



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Expresión de una proteína de fusión vasostatina 30 y  
vasoinhibina 14.1 (Osiris) en *Pichia pastoris* y evaluación de la  
actividad biológica de la Vasostatina 30 en pez cebra**

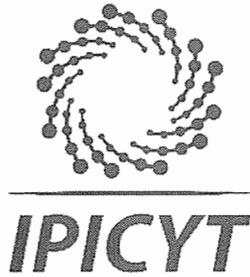
Tesis que presenta

**Edgar Rodrigo Juvera Avalos**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

Codirectores de la tesis:  
**Dr. Antonio de León Rodríguez**  
**Dra. Gabriela Vázquez Rodríguez**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto del 2019



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “*Expresión de una proteína de fusión vasostatina 30 y vasoinhibina 14.1 (Osiris) en Pichia pastoris y evaluación de la actividad biológica de la Vasostatina 30 en pez cebra*” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Edgar Rodrigo Juvera Avalos** y aprobada el dieciséis de agosto del dos mil diecinueve 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**  
Codirector de la tesis

**Dra. Gabriela Vázquez Rodríguez**  
Codirectora de la tesis

**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**  
Miembro del Comité Tutorial

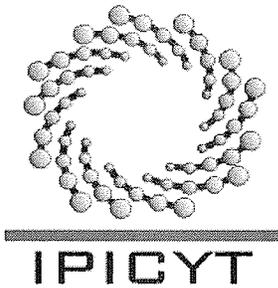
**Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández**  
Miembro del Comité Tutorial



## **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. y en la División de Cirugía, Ortopedia y Oncología del Departamento de Investigación Clínica y Experimental de la Universidad de Linköping bajo la codirección del Dr. Antonio De León Rodríguez y la Dra. Gabriela Vázquez Rodríguez

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (636171) 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 199 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 16 días del mes de agosto del año 2019, se reunió a las 09:20 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Sergio Nemorio Hidalgo Figueroa</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Edgar Rodrigo Juvera Avalos**

sobre la Tesis intitulada:

*Expresión de una proteína de fusión vasostatina 30 y vasoinhibina 14.1 (Osiris) en Pichia pastoris y evaluación de la actividad biológica de la Vasostatina 30 en pez cebra*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Antonio De León Rodríguez**  
**Dra. Gabriela Vázquez Rodríguez (Li.U)**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 11:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 16 días del mes de agosto de 2019.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Márcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## **Dedicatorias**

A mi familia, amigos y todas las personas que me acompañaron y ayudaron a lo largo de este proyecto

## **Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención (862245) que me otorgó durante la realización del trabajo de tesis de 2017 a 2019 y la beca de movilidad 2018 en el extranjero (291250)

Agradezco al a el Doctor Antonio De León Rodríguez por aceptarme en su grupo de trabajo, por las oportunidades brindadas y su supervisión técnica y por sus correcciones realizadas a la tesis y demás documentos.

Agradezco a las Doctoras Charlotta Dabrosin por aceptarme en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de realizar la estancia de investigación en la Universidad de Linköping.

Agradezco de manera muy especial a mi co-directora Dra. Gabriela Vázquez Rodríguez por su tiempo, por sus consejos, guía, su paciencia y sobre su apoyo indispensable para hacer posible este proyecto.

Agradezco al Dr. Sergio Calderón y la Dra. Arlette Bohórquez Hernández por sus consejos técnicos y ayuda durante este trabajo

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio por sus consejos técnicos proporcionados y por sus comentarios en los seminarios internos. En especial, agradezco a Víctor Balderas Hernández, por el apoyo técnico y las correcciones hechas en este trabajo.

A todos mis amigos en Linköping que me ayudaron a adaptarme y a hacer mi estancia en la ciudad mucho más amena.

Agradezco especialmente a mis padres Roberto Juvera Figueroa y Natalia Avalos Méndez y mis hermanos Janett Juvera Avalos y Roberto Juvera Avalos por su apoyo incondicional sin el cual este posgrado no hubiera sido posible.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta del examen.....	iv
Dedicatorias .....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de tablas .....	ix
Lista de figuras .....	x
Resumen .....	xi
Abstract .....	xii
Introducción.....	1
1. El proceso angiogénico .....	1
1.1 Angiogénesis fisiológica .....	2
1.2 Angiogénesis patológica .....	3
2. Terapia antiangiogénica.....	5
2.1 Vasoinhibina Vi-II-14.1 .....	6
2.2 Vasostatina 30.....	8
3. Proteínas de fusión.....	11
4. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión de proteínas .....	11
4.1 Proteína de fusión Osiris .....	12
5. Pez cebra como modelo de estudio.....	13
5.1 Pez cebra para el estudio de metástasis.....	14
Justificación.....	14
Objetivos generales.....	14
Objetivos específicos .....	14
Material y métodos .....	16
1. Material.....	16
1.1 Cepas.....	16
1.2 Plásmidos.....	16
1.3 Secuencias de péptidos de interés.....	16
1.4 Líneas celulares .....	18
1.5 Embriones de pez cebra .....	18
2. Métodos de producción y manipulación de ADN .....	18
2.1 Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina .....	18
2.2 Extracción de ADN total de <i>P. pastoris</i> .....	19
2.3 Amplificación de genes por PCR.....	19

2.4. Electroforesis en gel de agarosa .....	20
2.5. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	20
2.6 Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico .....	20
3. Transformación de <i>P. pastoris</i> .....	20
3.1 Preparación de células de <i>P. pastoris</i> electrocompetentes .....	20
3.2 Linealización y concentración de vectores de expresión.....	21
3.3 Condiciones de electroporación y cultivo de transformantes.....	21
3.4 Transformación por electroporación .....	21
4. Métodos de expresión, detección, análisis .....	22
4.1 Métodos de expresión constitutiva e inducida a nivel matraz.....	22
4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	22
5. Ensayos de proliferación de células cancerosas y sVs30 .....	23
6. Marcaje y microinyección de células de cáncer de mama en pez cebra .....	23
6.1 Día 1 antes de la microinyección.....	23
6.2 Día de la microinyección .....	23
7. Evaluación de tumor primario y análisis de angiogénesis tumoral.....	24
Resultados .....	24
Comprobación de la construcción.....	24
Selección de cepas secretoras de Osiris.....	25
Ensayos de expresión constitutiva e inducida a nivel matraz .....	27
Ensayos de proliferación de células cancerosas con sVs30 in vitro .....	28
Evaluación in vivo de la actividad anti-metastásica de Vs30 y sVs30 en pez cebra.....	29
Evaluación in vivo de la actividad anti-metastásica de angiogenina y angiostatina en pez cebra.....	33
Análisis de la angiogénesis tumoral en pez cebra .....	35
Discusión.....	40
Conclusiones.....	43
Referencias .....	44

## Lista de tablas

Tabla 1. Péptidos antiangiogénicos.....	6
Tabla 2. Proteínas de fusión con actividad antiangiogénica.....	12
Tabla 3. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de interés.....	17
Tabla 4. Primers.....	18

## Lista de figuras

Figura 1. Desarrollo del proceso angiogénico .....	2
Figura 2. Formación de vasos sanguíneos intratumorales: mecanismos moleculares y celulares .....	4
Figura 3. Representación estructural de la familia PRL/GH/PL de hormonas polipeptídicas y sus sitios de corte para la generación de vasoinhibinas .....	7
Figura 4. Representación de la vasoinhibina.....	8
Figura 5. Estructura modelo de calreticulina .....	9
Figura 6. Representación de la vasostatina .....	10
Figura 7. Representación de Osiris .....	13
Figura 8. Comprobación de la construcción.....	25
Figura 9. Colony blot .....	26
Figura 10. PCR de colonia .....	27
Figura 11. Análisis por Western blot de la producción de la proteína de fusión mediante expresión constitutiva e inducida .....	28
Figura 12. Ensayos de proliferación de las células T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 con 0.1 a 1000 ng/ mL de sVs30 .....	29
Figura 13. Fotografía de microinyección en espacio perivitelino de embriones de pez cebra .....	30
Figura 14. Diseminación de las células T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 en presencia de Vs30 .....	31
Figura 15. Diseminación de las células T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 en presencia de sVs30 .....	32
Figura 16. Diseminación de las células a) T47D, b) MDA-MB-468 y c) MDA-MB-231 en presencia de 1 µg/mL de angiostatina y angiogenina .....	34
Figura 17. Evaluación de la formación del tumor primario en presencia de matrigel .....	36
Figura 18. Análisis de la actividad antiangiogénica de Vs30.....	37
Figura 19. Análisis de la actividad antiangiogénica de sVs30 .....	38
Figura 20. Análisis de la actividad antiangiogénica de angiostatina y angiogenina .....	39

## Resumen

### Expresión de una proteína de fusión vasostatina 30 y vaso inhibina 14.1 (Osiris) en *Pichia pastoris* y evaluación de la actividad biológica de la Vasostatina 30 en pez cebra

El proceso angiogénico consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes y son clave en el crecimiento y metástasis del cáncer; estos proveen oxígeno y nutrientes que permiten el crecimiento del tumor y le proporciona una ruta de escape y diseminación. Los péptidos anti-angiogénicos vasostatina 30 (Vs30) y vaso inhibina 14.1 kDa (Vi-II-14.1) han demostrado una potente actividad anti-proliferativa en células endoteliales, de forma independiente. Por lo que el diseño y desarrollo de una proteína de fusión que incremente la actividad biológica de dichos péptidos es de interés terapéutico. En este trabajo, se llevó a cabo la expresión constitutiva e inducida de una proteína de fusión conformada por los péptidos Vs30 y Vi-II-14.1 en *Pichia pastoris*, para ello se realizaron ensayos de expresión constitutiva e inducible a nivel matraz. La actividad biológica de la vasostatina 30 sintética (sVS30) y Vs30 producida en *P. pastoris* se evaluó *in vivo* en pez cebra e *in vitro* en cultivos de líneas celulares de cáncer de mama T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231. La actividad anti-metastásica fue evaluada en embriones de pez cebra transgénicos de la cepa *Tg* (*fli1*: EGFP)<sup>y1</sup> utilizando dichas líneas celulares de cáncer de mama previamente marcadas con DiI (C<sub>59</sub>H<sub>89</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). La diseminación de las células cancerosas fue evaluada mediante microscopía de fluorescencia y la actividad anti-angiogénica mediante microscopía confocal. Los resultados obtenidos mostraron la expresión constitutiva e inducida de la proteína de fusión a las 24 y 48 horas de cultivo y su posterior confirmación mediante Western blot. Los ensayos *in vivo* e *in vitro* mostraron que la sVs30 no afectó la proliferación de las líneas celulares, pero disminuyó significativamente la diseminación de las células T47D y MDA-MB-468 a una concentración de 1 y 10 µg/mL, así como la formación de vasos sanguíneos intratumorales *in vivo* a 10 µg/mL. Mientras tanto la Vs30 no mostró un efecto significativo en la diseminación de ninguna de las líneas celulares, sin embargo, mostró un efecto inhibitorio en la formación de vasos sanguíneos intratumorales a una concentración de 1 µg/mL *in vivo*. Mientras las células MDA-MB-231 no fueron afectadas en su diseminación por Vs30 y sVs30. En comparación, la angiostatina y la angiogenina disminuyeron significativamente la diseminación de las células T47D y MDA-MB-468 y no mostraron un efecto inhibitorio en la formación de vasos sanguíneos intratumorales a una concentración de 1 µg/mL *in vivo*.

**Palabras clave:** angiogénesis, proteína de fusión, *Pichia pastoris*, antiangiogénicos, pez cebra, proliferación.

## Abstract

### Expression of a fusion protein vasostatin 30 and vaso-inhibin 14.1 (Osiris) in *Pichia pastoris* and evaluation of the biological activity of vasostatin 30 in zebrafish

The angiogenic process consists in the formation of new blood vessels from the preexisting ones and has a key role in cancer growth and metastasis. The new blood vessels provide oxygen and nutrients that allow tumor growth and a dissemination route for cancer cells. The anti-angiogenic peptides vasostatin 30 (Vs30) and vaso-inhibin 14.1 kDa (Vi-II-14.1) have shown a potent anti-proliferative activity in endothelial cells and the design and development of a fusion protein with increased biological activity is therapeutically interesting. In this work, the expression of a fusion protein made by the peptides Vs30 and Vi-II-14.1 was performed in *Pichia pastoris*. To achieve this, constitutive and inducible expression assays were performed in flask. On the other hand, the biological activity of synthetic vasostatin (sVs30) and Vs30 produced in *Pichia pastoris* was evaluated *in vivo* in zebrafish and *in vitro* in cultures of breast cancer cell lines. The anti-metastatic activity was analyzed in transgenic zebrafish embryos Tg (fli1: EGFP)<sup>y1</sup> using breast cancer cell lines (T47D, MDA-MB-468, and MDA-MB-231) previously labeled with DiI (C<sub>59</sub>H<sub>89</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). Breast cancer cell dissemination was evaluated by fluorescence microscopy and the anti-angiogenic activity by confocal microscopy. The obtained results showed a constitutive and inducible production of the fusion protein at 24 and 48 hours of culture and its subsequent confirmation by Western blot. The *in vivo* and *in vitro* assays showed that the sVs30 did not affect proliferation of breast cancer cells, however, it decreased significantly T47D and MDA-MB-468 cell dissemination at 1 and 10 µg/mL and inhibited the formation of intratumoral blood vessels *in vivo* at 10 µg/mL. Meanwhile, Vs30 did not show a significant effect on the dissemination of any of the cell lines, however, it showed an inhibitory effect on the formation of intratumoral blood vessels at 1 µg/mL *in vivo*. MDA-MB-231 cell dissemination was not affected by Vs30 or sVs30. In comparison, angiostatin and angiogenin decreased the spread of T47D and MDA-MB-468 cells and did not show an inhibitory effect on the formation of intratumoral blood vessels at 1 µg/mL *in vivo*.

**Key words:** Angiogenesis, fusion protein, *Pichia pastoris*, antiangiogenic, zebrafish, proliferation.

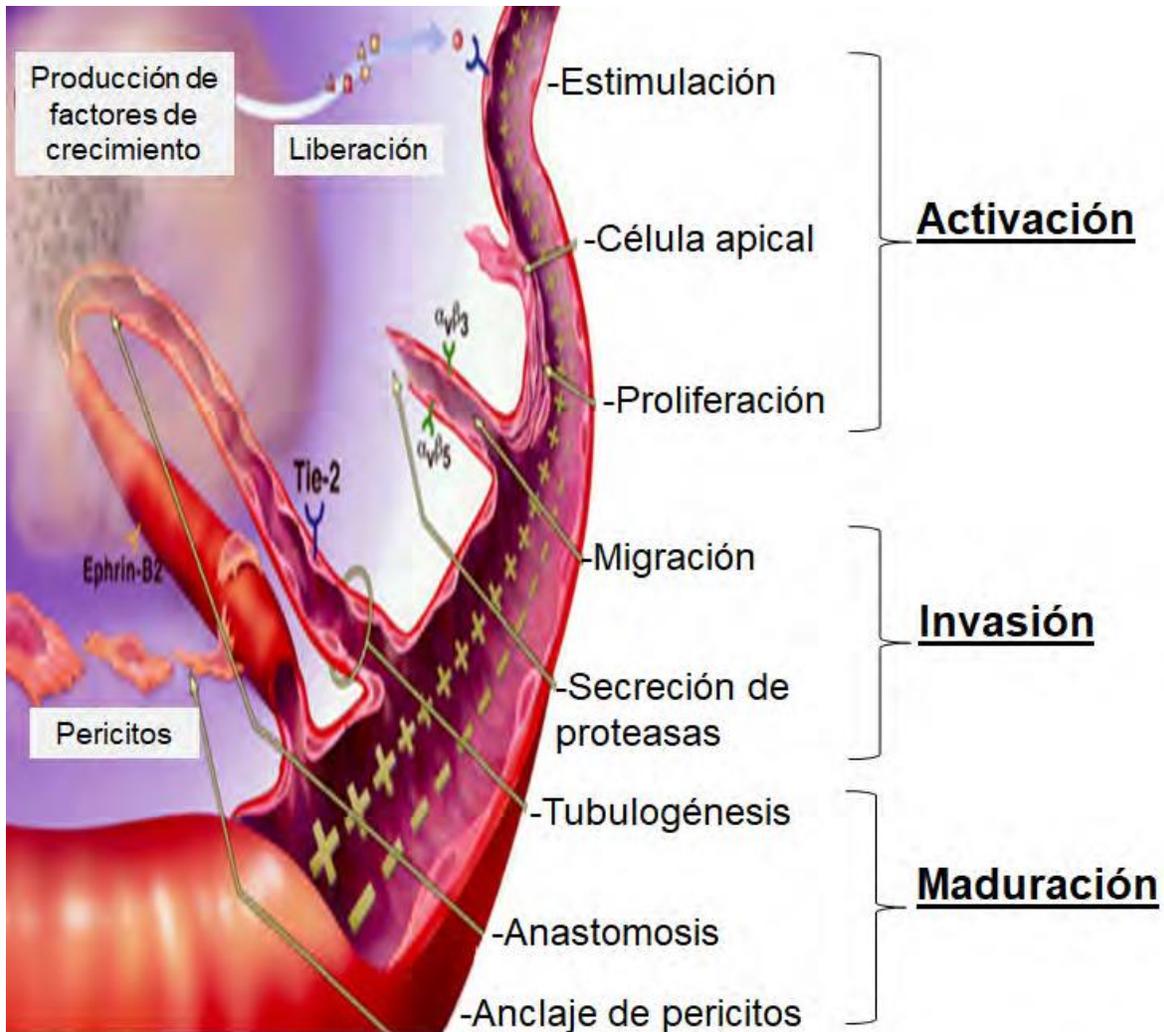
# Introducción

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes y es crucial para el crecimiento y desarrollo normal de los organismos (Raica, Cimpean and Ribatti, 2009). Además, el proceso angiogénico juega un papel clave en el crecimiento de los tumores sólidos que dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos para la obtención de nutrientes y una ruta de escape hacia otros tejidos (Hawighorst et al., 1997).

El descubrimiento de inhibidores endógenos de la angiogénesis como endostatina, angiostatina, tumstatina, vasostatina (Vs), vasoinhibinas (Vi) y otros (Ribatti, 2009a), lleva a la hipótesis de que el crecimiento tumoral puede ser inhibido al bloquear el efecto angiogénico que sustancias mitógenas ejercen sobre las células endoteliales y de esta forma mantener un estado quiescente o incluso revertirlo (Vazquez et al., 2013).

