



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Optimización de la producción de vasostatina 30
y su proteína de fusión VS_VI en biorreactor**

Tesis que presenta

Gabriela Vázquez Rodríguez

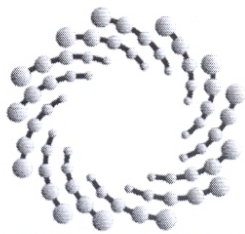
Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2013



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Optimización de la producción de vasostatina 30 y su proteína de fusión VS_VI en biorreactor**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Gabriela Vázquez Rodríguez** y aprobada el **11 de Julio de 2013** 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
Miembro del Comité Tutorial

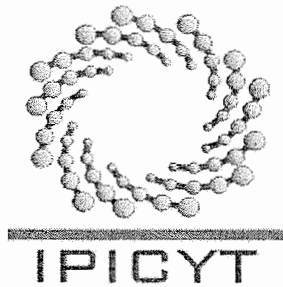
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado
Miembro del Comité Tutorial

Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez.

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.



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 056 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2013, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ma. del Carmen González Castillo	Presidente	UASLP
Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado	Secretario	UASLP
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Gabriela Vázquez Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

Optimización de la producción de las proteínas antiangiogénicas vasostatina y su quimera vasostatina-vasoinhibina

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez


El Jurado, después de deliberar, determinó

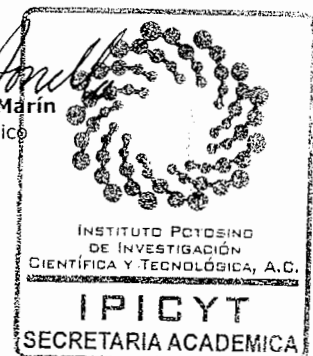
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 14:10 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 11 días del mes de julio de 2013.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mi esposo, Esri Hazael Juárez, por todo su apoyo, comprensión y compañía en los buenos y malos momentos.

A mis padres y hermanos, por todo el apoyo y comprensión otorgado durante todos estos años de estudio.

Agradecimientos

Al CONACYT, por la beca otorgada.

Al IPICYT, por haberme admitido en su programa de posgrado.

Al Dr. Antonio De León Rodríguez, por admitirme en su laboratorio y por su asesoría.

Al M. en C. Leandro Gabriel Ordóñez Acevedo, por el apoyo técnico y el buen humor que hizo más ameno el trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa, por las facilidades prestadas.

A todos mis compañeros de laboratorio, a los que están y a los que ya partieron, ya que de todos ellos obtuve mucho conocimiento, tips, críticas constructivas y muchos momentos felices.

Al Dr. Yihai Cao del Instituto Karolinska por haberme admitido en su laboratorio durante casi un año, en dónde aprendí nuevas e interesantes técnicas que contribuyeron en gran medida a mi formación profesional.

Al Dr. Lasse Jensen de la Universidad de Linköping por su asesoría, paciencia, amistad y todos los conocimientos otorgados durante mi estancia de investigación.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
CAPÍTULO 1 Introducción	1
1.1. Angiogénesis	2
1.2. Terapia antiangiogénica	4
1.2.1 Vasoinhibinas (Vi)	5
1.2.2 Vasostatina	6
1.3. <i>Escherichia coli</i> como modelo de expresión	7
1.4. Optimización de la producción de proteínas recombinantes	8
1.4.1. Diseño Box-Behnken (BB)	8
1.4.2. Diseño Compuesto Central (CC)	9
Justificación del trabajo	11
Objetivo	11
CAPÍTULO 2 Materiales y Métodos	12
2.1. Materiales y reactivos	13
2.2. Construcción de los vectores de expresión	13
2.2.1. pGVR-Vs30	13

2.2.2. pGVR-VS_VI	13
2.3. Cepas utilizadas	14
2.4. Diseños experimentales	15
2.5. Cultivos en biorreactor	15
2.6. Métodos analíticos	16
2.6.1. Reacción de polimerización con Klenow	16
2.6.2. Cultivos en biorreactor	17
2.6.3. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	18
2.6.4. Análisis de proteínas por SDS-PAGE	18
2.6.5. Western Blot	18
2.6.6. Purificación por cromatografía de afinidad	20
2.6.6.1. Preparación de la columna	20
2.6.6.2. Preparación de la muestra	21
2.6.6.3. Purificación en columnas de níquel	21
2.7 Análisis estadístico	22
CAPÍTULO 3 Resultados y Discusión	23
3.1 Construcción de los vectores de expresión pGVR-Vs30 y pGVR-VS_VI	24
3.2 Optimización de la producción de Vs30 y VS_VI recombinantes	25
3.2.1. Producción de Vs30 recombinante	26
3.2.2. Producción de VS_VI recombinante	33
CAPÍTULO 4 Conclusiones	40
CAPÍTULO 5 Manuscrito	42
CAPITULO 6 Referencias	53
CAPITULO 7 Anexos	58

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Estimuladores e inhibidores de la angiogénesis	2
Tabla 2. Código de los niveles evaluados en cada diseño experimental	15
Tabla 3. Diseño experimental Box-Behnken	26
Tabla 4. Análisis de varianza para la producción total de rVs30	30
Tabla 5. Análisis de varianza para rVs30 soluble	31
Tabla 6. Diseño compuesto central	34
Tabla 7. Análisis de varianza para la producción total de rVS_VI	37
Tabla 8. Análisis de varianza para rVS_VI soluble	38

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Familia VEGF y sus receptores tirosina cinasa	3
Figura 2. Modelo de resistencia al tratamiento con un anticuerpo dirigido contra el receptor 2 del VEGF	5
Figura 3. Esquema del plásmido pRARE y sus derivados	8
Figura 4. Esquema de cubo del diseño Box-Behnken	9
Figura 5. Modelo del diseño compuesto central	10
Figura 6. Deleción del gen <i>lacI</i> mediante restricción y polimerización con el fragmento Klenow	17
Figura 7. Esquema de la transferencia de proteínas en cámara semiseca	19
Figura 8. PCR y análisis por restricción de los fragmentos Vs30 y VS_VI	24
Figura 9. Obtención de las construcciones pGVR-Vs30 y pGVR-VS_VI	25
Figura 10. Cinética de crecimiento de la cepa BL21-SI/pGVR-Vs30	28
Figura 11. Producción de la proteína Vs30 recombinante en biorreactor	29
Figura 12. Gráficas de superficie de respuesta del modelo ajustado para la producción total y soluble de rVs30	32
Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa BL21-SI/pLysSRARE/pGVR-VS_VI	35
Figura 14. Producción de la proteína de fusión VS_VI en biorreactor	36
Figura 15. Gráficas de superficie de respuesta del modelo ajustado para la producción total y soluble de la proteína de fusión rVS_VI	39

Anexos

7.1 Cultivos en biorreactor	59
7.1.1. Medio mínimo BSG	59
7.1.2. Elementos traza	59
7.1.3. Buffer de fosfatos (PBS)	59
7.1.4. Curva de calibración de peso seco para la conversión a biomasa	60
7.2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	61
7.3 Análisis de proteínas por SDS-PAGE	62
7.3.1. Gel de gradiente tris-glicina	62
7.3.2. Gel discontinuo tris-tricina	63
7.3.3. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por densitometría	64
7.4 Western Blot	65
7.5 Purificación por cromatografía de afinidad	65

Resumen

Optimización de la producción de vasostatina 30 y su proteína de fusión VS_VI en biorreactor

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes y juega un papel clave en el desarrollo y progresión de enfermedades crónico-dependientes como la retinopatía diabética, artritis reumatoide, cáncer, entre otras. Actualmente, se ha generado gran interés por el diseño y estudio de nuevos péptidos antiangiogénicos que contribuyan a la inhibición del crecimiento y metástasis tumoral con los menores efectos adversos. Las vasoinhibinas (Vi) y la vasostatina (Vs) son péptidos aminotermiales inhibidores de la angiogénesis que son generados por proteólisis de la prolactina (PRL) y la calreticulina (CALR), respectivamente, y que además son prometedores agentes terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. La vasoinhibina de 14.1 kDa (Vi-II-14.1), la vasostatina de 30 residuos de aminoácidos que comprende de 135-164 a.a. de la CALR (Vs30) y su respectiva proteína de fusión denominada VS_VI, han demostrado tener una significativa actividad antiproliferativa de células endoteliales estimuladas con Bradicidina.

Debido a que se conoce muy poco del mecanismo de acción de la Vs30 y por consiguiente de su proteína de fusión VS_VI, el objetivo del presente trabajo fue optimizar la producción de las proteínas Vs30 y VS_VI en biorreactor mediante el uso de diseños experimentales y la metodología de superficie de respuesta (RSM), para así contar con una cantidad suficiente de éstas proteínas y caracterizarlas posteriormente.

Los genes que codifican las proteínas Vs30 y VS_VI fueron clonados en el vector pGVR (pET22b *lacI*) bajo el promotor de T7. Las construcciones fueron transformadas en *E. coli* BL21-SI y BL21-SI/pLysSRARE, respectivamente. Se realizaron dos diseños experimentales, el diseño Box-Behnken para la optimización de Vs30 y el diseño compuesto central para optimizar la proteína de fusión VS_VI. En la producción de las proteínas recombinantes se evaluó el efecto de los factores de temperatura de inducción (Ti), tensión de oxígeno disuelto (TOD) y pH a tres niveles cada uno. Mediante modelos de segundo orden se encontró que las mejores condiciones para la producción total de Vs30 recombinante fueron: pH 7, TOD 20% y 28.8 °C de Ti; y para VS_VI recombinante total fueron: pH 6.97 y 27.82 °C Ti; mientras que para Vs30 soluble fueron: pH 7, TOD 20% y 27.1°C de Ti; y para VS_VI soluble fueron: pH 7.0 y 28.5°C de Ti.

El diseño compuesto central es el mejor diseño experimental para optimizar la producción de proteínas recombinantes, ya que con este diseño se obtuvieron las condiciones óptimas para la producción de rVS_VI, objetivo que no se logró al utilizar el diseño Box-Behnken para la producción de rVs30. El uso de biorreactores es una herramienta muy útil en la optimización de la producción de proteínas de interés terapéutico debido al mantenimiento de condiciones controladas durante todo el cultivo.

PALABRAS CLAVE: *Diseño experimental, RSM, proteína recombinante, células endoteliales, proliferación celular.*

Abstract

Production optimization of vasostatin 30 and its fusion protein VS_VI in bioreactor

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from preexisting ones and plays a key role in development and progression of angiogenic-dependent diseases such as diabetic retinopathy, arthritis rheumatoid, and cancer, among others. The design and study of new antiangiogenic peptides that contribute to inhibition of tumor growth and metastasis with the minimum secondary effects, has generated a considerable interest. Vasoinhibins (Vi) and vasostatin (Vs) are N-terminal peptides released by proteolysis of human prolactin (hPRL) and calreticulin (CALR), respectively, that inhibit angiogenesis besides to be promising therapeutic agents in cancer treatment. The vasoinhibin of 14.1 kDa (Vi-II-14.1), the vasostatin of 30 amino acids residues from 135-164 a.a. of CALR (Vs30) and their fusion protein VS_VI, have shown a significant antiproliferative activity on endothelial cells in presence of Bradykinin.

Most of the mechanism of action Vs30 remains unknown, and also of its fusion protein VS_VI, therefore, the aim of this study was to optimize the production of the antiangiogenic proteins Vs30 and VS_VI in bioreactor, by using experimental designs and the response surface methodology (RSM) to have enough quantity of these proteins to further characterization.

The Vs30 and VS_VI genes were cloned into pGVR (pET22b *lacI'*) vector under T7 promoter. The constructions were transformed into *E. coli* BL21-SI and BL21-SI/pLysSRARE, respectively. Two experimental designs were used, the Box-Behnken design to optimize Vs30 and the central composite design to optimize the fusion protein VS_VI. In the recombinant protein production, the effect of post induction temperature (Ti), dissolved oxygen tension (DOT), and pH factors were evaluated at three levels each. By second order models we found that the best culture conditions for total rVs30 were: pH 7, DOT 20% and 28.8°C of Ti; and for total rVS_VI were: pH 6.97 and 27.82°C of Ti; meanwhile, for rVs30 soluble the best conditions were: pH 7, DOT 20% and 27.1°C of Ti; and for rVS_VI soluble were: pH 7.0 and 28.5°C of Ti.

The central composite (CC) design is the best experimental design to optimize recombinant protein production. With the CC design was possible to obtain the optimum conditions for rVS_VI production, aim that was not possible to reach by using Box-Behnken design. The use of bioreactors in optimization matters is a very useful tool due to the maintenance of controlled culture conditions, which leads to improve production of recombinant proteins of therapeutic interest.

Keywords: Experimental design, RSM, recombinant protein, endothelial cells and cell proliferation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. Participa en el proceso de reparación de heridas, en respuestas inflamatorias, en la embriogénesis, en tejidos en crecimiento y en órganos sexuales femeninos (Martínez-Ezquerro y Herrera 2006). En condiciones fisiológicas, la angiogénesis es un proceso finamente controlado por un balance entre factores pro- y antiangiogénicos (Tabla 1).

Tabla 1. Estimuladores e inhibidores endógenos de la angiogénesis

Angiogenesis	
Stimulators	Inhibitors
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Angiostatin
Fibroblast growth factor	Endostatin
Hepatocyte growth factor	Vasostatin
Platelet-derived endothelial cell growth factor	Canstatin
Transforming growth factor- β	Tumstatin
Angiogenin	Soluble VEGF receptor
Proliferin	Matrix metalloproteinase inhibitors
Interleukin-8	16-kDa prolactin fragment
Angiopoietin	Interleukin-12
Leptin	Arrestin
Granulocyte colony-stimulating factor	Platelet factor-4
Folistatin	Restin
Tumor necrosis factor- α	Maspin
Pleiotrophin	Interleukin-18

Tomado de Persano y cols. 2007 (Persano *et al.* 2007)

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es el principal regulador del proceso angiogénico, seguido del factor de crecimiento fibroblástico básico y ácido (FGF b y a), angiogenina, las angiopoietinas (Ang-1 y -2), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), entre otros (Yancopoulos *et al.* 2000).

