, 967-74.
39. Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delure, F. & Weiner, R. I. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**, 1292-9.
40. Yao, L., Pike, S. E. & Tosato, G. (2002). Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function. *J Leukoc Biol* **71**, 47-53.
41. Yao, L., Pike, S. E., Setsuda, J., Parekh, J., Gupta, G., Raffeld, M., Jaffe, E. S. & Tosato, G. (2000). Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. *Blood* **96**, 1900-5.

ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLOS

A. Amplificación de ADNc con la enzima de alta fidelidad Pfu.

Tabla A1.1 Reacción de PCR para Pfu

Reactivo	Volumen μ l
Oligo Forward	0,20
Oligo Reverse	0,20
dNTPs	0,50
Buffer de Pfu 10X	2,50
Enzima Pfu	1,00
ADN molde	1,00
Agua MQ estéril	19,60

- Iniciar con 5 min de desnaturalización a 95°C
- Disminuir la temperatura a 80°C por 1min, en ese momento añadir 1 μ l de la enzima Pfu (1U/ μ l).
- Seguir con los ciclos y condiciones normales de amplificación.

B. Adición de poliadeninas (PoliA)

- Comenzar con 1-7 μ l de producto de PCR purificado, generado por una enzima de alta fidelidad (ej. Pfu, Accuzyme, etc).
- Añadir 1 μ l del buffer de reacción 10X de la Taq DNA polimerasa.
- Añadir 0.5 μ l de MgCl₂ 25mM.
- Adicionar dNTP a una concentración final de 0.2mM.
- Añadir 5 unidades de Taq DNA polimerasa.
- Adicionar agua MQ estéril a un volumen final de 10 μ l.
- Incubar a 70°C durante 15-30 minutos.
- Utilizar de 1-2 μ l en la reacción de ligación.

C. Tinción de Plata

- Previamente preparar una solución con 50ml de metanol grado reactivo, 10ml de ácido acético, 10ml de Fixative enhancer conc. y 30ml de agua destilada.
- Sumergir en esta solución el gel de poliacrilamida, en agitación por 20 minutos.
- Dar 4 lavados de 15 minutos con 400ml de agua destilada.
- Preparar la solución 1 con 17.5ml de agua destilada, 2.5ml de la silver complex solution, 2.5ml de reduction moderator solution y 2.5ml de image development reagent.

- Preparar solución 2, pesar 1.25g del development accelerator solution, disolver en 23.75ml de agua destilada.
- Al termino de los lavados, mezclar la solución 1 y 2 y sumergir inmediatamente el gel en esta solución. Esperar a que comiencen a aparecer las bandas de proteínas.
- Detener la reacción con una solución de ácido acético al 5%

D. Células Rubidio Competentes

- Crecer un preinóculo de la cepa en 5 mL durante toda la noche a 37°C.
- Tomar una muestra del preinóculo e inocular en medio de cultivo fresco, comenzar con una OD de 0.1.
- Incubar a 37°C hasta alcanzar una OD de 0.5.
- Transferir el cultivo a tubos de polipropileno previamente enfriados en hielo.
- Dejar reposar en hielo 30 minutos agitando de vez en cuando.
- Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos.
- Decantar sobrenadante.
- Resuspender suavemente el pellet celular en 20 ml de la solución 1.
- Incubar en hielo por 1 hora agitando de vez en cuando.
- Centrifugar a 6000 rpm por 10 minutos.
- Decantar sobrenadante.
- Añadir 500µl de la solución 2.
- Alicuotar en tubos ependorf previamente congelados volúmenes de 50µl.
- Almacenar a -80°C

E. Transformación de células rubidio competentes

- Descongelar en hielo un tubo ependorf de las células rubidio competentes.
- Añadir 1µl de ADN plasmidico o el total del ADN proveniente de una reacción de ligación.
- Reposar en hielo durante 30 minutos, agitando cada 10 minutos.
- Incubar el tubo a 42°C por 1 minuto e inmediatamente volver a reposar en hielo por 5 minutos.
- Añadir 150µl de medio SOC y recuperar las células a 37°C durante 1 hora.
- Plaquear en cajas con medio LB o LBON, según sea el caso.

F. Purificación de ADN plasmidico

- Inocular 3 mL de medio de cultivo rico (LB o LBON) e incubar toda la noche a 37°C, 200 rpm.
- Alicuotar el cultivo en tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Centrifugar a maxima velocidad por 1 min a 4°C.
- Descartar sobrenadante y dejar el pellet tan seco como sea posible.
- Añadir en esterilidad y en hielo 100µL de la solución de lisis alcalina I, mezclar en vortex y dejar reposar en hielo.

