



03097  
2

Universidad Nacional Autónoma de México

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**Desarrollo y caracterización de una línea endotelial  
bovina: implicaciones para el estudio de la expresión  
y efecto de la prolactina en angiogénesis.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias (Neurobiología)

**P r e s e n t a**

M. en C. Marcos Cajero Juárez

Juriquilla, Qro.

TESIS CON  
FALLA EN ORDEN

2003.

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

*Producción de una línea endotelial bovina.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

**Ma. de la Luz Juárez Guillen y Gilberto Cajero Cruz.**

Quienes me han dado a través del estudio, la mayor herencia que me acompañara por el resto de mi vida.

Mi agradecimiento, admiración y respeto eternos.

A mis hermanos, sobrinos y resto de las familias.

A la Doctora **Carmen Clapp J;** por su apoyo y dirección de la tesis.

A las personas y amigos que encuentro; quienes de alguna manera me motivan al estudio, trabajo y a la continua superación.

A mis compañeros del laboratorio de Endocrinología Molecular.

Al M. en C. **Gabriel Nava Pinto;** al Nutriólogo **Fernando Lopez Barrera** y a la Licenciada **Ma. del Pilar Galarza.**

Al **Instituto de Neurobiología (Juriquilla Qro.)**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A la beca doctoral otorgada por la: **U.N.A.M.** y el apoyo del **CONCYTEQ.**

A la máxima casa de estudios (*mí alma mater*): **Universidad Nacional Autónoma de México.**

A la **Biología** por tantas satisfacciones y retos que están por venir.

A mí gran y muy querido **México** por todo lo que me ha dado y representa para mí.

*M. Cajero Juárez*

*INB-UNAM.*

B

## INDICE

\*\*\*\*\*

AGRADECIMIENTOS .....	II
RESUMEN .....	III
ABSTRACT .....	IV
INTRODUCCIÓN .....	01
A. Angiogénesis .....	01
B. Prolactina y angiogénesis .....	02
C. Heterogeneidad del endotelio vascular .....	10
D. Inmortalización mediante los oncogenes E6 y E7 .....	12
JUSTIFICACIÓN .....	14
HIPOTESIS .....	15
OBJETIVOS .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
I. PRODUCCIÓN DE LA LÍNEA ENDOTELIAL INMORTAL .....	16
II. ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES ENDOTELIALES .....	20
III. EXPRESIÓN Y EFECTO DE <i>PRL</i> .....	22
RESULTADOS .....	23
DISCUSIÓN .....	35
CONCLUSIONES .....	40
APENDICES .....	41
I. PROLACTINA .....	41
II. EXPRESION Y REGULACION DEL GEN <i>PRL</i> .....	50
REFERENCIAS .....	53-70
PUBLICACION .....	71

*Producción de una línea endotelial bovina.*

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

**Ma. de la Luz Juárez Guillen y Gilberto Cajero Cruz.**

Quienes me han dado a través del estudio, la mayor herencia que me acompañara por el resto de mi vida.

Mi agradecimiento, admiración y respeto eternos.

A mis hermanos, sobrinos y resto de las familias.

A la Doctora **Carmen Clapp J.** por su apoyo y dirección de la tesis.

A las personas y amigos que encuentro; quienes de alguna manera me motivan al estudio, trabajo y a la continua superación.

A mis compañeros del laboratorio de Endocrinología Molecular.

Al M. en C. Gabriel Nava Pinto; al Nutriólogo Fernando Lopez Barrera y a la Licenciada Ma. del Pilar Galarza.

Al **Instituto de Neurobiología** (Juriquilla Qro.)

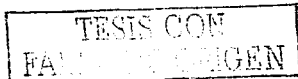
A la beca doctoral otorgada por la: **U.N.A.M.** y el apoyo del **CONCYTEQ.**

A la máxima casa de estudios (*mi alma mater*): **Universidad Nacional Autónoma de México.**

A la **Biología** por tantas satisfacciones y retos que están por venir.

A mí gran y muy querido **México** por todo lo que me ha dado y representa para mí.

*M. Cajero Juárez*



INB-UNAM. II

## RESUMEN

Las células endoteliales realizan diversas funciones fisiológicas que varían y se alteran de acuerdo a sus características asociadas con los diferentes lechos vasculares. Las células endoteliales aisladas de la vena umbilicales son frecuentemente utilizadas como modelo para estudiar la función endotelial. Sin embargo los cultivos primarios de estas células tienen baja capacidad proliferativa y una vida útil limitada. En este estudio se inmortalizaron células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC), a través transfectar un vector de expresión que contiene los oncogenes E6E7 de papiloma virus humano tipo 16. La expresión de E6E7 extendió la vida en cultivo de las células BUVEC (120 vs. 40 ciclos de replicación), sin que las células mostraran señales de senescencia. Cuatro clones inmortales fueron aislados que mantienen propiedades de las células endoteliales tales como: la incorporación de la lipoproteína acetilada de baja densidad, la expresión de la proteína Von Willebrand, la expresión de carbohidratos de superficie específicos del endotelio y la respuesta proliferativa al factor de crecimiento endotelial VEGF. Además, el clon BVE-E6E7-1 al igual que su contraparte de tipo silvestre, expresó el mRNA de prolactina y disminuyó su proliferación en respuesta al fragmento anti-angiogénico de la prolactina o *PRL-16K*. Este clon mostró pocos signos de inestabilidad genómica, como se reveló por los análisis del número de centrosomas y cromosomas. De esta forma obtuvimos líneas celulares BUVEC-E6E7 que retienen las propiedades del endotelio vascular y que pueden facilitar el estudio de su regulación. Finalmente, estas son las primeras líneas celulares endoteliales de la vena umbilical de origen no humano y su uso deberá ayudar a establecer los mecanismos que gobiernan la heterogeneidad de las células endoteliales entre diversas especies.



## ABSTRACT

Endothelial cells perform a large array of physiological functions that are influenced by their cellular heterogeneity in the different vascular beds. Vein endothelial cells isolated from the umbilical cords are commonly used to study vascular endothelium. Primary cultures of these cells, however, have low proliferative capacity and a limited life span. We have immortalized bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) by transfection with an expression vector containing the human papillomavirus type 16 E6E7 oncogenes. Expression of E6E7 extended the life span of BUVEC from 40 to more than 120 cell replication cycles with no signs of senescence. Four immortalized clones were isolated and found to maintain endothelial cells properties, such as the uptake of acetylated low density lipoprotein, the expression of the Von Willebrand protein, the binding of endothelial cell-specific lectins and proliferative responses to the specific endothelial cell mitogen, vascular endothelial growth factor. Moreover, clone BE-E6E7-1, like its wild-type counterparts, expressed prolactin mRNA and decreased its proliferation in response to the anti-angiogenic 16-kDa fragment of prolactin. This clone showed little signs of genetic instability as revealed by centrosome and chromosome number analysis. Thus, immortalized E6E7 BUVEC cell line retain endothelial cells characteristics and could facilitate studies to investigate the action of regulatory factors of vascular endothelium. Moreover, being the first non-human umbilical vein endothelial cells lines, their use should provide insights into the mechanisms governing species-related heterogeneity of endothelial cells.

## INTRODUCCIÓN

### A. Angiogénesis

El proceso natural de formación de vasos capilares sanguíneos a partir de vasos pre-existentes se conoce con el nombre de angiogénesis. Estos nuevos capilares determinan el crecimiento de los diferentes tejidos y órganos a través de aportar oxígeno, nutrientes y de eliminar las sustancias de desecho. La angiogénesis es esencial para el crecimiento y la diferenciación de los tejidos, particularmente durante el desarrollo embrionario y fetal. Sin embargo, después del nacimiento, la red capilar se renueva cada vez más lentamente y en el adulto es prácticamente inexistente, a excepción de la angiogénesis que acompaña algunos eventos en el aparato reproductor femenino. Por ejemplo, en el ovario la angiogénesis es determinante para el desarrollo y la ovulación de los folículos y para el crecimiento y la función del cuerpo lúteo. Asimismo, la angiogénesis es esencial para el desarrollo del endometrio, la formación de la placenta y el crecimiento de la glándula mamaria. De manera también importante, la angiogénesis forma parte de los procesos de reparación tisular a consecuencia de lesiones y fracturas [1,2].

Si bien la angiogénesis participa en diversos procesos fisiológicos, el gran interés por el entendimiento de los mecanismos que subyacen a la formación de los nuevos vasos sanguíneos, es consecuencia del reconocimiento de que diversas patologías dependen de la sobreproducción de los neovasos. Por ejemplo, se sabe que la angiogénesis determina el desarrollo y la metástasis de los tumores sólidos, la destrucción del cartilago en la artritis reumatoide y el desprendimiento de la retina en las retinopatías vasoproliferativas, como la diabética, la del prematuro y la degeneración macular asociada con la edad [2,3].

Dada la importancia de la angiogénesis tanto en procesos fisiológicos como patológicos, se ha dedicado un importante esfuerzo a la identificación y caracterización de los factores moleculares que intervienen en su regulación, con la esperanza de que aquellos agentes capaces de controlar el crecimiento vascular, podrían ser utilizados como una opción para el tratamiento de las patologías mencionadas.

## *Producción de una línea celular endotelial bovina*

### **A. 1 Reguladores de la angiogénesis**

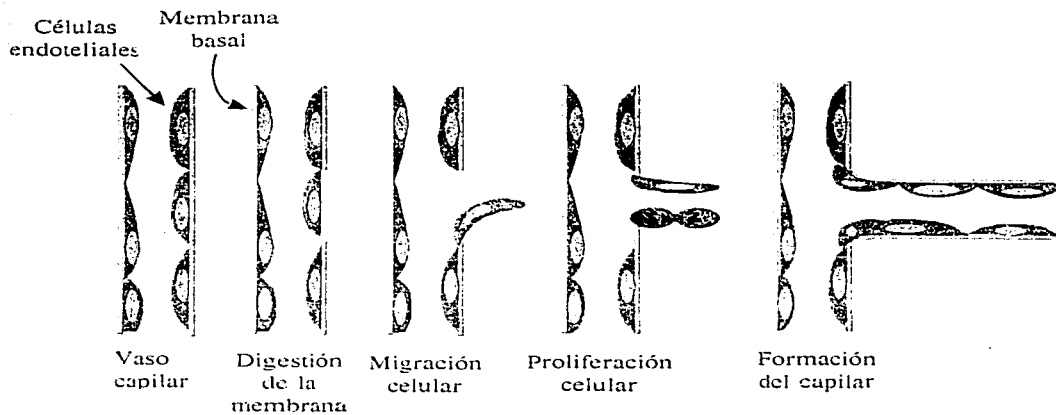
La función endotelial está regulada por múltiples factores estimuladores e inhibidores, que actúan sobre las diferentes fases del proceso angiogénico a saber: la proliferación, la migración, la asociación y la diferenciación de las células endoteliales en capilares sanguíneos (**Figuras 1 y 2**) [4,5]. Muchos de estos factores son de origen endocrino y parácrino pero también autócrino, es decir, producidos por las propias células endoteliales [4,5]. La mayor parte de los factores reguladores del proceso angiogénico pertenecen a la familia de los factores de crecimiento, y tienen la capacidad de regular la función del endotelio de manera directa e indirecta. Dentro de los principales factores estimuladores se incluye: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento básico derivado de los fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 8 y el factor de crecimiento de hepatocitos conocido como "scatter factor" (SF) (**Figura 2**). Por otra parte, la regulación negativa también está ampliamente representada e incluye factores como la trombospondina, la endostatina, la angiostatina, el factor tisular inhibidor de las metaloproteínas (TIMP), el factor derivado de plaquetas IV (PFIV), el interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) y recientemente, fragmentos moleculares de la hormona prolactina (*PRL*) (**Figura 2**). El equilibrio entre la acción de los factores estimuladores e inhibidores determinan tanto a la angiogénesis fisiológica, como sus alteraciones en condiciones patológicas [4]. El interés de esta tesis se inscribe dentro del tema de la participación de las isoformas de la *PRL* en la regulación del proceso angiogénico.

### **B. Prolactina y angiogénesis**

#### **B.1 *PRL* 16K**

Las prolactinas son una familia de proteínas derivadas de un solo gen, las cuales difieren estructuralmente entre sí, debido básicamente a modificaciones postraduccionales tales como: la fosforilación, glicosilación, desamidación, agregación y proteólisis a partir de una proteína predominante de aproximadamente 200 aminoácidos, y una masa

## PROCESO DE ANGIOGENESIS



**Fig: 1. Angiogénesis.** Esquema que ilustra las etapas del proceso natural de la formación de vasos capilares sanguíneos en los tejidos corporales.

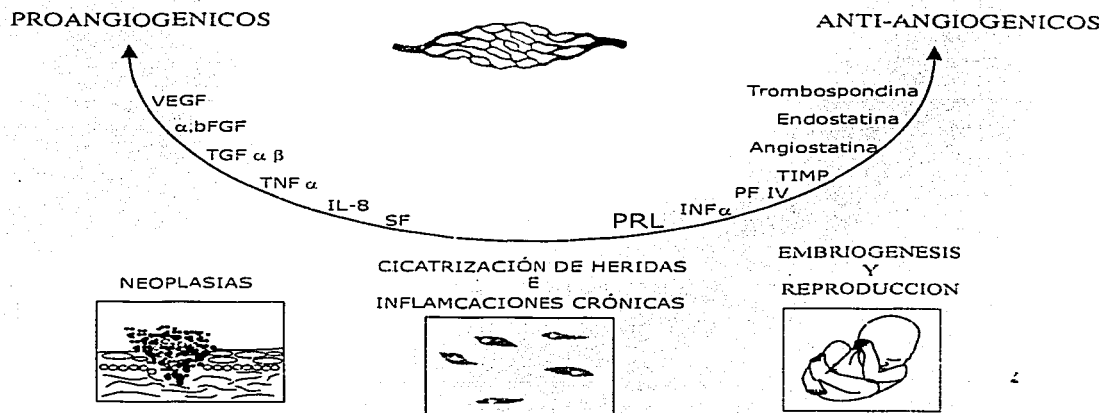
### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

molecular de 23 kDa [5,6]. Las *PRLs* actúan de manera dual, como hormonas o como citocinas, en la regulación de diversas funciones que inciden sobre la reproducción, la osmorregulación, el crecimiento, el metabolismo y la modulación de la respuesta inmune entre otras [7,8].

Entre las diversas funciones de esta hormona recientemente se ha incluido a la angiogénesis [9]. La *PRL* activa en la angiogénesis resulta de la proteólisis de la hormona, entre los aminoácidos Tyr<sup>145</sup> y Ser<sup>149</sup> por proteasas ácidas de la familia de la catepsina D [10,11]. La reducción de los puentes disulfuro de la *PRL* así procesada genera dos fragmentos, uno N-terminal de 16 kDa (*PRL* 16K) y uno C-terminal de 5.8 kDa (Figura 3) [11]. La *PRL* 16K, pero no la *PRL* integra (23KDa) inhibe la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo* la *PRL* 16K inhibe la formación de vasos capilares sanguíneos que tiene lugar en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo [12]. Asimismo, la *PRL* 16K inhibe la angiogénesis inducida por el bFGF en la cornea de la rata [13]. Las acciones *in vivo* parecen ser mediadas a través de efectos directos sobre las células endoteliales que conforman a los capilares sanguíneos. La *PRL* 16K inhibe la proliferación estimulada por bFGF y VEGF de las células endoteliales aisladas de diversas especies (rata [14], bovina [15] y humana [9,12] ) y de diferentes lechos vasculares (capilares de la retina y de la vena umbilical [15] ). Además, la *PRL* 16K estimula en las células endoteliales la expresión del inhibidor del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), que es el responsable de inhibir al activador del plasminógeno de tipo urokinasa (u-PA) [16,17]. El u-PA promueve la degradación la membrana basal que rodea los capilares sanguíneos, y con ello permite la migración del endotelio y su regeneración durante las etapas tempranas de la angiogénesis [16,17]. Finalmente, la *PRL* 16K estimula la apoptosis de las células endoteliales determinada a través de la fragmentación del DNA, la activación de caspasas y la inhibición de los efectos de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 [18].

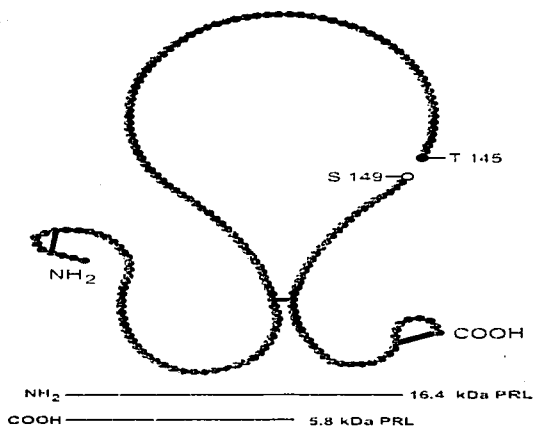
El hecho de que todas las acciones antiangiogénicas se observen en respuesta a la *PRL* 16K pero no a la *PRL* 23K, sugiere su mediación a través de receptores distintos al receptor de esta hormona. A este respecto, no se ha logrado detectar la expresión del receptor de *PRL* en el endotelio vascular [14,19], pero sí se observó que membranas de células endoteliales contienen sitios de unión específicos saturables y de alta afinidad (Kd

## ANGIOGENESIS



**Fig: 2. Angiogenesis en procesos biológicos.** Esquema que ilustra algunos factores estimuladores e inhibidores de la angiogenesis y su influencia en procesos fisiológicos y patológicos. También se muestran algunas moléculas estimulatorias o inhibitorias de la angiogenesis.

TESIS CON  
FAMILIA DE ORIGEN



**Fig: 3. Estructura de la hormona PRL.** Esquema que ilustra la estructura primaria de la PRL y el sitio de corte entre los aminoácidos Treonina 145 (T-145) y Serina 149 (S-149), que bajo la acción de agentes reductores permite la generación de dos fragmentos, uno N-terminal de 16.4 kDa y otro C-terminal de 5.8 kDa.