## 1. El proceso angiogénico

Las células tumorales producen y liberan factores pro-angiogénicos que difunden hacia tejidos adyacentes y se unen a receptores específicos ubicados en células endoteliales (EC) de vasos sanguíneos preexistentes cercanos. Una vez que los factores de crecimiento se unen las EC se activan y en consecuencia se envían señales desde de la superficie celular hacia núcleo (Figura 1). Posteriormente se da la remoción de los pericitos del vaso sanguíneo que va a dividirse, las células comienzan a proliferar y migran a través del torrente sanguíneo hacia el tejido tumoral. Las integrinas sirven como soporte para tirar del nuevo brote de los vasos sanguíneos hacia adelante. También se producen metaloproteasas (MMP) que degradan la matriz extracelular vecina a la punta del vaso en formación. A medida que el vaso se extiende, el tejido se remodela a su alrededor. Las células endoteliales germinadas se enrollan para formar los tubos sanguíneos, mientras que los tubos individuales se conectan para formar bucles. Finalmente, los tubos sanguíneos recién formados se estabilizan mediante células musculares especializadas que proporcionan soporte estructural y se inicia el flujo sanguíneo (Pandya, Dhalla and Santani, 2006).



### Figura 1. Desarrollo del proceso angiogénico

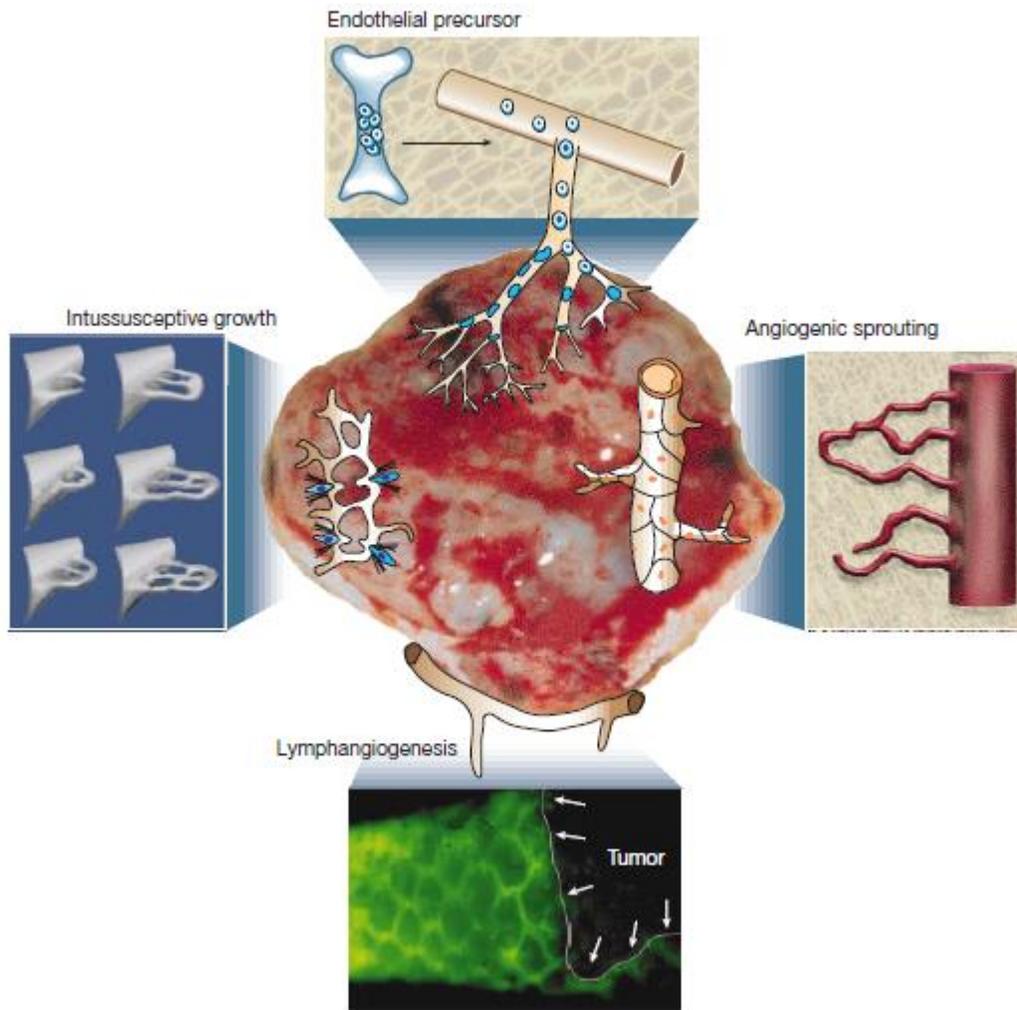
La formación de nuevos vasos sanguíneos sigue un estricto orden de eventos que involucra la activación, proliferación y migración de las células endoteliales (EC, por sus siglas en inglés) en respuesta a factores pro-angiogénicos liberados por las células tumorales. La imagen resume las diferentes etapas que se llevan a cabo durante el proceso angiogénico. (Pandya, Dhalla and Santani, 2006).

#### 1.1 Angiogénesis fisiológica

La angiogénesis no patológica se presenta en procesos biológicos como el ciclo endometrial, la cicatrización y la adaptación a largo plazo del flujo sanguíneo por los órganos (Chung, 2011). El proceso angiogénico también ocurre de manera normal en diferentes procesos fisiológicos como la vasculogénesis, que es la proliferación y formación del plexo capilar primario, proceso *de novo*, y la angiogénesis fetal que es la remodelación del plexo capilar primario para la formación de nuevos vasos a partir de los existentes (Otrock *et al.*, 2007).

## **1.2 Angiogénesis patológica**

La angiogénesis patológica generalmente ocurre por un desbalance de factores pro- y anti-angiogénicos lo que da lugar a una vascularización excesiva o deficiente en numerosas enfermedades como el crecimiento tumoral, artritis reumatoide, enfermedad isquémica del corazón, cicatrización de heridas y retinopatía diabética (Pandya, Dhalla and Santani, 2006). En enfermedades isquémicas la angiogénesis es deficiente debido a la regresión de vasos sanguíneos, a la disfunción de las células endoteliales o a una revascularización deficiente (Losordo, 2004). Caso contrario son las enfermedades como el cáncer en donde la alta concentración de factores pro-angiogénicos induce la formación de vasos sanguíneos mediante diferentes mecanismos: 1) angiogénesis; 2) intususcepción, en donde los vasos tumorales se remodelan y expanden mediante la inserción de columnas de tejido intersticial en el lumen de los vasos preexistentes; y 3) los precursores de células endoteliales (angioblastos) se alojan desde la médula ósea o la sangre periférica hacia los tumores y contribuyen al revestimiento endotelial de los vasos tumorales (vasculogénesis). De igual manera que la angiogénesis, la linfangiogénesis contribuye a la diseminación de las células tumorales (Figura 2) (Pandya, Dhalla and Santani, 2006).



**Figura 2. Formación de vasos sanguíneos intratumorales: mecanismos moleculares y celulares**

Los mecanismos celulares de angiogénesis tumoral que contribuyen a la supervivencia y diseminación de células cancerosas incluyen: angiogénesis, intususcepción y vasculogénesis via precursores endoteliales. Se muestra además el proceso de linfangiogénesis el cual contribuye de manera importante al desarrollo de metástasis.

La formación de tumores resulta de la combinación de alteraciones genéticas y epigénéticas que activan oncogenes y/o inhiben genes supresores de tumores, lo cual provoca que la tasa de proliferación celular aumente y la apoptosis disminuya, procesos concomitantes que resultan en el crecimiento hiperplásico temprano. La angiogénesis es constantemente estimulada por factores de crecimiento producidos en exceso dentro del microambiente tumoral formado por un conjunto de células tumorales, fibroblastos, macrófagos, linfocitos T y otras células inflamatorias (Wicki and Christofori, 2008).

Los tumores pueden absorber suficientes nutrientes y oxígeno por difusión simple hasta un tamaño de 1-2 mm<sup>3</sup>, pero su crecimiento requiere suministro vascular.

Sin embargo, una vez que el tumor ha alcanzado un tamaño crítico, las células tumorales que se encuentran distantes de los vasos sanguíneos carecen de un suministro suficiente de oxígeno y nutrientes, por lo cual mueren por necrosis o apoptosis. Por lo anterior, las células tumorales activan vías de señalización que les permiten evadir estos procesos e inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos que les suministren los nutrientes necesarios. La angiogénesis no solo contribuye al aporte de nutrientes a las células tumorales sino que también ofrece una ruta de diseminación de las células cancerosas a través del torrente sanguíneo que permite la invasión de órganos distantes conocida como metástasis (Raica, Cimpean and Ribatti, 2009).

## **2. Terapia antiangiogénica**

Los inhibidores endógenos de la angiogénesis son fragmentos de algunas proteínas específicas que pueden inhibir la formación de vasos sanguíneos (Ribatti, 2009b). Estos inhibidores pueden ser detectados en el torrente sanguíneo, lo que sugiere que actúan en el balance anti-angiogénico como reguladores en condiciones fisiológicas normales (Ribatti, 2009b).

La mayoría de los fármacos inhibidores de la angiogénesis (Tabla 1) derivan de moléculas más grandes que componen la matriz extracelular (MEC). Los fragmentos son liberados por proteólisis de MEC y de la membrana basal por metaloproteasas (MMPs), catepsinas y elastasas (Sund, Xie and Kalluri, 2004).

**Tabla 1. Péptidos antiangiogénicos**

<b>Péptido anti-angiogénico</b>	<b>Blanco celular endotelial</b>	<b>Fase clínica</b>
Angiostatina	Se une a la ATP sintasa, a angiomotina y annexin II en células endoteliales para inhibir la proliferación y migración celular.	Fase 1
Bevacizumab	Anticuerpo monoclonal recombinante humano contra el factor de crecimiento vascular (VEGF).	Fase II y III
Canstatina	Se cree que se une a la integrina - $\alpha$ , $\beta$ para inhibir la proliferación, migración y formación de tubos de células endoteliales.	Fase preclínica
Combrestatina	Microtúbulos Induce la reorganización del citoesqueleto de actina.	Fase I completa
Endostatina	Se cree que tiene como blanco la integrina - $\alpha$ , $\beta$ para inhibir la proliferación y migración e induce la apoptosis de células endoteliales en proliferación; no afecta el proceso de saneamiento.	Fase I y II
NM-3	Un inhibidor de la molécula pequeña de VEGF. Inhibe selectivamente la proliferación celular de células endoteliales.	Fase I
Trombospondina	Bloquea la migración y neovascularización de células endoteliales en la córnea; puede no ser específico para células endoteliales.	Fase I
Vasostatina 30	Se une específicamente a laminina e impide la unión de células endoteliales.	No aún
Vasoinhibina II.14.1	No se ha descrito.	No aún

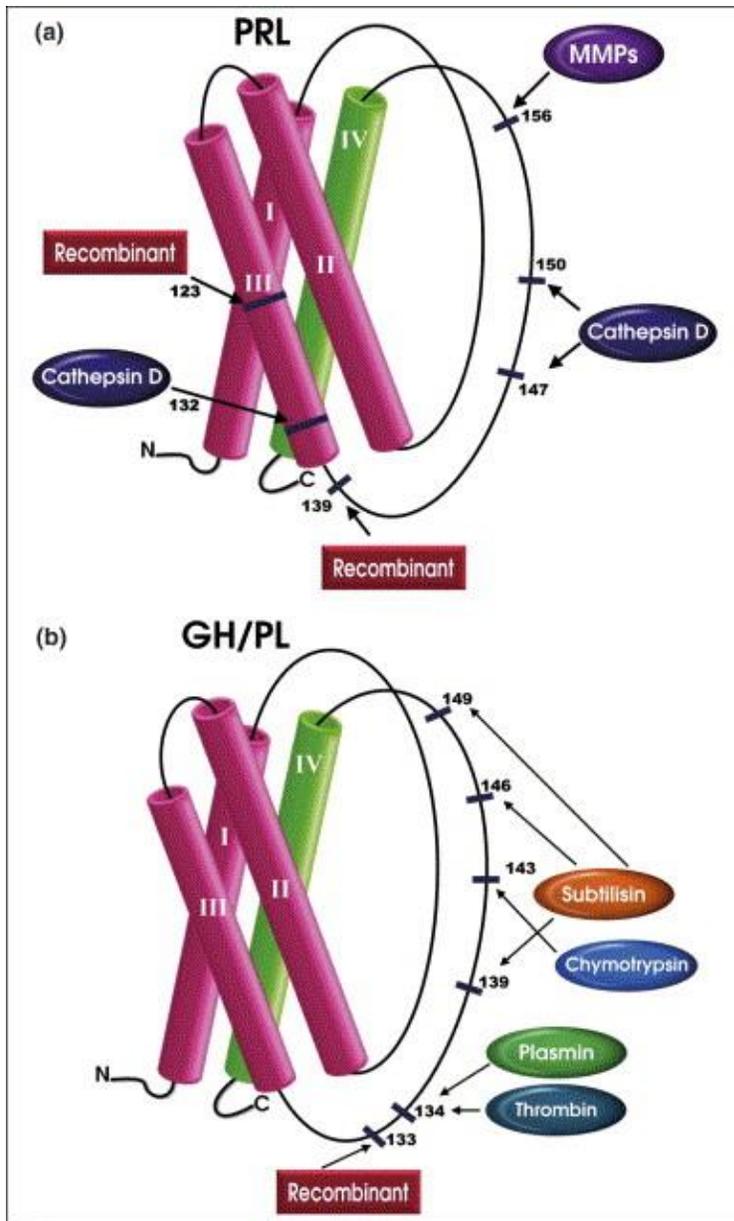
Adaptado de (Kerbel and Folkman, 2002)

### **2.1 Vasoinhibina Vi-II-14.1**

Las vasoinhibinas son péptidos anti-angiogénicos derivados de la prolactina humana (hPRL), son generados por un corte proteolítico en o cerca del loop largo que conecta la tercera o cuarta  $\alpha$ -hélice, comprendiendo los residuos 138-160 en hPRL y 129-153 en la hormona del crecimiento (GH) y lactógeno placentario (PL) (Figura 3) (Clapp *et al.*, 2006).

La hPRL es una hormona proteínica de 22-23 kDa formada por 4 hélices- $\alpha$  organizadas en una configuración “arriba-arriba-abajo-abajo” y conteniendo dos (en GH y PL) o tres (en PRL) puentes di sulfuro. Es producida principalmente por células lactótropas en la hipófisis anterior. La PRL humana tiene numerosas funciones en la reproducción, el metabolismo, la regulación del sistema inmune, la

osmorregulación y la conducta (Clapp *et al.*, 1994). La vaso inhibina derivada de PRL induce apoptosis por medio de la caspasa 3 (Martini *et al.*, 2000) y NF- $\kappa$ B así como la inhibición de proliferación endotelial, migración e impedimento de la vasodilatación (Zhu *et al.*, 2017).

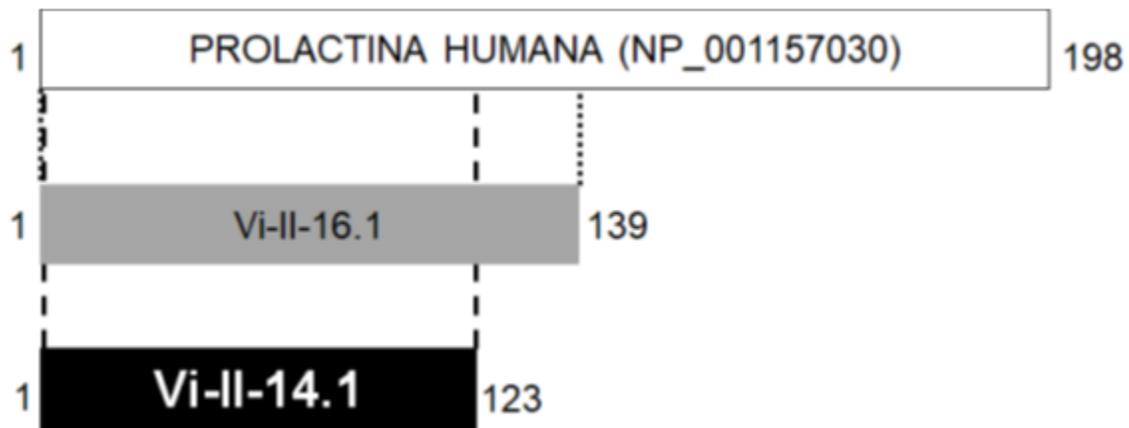


**Figura 3. Representación estructural de la familia PRL/GH/PL de hormonas polipeptídicas y sus sitios de corte para la generación de vaso inhibinas**

Las estructuras han sido simplificadas y las posiciones de los loops cambiadas para facilitar la visualización. Se indican los sitios conocidos en donde las proteasas cortan las respectivas moléculas, como lo son la terminación de las vaso inhibinas recombinantes, que son sintetizadas directamente como la forma más corta. Los aminoácidos C- terminal de las vaso inhibinas cortadas están indicadas por el número de residuo. El corte de la molécula parental resulta en la remoción de la hélice IV, ilustrada en verde (Clapp *et al.*, 2006).

Varias proteasas cortan tanto en formas purificadas como recombinantes en las tres hormonas en múltiples sitios. La proteólisis de la hPRL por catepsina D produce los péptidos antiangiogénicos 1-32 (15.0 kDa), 1-47 (16.8 kDa) y 1-150 (17.2 kDa) (Piwnica *et al.*, 2004) y las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 y MMP-13) cortan la unión en el péptido 156-157 en PRL para generar una vaso inhibina de 17 kDa que puede después ser procesada por MMPS para generar vaso inhibinas de 16 y 14 kDa (Macotela, 2006).

La Vi-II- 14.1 es la Vi que contiene los primeros 123 aminoácidos de la PRL (Figura 4), esta es producida por la acción de MMPs y catepsina D. La Vi-II- 14.1 mantiene el mismo efecto anti-proliferativo que la vaso inhibina de 16 kDa, la vaso inhibina más estudiada. En nuestro grupo de trabajo se ha producido la Vi-II-14.1-6His en *E. coli* y fue purificada mediante cromatografía de afinidad y mostró actividad anti proliferativa en cultivos de células endoteliales de vasos coronarios de rata (Vazquez Rodriguez, Gonzalez and De Leon Rodriguez, 2013).