Existen 4 tipos de VEGF designados con las letras A-D, que al reconocer a sus receptores VEGFR-1, -2, y -3 inducen señales proliferativas y mitogénicas sobre células endoteliales (Figura 1). El VEGF-A es el miembro principal y más estudiado, estimula la proliferación de células endoteliales promoviendo la angiogénesis e incrementa la permeabilidad vascular. Del VEGF-A se conocen nueve isoformas: VEGF-A 110, 121, 145, 165, 206, 189, 183, 162 y 148 (Woolard

et al. 2009) de las cuáles la isoforma VEGF-A₁₆₅ es la más abundante. A diferencia del VEGF-A y -B, el VEGF-C y -D participan principalmente en la formación y mantenimiento de los vasos linfáticos (Dvorak 2005). La familia VEGF juega un papel muy importante en el mantenimiento y balance del proceso angiogénico. La pérdida de dicho balance, ocurre en una serie de patologías como el cáncer, la retinopatía diabética, artritis reumatoide y enfermedades cardiovasculares, entre otras (Hanahan y Folkman 1996). Por estas implicaciones clínicas, el diseño, producción y estudio de factores antiangiogénicos, ha despertado un interés médico considerable (Persano *et al.* 2007).

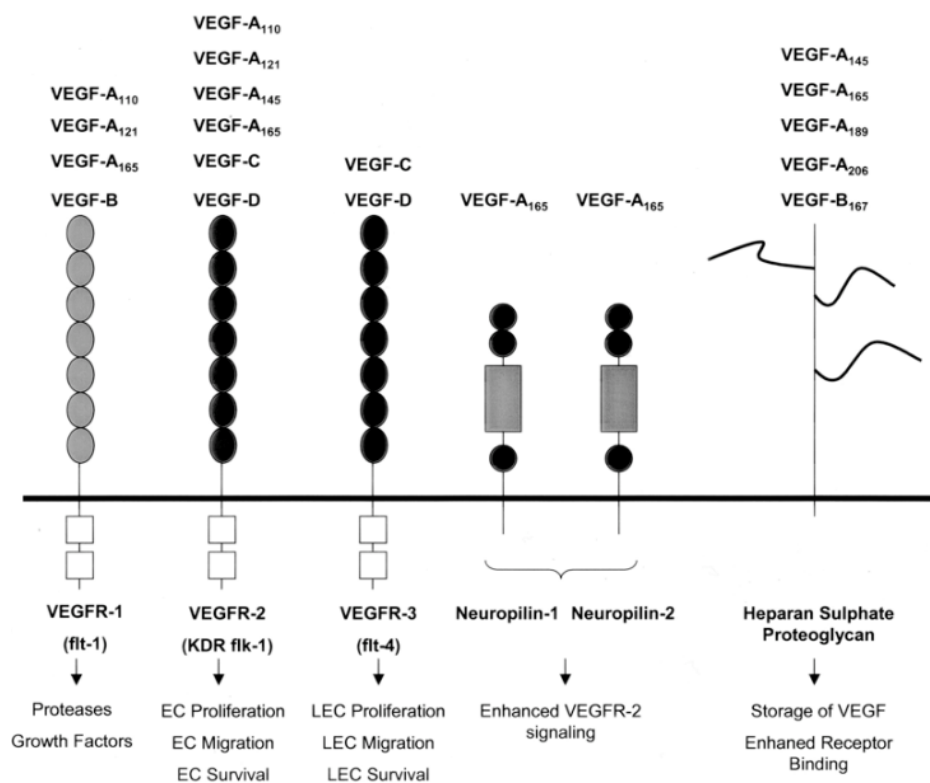


Figura 1. Familia VEGF y sus receptores tirosina cinasa. Se muestran a todos los miembros de la familia VEGF y a sus diferentes isoformas, así como a los receptores a los cuales se unen para ejercer su actividad angiogénica. Los proteoglicanos heparina sulfato no sólo incrementan la unión del VEGF a su receptor, sino que también sirven como almacenamiento de VEGF. Células endoteliales (EC), células endoteliales linfáticas (LEC). Tomado de Hoeben y cols. 2004 (Hoeben *et al.* 2004)

1.2. Terapia antiangiogénica

Cuando en 1972 Judah Folkman describió al proceso angiogénico como un blanco terapéutico en el tratamiento del cáncer (Folkman 1972), comenzó la búsqueda y descubrimiento de diversos péptidos con actividad antiangiogénica capaces de reducir e incluso revertir el crecimiento tumoral y el proceso metastático (Tabla 1). En el microambiente tumoral, las células cancerosas secretan factores de crecimiento para inducir la angiogénesis, así como también inducen a células vecinas a secretar sustancias químicas, como IL-8, VEGF y angiopoietina 1, que también inducen la señalización angiogénica. Este mecanismo se lleva a cabo principalmente para aportar el oxígeno y nutrientes necesarios que soporten un crecimiento tumoral más allá de 1-2 mm³ (Kerbel 2008). El advenimiento y estudio de nuevos péptidos utilizados en el tratamiento antiangiogénico, ha llevado al descubrimiento de una resistencia de la masa tumoral a dicho tratamiento, es decir, cuando se bloquea el efecto mitogénico de un solo factor de crecimiento endotelial, otros factores de crecimiento se producen alternativamente. Uno de los agentes más usados y aprobado por la FDA es el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el VEGF, que ya se ha comprobado el desarrollo de resistencia a este tratamiento en pruebas clínicas (Clark *et al.* 2012). Uno de los mecanismos propuestos y que se ha observado en experimentos *in vivo*, es la producción de otros factores pro-angiogénicos como un mecanismo de evasión al tratamiento anti-VEGF, tal es el caso del FGF básico y ácido (Figura 2) (Casanovas *et al.* 2005).

Dichos mecanismos de resistencia ha llevado a desarrollar diversas combinaciones de agentes antiangiogénicos con agentes quimioterapéuticos, e incluso combinación entre diferentes péptidos inhibidores de la angiogénesis. Éstas combinaciones han mejorado notablemente la respuesta del tumor al tratamiento, tales como el uso de endostatina y doxorubicina (Xu *et al.* 2011), paclitaxel y bevacizumab (Livi *et al.* 2013), vasostatina y ciclofosfamida (Cichon *et al.* 2012), factor plaquetario-4 y vasostatina (Li *et al.* 2007), etc.

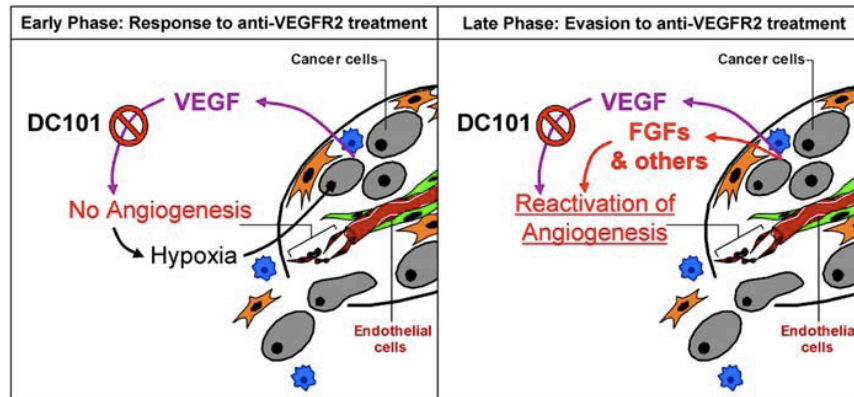


Figura 2. Modelo de resistencia al tratamiento con un anticuerpo dirigido al receptor 2 del VEGF (DC101). Se observa del lado izquierdo la fase temprana del tratamiento en el que la angiogénesis se ve inhibida por medio de tratamiento con DC101, y del lado derecho la fase tardía en donde se producen otros factores angiogénicos como el FGF, llevando a la reactivación de la angiogénesis. La ruta de regulación principal de la angiogénesis se muestra en morado. Tomado de Casanovas y cols. 2005 (Casanovas *et al.* 2005)

A pesar del amplio uso de proteínas y péptidos antiangiogénicos en el tratamiento del cáncer y otras afecciones angiogénico-dependientes, el mecanismo de acción de la mayor parte de los péptidos antiangiogénicos, como la vasostatina y las vaso inhibinas, no se ha elucidado completamente. A pesar de lo anterior, las vaso inhibinas y la vasostatina presentan un alto potencial como futuros agentes terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer.

1.2.1. Vaso inhibinas (Vi): son péptidos que inhiben la proliferación de células endoteliales y angiogénesis (Struman *et al.* 1999; Corbacho *et al.* 2002), y se derivan por proteólisis del extremo amino-terminal de la prolactina humana (hPRL), que por sí misma no presenta capacidad antiangiogénica (Struman *et al.* 1999). Dicha proteólisis se lleva a cabo por enzimas del tipo de la catepsina D (Piwnica *et al.* 2004), metaloproteasas de matriz extracelular (Macotella *et al.* 2006), y por la proteína morfogenética de hueso tipo 1 (BMP-1) (Ge *et al.* 2007). Se sabe que las Vi bloquean las acciones proliferativas y mitogénicas inducidas principalmente por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), pero también por el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y por sustancias

vasoactivas como la Bradicidina (BK) y la acetilcolina (Ach) en células endoteliales (Clapp *et al.* 1993; D'Angelo *et al.* 1999; Stéphanie Thebault *et al.* 2011).

1.2.2. *Vasostatina*: es un péptido antiangiogénico que deriva del extremo amino-terminal de la calreticulina humana (hCALR). La proteólisis de la hCALR por serin proteasas, como la catepsina G y la elastasa de neutrófilos, libera 180 a.a. amino-terminales correspondientes a la vasostatina (Eggleton *et al.* 2000). Estudios subsecuentes han reducido éste dominio a péptidos recombinantes de 60 a.a. (120-180 a.a.), 48 a.a. (133-180 a.a.), y 30 a.a. (135-164 a.a.), que junto con la calreticulina presentan actividad antiproliferativa y antiangiogénica (Pike *et al.* 1999; Li *et al.* 2007; Bee *et al.* 2010; Vazquez Rodriguez *et al.* 2013). Se ha demostrado que la vasostatina, al igual que las vasoinhibinas, inhibe los efectos proliferativos y mitogénicos del VEGF, FGFb y BK (Pike *et al.* 1998; Pike *et al.* 1999; Vazquez Rodriguez *et al.* 2013), además de suprimir la neovascularización y el crecimiento tumoral *in vivo* (Jazowiecka-Rakus *et al.* 2006; Cai *et al.* 2008).

El uso y combinación de éstos agentes antiangiogénicos disminuiría considerablemente el riesgo de resistencia a la terapia anticancerígena debido a que, como se mencionó anteriormente, las vasoinhibinas bloquean preferentemente las acciones del VEGF mientras que la vasostatina bloquea a su vez al FGFb, con lo que se bloquea a las dos principales vías de inducción de la angiogénesis. De forma interesante, una reciente proteína de fusión derivada de estas dos proteínas y producida en nuestro laboratorio, denominada VS_VI, mostró una actividad antiproliferativa significativamente mayor en comparación con las proteínas por separado (Vazquez Rodriguez *et al.* 2013), lo que hace a esta nueva proteína un interesante objeto de estudio para elucidar los posibles mecanismos de acción de nuevos agentes antiangiogénicos.

Para elucidar el mecanismo de acción de las vasoinhibinas y la vasostatina, así como sus efectos biológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha recurrido a la producción recombinante de los mismos en diferentes organismos como

Escherichia coli (Pike *et al.* 1999; Sun *et al.* 2005) y células de insecto (Galfione *et al.* 2003).

1.3. *Escherichia coli* como modelo de expresión

Escherichia coli es una bacteria que ha sido utilizada para producir diversas proteínas recombinantes, debido al conocimiento sobre su fisiología y genética que presenta las siguientes ventajas:

- Disponibilidad de una amplia gama de vectores de expresión y cepas mutantes.
- Rápido crecimiento.
- Medios de cultivo económicos en los que se puede obtener una alta densidad celular.

No obstante, *E. coli* también presenta ciertas desventajas como la formación de cuerpos de inclusión de la proteína recombinante, realiza pocas modificaciones postraduccionales, y el uso ineficiente de codones de genes de eucariontes, principalmente. Sin embargo, la mayoría de éstas desventajas pueden ser fácilmente superadas. Por ejemplo, existen cepas creadas especialmente para expresar genes con alto contenido de codones raros en *E. coli* (Nakamura *et al.* 2000) como la Rosetta gami (DE3) pLysS, la cual contiene un plásmido denominado pLysSRARE que codifica para los ARNt de los codones de más baja frecuencia en *E. coli* (Figura 3).

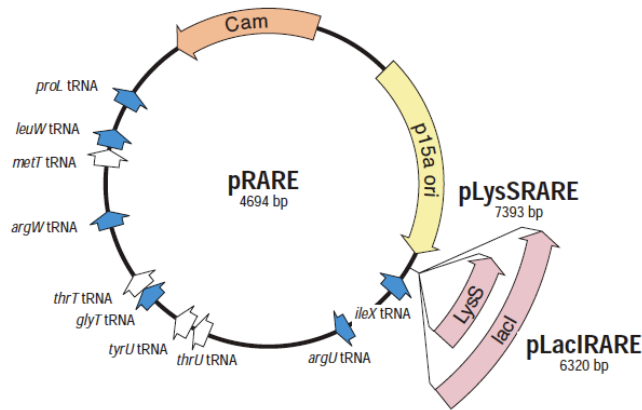


Figura 3. Esquema del plásmido pRARE y sus dos derivados pLysSRARE y pLacIRARE utilizados en la expresión de proteínas heterólogas que contienen en sus genes codones de baja frecuencia en *E. coli*.

Para evitar la formación de cuerpos de inclusión y solubilizar la proteína de interés, se puede llevar a cabo una optimización de la producción al modificar ciertas condiciones de cultivo como la temperatura de inducción (a menor temperatura mayor solubilidad (descrito en Maldonado et al. 2007)), tensión de oxígeno disuelto, pH; etc.

1.4. Optimización de la producción de proteínas recombinantes

Para encontrar las mejores condiciones de cultivo en las que se produce la mayor cantidad de proteína recombinante, sobre todo soluble, usualmente se utilizan diseños experimentales para evaluar el efecto de determinados factores. El uso de un diseño experimental en específico depende en gran medida del número de factores y niveles a analizar. Existen algunos diseños experimentales que por sus características son ampliamente utilizados, por ejemplo:

1.4.1. Diseño Box-Behnken (BB): Es un diseño rotatable tipo factorial 3^k de tres niveles que se utiliza en conjunto con la metodología de superficie de respuesta. También es útil para encontrar los coeficientes en un polinomio de segundo orden.