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

= 1nM) para la *PRL* 16K, que no reconocen a la *PRL* 23K [19] y que podrían representar los receptores de este fragmento hormonal. Sin embargo la identidad de estos posibles receptores aún no se conoce, y poco es lo que se sabe sobre los mecanismos moleculares de señalamiento a través de los cuales está variante de la *PRL* ejerce sus efectos anti-angiogénicos. A éste respecto lo que se conoce es que la *PRL* 16K, inhibe las acciones mitogénicas tanto del bFGF como del VEGF, a través de inhibir la activación de RAF-1 y la subsecuente fosforilación-activación de las MAPKs [9,20].

La idea de que la *PRL* 16K puede inhibir la angiogénesis vía receptores específicos, apoya su posible papel como regulador natural de este proceso y ha motivado la búsqueda de una *PRL* 16K endógena. Al respecto, se han presentado evidencias de la presencia de *PRL* 16K en la hipófisis anterior y en la circulación de diversas especies, incluida la humana [6,21-26]. Asimismo, se ha mostrado que el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, produce y secreta a la circulación un fragmento de *PRL* de 14KDa, que es funcionalmente análogo a la *PRL* 16K ya que también inhibe la proliferación de las células endoteliales en cultivo [27,28]. La observación de que fragmentos moleculares de la *PRL* con propiedades aniangiogénicas están presentes en la circulación, ha permitido proponer el posible papel de estos péptidos en la inhibición sistémica de la angiogénesis. Esta posibilidad no es nueva dado que se conocen varios fragmentos moleculares de proteínas que poseen propiedades anti-angiogénicas (Tabla 1) y algunos de estos, como la angiostatina y la endostatina están presentes en la circulación [29-31].

La inhibición sistémica de la angiogénesis podría contribuir a explicar la ausencia de neovascularización que tiene lugar en todo el organismo a través de la vida adulta. Sin embargo, se sabe que la angiogénesis es un proceso que ocurre localmente y no en forma generalizada, y que en gran medida obedece a factores producidos por células de la vecindad del capilar e incluso por las mismas células endoteliales [9,32]. Al respecto, evidencias recientes muestran que la *PRL* se produce y secreta por el endotelio vascular, lo que sugiere que las *PRLs* podrían contribuir a la regulación local (autócrina) de la angiogénesis [9,33,34].



**TABLA 1**

**Fragmentos de proteínas precursoras inhibidores de la función endotelial**

<b>Fragmento</b>	<b>PM</b>
Fibronectina	29 kDa
PRL	16 kDa
Trombospondina	
Angiostatina	38 kDa
Factor plaquetario 4	7.8 kDa
EGF murino	32-42 kDa
Endostatina	20 kDa

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## *Producción de una línea celular endotelial bovina*

### **B.2 PRLs endoteliales**

Estudios recientes han demostrado que el gen de la *PRL* se expresa en las células endoteliales de diversos lechos vasculares y de diferentes especies [14,33-35]; si bien existen diferencias importantes entre los diferentes tipos de endotelio, con respecto a las isoformas de *PRL* que se producen y se secretan por el endotelio vascular [34]. Por ejemplo, las células endoteliales derivadas de capilares de cerebro bovino en cultivo, sintetizan y secretan *PRLs* inmunorreactivas cuyos pesos moleculares aparentes son de 23, 21 y 14 kDa [28]. En las células bovinas y las células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana (HUVEC), además de las proteínas inmunorreactivas de 23, 21 y 14kDa, también producen y secretan una proporción importante de una proteína inmunorreactiva de 16kDa [14,33,34]. Resulta interesante que en las células humanas, la incubación con anticuerpos anti-*PRL* estimula la proliferación celular [34]. Este efecto estimulador de los anticuerpos, podría ser consecuencia de la inmunoneutralización de la *PRL* 16K anti-angiogénica secretada por las células endoteliales humanas [34]. Otro endotelio que presenta diferencias con respecto a la *PRLs* que produce, es el proveniente de los capilares de la retina de la rata. Estas células solamente expresan y secretan a la *PRL* 23K y no a otras isoformas de *PRL* [14]. Además estas células producen cantidades de *PRL* mayores ( $\geq$  300 veces) que la de los otros endotelios referidos [9,14].

El hecho de que las células endoteliales produzcan y secreten *PRLs* con efectos sobre la angiogénesis, apoya la idea de que estas proteínas pudieran participar en la regulación local (autócrina) de éste proceso. Si esto es así, cabe proponer que la expresión del gen de la *PRL* en el endotelio vascular podría estar bajo el control de factores que pueden afectar el proceso angiogénico, o bien otras funciones propias de estas células. Al respecto de esto último se sabe que las células endoteliales median la adhesión y activación de leucocitos en procesos de inflamación [36], y resultados recientes han mostrado que la *PRL* estimula la adhesión de células mononucleares de sangre periférica a monocapas de endotelio activado [37].

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

Dadas las diferencias que se han descrito en la producción de *PRL* entre diversos tipos de endotelio, es claro que la expresión y el procesamiento de la *PRL* es función de la heterogeneidad celular endotelial.

#### **C. Heterogeneidad del endotelio vascular**

Las células endoteliales de los diferentes lechos vasculares difieren en sus capacidades para percibir, transducir y responder a las diferentes señales angiogénicas [38,39]. A saber, la migración y la proliferación de las células endoteliales están finamente controladas por factores derivados del microambiente local que incluyen factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, fuerzas hemodinámicas, etc; que en su conjunto definen una respuesta celular diferencial [40-42]. Por ejemplo se sabe que el bFGF, el estimulador clásico de la angiogénesis, aumenta la producción del activador del plásmínogeno (tPA) en las células endoteliales de la aorta, pero suprime dicha función en las células endoteliales de origen venoso [43,44]. También se sabe que la capacidad de adhesión puede variar entre los diferentes tipos de células endoteliales. Por ejemplo se ha encontrado que la estimulación de la molécula adhesión VCAM-1 en respuesta a TNF- $\alpha$ , es 2-3 veces mayor en el endotelio de la vena umbilical que en el de las venas de músculo liso [32].

Asimismo, células endoteliales de la vena umbilical sembradas en matrigel, requieren aproximadamente de 24 h para formar túbulos parecidos a los capilares sanguíneos, mientras que las de las venas del músculo liso establecen la malla tubular en aproximadamente 8 h [46,47]. Por otra parte, se ha observado que las células de la microvasculatura difieren de las células endoteliales de los grandes vasos en la expresión y activación de diversos antígenos de superficie celular [44,45]. Demostrado por la acción de los lipopolisacáridos (LPS) de origen bacteriano sobre la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y PCAM-1), difiere entre endotelios de la macro y de la micro-circulación [48-50].

## *Producción de una línea celular endotelial bovina*

Además de las diferencias asociadas a su heterogeneidad funcional, las características propias de su localización anatómica imponen limitaciones para el aislamiento y mantenimiento de los cultivos primarios de las células endoteliales.

### **C.1 Cultivos primarios de endotelio vascular**

El uso de cultivos primarios como modelo *in vitro* para la investigación de la función endotelial, ha estado limitada en parte por la localización y características del lecho vascular que interfieren con la obtención del tejido y el aislamiento del endotelio. En situaciones donde el modelo celular a implementar es de origen humano, una consideración adicional es la disponibilidad de las muestras y el riesgo implícito de su manipulación. Además en cada aislamiento existe el riesgo de contaminación con más de un tipo celular siendo los principales contaminantes los fibroblastos, células mayoritarias de los tejidos corporales [51]. Por ejemplo, los cultivos de células endoteliales de la retina mantienen propiedades funcionales asociadas a su acción en la conformación de la barrera "hemato-retiniana" [51] y a su respuesta incrementada al VEGF [51-56], por lo que se les considera un buen modelo de estudio de este lecho vascular. Sin embargo su aislamiento requiere de suficiente tejido que necesariamente implica varios donadores y la eliminación de contaminantes celulares entre las que sobresalen, fibroblastos y astrocitos. Este aislamiento es elaborado y descansa en técnicas de clonación y/o de separación selectiva. Por ejemplo mediante el uso de anticuerpos específicos de endotelio [14]. En contraposición al endotelio de la retina, las células endoteliales de la vena del cordón umbilical son fácilmente accesibles dada la disponibilidad del tejido después del parto. Además, el tratamiento controlado con proteasas puede separar selectivamente al endotelio del tejido subyacente, por lo que la contaminación con otros tipos celulares es mínima. Dadas estas ventajas, un número muy importante de estudios sobre la angiogénesis han sido conducidos en células derivadas de la vena umbilical humana (HUVEC), gracias a que se tiene una fuente de tejido humano fácilmente disponible y las células son de fácil aislamiento. Sin embargo, diversas desventajas limitan el uso de HUVEC en su cultivo, a saber: HUVEC requieren substratos especiales (fibronectina, gelatina, colágena, etc), una combinación de factores de crecimiento (bFGF, ECGC, etc), cofactores (heparina) y altas concentraciones de suero [57]. Además las HUVEC poseen

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

períodos largos de duplicación celular (2 a 3 días), y tienen una vida promedio corta en cultivo (4 a 5 resiembras) [57]. Estas características limitan el número de células disponibles, por lo que regularmente se recurre a juntar lotes celulares aislados de varios donadores, lo que a su vez conduce a poblaciones celulares altamente heterogéneas.

Estas desventajas de los cultivos primarios pueden contrarrestarse mediante la generación de las líneas celulares endoteliales inmortales. En primer lugar, las líneas celulares siempre están disponibles, ya que pueden proliferar continuamente *in vitro* sin necesidad de ser reaisladas del organismo donador. Estas líneas celulares pueden ser clonadas y dar lugar a poblaciones homogéneas (en grandes cantidades) con respecto a su genotipo y fenotipo facilitando así la reproducibilidad de los análisis [58-60]. Se han generado líneas celulares de HUVEC que presentan un rango de características que van de un fenotipo casi normal [61], donde las células difieren en pocas funciones endoteliales típicas [61], hasta aquellas que presentan un fenotipo completamente transformado [61]. Si bien existe una línea celular HUVEC inmortalizada espontáneamente a partir de un cultivo primario, las líneas celulares HUVEC han sido el producto de la transformación artificial por medio de la introducción de oncogenes virales como el del virus del simio 40 (SV-40) [62], de *v-ras* y de *v-mos* [63] ó de los oncogenes E6 y E7 del papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16) [64]. También se generó una línea celular a través de la fusión de HUVEC con la línea celular A549 proveniente de un carcinoma pulmonar humano [65].

Una de las estrategias más utilizadas, que presenta ventajas para el desarrollo de líneas celulares es la transfección con E6 y E7 de HPV-16. Esta estrategia se ha empleado en la immortalización de fibroblastos [66], células epiteliales [67], queratinocitos [68], células del músculo liso [69] y las propias células endoteliales de capilares de cerebro de cerdo [70].

#### **D. Inmortalización mediante los oncogenes E6 y E7**

Los papilomavirus son virus con genoma de ADN circular, de doble cadena y con un tamaño aproximado de 7900 pb [71]. Actualmente se han identificado cerca de 200 diferentes tipos de HPV. Aproximadamente 20 de estos están específicamente asociados con lesiones epiteliales del cuello uterino y han sido clasificados de acuerdo a su

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

patogenicidad como de bajo riesgo, pues producen lesiones con baja probabilidad de provocar una progresión carcinogénica. Sin embargo los serotipos 16, 18, 30 y 31 son considerados de alto riesgo y se encuentran en lesiones epiteliales del cervix uterino, donde se asocian con una alta incidencia del carcinoma cervical [72]. A éste respecto en más del 99.7% de los cánceres cervicales humanos se ha encontrado el ADN de HPV-16 y la expresión selectiva de los oncogenes E6 y E7 [73]; los cuales también están presentes en líneas celulares derivadas de algunos de estos tumores como por ejemplo en las células CasKi, SiHa y HeLa [74].

Las oncoproteínas E6 y E7 están relacionadas con la transformación celular [71,72]. Se sabe que la introducción del ADN de HPV-16 a las células NHI 3T3 de ratón, les confiere la capacidad de generar tumores cuando son implantadas en ratones inmunosuprimidos [75]. Asimismo, las oncoproteínas E6 y E7 son eficientes para inducir la immortalización de células epiteliales humanas *in vitro*. Células epiteliales de prepucio y queratinocitos de humano pueden ser immortalizadas por la expresión única de E7, mientras la coexpresión con E6 aumenta la frecuencia de immortalización [76,77].

El principal blanco celular del gen E7, es la forma fosforilada activa de la proteína retinoblastoma (pRb), por lo que esta unión impide que pRb bloquee la transcripción de genes involucrados en la progresión G1-S del ciclo celular [69,73]. Por otro lado, el blanco de la oncoproteína E6 es el gen supresor de tumor p53. La proteína E6 al unirse a la p53 provoca su degradación [72].

TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

## JUSTIFICACIÓN

Las células endoteliales en cultivo constituyen un modelo muy útil para estudiar la expresión y acción de factores capaces de regular la angiogénesis. Sin embargo, la obtención y manejo de los cultivos primarios de endotelio presenta dificultades que interfieren con la obtención y reproducibilidad de los resultados. Las principales dificultades residen en la heterogeneidad celular, que frecuentemente incluye otros tipos celulares (por ejemplo, fibroblastos) o células endoteliales con características diversas asociadas al estado fisiológico del donador. Además, el endotelio posee una baja viabilidad y capacidad reproductiva en cultivo, lo que limita su uso a las resiembras iniciales del cultivo.

La generación de una línea celular endotelial, presenta como ventaja la obtención de endotelio homogéneo con reproducción indefinida. Estas características aumentan la disponibilidad de los cultivos y facilitan la reproducibilidad de los análisis encaminados a estudiar la regulación del endotelio por diversos factores biológicos. Asimismo las células endoteliales inmortales, permiten estudiar posibles características asociadas con la transformación tumoral que podrían interferir con la producción y/o acción de factores con efecto sobre la angiogénesis.

El propósito de éste estudio fue analizar si la transfección del endotelio derivado de la vena umbilical bovina, con los oncogenes E6 y E7 de HPV 16, genera una línea celular inmortal de utilidad para poder estudiar la expresión y efecto de la prolactina sobre la angiogénesis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## HIPOTESIS

Los oncogenes E6/E7 del HPV 16 generan líneas celulares endoteliales que mantienen la diferenciación del endotelio, expresan *PRL* y responden a la *PRL* 16K.

## OBJETIVOS

- a) Generar una línea celular endotelial inmortal mediante la expresión de los genes E6/E7 del HPV 16 en células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC).
- b) Determinar las propiedades de endotelio diferenciado en la línea celular inmortal BUVEC.
- c) Determinar la expresión del ARN mensajero *PRL* y el efecto de la *PRL* 16K en la línea celular inmortal BUVEC.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **I. Producción de la línea endotelial inmortal**

#### **1. Aislamiento y cultivo de células BUVEC**

Las células endoteliales fueron aisladas de la manera siguiente con algunas modificaciones [78]. Cordones umbilicales bovinos (2-3) obtenidos en el rastro municipal fueron la fuente de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC). Los cordones fueron lavados en PBS y transportados al laboratorio en Hank's a 4 °C. Las venas del cordón fueron canuladas y lavadas con Hank's para eliminar los restos de sangre. Un extremo de la vena se cerró y por el otro se inyectaron 15 ml de una solución de tripsina-EDTA (0.5%) y se le incubó por 20 min a 37 °C. La suspensión celular se diluyó en 15 ml de medio de cultivo completo (F12K; 10% Suero de ternera y antibióticos) y se centrifugó por 6 min a 2000 rpm a temperatura ambiente. El paquete celular se resuspendió en 6 ml de medio de cultivo y 2 ml de la suspensión celular se sembró en cajas de cultivo (35mm). Las células se mantuvieron bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) y aire (95%) a 37 °C hasta su confluencia. Los cultivos confluentes fueron amplificados mediante diluciones (1:3) y resembrados en cajas de 100 mm. En sus etapas iniciales una porción del endotelio fue congelado en nitrógeno líquido, empleando suero de ternera con 10% de DMSO.

#### **2. Construcción del vector pCMV-E6E7**

La construcción recombinante fue realizada de acuerdo a técnicas estándares de ingeniería genética [79,80]. El vector de clonación empleado fue el plásmido pCDNA3 que contiene el inserto E6E7 bajo el promotor del citomegalovirus (CMV) y el gen de resistencia a geneticina (G418), un análogo de la neomicina, bajo el promotor del virus del simio 40 (SV40). El vector pCDNA3 (5 µg) fue cortado con la enzima EcoR1. Paralelamente el plásmido pSV-E6E7 que contiene las secuencias E6 y E7 (850 pb) de HPV-16, se cortó con la enzima EcoR1 para liberar el inserto de 850 pb. Ambas digestiones enzimáticas (5 U EcoR1/µg de ADN) se realizaron por 30 min a 37 °C. Los productos de la digestión se analizaron mediante geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. La ligación molecular (vector + inserto) fue de tipo pegajoso,

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

empleando 20 ng del vector y 5 ng del inserto. A esta mezcla de inserto y vector se agregó la enzima T4 DNA ligasa (3 U) en un volumen final de 10  $\mu$ l y la reacción se incubó por 2 h a 24 °C. El vector resultante contuvo el inserto E6E7 bajo el promotor de CMV y el gen de resistencia a geneticina y se denominó pCMV-E6/E7.

### **3. Transfección celular**

La electroporación se empleó como el método de transfección. Dos millones de BUVEC en 800  $\mu$ l de medio OPTIMEM (GIBCO), se transfectaron con 10  $\mu$ g del vector de transformación pCMV-E6/E7 empleando un electroporador (Gene pulser, BIO-RAD, Hercules CA. EUA) a 360 V y 100  $\mu$ F. Las células electroporadas se sembraron en placas de 6 pozos (35 mm) con medio de cultivo fresco.