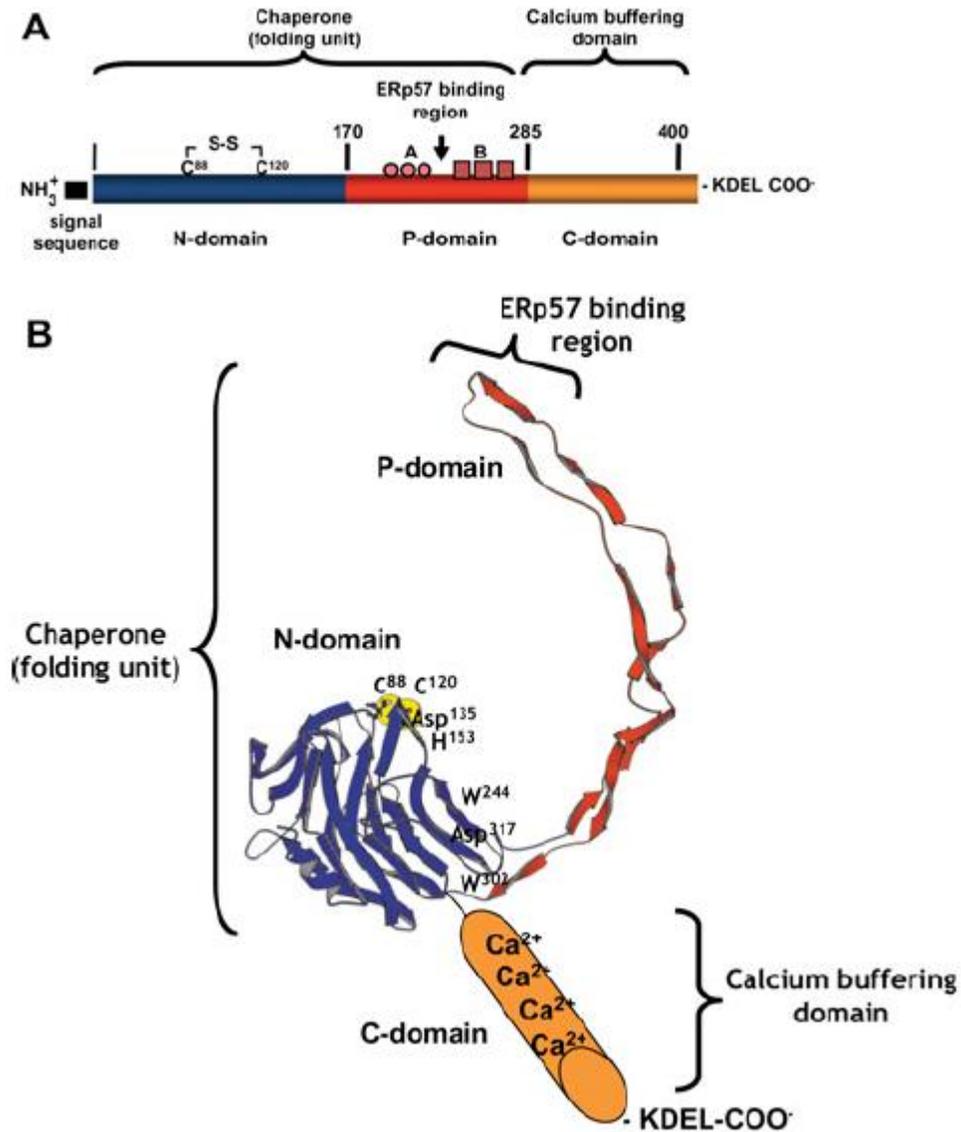
**Figura 4. Representación de la vaso inhibina**

Se muestra una representación esquemática de la PRL humana y los péptidos Vi-II-16.1 y Vi-II-14.1 los cuales derivan del extremo amino terminal. Se incluye además la clave de acceso a la secuencia de aminoácidos de la PRL humana. Los números a los extremos representan el número de aminoácido.

## 2.2 Vasostatina 30

La vasostatina (Vs) es un péptido anti-angiogénico derivado del extremo amino terminal de la calreticulina humana (hCALR). La hCALR es una proteína de 46 kDa de unión a  $Ca^{2+}$  y actividad chaperona. La proteína contiene una secuencia N-terminal escindible que dirige al retículo endoplasmático (ER) y una señal de retención en ER KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu). La hCALR está involucrada en el correcto plegamiento de polipéptidos nacientes que atraviesan el ER. La hCALR

está implicada en un gran número de procesos biológicos incluyendo el plegamiento de proteínas, la regulación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , la modulación de vías transcripcionales, adhesión celular, apoptosis, desarrollo embrionario entre otros (Figura 5) (Michalak *et al.*, 2009).



**Figura 5. Estructura modelo de calreticulina**

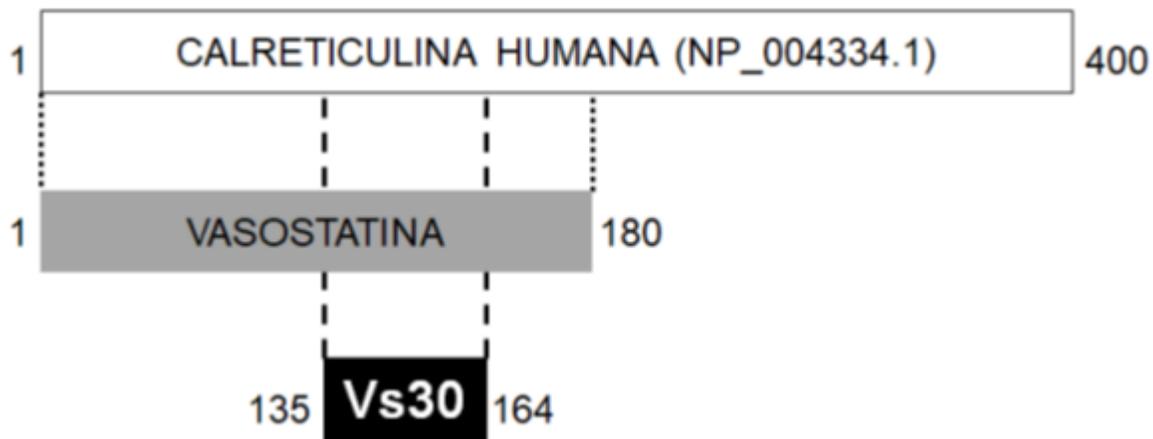
A) Representación lineal de los dominios de calreticulina. La proteína contiene una secuencia señal N terminal (caja negra), un dominio N (caja azul), dominio P (caja roja), dominio C (caja naranja) y una señal C-terminal KDEL. B) Modelo tridimensional de los dominios N y P de calreticulina basados en estudios de NMR. (Michalak *et al.*, 2009).

La Vs fue obtenida originalmente de sobrenadantes de la línea celular VDS-O inmortalizada con el virus de Epstein-Barr. El sobrenadante inhibió de manera significativa la proliferación de células HUVEC y células endoteliales fetales de

corazón bovino (FBHE) inducida por el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (Pike *et al.*, 1998).

La Vs inhibe la angiogénesis *in vivo*, suprime la neovascularización *in vivo*, previene o reduce el crecimiento tumoral experimental, e inhibe la migración celular endotelial por la unión a laminina  $\alpha 5$ , y  $\gamma 1$  (Pike *et al.*, 1998)(Yao, Pike and Tosato, 2002).

El dominio activo de Vs está comprendido en los 135-164 aminoácidos N-terminales de hCALR (Vs30) (Figura 6).



### Figura 6. Representación de la vasostatina

Se muestra una representación esquemática de la hCALR y los péptidos vasostatina y Vs30 los cuales derivan del extremo amino terminal. Se incluye además la clave de acceso a la secuencia de la calreticulina humana. Los números a la derecha representan el número de aminoácido.

La Vs30 inhibe la proliferación de células endoteliales, suprime la angiogénesis *in vivo*, cuenta con actividad antiinflamatoria y no afecta el proceso de reparación de heridas (Pike *et al.*, 1998; Calderon-Salais *et al.*, 2018) (Pike *et al.*, 1998).

Además, Vs30 puede inhibir la proliferación celular endotelial *in vitro*, suprimir la neovascularización *in vivo* y prevenir o reducir el crecimiento de tumores (Pike *et al.*, 1998). Comparado con otros inhibidores de la angiogénesis como trombospondina, angiostatina y endostatina, la vasostatina es pequeña, soluble y estable, además de ser fácil de producir y utilizar. El péptido puede ser producido mediante síntesis química, sin embargo esta no es la plataforma ideal para producción a gran escala debido a que los costos de producción y purificación son mayores que con el enfoque biotecnológico (Andersson *et al.*, no date; Bray, 2003; Li, 2011).

### **3. Proteínas de fusión**

Las proteínas de fusión están formadas por la traducción de dos o más genes previamente independientes que se han unido de manera natural o mediante manipulación genética. Las proteínas de fusión son usadas terapéuticamente para extender la vida media o combinar mecanismos de acción en una sola entidad proteínica (Czajkowsky *et al.*, 2012).

### **4. *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas**

El uso de *P. pastoris* para la producción heteróloga de proteínas es altamente efectiva. La disponibilidad de promotores inducibles y constitutivos, así como de marcadores de selección, señales de secreción, cepas deficientes de proteasas y mejor entendimiento de los patrones de glicosilación, ha dado a los investigadores diversos medios para la producción de proteínas heterólogas. Existen fármacos comerciales producidos en *P. pastoris* como la albumina sérica humana (Japón) y la ocrisplamina (Bélgica)(Yang and Zhang, 2018). En comparación a la producción en *E. coli*, este sistema puede evitar pasos como: 1) la extracción de proteína por lisis celular, 2) el procesamiento de cuerpos de inclusión y 3) el análisis de controles adicionales para endotoxinas, las cuales pueden modular la proliferación de células endoteliales (Baltzer, 1994). Esta diversidad incluso ha permitido la producción de proteínas de membrana complejas como los receptores acoplados a proteínas G (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Se han producido múltiples proteínas de fusión con actividad anti-angiogénica (Tabla 2). Generalmente se ha utilizado la expresión inducible para la producción de estas proteínas a excepción de canastatina-N (Calderón Salais 2018).

**Tabla 2. Proteínas de fusión con actividad anti-angiogénica**

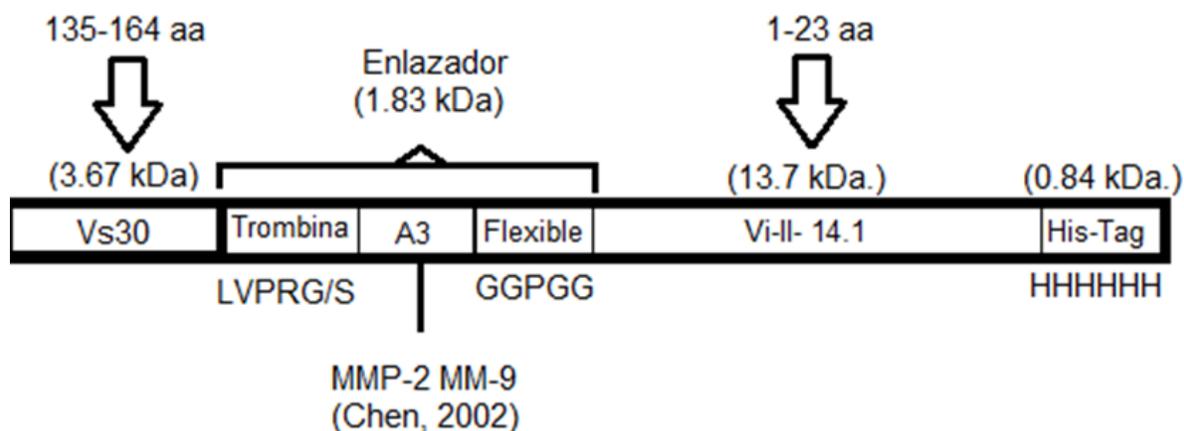
Sistema de expresión	Proteína de fusión	N-Terminal	Enlazador	C-terminal
<i>E. coli</i>	PFV	Fragmento C-13 del factor plaquetario 4	G-P-G	Vs30
	ALV	Fragmento ATF de la urokinasa	G <sub>4</sub>	VAS
	VS_VI	Vs30	G <sub>2</sub> -P-G <sub>2</sub>	Vasoinhibina Vi-II-14.1
	VTF	VAS	(G-S-G) <sub>2</sub>	Tumstatina
	T-CAM	Fastatin	-	Fragmento de la fibronectina FII (9-10)
<i>S. cerevisiae</i>	HSA-TIMP-2	HSA	-	TIMP-2
Células 293t	RBDV-Ig	RBDV dominio de unión a receptor del VEGF		Porción Fc de IgG1 humana
<i>P. pastoris</i>	E-K5	Endostatina Derivado colágeno tipo XVIII		Fragmento del plasminógeno Kringle
	rhHSA-VEGF16 5b	HSA		VEGF165b
	Vs_Vi	Vs30	G <sub>2</sub> -P-G <sub>2</sub>	Vasoinhibina Vi-II-14.1

Aunque los sistemas de expresión de *P. pastoris* disponibles son eficientes y fáciles de usar con protocolos bien establecidos, se requiere optimizarlos para lograr la máxima producción de la proteína deseada (Macauley-Patrick et al., 2005).

#### **4.1 Proteína de fusión Osiris**

En este trabajo se expresó la proteína de fusión denominada Osiris compuesta por Vs30, un enlazador multicomponente, Vi-II-14.1 y una etiqueta de polihistidinas. El enlazador contiene la secuencia de corte de la trombina, la secuencia A3 y una región flexible de tipo GGPGG. La secuencia A3 es reconocida por las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 presentes en los sitios hiperproteolíticos

tumorales (Figura 7). Esta secuencia se añadió con la intención de que los péptidos V30 y Vi-II-14-1 sean escindidos y puedan actuar de manera independiente. La secuencia de ADN que codifique Osiris será diseñada de acuerdo con la secuencia de aminoácidos y el uso preferencial de codones de *P. pastoris* (Calderon-Salais, 2018).



**Figura 7. Representación de Osiris**

Se muestran las coordenadas y clave de acceso de las secuencias de aminoácidos de Vs30 y Vi-II-14.1 dentro de las proteínas parentales, el peso molecular teórico y la secuencia de los componentes del enlazador. La diagonal en las secuencias representa el sitio de corte de la proteasa en cuestión (Chen, 2002).

## 5. Pez cebra como modelo de estudio

La investigación biomédica depende del uso de modelos animales para estudiar y entender la patogénesis de las enfermedades humanas a nivel celular y molecular y provee herramientas para el desarrollo de nuevas terapias (Currie, 2007).

A pesar de la preeminencia del ratón en el modelado de enfermedades humanas, varios aspectos de la biología murina, así como los costos de insumos e infraestructura para el manejo del modelo limitan su uso rutinario en el escrutinio genético y terapéutico a gran escala.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un organismo modelo para el estudio de la biología de vertebrados, siendo adecuado para análisis genéticos y de desarrollo embrionario. El rápido desarrollo, así como su claridad óptica durante la embriogénesis permiten el análisis visual de los procesos de desarrollo temprano, así como la alta fecundidad y los tiempos de vida cortos facilitan los análisis genéticos. Por medio de escrutinios genéticos a gran escala en este modelo se han identificado > 500 fenotipos mutantes en varios aspectos del desarrollo temprano, muchos de los cuales se asemejan a trastornos clínicos humanos (Kimberly Dooley and Leonard I Zon, 2000).

### **5.1 Pez cebra para el estudio de metástasis**

Existe abundante evidencia que independientemente del proceso celular de transformación, el fenotipo de metástasis esta genéticamente controlado (Teng *et al.*, 2013). La metástasis es un proceso de varios pasos que involucra invasión tumoral local seguida por la diseminación y restablecimiento en sitios distantes. Gracias a la fácil manipulación genética del pez cebra, se han obtenido una amplia gama de cepas transgénicas que expresan proteínas fluorescentes en tipos celulares determinados. Un ejemplo es la fusión de la región reguladora del gen *fli1* con la secuencia codificante de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) dando lugar a la cepa Tg (*fli1*: EGFP)<sup>y1</sup> la cual presenta vasos sanguíneos verde fluorescentes. Dicha cepa ha sido ampliamente utilizada en el estudio de angiogénesis tumoral y metástasis (Delov *et al.*, 2014), además, debido a la transparencia de los embriones de pez cebra es posible analizar eventos tempranos del proceso metastásico *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia. Debido a lo anterior, el modelo de pez cebra representa un sistema *in vivo* adecuado para la rápida y precisa evaluación de la efectividad de moléculas candidatas para tratamientos anti-cancer (Teng *et al.*, 2013).

## **Justificación**

La angiogénesis es un blanco sumamente importante para la terapia contra el cáncer. La inhibición de la angiogénesis previene el crecimiento tumoral y diseminación celular por lo cual en el presente trabajo se propone realizar la expresión de la proteína de fusión Osiris (Vs30- Vi-II-14.1) en *P. pastoris*, así como la evaluación de la actividad biológica del péptido anti-angiogénico vasostatina (Vs30).

## **Objetivos generales**

Expresar la proteína anti-angiogénica Osiris en *P. pastoris*.

Evaluar la actividad biológica de las proteínas anti-angiogénicas en sistemas *in vitro* e *in vivo*.

## **Objetivos específicos**

Comparar la expresión constitutiva e inducida de la proteína de fusión Osiris.

Evaluar la actividad anti-proliferativa de la Vs30 sintética (sVs30) en líneas celulares de cáncer de mama.

Evaluar la actividad anti-metastásica y anti-angiogénica de Vs30 y sVs30 *in vivo* en pez cebra.

# Material y métodos

## 1. Material

### 1.1 Cepas

La propagación de los plásmidos se realizó en *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen) con el genotipo: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*. Las cepas comerciales de Invitrogen de *P. pastoris* se han reclasificado en dos especies *Komagataella phaffii* y *Komagataella pastoris*. Por tanto, para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa deficiente de proteasas SMD1168 (pep4) de *Komagataella pastoris*.

### 1.2 Plásmidos

Se utilizó el vector pGAPZαA para la expresión constitutiva, el cual cuenta con el promotor pGAP y un gen de resistencia a la zeocina que puede ser utilizado como marcador de selección en *E. coli* y en *P. pastoris*. Por otra parte, el vector de expresión inducible pPIC9K cuenta con el promotor de la AOX1 y un gen de resistencia a G418 para la selección en *P. pastoris* y un gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli*.