A diferencia de los diseños factoriales, el diseño Box-Behnken excluye interacciones que son innecesarias resultando en un menor número de experimentos totales en los que se evalúan las interacciones más significativas. Al evaluar 3 factores la representación esquemática del diseño BB puede apreciarse en forma de cubo con puntos centrales y puntos intermedios de las orillas (Figura 4) (Ferreira et al. 2007).

El número de experimentos requeridos para desarrollar un diseño BB, está dado por la fórmula:

$$N = 2k(k-1) + C_0 \quad (1)$$

Donde k es el número de factores a analizar y C_0 el número de puntos centrales.

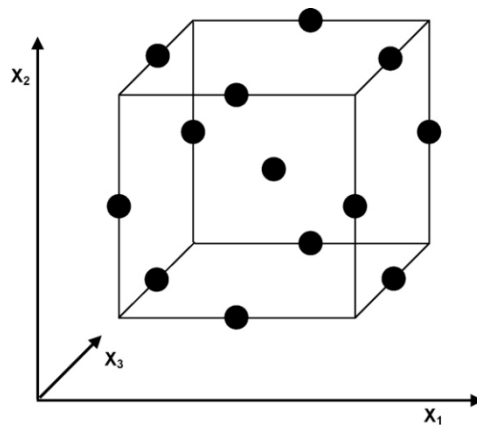


Figura 4. Esquema de cubo del diseño Box-Behnken.

1.4.2 Diseño Compuesto Central (CC): Es un diseño que se construye en base a factoriales de dos niveles, con lo que permite evaluar las interacciones principales de los factores. Además, incluye un conjunto de puntos en los ejes, denominados puntos estrella, que junto con los puntos centrales permiten estimar los términos cuadráticos puros. Estos puntos estrella se encuentran a un α distancia de los puntos centrales, estableciendo nuevos extremos de los valores altos y bajos de todos los factores a evaluar (Figura 5).

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Para elucidar el mecanismo de acción de proteínas y péptidos potenciales en el uso del tratamiento del cáncer y otras enfermedades angiogénico-dependientes, como la vasostatina y su proteína de fusión VS_VI, es necesario obtener una cantidad de proteína suficiente para realizar ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que la optimización de la producción de éstas proteínas recombinantes en biorreactor es una opción conveniente para llegar a nuestro objetivo.

OBJETIVO

Optimizar la producción de la proteína antiangiogénica vasostatina 30 y su proteína de fusión VS_VI en biorreactor mediante diseños experimentales basados en la metodología de superficie de respuesta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales y reactivos

La cepa de *Escherichia coli* BL21-SI inducible por NaCl fue adquirida de GIBCO, (Darmstadt, Ger). Los vectores de clonación y expresión pGEM T-EASY y pET22b fueron comprados de Promega, Madison, Wisconsin, USA y Novagen, respectivamente. Las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* fueron compradas de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. La glucosa, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, MgSO_4 , hidrócloruro de tiamina y Tricina de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 de Fermont, Monterrey, Nuevo León, México; Na_2SO_3 de Mallinckrodt Chemical, Paris, KY; NaCl de J. T. Baker, Ecatepec, Estado de México; NaH_2PO_4 de CTR Scientific, Monterrey, Nuevo León, México; albúmina sérica bovina (BSA) de Research Organics, Cleveland, Ohio, USA; Tris (Hidroximetil) Aminometano de IBI Scientific, Peosta, IA, USA y el extracto de levadura de Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA. El biorreactor de 1.3 L, electrodos, la bioconsola ADI 1035, el biocontrolador ADI 1030, y el software BioXpert 1.3 fueron comprados de Applikon, Foster City, CA, y el recirculador refrigerante de PolyScience, Illinois, USA.

2.2 Construcción de los vectores de expresión

2.2.1. *pGVR-Vs30*: El gen de la vasostatina de 30 a.a. (Vs30) fue amplificado del vector pET12a-Vs diseñado previamente (Vazquez-Rodriguez 2009). Para la amplificación de Vs30 se utilizó el oligo forward 5' catatggacatctgtggcc 3' y el oligo reverso 5' ggatccttagtggtggtggtggtggtgcttgcaacggatgtcc 3', los oligos contienen sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*, respectivamente (subrayados); un codón de paro (negritas) y una cola de histidinas (cursivas).

2.2.2. *pGVR-VS_VI*: El gen de la proteína de fusión VS_VI fue amplificado del vector pET12a-VS_VI también diseñado previamente (Vazquez-Rodriguez 2009). Para la amplificación de VS_VI se utilizó el oligo forward 5' catatggacatctgtggcc 3' y el oligo reverso 5' ggatccttagtggtggtggtggtggtgcttcaatctctacagctttggatagg 3', los

oligos contienen sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*, respectivamente (subrayados); Un codón de paro (negritas) y una cola de histidinas (cursivas).

Los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM T-EASY y luego subclonados en el vector de expresión pET22b (Novagen) en los sitios de restricción descritos previamente en las secciones 2.1.1 y 2.1.2. Posteriormente se procedió a escindir el gen *lacI* de las construcciones pET22b-Vs30 y pET22b-VS_VI con las enzimas *EcoRV* y *BglII*, seguido de una reacción de polimerización con klenow y una reacción de ligación para recircular el plásmido por medio de la T4 ligasa. Se decidió escindir el gen *lacI* de las construcciones para evitar el uso de IPTG, debido a que las proteínas recombinantes se producirán en una cepa inducible por NaCl.

Las construcciones resultantes, designadas como pGVR-Vs30 y pGVR-VS_VI, fueron confirmadas por secuenciación (MacLab, San Francisco CA).

2.3 Cepas utilizadas

Para propagar las construcciones obtenidas en cada paso, se utilizaron cepas como XI1 blue y TOP10. Por otro lado, la cepa de *E. coli* BL21-SI, se utilizó para producir las proteínas recombinantes ya que al tener en su genoma el gen de la polimerasa del fago T7 bajo el promotor *proU* lo hace un sistema de expresión barato al utilizar NaCl como inductor. Debido a que, para construir el gen de la proteína de fusión VS_VI se amplificó la parte de la vasoinhibina de un cDNA de la prolactina humana que contiene en su secuencia codones raros para *E. coli*, la cepa BL21-SI transformada con el plásmido pGVR-VS_VI fue previamente transformada con el plásmido pLysSRARE para al final obtener la cepa BL21-SI/pLysSRARE/pGVR-VS_VI. Por otro lado, la cepa de BL21-SI transformada con el plásmido pGVR-Vs30 (BL21-SI/pGVR-Vs30), no fue necesario transformarla previamente con el plásmido pLysSRARE, ya que el gen de Vs30 fue amplificado de un gen sintético que no cuenta en su secuencia con codones raros para *E. coli*.

2.4 Diseños experimentales

Para la optimización de Vs30 se utilizó el diseño Box-Behnken (BB) en el que se evaluaron tres factores a tres niveles cada uno (1, 0, -1). Los factores evaluados fueron: pH, Tensión de oxígeno disuelto (TOD) y temperatura de inducción (Tabla 2); con esta combinación de factores más los tres puntos centrales necesarios para realizar el análisis estadístico, de acuerdo con la ecuación 1, el número de experimentos a realizar en este diseño es de 15 (Tabla 3).

Por otro lado, para optimizar la producción de la proteína de fusión VS_VI se utilizó el diseño compuesto central (CC) en el que se evaluaron dos factores a tres niveles cada uno, mas dos puntos estrella para cada factor (α , 1, 0, -1, $-\alpha$). Los factores evaluados fueron: pH y temperatura de post inducción (Tabla 2); de acuerdo a la ecuación 2, el número de experimentos necesarios para evaluar el efecto de los factores en la producción de VS_VI es de 11 (Tabla 6).

Tabla 2. Código de los niveles evaluados en cada diseño experimental

Factores	Diseño Box-Behnken			Diseño compuesto central				
	1	0	-1	α	1	0	-1	$-\alpha$
pH (-)	7	6	5	8.4	8	7	6	5.5
TOD (%)	20	10.5	1	-	-	-	-	-
Temperatura (°C)	37	28.5	20	40.5	37	28.5	20	16.5

2.5 Cultivos en biorreactor

Las cepas de *E. coli* BL21-SI/pGVR-Vs30 y BL21-SI/pLysSRARE/pGVR-VS_VI fueron crecidas de manera rutinaria en placas de medio sólido LBON (Luria-Bertani libre de sales) suplementado con ampicilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con cloranfenicol 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Las cepas se crecieron en un preinóculo de 12 horas a 37°C y 200 rpm en 100 mL de medio mínimo BSG (Balderas Hernandez *et al.* 2008) (Anexo 7.1.1), suplementado con tiamina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los antibióticos de selección correspondientes y 5 g/L de extracto de

levadura.

El preinóculo fue centrifugado y resuspendido en medio BSG para eliminar el extracto de levadura residual. Después de este procedimiento, el preinóculo fue inoculado en un biorreactor de 1.3 L con 1 L de medio BSG suplementado con 1 µg/mL de tiamina, 5 µM de elementos traza (Anexo 7.1.2) (Rosales-Colunga Luis Manuel *et al.* 2010) y los antibióticos de selección correspondientes. Los cultivos comenzaron a una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0.2 en condiciones controladas de pH 7.0, TOD 20% y 37°C. Los cultivos fueron inducidos con NaCl 0.3 M al llegar a una OD₆₀₀ de 0.5, a partir de este punto las condiciones de cultivo se ajustaron de acuerdo al diseño experimental. Se tomaron muestras de los cultivos cada 4 h, se centrifugaron y resuspendieron en buffer PBS 1X (Anexo 7.1.3). Al final de cada fermentación, se obtuvieron gráficas de cinéticas de crecimiento, la absorbancia medida se convirtió a biomasa mediante una curva de calibración de peso seco (Anexo 7.1.4).

Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE en geles de tris-glicina para analizar producción de VS_VI y geles de tris-tricina para Vs30. También se confirmó la identidad de las proteínas recombinantes por Western Blot.

2.6 Métodos analíticos

2.6.1. Reacción de polimerización con Klenow

Para escindir el gen *lacI* de las construcciones pET22b-Vs30 y pET22b-VS_VI, se realizó una reacción de restricción con las enzimas *EcoRV* y *Bg/II*. La enzima *Bg/II* corta el ADN de tal manera que deja extremos cohesivos, no así *EcoRV* que deja extremos romos (Figura 6). Posteriormente, se llevó a cabo una reacción de polimerización del extremo cohesivo con el fragmento Klenow (Invitrogen) mediante el siguiente protocolo:

- Diluir el fragmento Klenow a una concentración de 0.5 U/µL con el buffer de dilución klenow (proporcionado en el kit).
- En un tubo de microcentrifuga en hielo se prepara la siguiente reacción
 - 10X React 2 buffer 3 µL

- 0.5 mM dATP 1 μ L
 - 0.5 mM dCTP 1 μ L
 - 0.5 mM dGTP 1 μ L
 - 0.5 mM dTTP 1 μ L
 - ADN plasmídico 0.5 - 1 μ g
 - Klenow 1 μ L
 - Agua destilada c.b.p. 30 μ L
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 - 15 minutos.
 - Cargar la mezcla en gel de agarosa para la purificación del ADN.
 - El ADN plasmídico purificado se recirculariza mediante una reacción de ligación con T4 ligasa y se transforma en células electrocompetentes de *E. coli*.

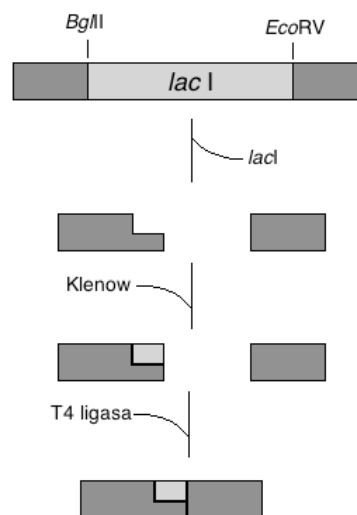


Figura 6. Deleción del gen *lac I* mediante restricción y polimerización del fragmento Klenow.

2.6.2. Cultivos en biorreactor

La densidad óptica de los cultivos fue medida en un espectrofotómetro UV-visible Cary 50 Bio (Palo Alto CA). La tensión de oxígeno disuelto (TOD) y el pH fueron monitoreados mediante electrodos esterilizables conectados a la bioconsola ADI 1035 y controlados por el biocontrolador ADI 1030, mientras que, la temperatura fue controlada con un recirculador refrigerante. El electrodo de oxígeno fue calibrado al 100% con aire comprimido a presión atmosférica, y al 0% con Na_2SO_3

2%. Los datos de cada fermentación fueron obtenidos y graficados mediante el software BioXpert 1.3.

2.6.3. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

Para obtener la curva de calibración (Anexo 7.2), así como cuantificar cada una de las muestras, se tomaron 200 μ L de cada uno de los estándares y/o muestras y se añadió 1mL del reactivo D, las muestras se dejaron reposar por 10 minutos y se agregó 100 μ L del reactivo de Folin diluido 1:2 en agua destilada. Se dejó reposar durante 30 minutos para, finalmente, tomar lectura de absorbancia a 590nm en un espectrofotómetro UV-Visible, para la curva de calibración el procedimiento se realiza por duplicado. La cuantificación de proteínas totales de las muestras problema se obtiene extrapolando los valores en la curva de calibración.

2.6.4. Análisis de proteínas por SDS-PAGE

Después de cuantificar las muestras por la técnica de Lowry, se analizaron en geles de poliacrilamida. Para las muestras de biorreactor provenientes de la cepa BL21-SI/pLysSRARE/pGVR-VS_VI se utilizaron geles de gradiente 4-20% en buffer de tris-glicina (Anexo 7.3.1), se cargaron 40 μ g de muestra por pozo y el gel se corrió a 100 V durante 3.5 horas.

Para las muestras de biorreactor provenientes de la cepa BL21-SI/pGVR-Vs30 se utilizaron geles discontinuos en buffer de tris-tricina (Anexo 7.3.2), se cargaron 40 μ g de muestra por pozo y el gel se corrió a 80 V durante 4 horas sin dejar que salga el frente de corrida.

Se cuantificó la producción de proteína recombinante por densitometría utilizando una curva de calibración a base de albúmina sérica bovina (BSA) mediante el software Quantity One™ v4.5 de BioRad (Anexo 7.3.3).