### **4. Selección y clonación celular**

Cuarenta y ocho horas post-transfección, las células electroporadas BUVEC-E6E7 fueron cultivadas en medio de cultivo completo con 500  $\mu$ g/ml de G418, para eliminar las células que no incorporaron el plásmido pCMV-E6/E7 a su genoma celular. Como control negativo de resistencia se emplearon células BUVEC sin transfectar (silvestres). Se revisaron cotidianamente los cultivos por 4 semanas para detectar diferencias en la sobrevivencia celular y la formación de colonias resistentes a G418.

Las células BUVEC-E6E7 se clonaron por el método de dilución limitante de la manera siguiente. Células BUVEC y BUVEC-E6E7 fueron cosechadas y el número celular total por caja fue determinado mediante el conteo celular directo empleando un hemocitómetro. Las suspensiones celulares se diluyeron en medio de cultivo para tener 1 célula BUVEC-E6E7 y 1000 células BUVEC en placas de 96 pozos. Las BUVEC se utilizaron como nodrizas para sostener la viabilidad y actividad de las BUVEC-E6E7. Cuando las células llegaron al 80% de confluencia, se les agregó el antibiótico G418 (500  $\mu$ g/ml) para eliminar las células nodrizas. Cada tercer día se cambió el medio de cultivo por medio fresco con G418.

## *Producción de una línea celular endotelial bovina*

Cuando las clonas celulares BUVEC-E6E7 llegaron a subconfluencia, se cosecharon y se sembraron gradualmente en cajas de 48, 24, 12, 6 pozos y finalmente en cajas de 100 mm. Alcanzada la confluencia de 90%, las cajas se cosecharon, una parte de la suspensión celular se congeló y la otra se mantuvo para su posterior caracterización.

### **5. Caracterización de BUVEC transfectadas**

#### **a) Valoración de la inserción del oncogene E6E7 al genoma celular**

##### **a.1) Extracción de ADN**

El ADN total de células BUVEC y BUVEC-E6E7 se aisló mediante la técnica de Gene-Clean [81]. Las células se colectaron en 400  $\mu$ l de yoduro de sodio (NaI) 6M con 1.5 % de bisulfito de sodio y se centrifugaron a 10,000 rpm. A la fase acuosa recuperada en tubo nuevo se le agregaron 30  $\mu$ l de la suspensión de sílica (1 mg/ml). La mezcla se agitó por 5 minutos a 4 °C y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 seg. La pastilla se resuspendió (Vortex) en 300  $\mu$ l de solución de lavado (50 ml de etanol y 50 ml de solución con 20 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA y 0.1 M NaCl) y se centrifugó como anteriormente. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua estéril; la mezcla se incubó por 5 minutos a 55 °C y se centrifugó como anteriormente. El sobrenadante que lleva al ADN diluido se recuperó en tubo nuevo (este paso se repitió 2 veces).

##### **a.2) PCR**

La PCR se realizó mezclando 2  $\mu$ l de la mezcla de dNTPs (AGTC 200  $\mu$ M cada uno); 1  $\mu$ l de amortiguador 10X; MgCl<sub>2</sub> (final 1.5  $\mu$ M); 1 U de Taq DNA polimerasa; 25 pM de cada uno de los primers 5' y 3' específicos de la secuencia a amplificar y DNA o reacción de RT en un volumen final de 50  $\mu$ l. La reacción se realizó en un termociclador GenAmp 2400 (PERKIN-ELMER). Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para el producto E6E7 de 1000 pb fueron: (1) 5'-CCA TTT AAT ggC gAg TTT CCT TA<sub>g</sub>-3'; (2) 5'-CAg Tgg TCA TCA CCA TgA ACA g-3'. Para el producto E6E7 de 410 pb se utilizaron los oligonucleótidos: (3) 5'-TAA TAC gAC TCA CTA TA<sub>g</sub> gg-

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

3' y (4). 5'-ATT TAG gTg ACA CTA TAG-3'. Los oligonucleotidos y el tamaño del producto amplificado por ellos se ilustra en la figura 4 A.

#### **a.3) Detección del oncogen E6E7 por inmunocitoquímica**

Células BUVEC-E6E7 se sembraron en cubreobjetos estériles cubiertos con fibronectina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en placas de 12 pozos y aproximadamente al 80% de confluencia. Las células se lavaron con PBS, se fijaron en paraformaldehído al 2% durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 5 veces con PBS. Subsecuentemente, las células se incubaron con suero normal caprino diluido 1:10 en PBS-Tritón (tritón 0.3 % en PBS 1X), durante dos horas en cámara húmeda a temperatura ambiente para bloquear sitios de pegado inespecíficos, se lavaron tres veces con PBS-Tritón y se incubaron en ausencia o presencia del anticuerpo monoclonal anti-proteína E7 (ZYMED, Laboratories San Francisco California, EUA), diluido 1:2 en PBS-Tritón a temperatura ambiente en cámara húmeda durante toda la noche (18-20 horas). Al día siguiente las células se lavaron 4 veces con PBS-Tritón y se incubaron durante una hora en cámara húmeda con segundos anticuerpos anti-IgG de ratón acoplados a rodamina (JACKSON, laboratories West Baltimore PA) diluidos 1:100 en PBS-Tritón. Finalmente las células se lavaron 4 veces con PBS-Tritón y una vez con PBS. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con PBS-glicerol (1:1); las células se observaron y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60).

#### **b) Análisis del ciclo celular**

##### **b.1) Duración**

Cincuenta mil células BUVEC fueron sembradas en cajas de 60 mm en medio de cultivo completo y los conteos celulares se realizaron a las 24 horas (tiempo 0), o bien a las 48, 72, 96, 130, 154 y 178 horas post-siembra. En cada caso 3 cajas fueron cosechadas y el número celular total por caja fue determinado, mediante el conteo celular directo empleando un hemocitómetro. El número celular promedio de los triplicados fué graficado para determinar la duración en horas de la división de las células no transfectadas (silvestres).

## *Producción de una línea celular endotelial bovina*

### **b) Tasa de proliferación.**

Quinientas mil células BUVEC o BUVEC-E6E7 fueron sembradas en cada resiembra en cajas de 100 mm con medio de cultivo completo. Los conteos celulares se realizaron cada tercer día (subconfluencia) post-resiembra. En cada caso, tres cajas fueron cosechadas y el número celular total por caja determinado mediante el conteo celular directo empleando un hemocitómetro. El número celular promedio de los triplicados fué graficado para determinar la tasa de proliferación celular a través del tiempo.

## **II. Análisis de propiedades endoteliales**

### **a) Detección de la proteína Von Willebrand**

Células BUVEC, BUVEC-E6E7 y las cuatro clonas BVE-E6E7-1,-2,-3 y -4 fueron sembradas en cubreobjetos estériles cubiertos con fibronectina y se procesaron para inmunocitoquímica como se mencionó anteriormente para la proteína E7. Las células se incubaron toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti-factor Von Willebrand humano (ZYMED Laboratories, San Francisco, CA. EUA) diluido 1:500 en PBS-Tritón. Posteriormente, las laminillas se lavaron repetidamente con PBS y se incubaron por 2 hrs con un segundo anticuerpo de conejo anti-IGg de ratón acoplado a rodamina.

### **b) Unión de lectinas**

La presencia de carbohidratos específicos en la membrana del endotelio se evaluó mediante el uso de lectinas fluorescentes de acuerdo al método descrito [82.83]. Brevemente, las células BUVEC, BUVEC-E6E7 y BVE-E6E7-1,-2,-3 y -4 fueron sembradas en laminillas y se fijaron como en los casos anteriores. Las células fijadas se incubaron por 2 h a 37 °C con las lectinas de *Ulex europaeus* (100 µg/ml) y *Bandeiraëa simplicifolia* (25 µg/ml) acopladas a rodamina (BSI-TRICT y UEA-I-TRICT ambas de SIGMA). Finalmente las células se lavaron 4 veces con PBS-Tritón y 1 vez con PBS. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con PBS-glicerol (1:1); las células se observaron y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60).

**c) Incorporación de LDL**

La incorporación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) es otra característica que distingue al endotelio vascular [82]. Células BUVEC, BUVEC-E6E7 y BVE-E6E7-1,-2,-3 y -4 se sembraron en cubreobjetos estériles cubiertos con fibronectina (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en placas de 12 pozos. Aproximadamente al 80 % de confluencia, las células se incubaron directamente por 2 h con 3  $\mu\text{l}$  de la LDL (10  $\mu\text{g/ml}$ ) acoplada a rodamina (Dil-Ac-LDL; Molecular probes, EUA). Finalmente las células se lavaron 4 veces con PBS-Tritón y 1 vez con PBS. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con PBS-glicerol (1:1); las células se observaron y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60).

**d) Respuesta a factores mitogénicos**

**d.1) Dependencia del suero**

Cincuenta mil células BUVEC y BVEC-E6E7-1 fueron cultivadas en cajas de 60 mm, bajo diferentes concentraciones (0, 1, 5, 10, 20 y 30 %) de suero normal de ternera y cinco días después se cosecharon y se determino el número celular total.

**d.2) Respuesta al VEGF**

Mil células fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio de cultivo completo: cuando las células se adhirieron (24 horas después), se substituyó el medio por medio libre de suero con concentraciones crecientes (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 15  $\text{ng/ml}$ ) del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Después de 72 horas se determinó la proliferación celular a través del método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2h-tetrazolio bromuro (MTT), que consistió en añadir 10  $\mu\text{l}$  de MTT (5  $\text{mg/ml}$  en PBS) por pozo e incubar por 4 horas a 37 °C. Finalmente se adicionaron 100  $\mu\text{l}$ /pozo de SDS (10 %)-HCl (0.4 N) y las cajas se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz. El producto colorido (violeta) de la reacción se midió por la reacción colorimétrica a 595 nm en un lector de placas de ELISA (BIO-RAD, Hercules CA).

### **III. Expresión y efecto de PRL**

#### **a) Expresión del gen PRL**

##### **a.1) Extracción, transcripción inversa de RNA total y PCR**

El RNA celular total de células BUVEC y BUVEC-E6E7-1 se aisló de cajas de 100 mm confluentes mediante la técnica de isotiocianato de guanidina:fenol-cloroformo [84]. Transcripción inversa: un  $\mu\text{g}$  de RNA total de células BUVEC y BUVEC-E6E7-1 fue mezclado con 2  $\mu\text{l}$  de amortiguador 1X; 2  $\mu\text{l}$  de dNTPs (AGTC); 0.5  $\mu\text{l}$  de RNasin; 1  $\mu\text{l}$  de oligo-dT y 2.5 U de la enzima transcriptasa reversa en un volumen de 20  $\mu\text{l}$ . La mezcla se dejó a temperatura ambiente por 10 min y finalmente se incubó por 35 min a 45 °C para copiar el ARN a su forma de ADNc.

Para la amplificación de PRL se utilizaron los siguientes oligonucleotidos complementarios al ADNc de la PRL bovina: (1) 5'-ACC TCT CCT Cgg AAA TgT TA A-3' con (2) 5'-TgT AgA TgA TTC TgC AAT TCA g-3' que amplifican un producto de 473 pb; 2 con (3) 5'-Agg gCA AAg ggT TCA TTA CCA T-3' que amplifican un producto de 428 pb y 3 con (4) 5'-AAg TgT CAA TCT TgC TTg AAT C-3' que amplifican un producto de 395 pb.

##### **b) Efecto anti-proliferativo de PRL 16K**

La PRL 16K se generó a partir de la proteólisis enzimática de la preparación de referencia de PRL (donada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de EUA) y se purificó de acuerdo al método descrito [85].

Mil células BUVEC (resiembrada 7) y BVE-E6E7-1 (resiembrada 37) fueron sembradas en placas de 96 pozos en medio de cultivo completo, cuando las células se adhirieron (24 horas después) se eliminó el medio y se agregó medio libre de suero con VEGF (10 ng/ml) y concentraciones crecientes (0, 1, 10 y 50 nM) del fragmento de PRL 16K. Después de 72 horas se determinó la proliferación celular a través del método de MTT.

## RESULTADOS

### **Transfección de células BUVEC con el vector pCMV-E6E7**

Células BUVEC y BUVEC transfectadas con el vector de expresión y selección pCMV-E6E7, fueron cultivadas en presencia del antibiótico de selección genéctica (G418). Al cabo de 3-4 semanas solo sobrevivieron al antibiótico los cultivos transfectados (**Figura 4**). Estos cultivos transfectados, así seleccionados, se crecieron a confluencia con una dosis baja de G418 (100 µg/ml) para evitar la contaminación con células que no expresaran los oncogenes inmortalizantes.

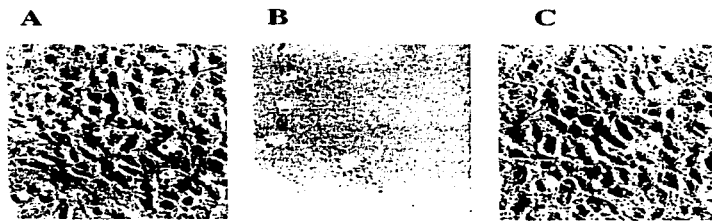
### **Análisis de la integración de los oncogenes en las células BUVEC-E6E7**

La integración genómica de las secuencias E6E7 de HPV-16 en las células transfectadas seleccionadas, se verificó por PCR empleando dos juegos de oligonucleótidos diseñados para amplificar dicha secuencia (**Figura 5A**). La figura 5B muestra las reacciones de PCR empleando ADN genómico de células BUVEC (carriles 1-4), células BUVEC-E6E7 (carriles 5-8) y como control positivo el plásmido pCMV-E6E7 (carriles 10 y 11). Dado que la secuencia genética E6E7, de 850 pb se clonó en la zona de sitios únicos de corte del vector pCDNA3, los oligonucleótidos 1 (T7) y 2 (SP6) hibridaron en los extremos de dicha zona, lo que explica la presencia de un fragmento de ADN de 1000 pb. En la parte 3' de la secuencia genética que codifica para la proteína E6 hibrida el oligonucleotido 3 (HPV-5') y en el extremo 5' de la secuencia que codifica para la proteína E7 hibrida el oligonucleotido 4 (HPV-3'). Esta combinación de oligonucleotidos 3 y 4 generan un producto de 410 pb, que es específico de la región de fusión entre los genes virales E6 y E7 (**Figura 5 A y B**). Los resultados anteriores muestran claramente la integración correcta del cassette de expresión de E6E7 y de resistencia a G418 en el genoma de las células BUVEC-E6E7 (carriles 5-8).

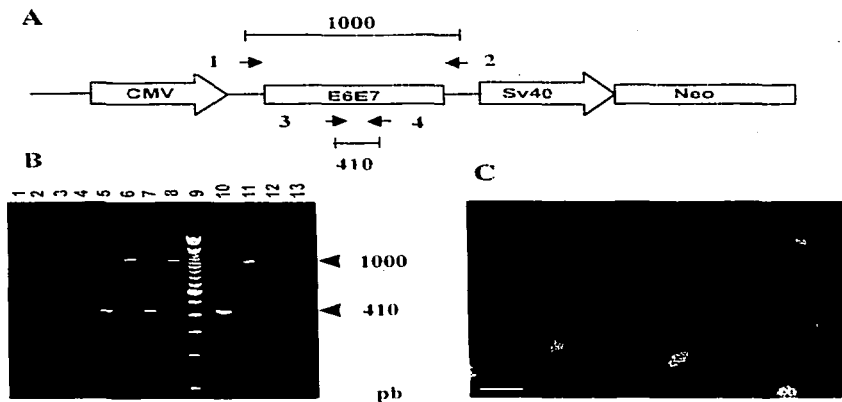
Para determinar la expresión de las oncoproteínas virales se realizó un análisis por inmunocitoquímica de las células BUVEC-E6E7, empleando un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína E7. Como puede verse en la fotografía de la **figura 5 C**, todas las células BUVEC-E6E7 policlonales se marcaron positivamente con dicho anticuerpo.



*Producción de una línea celular endotelial bovina*



**Fig: 4. Selección celular.** Células BUVEC no transfectadas (A y B) y transfectadas (C) cultivadas en ausencia (A) o presencia (B y C) del antibiótico G418 por 4 semanas.



**Fig: 5. Integración y expresión de las oncoproteínas E6E7.** A) Plásmido pCMV-E6E7 que contiene: promotor de citomegalovirus (CMV); secuencias oncogénicas (E6E7); promotor del virus del simio 40 (SV40); gen de resistencia a G418 (Neo); oligonucleótidos 1, 2, 3 y 4 para la PCR (flechas). B) PCR del ADN genómico de células no transfectadas (carriles 1-4) y transfectadas (carriles 5-8); ADN de pCMV-E6E7 (carriles 10 y 11) y control negativo sin ADN (carriles 12 y 13); Marcador de peso molecular (carril 9). C) Inmunocitoquímica con el mAb anti-E7 de células transfectadas. Escala de la barra = 38  $\mu$ m.

M. Cajero Juárez

TESIS CON  
FALLIDO ORIGEN

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

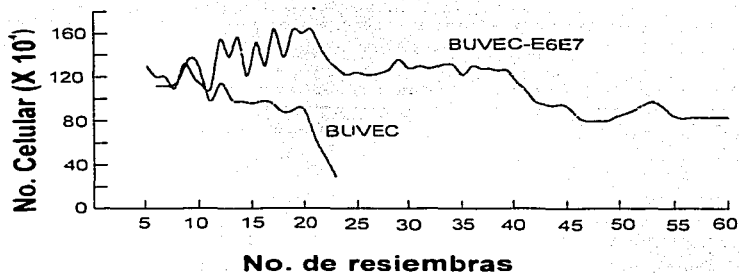
La duración del ciclo celular de BUVEC silvestres fué determinado en condiciones normales de cultivo. El conteo celular directo por 5 días de las cajas de cultivo, mostró que las células duplicaron su número celular aproximadamente cada 24 horas (resultados no mostrados).