### 1.3 Secuencias de péptidos de interés

En la tabla 3 y 4, se enlistan las secuencias de los diferentes componentes de Osiris y los oligonucleótidos comerciales para la verificación de la inserción de los vectores de expresión en el genoma de *P. pastoris*.

**Tabla 3 Secuencias nucleotídicas y aminoácidas de interés**

Anti-angiogénico	Longitud en pares de bases (pb) aminoácidos (aa)	Secuencia
<b>Vs30</b>	117 pb	GAATTCGATATTTGCGGTCCAGGAACCAAGAAGGTCCACGTCAT TTTCAACTACAAGGGAAAGAATGTCCTTATTAACAAAGATATTAGA TGCAAGCACCACCACCACCACCCTAA
	38 aa	EFDICGPGTKKVHVIFNYKGNVLINKDIRCKHHHHHH.
<b>Vi-II-14.1</b>	390 pb	ATGCTTCCAATTTGTCCTGGTGGAGCAGCTAGATGCCAAGTCAC TTTGAGAGATCTTTTTGACAGAGCTGTTGTCTTGAGTCATTACAT CCACAACCTTTCTTCCGAAATGTTTCTCAGAGTTCGATAAGAGAT ACACCCATGGTAGAGTTTTTATTACTAAGGCTATCAATTTCTTGT CACACTTCAAGTTTTGGCTACACCAGAAGATAAGGAGCAAGCCC AACAGATGAACCAGAAAAGACTTCTTGTCTCTTATTGTTCCATCT TGAGATCATGGAATGAACCTTTGTACCATCTTGTACTGAAGTCA GAGGAATGCAGGAGGCCCTGAAGCCATTCTTCCAAGGCAGT TGAGATTGAACACCACCACCACCATTAA
	129 aa	EFMLPICPGGAARCQVTLRDLFDRVVLVSHYIHNLSSEMFEFDKRY THGRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKDFLSLIVSILRSW NEPLYHLVTEVRGMQEAPAILSKAVEIEHHHHHH.
<b>VS_VI [59]</b>	495 pb	GAATTCGACATCTGTGGCCCTGGCACCAAGAAGGTTTCATGTCAT CTTCAACTACAAGGGCAAGAACGTGCTGATCAACAAGGACATCC GTTGCAAGGGTCCAGGTGGTATGTTGCCCATCTGTCCCGG CGGGGCTGCCGATGCCAGGTGACCCTTCGAGACCTGTTTGAC CGCGCCGTGCTCCTGTCCCACTACATCCATAACCTCTCCTCAGA AATGTTCCAGCGAATTCGATAAACGGTATACCCATGGCCGGGGGT TCATTACCAAGGCCATCAACAGCTGCCACACTTCTTCCCTTGCCA CCCCGAAGACAAGGAGCAAGCCCAACAGATGAATCAAAAAGAC TTTCTGAGCCTGATAGTCAGCATATTGCGATCCTGGAATGAGCCT CTGTATCATCTGGTCACGGAAGTACGTGGTATGCAAGAAGCCCC GGAGGCTATCCTATCCAAGCTGTAGAGATTGAGCACCACCACC ACCACCCTAA
	164 aa	EFDICGPGTKKVHVIFNYKGNVLINKDIRCKGGPGLPICPGGAA RCQVTLRDLFDRVVLVSHYIHNLSSEMFEFDKRYTHGRGFITKAIN SCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKDFLSLIVSILRSWNEPLYHLVTEVR GMQEAPAILSKAVEIEHHHHHH.
<b>OSIRIS</b>	540 pb	GAATTCGATATTTGCGGTCCAGGAACCAAGAAGGTCCACGTCAT TTTCAACTACAAGGGAAAGAATGTCCTTATTAACAAAGATATTAGA TGCAAGTTGGTTCCAAGAGGTTCCGCTGCCAACCTAGAGCCTT <b>GACAGCAGGTGGACCAGGTGGAATGCTTCCAATTTGCTCTGGT</b> <b>GGAGCAGCTAGATGCCAAGTCACTTTGAGAGATCTTTTTGACAG</b> AGCTGTTGTCTTGAGTCATTACATCCACAACCTTTCTTCCGAAAT GTTCTCAGAGTTCGATAAGAGATACCCATGGTAGAGGTTTTAT TACTAAGGCTATCAATTCTTGTACACTTCAAGTTTTGGCTACACC AGAAGATAAGGAGCAAGCCCAACAGATGAACCAGAAAAGACTTCT TGTCTCTTATTGTTCCATCTTGGATCATGGAATGAACCTTTGTA CCATCTTGTACTGAAGTCAGAGGAATGCAGGAGGCCCTGAAG CCATTCTTCCAAGGCAGTTGAGATTGAACACCACCACCACCAC CATTAG
	179 aa	EFDICGPGTKKVHVIFNYKGNVLINKDIRCKLVPRGSAKPRALTA <b>GGPGLPICPGGAARCQVTLRDLFDRVVLVSHYIHNLSSEMFEF</b> DKRYTHGRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKDFLSLIVSIL RSWNEPLYHLVTEVRGMQEAPAILSKAVEIEHHHHHH.

**Tabla 4. Primers**

Primer	Secuencia
pGAP Forward	5'-GTCCCTATTTCAATCAATTGAA-3'
3' AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

### **1.4 Líneas celulares**

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mamá negativas a receptor de estrógeno (ER-) MDA-MB-468, MDA-MB-231 y ER+ T47D las cuales fueron obtenidas y autenticadas por la American Type Culture Collection (ATCC). Las células ER- MDA-MB-231 y MDA-MB-468 fueron cultivadas en medio DMEM libre de rojo de fenol suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 2mM glutamina y 50 IU/mL/50 µg/mL penicilina/estreptomicina, mientras que las células ER+ T47D fueron mantenidas en medio Opti-MEM con 4% FBS.

### **1.5 Embriones de pez cebra**

Se utilizaron embriones transgénicos de la cepa Tg (fli1: EGFP) <sup>y1</sup> los cuales expresan la proteína verde fluorescente en células endoteliales. Tres días antes de los experimentos, los peces cebra adultos se colocaron en acuarios de crianza y los huevecillos fueron recolectados al día siguiente e incubados en medio embrionario E3 a 28°C. Después de 48 horas de incubación, dos días post-fertilización (2 dpf), el corion fue removido bajo microscopio. Para las microinyecciones, los embriones fueron colocados en moldes de agarosa y anestesiados con 0.5 mg/mL de tricaina.

## **2. Métodos de producción y manipulación de ADN**

### **2.1 Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina**

Se utilizó el método de lisis alcalina para la producción de ADN plasmídico, que se llevó a cabo de la siguiente manera:

a) Condiciones de cultivo y antibióticos.

Se sembró una colonia de *E. coli TOP10F'* en 2 mL de medio LB y se incubó entre 16 a 18 horas en agitación constante a 37°C. Se utilizó el antibiótico zeocina (25 mg/mL) y LB de bajas sales para la producción de los plásmidos derivados de pGAPZαA, para el resto se utilizó ampicilina (50 mg/mL) y LB convencional. Después, se colocó el cultivo en un tubo de 1,5 mL, se centrifugó por 1 minutos a 12,000 rpm y se descartó el sobrenadante.

b) Lisis alcalina

Se agregaron 100µL de la solución Birnboim I y se resuspendió la pastilla completamente. Después, se adicionaron 200µL de la solución Birnboim II y se mezcló por inversión hasta que la mezcla estuviera transparente (Nota: una mezcla no transparente es señal de una lisis bacteriana deficiente.) Luego, se agregaron 150µL de la solución Birnboim III y se mezcló por inversión hasta la aparición de precipitados.

Después, se agregaron 20µL de cloroformo, se centrifugó a 12,500 rpm por 5 minutos y se recuperó del sobrenadante.

#### c) Precipitación de ADN plasmídico

Se precipitó el ADN plasmídico de la siguiente manera: se agregaron 50 µL de acetato de sodio 3M y 1 mL de etanol absoluto frío. Después, se incubó la mezcla anterior durante 20-40 minutos a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 12,500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla. Se resuspendió en 50µL de H<sub>2</sub>O.

### **2.2 Extracción de ADN total de *P. pastoris***

Se extrajo el ADN total de las transformantes de *P. pastoris* con el fin de verificar la inserción del casete de expresión en el genoma. Para esto se utilizó el método de PCR de colonia ya que es un método sencillo y económico que permite el procesamiento de un gran número de cepas en poco tiempo. Se colocó una colonia de las cepas transformantes de *P. pastoris* en 50 µL de H<sub>2</sub>O y se incubó a 100°C durante 10 minutos y se colocó en microondas por 5 minutos a máxima potencia (nota las colonias a analizar no deben de superar 2 semanas de almacenamiento a 4°C). Después, se centrifugó el lisado a 12,500 rpm por 1 minuto y se utilizó 1 µL del sobrenadante como ADN molde para una reacción de 15 µL de PCR. El sobrenadante puede almacenarse a 4°C durante 24 h.

### **2.3 Amplificación de genes por PCR**

Se utilizó el método de PCR para la amplificación de los genes Osiris. Se utilizaron los oligonucleótidos pGAP forward y 3'AOX1 para amplificar el casete de expresión del plásmido pGAPα y los oligonucleótidos Factor-α y 3'AOX1 para Ppick9k. Las condiciones de temperatura fueron las siguientes:

- a) 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min (15 minutos para PCR de colonia).
- b) 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento por 30 segundos y 72 °C durante 40 segundos para todos los genes.
- c) 1 ciclo de extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

## **2.4. Electroforesis en gel de agarosa**

Se utilizaron geles de agarosa con una concentración de 1.2% para los fragmentos menores a 500 pb, 1% para fragmentos de 500 pb a 4 kb. Se utilizó buffer TAE y se administró 90 voltios por 50 minutos para geles de agarosa de 1%. Se realizó la tinción del ADN con bromuro de etidio por 10 minutos y se analizó en un transiluminador de luz UV.

## **2.5. Preparación de células competentes de *E. coli***

Se obtuvieron células competentes de *E. coli* mediante el tratamiento con cloruro de rubidio, de la siguiente forma:

- a) Se sembró una colonia de *E. coli* TOP10F' en 5 mL de LB y se incubó toda la noche en agitación constante a 37 °C. Después, se añadieron 2 mL de pre-cultivo en 200 mL de LB y se incubó en las mismas condiciones hasta llegar a una DO<sub>550</sub> de 0.5 (Aproximadamente 3 horas).
- b) Se centrifugó la pastilla celular en 10 mL de la solución reguladora I y se incubó por 20 minutos en hielo.
- c) Se repitió el paso b) y se resuspendió la pastilla celular en 2 mL de la solución reguladora II. Después, se realizaron alícuotas de 200 µL en tubos estériles de 1.5 mL y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

## **2.6 Transformación de *E. coli* por choque térmico**

Se agregó el plásmido pGap-Osiris a 100 µL de células competentes en un tubo de 1.5 mL y se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo. El choque térmico se realizó a 42 °C por 45 segundos y después se incubó en hielo durante 1 minuto. Posteriormente, se agregaron 500 µL de medio LB y se incubó a 37 °C por 40 minutos en reposo y 20 minutos en agitación. Se centrifugó por 30 segundos a 3,000 rpm y se descartó el sobrenadante hasta un volumen de 50 µL de sobrenadante y se sembró en una placa de Petri con medio LB con ampicilina (50 µg/mL) o en medio LB de bajas sales con zeocina (25 µg/mL) para los plásmidos derivados de pGAPZαA.

## **3. Transformación de *P. pastoris***

### **3.1 Preparación de células de *P. pastoris* electrocompetentes**

- a) Se sembró una colonia de *P. pastoris* en 5mL de YPD y se incubó toda la noche en agitación constante a 28 °C. Después, se añadieron 125µL del pre-cultivo en 125mL de YPD y se incubó en las mismas condiciones hasta llegar a una DO<sub>600</sub> de 1-1.3 (Nota: en aproximadamente 14 y 16 h).
- b) Se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- c) Se resuspendió la pastilla celular en 60 mL de H<sub>2</sub>O estéril fría.

d) Se repitió el paso b) y se resuspendió la pastilla celular en 30mL de H<sub>2</sub>O estéril fría.

e) Se repitió el paso b) y se resuspendió la pastilla celular en 10mL de sorbitol 1 M estéril frío.

f) Se repitió el paso b) y se resuspendió la pastilla celular en 250mL de sorbitol 1M estéril frío. Después, se realizaron alícuotas de 80  $\mu$ L en tubos estériles de 1.5 mL y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. Nota: no exceder las 12 h de almacenamiento.

### **3.2 Linealización y concentración de vectores de expresión**

Es necesario linealizar 10-15  $\mu$ g en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O del vector de expresión para la transformación de *P. pastoris*. Se utilizó la enzima *Bam*HI para linealizar el plásmido pGAPZ $\alpha$ A. Se realizaron de 5 a 7 digestiones por separado en 2  $\mu$ g de vector de expresión y se incubaron a 37 °C por 3 horas. Después se juntaron las reacciones de digestión en un tubo de 1.5 mL y se adicionó H<sub>2</sub>O hasta llegar a un volumen de 250  $\mu$ L. Luego se agregó 1 volumen de fenol-tris, se mezcló y se centrifugó a 12,500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, se recuperó la fase superior y se precipitó con alcohol absoluto. El precipitado se resuspendió en 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

### **3.3 Condiciones de electroporación y cultivo de transformantes**

Se mezclaron 10-15  $\mu$ g del vector de expresión linealizado y 80  $\mu$ L de células competentes de *P. pastoris*. Después, se colocó la mezcla en una unidad de electroporación con un tamaño de ranura de 2 mm y se incubó en hielo por 20 minutos.

Luego, se secó la unidad de electroporación, se colocó en el electroporador (Electroporator 2510, Eppendorf) y se dio un pulso a 1,500 V por 5 ms. Inmediatamente después, se agregó 1 mL de sorbitol 1 M frío en la unidad de electroporación, luego se transfirió la mezcla en un tubo de ensayo de vidrio estéril con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se incubó a 28 °C por 2 h en reposo. Posteriormente, se sembraron 400  $\mu$ L de la transformación en cajas Petri con medio YPD adicionado con sorbitol 1M y con una concentración de 100  $\mu$ g/mL de zeocina. Después, se incubaron las cajas Petri a 28 °C durante 72 h. Se realizó PCR de colonia para verificar la inserción del vector de expresión en el genoma de *P. pastoris*.

### **3.4 Transformación por electroporación**

1. Mezclar 80  $\mu$ L de las células competentes con 5- 10  $\mu$ g de ADN linealizado (en 5-10  $\mu$ L de agua estéril) y transferir a una celda de fría de electroporación de 0.2 cm

2. Incubar la celda en hielo por 5 minutos
3. Dar el pulso de electroporación de acuerdo con los parámetros para levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).
4. Agregar inmediatamente 1 mL de sorbitol 1M frío a la celda. Transferir con pipeta Pasteur de vidrio estéril a tubos estériles de vidrio de 15 mL
5. Dejar el tubo incubando sin agitación a 30°C por 1-2 horas.
6. Plaquear 10, 25, 50, 100 y 200 µL en cajas Petri con 100 µg/mL de zeocina. Plaquear a bajas densidades favorece la eficiencia de selección con zeocina.
7. Incubar placas por 2-3 días a 30°C hasta que se formen las colonias (Nota: cubrir las cajas con aluminio, la zeocina es sensible a la luz)
8. Tomar 10-20 colonias separadas y sembrarlas en YPD fresco o placas con YPD con 100 µg/mL zeocina.

## **4. Métodos de expresión, detección, análisis**

### **4.1 Métodos de expresión constitutiva e inducida a nivel matraz**

Expresión constitutiva: Se sembró una colonia de *P. pastoris* en 5 mL de YPD con zeocina (50 µg/mL) y se incubó toda la noche en agitación constante a 28°C. Posteriormente, se comenzó el cultivo con una  $DO_{600} = 0.5 - 0.1$  en 25 mL de YPD en matraz de 250 mL y se incubó a 28°C por 120 horas. El pH del medio de cultivo se modificó mediante la adición de una solución amortiguadora de fosfatos.

Expresión inducida: Se sembró una colonia de *P. pastoris* en 5 mL de YPD con G418 (500 µg/mL) y se incubó toda la noche en agitación constante a 28°C. Posteriormente, se comenzó el cultivo con una  $DO_{600} = 0.5 - 0.1$  en 25 mL de BMGY (Buffered glycerol-complex medium) en matraz de 250 mL y se incubó a 28°C y cada 24 horas se adicionó metanol absoluto estéril como inductor hasta lograr una concentración del 1% (nota: el metanol se agregó al cultivo después de la toma de la muestra).

En ambos ensayos de expresión se recolectó 1 mL de cultivo cada 12 horas y se centrifugó a 12,000 durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se separó el sobrenadante y la pastilla celular y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

### **4.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Se usó SDS-PAGE con amortiguación tris-tricina para la separación y análisis de las proteínas de interés. Para todos los casos la concentración de poliacrilamida del gel concentrador fue de 4% y la del gel separador fue de 16%. Se incluyó un gel separador de 10% en el análisis de Vs30. Los geles tuvieron un espesor de 0.7 mm y se corrieron a un amperaje constante de 200 mA durante aproximadamente

1 hora. Nota: no mezclar las soluciones amortiguadoras del cátodo y del ánodo, las cuales se pueden reutilizar 3 veces.

## **5. Ensayos de proliferación de células cancerosas y sVs30**

Se realizaron ensayos de proliferación con líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MDA-MB-468 y T47D en presencia de diferentes concentraciones de Vs30 sintética (sVs30). La proliferación de las células ER- MDA-MB-231, MDA-MB-468 y ER+ T47D fue evaluada en placas de 96 pozos en medio DMEM/F12 suplementado con 0.02% BSA, 10 µg/mL apo-transferrina y 1 µg/mL insulina. Las células cancerosas fueron tratadas con 0.1, 1, 10, 100 y 1000 ng/mL durante 3 días a 37 °C. Se utilizó un kit de BrdU Cell Proliferation ELISA (Roche #11 647 229 001) para medir la proliferación de las células.