- Añadir en hielo 200 μ L de la solución de lisis alcalina II recién preparada y mezclar (no usar vortex), almacenar el tubo en hielo.
- Adicionar 150 μ L de la solución de lisis alcalina III, mezclar y dejar reposar de 3-5 min en hielo.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 10 min a 4°C, transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio.
- Añadir un volumen igual al que se tiene en el tubo (aproximadamente 450 μ L) de fenol:cloroformo, mezclar en vortex y centrifugar a máxima velocidad por 2 min a 4°C.
- Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
- Precipitar el ADN plasmidico con 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Mezclar y dejar reposar 5 min.
- Centrifugar a máxima velocidad por 5 min a 4°C.
- Remover el sobrenadante por aspiración y colocar el tubo en posición invertida sobre un papel para remover el etanol.
- Dar 3 lavados con etanol 70%.
- Invertir el tubo y dejar secar por evaporación a temperatura ambiente.
- Resuspender el ADN plasmidico en 30 μ L de buffer TE o agua MQ esteril.
- Añadir 2 μ L de RNAsa 20 μ g/ml, incubar a 37°C durante 1 hora.
- Analizar la integridad del ADN plasmidico en geles de agarosa 1%.

G. Geles de SDS-PAGE en gradiente

- Preparar la solución stack, la de 4% y 20% de acrilamida.
- Colocar las soluciones del 4 y 20% previamente adicionadas con persulfato de amonio (PSA) y TEMED, en una cámara de gradiente.
- Vaciar la primera capa entre dos vidrios especiales para la obtención de geles de 0.75mm de grosor y cubrir con agua MQ.
- Una vez gelificada la primera capa, se retira el exceso de agua, se coloca la peineta y se añade la solución de stack previamente adicionada con PSA y TEMED, esperar a que gelifique.
- Retirar la peineta y eliminar las burbujas con papel filtro.
- Correr el gel en buffer tris-glicina 1X

H. Geles de SDS-PAGE discontinuos o tris-tricina

- Preparar las soluciones del separador, espaciador y concentrador.
- Vaciar la primera capa con la solución del separador, previamente con PSA y TEMED y cubrir con agua MQ.
- Al gelificar, retirar el exceso de agua y añadir la segunda capa con la solución del espaciador y cubrir nuevamente con agua MQ.
- Retirar el exceso de agua, colocar la peineta y añadir la solución del concentrador.
- Retirar la peineta y eliminar las burbujas con un papel filtro.
- Correr el gel con las soluciones de cátodo 1X en el interior y ánodo 1X en el exterior.

ANEXO 2. SOLUCIONES Y REACTIVOS

A. Medios de cultivo

A1. Medio LB

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Para LB sólido, adicionar 15 g de agar bacteriológico.

A2. Medio LBON

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g

Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Para LBON sólido, adicionar 15 g de agar bacteriológico.

A3. Medio BSG

Reactivos	Cantidad
Glucosa	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
(NH ₄) ₂ PO ₄	3.5 g
KH ₂ PO ₄	3.5 g
Tiamina (40 µg/L)	40 µL
Ampicilina (100 mg/mL)	1 mL

-Disolver la glucosa y el MgSO₄·7H₂O en 100 mL de agua destilada (10 % del volumen total), esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

-Disolver las sales en 900 mL de agua destilada (90 % del volumen total), esterilizar a 121°C durante 15 minutos

-Esteriliza la solución de 100 mg/mL de ampicilina por filtración, de esta solución adicionar 1 µL/mL de medio.

-Esterilizar la solución de 40 µg/L de tiamina por filtración, de esta solución adicionar 40 µL/L de medio

B. Soluciones para células rubidio competentes.

B1. Solución RF1

Reactivo	Peso (g)
RbCl	2.4
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.98
CaCl ₂	0.30
Glicerol 100%	30 ml

Ajustar a 200ml con agua destilada, esterilizar en autoclave y posteriormente agregar 6ml de Kac 1M esteril.

B2. Solución RF2

Reactivo	Peso (g)
RbCl	0.24
CaCl ₂	2.2
Glicerol 100%	30 ml

Ajustar a 200ml con agua destilada, esterilizar en autoclave y posteriormente agregar 4ml de MOPS 0.5M pH 6.8

C. Electroforesis en gel de agarosa

C1. TAE 50X

Reactivos	Cantidad
Tris (base)	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA (0.5 mM, pH 8)	100 mL

Aforar a 1 L con agua miliQ.

C2. Gel de agarosa al 1%

Reactivos	Cantidad
Agarosa	1 g
TAE 1X	100 mL
Bromuro de etidio (10 mg/mL)	0.5 µg/mL

Calentar la solución en horno de microondas a máxima potencia durante 2 minutos.

D. Soluciones para purificación de ADN plasmidico por lisis alcalina

D1. Solución I para purificar ADN plasmidico.