Para analizar la posible immortalización celular de los cultivos BUVEC-E6E7, se determinó su tasa de proliferación a través del tiempo y se comparó con la de las células BUVEC. El número de células BUVEC-E6E7 registrado al cabo de 48 h después de la resiembra (número de replicación) fué constante a lo largo de más de 60 resiembras, lo que es consistente con sus características inmortales. En contraposición las células BUVEC disminuyeron su número de replicación a partir de la resiembra 20 (**Figura 6**). De manera consistente con la senescencia de los cultivos BUVEC se observaron cambios en su morfología celular. Por ejemplo, en la resiembra 21 las células BUVEC mostraron un mayor tamaño que en las resiembras más tempranas. En contraposición, no se observó diferencia en el tamaño de las células BUVEC-E6E7 a lo largo del tiempo, siendo su morfología celular similar a la de los cultivos jóvenes de BUVEC (**Figura 7**). Para comprobar que la aparente diferencia en tamaño no fué reflejo de una mayor superficie de adhesión, se tripsinaron los cultivos BUVEC silvestres y BUVEC-E6E7 y se comparó el volumen de las células en suspensión a través de determinar el diámetro celular por medio de fotografías de los cultivos. Se observó que las células de los cultivos tardíos BUVEC poseen un mayor volumen que las de los cultivos BUVEC-E6E7 de edad equivalente (resultados no mostrados).

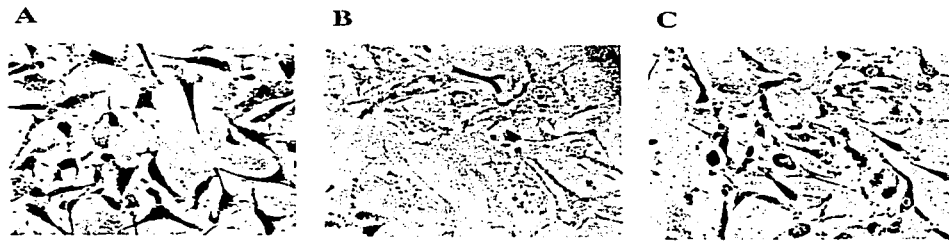
### **Respuesta proliferativa de BUVEC-E6E7 a factores de crecimiento del suero.**

Una de las características de la transformación tumoral es que la proliferación celular es independiente de la acción de factores de crecimiento presentes en el suero [83,86], por esta razón, investigamos si los cultivos BUVEC-E6E7-1 mantenían una respuesta proliferativa en relación directa a la concentración de suero presente en el medio de cultivo. Los cultivos transfectados no solo no fueron refractarios, sino que responden a concentraciones crecientes de suero y su proliferación aumentó significativamente más que la de los cultivos BUVEC de tipo silvestre (**Figura 8**).

*Producción de una línea celular endotelial bovina*



**Fig: 6.** Tasa de replicación celular. Células BUVEC y BUVEC-E6E7 fueron sembradas a una densidad de  $5 \times 10^5$  en cajas de 100 mm y, el número celular fue registrado y graficado en cada resiembra llevada a cabo cada 48 h.



**Fig: 7.** Morfología de BUVEC-E6E7. Células BUVEC no transfectadas en la resiembra 6 (A) y en la resiembra 21 (B) vs. BUVEC-E6E7 en resiembra 21 (C). Escala de la barra =  $67 \mu\text{m}$ .

### **Caracterización de células BUVEC-E6E7 clonadas**

A partir de la resiembra 21, BUVEC-E6E7 fueron clonadas por dilución limitante en presencia de células nodrizas y se obtuvieron cuatro clonas que fueron caracterizadas en base a sus propiedades inmortales y específicas de endotelio.

#### **Proliferación**

Las cuatro clonas mantuvieron una tasa de proliferación (número de células cada 48 h) estable por más de 40 resiembras (**Figura 6**).

#### **Propiedades endoteliales**

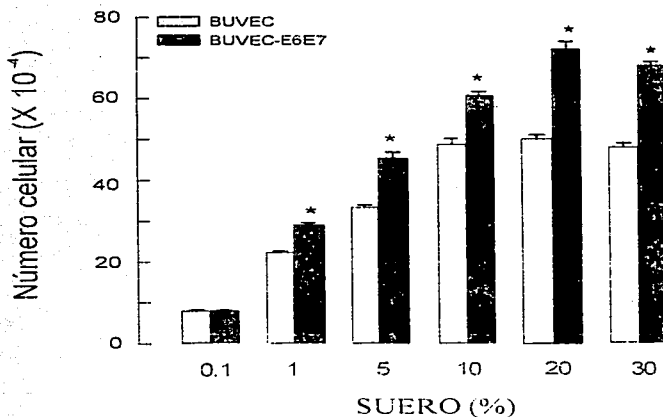
##### **Expresión de la proteína Von Willebrand**

Las células endoteliales sintetizan a la proteína Von Willebrand y la almacenan en pequeñas vesículas en el citoplasma. Cuando hay un daño al tejido la proteína se libera actuando como un ligando plaquetario en los procesos de adhesión plaquetas-endotelio. Dado que los diversos endotelios producen esta proteína, su inmunotinción es uno de los parámetros más utilizados para la caracterización del endotelio [87]. Estudios de inmunocitoquímica empleando un anticuerpo policlonal anti-proteína Von Willebrand (1:500) y un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína mostraron un marcaje positivo tanto en las células BUVEC como en las clonas 1-4 de BUVEC-E6E7. Demostrando que la expresión del oncogene E6E7 no altera esta propiedad endotelial (**Figuras 9 y 10**).

##### **Unión de lectinas**

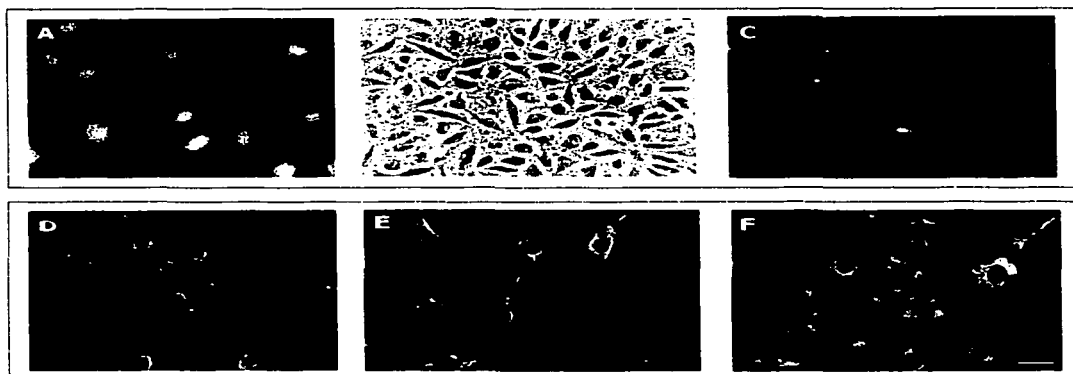
Las lectinas son moléculas que se unen específicamente a carbohidratos. El patrón de carbohidratos localizados en la membrana de las células, varía entre los diferentes tejidos y esto ha permitido el uso de lectinas como marcadores de los distintos tipos celulares. En el endotelio se han descrito dos lectinas capaces de unirse específicamente al endotelio. La lectina de *Ulex europaeus I* (UEA-I) se une a residuos de  $\alpha$ -fucosa localizados en la membrana de todos los tipos de endotelio [82,83]. La lectina de *Bandeiraea simplicifolia I* (BS-I) se une a los residuos de  $\alpha$ -D-galactopiranosas, localizados preferencialmente en las membranas de las células endoteliales provenientes de la microvasculatura, siendo la unión a esta lectina más débil en el endotelio de vasos grandes [82]. La fotografía de la **figura 8 E y F** muestra de manera clara que las células BUVEC-E6E7-1 fueron reconocidas por ambas lectinas, y por lo tanto la transfección de

*Producción de una línea celular endotelial bovina*



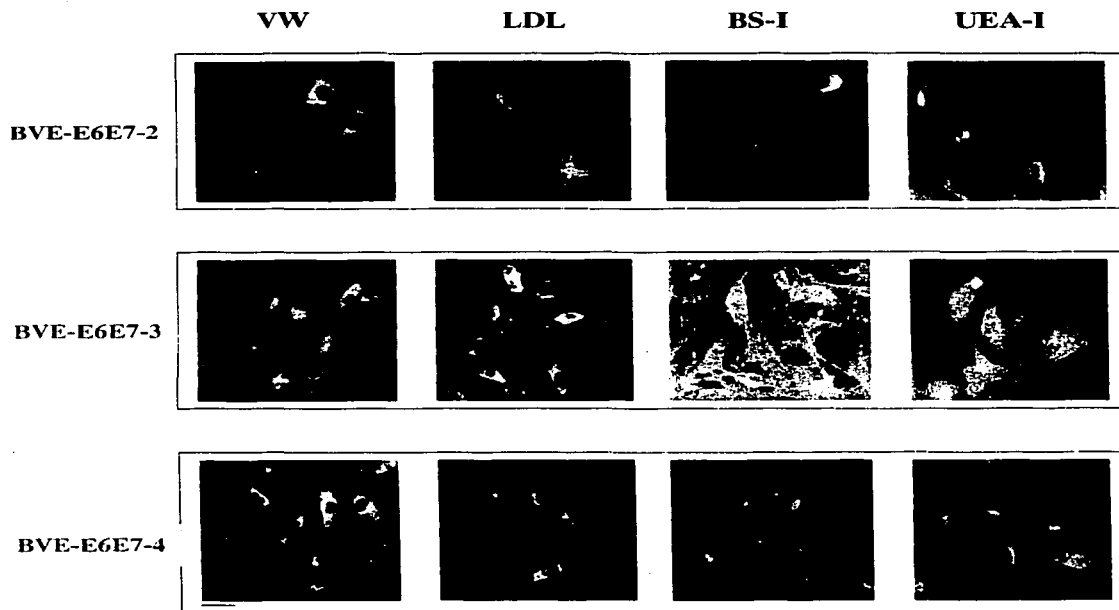
**Fig: 8. Estimulación de la proliferación celular dependiente de suero.** Proliferación de células BUVEC (resiembra 6) y BUVEC-E6E7 (resiembra 32) en respuesta a concentraciones crecientes de suero. Los valores son el número celular total por pozo (60 mm) y representan el promedio  $\pm$  SEM por triplicado. \*  $p > 0.05$  vs. BUVEC.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*



**Fig: 9. Caracterización de la clona BVE-E6E7-1.** La línea BVE-E6E7-1 fué positiva para la oncoproteína E7 (A) y para la proteína Von Willebrand (C); estas células incorporan la LDL (D) y reaccionan contra las lectinas BSI (E) y UEA-1 (F) específicas de endotelio. Además, estas células forman monocapas confluentes (B). Escala de la barra = 38  $\mu$ m para A, E, F y 67  $\mu$ m para C y D.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*



**Fig: 10. Caracterización de las clonas BVE-E6E7.** Las clonas celulares BVE-E6E7-2, -3 y -4 fueron positivas para la proteína Von Willebrand, incorporan la LDL y reaccionan con las lectinas *BS-I* y *UEA-I* específicas de endotelio. Estas células fueron analizadas en la resiembra 37. Escala de la barra = 38  $\mu$ m.

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

los oncogenes no interfirió con la expresión de carbohidratos característicos del endotelio. En forma similar ambas lectinas reconocieron a las clonas 2-4 de BUVEC-E6E7 (**Figura 10**).

### **Incorporación de la LDL**

Otro criterio ampliamente utilizado para la caracterización del endotelio es la incorporación de la lipoproteína de baja densidad (LDL), por lo que el uso de la LDL constituye una prueba muy empleada para evaluar la capacidad metabólica de las células endoteliales [83]. Nuestros resultados mostraron que las células BUVEC-E6E7-1,2,3, y 4 también incorporan la LDL (**Figura 9 y 10**).

### **Respuesta al VEGF**

Consistente con sus propiedades de endotelio diferenciado el VEGF, conocido factor mitogénico específico de las células endoteliales [88,89], estimuló la proliferación de las células BUVEC-E6E7-1 (**Figura 11**). El VEGF estimuló su proliferación en forma dependiente de la dosis, sin embargo se observaron diferencias con respecto a la acción del VEGF entre la clona BUVEC E6E7-1 y las BUVEC silvestres (**Figura 11**). La clona mostró una respuesta proliferativa incrementada con respecto a las células silvestres, alcanzando el crecimiento máximo a una dosis menor (5 ng/ml) y lo mantuvo aún bajo la concentración máxima de VEGF (100 ng/ml).

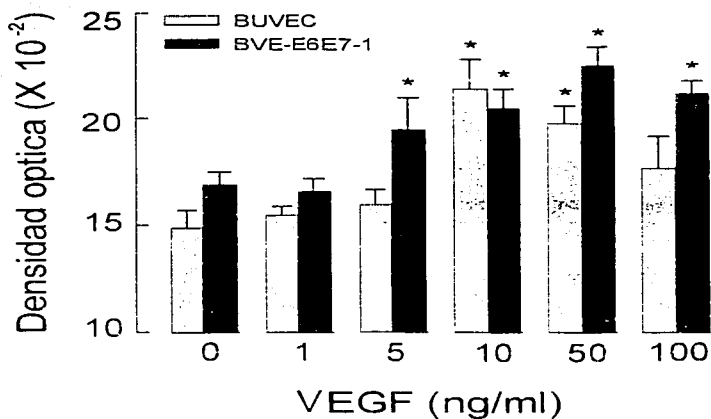
### **Expresión y efecto de PRL en BUVEC-E6E7-1**

El uso potencial de la clona BUVEC-E6E7-1 para el estudio de factores reguladores de la angiogénesis, se investigó a través de analizar la expresión de *PRL* por estas células y su respuesta a la *PRL* anti-angiogénica de 16 kDa (*PRL*-16K).

### **Expresión del gen *PRL***

Actualmente se sabe que las células endoteliales humanas [33] y de bovino [34] expresan el ARNm de la *PRL*. ARN total de células BUVEC silvestres y BUVEC-E6E7-1 fue copiado a su forma de ADNc a través de la transcripción inversa. Los ADNc fueron empleados para amplificar tres diferentes segmentos de la secuencia de la *PRL*, mediante la reacción de PCR empleando tres diferentes juegos de oligonucleótidos: 5 y 6 amplifican un fragmento de 473 pb (carriles 1,5,7); 6 y 7 un fragmento de 428 pb





**Fig: 11. Estimulación de la proliferación celular por VEGF.** Proliferación de células BUVEC (resiembra 7) y BVE-E6E7-1 (resiembra 37) en respuesta a concentraciones crecientes del mitógeno VEGF. Los valores son el promedio  $\pm$  SEM \*  $p < 0.05$  vs. control respectivo sin VEGF.

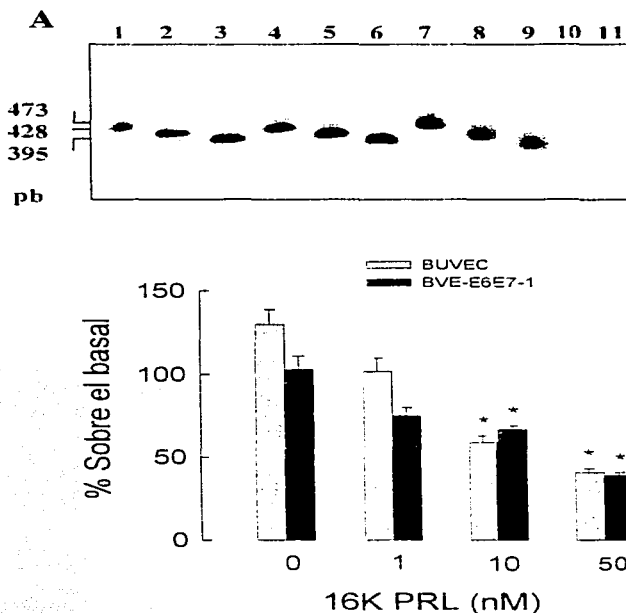
### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

(carriles 2,6,8) y 7 y 8 un fragmento de 395 pb (carriles 3,7,9). Como control positivo se empleo el plásmido pCDNA-E6E7 con las mismas tres series de primers (carriles 7-9). En esta serie de resultados queda de manifiesto que el ARN mensajero de la *PRL* se expresa tanto en las células de tipo silvestre como en las inmortales (**Figura 12 A**).

### **Efecto anti-proliferativo de *PRL* 16K**

Las células endoteliales *in vivo* e *in vitro* responden a los mitógenos bFGF y VEGF de manera dependiente de la dosis [44,89]. Células BUVEC silvestres y BUVEC-E6E7-1 fueron cultivadas simultáneamente en presencia de VEGF y concentraciones crecientes del fragmento anti-angiogénico *PRL* 16K. Como puede observarse en la gráfica de la **figura 12 B**, la *PRL* 16K inhibió en forma dosis-dependiente la proliferación inducida por el VEGF en ambos tipos celulares.

Producción de una línea celular endotelial bovina



**Fig: 12. Expresión del gen *PRL* en BUVEC.** A) Detección de la expresión del ARNm de *PRL* en células BUVEC y BVE-E6E7-1 empleando RT-PCR con tres combinaciones de oligonucleótidos complementarios al cADN de la *PRL* y Southern blot. La PCR amplificó productos similares en BUVEC resiembra 7 (carriles 1-3); BVE-E6E7-1 resiembra 37 (carriles 4-6) y en el plásmido pB-bPRL (carriles 7-9). Controles negativos con ARN (carriles 10 y 11). B) Inhibición de la proliferación celular inducida por VEGF (10 ng/ml) de BUVEC y BVE-E6E7-1 por concentraciones crecientes de PRL-16K. Los valores son expresados como el porcentaje de aumento en la proliferación inducida por VEGF en relación a las células no tratadas (proliferación basal). Los valores son promedio  $\pm$  SEM \* $p < 0.05$  vs. valores sin PRL-16K.

## DISCUSION

El vascular es uno de los principales sistemas que funcionan durante el desarrollo de los vertebrados, y la formación de una nueva red de vasos sanguíneos es absolutamente esencial para la sobrevivencia, crecimiento y diferenciación del embrión. Además la angiogénesis, también ocurre asociada a diferentes eventos en el aparato reproductor de las hembras, la reparación de heridas y en procesos inflamatorios. Más aun, el endotelio juega un papel importante en la homeostasis vascular, ya que este tiene la habilidad de producir mediadores vasoactivos que regulan las funciones de las plaquetas, de los leucocitos y de las células del músculo liso vascular [88].