## **6. Marcaje y microinyección de células de cáncer de mama en pez cebra**

### **6.1 Día 1 antes de la microinyección**

- 1.- Lavar células competentes con 5mL de PBS precalentado a 37°C.
- 2.- Diluir DiL 2.5 µL por 10 mL de PBS (4 µg/mL).
- 3.- Añadir PBS con DiL al frasco con células e incubar por 30 minutos a 37°C.
- 4.- Utilizar un “cell scrapper” para despegar las células y transferirlas a un tubo Falcon de 50 mL.
- 5.- Centrifugar las células a 1000 x g por 3 minutos, repetir este paso por un total de 3 veces.
- 6.- Resuspender las células en medio de cultivo y transferir a un frasco de 75 cm<sup>3</sup>
- 7.- Incubar a 37°C durante 24 horas.

### **6.2 Día de la microinyección**

- Lavar células con 8-10 mL de PBS y después añadir 2 mL de tripsina.
- Agregar 5 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina.
- Transferir todas las células a un tubo falcón de 50 mL.
- Diluir 1:10 las células con azul de tripano y contar en cámara de Neubauer.
- Centrifugar células a 300 x g por 5 minutos y descartar sobrenadante.
- Diluir células en 1 mL de medio DMEM/F12 suplementado con 0.02% BSA, 10 µg/mL apo-transferrina y 1 µg/mL insulina, poner células en tubo de 1 mL en hielo y llevar al laboratorio de pez cebra.
- Antes de la microinyección centrifugar células a 1500 rpm por 5 minutos.
- Diluir pellet con PBS ± (s)Vs30 1 µg/mL/10 µg/mL, 1 µg/mL de angiostatina o 1 µg /mL de angiogenina a una concentración final de 150,000 - 200,000 células/µL.

- Después de las microinyecciones seleccionar los embriones inyectados correctamente bajo microscopio de fluorescencia y transferir a medio E3 para un lavado adicional.
- Colocar todos los embriones en medio E3 suplementado con 30 µg/mL PTU ± E2 1nM e incubar por 3 días a 28°C.

## 7. Evaluación de tumor primario y análisis de angiogénesis tumoral

Células MDA-MB-231 fueron marcadas con DiI e inyectadas en embriones de pez cebra como se describió anteriormente en presencia de matrigel. Se probaron concentraciones de 0, 10, 25 y 50% de matrigel para conocer la concentración que generará tumores primarios mejor definidos. Después de 3 días de incubación a 28 °C en presencia de PTU, los embriones fueron anestesiados con tricaina 0.02%, fijados en 4% de paraformaldehído a 4 °C durante toda la noche y montados en cubreobjetos con medio Slowfade Gold antifade. Se tomaron fotografías de los embriones por medio de microscopía confocal usando un objetivo de 20x y haciendo un Z stack partiendo del inicio al final del tumor primario.

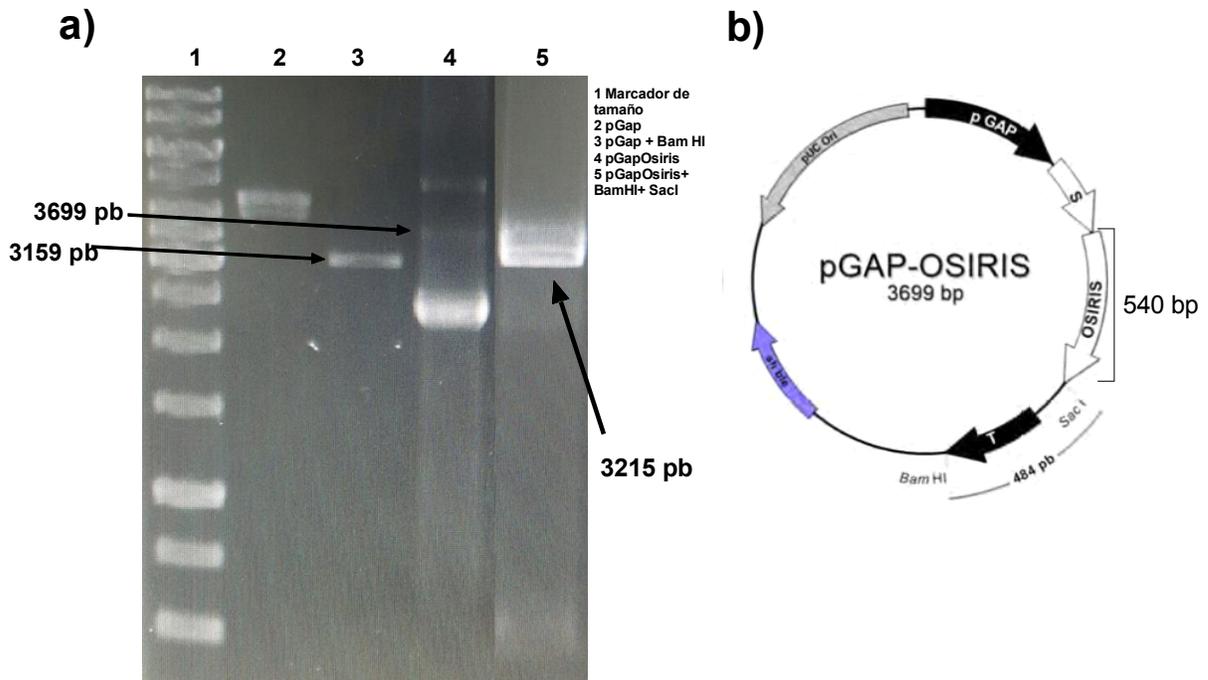
Para el análisis de la actividad anti-angiogénica, las células MDA-MB-231 se inyectaron con 50% de matrigel y en presencia de 1 o 10 µg/mL de sVs30 o con 1 µg/mL de Vs30, angiostatina o angiogenina. Posteriormente los embriones fueron incubados durante 3 días a 28 °C, fijados y analizados mediante microscopía confocal como se describió anteriormente. Las imágenes obtenidas se analizaron por medio del software ImageJ y se midió el porcentaje de angiogénesis tumoral con respecto al área tumoral.

## Resultados

### Comprobación de la construcción

Para verificar que la construcción de pGapOsiris había sido correctamente propagada en *E. coli TOP10 F'* se realizó una extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina y posteriormente la construcción se analizó por digestión enzimática con *BamHI* y *SacI*. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 8). Los resultados muestran en el carril 2 el vector pGap (3159 pb), en el carril 3 el vector cortado por *BamHI* (3159 pb), en el carril 4 se muestra pGaposiris sin ninguna digestión enzimática por lo que el ADN muestra diversas isoformas (3699 pb), en el carril 5 se realizó doble digestión para comparar el tamaño del vector sin el inserto (3215) y se pudo constatar que una vez

liberado el fragmento la banda del carril 5 coincide con el vector vacío (carril 3). Una vez confirmado el vector se prosiguió a la transformación de *Pichia pastoris* para la expresión de la proteína de interés.

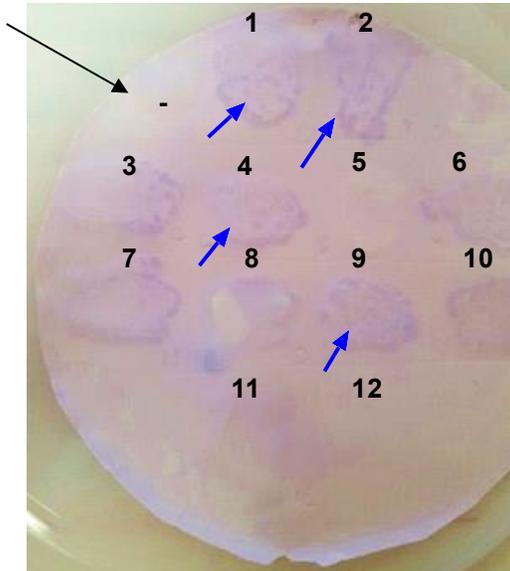


### Figura 8. Comprobación de la construcción inducida

Digestión enzimática de los plásmidos pGap y pGapOsiris. a) Se observan bandas a 3159 pares de bases (pb) y 3699 pb correspondientes a pGap cortado con BamHI y pGapOsiris respectivamente. b) Se muestra el mapa del plásmido pGAP-Osiris y los sitios de corte.

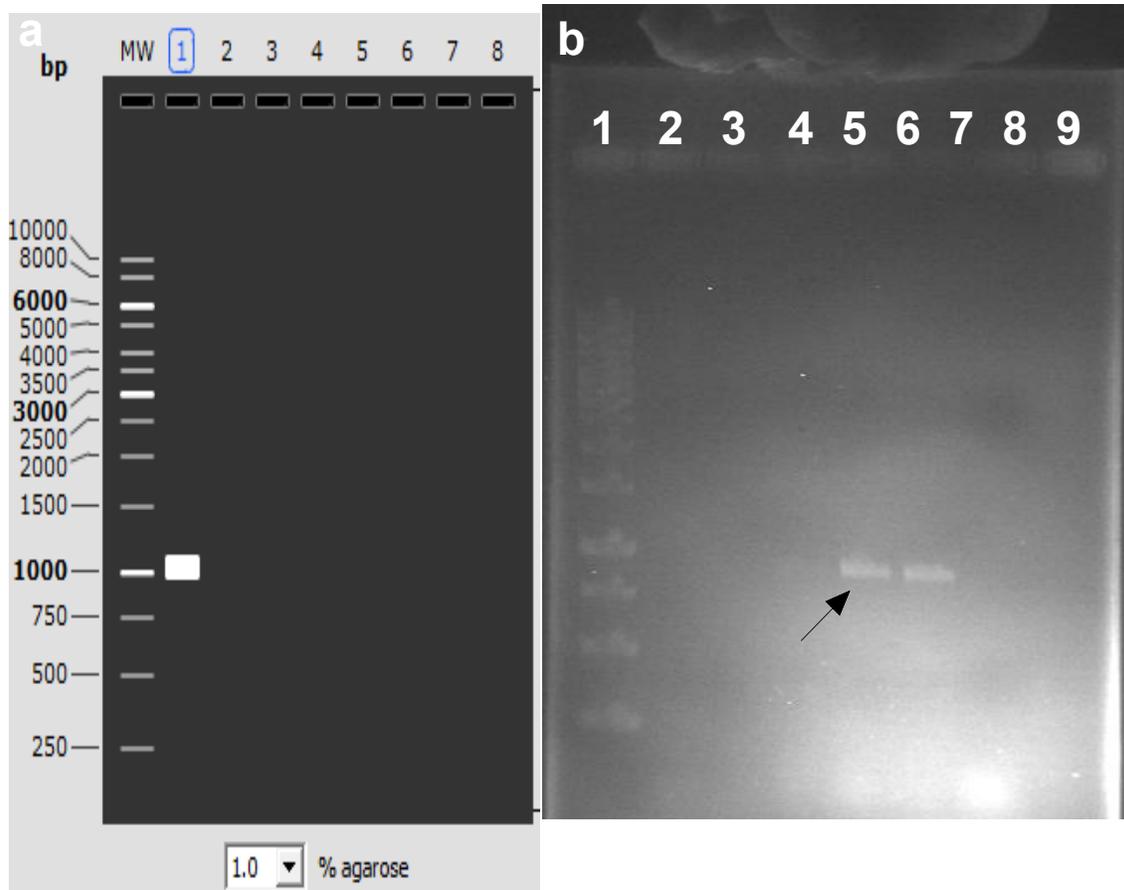
### Selección de cepas secretoras de Osiris

Se realizó el escrutinio en masa por el método de inmunodetección en placa (colony blot) de la cepa de *P. pastoris* transformada con el plásmido pGAPOsiris para seleccionar las colonias sobreproductoras de la proteína de interés y realizar ensayos de expresión posteriores con dichas colonias. La figura 9 muestra una expresión variable de la proteína de fusión en cada colonia de *P. pastoris*. Se seleccionaron las cuatro cepas de *Pichia* con mayor expresión de la proteína de fusión para realizar los ensayos de expresión. El PCR de colonia es un método sencillo y fiable para verificar la integración en el genoma del gen de interés en *P. pastoris*. Por lo cual se utilizó este método usando los primers pGAP Forward y 3' AOX1 para amplificar el gen de interés (Figura 9).



### Figura 9. Colony blot

Se analizaron 12 transformantes diferentes, cada una marcada con un número usando como anticuerpo primario anti his tag, la flecha de color negro muestra un control negativo con SMD168 sin transformar. Se muestra con flechas azules las 4 colonias seleccionadas. La membrana de nitrocelulosa fue revelada con NBT y BCIP.



### Figura 10. PCR de colonia para amplificar el gen Osiris.

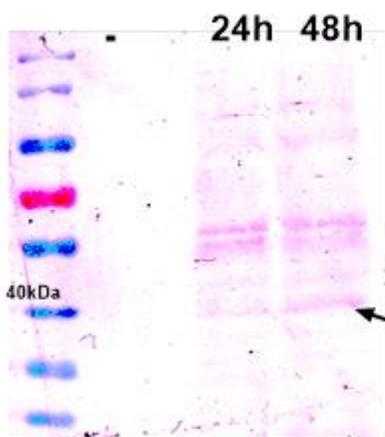
A) Se muestra la predicción del PCR de colonia con el software Snapgene. B) Se muestra un gel de agarosa al 1% donde el carril 1 representa el marcador de peso, 2 blanco, 3 control negativo y los carriles 4-9 son muestras del cultivo transformado. Se muestra una predicción del gen amplificado de 1076 pb y una representación de la zona amplificada.

### Ensayos de expresión constitutiva e inducida a nivel matraz

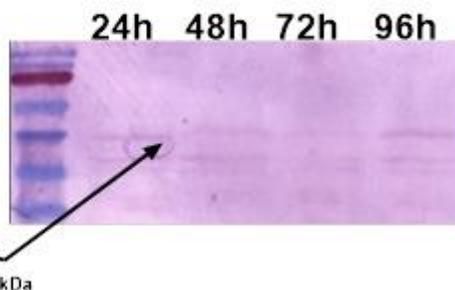
Con el fin de comparar el nivel de producción de la proteína de fusión en los sistemas de expresión constitutiva e inducible se realizaron ensayos de expresión a nivel matraz recolectando muestras cada 24 horas por 120 horas, induciendo cada 12 horas después de tomar la muestra con metanol

absoluto hasta una concentración de 1 %. La expresión de la proteína se evaluó mediante Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la etiqueta de histidinas.

### Expresión Constitutiva



### Expresión inducida



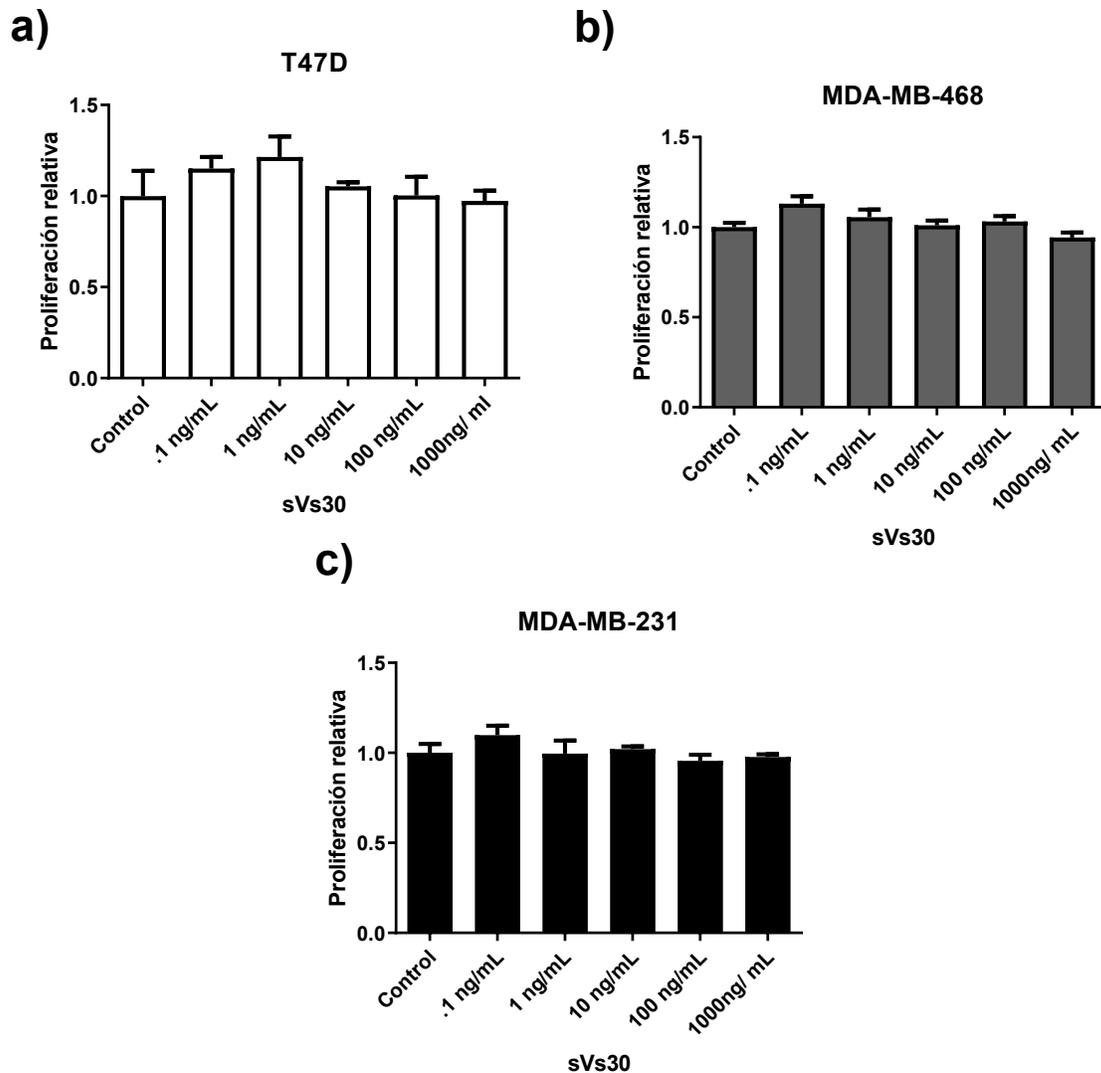
**Figura 11. Análisis por Western blot de la expresión de Osiris mediante expresión constitutiva e inducida**

Se tomó muestra de ambos ensayos cada 24 horas durante 5 días y se analizó por medio de western blot. En ambos ensayos se muestra una banda consistente en 40 kDa a las 24 y 48 horas.