2.6.5. Western Blot

Las proteínas recombinantes Vs30 y VS_VI fueron confirmadas por Western Blot (WB) mediante el protocolo descrito anteriormente en (Marino-Marmolejo *et al.* 2009):

1.- Después de correr el gel de poliacrilamida con las muestras, éste se incuba durante 20 minutos en buffer de transferencia Towbin 1X con metanol al 20% de concentración final (Anexo 7.4).

2.- Por separado, seis recuadros de papel filtro mayor al tamaño del gel y una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (Hybond™, Amersham Biosciences) también se incubaron en buffer de transferencia Towbin 1X con 20% metanol durante 15 min.

Nota: para realizar WB de la proteína Vs30 (4 kDa) se emplea una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.2 μm (Immobilon-P^{SQ}, Millipore) pretratada de la siguiente manera: sumergir la membrana en metanol por 1-3 segundos, pasar la membrana a agua destilada por 1-2 minutos para eliminar el metanol, equilibrar la membrana en el buffer de transferencia Towbin por 2-3 minutos para eliminar el agua, a partir de este paso la membrana está lista para usarse.

3.- Los filtros, la membrana y el gel de poliacrilamida se acomodan en la cámara de transferencia (Semi-dry blot, Bio-Rad) de acuerdo a la figura 6.

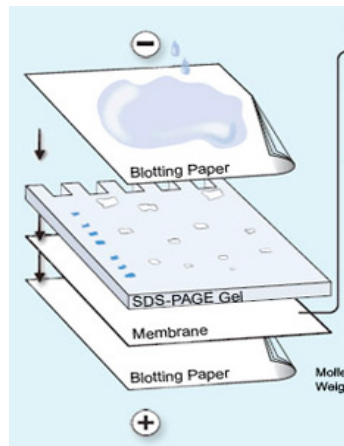


Figura 7. Esquema de la transferencia de proteínas en cámara semiseca.

4.- Al colocar los filtros, la membrana y el gel, se eliminan burbujas en cada paso con un tubo de ensayo.

5.- Colocar la placa del cátodo. Presionar sin dañar el apilado.

6.- Cerrar la tapa y conectar a la fuente de poder.

- 7.- Realizar la transferencia a 10 V durante 20 minutos.
- 8.- Al finalizar la transferencia, el gel se transfiere a un recipiente con azul de Coomasie (Anexo 7.4) para confirmar la transferencia total de las proteínas.
- 9.- La membrana se tiñe con rojo de Poceau (Anexo 7.4) por unos segundos y se lava con agua destilada hasta revelar las bandas pertenecientes a las proteínas transferidas. Con unas tijeras se corta la porción de membrana en dónde se encuentra el marcador de peso molecular.
- 10.- Bloquear la membrana por 2 h a temperatura ambiente en 10 mL de leche al 5% disuelta en PBS 1X.
- 11.- Lavar la membrana con PBS 1X durante 15 min. Realizar por triplicado.
- 12.- Incubar toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de ratón anti-His tag diluído 1:4000 en leche 0.5% en PBS 1X.
- 13.- Repetir el paso 11.
- 14.- Incubar por 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina diluído 1:2000 en leche 0.5% en PBS 1X.
- 15.- Repetir el paso 11.
- 16.- Lavar la membrana 15 min con el buffer AP (Anexo 7.4)
- 17.- Descartar la solución anterior.
- 18.- Añadir a la membrana el buffer de revelado (Buffer AP + 66 μ L de NBT y 33 μ L de BCIP) y dejar reaccionar hasta que aparezcan las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes.
- 19.- Detener la reacción lavando la membrana con agua destilada.

2.6.6. Purificación por cromatografía de afinidad

Las proteínas recombinantes Vs30 y VS_VI fueron purificadas por cromatografía de afinidad mediante columnas con agarosa acoplada a níquel. Se utilizó el sistema de purificación Ni-NTA de Invitrogen. El protocolo es el siguiente:

2.6.6.1. Preparación de la columna:

- 1.- Se añade 1.5 ml de agarosa Ni-NTA por cada 10 mL de volumen de columna.

- 2.- Dejar asentar la resina y aspirar el sobrenadante.
- 3.- Lavar la resina con 6 mL de agua destilada por inversion, repetir el paso 2.
- 4.- Añadir 6 mL del buffer de unión nativa 1X (Anexo 7.5) a la columna y lavar la resina por inversion. Repetir el paso 2.
- 5.- Repetir el paso 4.

2.6.6.2. Preparación de la muestra:

- 1.- El cultivo proveniente de biorreactor se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
- 2.- El pellet fue resuspendido en 50 mL de buffer de unión nativa 1X (5 mL por cada 100 mL de cultivo).
- 3.- La muestra se sonicó a máxima amplitud durante 30 min en pulsos de 9.9 s.
- 4.- La muestra se centrifugó bajo las mismas condiciones del punto 1 y el sobrenadante ó fracción soluble (FS) se separó del pellet ó fracción insoluble (FI) y se conservó en hielo.

2.6.6.3. Purificación en columnas de níquel

- 1.- Teniendo la muestra y la columna preparadas, se añade 8 mL de FS por cada 10 mL de volumen de columna.
- 2.- Dejar en agitación la columna durante 30-60 min.
- 3.- Dejar asentar la resina y aspirar el sobrenadante.
- 4.- Lavar con 8 mL de buffer de lavado nativo con 5 mM de imidazol (Anexo 7.5).
- 5.- Repetir el paso 3 y almacenar el sobrenadante a 4°C para su posterior análisis por SDS-PAGE.
- 6.- Repetir el paso 4 y 5 tres veces más incrementando la concentración de imidazol a 20, 50 y 100 mM cada vez.
- 7.- Eluir la proteína recombinante con buffer de elución nativa (Anexo 7.5) y colectar para su posterior análisis por SDS-PAGE

2.7 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados de acuerdo a la metodología de superficie de respuesta (RSM). El análisis de varianza (ANOVA), la prueba T de student, y las gráficas de superficie de respuesta fueron obtenidos utilizando el software Statgraphics Plus v 5.0 (Statistical Graphics Co). La significancia del efecto de cada factor así como sus interacciones fue determinada con la prueba T de student, en donde una *P*-value menor de 0.05 es significativa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Construcción de los vectores de expresión pGVR-Vs30 y pGVR-VS_VI

Los genes que codifican para Vs30 y VS_VI se amplificaron como se describió previamente en la sección 2.2. Del producto de PCR se obtuvo una banda de 120 pb correspondiente al gen de la Vs30 y una banda de 495 pb correspondientes al gen de VS_VI (Figura 7A). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM T-EASY y confirmados por restricción con las enzimas *Nde*I y *Bam*HI para liberación de insertos (Figura 7B).

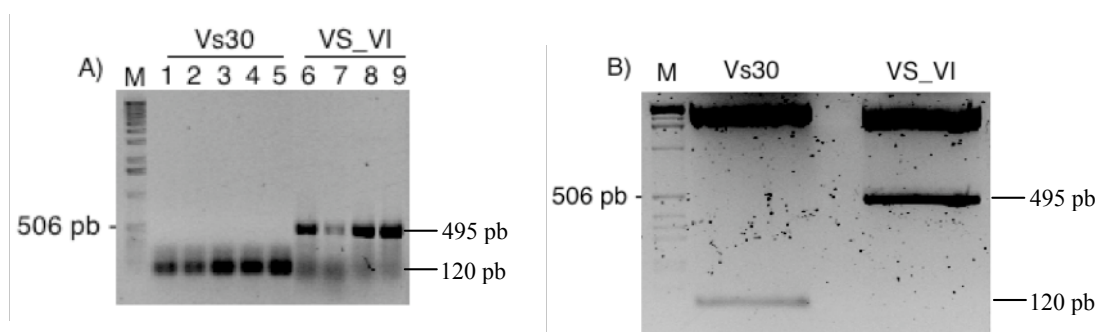


Figura 8. PCR y análisis por restricción. PCR de los fragmentos de ADN de Vs30 y VS_VI (A) y su confirmación por restricción enzimática del vector de clonación pGEM T-EASY (B). M= marcador de tamaño

Los fragmentos liberados del vector de clonación fueron purificados de gel mediante el *kit* QIAquick (QIAGEN), lo mismo se realizó para el vector de expresión pET22b (Figura 8A). Previo a su purificación de gel, el vector pET22b se digirió con las enzimas *Nde*I, *Bam*HI y *Nco*I para descartar colonias falsas positivas debido a religaciones. Posteriormente, mediante una reacción de ligación con la enzima T4 ligasa (Promega), los fragmentos de Vs30 y VS_VI purificados fueron ligados al vector pET22b en los sitios *Nde*I y *Bam*HI. Las construcciones obtenidas, pET22b-Vs30 y pET22b-VS_VI, fueron confirmadas por restricción con las enzimas *Pst*I y *Bgl*II generando un fragmento de 3,961 pb y otro de 1,532 pb el cual varía de acuerdo al tamaño del inserto (Figura 8B y C).

Las construcciones finales, denominadas pGVR-Vs30 y pGVR-VS_VI, fueron confirmadas por secuenciación (MacLab, San Francisco CA) y transformadas por electroporación en *E. coli* BL21-SI y BL21-SI/pLysSRARE, respectivamente.

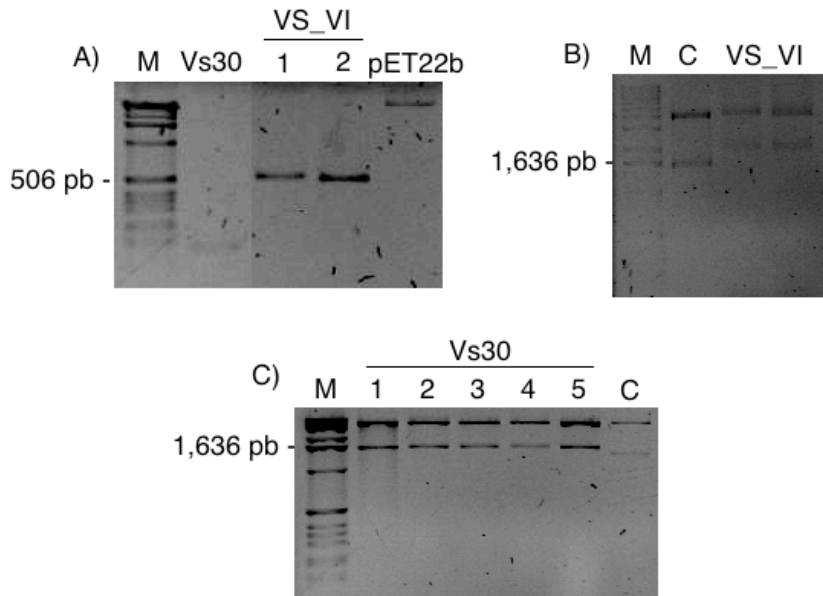


Figura 9. Obtención de las construcciones pGVR-Vs30 y pGVR-VS_VI. Fragmentos Vs30, VS_VI y vector de expresión pET22b purificados (A). Comprobación de la presencia de inserto VS_VI (B) y Vs30 (C) mediante reacción de restricción. M= marcador de tamaño, C= control de pET22b sin inserto.

3.2. Optimización de la producción de Vs30 y VS_VI recombinantes

Para encontrar las condiciones de cultivo que induzcan una mayor expresión y por lo tanto una mayor producción de la proteína recombinante, generalmente se realiza una optimización de la producción basada en diseños experimentales que sean aplicables de usar la metodología de superficie de respuesta (RSM) (Maldonado *et al.* 2007; Cao *et al.* 2013). La RSM es un conjunto de pruebas matemáticas y estadísticas útiles para analizar y modelar problemas en los que una variable de interés es influenciada por varios factores, y cuyo objetivo es optimizar ésta respuesta (Myers R.H. 1995).

Estudios previos han demostrado que modificando las condiciones de cultivo es posible aumentar la producción de las proteínas recombinantes así como su solubilidad (Sun *et al.* 2005; Sun *et al.* 2005; Maldonado *et al.* 2007).

3.2.1. Producción de Vs30 recombinante

Para optimizar la producción y solubilidad de la proteína recombinante Vs30 se utilizó un diseño experimental basado en el diseño Box-Behnken que previamente se demostró su eficacia en optimizaciones anteriores en el laboratorio (Maldonado *et al.* 2007).

En este diseño se evaluó el efecto de tres factores (variables independientes) sobre la producción total y la solubilidad de Vs30 (variables dependientes). De acuerdo a la sección 2.4, los 15 experimentos realizados y los datos de producción total y soluble de Vs30 recombinante, observados y predichos, para cada experimento se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental Box-Behnken. Producción total y soluble de Vs30 recombinante a diferentes condiciones de cultivo.

Experimento #	pH (-)	TOD (%)	Ti (°C)	Observado		Predicho	
				Vs30 total (mg/L)	Vs30 soluble (mg/L)	Vs30 total (mg/L)	Vs30 soluble (mg/L)
1	0	1	1	15	10	18.35	14.85
2	-1	0	-1	0.55	0	0	0
3	-1	1	0	9.2	5	12.55	5
4	0	0	0	15.4	3	15.46	3.35
5	0	0	0	16	3.6	15.46	3.35
6	1	0	-1	24.2	22	30.09	26.85
7	1	0	1	15	13	15.46	13
8	-1	-1	0	5	2.4	10.89	7.25
9	0	-1	1	0	0	0	0
10	0	1	-1	10	9	10	9
11	1	1	0	68.8	61.5	62.90	56.65
12	0	-1	-1	3	1	0.45	0
13	-1	0	1	1.08	1	0	0
14	1	-1	0	20	11.12	16.64	11.1
15	0	0	0	15	3.46	17.54	3.35

En la figura 9 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa BL21-SI/pGVR-Vs30 del experimento 11, el crecimiento celular se monitoreó hasta llegar a su fase estacionaria y se tomaron muestras del cultivo cada 4 horas.

Las muestras tomadas de cada experimento se analizaron por SDS-PAGE (Figura 10A), la proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad y se confirmó por Western Blot (Figura 10B y C).

Como se muestra en la tabla 3, el experimento en el que se produce la mayor cantidad de proteína total y soluble es el número 11 donde se obtuvo 68.8 mg/L de Vs30 total y 61.5 mg/L de Vs30 soluble, empleando condiciones de pH 7, TOD 20% y una temperatura de post inducción (Ti) de 28.5 °C.