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl (pH 8)	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	10 mM

D2. Solución II para purificar ADN plasmidico

Reactivos	Cantidad
SDS	1 %
NaOH	0.2 M

D3. Solución III para purificar ADN plasmidico

Reactivos	Cantidad
Acetato de Sodio	3 M

Ajustar a pH 4.8 con ácido acético glacial

E. Soluciones para proteínas

E1. Cuantificación de proteína total (Lowry)

Solución	Reactivos
A	0.25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de agua destilada.
B	0.5 g de tartrato de sodio y potasio en 50 mL de agua destilada.
C	10 g de Na_2CO_3 en 500 mL de NaOH 0.1 N.
D	1 mL de solución A, 1 mL de solución B y 98 mL de la solución C.
Folín	1:2 en agua destilada (prepararse antes de utilizar).

E2. Soluciones para el gel de gradiente

Soluciones	Gel al 4 %	Gel al 20 %
Acrilamida (Bio Rad cat. 161-0154)	365 μL	1815 μL
Amortiguador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	690 μL	690 μL
SDS al 10 %	27.5 μL	27.50 μL
H_2O_m	1650 μL	205 μL
TEMED	1.83 μL	0.91 μL
APS al 10 %	9.16 μL	9.16 μL

E3. Soluciones para el gel concentrador

Soluciones	Gel al 4 %
Acrilamida (Bio Rad cat. 161-0154)	365 μ L
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	690 μ L
SDS al 10 %	27.5 μ L
H ₂ O _m	1650 μ L
TEMED	1.83 μ L
APS al 10 %	9.16 μ L

NOTA: Adicionar el TEMED y el APS antes de usar.

E4. Amortiguador Tris 1.5M pH 8.8 100ml

Reactivo	Peso (g)
Tris base	18.15
Agua	c.b.p.

E5. Amortiguador Tris 0.5M pH 6.8 100ml

Reactivo	Peso (g)
Tris base	6.0
Agua	c.b.p.

E6. SDS 10% 1mL

Reactivo	Peso (g)
SDS	0.1
Agua	c.b.p.

E7. Solución de NaCl 3M 100mL

Reactivo	Peso (g)
NaCl	17.5
Agua	c.b.p.

Nota: esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente

E8. Buffer de carga de la muestra

Soluciones	Cantidad
Tris-HCl 1 M pH 6.8	0.6 mL
Glicerol al 50%	5 mL
SDS al 10 %	2 mL
2-β-mercaptoetanol	0.5 mL
Azul de bromofenol al 1%	1 mL

Adicionar 0.9 mL de agua destilada.

E9. Buffer de corrida Tris-glicina

Reactivos	Cantidad
Tris-base	3 g
Glicina	14.4 g
SDS	1 g

Disolver en 1 L de agua destilada, el pH aproximado es de 8.3.

E10. Soluciones para gel discontinuo (Tris-tricina)

Reactivo	Concentrador (μl)	Espaciador (μl)	Separador (μl)
Sol'n de acrilamida	160.0	406.0	1670.0
Amortiguador de gel	496.0	666.0	1670.0
Glicerol 100%	-	-	533.0
Agua MQ	1340.0	927.0	1130.0
PSA 10%	11.0	7.0	11.0
TEMED	1.1	0.7	1.1

E11. Amortiguador de gel 50mL

Reactivo	Peso (g)
Tris base	18.17
SDS	0.15
Agua MQ	c.b.p.

E12. Amortiguador de Ánodo 1X

Reactivo	Peso (g)
Tris base	12.11
Agua MQ	c.b.p.

E13. Amortiguador de Cátodo 1X

Reactivo	Peso (g)
Tris base	6.05
Tricina	8.96
SDS	0.5
Agua MQ	c.b.p.

F. Soluciones para Western blot

F1. Buffer de transferencia Towbin

Reactivos	Cantidad
Tris-base	25 mM
Glicina	192 mM

Disolver en solución de metanol al 20 %.

F2. Buffer de fosfatos PBS 1X

Reactivos	Cantidad
NaCl	140 mM
Na ₂ HPO ₄	7.2 mM
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2.8 mM

Disolver en agua miliQ, ajustar el pH a 7.5

F3. Solución de bloqueo

Reactivos	Cantidad
Leche descremada Svelty®	3 g

Disolver en 100 mL de PBS

F4. Amortiguador para la enzima alcalino fosfatasa

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl (pH 9.5)	0.1 M
NaCl	0.1 M
MgCl ₂ .6H ₂ O	50 mM

F5. Solución de revelado (Coomasie)

Reactivo	Cantidad
Coomasie blue R-250	1.0g
Agua MQ	500ml
Acido acético	100ml
Metanol	400ml

F6. Solución de desteñido

Reactivo	Volumen (ml)
Agua MQ	500
Acido acético	100
Metanol	400