La principal importancia del estudio del proceso angiogénico radica en su influencia sobre diferentes patologías que dependen de la sobre-proliferación de vasos sanguíneos y que incluyen al cáncer, la artritis reumatoide y las retinopatías proliferativas. Como ya se ha mencionado, actualmente el estudio de factores que tienen la propiedad de inhibir la angiogénesis, ha recibido una gran atención por su potencial clínico en el tratamiento de estos padecimientos.

Entre los factores involucrados en la inhibición de la formación de la red capilar vascular, se han incluido a diferentes fragmentos peptídicos que provienen de grandes proteínas precursoras, las cuales en su forma nativa no tienen ninguna acción sobre el proceso angiogénico. Por ejemplo, la angiostatina derivada de colágena tipo XVIII y la endostatina un fragmento del plasminógeno, inhibidores sistémicos de la angiogénesis. Otros de estos fragmentos provienen de la hormona prolactina una proteína con múltiples acciones. Los fragmentos N-terminales de 16 y 14 kDa de *PRL* poseen efectos anti-angiogénicos *in vivo* e *in vitro* [9,12-15]. Además también se sabe que las propias células endoteliales, expresan el gen de la *PRL* y procesan la proteína hacia los fragmentos de 16 y 14K [14,20,28,29]; hallazgos moleculares que sugieren una probable acción de estas proteínas en la regulación autócrina de la función endotelial.

Los cultivos primarios utilizados para el estudio de la angiogénesis, como para otros procesos biológicos tienen como desventaja, que las experimentales se realizan con preparaciones nuevas, procedente de diferentes resiembras o individuos. Además la heterogeneidad de los cultivos se acentúa por la contaminación con otros tipos celulares

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

que es difícil evitar en su totalidad. Con respecto al endotelio, es frecuente que su vida de cultivo útil este limitada a las primeras resiembras, lo que aunado a los problemas relativos a su aislamiento y la obtención del material biológico (sobretudo si es de origen humano), constituyen limitaciones adicionales de su uso en la experimentación. En general, estas limitantes se suelen obviar mediante el desarrollo de líneas celulares inmortales, que ofrecen como ventajas poblaciones homogéneas con proliferación ilimitada.

Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que afectan las funciones de la células endoteliales, se ha visto limitado por dificultades asociadas al empleo de sus cultivos primarios, la falta de líneas celulares capaces de mantener un fenotipo diferenciado. Los cultivos primarios de células endoteliales presentan dificultades para un análisis prolongado, debido a que pueden sufrir alteraciones en su respuesta a factores de crecimiento o citocinas [81,88].

Más aún, las células endoteliales difieren de acuerdo al tipo de vaso y órgano del que provienen [86]. Por ejemplo, existen diferencias en el tipo y cantidad de moléculas de adhesión expresadas por células de la microvasculatura y el endotelio de vasos grandes [86]. Además la heterogeneidad celular también se extiende a las diferencias entre los lechos vasculares de los diferentes órganos y tejidos. Por ejemplo, células endoteliales de la microcirculación de la retina o del cerebro, difieren de otros vasos capilares (macrocirculación) en sus propiedades de permeabilidad y expresión de factores angiogénicos [89-93]. También existen diferencias entre endotelios de la vasculatura adulta, la vasculatura fetal y entre especies [90,91]. Por estas razones, una línea celular homogénea puede facilitar la estandarización de observaciones hechas en diversos endotelios, superar dificultades asociadas con los tiempos cortos de vida en cultivo y la dediferenciación de cultivos endoteliales primarios. Logrando de esta manera contar con un modelo consistente para estudiar la función de la célula endotelial.

La mayoría de los estudios en endotelio de vena, han usado células derivadas de venas umbilicales humanas (HUVEC). Estas células poseen un tiempo corto de vida en cultivo (3-5 resiembras), altos requerimientos de suero, factores de crecimiento, natrices celulares, aditivos para su crecimiento y una gran variabilidad de respuestas en ensayos

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

funcionales [57.76]. Actualmente existen líneas celulares de HUVEC que sin embargo adolecen de pérdidas mayores o menores del fenotipo endotelial diferenciado [91.92].

En este estudio mostramos la caracterización de las primeras líneas celulares endoteliales (bovinas) de vena umbilical no humanas, generadas mediante la transfección de los oncogenes E6E7 de HPV-16, que mantienen muchas de las características del endotelio vascular.

Múltiples estudios han mostrado que la expresión de E6E7 de HPV-16, inmortalizan eficientemente varios tipos celulares incluyendo fibroblastos [66], queratinocitos [67.99] y células del músculo liso [68]. Asimismo la transfección con E6E7 ha generado líneas celulares a partir de epitelios diversos a saber: células epiteliales de la glándula mamaria [94]; de la cavidad bucal humanas [95], de los ductos pancreáticos [96], de los bronquios [67] y de la próstata [97]. Por último los oncogenes E6E7 han permitido inmortalizar células endoteliales de cerebro de rata [99] y células endoteliales de la vena umbilical humana [63].

Consistente con los reportes mencionados las células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC), transfectadas con los oncogenes E6E7 de HPV-16 fueron inmortalizadas con éxito. La integración de los oncogenes E6E7 al genoma celular y la expresión de la proteína E7 se verificó mediante PCR e inmunocitoquímica respectivamente. Las células BUVEC-E6E7 mantuvieron una tasa alta de proliferación por más de 120 ciclos de reproducción sin mostrar señales de senescencia. Además el tamaño y morfología de las BUVEC-E6E7 fueron comparables a los de los cultivos jóvenes de BUVEC. En contraposición las células BUVEC no transfectadas, declinaron su proliferación a partir del ciclo celular 40 cuando ya mostraban claras señales de senescencia.

El principal mecanismo por el cual la expresión de las oncoproteínas E6E7 inmortaliza ha sido conocido por algún tiempo. Se ha mostrado que la proteína E6 se une a la proteína p53, promoviendo su degradación mientras que la proteína E7 se une al producto del gen de retinoblastoma y lo inactiva [72.73]. Si bien estos hallazgos son consistentes con la participación de las proteínas E6E7 en carcinogénesis, líneas

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

inmortalizadas con E6E7 de HPV-16 no parecen estar completamente transformadas [74]. Estas líneas son incapaces de crecer en forma independiente al anclaje, no son tumorigénicas en ratones con el sistema inmune deprimido, mantienen cariotipos normales y fenotipos estables a los de su tipo celular original [66,98]. La transfección con E6E7 de HPV-16 sirve como un buen modelo para generar líneas celulares, que pueden mantener características diferenciadas similares a sus células primarias originarias [99].

Consistente con las observaciones en otros sistemas celulares, la transfección de E6E7 inmortalizó los cultivos BUVEC sin una aparente alteración de sus propiedades endoteliales. Las cuatro líneas celulares BVE-E6E7-1,-2,-3 y -4 desarrolladas en este trabajo, son inmortales en cuanto a que mantienen una alta tasa de replicación por más 120 ciclos de reproducción y retienen características morfológicas y fenotípicas de un endotelio diferenciado. Las cuatro clonas expresan la proteína Von Willebrand, incorporan LDL acetilada, y poseen un patrón de carbohidratos membranales característicos del endotelio vascular, manifestada por su reacción a lectinas específicas. Más aún las BUVEC-E6E7, responden a la acción proliferativa del suero y la clona BVE-E6E7-1 al efecto mitogénico de factores angiogénicos específicos (VEGF).

Por otra parte, un estudio posterior verificó que la línea BVE-E6E7-1, no presenta inestabilidad genómica, de acuerdo a la ausencia de anomalías en los centrosomas, caracterizada por la inmunorreactividad a la gamma-tubulina de los centrosomas cromosómicos [35]. Asimismo, no se detectaron diferencias significativas en el número de cromosomas entre el tipo silvestre y la clona endotelial. La falta de alteraciones aparentes en estos parámetros es consistente con la conservación de las características de endotelio diferenciado de estos cultivos.

Estos resultados señalan a las líneas BUVEC-E6E7, como un modelo adecuado para el estudio de endotelios provenientes de la macrocirculación (vena) y con ventajas con respecto a las líneas celulares generadas a partir de venas umbilicales humanas. HUVEC inmortalizadas con HPV16 muestran la expresión de marcadores endoteliales (factor vonWillenbrand y unión a lectinas) solamente en resiembras tempranas. Con las resiembras tardías estas HUVEC-E6E7 muestran un aumento en el número de células gigantes, la pérdida del fenotipo de empedrado de las monocapas característico del

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

endotelio vascular y de la expresión del factor Von Willebrand [87]. Una posibilidad para explicar las diferencias en la inmortalización de HUVEC y BUVEC por HPV16 puede asociarse a la especie. Nuestra experiencia muestra que las BUVEC son menos exigentes que las HUVEC para su cultivo, es decir, no requieren de la adición de co-factores, factores de crecimiento, y matrices extracelulares esenciales para las HUVEC [57,78]. Además las BUVEC tienen ciclos celulares más cortos (24 h vs. 92 h en HUVEC). La transfección en paralelo de ambos cultivos primarios con el mismo vector pCMV-E6E7 permitirá aclarar esta posibilidad.

La utilidad de las líneas BUVEC desarrolladas en este estudio, como herramientas para el análisis de la acción de factores reguladores de la angiogénesis, se apoya en la demostración de que la clona BUVEC-E6E7-1 expresa *PRL* y responde a la inhibición de la *PRL* 16K anti-angiogénica. La *PRL* es una proteína que puede actuar como hormona y como citosina en la regulación de múltiples efectos, que incluyen acciones en la reproducción, osmorregulación, inmunomodulación y angiogénesis [9]. La *PRL* puede ser modificada proteolíticamente hacia un fragmento de 16kDa. Esta *PRL* 16K inhibe la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* [9,12,13,15-19], y lo hace tanto a manera de hormona como de forma local autocrina [15-19]. La *PRL* 16K está presente en la circulación y se produce y secreta por endotelios de diversas especies y lechos vasculares [9,14,27,28]. En este trabajo demostramos que la línea BUVEC E6E7-1, expresa el RNA mensajero de *PRL* y que su proliferación disminuye en respuesta a la *PRL* 16K. Por lo tanto esta clona puede contribuir a analizar la posible participación de esta proteína en la angiogénesis.

En conclusión en este trabajo hemos desarrollado una línea inmortal de células endoteliales que constituye un modelo biológico homogéneo, reproducible y fácilmente accesible para estudiar la expresión, y la actividad de reguladores de la angiogénesis, entre los cuales se incluyen los fragmentos moleculares de la *PRL*.



## CONCLUSIONES

- Las oncoproteínas E6E7 de HPV-16 son efectivas para inmortalizar las células BUVEC
- Las células BUVEC-E6E7 son inmortales dado que extienden su vida promedio a más de 120 ciclos de replicación.
- Las células BUVEC-E6E7 mantienen diferentes características típicas del endotelio diferenciado.
- Las células BUVEC-E6E7 no alteraron su estabilidad cromosómica.
- Se derivaron las clonas BVE-E6E7-1,2,3,4 a partir de la población inmortal policlonal.
- Las células BUVEC silvestres y la clona inmortal BVE-E6E7-1 expresan el gen de la *PRL* y responden a la *PRL*-16K de manera dependiente de la dosis.
- Las clonas inmortales BVE-E6E7-1,2,3,4 podrían ser un modelo adecuado para el estudio del proceso angiogénico y de los factores de regulación vascular.

## APÉNDICE I. PROLACTINA

### A. Generalidades

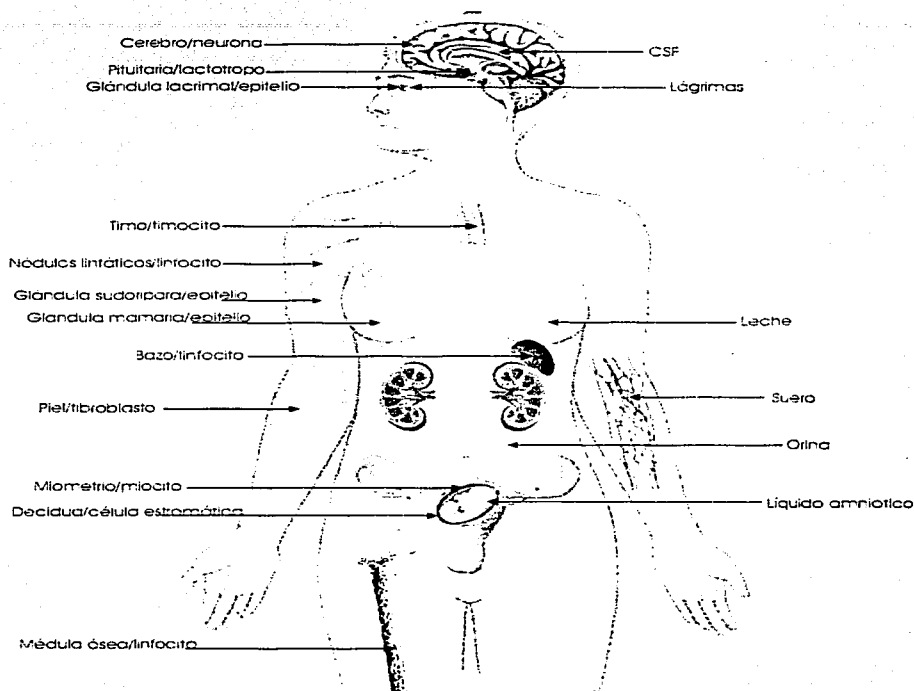
Las *PRLs* representan una familia de hormonas y citocinas que se producen principalmente en la hipófisis anterior, por células conocidas como lactotropos que comprenden el 20-50% del total de las células de la glándula hipofisiaria (**Figura 13**). Existen también sitios de producción extrahipofisiaria de *PRL* que incluyen a la glándula mamaria, la decidua uterina, el útero, las células del sistema inmune, el cerebro y el endotelio vascular, entre otros [7,8,100].

La *PRL* inicia sus efectos biológicos, induciendo la dimerización de sus receptores en la membrana de las células blanco, lo cual trae como consecuencia la activación de diversos mecanismos intracelulares. Actualmente, se han descrito 3 variantes del receptor de la *PRL* que resultan del procesamiento alternativo (splicing) del ARNm, y que de acuerdo al tamaño de su dominio intracelular se denominan como las variantes de tipo corto, medio y largo [100]. Durante los últimos años se ha documentado como uno de los principales mecanismos de activación de estos receptores, a la vía de señalización denominada JAK/STAT. Las proteínas JAK ("Janus Kinases") representan a una familia de cinasas de tirosina, capaces de fosforilar a los factores de transcripción STAT ("Signal transduction activators of transcription"). La fosforilación de las STAT permite su translocación al núcleo y subsecuentemente su unión a secuencias consenso "GAS" sobre el ADN, lo cual provoca la activación de la transcripción de diferentes genes que median eventos de proliferación y diferenciación celular [101-106].

### B. Estructura

Debido a características estructurales y biológicas comunes la *PRL*, la hormona de crecimiento (*GH*) y el lactógeno placentario (*LP*), se agrupan en una sola familia hormonal (*PRL/GH/PL*). Estas hormonas tienen un alto grado de homología en su secuencia primaria, y probablemente un origen común a partir de un gen ancestral común. Todas estas proteínas están constituidas por aproximadamente 190-200 aminoácidos, su masa molecular oscila entre 22-23 kDa y su estructura tridimensional se

*Producción de una línea celular endotelial bovina*



**Fig: 13. Sitios de producción de la PRL.** Dibujo que ilustra los sitios reportados en el cuerpo humano, de la producción de la hormona PRL y los fluidos orgánicos en los que se ha determinado su presencia.

## *Producción de una línea celular endotelial bovina*

organiza en 4 alfa hélices antiparalelas que se estabilizan mediante tres puentes disulfuro. En particular la *PRL* está constituida por una sola cadena polipeptídica de cerca de 200 aminoácidos según la especie y tres puentes disulfuro (**figura 2**) [5,101].

La *PRL* es codificada por un gen localizado en los cromosomas 6, 17 y 23 en el humano, la rata y el bovino, respectivamente [107-109]. En los humanos este gen comprende una secuencia de 1.5 kb el cual contiene las secuencias regulatorias 5' y 3', 5 exones y 4 intrones [107,110,111]. El exón I esta formado por 56 pares de bases (pb) que incluyen una parte de la región control. El exón II codifica para la secuencia de aminoácidos del péptido señal y contiene los primeros 40 codones de la proteína madura [6,110,112].

La secuencia primaria de la *PRL* contiene seis dominios estructurales constituidos por 34 aminoácidos que son altamente conservados en la escala filogenética, lo que sugiere la participación de estos dominios en acciones fisiológicas comunes para las *PRLs* entre las distintas especies [6,113]. De igual forma la secuencia primaria de la *PRL* contiene 6 residuos de cisteína (posiciones 4, 9, 56, 172, 189 y 177 en la rata) que al unirse forman tres enlaces disulfuro indispensables para mantener la configuración terciaria y la bioactividad de la hormona madura [107,113,114]. En diversos estudios se ha intentado definir las regiones moleculares de la *PRL* asociadas con sus efectos biológicos. Se ha propuesto que la región contenida entre los aminoácidos 80-137, es esencial para mantener los efectos lactogénicos y mitogénicos de la *PRL* [114]. Mutaciones dirigidas hacia los aminoácidos tirosina y fenilalanina ubicados en las posiciones 28 y 50 respectivamente, son indispensables para mantener los efectos mitogénicos de la *PRL* sobre la línea de linfocitos NB2 de rata. También ha sido sugerido que los residuos de histidina localizados en las posiciones 27 y 30, forman parte del sitio de unión de la hormona con sus receptores celulares [115,116].