De acuerdo al análisis de varianza, los factores que afectaron significativamente la producción total de la proteína recombinante Vs30 (rVs30) fueron: *A*, *B*, *AB* y *C*² (Tabla 4). Para estimar las mejores condiciones de producción de rVs30, los resultados obtenidos fueron ajustados a una ecuación de segundo orden, mediante mínimos cuadrados,; dicha ecuación está representada por gráficas de superficie de repuesta (Figura 10).

La ecuación de segundo orden que se ajustó a los datos obtenidos es la siguiente:

$$(3) \quad rVs30 \text{ total} = 154.843 - 102.344A - 8.54261B + 11.9006C + 9.34979A^2 + 1.17368AB - 0.286176AC + 0.010344B^2 + 0.0892724BC - 0.2022C^2$$

Donde los factores *A*, *B* y *C* se definen como pH, TOD (%) y Ti (°C), respectivamente. El modelo se ajustó con una $R^2 = 94.664\%$, un error estándar de 7.031 y un error absoluto de 3.084. Lo anterior significa que un 94.664% de los datos observados están bien representados en el modelo matemático. De acuerdo al modelo, las mejores condiciones para la producción de rVs30 total son: pH 7, TOD 20% y 28.8°C de temperatura de inducción.

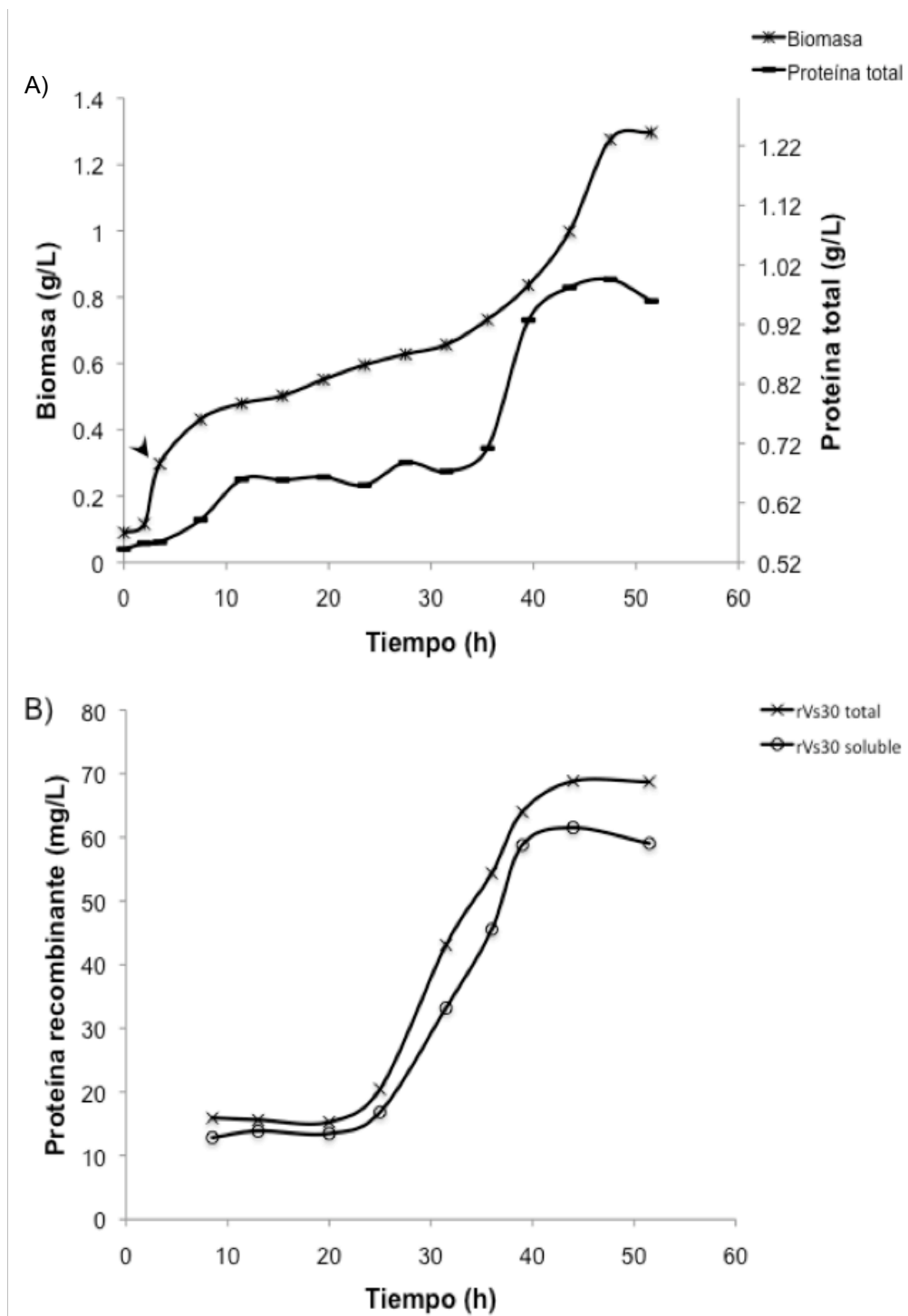


Figura 10. Cinética de crecimiento de la cepa BL21-SI/pGVR-Vs30. Curva de crecimiento y proteína total del experimento número 11 del diseño experimental (A), se muestra también la cinética de producción de rVs30 total y soluble (B). La flecha indica el momento de la inducción.

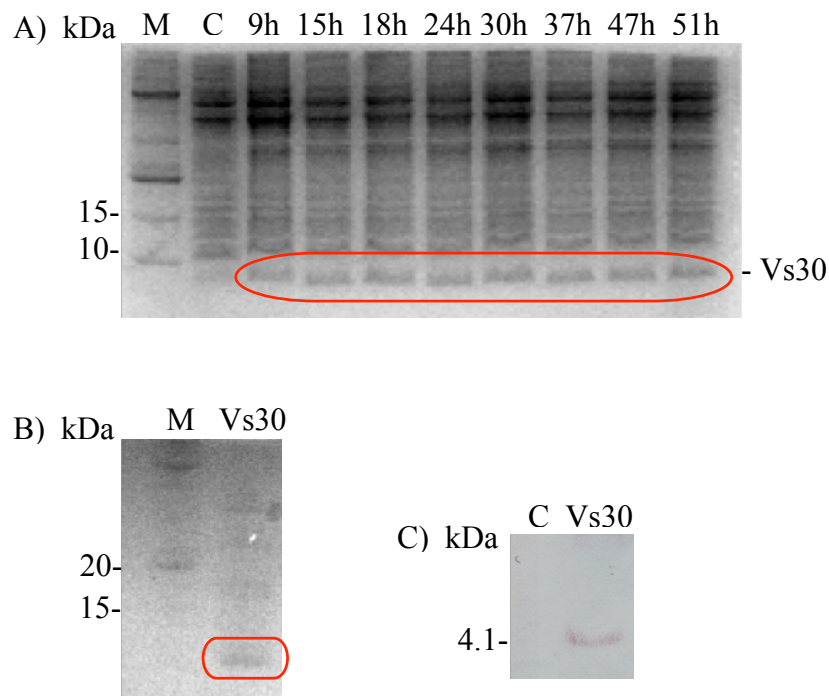


Figura 11. Producción de la proteína Vs30 recombinante en biorreactor. Análisis por SDS-PAGE de las muestras tomadas del experimento número 11 (A). purificación de la proteína (B) y confirmación por Western Blot (C). M= marcador de peso molecular, C= cepa control transformada con el plásmido pET22b e inducida con NaCl, h= tiempo en horas

Por otra parte, de acuerdo al análisis de varianza, los factores que afectaron significativamente la solubilidad de la proteína recombinante Vs30 (rVs30 soluble) fueron: *A*, *B* y *AB* (Tabla 5). Para estimar las mejores condiciones en las que se obtiene mayor cantidad de rVs30 soluble, de igual manera que para rVs30 total, los resultados obtenidos fueron ajustados a una ecuación de segundo orden, mediante mínimos cuadrados; dicha ecuación está representada por gráficas de superficie de repuesta (Figura 10).

La ecuación de segundo orden que se ajustó a los datos obtenidos para rVs30 soluble es la siguiente:

$$(4) \quad rVs30 \text{ soluble} = 203.8 - 110.639A - 9.32167B + 9.49302C + 10.7983A^2 + 1.25789AB - 0.641176AC + 0.0648015B^2 + 0.0544892BC - 0.112134C^2$$

Donde los factores *A*, *B* y *C* se definen como se mencionó previamente. El modelo fue ajustado con una $R^2 = 95.5347\%$, un error estándar de 6.864 y un error absoluto de 2.292. Lo anterior demuestra una representación del 95.53% entre los datos observados y el modelo matemático, lo que indica un buen ajuste. De acuerdo a la ecuación 4, las mejores condiciones para mejorar la solubilidad de rVs30 son: pH 7, TOD 20% y 27.18°C como temperatura de inducción.

Tabla 4. Análisis de varianza para la producción total de rVs30.

Factor^a	Suma de cuadrados	Gl^b	Media cuadrática	F-ratio^c	P-value^d
A	1572.76	1	1572.76	31.81	0.0049
B	765.362	1	765.362	15.48	0.0170
C	63.0438	1	63.0438	1.28	0.3219
AA	262.256	1	262.256	5.31	0.0826
AB	497.29	1	497.29	10.06	0.0338
AC	23.6682	1	23.6682	0.48	0.5270
BB	2.6145	1	2.6145	0.05	0.8294
BC	103.932	1	103.932	2.10	0.2207
CC	640.265	1	640.265	12.95	0.0228
Error total	197.741	4	49.4353		
Total (corr.)	3705.61	13			

^a A= pH, B= TOD, C= Temperatura de post inducción
^b Grados libertad
^c Prueba de Fisher
^d Valor de probabilidad de distribución, los factores y sus interacciones con una *p-value* < 0.05 son estadísticamente significativos

Tabla 5. Análisis de varianza para rVs30 soluble

Factor ^a	Suma de cuadrados	GI ^b	Media cuadrática	F-ratio ^c	P-value ^d
A	924.075	1	924.075	19.61	0.0214
B	562.467	1	562.467	11.94	0.0408
C	5.80167	1	5.80167	0.12	0.7488
AA	223.88	1	223.88	4.75	0.1174
AB	571.21	1	571.21	12.12	0.0400
AC	50.9186	1	50.9186	1.08	0.3749
BB	65.6698	1	65.6698	1.39	0.3228
BC	33.1886	1	33.1886	0.70	0.4629
CC	185.328	1	185.328	3.93	0.1416
Error total	141.332	3	47.1107		
Total (corr.)	3165.11	12			

^aA= pH, B= TOD, C= Temperatura de post inducción
^bGrados libertad
^cPrueba de Fisher
^dValor de probabilidad de distribución, los factores y sus interacciones con una *p-value* < 0.05 son estadísticamente significativos.

Con base en los resultados obtenidos, la producción de rVs30 así como su solubilidad dependen tanto del pH, TOD y la interacción entre estos dos factores. Sin embargo, la solubilidad de la rVs30 es independiente de la temperatura, lo que puede deberse a que la proteína es muy pequeña (30 a.a.), además, de que su estructura conformacional es muy simple (sólo láminas beta). Cabe mencionar que con el uso del diseño Box-Behnken para la optimización de rVs30 no se lograron encontrar niveles de pH y TOD óptimos para su producción.

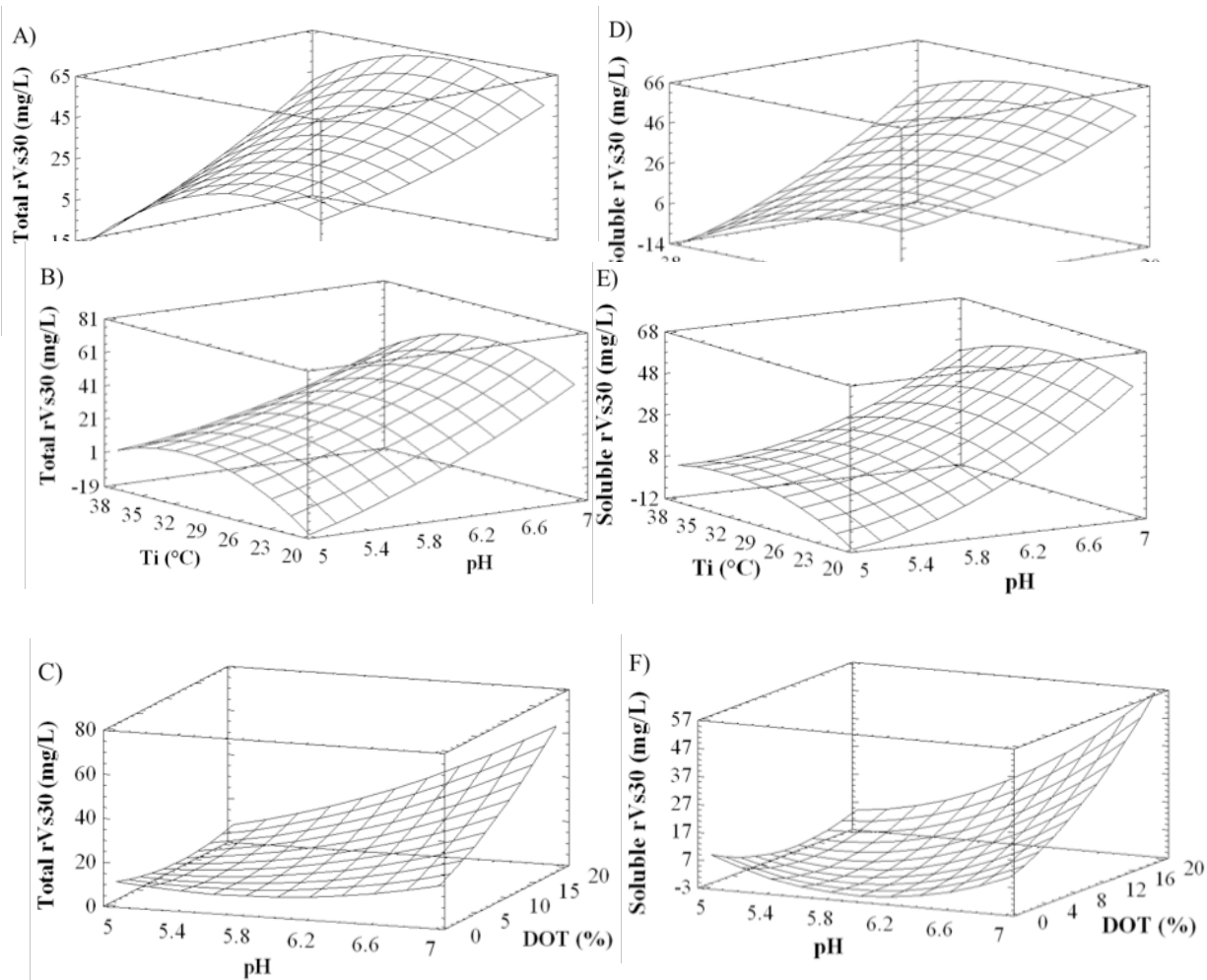


Figura 12. Gráficas de superficie de respuesta del modelo ajustado para producción total (A-C) y soluble (D-F) de rVs30. pH ajustado a 7.0 (A, D), TOD ajustado a 20% (B, E), y temperatura de inducción (Ti) ajustada a 28.5 °C (C, F).