Se puede observar en ambos ensayos de expresión la aparición de una banda constante de 40 kDa (Figura 11), esta banda es consistente en ambos ensayos lo cual indica que se puede tratar de nuestra proteína de interés. Sin embargo, el peso molecular esperado ( $\approx 20$  kDa) es diferente al obtenido por lo cual sugiere que la proteína pudo haber tenido modificaciones postraduccionales tales como glicosilaciones que afectaron su peso molecular. Es necesario realizar más experimentos para corroborar la identidad de la proteína de fusión y proseguir con la producción y purificación de esta.

### Ensayos de proliferación de células cancerosas con sVs30 *in vitro*

Se realizaron ensayos de proliferación con líneas celulares de cáncer de mama T47D, MDA-MB-468, MDA-MB-231 en presencia de diferentes concentraciones de sVs30 para evaluar su posible efecto en el crecimiento celular. Los ensayos de proliferación de las células cancerosas mostraron que la sVs30 no tuvo un efecto significativo en la proliferación de las células de cáncer de mama a las concentraciones probadas (Figura 12).



**Figura 12. Ensayos de proliferación de las células T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 con 0.1 - 1000 ng/ mL de sVs30.** Las células fueron sembradas en placas de 96-pozos y tratadas con sVs30, la proliferación celular se analizó mediante un kit de BrDU ELISA como se indica en materiales y métodos. (a) T47D (b) MDA-MB-468 y (c) MDA-MB-231. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y análisis estadístico con Student t test de dos colas, no se obtuvo ningún cambio significativo entre grupos.

### **Evaluación *in vivo* de la actividad anti-metastásica de Vs30 y sVs30 en pez cebra**

En este experimento se evaluó el efecto que Vs30 y sVs30 presentan sobre la actividad metastásica de las células cancerosas. Para la evaluación *in vivo* se analizó Vs30 producida en *P. pastoris* y la vasostatina producida de manera sintética (sVs30). Para evaluar la actividad anti-metastásica de los péptidos recombinantes, se inyectaron células de cáncer de mama T47D, MDA-MB-468 y

MDA-MB-231 marcadas con DiI en conjunto con el péptido de interés en embriones transgénicos de pez cebra (Figura 13). Embriones de dos días de edad se inyectaron en el espacio perivitelino y fueron incubados posteriormente durante 3 días a 28°C en presencia de PTU al 30 µg/mL para prevenir el desarrollo de pigmentación.

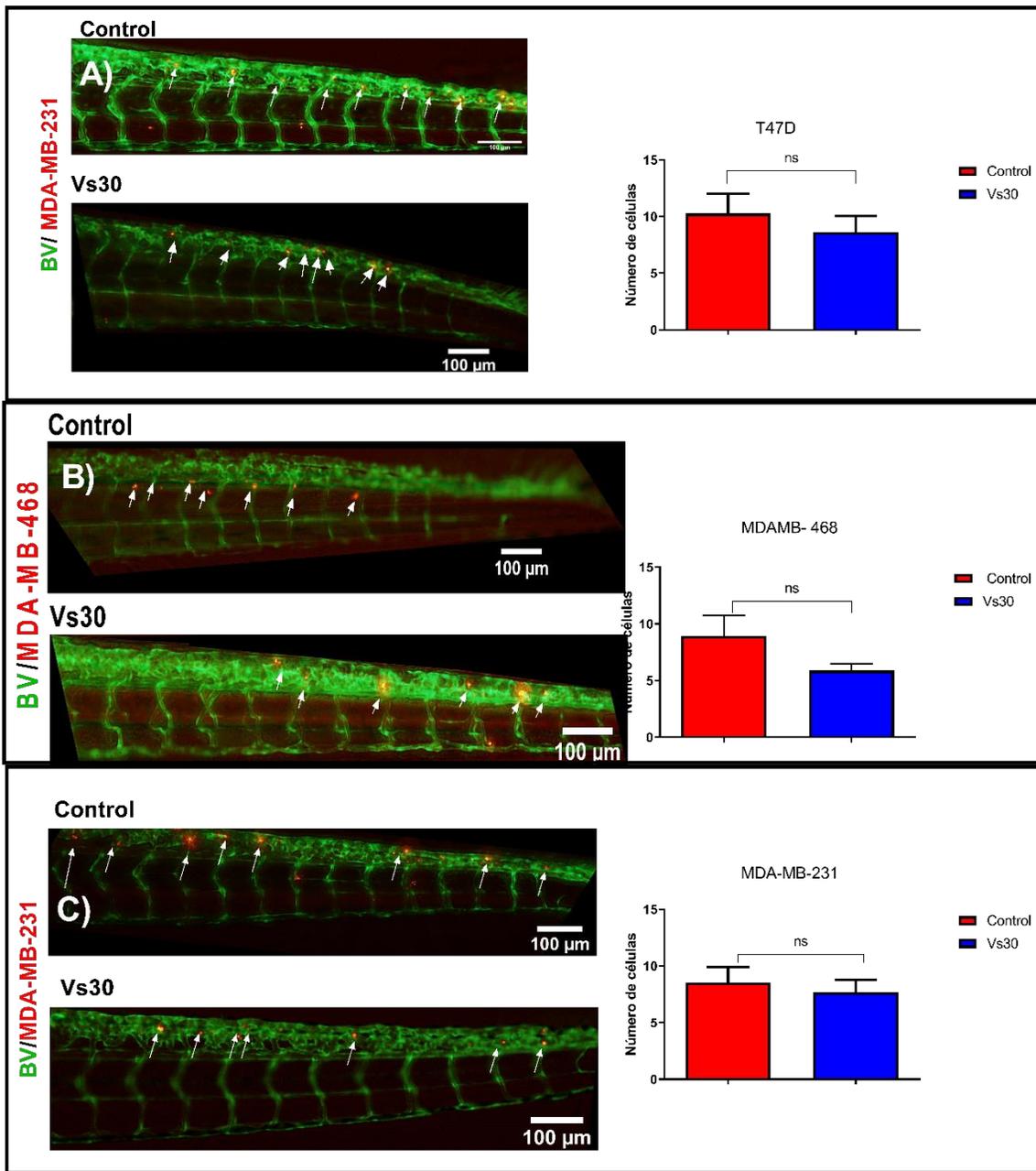


**Figura 13. Fotografía de microinyección en espacio perivitelino de embriones de pez cebra.** Embriones de pez cebra anestesiados y colocados sobre un molde de agarosa para la realización del xenoinjerto con células de cáncer de mama.

Después de 3 días de incubación, los embriones fueron fotografiados utilizando un microscopio de fluorescencia y se contó el número de células que migraron a la cola del pez. Los resultados mostraron que no hay una diferencia significativa en la migración de las células T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 inyectadas con 1 µg/mL de Vs30 con respecto a los grupos control (Figura 14). Por lo cual se sugiere que Vs30 a 1 µg/mL no afecta la actividad metastásica de las células cancerosas.

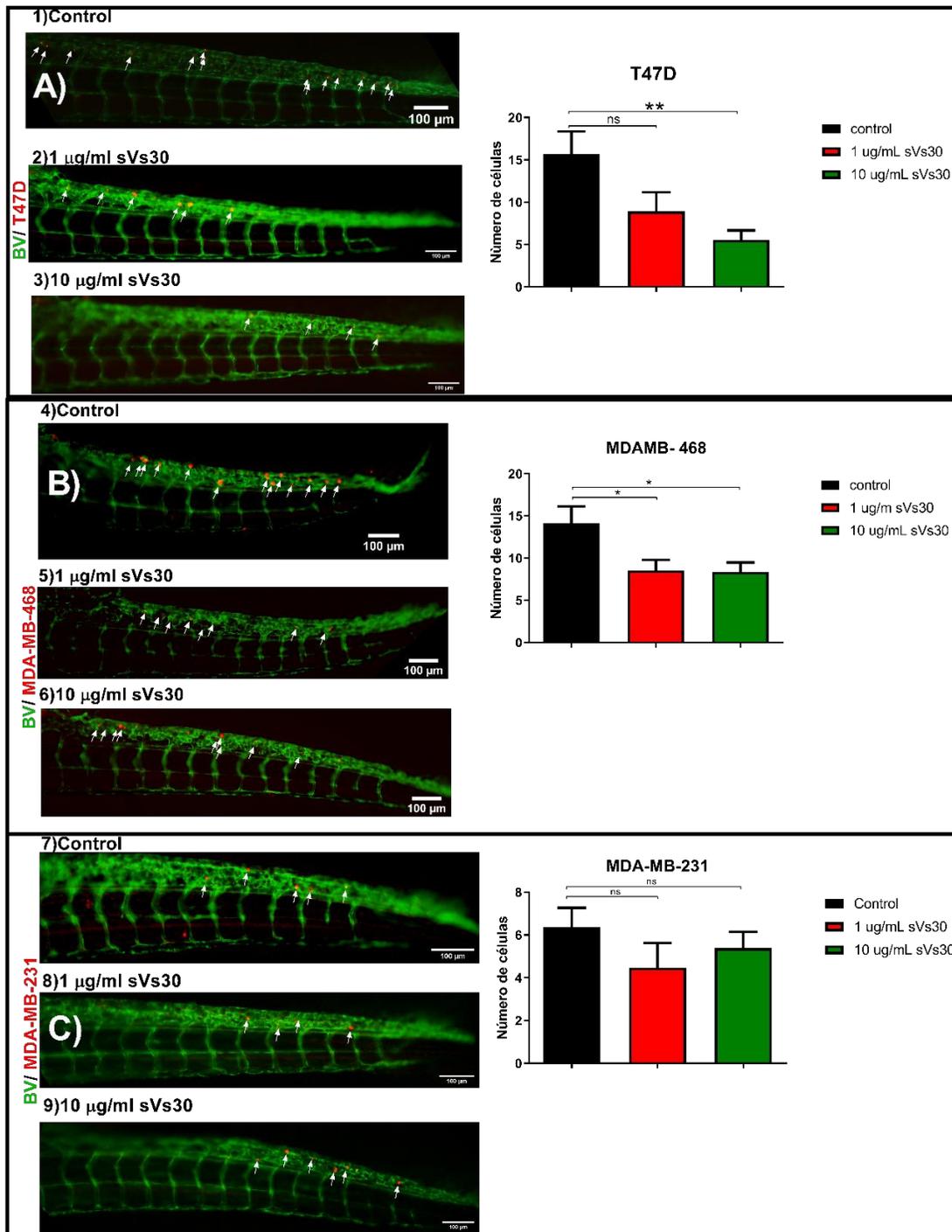
Sin embargo, los resultados con sVs30 muestran una disminución en la diseminación celular de las líneas T47D ( $p = .0010$ ) y MDA-MB-468 ( $p = .0198$ ) en concentraciones de 10 µg/mL y no muestran un efecto estadísticamente significativo en con la línea celular MDA-MB-231 en ninguna de las dos concentraciones de sVs30 (Figura 15).

Estos resultados sugieren que la sVs30 tiene un efecto inhibitorio en la actividad metastásica de las líneas celulares T47D y MDA-MB-468 pero no en MDA-MB-231.



**Figura 14. Diseminación de las células T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 en presencia de Vs30**

Fotografía de microscopía de fluorescencia de embriones de pez cebra transgénicos micro inyectados con células A) T47D, B) MDA-MB 468 y C) MDA-MB-231 con vs30 marcadas con DiI. Representaciones gráficas del número de células que migraron a la cola de los embriones. BV=vasos sanguíneos, las flechas muestran las células diseminadas. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y análisis estadístico con Student t test de dos colas, no se obtuvo ningún cambio significativo entre grupos.



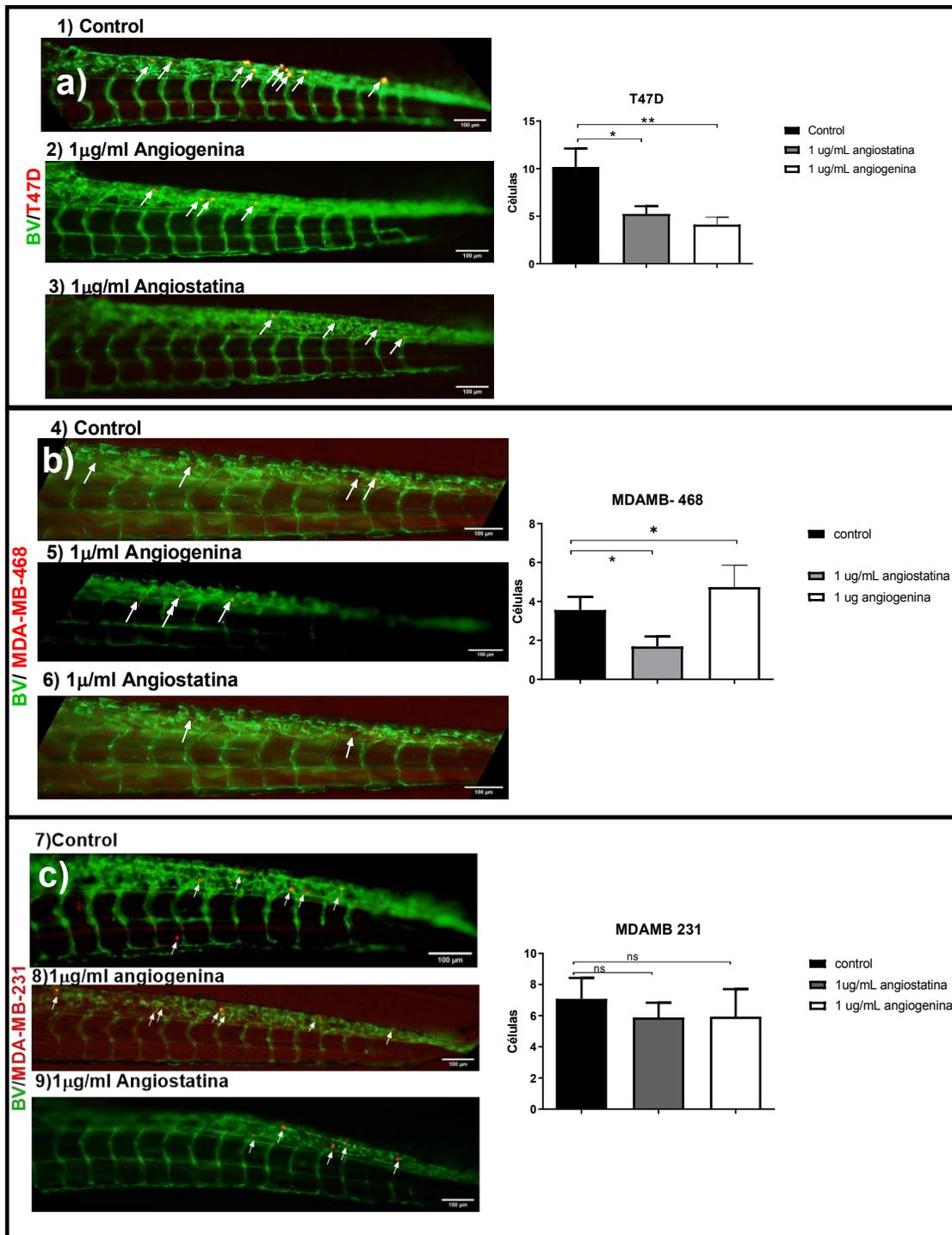
**Figura 15. Diseminación de las células T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 en presencia de sVs30**

Fotografía de microscopía de fluorescencia de embriones de pez cebra transgénicos microinyectados con células A) T47D, B) MDA-MB 468 y C) MDA-MB-231 con 1 ng/mL y 10 µg/mL de sVs30 marcadas con DiI. 1,4,7) Grupos control. 2,3,5,6,8,9) Células + sVs30. Representaciones gráficas del número de células que migraron a la cola de los embriones. BV=vasos sanguíneos, las flechas muestran las células diseminadas. Los datos se muestran como media ± SEM y análisis estadístico con Student t test de dos colas, \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

## **Evaluación *in vivo* de la actividad anti-metastásica de angiogenina y angiostatina en pez cebra**

Debido a que el péptido anti-angiogénico angiostatina y el péptido angiogénico angiogenina son dos moduladores de la angiogénesis tumoral ampliamente estudiados *in vitro* e *in vivo* se incluyeron en este estudio como control negativo y positivo respectivamente. Cabe mencionar que el efecto de estos péptidos en el desarrollo de metástasis y en la modulación del proceso angiogénico en cáncer no ha sido reportado previamente en el modelo de pez cebra.

En el ensayo de T47D la angiostatina y angiogenina tuvieron un efecto inhibitorio en la migración de las células. Las células MDA-MB-468 fueron susceptibles a ambos tratamientos y los resultados indican una mayor migración con respecto al control con 1 µg/mL de angiogenina y significativamente menor la migración de las células con 1 µg/mL de angiostatina. Las células MDA-MB-231 no fueron susceptibles a estos tratamientos y no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la diseminación de las células (Figura 16).