### **C. Heterogeneidad molecular**

La *PRL* esta sujeta a modificaciones postraduccionales que incluyen la agregación, la fosforilación, la glicosilación y la proteólisis [113,114]. Variantes de la *PRL* con una masa molecular mayor de 23 kDa han sido identificadas en la circulación de distintas

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

especies de mamíferos. Estas variantes parecen ser agregados de la forma predominante de 23 kDa, a través de enlaces disulfuro [110,113,117,118]. No obstante la demostración de que los polímeros de esta hormona varían en sus concentraciones plasmáticas bajo ciertos estados fisiológicos o patológicos, y después del tratamiento con agonistas dopaminérgicos, el significado biológico de estos polímeros no es del todo claro [118]. Se ha demostrado sin embargo que algunas variantes poliméricas de la *PRL*, poseen actividad biológica en los bioensayos para la hormona de 23 kDa. Por ejemplo un dímero de *PRL* de 45 kDa, posee efectos mitogénicos sobre linfocitos NB2 en cultivo, aunque con menor potencia que la forma monomérica de 23 kDa [113,118].

Las variantes monoméricas de la *PRL* comprenden tanto a la forma de 23 kDa, como sus isoformas glicosiladas, fosforiladas, deaminadas, o sulfatadas postraduccionalmente [110,117,118]. La *PRL* glicosilada con un peso molecular de 25 kDa, constituye alrededor del 13-25% de la hormona en la hipófisis y se le ha detectado en el suero y en el líquido amniótico [110,113,117,118]. Se ha mostrado que la glicosilación ocurre específicamente en el residuo asparagina localizado en la posición 31 y que la *PRL* glicosilada posee efectos mitogénicos sobre las células epiteliales del buche de pichón [117,118], y que promueve la síntesis de caseína por el epitelio mamario [113]. Todas estas acciones, sin embargo, ocurren con una potencia menor que la de la *PRL* no glicosilada [113,117].

La variante fosforilada de la *PRL*, representa alrededor del 20% del total de la hormona circulante en la rata. La fosforilación de la hormona parece ocurrir en los residuos serina localizados en las posiciones 26, 34 y 90 [113,118-120]. Ha sido demostrado que la posición de estos sitios de fosforilación está conservada filogenéticamente [119,120]. Aunque aún no se tiene certeza acerca de la (s) función (es) de la forma fosforilada, reportes recientes sugieren que la fosforilación bloquea los efectos biológicos de la *PRL*, más no su unión al receptor lo que ha propuesto su posible acción como antagonista de la hormona [119,120].

Por otra parte, la *PRL* de 23 kDa puede ser procesada proteolíticamente en la adenohipófisis, la glándula mamaria, el hígado, el riñón, el pulmón, el bazo, el ovario, la

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

próstata y el cerebro [84,110,121-124] hacia una forma cortada cuya asa mayor esta escindida entre los aminoácidos tirosina 145 y leucina 149 [10]. Aunque las enzimas que cortan la molécula de 23 kDa no han sido plenamente identificadas, se ha sugerido que la catepsina D [11], las proteasas de serina y aspartato, así como algunas metaloproteasas [121] pudieran ser responsables de dicho procesamiento. En este sentido la *PRL* cortada ha sido identificada en el plasma de humanos y de roedores mediante técnicas de Western blot [113,125]. Estudios recientes han demostrado que esta variante cortada poseen acciones mitogénicas tipo *PRL* sobre células epiteliales mamarias, linfocitos NB2 en cultivo, y en células epiteliales del buche de pichón *in vivo* [6,113]. Por otra parte, también se encontró que la *PRL* cortada estimula la proliferación de gonadotropos y tirotrupos adenohipofisarios. Este último efecto no es observado con la variante de 23 kDa, lo que apoya que la *PRL* cortada puede poseer funciones propias independientes a las de la *PRL* [10].

La reducción subsecuente de los enlaces disulfuro que mantienen unida a la *PRL* cortada, genera dos péptidos uno N-terminal con una masa molecular de 16 kDa y otra C-terminal con una masa molecular de 6 kDa (**Figura 3**) [21,22,84,126]. Estudios recientes han demostrado que la variante de 16 kDa, posee efectos mitogénicos aunque de menor potencia a la de la variante de 23 kDa, sobre células epiteliales del buche de pichón *in vivo* y sobre linfocitos NB2 *in vitro* [11]; así mismo la *PRL* 16K estimula la mitogénesis del epitelio mamario en cultivo [127,128].

La relevancia funcional de proteólisis enzimática de la *PRL* hacia el fragmento N-terminal de 16 kDa, reside principalmente sobre un efecto nuevo que no tiene ni la *PRL* integra ni la *PRL* cortada, su precursor inmediato. La *PRL* 16K inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis [125]. Así la *PRL* 16K se suma a la reciente lista de proteínas que adquieren funciones específicas o son activas como resultado de la proteólisis de precursores mayores. Este mecanismo de activación es común a otros potentes factores anti-angiogénicos como la angiostatina [8], y la endostatina [129], y otras citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [130,131].

#### **D. Sitios de producción**

La *PRL* es producida principalmente por las células acidófilas (lactotropos o somatotropos) de la hipófisis anterior. Sin embargo su síntesis se ha podido confirmar en múltiples sitios extrahipofisarios (**Figura 13**), que incluyen varias regiones del sistema nervioso, la decidua uterina, el epitelio de las glándulas lacrimales, sudoríparas y mamarias, diversas células del sistema inmune y células endoteliales vasculares [10,132,133]. En estos tejidos se ha evaluado tanto la expresión del RNAm de la *PRL* como la producción de la proteína en función de su masa molecular, inmunoreactividad y bioactividad en ensayos específicos. Además, la presencia de la *PRL* se ha detectado en diversos fluidos corporales que incluyen al líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, las lagrimas, la leche, el líquido folicular, el sudor, etc. [10]

La regulación de la síntesis y secreción de la *PRL* involucra distintos mecanismos que actúan tanto a nivel de transcripción y traducción, así como también sobre su proceso de secreción. La mayor parte del conocimiento acerca de los mecanismos de regulación de la producción y secreción de esta hormona, derivan de estudios fisiológicos y farmacológicos, que han evaluado los efectos de distintos agentes sobre la función adenohipofisaria *in vivo* o bien sobre los lactotropos en cultivo. Estos estudios han permitido identificar factores ambientales, factores hormonales hipotalámicos, ováricos y derivados de la glándula suprarrenal, así como factores parácrinos y autócrinos que actúan de manera orquestada para controlar la producción y secreción adenohipofisaria de la hormona. Sin embargo poco se sabe acerca de los mecanismos de regulación de la producción de la *PRL* en las fuentes de producción extrahipofisarias.

Los factores externos que afectan la producción y liberación de la *PRL* hipofisaria pueden ser generales como por ejemplo: el estado nutricional, los ritmos circádicos y estacionales, o bien estar asociados a estados fisiológicos específicos, como la respuesta general de alarma, la estimulación cervico-uterina durante el coito o el parto y la estimulación multisensorial durante la lactancia [134-138]. Estos estímulos influyen sobre la producción y secreción adenohipofisaria de la hormona a través de su acción sobre

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

distintos mecanismos neurales que modifican la función hipotalámica y la liberación de sus factores de regulación endocrina [134,139].

Diversas hormonas liberadas por el hipotálamo ejercen acciones inhibitorias o estimulantes sobre la producción y secreción de la *PRL*. De estos factores, quizás el mejor estudiado es la dopamina; una catecolamina que ejerce acciones inhibitorias o estimulantes sobre la transcripción y liberación de la *PRL*, dependiendo del estado funcional de las células secretoras de *PRL* ó lactotrofos y de la presencia o ausencia de cofactores endógenos. La dopamina parece inhibir la liberación de la hormona actuando tanto a nivel de la transcripción, como a nivel de la secreción a través de reducir los niveles intracelulares de AMPc, calcio y fosfato de inositol [6,110,139]. Otros factores hipotalámicos tales como el ácido gama-amino butírico, la somatostatina, la hormona estimulante de melanocitos y el péptido asociado a la hormona liberadora de gonadotropinas, han sido también implicados en la inhibición de la secreción de la *PRL*. Por otro lado, distintos factores hipotalámicos estimulan la transcripción y la secreción de esta hormona en la adenohipófisis. La hormona inhibidora de la tiotropina (TRH) por ejemplo, parece estimular la producción y secreción de la *PRL* en los lactotrofos incrementando la transcripción, estabilizando el RNAm y fomentando su liberación por un mecanismo que parece depender de AMPc. Otros factores hipotalámicos que se ha demostrado estimulan la liberación de la *PRL* son: el péptido intestinal vasoactivo, la serotonina y algunos péptidos opioides [6,10,139].

Factores endócrinos periféricos también participan en la regulación de la producción de la *PRL* hipofisiaria. Se ha documentado por ejemplo que los glucocorticoides suprarrenales inhiben la producción de la *PRL* en la adenohipófisis, mientras que los estrógenos ováricos, la norepinefrina suprarrenal y la insulina promueven su síntesis y secreción [6,139]. En el caso de los glucocorticoides y los estrógenos, sus efectos sobre la transcripción del gen de la *PRL* parecen ser mediados por secuencias de acción "cis" responsivas localizadas en el promotor del gen [140,141].



## **E. Funciones**

En los vertebrados la *PRL* posee un amplio espectro funcional, y entre las más de 300 acciones fisiológicas descritas para esta hormona (**Figura 2**) destacan sus efectos sobre los procesos de diferenciación y regulación del ciclo celular, la regulación de la concentración de electrolitos séricos y la modulación de las funciones reproductivas, inmunológicas y neurológicas [118,142,143]. Así además de sus funciones relacionadas con la producción de leche durante la lactación en los mamíferos [6], la *PRL* ha sido involucrada también en el proceso de capacitación espermiogénica y en la fecundación e implantación del cigoto [144-146]. La *PRL* es un factor mitogénico para las células epiteliales de la glándula mamaria, el epitelio del buche del pichón, los linfocitos y astrocitos [145,147-150]. Estas características han sido utilizadas para diseñar bioensayos que evalúan tanto los efectos mitogénicos de la hormona como de sus variantes moleculares. Esta hormona también promueve la diferenciación de las células en la glándula suprarrenal, el páncreas, el pulmón durante la vida embrionaria y la maduración, así como la función de los órganos reproductores en los mamíferos [145, 151-154].

Otras funciones en las que la *PRL* parece tener un papel regulatorio importante son en la producción de hormonas esteroideas en la glándula suprarrenal, los ovarios, el testículo y en la producción de factor surfactante en el pulmón [145,151,155]. Esta hormona también estimula el crecimiento de pelo, y en algunas especies de mamíferos la pigmentación del mismo [145,156,157]. Efectos de esta hormona sobre los niveles de calcio y sodio séricos han sido descritos en peces y mamíferos. La *PRL* no solamente regula la concentración de electrolitos en suero sino también en la leche, el líquido amniótico, el sudor y las lágrimas [5,6]. La *PRL* modula la acción regulatoria de otros mediadores químicos tales como la dopamina, los opioides, las gonadotropinas, la insulina, y los factores insulina tipo I y II [145,155,158]. Sobre el sistema nervioso central la *PRL* regula la conducta reproductiva, el estrés, la conducta materna y la conducta de reconocimiento madre-cría en mamíferos, así como las conductas de migración y construcción de nidos en peces y aves [145,159-162]. Finalmente se ha sugerido que esta hormona pudiera

## *Producción de una línea celular endotelial bovina*

participar en la regulación del sueño, y en la modulación de los niveles de ansiedad en algunas especies de mamíferos [162-164].

### **F. Señalización intracelular**

Los receptores celulares para la hormona *PRL* pertenecen a la familia de receptores de citosinas clase I, donde se agrupan a los receptores hematopoyéticos, la *IL-2* y la *GH* entre otros [11,110,165-168]. El receptor para las *PRLs* es una glicoproteína codificada por un gen que contiene al menos 11 exones y está localizado en el cromosoma 5 en el humano [110]. A la fecha tres subtipos de receptores para la *PRL* han sido caracterizados en distintas especies de mamíferos. Estos receptores están constituidos por tres dominios estructurales referidos como dominios intracelular, transmembranal y extracelular. La secuencia de aminoácidos de los dominios extracelular y transmembranal son homólogas en los distintos receptores, mientras que la secuencia de aminoácidos y la extensión del dominio intracelular difiere entre los distintos receptores como resultado del procesamiento postranscripcional [110,166-168]. De tal manera que los receptores para la *PRL* definen tres subtipos dependiendo de la extensión de su dominio intracelular. El receptor corto (42 kDa) está constituido por 284-291 aminoácidos, 26 de los cuales conforman el dominio intracelular; el receptor medio (65 kDa) posee 392 aminoácidos con un dominio intracelular de 57 aminoácidos; y el receptor largo (80 kDa) constituido por 591-598 aminoácidos con 262 residuos en el dominio intracelular [165,166,168]. Recientemente se ha identificado en el ovario de la rata una forma soluble del receptor para la *PRL*, que está formado por el dominio extracelular y una extensión de 20 aminoácidos hacia la región C-terminal. Se ha sugerido que esta forma del receptor es en realidad una proteína transportadora de la *PRL* [110].

La distribución de estos receptores en los distintos tejidos ha sido evaluada mediante técnicas de inmunocitoquímica, hibridación *in situ*, RT-PCR y por ensayos de radioreceptor en los tejidos ó en membranas aisladas [11,169-173]. Estos estudios han demostrado la presencia ubicua de estos receptores en todos los órganos blanco conocidos de la hormona pero también en otros tipos celulares donde a un no se conoce los posibles

## *Producción de una línea celular endotelial bovina*

efectos de la *PRL*. La amplia distribución de los receptores para la *PRL*, por lo tanto no solo, es compatible sino que amplía la versatilidad funcional que esta hormona presenta.

En base a diversos estudios se ha propuesto que la activación del receptor de la *PRL* requiere de la dimerización molecular es decir de la unión de una molécula de la hormona a dos moléculas del receptor [11,165,174]. Esta dimerización del receptor, permite la activación de distintas vías de segundos mensajeros. Entre estas se han documentado los efectos secundarios asociados a las enzimas adenilato ciclasa, ornitín descarboxilasa, proteína cinasa C, fosfolipasa A2, fosfolipasa C, proteínas G y tirosina cinasa-JAK 2 [175-183]. De estos los más estudiados en los últimos años son la vía de la JAK-2 a su vez responsable de activar la fosforilación de factores de transcripción del grupo STAT. Se ha mostrado que la *PRL* puede activar a las proteínas JAK 1, 2 ó 3 y subsecuentemente a las moléculas de STAT 1, 3 ó 5 (transductores de señal y activadores de la transcripción); siendo las principales JAK 2 y STAT 5 [165]. Las STAT se unen a secuencias GAS en la región del promotor de diferentes genes lo que resulta en la transcripción de los genes asociados a procesos de proliferación y diferenciación celular (ej. gen de la caseína).

## **APENDICE II. EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DEL GEN *PRL***

Para entender la posible participación de la *PRL* en el control autócrino de la angiogénesis (ó la relevancia funcional de su expresión por el endotelio) es importante entender los mecanismos que regulan su expresión en el endotelio vascular mismo, tomando como base conocimientos previos sobre la regulación del gen *PRL* en otros tipos celulares

### **A. En la hipófisis**

La regulación de la expresión del gen *PRL* se ha estudiado principalmente en la hipófisis anterior donde se ubican las principales células endócrinas productoras de esta hormona o lactotopos. Si bien son muchos los factores capaces de regular al promotor de este gen en la hipófisis, se considera que su principal control lo ejerce el hipotálamo, a través de un equilibrio entre la acción inhibitoria de la dopamina y el efecto estimulatorio de la hormona tiro liberina (TRH) y del péptido intestinal vasoactivo (VIP) [6,15,184]. Este

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

control es modificado por factores externos (succión de las crías durante la lactancia, estímulo cervical durante el coito, etc), pero también por factores internos de tipo hormonal entre los que sobresalen los estrógenos. A este respecto se sabe que los estrógenos estimulan la expresión del gen *PRL* y son responsables de su secreción preóvulatoria a la circulación.

Por otra parte se ha mostrado que factores autócrinos y parácrinos adenohipofisarios pueden regular la síntesis y secreción de la *PRL*. Así el péptido intestinal vasoactivo producido por los lactotropos y la misma hormona *PRL* estimula su producción y secreción a través de un mecanismo autócrino. Entre los factores parácrinos se incluyen a la angiotensina II y a la acetilcolina secretadas por los gonadotropos y corticotropos, respectivamente, que inhiben la síntesis de la hormona [6.110]. Existe escasa información acerca de los mecanismos que regulan la producción de las distintas formas de *PRL*, aunque en estudios recientes, se ha sugerido que la dopamina y la TRH pudieran influenciar el cociente de producción de las distintas variantes de la hormona en la hipófisis [185-188]. A éste respecto se sabe que la TRH inhibe al promotor del gen humano de la *PRL* interfiriendo de alguna manera con el factor de transcripción AP-1 [189].

De acuerdo ha lo mencionado, se desprende que la regulación de la expresión del gen de la *PRL* parece ser tejido-específica y por lo tanto en el endotelio podría estar sujeta a factores relacionados con la función endotelial. Cabe sin embargo señalar, que entre los factores regulatorios de la angiogénesis se encuentran los estrógenos, principales reguladores de la expresión de la *PRL* hipofisaria y cuyos efectos angiogénicos son particularmente relevantes en órganos reproductores como el ovario, el útero, la glándula mamaria, etc [190,191].

#### **B. En tejidos extra-hipofisarios**

En humanos la expresión de la *PRL* no esta limitada a la glándula pituitaria, por que como ya se ha mencionado existen sitios extra-pituitaria que expresan también la *PRL* [8]. La regulación de la expresión de la *PRL* en tejidos extra-pituitaria ha sido poco estudiada, y la mayoría de este análisis se ha realizado en la decidua uterina humana.