Sun y cols. 2005 (Sun *et al.* 2005) produjeron vasostatina 120-180 a.a. recombinante fusionada a la glutatión s-transferasa (GST), denominada como GST-VAS, mediante el vector de expresión pALEX y coexpresada con las chaperonas moleculares GroEL/ES y TF en tubos utilizando medio LB. Evaluaron dos temperaturas de expresión, 37 y 28°C. A 28 °C obtuvieron 15 mg/L de GST-VAS soluble en el sobrenadante de *E. coli* y 7.2 mg/L de VAS purificada. Posteriormente, el mismo grupo de investigación incrementó la producción de VAS al producir la proteína fusionada a un tag de histidinas (His-VAS) mediante el

vector de expresión pET28a y coexpresada con las mismas chaperonas moleculares anteriormente descritas y las mismas condiciones de cultivo (Sun *et al.* 2005). En esta ocasión obtuvieron 34.5 mg/L de His-VAS en la fracción soluble de *E. coli* en cultivos inducidos a 28°C, y finalmente obtuvieron 21 mg/L de VAS purificada.

En este trabajo se obtuvieron 61.5 mg/L de Vs30 recombinante soluble, lo que indica una mejora de la producción en 1.78 veces más que la obtenida por Sun y cols. en el 2005. Además, cabe resaltar que la producción de rVs30 soluble obtenida en este trabajo, se realizó sin la coexpresión de chaperonas moleculares y que es el primer estudio en producir rVs30 en biorreactor empleando condiciones de cultivo controladas basadas en un diseño experimental tipo Box-Behnken.

3.2.2. Producción de VS_VI recombinante

Debido a que en la producción de rVs30 no se encontraron los valores óptimos de pH y de TOD, para optimizar la producción y solubilidad de la proteína de fusión recombinante VS_VI (rVS_VI) se utilizó un diseño experimental basado en el diseño compuesto central (CC) con puntos estrella para evaluar el efecto de los factores fuera del diseño, y de esta manera encontrar los valores óptimos. En este diseño se evaluó el efecto de dos factores (variables independientes) sobre la producción total y la solubilidad de VS_VI (variables dependientes). En este diseño experimental se ajustó la TOD a 20% para todos los experimentos ya que se ha visto que la tasa de crecimiento, generación de biomasa y estabilidad plasmídica no varía a partir del 10% de TOD (Li *et al.* 1992). De acuerdo a la sección 2.4, los 11 experimentos realizados y los datos de producción total y soluble de VS_VI recombinante, observados y predichos, para cada experimento se muestran en la tabla 6.

En la figura 12 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa BL21-SI/pLysSRARE/pGVR-VS_VI del experimento 1, el crecimiento celular se

monitoreó hasta llegar a su fase estacionaria y se tomaron muestras del cultivo cada 4 horas.

Las muestras tomadas de cada experimento se analizaron por SDS-PAGE (Figura 13A), la proteína recombinante se purificó por cromatografía de afinidad y se confirmó por Western Blot (Figura 13B y C).

En la tabla 6 se observa que el experimento en el que se produce la mayor cantidad de proteína total y soluble es el número 1 donde se obtuvo 21.3 mg/L de rVS_VI total y 17.5 mg/L de VS_VI soluble, empleando condiciones de pH 7 y una temperatura de post inducción de 28.5 °C.

Tabla 6. Diseño Compuesto Central. Producción total y soluble de VS_VI recombinante a condiciones controladas de cultivo.

Experimento #	pH (-)	Ti (°C)	Observado		Predicho	
			VS_VI total (mg/L)	VS_VI soluble (mg/L)	VS_VI total (mg/L)	VS_VI soluble (mg/L)
1	0	0	21.3	17.5	17.88	15.31
2	0	0	14.2	11.5	17.88	15.31
3	0	0	18	17.1	17.88	15.31
4	1	-1	7.19	3.8	7.85	4.74
5	1	1	8	3.1	10.52	4.59
6	-1	1	7	3	7.47	1.58
7	- α	0	4.02	3	4.81	4.75
8	0	α	14.1	8	12.2	6.25
9	α	0	8.1	4.5	6.02	3.36
10	0	- α	12.5	7.2	13.24	6.22
11	-1	-1	13	3.35	11.61	4.56

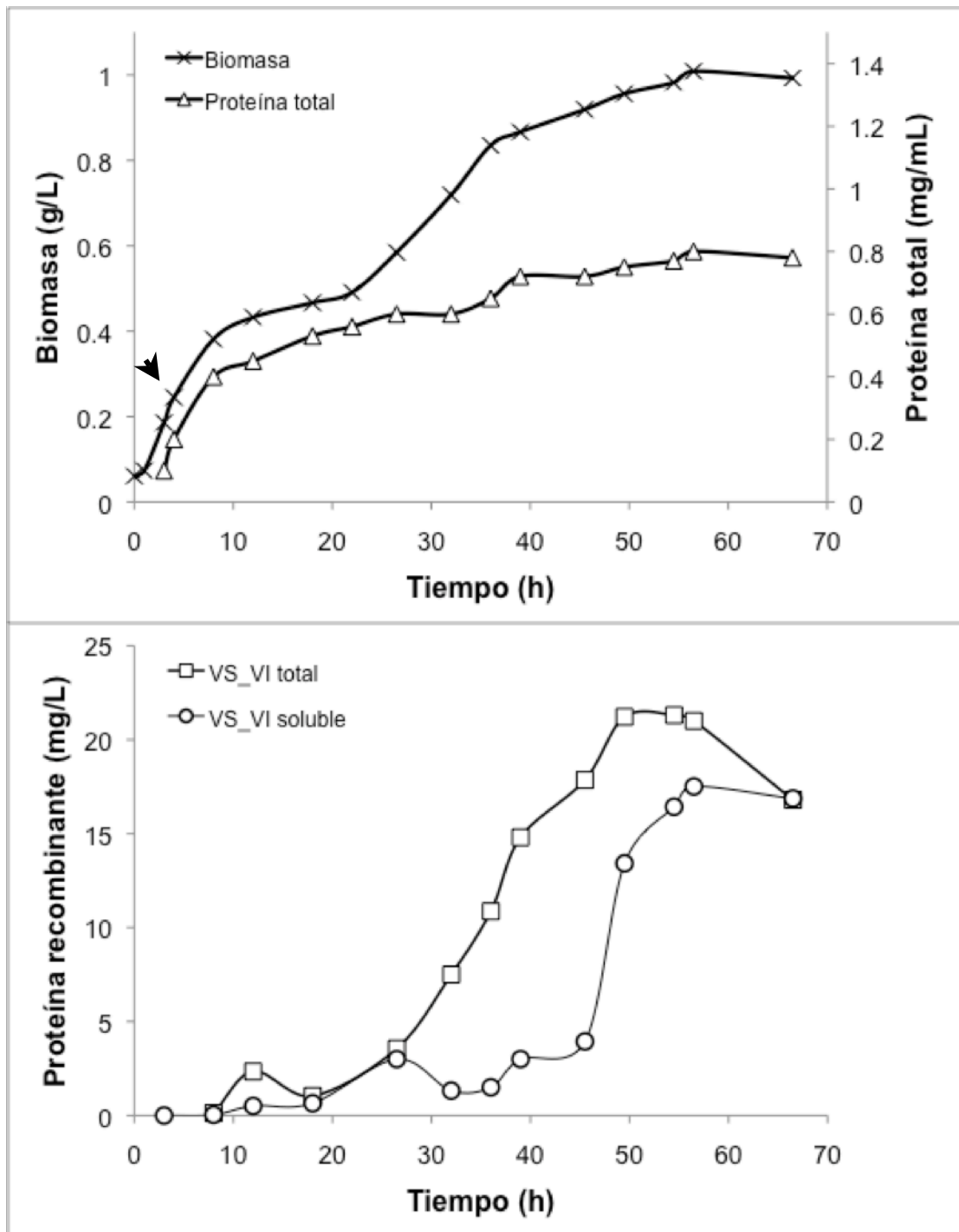


Figura 13. Cinética de crecimiento de la cepa BL21-SI/pLysSRARE/pGVR-VS_VI. Curva de crecimiento y proteína total del experimento número 1 del diseño experimental (A), y cinética de producción de rVS_VI total y soluble (B). La flecha indica el momento de la inducción.

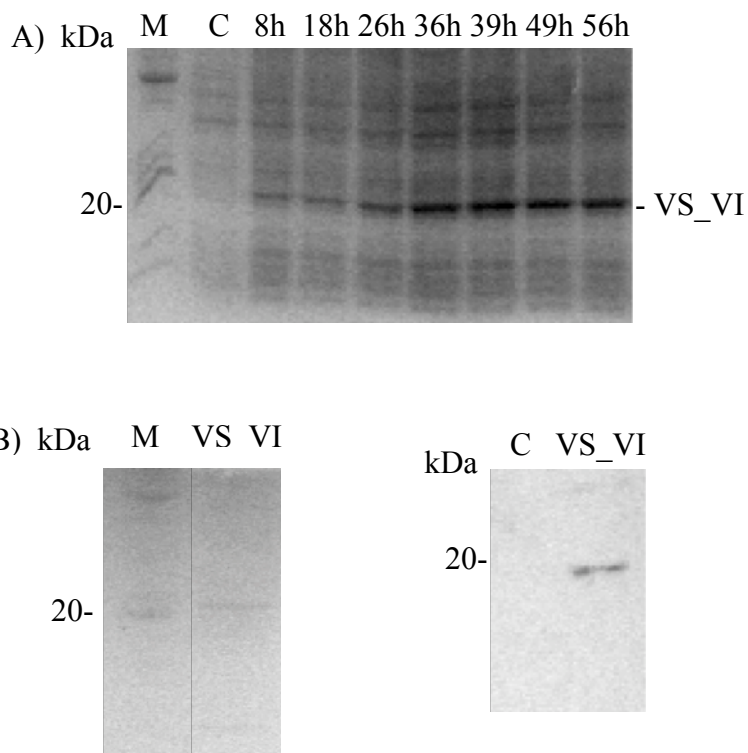


Figura 14. Producción de la proteína de fusión rVS_VI en biorreactor. Análisis por SDS-PAGE de las muestras tomadas del experimento número 1 (A). Se muestra la purificación de la proteína (B) y su confirmación por Western Blot (C). M= marcador de peso molecular, C= cepa control transformada con el plásmido pET22b e inducida con NaCl, h= tiempo en horas

De acuerdo al análisis de varianza, el factor que afectó significativamente la producción total de la proteína de fusión rVS_VI fue: A^2 (Tabla 7). Para estimar las mejores condiciones de producción de rVS_VI, se ajustaron los resultados obtenidos una ecuación de segundo orden, mediante mínimos cuadrados; dicha ecuación está representada por su respectiva gráfica de superficie de respuesta (Figura 14).

La ecuación de segundo orden que se ajustó a los datos obtenidos es la siguiente:

$$(5) \quad rVS_VI \text{ total} = -259.116 + 0.595524*B + 77.0702*A - 0.0358029*B^2 + 0.200294*AB - 5.92538*A^2$$

Donde los factores *A* y *B* se definen como pH y *Ti* (°C), respectivamente. El modelo se ajustó con una $R^2 = 84.194\%$, un error estándar de 2.94 y un error absoluto de 1.616. Lo cual indica que un 84.194% de los datos observados están representados en el modelo matemático. De acuerdo al modelo, las mejores condiciones para la producción de rVS_VI total son: pH 6.97 y 27.82°C de temperatura de inducción.

Tabla 7. Análisis de varianza para la producción total de rVS_VI.

Factor^a	Suma de cuadrados	GI^b	Media cuadrática	F-ratio^c	P-value^d
A	0.254857	1	0.254857	0.03	0.8706
B	1.07584	1	1.07584	0.12	0.7389
AA	214.749	1	214.749	24.78	0.0042
AB	11.594	1	11.594	1.34	0.2996
BB	37.3273	1	37.3273	4.31	0.0926
Error total	43.3242	5	8.66484		
Total (corr.)	274.101	10			

^a A= pH, B= Temperatura de post inducción (*Ti*)
^b Grados libertad
^c Prueba de Fisher
^d Valor de probabilidad de distribución, los factores y sus interacciones con una *p-value* < 0.05 son estadísticamente significativos

Por otro lado, de acuerdo al análisis de varianza, los factores que afectaron significativamente la solubilidad de la proteína de fusión rVS_VI fueron: *AA* y *BB* (Tabla 8). Para estimar las mejores condiciones en las que se obtiene mayor cantidad de rVS_VI soluble, los resultados obtenidos se ajustaron a una ecuación de segundo orden mediante mínimos cuadrados; dicha ecuación está representada por gráficas de superficie de respuesta (Figura 14).

La ecuación de segundo orden que se ajustó a los datos obtenidos para rVS_VI soluble es la siguiente:

$$(6) \quad rVS_VI \text{ soluble} = -336.937 + 3.66533*B + 85.7125*A - 0.0630192*B^2 - 0.0102941*AB - 6.10109*A^2$$

Donde los factores *A* y *B* se definen como se mencionó previamente. El modelo fue ajustado con una $R^2 = 87.849\%$, un error estándar de 2.737 y un error absoluto de 1.677. Lo anterior demuestra una buena representación entre los datos observados y el modelo matemático. De acuerdo a la ecuación 6, las mejores condiciones para mejorar la solubilidad de rVS_VI son: pH 7 y 28.5 °C.

Tabla 8. Análisis de varianza para rVS_VI soluble.