**Figura 16. Diseminación de las células a) T47D, b) MDA-MB-468 y c) MDA-MB-231 en presencia de 1 µg/mL de angiostatina y angiogenina**

BV=vasos sanguíneos, las flechas muestran las células diseminadas. Los datos se muestran como media ± SEM y análisis estadístico con Student t test de dos colas, \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

## **Análisis de la angiogénesis tumoral en pez cebra**

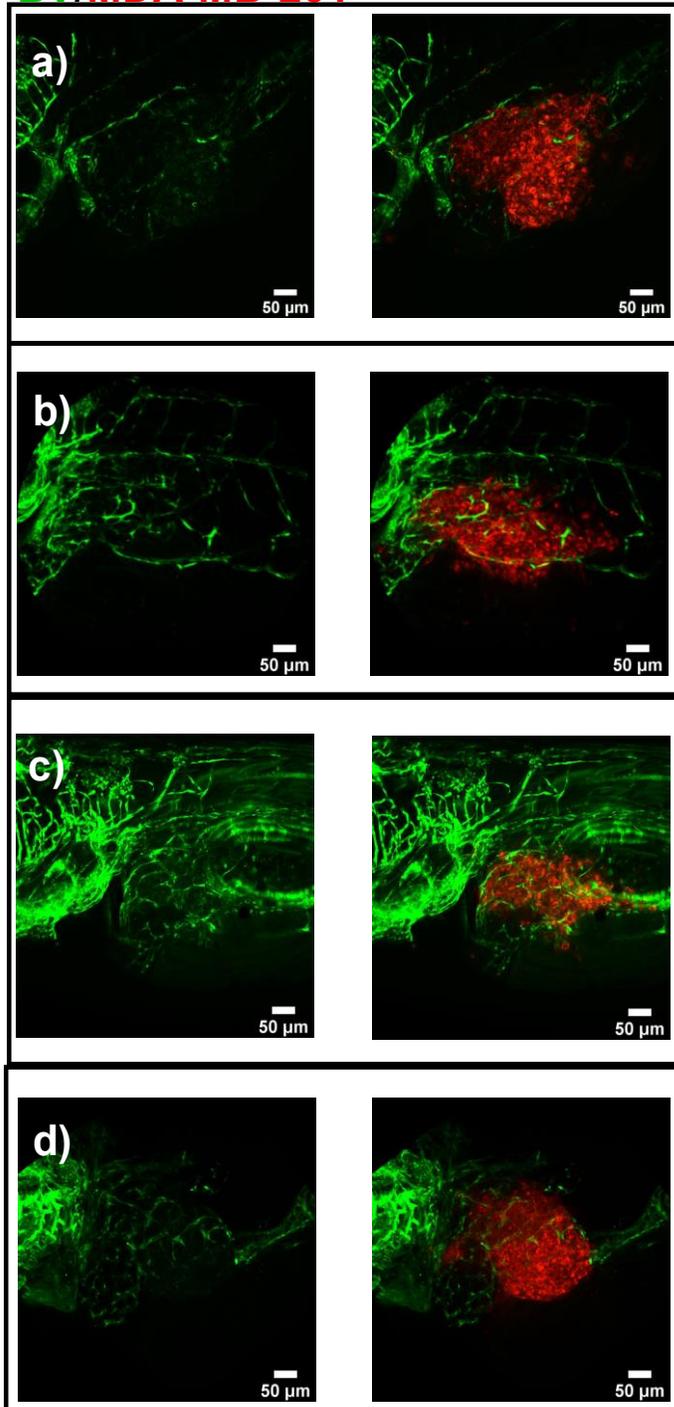
Debido a que las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 cuentan con una capacidad metastásica y angiogénica equiparable entre ellas y mayor en comparación con las células T47D, estas células son un modelo ideal para evaluar la actividad antiangiogénica de los péptidos Vs30 y sVs30 *in vivo* en embriones de pez cebra. En este trabajo se decidió utilizar las células MDA-MB-231 para este fin. Las células MDA-MB-231 *per se* se diseminan fácilmente en los embriones de pez cebra por lo que la formación del tumor primario en el sitio de inyección es muy variable y en ocasiones no distinguible. Para poder evaluar la capacidad antiangiogénica de los péptidos es necesario obtener tumores primarios contenidos y bien definidos, de esta manera los factores angiogénicos que son secretados por las células cancerosas se concentran en un solo lugar. Para superar este obstáculo se incluyó el uso de matrigel en las microinyecciones.

Para conocer a qué concentración de matrigel se obtienen tumores primarios definidos se probaron concentraciones de 0, 10, 25 y 50%. La figura 17 muestra que, en comparación con las concentraciones de 0, 10 y 25%, a una concentración de 50% de matrigel se mantiene una estructura mejor definida del tumor primario y de los vasos sanguíneos intratumorales. Debido a esto, se utilizó una concentración de 50% de matrigel para los experimentos posteriores con los péptidos recombinantes.

La figura 18 muestra el efecto inhibitorio de la angiogénesis tumoral de Vs30 a 1  $\mu\text{g/mL}$  mientras que la sVs30 inhibió la formación de vasos sanguíneos intratumorales a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19).

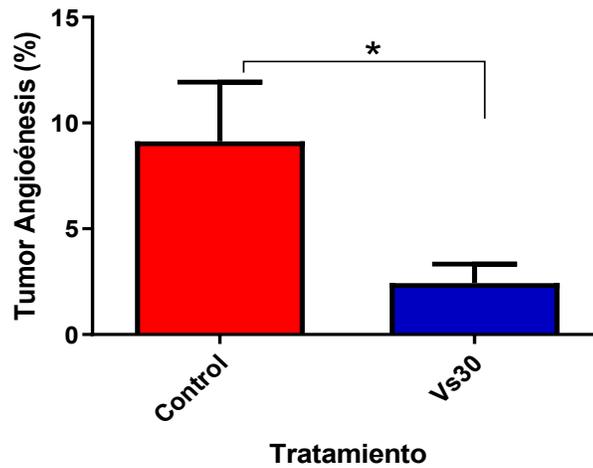
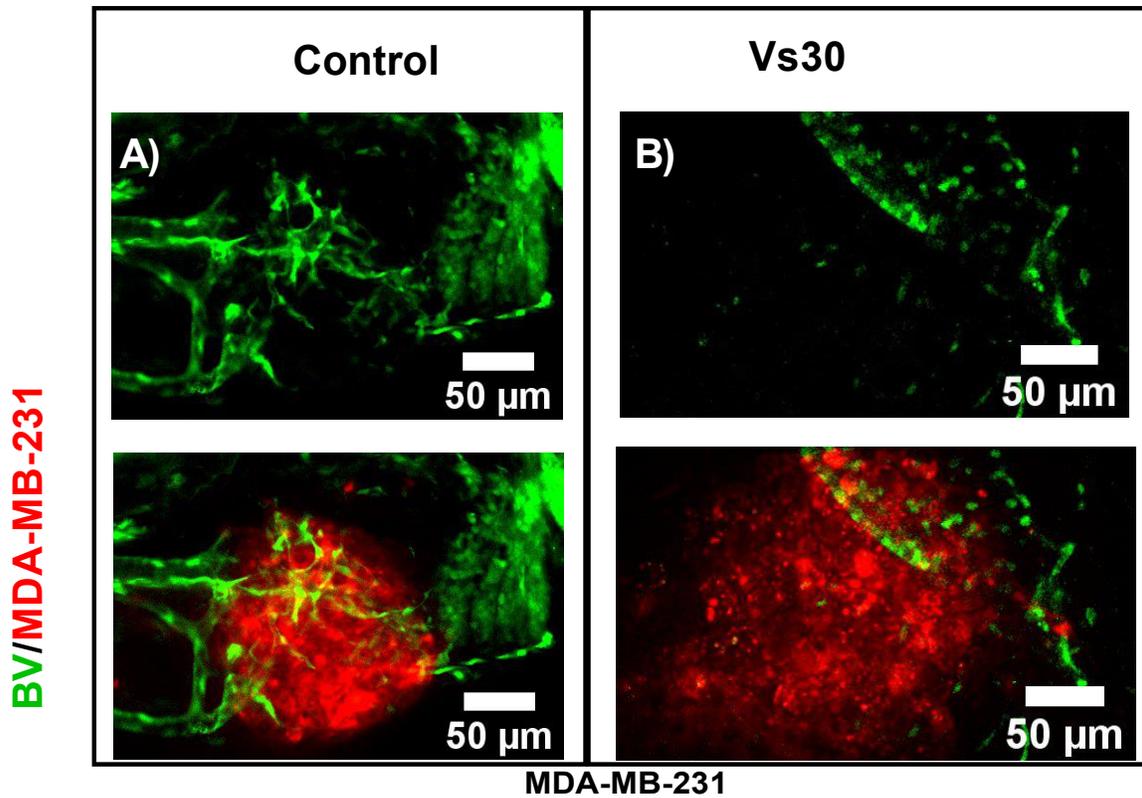
La figura 20 muestra que la angiostatina y angiogenina no tuvieron un efecto estadísticamente significativo con respecto al control a 1  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo, se observa una tendencia de incremento en la angiogénesis tumoral con angiogenina lo cual corresponde a lo reportado en la literatura.

## BV/MDA-MB-231



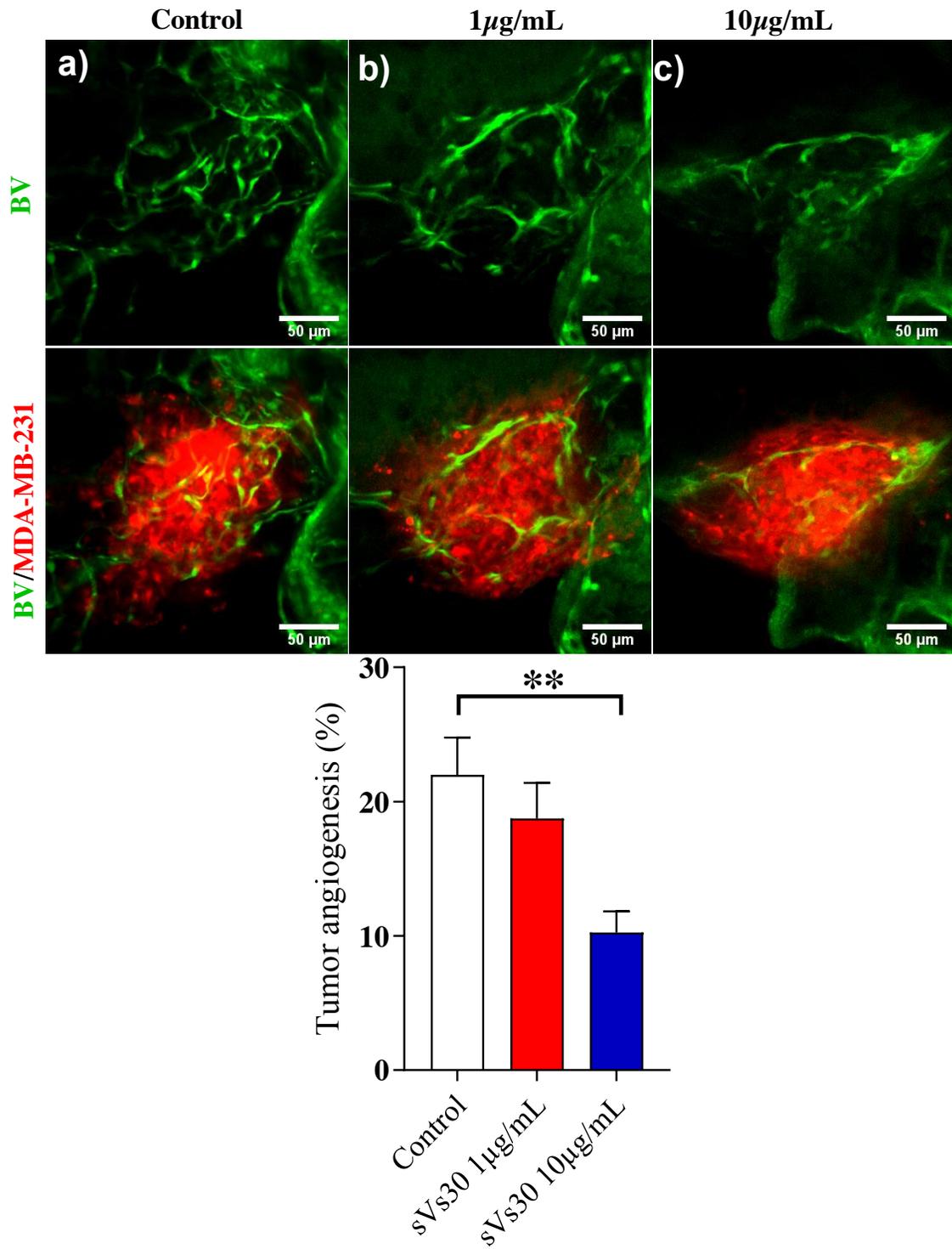
**Figura 17. Evaluación de la formación del tumor primario en presencia de matrigel**

Células MDA-MB-231 fueron inyectadas en presencia de (a) 0%, (b) 10%, (c) 25% y (d) 50% de matrigel en embriones de pez cebra transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente en las células endoteliales. Se observa que a una concentración de 50% matrigel se obtuvo una formación del tumor primario mejor definido. BV=vasos sanguíneos



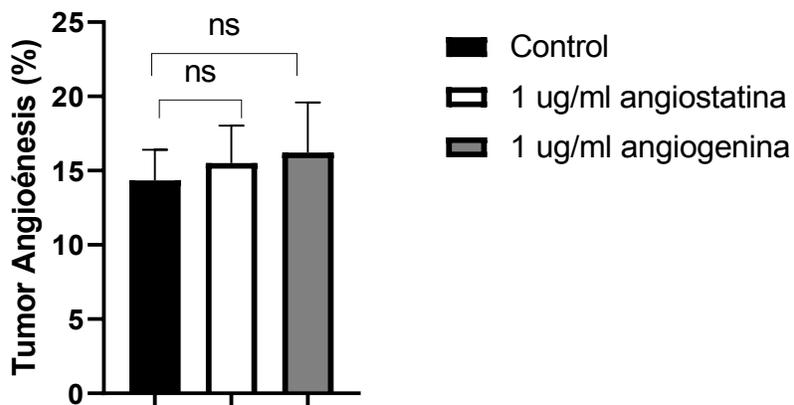
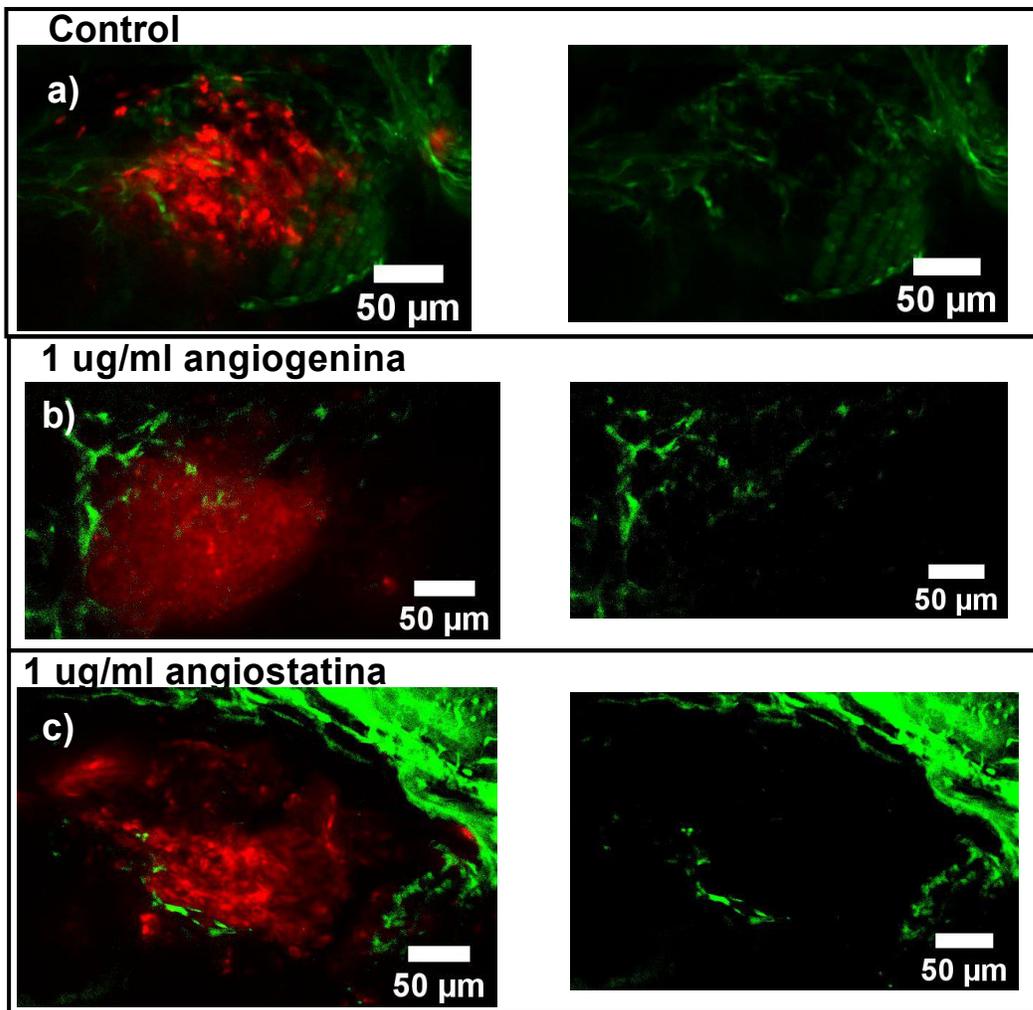
**Figura 18. Análisis de angiogénesis tumoral con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Vs30**

Análisis por microscopía confocal de la angiogénesis tumoral en pez cebra. Células MDA-MB-231 se inyectaron en embriones de pez cebra transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente en las células endoteliales en presencia de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Vs30 y 50% matrigel. A) Grupo control, B) Grupo con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sVs30. BV=vasos sanguíneos. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y análisis estadístico con Student t test de dos colas, \*  $p < 0.05$ .



**Figura 19. Análisis de angiogénesis tumoral con 1 y 10 µg/mL de sVs30**

Análisis por microscopía confocal de la angiogénesis tumoral en pez cebra. Células MDA-MB-231 que expresan la proteína verde fluorescente se inyectaron en embriones de pez cebra transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente en las células endoteliales en presencia de b) 1 µg/mL de sVs30 y C) 10 µg/mL de sVs30 y 50% de matrigel. BV=vasos sanguíneos. Los datos se muestran como media ± SEM y análisis estadístico con Student t test de dos colas, \*\*  $p < 0.01$ .



**Figura 20. Análisis de angiogénesis tumoral con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de angiostatina y angiogenina**

Análisis por microscopía confocal de la angiogénesis tumoral en pez cebra. Células MDA-MB-231 se inyectaron en embriones de pez cebra transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente en las células endoteliales en presencia de b) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de angiogenina y C) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de angiostatina. Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM y análisis estadístico con Student t test de dos colas, no se obtuvo ningún cambio significativo entre grupos.

## Discusión

La expresión constitutiva e inducida de proteínas recombinantes requiere diferentes condiciones para su operación y grados de producción (Anane, 2016). El vector de expresión inducible pGap cuenta con el promotor de la alcohol oxidasa (AOX) el cual es inducido por metanol y reprimido en presencia de glucosa o glicerol. En el caso del vector de expresión constitutiva pGAP $\alpha$ A cuenta con un promotor del gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAP), enzima presente en la vía de la glucólisis. Previamente en nuestro grupo se diseñaron las construcciones de los plásmidos de expresión constitutiva e inducible de Osiris. Con la idea de comparar ambos sistemas de expresión se procedió a obtener la cepa de *Pichia* que expresara la proteína de fusión de manera constitutiva. Se sabe que las proteínas recombinantes producidas en *P. pastoris* pueden tener modificaciones postraduccionales. *P. pastoris* realiza típicamente la N-glicosilación en la secuencia N-X-S/T (Asparagina-cualquier aminoácido-serina/treonina) (Hirose, Kameyama and Ohi, 2002). En humano, se ha detectado una versión glicosilada de la prolactina de 25 kDa en hipófisis, plasma y líquido amniótico por lo que el uso de *P.pastoris* como sistema de expresión ayuda a generar proteínas con un patrón de glicosilación similar a las proteínas nativas (Sinha, 1992). En un trabajo realizado en el 2018 en nuestro grupo de trabajo, se expresó en *P. pastoris* la proteína de fusión Osiris por medio del sistema inducible con metanol durante 72 horas con lo cual se identificaron bandas a 20 kDa; en este trabajo los ensayos de expresión de ambos sistemas mostraron una banda constante a 40 kDa lo cual no concuerda con lo obtenido en el trabajo antes mencionado, sin embargo, es necesario revelar con experimentos posteriores si esta proteína de fusión obtenida es una versión glicosilada de Osiris.