### *Producción de una línea celular endotelial bovina*

Los resultados bioquímicos, inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ* en el estroma endometrial han mostrado que la *PRL* no se expresa durante la fase proliferativa del ciclo menstrual [192]. La síntesis de la hormona se detecta al día 23 del ciclo y coincide con la aparición de las primeras células pre-deciduales, y poco después del aumento pico de la progesterona en sangre [192]. También se sabe que esta *PRL* extra-pituitaria es indistinguible de la proteína que se produce en la pituitaria, tomando como base estudios inmunológicos y biológicos [193]. Sin embargo en células endometriales estromales en fase proliferativa tratadas con inductores de decidualización como el ester de forbol (TPA) y el AMPc, se ha demostrado que una región del promotor de *PRL* distinta a la de la pituitaria puede dirigir la transcripción del gen reportero en una forma específica [194]. Se sabe además que las primeras 330 pb del promotor proximal de la *PRL* de tipo no pituitaria son suficientes para conferir la activación del gen *PRL* bajo los inductores de la decidualización (como análogos del compuesto AMPc). El efecto de estos análogos puede ser inhibido por la cotransfección del gen PKI, que es un inhibidor del sistema de trasducción de la señal de la proteína cinasa A dependiente del AMPc.

El análisis de la regulación del gen *PRL* en la decidua ha estado impedido por la carencia de líneas celulares en que el gen de la *PRL* se exprese. Recientemente sin embargo se ha podido desarrollar una línea inmortal del estroma endometrial humano ST-2 que expresa *PRL* cuando estas células son crecidas en presencia de inductores de la decidualización [194]. Con respecto a otros tejidos extrahipofisarios, también se han identificado y caracterizado una serie de líneas celulares derivadas de linfoblastos humanos (IM-P-P33) que expresan altos niveles de *PRL* [193]. En las células del sistema inmune, la regulación de la expresión del gen *PRL* es parecido a la de la decidua donde este no responde a factores hipotalámicos clásicos como dopamina y TRH [189], ni a los estrógenos [189]. Si bien se desconocen los reguladores potenciales de la expresión de *PRL* en células del sistema inmune, algunos estudios utilizando líneas celulares derivadas de linfocitos han sugerido la participación de los corticoides, del ácido retinoico, de las interleucinas, etc. [193]. Por ejemplo se ha encontrado que la adición del ácido retinoico a cultivos de las mismas células IM-9-P33 provocó un aumento en el ARNm de *PRL* y en la secreción de la hormona [194]. Encontrándose también que la dexametasona causa una reducción del ARNm y en la secreción de la *PRL* [194].

## REFERENCIAS

- [1] Battegay B.J. 1995. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.* **73**: 333-46.
- [2] Folkman J. 1997. Regulation of angiogenesis. (Eds. Goldberg I.D. and Rosen E.M.) Basel, Suiza. 1-8.
- [3] Polverini P.J. 1995. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **6** (3): 230-47.
- [4] Auerbach W. and Auerbach R. 1994. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac. Ther.* **63**: 265-311.
- [5] Sinha Y.N. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Rev.* **16**: 354-69.
- [6] Neill J.D. and Nagy G.M. 1994. Prolactin secretion and its control. In the physiology of reproduction. Vol 1. (Eds. Knobil, E. and Neill, J.D.) *Raven Press. USA.* 1833-60.
- [7] Yu-Lee L. 1997. Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **215**: 35-52.
- [8] Ben-Jonathan N., Mershon J.L., Allen D.L. and Steinmetz R.W. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Rev.* **17**(6): 639-69.
- [9] Corbacho A.M., Martínez de la Escalera G. and Clapp C. 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental-lactogen family in angiogenesis. *J. Endocrinol.* **173**: 219-38.
- [10] Andries M., Tilemans D. and Denef C. 1992. Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochemical Journal.* **281**: 393-400.
- [11] Baldocchi R.A., Tan L., King D.S. and Nicoll C.S. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: Evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology.* **133**: 935-38.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [12] Clapp C., Martial J., Guzman R.C., Rentier-Delrue F. and Weiner R.I. 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*. **133**: 1292-99.
- [13] Dueñas Z., Torner L., Corbacho A.M., Ochoa A., Gutierrez-Ospina G., Lopez-Barrera F., Barrios F.A., Berger P., Martínez de la Escalera G. and Clapp C. 1999. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **40** (11): 2498-505.
- [14] Ochoa A., Montes de Oca P., Rivera C., Dueñas Z., Nava G., Clapp C. and Martínez de la Escalera G. 2001. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42** (7): 1639-45.
- [15] Ferrara N., Clapp C. and Weiner R. 1991. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*. **129** (2): 896-900.
- [16] Lee H., Struman I., Clapp C., Martial J. and Weiner R.I. 1998. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology*. **139** (9): 3696-703.
- [17] Struman I., Bentzien F., Lee H., Mainfroid V., D'Angelo G., Goffin V., Weiner R.I. and Martial, J.A. 1999. Opposing actions of intact N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: An efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **96**: 1246-51.
- [18] Martini J.F., Piot C., Humeau L.M., Struman I.M., Martial J.A. and Weiner R.I. 2000. The anti-angiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol. Endocrinol.* **14**: 1536-49.
- [19] Clapp C. and Weiner R.I. 1992. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*. **130**: 1380-86.
- [20] D'angelo G., Martín J.F., Liri T., Fantl W.J., Martial J. and Weiner R.I. 1999. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of ras in capillary endothelial cells. *Mol. Endocrinol.* **13** (5): 692-704.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [21] Mittra I. 1980a. A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 1760-67.
- [22] Mittra I. 1980b. A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. II. In vivo mammary mitogenic activity of its Nterminal 16K moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**: 1750-59.
- [23] Pellegrini I., Gunz G., Ronin C., Fenouillet E., Peyrat J-P., Delori P. and Jaquet P. 1988. Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells: immunological, receptor binding, and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms. *Endocrinology.* **122**: 2667-74.
- [24] Shah G.N. and Hymer W.C. 1989. Prolactin variants in the rat adenohypophysis. *Mol. Cel. Endocrinol.* **61**: 97-107.
- [25] Sinha Y.N. and Gilligan T.A. 1984. A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology.* **114**: 2046-53.
- [26] Sinha YN., Gilligan T.A., Lee D.W., Hollingsworth D. and Markoff E. 1985. Cleaved prolactin: Evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism.* **60**: 239-43.
- [27] Clapp C., Torner L., Gutiérrez-Ospina G., Alcántara E., López-Gómez F.J., Nagano M., Kelly P.A., Mejía S., Morales M.A. and Martínez de la Escalera G. 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. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **91**: 10384-88.
- [28] Torner L., Mejía S., Lopez-Gomez F.J., Quintanar A., Martínez de la Escalera G. and Clapp C. 1995. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology.* **136** (12): 5454-60.
- [29] O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H. and Folkman J. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis



*Producción de una línea celular endotelial bovina*

inhibitor that mediates the suppressail of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell*. **79**: 315-28.

[30] O'Reilly M.S. 1997. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *Exs*. **79**: 273-94.

[31] O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R. and Folkman J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. **88**: 277-85.

[32] Lelkes P.I., Manolopoulos V., Silverman M., Zhang S., Karmiol S. and Unsworth B.R. 1996. On the possible role of endothelial cell heterogeneity in angiogenesis. In *Molecular, Cellular, and Clinical Aspects of Angiogenesis*, (Ed. M:E Maragoudakis). New York: Plenum Press. 1-17.

[33] Corbacho A.M., Macotela Y., Nava G., Torner L., Dueñas Z., Noris G., Morales M.A., Martínez de la Escalera G. and Clapp C. 2000. Human umbilical vein endotelial cells express multiple prolactin isoforms. *J. Endocrinology*. **166**: 53-62.

[34] Clapp C., López-Gómez F.J., Nava G., Corbacho A., Torner L., Macotela Y., Dueñas Z., Ochoa A., Noris G., Acosta E., Garay E. and Martínez de la Escalera G. 1998. Expresión of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endotelial cells: evidence for autocrine effects. *J. Endocrinology*. **158**: 137-144.

[35] Cajero-Juárez M., Avila B., Ochoa A., Garrido-Gerrero E., Varela-Echavarría A., Martínez de la Escalera G. and Clapp C. 2002. Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur. J. Cell Biol.* **81**: 1-8.

[36] Springer T. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. **76**: 301-14.

[37] Montes de Oca Balderas P. 1999. Análisis de la participación de prolactinas en interacciones endotelio-linfocitos. Tesis de Maestría. UNAM.

[38] Lelkes, P.I., E.G. Manolopoulos, D.M. CÖhick, and B.R. Unsworth. 1994. Endothelial cell heterogeneity and organ-specificity. In *Angiogenesis: molecular biology, clinical aspects*. (Eds. M.E. Maragoudakis, P. Guillino, and P.I. Lelkes.) Plenum Press. New York. 15-28.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [39] Lelkes, P.I. and B.R. Unsworth. 1992. Role of heterotypic interactions between endothelial cells and parenchymal cells in organospecific differentiation: a possible trigger of vasculogenesis. In *Angiogenesis in health and disease*. (Eds. M.E. Maragoudakis, P. Gullino, and P.I. Lelkes.) Plenum Press, New York, NY. 27-43.
- [40] Chaudhury, A.R. and P. A. D'Amore, 1991. Endothelial cell regulation by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Cell. Biochem.* **47**: 224-29.
- [41] Madrid, J. A., L. Bell, M. Marx, J. R. Merwin, C. Basson, and C. Prinz. 1991. Effects of soluble factors and extracellular matrix components on vascular cell behavior in trio and in vivo: models of de-endothelialization and repair. *J. Cell. Biochem.* **45**: 123-30.
- [42] Nerem, R.M. 1993. Hemodynamics and the vascular endothelium. *J. Biomech. Eng.* **115**: 510-14.
- [43] Warren J.B. and Loi R.K. 1995. Captopril increases skin microvascular blood flow secondary to bradykinin, nitric oxide, and prostaglandins. *FASEB J.* **9**: 411-18.
- [44] Yamamoto C., Kaji T., Furuya M., Sakamoto M., Kozuka H. And Koizumi F. 1994. Basic fibroblast growth factor supresses tissue plasminogen activator released from cultured human umbilical vein endothelial cells but enhances that from cultured human aortic endothelial cells. *Thromb. Res.* **73**: 255-63.
- [45] Swerlick, R.A. and T.J. Lawley. 1993. Role of microvascular endothelial cells in inflammation. *J. Invest. Dermatol.* **100** (1): 111S-15S.
- [46] Swerlick, R.A., K.H. Kee, T.M. Wick, and T. J. Lawley, 1992. Human dermal microvascular endothelial but not human ubilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J. Immunol.* **148** (1): 78-83.
- [47] Grant, D. S., P. I. Lelkes, K. Fukuda, and H. K. Kleinman. 1991. Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation in vitro. *In vitro Cell Dev. Biol.* **27A**: 327-36.
- [48] Matsby-Baltzer I., Jakobsson A., Sörbo J. and Norrby K. 1994. Endotoxin is agiogenic. *Int. J. Exp. Pathol.* **75**: 191-96.
- [49] Fajardo L.F., Kwan H.H., Kwaiski J., Prionas S.D. and Aliison A.C. 1992. Dual role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **104**: 539-44.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [50] Olivo M., Bhardwaj R., Schultze-Osthoff K., Sorg C., Jacob H.J. and Flamme I. 1992. A comparative study on the effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) human angiogenic factor (h-AF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the choriollantoic membrane of the chick embryo. *Anat. Rec.* **234**: 105-15.
- [51] Augustin H.G., Kozian D.H. and Jhonson R.C. 1994. Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and active endothelial cells phenotypes. *BioEssays*. **16**: 901-06.
- [52] Campochiaro P.A. 2000. Retinal and choroidal neovascularization. *J. Cell Physiol.* **184**: 301-10.
- [53] Stone J. and Maslin J. 1997. Mechanisms of retinal angiogenesis. *Progress in Retinal and Eye Res.* **16** (2): 157-81.
- [54] Murata T., Nakawaga K., Khalil A., Ishibashi T., Imota H. And Sueishi K. 1996. The temporal and spacial vascular endothelial growth factor expression in retinal vasculogenesis of rat neonates. *Lab. Invest.* **74** (1): 68-77.
- [55] Pe'er J., Sweiki D., Itin A., Hemo I., Gnessin H. and Keshet E. 1995. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularization ocular diseases. *Lab. Invest.* **72**: 638-45.
- [56] Takagi H., King G., Ferrara N. and Aiello P. 1996. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk gene expression through adenosine A<sub>2</sub> receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* **37** (7): 1311-21.
- [57] Battista P.J., Bowen H.J. and Gorfien S.F. A serum-free for the culture of human umbilical vein endothelial cells. *FOCUS*. **17** (1): 10-13.
- [58] Crane M. St. J. 1999. Mutagenesis and cell transformation in cell culture. *Methods in Cell Sci.* **21**: 245-53.
- [59] Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G. and Minick C.R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**: 2745-56.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [60] Faller D.V., Kourembanas S., Ginsberg D., Hannan R., Collins T., Westein B.M., Pber J.S. and Tantravahi R. 1988. Immortalization of human endothelial cells by murine sarcoma viruses, without morphological transformation. *J. Cell Physiol.* **134**: 47-56.
- [61] Takahashi K., Sawasaki Y., Hara J-I., Mukay K. and Goto T. 1990. Spontaneous transformation and immortalization human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **25**: 265-74.
- [62] Lassalle P., LaGrou C., Delneste Y., Sanceau J., Coll J., Torpier G., Wietzerbin J., Stehelin D., Tonnel A-B. and Capron A. 1992. Human endothelial cells transfected by SV40 T antigens: characterization and potential use as a source of normal endothelial factors. *Eur. J. Immunol.* **22**: 425-31.
- [63] PUNCHARD N.A., JEWERS R.J., SANKEY M.D., WATSON D.J., KELL B., CASON J., BEST J.M. and THOMPSON R.P. 1994. Use of viral and cellular oncogenes to immortalize endothelial cells. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 197S.
- [64] Fontijn R., Hop C., Brinkman H.J., Slater R., Westerveld A., Van Mourik J.A., and Pannekoek H. 1995. Maintenance of vascular endothelial cell-specific properties after inmortalization with an amphotrophic replication-deficient retrovirus containing human papilloma virus 16 E6/E7 DNA. *Exp. Cell Res.* **216** (1): 199-207.
- [65] Edgell C.J-S., McDonald C.C. and Graham J.B. 1983. Permanent cell line expression human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **80**: 3734-37.
- [66] Shiga T., Shirasawa H., Shimizu K., Dezawa M., Masuda Y. and Simizu B. 1997. Normal human fibroblasts immortalized by introduction of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6-E7 genes. *Microbiol. Immunol.* **41** (4): 313-19.
- [67] Coursen J.D., Bennett W.P., Gollahon L., Shay J.W. and Harris C.C. 1997. Genomic instability and telomerase activity in human bronquial epithelial cells during immortalization by human papillomavirus-16 E6 and E7 genes. *Exp. Cell Res.* **235**: 245-53.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [68] Münger K., Phelps W. C., Bubb V., Howley P.M. and Schlegel R. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virology*. **63** (10): 4417-21.
- [69] Lochmüller H., Johns T. and Shoubbridge E.A. 1999. Expression of the E6 and E7 genes of human papillomavirus (HPV16) extends the life span of human myoblasts. *Exp. Cell Res.* **248**: 186-93.
- [70] Teifel M. and Friedel P. 1996. Establishment of the permanent microvascular endothelial cells line PBMEC/C1-2 from porcine brains. *Exp. Cell Res.* **228**: 50-57.
- [71] Seedorf K., Krammer G., Dürst M., Suhai S. and Röwekamp W. 1985. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. **145**: 181-85.
- [72] Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J. and Howley P.M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. **63**: 1124-36.
- [73] Jones D.L., Thompson D.A., Suh-Bürgmann E., Grace M. and Münger K. 1999. Expression of the HPV E7 oncoprotein mimics but does not evoke a p53-dependent cellular DNA damage response pathway. *Virology*. **258**: 406-14.
- [74] García-Carrancá A. y Gariglio P. 1993. Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. *Revista de Investigación Científica*. **45**: 85-92.
- [75] Yasumoto S., Burkhardt A.L., Doniger J. and DiPaolo J.A. 1986. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virology*. **57**: 572-77.
- [76] Thomas J.T. and Laimins L.A. 1998. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J. Virol.* **72** (2): 1131-37.
- [77] Banks L. and Crawford L. 1998. Analysis of human papillomavirus type 16 polypeptides in transformed primary cells. *Virology*. **165**: 326-28.
- [78] Olsen E. 1994. Culturing of human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. In: *Cell Biology A laboratory handbook*. (Eds) Celis J.E. Academic Press. USA. p594.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [79] Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. 1999. Short protocols in molecular biology. Fourth Edition. Wiley. New York. USA.
- [80] Sambrook J. and Russell D.M. 2001. Molecular Cloning. Third Edition. CSHL PRESS. New York. USA.
- [81] Attal J., Cajero-Juárez M., and Houndebine L-M. 1995. A simple method of DNA extraction from whole tissues and blood using glass powder for detection of transgenic animals by PCR. *Transgenic Res.* 4: 149-50.
- [82] Hölthofer L. 1982. *Ulex europaeus* I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab. Inv.* 47 (1): 60-66.
- [83] Magee M. 1994. Isolation, culture and characterization of rat cells. *Am. J. Physiol.* 267: 433-41.
- [84] Chomczynski P. and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1): 156-59.
- [85] Clapp C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology.* 121: 2055-64.
- [86] Ades E.W., Candal F.J, Swerlick R.A., Velma G.G, Summers S., Bosse D.C. and Lawley T.J. 1992. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99: 683-90.
- [87] Wagner D., Olmsted J.B., and Marder V. 1982. Immunolocalization of Von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95: 355-60.
- [88] Banerjee, D.K. and Martínez J. 1998. Microvascular endothelial cells from Adrenal Medulla A Model for *in vitro* angiogenesis. In *Angiogenesis, Models, Modulators and Clinical Applications.* (Eds. Maragoudakis M.E.) Plenum Press. New York. 7-17.
- [89] Sheweiki D.A., Itin A., Soffer D. and Keshet E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediated hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 359: 843-45.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [90] Folkman J. 1990. Endothelial cells and angiogenic growth factors. In. Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **3**: 171-74.
- [91] Hughes S.E. 1996. Functional Characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in a *in vitro* model of angiogenesis. *Exp. Cell Res.* **225**: 171-85.
- [92] Greenwood J. 1992. Characterization of a retinal endothelial cell culture and the expression of P-glycoprotein in brain and retinal endothelium *in vitro*. *J. Neuroimmunol.* **39**: 123-32.
- [93] Simorre-Pinatel V., Guerrin M., Chollet P., Penary M., Clemens S., Malecaze F. and Plouet J. 1994. Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**: 3393-99.
- [94] Band V., Dalal S., Delmolino, L. and Andophy, E.J. 1993. *EMBO J.* **10**: 4129-35.
- [95] Oda D., Bigler, L., Lee, P. and Blanton, R. 1996. HPV immortalization of human oral epithelial cells: A model for carcinogenesis. *Exp. Cell Res.* **226**: 164-69.
- [96] Furukawa T., Duguid, W.P., Rosenberg, L., Viallet, J., Galloway D.A. and Tsao, M.S. 1996. Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am. J. Pathol.* **148** (6): 1763-70.
- [97] Choo C.K., Ling, M.T., Chan K.W., Tsao S.W., Zheng, Z., Chan, L.C. and Wong, Y.C. 1999. Immortalization of human prostate epithelial cells by HPV 16 E6/E7 open reading frames. *Prostate.* **40** (3): 150-58.
- [98] Khan M., Canhoto A.J., Housley P.R., Creek K.E. and Pirisi L. 1997. Glucocorticoids stimulate growth of human papillomavirus type 16 (HPV-16)-immortalized human keratinocytes and affecting the levels of HPV-16 E6/E7 mRNA. *Exp. Cell Res.* **236**: 304-10.
- [99] Kanda T., Foruno A. and Yoshiike K. 1988b. Human papillomavirus type 16 open reading frame E7 encodes a transforming gene for rat 3Y1 cells. *J. Virology.* **62**(2): 610-13.