Factor ^a	Suma de cuadrados	GI ^b	Media cuadrática	F-ratio ^c	P-value ^d
A	0.000124408	1	0.000124408	0.0	0.9969
B	0.000789645	1	0.000789645	0.0	0.9922
AA	227.675	1	227.675	30.39	0.0027
AB	0.030625	1	0.030625	0.0	0.9515
BB	115.648	1	115.648	15.44	0.0111
Error total	37.4559	5	7.49119		
Total (corr.)	308.254	10			

^a A= pH, B= Temperatura de post inducción (Ti)
^b Grados libertad
^c Prueba de Fisher
^d Valor de probabilidad de distribución, los factores y sus interacciones con una *p-value* < 0.05 son estadísticamente significativos

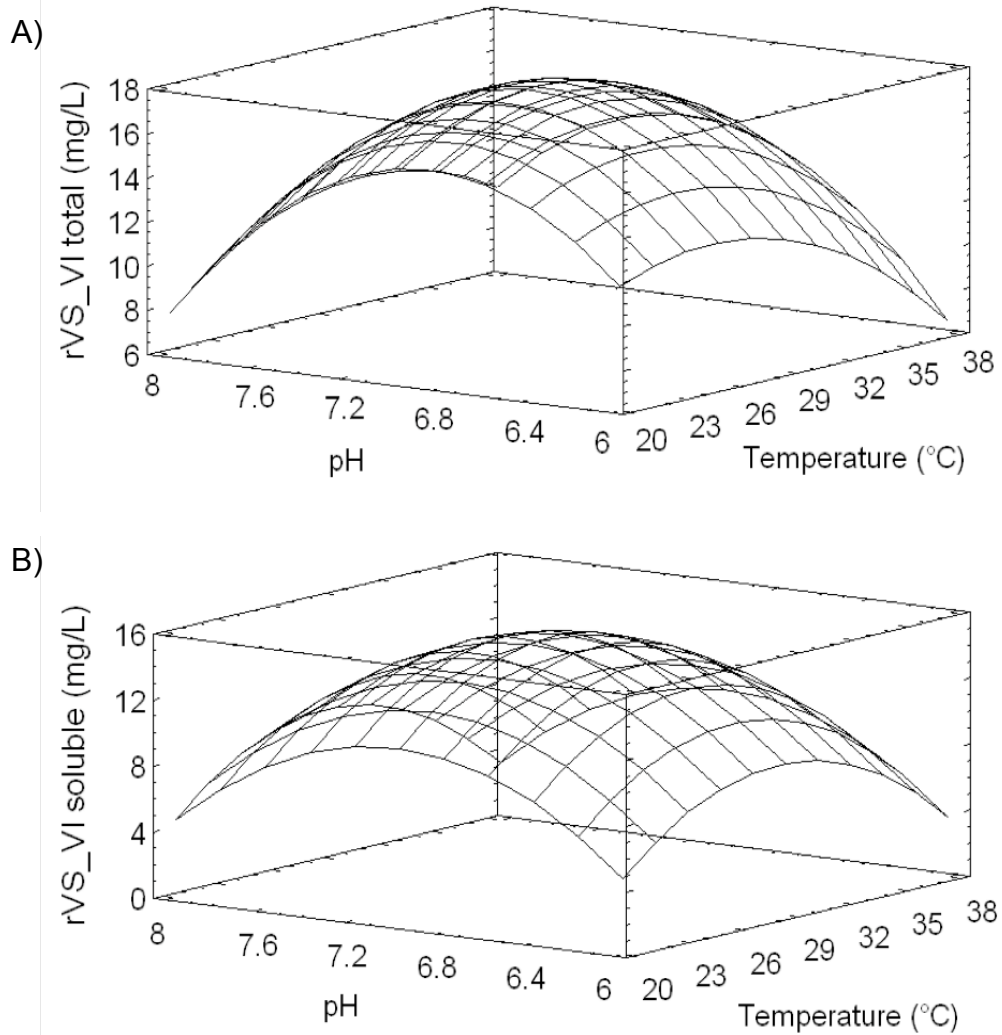


Figura 15. Gráficas de superficie de respuesta del modelo ajustado para producción total (A) y soluble (B) de la proteína de fusión rVS_VI.

A diferencia de la proteína Vs30, la solubilidad de la proteína de fusión VS_VI depende tanto del pH como de la temperatura. Este es el primer trabajo en producir una proteína de fusión entre la vasoinhibina de 14 kDa y la vasostatina de 30 a.a. (135-164 a.a.), además de optimizar la producción de la misma mediante el diseño experimental Compuesto Central, lo que permitirá posteriormente realizar estudios *in vivo* e *in vitro* que permitirán elucidar el mecanismo de acción involucrado en el efecto antiangiogénico de ésta proteína.

4. CONCLUSIONES

El pH, TOD y la temperatura de inducción son factores que influyen de manera significativa la producción de proteínas recombinantes, además de su solubilidad. La interacción entre estos factores también es una variable determinante, tanto para la producción de proteínas y especialmente para la generación de biomasa, esto último lo hace un factor relevante para la producción recombinante de proteínas dependientes de biomasa.

La producción de la proteína antiangiogénica rVs30 depende del pH, TOD, temperatura de inducción y de la interacción entre pH-TOD presentes en el cultivo, mientras que su solubilidad depende del pH, TOD y la interacción entre estos dos factores. Mientras tanto, la producción de la proteína de fusión rVS_VI se ve afectada principalmente por el pH del medio y su solubilidad por el pH y la temperatura de inducción. Al realizar una evaluación general de los dos diseños utilizados en este trabajo, se puede concluir que el diseño compuesto central es un diseño más apropiado para encontrar los niveles óptimos de producción de proteínas recombinantes debido a los puntos estrella presentes en el diseño.

A diferencia de la producción en matraz en la que es posible evaluar un número limitado de factores como: concentración de inductor, pH inicial y temperatura de inducción que probablemente sea la única variable controlada en matraz, la producción en biorreactor permite evaluar las variables que en matraz no es posible mantener constantes y que son las que presentan un efecto significativo en la producción, por ejemplo el pH y TOD, como se mostró en este trabajo.

El uso de condiciones controladas de cultivo para la expresión de proteínas recombinantes en biorreactor, es la mejor opción para obtener cantidades significativas de la proteína de interés, y de ésta manera llevar a cabo los estudios *in vitro* e *in vivo* necesarios para su posterior validación para uso humano.

5. MANUSCRITO

Novel Fusion Protein Derived from Vasostatin 30 and Vasoinhibin II-14.1 Potently Inhibits Coronary Endothelial Cell Proliferation

Gabriela Vazquez Rodriguez · Carmen Gonzalez ·
Antonio De Leon Rodriguez

Published online: 12 January 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

6. REFERENCIAS

- Balderas Hernandez, V. E., L. M. Paz Maldonado, et al. (2008).** "Periplasmic expression and recovery of human interferon gamma in Escherichia coli." Protein Expr Purif **59**(1): 169-74.
- Bee, Y. S., S. J. Sheu, et al. (2010).** "Topical application of recombinant calreticulin peptide, vasostatin 48, alleviates laser-induced choroidal neovascularization in rats." Mol Vis **16**: 756-67.
- Cai, K. X., L. Y. Tse, et al. (2008).** "Suppression of lung tumor growth and metastasis in mice by adeno-associated virus-mediated expression of vasostatin." Clin Cancer Res **14**(3): 939-49.
- Cao, W., H. Li, et al. (2013).** "Periplasmic expression optimization of VEGFR2 D3 adopting response surface methodology: antiangiogenic activity study." Protein Expr Purif.
- Casanovas, O., D. J. Hicklin, et al. (2005).** "Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors." Cancer Cell **8**(4): 299-309.
- Cichon, T., M. Jarosz, et al. (2012).** "Vasostatin increases oxygenation of B16-F10 melanoma tumors and raises therapeutic efficacy of cyclophosphamide." Acta Biochim Pol **59**(3): 377-81.
- Clapp, C., J. A. Martial, et al. (1993).** "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis." Endocrinology **133**(3): 1292-9.
- Clark, A. J., K. R. Lamborn, et al. (2012).** "Neurosurgical management and prognosis of patients with glioblastoma that progresses during bevacizumab treatment." Neurosurgery **70**(2): 361-70.
- Corbacho, A. M., G. Martinez De La Escalera, et al. (2002).** "Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis." J Endocrinol **173**(2): 219-38.
- D'Angelo, G., J. F. Martini, et al. (1999).** "16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells." Mol Endocrinol **13**(5): 692-704.
- Dvorak, H. F. (2005).** "Angiogenesis: update 2005." J Thromb Haemost **3**(8): 1835-42.

- Eggleton, P., F. J. Ward, et al.** (2000). "Fine specificity of autoantibodies to calreticulin: epitope mapping and characterization." Clin Exp Immunol **120**(2): 384-91.
- Ferreira, S. L., R. E. Bruns, et al.** (2007). "Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods." Anal Chim Acta **597**(2): 179-86.
- Folkman, J.** (1972). "Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors." Ann Surg **175**(3): 409-16.
- Gabriela, V. R.** (2009). Producción de las proteínas con capacidad antiangiogénica: vasostatina, vaso inhibina y sus quimeras en *Escherichia coli* y su actividad biológica Departamento de Biología Molecular. San Luis Potosi, S.L.P., Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. **Maestría**: 69.
- Galfione, M., W. Luo, et al.** (2003). "Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells." Protein Expr Purif **28**(2): 252-8.
- Ge, G., C. A. Fernandez, et al.** (2007). "Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10010-5.
- Hanahan, D. and J. Folkman** (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Hoeben, A., B. Landuyt, et al.** (2004). "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis." Pharmacol Rev **56**(4): 549-80.
- Jazowiecka-Rakus, J., M. Jarosz, et al.** (2006). "Combination of vasostatin gene therapy with cyclophosphamide inhibits growth of B16(F10) melanoma tumours." Acta Biochim Pol **53**(1): 199-202.
- Kerbel, R. S. (2008). "Tumor angiogenesis." N Engl J Med **358**(19): 2039-49.
- Li, X., L. Jiang, et al.** (2007). "Inhibition of angiogenesis by a novel small peptide consisting of the active fragments of platelet factor-4 and vasostatin." Cancer Lett **256**(1): 29-32.
- Li, X., J. W. Robbins, Jr., et al.** (1992). "Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains." J Ind Microbiol **9**(1): 1-9.

- Livi, L., P. Bonomo, et al. (2013). "Paclitaxel and bevacizumab in first-line treatment for HER2-negative metastatic breast cancer: single-center experience." Med Oncol **30**(1): 434.
- Macotela, Y., M. B. Aguilar, et al. (2006). "Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin." J Cell Sci **119**(Pt 9): 1790-800.
- Maldonado, L. M., V. E. Hernandez, et al. (2007). "Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in Escherichia coli using response surface methodology: the case of human interferon beta." Biomol Eng **24**(2): 217-22.
- Marino-Marmolejo, E. N., A. De Leon-Rodriguez, et al. (2009). "Heterologous expression and characterization of an alcohol dehydrogenase from the archeon Thermoplasma acidophilum." Mol Biotechnol **42**(1): 61-7.
- Martínez-Ezquerro, J. D. and L. A. Herrera (2006). "ANGIOGÉNESIS: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer." Cancerología **1**(2): 83-96.
- Myers R.H., M. D. C. (1995). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. I. John Wiley & Sons. New York.
- Nakamura, Y., T. Gojobori, et al. (2000). "Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000." Nucleic Acids Res **28**(1): 292.
- Persano, L., M. Crescenzi, et al. (2007). "Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects." Mol Aspects Med **28**(1): 87-114.
- Pike, S. E., L. Yao, et al. (1998). "Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth." J Exp Med **188**(12): 2349-56.
- Pike, S. E., L. Yao, et al. (1999). "Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth." Blood **94**(7): 2461-8.
- Piwnica, D., P. Touraine, et al. (2004). "Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance." Mol Endocrinol **18**(10): 2522-42.
- Rosales-Colunga Luis Manuel, R.-F. E., Ordoñez Leandro G., Alatríste-Mondragón Felipe, De León-Rodríguez Antonio (2010). "Hydrogen production by Escherichia coli Δ hycA Δ lacI using cheese whey as substrate." International Journal of Hydrogen Energy **35**(2): 491-499.

- Stéphanie Thebault, C. G., Celina García, David Arredondo Zamarripa,, L. V. Gabriel Nava, Fernando López-Casillas, Gonzalo Martínez de la Escalera, et al. (2011). "Vasoinhibins Prevent Bradykinin-Stimulated Endothelial Cell Proliferation by Inactivating eNOS via Reduction of both Intracellular Ca²⁺ Levels and eNOS Phosphorylation at Ser1179." Pharmaceuticals **4**: 1052-1069.
- Struman, I., F. Bentzien, et al. (1999). "Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1246-51.
- Sun, Q. M., L. Cao, et al. (2005). "Expression, purification of human vasostatin120-180 in Escherichia coli, and its anti-angiogenic characterization." Protein Expr Purif **39**(2): 288-95.
- Sun, Q. M., L. L. Chen, et al. (2005). "An improved strategy for high-level production of human vasostatin120-180." Biotechnol Prog **21**(4): 1048-52.
- Vazquez Rodriguez, G., C. Gonzalez, et al. (2013). "Novel Fusion Protein Derived from Vasostatin 30 and Vasoinhibin II-14.1 Potently Inhibits Coronary Endothelial Cell Proliferation." Mol Biotechnol **54**(3): 920-9.
- Woolard, J., H. S. Bevan, et al. (2009). "Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity." Microcirculation **16**(7): 572-92.
- Xu, H., X. Niu, et al. (2011). "Synergistic antitumor efficacy by combining adriamycin with recombinant human endostatin in an osteosarcoma model." Oncol Lett **2**(5): 773-778.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-8.