Las líneas celulares T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 derivadas de cáncer de mama son ampliamente utilizadas para la investigación sobre posibles tratamientos contra esta enfermedad. Se ha reportado que Vs30 inhibe la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* mediante el bloqueo de la proliferación y migración de células endoteliales (Yao, Pike and Tosato, 2002). Su efecto en células de cáncer de mama, sin embargo, hasta el momento no se reportado. Nuestros resultados mostraron que la sVs30 no afectó la proliferación de las células cancerosas analizadas hasta una concentración de 1000 ng/mL. Un estudio publicado por Pike *et al.* 1998 muestra que la vasostatina cuenta con un efecto directo y específico sobre la proliferación de células endoteliales, sin embargo, presenta un efecto mínimo sobre la proliferación de otras líneas celulares, entre ellas la MDA-MB-468, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo (Pike *et al.*, 1998).

Se ha reportado que la diseminación celular fuera del tumor primario puede ocurrir a etapas tempranas del crecimiento tumoral, incluso cuando el tumor primario no ha sido detectado (Klein, 2009) además se ha observado un comportamiento pro- o anti-tumoral de diferentes moléculas dependiendo del estadio del crecimiento tumoral (Bergers and Benjamin, 2003). A diferencia del modelo de cáncer en pez cebra, el modelo de cáncer murino no permite analizar eventos tempranos de la diseminación celular. Debido a la transparencia de los embriones de pez cebra, a la gran variedad de cepas transgénicas y a que se inyecta poca cantidad de células tumorales marcadas con colorantes fluorescentes (100-200 células/embrión) esto hace al pez cebra un modelo ideal para el estudio del proceso metastásico a etapas tempranas del desarrollo tumoral y el estudio del proceso angiogénico que contribuye en gran medida a la diseminación celular.

Diferentes estudios han demostrado que Vs30 ha sido efectiva en modelos murinos con ningún efecto secundario (Peng *et al.*, 2014). La aplicación intramuscular de DNA plasmídico que codifica para vasostatina produce inhibición sistemática de la angiogénesis y el crecimiento tumoral en modelos murinos (Xiao *et al.*, 2002), sin embargo, los efectos de Vs30 no han sido probados en ensayos de diseminación celular temprana y angiogénesis tumoral en el modelo de pez cebra.

En este trabajo se utilizó la cepa Tg (*fli1*: EGFP)<sup>y1</sup> de pez cebra que expresa la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) bajo el control del promotor *fli1* que pertenece a la familia del factor de transcripción ETS (E-twenty six) que es crucial para el desarrollo vascular (Liu, 2008). La señal de EGFP de los embriones Tg(*fli1*: EGFP)<sup>y1</sup> corresponde al patrón de expresión de la proteína endógena *fli1* (Lawson and Weinstein, 2002) lo que facilitó poder observar los efectos de Vs30 en la angiogénesis tumoral y la metástasis de células de cáncer de mama. Actualmente no existen reportes de un efecto de inhibición en la metástasis de T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 con Vs30 en este modelo.

Los resultados con Vs30 mostraron que no hubo un efecto en la diseminación celular a una concentración de 1 µg/mL, sin embargo, si hubo una disminución con sVs30 en las líneas T47D a 10 µg/mL y MDA-MB-468 a 1 y 10 µg/mL, respectivamente. Las células MDA-MB-231 no fueron susceptibles a ninguno de los tratamientos probados, la línea celular MDA-MB-231 es proveniente de un cáncer de mama triple negativo el cual es un tipo agresivo con opciones limitadas de tratamiento, tienen un crecimiento rápido en cultivos y a diferencia de las líneas células MDA-MB-468 y T47D la línea MDA-MB-231 es de regulación autócrina, es decir expresan los factores de crecimiento que ellas mismas necesitan (Cailleau *et al.*, 1974) lo cual puede haber inhibido el efecto de Vs30 y sVs30 sobre la diseminación de éstas células.

En cuanto a la angiogénesis tumoral, Vs30 inhibió la formación de vasos intratumorales a 1 µg/mL mas no en la diseminación de las células MDA-MB-231. Se ha reportado previamente un efecto denominado “normalización de la vasculatura” con diferentes tratamientos antiangiogénicos en modelos experimentales, por ejemplo, con bevacizumab, lo cual conlleva a una mejor penetración y distribución de sustancias quimioterapéuticas dentro del tumor contribuyendo de esta manera al efecto antitumoral de la sustancia antiangiogénica (Goel *et al.*, 2011). El hecho de que Vs30 no afecte la proliferación ni diseminación de las células MDA-MB-231 pero si la angiogénesis tumoral podría suponer un posible mecanismo anticanceroso a través de la normalización de la vasculatura, mismo que tendría que ser analizado y corroborado mediante experimentos que analicen la permeabilidad vascular y eficacia de quimioterapéuticos en presencia y ausencia de Vs30. La sVs30 mostró también un efecto en la inhibición de la angiogénesis tumoral, pero a una concentración 10 veces mayor (10 µg/mL) esto se puede deber a que la vasostatina sintética no tiene las mismas modificaciones postraduccionales que la vasostatina expresa en *P. pastoris* por lo que su respuesta biológica puede variar con respecto a Vs30.

Se utilizó además como control dos moléculas cuyo efecto ha sido reportado previamente, la angiogenina que induce la angiogénesis al activar las células de los músculos endoteliales y lisos de los vasos y desencadenar una serie de procesos biológicos, que incluyen la migración celular, la invasión, la proliferación y la formación de estructuras tubulares (Xiangwei Gao and Zhengping Xu, 1994) y la angiostatina que es uno de los inhibidores naturales de la angiogénesis mejor conocidos. Si bien la actividad pro-angiogénica de la angiogenina es la mayormente estudiada, se sabe que la angiogenina también actúa sobre las células cancerosas promoviendo su supervivencia al inhibir la fosforilación de p53 promoviendo su ubiquitinación y degradación lo cual disminuye la apoptosis de las células cancerosas. Además, la angiogenina cuenta con actividad ribonucleolítica, induce proliferación y migración celular, regula el metabolismo de ácidos nucleicos, promueve la degradación de la matriz extracelular e induce invasión celular (Sheng and Xu, 2016). Por otro lado, la angiostatina bloquea algunas etapas de la angiogénesis como la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales y la formación tubular (Kotulska-Kucharz-2018).

Los resultados de diseminación celular con angiogenina y angiostatina mostraron que: con las células MDA-MB-231 no se observó ningún efecto en la diseminación probablemente debido a la alta capacidad invasiva y migratoria de éstas células, con las células MDA-MB-468 la angiogenina incrementó significativamente la migración celular mientras que la angiostatina redujo significativamente la migración de las células, con éstas células se obtuvo un comportamiento esperado por parte de los controles angiogenina y angiostatina. Mientras tanto con las células T47D tanto angiostatina como angiogenina disminuyeron

significativamente la diseminación celular. El hecho de que la angiogenina haya reducido la diseminación de las células T47D se puede deber a que, a diferencia de las células subtipo basal MDA-MB-231 y MDA-MB-468, las células T47D son menos agresivas, son receptor a estrógenos positivas y forman parte del subtipo luminal A de cáncer de mama por lo que se puede presentar un efecto diferente, además de que en el modelo de pez cebra se evalúa la diseminación celular a etapas tempranas por lo que la angiogenina podría estar mostrando un efecto anti-metastásico en este estadio del cáncer como se ha reportado para otras proteínas pro-tumorales (Lin *et al.*, 2009).

La angiogenina y la angiostatina no mostraron un efecto significativo en la formación de vasos sanguíneos intratumorales a la misma concentración de 1µg/mL con Vs30 lo que sugiere que Vs30 cuenta con un efecto más potente que la angiostatina en el modelo de pez cebra.

## Conclusiones

- La expresión de la proteína de fusión fue mayor a las 24 y 48 horas en la expresión constitutiva e inducible.
- Es necesario realizar más experimentos para verificar la identidad de la proteína.
- La sVs30 en concentraciones de 0.1 a 1000ng/mL no inhibe la proliferación de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, MDA-MB-468 y T47D.
- Los tratamientos con Vs30 y sVs30 no inhiben la diseminación de las células MDA-MB-231 en embriones de pez cebra.
- Vs30 no afecta la diseminación de las células T47D, MDA-MB-468 y MDA-MB- 231 en embriones de pez cebra.
- El péptido sVs30 disminuye significativamente la diseminación de las células MDA-MB-468 y T47D.
- La formación de vasos intratumorales *in vivo* disminuye significativamente con 1 µg/mL de Vs30 y 10 µg/mL de sVs30.
- La angiogenina y angiostatina a 1 µg/mL no presentan un efecto significativo en la inhibición de la angiogénesis tumoral ni en la diseminación de las células MDA-MB-231, por otro lado, si presentan un efecto en la diseminación de las células MDA-MB-468 y T47D.

## Referencias

- Anane, E., van Rensburg, E. and Görgens, J. F. (2016) 'Comparison of constitutive and inducible  $\beta$ -fructofuranosidase production by recombinant *Pichia pastoris* in fed-batch culture using defined and semi-defined media', *South African Journal of Chemical Engineering*, 22, pp. 17–22. doi: 10.1016/j.sajce.2016.10.001.
- Andersson, L. *et al.* (no date) 'Large-Scale Synthesis of'.
- Bergers, G. and Benjamin, L. E. (2003) 'Tumorigenesis and the angiogenic switch', *Nature Reviews Cancer*, 3(6), pp. 401–410. doi: 10.1038/nrc1093.
- Bray, B. L. (2003) 'Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 2(7), pp. 587–593. doi: 10.1038/nrd1133.
- Cailleau, R. *et al.* (1974) 'Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions 2', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. Narnia, 53(3), pp. 661–674. doi: 10.1093/jnci/53.3.661.
- Calderon-Salais, S. *et al.* (2018) 'Constitutive expression of the active fragment of human vasostatin Vs30 in *Pichia pastoris* SMD1168H', *Protein Expression and Purification*. doi: 10.1016/j.pep.2017.12.002.
- Chung, A. S. and Ferrara, N. (2011) 'Developmental and Pathological Angiogenesis', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Annual Reviews, 27(1), pp. 563–584. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154002.
- Clapp, C. *et al.* (1994) 'The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 91(22), pp. 10384–8. doi: 10.1073/PNAS.91.22.10384.
- Clapp, C. *et al.* (2006) 'Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function', *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Elsevier Current Trends, 17(8), pp. 301–307. doi: 10.1016/J.TEM.2006.08.002.
- Currie, G. J. L. and P. D. (2007) 'Animal models of human disease: zebrafish swim into view', *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 9(8), pp. 2663–2668. doi: 10.1038/nrg2091.
- Czajkowsky, D. M. *et al.* (2012) 'Fc-fusion proteins: New developments and future perspectives', *EMBO Molecular Medicine*, 4(10), pp. 1015–1028. doi: 10.1002/emmm.201201379.
- Delov, V. *et al.* (2014) 'Transgenic fluorescent zebrafish Tg(fli1:EGFP)y1 for the identification of vasotoxicity within the zFET', *Aquatic Toxicology*. Elsevier, 150, pp. 189–200. doi: 10.1016/J.AQUATOX.2014.03.010.
- Goel, S. *et al.* (2011) 'Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases', *Physiol Rev*, 91, pp. 1071–1121. doi: 10.1152/physrev.00038.2010.-New.
- Hawighorst, H. *et al.* (1997) 'Angiogenesis of uterine cervical carcinoma: Characterization by pharmacokinetic magnetic resonance parameters histological microvessel density with correlation to lymphatic involvement', *Cancer Research*, 57(21), pp. 4777–4786.
- Hirose, M., Kameyama, S. and Ohi, H. (2002) 'Characterization of N-linked oligosaccharides attached to recombinant human antithrombin expressed in the

- yeast *Pichia pastoris*', *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd, 19(14), pp. 1191–1202. doi: 10.1002/yea.914.
- Kerbel, R. and Folkman, J. (2002) 'Clinical translation of angiogenesis inhibitors', *Nature Reviews Cancer*, 2(10), pp. 727–739. doi: 10.1038/nrc905.
- Kimberly Dooley and Leonard I Zon (2000) 'Zebrafish: a model system for the study of human disease', *Current Opinion in Genetics & Development*, 10, pp. 252–256.
- Klein, C. A. (2009) 'Parallel progression of primary tumours and metastases', 1283, pp. 1279–1283.
- Lawson, N. D. and Weinstein, B. M. (2002) 'In Vivo Imaging of Embryonic Vascular Development Using Transgenic Zebrafish', *Developmental Biology*. Academic Press, 248(2), pp. 307–318. doi: 10.1006/DBIO.2002.0711.
- Li, Y. (2011) 'Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review', *Protein Expression and Purification*. Academic Press, 80(2), pp. 260–267. doi: 10.1016/J.PEP.2011.08.001.
- Lin, S. *et al.* (2009) *Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model*.
- Liu, F. (2008) 'Flt1 Acts at the Top of the Transcriptional Network Driving Blood and Endothelial Development', *Current Biology*. Cell Press, 18(16), pp. 1234–1240. doi: 10.1016/J.CUB.2008.07.048.
- Losordo, D. W. (2004) 'Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for Ischemic Disease: Part II: Cell-Based Therapies', *Circulation*, 109(22), pp. 2692–2697. doi: 10.1161/01.CIR.0000128596.49339.05.
- Macauley-Patrick, S. *et al.* (2005) 'Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system', *Yeast*, 22(4), pp. 249–270. doi: 10.1002/yea.1208.
- Macotela, Y. (2006) 'Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin', *Journal of Cell Science*, 119(9), pp. 1790–1800. doi: 10.1242/jcs.02887.
- Martini, J.-F. *et al.* (2000) 'The Antiangiogenic Factor 16K PRL Induces Programmed Cell Death in Endothelial Cells by Caspase Activation', *Molecular Endocrinology*. Narnia, 14(10), pp. 1536–1549. doi: 10.1210/mend.14.10.0543.
- Michalak, M. *et al.* (2009) 'Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum', *Biochemical Journal*, 417(3), pp. 651–666. doi: 10.1042/BJ20081847.
- Otrock, Z. K. *et al.* (2007) 'Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms', *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. Academic Press, 39(2), pp. 212–220. doi: 10.1016/J.BCMD.2007.04.001.
- Pandya, N. M., Dhalla, N. S. and Santani, D. D. (2006) 'Angiogenesis-a new target for future therapy'. doi: 10.1016/j.vph.2006.01.005.
- Peng, X. *et al.* (2014) 'Plasmid-encoding vasostatin inhibited the growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells', *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer US, 395(1–2), pp. 265–272. doi: 10.1007/s11010-014-2135-y.
- Pike, S. E. *et al.* (1998) *Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth*, *The Journal of Experimental Medicine*. Available at: <http://www.jem.org>.
- Piwnicka, D. *et al.* (2004) 'Cathepsin D Processes Human Prolactin into Multiple

16K-Like N-Terminal Fragments: Study of Their Antiangiogenic Properties and Physiological Relevance', *Molecular Endocrinology*, 18(10), pp. 2522–2542. doi: 10.1210/me.2004-0200.

Raica, M., Cimpean, A. M. and Ribatti, D. (2009) 'Angiogenesis in pre-malignant conditions', *European Journal of Cancer*. doi: 10.1016/j.ejca.2009.04.007.

Ribatti, D. (2009a) 'Endogenous inhibitors of angiogenesis. A historical review', *Leukemia Research*, 33(5), pp. 638–644. doi: 10.1016/j.leukres.2008.11.019.

Sheng, J. and Xu, Z. (2016) 'Three decades of research on angiogenin: a review and perspective', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Narnia, 48(5), pp. 399–410. doi: 10.1093/abbs/gmv131.

Sinha, Y. N. (1992) 'Prolactin variants', *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Elsevier Current Trends, 3(3), pp. 100–106. doi: 10.1016/1043-2760(92)90021-R.

SUND, M., XIE, L. and KALLURI, R. (2004) 'The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis', *APMIS*, 112(7–8), pp. 450–462. doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.t01-1-apm11207-0806.x.

Teng, Y. *et al.* (2013) 'Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish.', *BMC cancer*. BioMed Central, 13, p. 453. doi: 10.1186/1471-2407-13-453.

Vazquez Rodriguez, G., Gonzalez, C. and De Leon Rodriguez, A. (2013) 'Novel fusion protein derived from vasostatin 30 and vasoinhibin II-14.1 potently inhibits coronary endothelial cell proliferation', *Molecular Biotechnology*. doi: 10.1007/s12033-012-9642-4.

Wicki, A. and Christofori, G. (2008) 'The angiogenic switch in tumorigenesis', *Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy*, 19, pp. 67–88. doi: 10.1007/978-3-540-33177-3\_4.

Xiangwei Gao and Zhengping Xu (2008) 'Mechanisms of action of angiogenin', *Acta Biochim Biophys Sin*, 40(7), pp. 619–624.

Xiao, F. *et al.* (2002) 'A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin', *Gene Therapy*, 9(18), pp. 1207–1213. doi: 10.1038/sj.gt.3301788.

Yang, Z. and Zhang, Z. (2018) 'Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review', *Biotechnology Advances*. Elsevier, 36(1), pp. 182–195. doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2017.11.002.

Yao, L., Pike, S. E. and Tosato, G. (2002) 'Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function.', *Journal of leukocyte biology*, 71(1), pp. 47–53. doi: 10.1890/090142.

Zhu, Y. *et al.* (2017) 'Vasoinhibin, an n-terminal Prolactin Fragment, Directly inhibits cardiac angiogenesis in Three-dimensional heart culture', 8, p. 20. doi: 10.3389/fendo.2017.00004.