7. ANEXOS

7.1 Cultivos en biorreactor

7.1.1 Medio mínimo BSG

Solución A	1L	[final]
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.68 g	3.5 g/L
KH ₂ PO ₄	3.68 g	3.5 g/L
Solución B	100 ml	[final]
Glucosa	10 g	5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g	5 g/L
Ajustar la solución A a un pH de 7.4. Esterilizar las soluciones por separado. Por cada 100 ml de cultivo, medir 95 ml de la solución A y 5 ml de la solución B		

7.1.2 Elementos traza

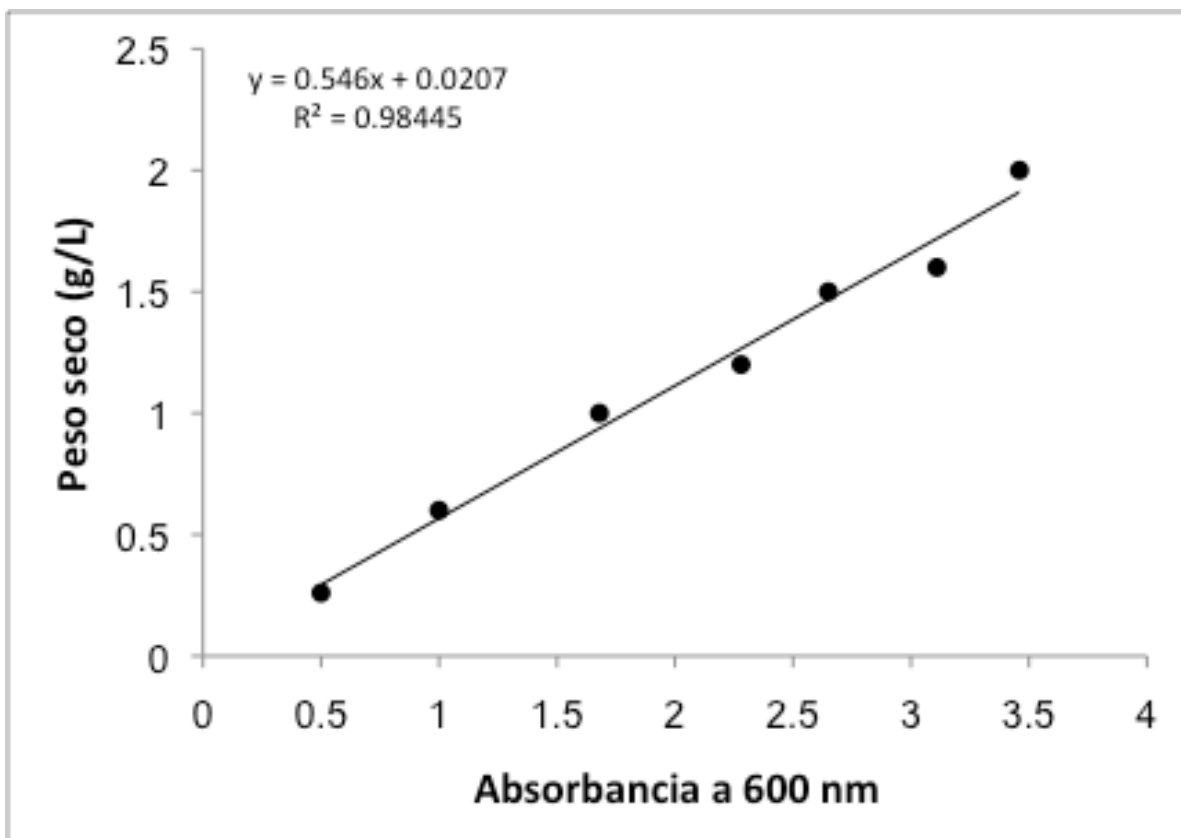
Reactivos	20X [100 µM]
Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	0.00048 g
FeCl ₂ ·6H ₂ O	0.00047 g
NiCl ₃ ·6H ₂ O	0.00055 g
Na ₂ SeO ₃	0.00034 g
Disolver en 20 ml de agua destilada y esterilizar. La concentración en el medio de cultivo debe ser de 5 µM	

7.1.3 Buffer de fosfatos (PBS)

Reactivos	20X
NaCl	81.8 g
NaH ₂ PO ₄ ·4H ₂ O	3.60 g
Na ₂ HPO ₄	10.22 g
Disolver en 500 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.5. Esterilizar	

7.1.4 Curva de calibración de peso seco para la conversión a biomasa

Absorbancia	Peso seco (g/L)
0.5	0.26
1	0.6
1.68	1
2.28	1.2
2.65	1.5
3.11	1.6
3.46	2

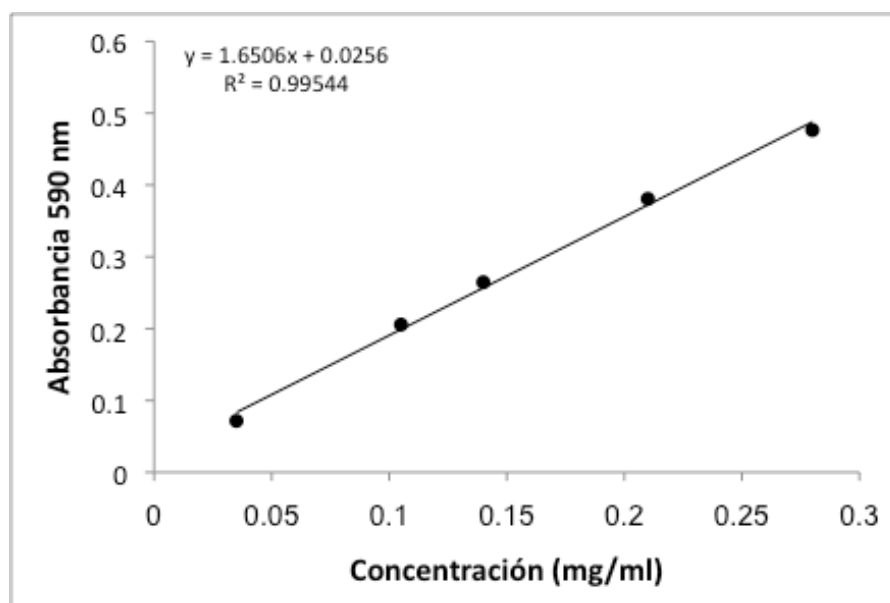


7.2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

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 solución C
Folin	Diluido 1:2 en agua destilada (preparar en el momento)

Curva de calibración

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	0.0716
0.105	79.5	920.5	0.2056
0.14	106	894	0.2646
0.21	159	841	0.3807
0.28	212	788	0.4764



7.3 Análisis de proteínas por SDS-PAGE

7.3.1 Gel de gradiente tris-glicina

Soluciones

<i>Tris-HCl 0.5M pH 6.8</i>	<i>Tris-HCl 1.5M pH 8.8</i>	<i>SDS 10%</i>	<i>APS 10%</i>
Tris base 6 g	Tris base 54.5 g	SDS 10 g	APS 100 mg
Disolver en 60 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N y aforar a 100 ml	Disolver en 150 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N y aforar a 300 ml	Disolver en 100 ml de agua destilada y almacenar a temperatura ambiente	Disolver en 1 ml de agua destilada. Almacenar a 4°C

Gel de poliacrilamida

Soluciones	Stack (4%)	4%	20%
Acrilamida 30%	0.366 ml	0.366 ml	1831 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.693 ml	-	-
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	-	0.687 ml	0.687 ml
SDS 10%	0.0275 ml	0.0275 ml	0.0275 ml
Agua MQ	1650 ml	1654 ml	0.189 ml
TEMED	2 µl	1.8 µl	0.9 µl
APS 10%	10 µl	9.2 µl	9.2 µl

Buffer de corrida

Reactivos	5X
Tris base	7.55 g
Glicina	47 g
SDS 10%	25 ml
Disolver en 400 ml de agua destilada y ajustar pH a 8.3. Aforar a 500 ml y usar al 1X.	

Buffer de carga

Reactivos	Concentración
Tris-HCl pH 6.8	62.5 mM
Glicerol	25 %
SDS	2 %

Disolver en 0.950 ml de agua destilada, añadir una pizca de azul de bromofenol y 50 µl de 2-mercaptoetanol

7.3.2 Gel discontinuo tris-tricina

Soluciones

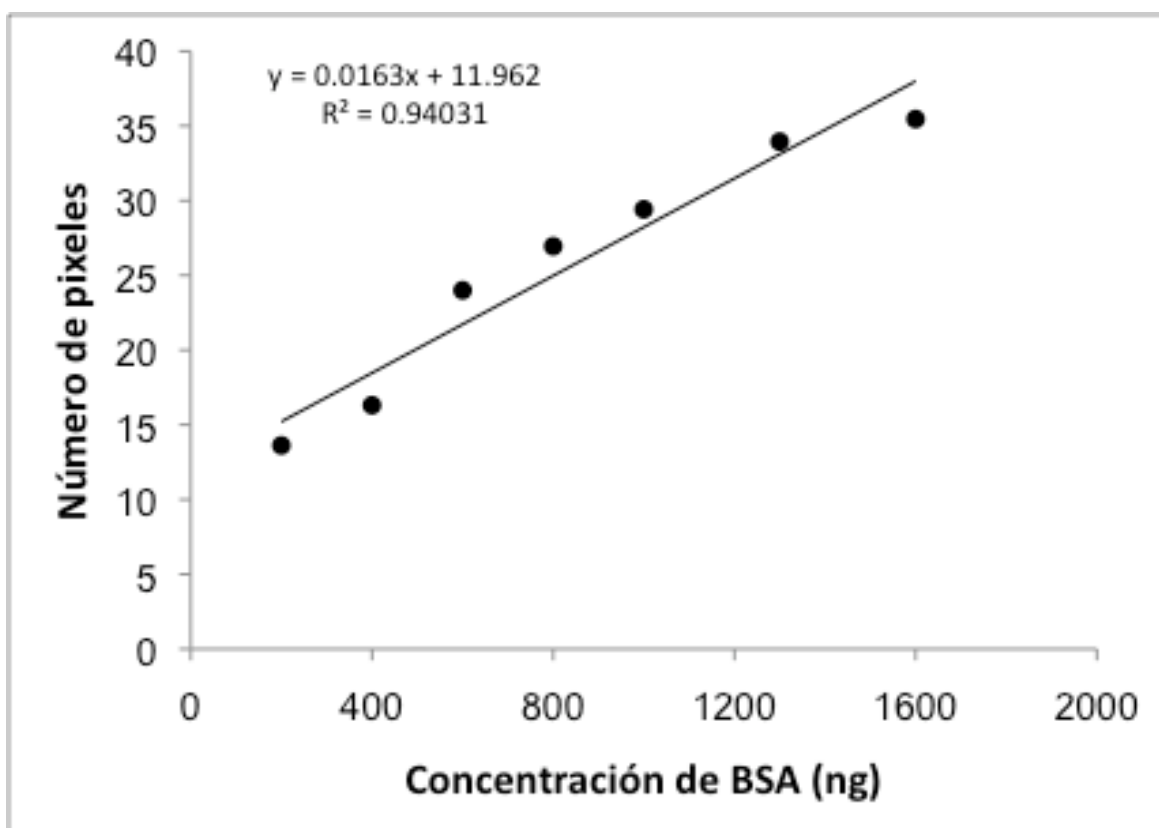
<i>Acrilamida 49.5%</i>	<i>Amortiguador de gel</i>	<i>Buffer Cátodo 1X</i>	<i>Buffer Ánodo 1X</i>
Acrilamida 48 g N,N-metilen-bis acrilamida 1.5 g	Tris base 36.34 g SDS 0.3 g	Tris base 12.11 g Tricina 17.92 g SDS 1.0 g	Tris base 121.1 g
Disolver en 100 ml de agua destilada.	Disolver en 60 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.45 con HCl 1N y aforar a 100 ml	Disolver en 900 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.2 y aforar a 1 L. Se usa en el interior de la cámara de electroforesis	Disolver en 1 L de agua destilada, ajustar el pH a 8.4 y aforar a 5 L. Se usa en el exterior de la cámara de electroforesis

Gel de poliacrilamida

Soluciones	Concentrador	Espaciador	Separador
Acrilamida 49.5%	0.16 ml	0.406 ml	2 ml
Amortiguador de gel	0.496 ml	0.666 ml	1.34 ml
Glicerol 100%	-	-	0.533 ml
Agua MQ	1.34 ml	0.927 ml	1.13 ml
TEMED	3 µl	1.4 µl	2.2 µl
APS 10%	30 µl	14 µl	22 µl

7.3.3 Curva de calibración para la cuantificación de proteínas por densitometría

Concentración de BSA (ng)	Número de pixeles
200	13.62
400	16.31
600	24
800	26.95
1000	29.42
1300	33.95
1600	35.46



7.4 Western Blot

Soluciones

<i>Towbin 10X</i>	<i>Buffer AP 1X</i>	<i>Azul de Coomasie</i>	<i>Rojo de Ponceau</i>
Tris base 3.03 g Glicina 14.4 g	Tris base 1.21 g NaCl 0.58 g MgCl ₂ ·6H ₂ O 1.51 g	Coomasie blue R-250 1 g Agua MQ 500 ml Ácido acético 100 ml Metanol 400 ml	Ponceau Xilidina 0.01 g
Disolver en 90 ml de agua MQ, ajustar pH a 8.3. Aforar a 100 ml. Usar al 1X con metanol 20% de [final]	Disolver en 60 ml de agua destilada, ajustar el pH a 9.5 con HCl 1N y aforar a 100 ml. Añadir el MgCl ₂ antes de usar.	Mezclar todo y mantener a temperatura ambiente. Proteger de la luz con papel aluminio	Disolver en 10 ml de agua destilada, proteger de la luz.

7.5 Purificación por cromatografía de afinidad

Soluciones

<i>Buffer de purificación nativa (BPN) 5X</i>	<i>Solución stock A 10X</i>	<i>Solución stock B 10X</i>	<i>Imidazol 3M stock</i>
NaH ₂ PO ₄ 7 g NaCl 29.2 g	NaH ₂ PO ₄ 27.6 g NaCl 292.9 g	Na ₂ HPO ₄ 28.4 g NaCl 292.9 g	Imidazol 20.6 g Stock A (10X) 8.77 ml Stock B (10X) 1.23 ml
Disolver en 180 ml de agua MQ, ajustar pH a 8.0. Aforar a 200 ml. Usar al 1X	Disolver en 900 ml de agua destilada. Aforar a 1 L.	Disolver en 900 ml de agua destilada. Aforar a 1 L.	Disolver en 90 ml de agua MQ, ajustar pH a 6.0. Aforar a 100 ml.

Soluciones

<i>Buffer de unión nativa 1X</i>	<i>Buffer de lavado nativo 1X</i>	<i>Buffer de elución nativa 1X</i>
BPN (5X) 20 ml	BPN (5X) 20 ml	BPN (5X) 20 ml
Aforar a 100 ml con agua destilada. Ajustar pH a 8.0.	Aforar a 100 ml con agua destilada. Añadir Imidazol 3M stock a concentraciones finales de 10, 20, 50 y 100 mM según el lavado. Ajustar pH a 8.0.	Disolver en 60 ml de agua destilada. Añadir 8.33 ml de Imidazol 3M stock para una [final] de 250 mM. Aforar a 100 ml de agua. Ajustar