*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [100] Bole-Feysot C., Goffin V., Eder-y M., Binart N. and Kelly P.A. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Rev.* **3**: 225-68.
- [101] Ali S., Eder-y M., Pellegrini L., Lesueur L., Paly J., Djiane J. and Keclly P.A. 1992. The Nb2 form of prolactin receptor is able to activate a milk protein gene promoter. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1242-48.
- [102] Herrington J., Smit L.S., Schwartz J. and Carter-Su C. 2000. The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene.* **19**: 2585-97.
- [103] Horseman N.D. and Yu-Lee L-Y. 1994. Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: Growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocrine Rev.* **15**: 617-49.
- [104] Ihle J.N. and Kerr I.M. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends in Genetics.* **11**: 69-74.
- [105] Lebrun J., Ali S., Goffin V., Ullrich A. and Kelly P.A. 1995. A single phosphotyrosine residue of the prolactin receptor is responsible for activation of gene transcription *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **92**: 4031-35.
- [106] O'Neal K.D. and Yu-Lee L-Y. 1994. Differential signal transduction of the short, Nb2 and long PRL receptor: Activation of IRF-1 and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **269**: 26076-82.
- [107] Gubbins E.J., Maurer R.A., Lagrimini M., Erwin C.R., Donelson J.E. 1980. Structure of the rat prolactin gene. *J. Biol. Chem.* **255**: 8655.
- [108] Owerbach D., Rutter W.J., Cooke N.E., Martial J.A. and Gjows T.B. 1981. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science.* **212**: 81S.
- [109] Parlow A.F. and Shome B. 1976. Rat prolactin: the entire linear aminoacid sequence. *Fed. Proc.* **35**: 219.
- [110] Cooke E.N. 1995. Prolactin: *Basic. Physiology.* p368. In: Endocrinology Vol 1. (Ed. DeGroot L.) Saunders: Philadelphia.
- [111] Maurer R., Erwin C.R. and Donelson J.E. 1981. Analysis of 5' flanking sequences and intron exon boundaries of the rat prolactin gene. *J. Biol. Chem.* **256**: 10524.



*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [112] Krieger D.T., Brownstein M.V. and Martin J.B. 1993. Brain Peptides. John Wiley and Sons., USA: New York.
- [113] Sinha Y.N. 1992. Prolactin variants. *Trends Endocrinol. Metab.* **3**: 100.
- [114] Rubinshtein A.I. and Pankov I.A. 1990. Features of structure-activity organization of prolactin. *Mol. Biol. Mosk.* **24**: 1562.
- [115] Luck D.N., Gout P.W., Beer C.T. and Snuth M. 1988. Bioactive recombinant bovine use of site-specific mutagenesis in structure-function analysis. p99. In: *Prolactin gene family and its receptors*. (Ed. Hoshino K.) Holanda: Elsevier.
- [116] Luck D.N., Gout P.W., Beer C.T. and Smith M. 1989. Bioactive recombinant methionyl bovine prolactin: Structure-function studies using site specific mutagenesis. *Mol. Endocrinol.* **3**: 822.
- [117] Cole E.S., Nichols E.H., Lauziere K., Edmunds T. and McPherson J.M. 1991. Characterization of microheterogeneity of recombinant primate prolactin: Implications for posttranslational modifications of the hormone in vivo. *Endocrinology.* **129**: 2639.
- [118] Robyn C. and Meuris S. 1988. The state of the art in human prolactin. p29. In: *Prolactin gene family and its receptors*. (Ed. Hoshino K.) Holanda: Elsevier.
- [119] Brooks C.L., Isaacs L.A. and Wicks J.R. 1994. Preparative purification of phosphorylated and non-phosphorylated bovine prolactins. *Mol. Cell Endocrinol.* **99**: 301.
- [120] Kim B.G. and Brooks C.L. 1993. Isolation and characterization of phosphorylated bovine prolactin. *Biochem. J.* **296**: 41.
- [121] Baldocchi R.A., Tan L. and Nicoll C.S. 1992. Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum in vitro. *Endocrinology* **130**: 165.
- [122] DeVito W.J., Avakian C. and Stone S. 1992. Proteolytic modification of prolactin by the female rat brain. *Neuroendocrinology.* **56**: 597.
- [123] Nolin J.M. 1982. Molecular homology between prolactin and ovarian peptides: Evidence for physiologic modification of the parent molecule by the target. *Peptides.* **3**: 823.
- [124] Oetting W.S. and Walker A.M. 1985. Intracellular processing of prolactin. *Endocrinology.* **117**: 1565.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [125] Tomer L.M. 1992. Detección de la prolactina 16K en la circulación e hipófisis de la rata. Tesis de Maestría. UNAM. México.
- [126] Clapp C., Sears P.S., Russel D.H., Richards J., Levay-Young B. and Nicoll C.S. 1988. Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* **122**: 2892.
- [127] Clapp C., Martial J., Rentier-Delrue F., Guuzman R.C. and Weiner R.I. 1993. Human 16K prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**: 1292.
- [128] Ferrara N., Clapp C. and Weiner R.I. 1993. The 16Kd fragment of prolactin sepecifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* **129**: 896.
- [129] Berlanga J.J., Garcia-Ruiz J.P., Perrot-Applanat M., Kelly P.A. and Edery M. 1997. The short form of the prolactin receptor silences prolactin induction of the b-casein gene promoter. *Mole. Endocrinol.* **11** 1449-1457.
- [130] Blank D., Riedl M., Reitner A., Schnack C., Schernthaner G., Clodi M., Frisch H. and Luger A. 2000. Growth hormone replacement therapy is not associated with retinal changes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**: 634-36.
- [131] Boes M., Dake B.L. and Bar R.S. 1991. Interactions of cultured endothelial cells with TGF-P, BFGF, PDGF and IGF-1. *Life Science* **48**: 811-21.
- [132] Anthony R.V., Limesand S.W., Fanning M.D. and Liang R. 1998. Placental lactogens and growth hormone regulation and action. In *77 Endocrinology of Pregnancy*, pp 461-490. Ed FW Bazer. Totowa NJ: Humana Press Inc.
- [133] Aston R., Youiig K., Van den Berg H. and Ivanyi J. 1984. Identification of Mr variants of prolactin with monoclonal antibodies. *FEBS Letters* **171**: 192-96.
- [134] Arey B.J. and Freeman M.E. 1989. Hypothalamic factors involved in the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* **124**: 878.
- [135] Ben-Jonathan N., Arbogast L.A. and Hyde J.F. 1989. Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog. Neurobiol.* **33**: 399.
- [136] Jacobowitz D.M. 1988. Multifactorial control of pituitary hormone secretion: The Whchis of the brain. *Synapse* **2**: 186.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [137] Mena F., Hummett G., Aguayo D., Clapp C., Martínez de la Escalera G., Morales M.T. 1992. Changes in molecular variants during *in vitro* transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology* 130: 3365.
- [138] Meites J. 1977. Neuroendocrine control of prolactin in experimental animals. *Clin. Endocrinol.* 6 suppl: 95
- [139] Kordon C., Drouva S.V., Martínez de la Escalera G. and Weiner R.I. 1994. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. p 1621. En: *The Physiology of Reproduction*. (Eds. Knobil E. and Neill J.D.) New York: Raven Press.
- [140] Kumar V., Wong D.T., Pasion S.G. and Biswas D.K. 1987. Defective distal regulatory element at 5' upstream of rat prolactin gene of steroid-nonresponsive GH-subclone. *Biochem. Biophys. Acta* 910: 213.
- [141] Lewis U.J., Singh N.F., Vanderlaan W.F. and Tutwiler G.F. 1977. Enhancement of hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymatic modification. *Endocrinology* 101: 1587.
- [142] Nicoll C.S. 1974. Physiological actions of prolactin. In: *Handbook of Physiology*, Vol 1, II. pp 253-393. (Ed. Knobil E, Sawyer Vffl.) Washington DC : Am. Physiol. Soc.
- [143] Nicoll C.S. 1980. Ontogeny and evolution of prolactin functions. *Fed. Proc.* 39: 2563.
- [144] Hoshino K. 1988. Biological effects of prolactin on spermatozoa, oocytes and fertilization. In: *Prolactin gene family and its receptors*. (Ed. Hoshino K.) Holanda Elsevier.
- [145] Meites J. 1988. Biological functions of prolactin in mammals. In: *Prolactin gene family and its receptors*. pp123-130. (Ed. Hoshino K.) New York: Elsevier.
- [146] Mori C., Harigaya T., Hoshino K. and Fukuda A. 1988. Effects of mouse prolactin on acrosomal reaction of spermatozoa in mice *in vitro*. p183. In: *Prolactin gene family and its receptors*. (Ed. Hoshino K.) Holanda Elsevier.
- [147] Dardenne M. and Savino W. 1994. Prolactin mediated cellular interactions in the thymus. *Ann. NY Acad. Sci.* 741: 100.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [148] De Vito W.J., Avakian C., Stone S. and Okulics W.C. 1993. Prolactin stimulated mitogenesis of cultured astrocytes is mediated by a protein kinase C dependent mechanism. *J. Neurochem.* **60**: 832.
- [149] De Vito W.J., Okulics W.C., Stone S. and Aviakian C. 1993. Prolactin stimulated mitogenesis of cultures astrocytes. *Endocrinology.* **130**: 2549.
- [150] Gutierrez G., Anaya J.N., Cabrera G.E., Vindrola O. and Espinoza L.R. 1994. Prolactin, a link between the neuroendocrine and immune systems. *Rev. Rhum.* **61**: 278.
- [151] Ballard P.L. 1986. Hormones and lung maturation. *Monogr. Endocrinol.* **28**: 1.
- [152] Costello L.C. and Franklin R.B. 1994. Effects of prolactin on the prostate. *Prostate.* **24**: 162.
- [153] Nielsen J.H., Moldrup A., Billestrup N., Petersen E.D., Allevato G. and Stahi M. 1992. The role of growth hormone and prolactin in beta cell growth and regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **321**: 9.
- [154] Perez-Villamil B., Bordiu E. and Puente-Cueva R. 1992. Involvement of physiological prolactin levels in growth and prolactin receptor content of prostate glands and testes in developing male rats. *J. Endocrinol.* **132**: 449.
- [155] Sanchez-Criado J.E., Van der Schoot P. and Uilenbroek J.T. 1988. Evidence for luteotrophic and antiluteolytic actions of prolactin in rats with 5-day oestrous cycles. *J. Endocrinol.* **117**: 455.
- [156] Dicks P., Russel A.J. and Lincoln G.A. 1994. The role of prolactin in the reactivation of hair follicles in relation to moulting in cashmere goats. *J. Endocrinol.* **143**: 441.
- [157] Duncan M.J. and Goldman B.D. 1985. Physiological dosis of prolactin stimulate pelage pigmentation in Djungarian hamster. *Am. J. Physiol.* **248**: R664.
- [158] LeProvost F., Leroux C., Martin P., Gaye P. and Djiane J. 1994. Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland. *Neuroendocrinology.* **60**: 305.
- [159] Bridges R.S. and Mann P.E. 1994. Prolactin brain interactions in the induction of maternal behavior in rats. *Psychoneuroendocrinology.* **19**: 611.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [160] Harlan R.E., Shivers B.D. and Pfaff D.W. 1983 Midbrain microinfusions of prolactin increase the estrogen-dependent behavior, lordosis. *Science*. **219**: 1451.
- [161] Leboucher G., Richard-Yris M.A., Guemene D. and Chadwick A. 1993. Respective effects of chicks and nest on behavior and hormonal concentrations of incubating domestic hens. *Physiol. Behav.* **54**: 135.
- [162] Sobrinho L.G. 1991. Neuropsychiatry of prolactin: causes and effects. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **5**: 119.
- [163] Obal F., Payne L., Kacsoh B., Opp M., Kapas L., Grosvenor C.E. and Krueger J.M. 1994. Involvement of prolactin in REM sleep-promoting activity of systemic vasoactive intestinal peptide (VIP). *Brain Res.* **645**: 143.
- [164] Roky R., Valatx J.L., Paut-Pagano L. and Jouvet M. 1994. Hypothalamic injection of prolactin or its antibody alters the rat sleep-wake cycle. *Physiol. Behav.* **5**: 101 S.
- [165] Ali S., Edery M., Pellegrini L., Lesueur L., Paly J., Djiane J. and Kelly P.A. 1992. The Nb2 form of prolactin receptor is able to activate a milk protein gene promoter. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1242-48.
- [166] Kelly P.A. 1993. Domains of the growth hormone receptor involved in ligand binding and signal transduction. Workshop on neuroendocrinology of growth. p 19.
- [167] Kelly P.A., Djiane J., Postey-Vinay M.C. and Edery M. 1991. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Rev.* **12**: 235.
- [168] Kelly P.A., Djiane J., Boutin J.M., Jolicoeur C. and Edery M. 1988. Molecular cloning and expression of prolactin receptors. p 71. En: Prolactin gene family and its receptors. Ed. Hoshino K. Holanda: Elsevier.
- [169] Chiu S. and Wise P.M. 1994. Prolactin receptor mRNA localization in the hypothalamus by in situ hybridization. *J. Neuroendocrinol.* **6**: 191.
- [170] Di Carlo R., Muccioli G., Papotti M. and Bussolati G. 1992. Characterization of prolactin receptor in human and choroid plexus. *Brain Res.* **570**: 1992.
- [171] Okamura H., Raguet S., Bell A., Gagnon J. and Kelly P.A. 1989. Purification and protein sequence analysis of rat liver prolactin receptor. *J. Biol. Chem.* **264**: 5904.
- [172] Oseko F., Morikawa K., Nakano A. and Taniguchi A. 1993. Biosynthesis and secretory regulation of pituitary prolactin. *Nippon-Rinsho.* **51**: 2592.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [173] Ouhitt A., Morel G. and Kelly P.A. 1993. Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat reproductive tissues. *Biol. Reprod.* **49**: 528.
- [174] Ausprunk D.H., Knighon D.R. Folkman J. 1974. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: A structural and autoradiographic study. *Develop. Biol.* **38**: 237-48.
- [175] Fan G. and Rillema J.A. 1993. Effects of the protein phosphatase inhibitor okadaic acid on the actions of prolactin in cultured mouse mammary gland explants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **203**: 501.
- [176] Fan G. and Rillema J.A. 1992. Effect of a tyrosine kinase inhibitor, genistein, on the actions of prolactin in cultured mouse mammary tissues. *Mol. Cell Endocrinol.* **83**: 51.
- [177] Koduri P.B. and Rillema J.A. 1993. Effects of cholera and pertussis toxins on prolactin stimulation of actose synthesis and ornithin decarboxylase activity in mouse mammary gland explants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **203**: 424.
- [180] Linebaugh B.E. and Rillema J.A. 1991. Polyan-dne influences on the prolactin stimulation of phosphoprotein synthesis in hydroxyurca synchronized MCF-7 human mammary epithelial cells. *Horm. Metab. Res.* **23**: 414.
- [181] Rayhel E.J., Hughes J.P., Svihla D.A. and Prentice D.A. 1990. Growth and protein phosphorylation in NB2 lymphoma: effects of prolactin, cant. and agents that activate adenylate cyclase. *J. Cell Biochem.* **43**: 327.
- [182] Rillema J.A., Etindi R.N., Ofenstein J.P. and Waters S.B. 1988. Mechanisms of prolactin action. In: *The physiology of reproduction*, p. 2217. (Eds). Knobü E, Neill J. New York Raven press.
- [183] Rillema J.A., Etindi R.N. and Cameron C.M. 1986. Prolactin actions on casein and lipid biosynthesis in mouse and rabbit mammary gland explants are abolished by p-bromophenacyl bromide and quinacrine, phospholipase A2 inhibitors. *Horm. Met. Res.* **18**: 672.
- [184] Ben-Jonathan N. et. al. 1994. Regulation of Prolactin Secretion. In: Imura, H (de) *The Pituitary Gland*, de 2 Raven Press, New York. p261-83.

*Producción de una línea celular endotelial bovina*

- [185] Leite V., Cosby H., Sobrinho L.G., Fresnoza G., Santos M.A. and Friensen H.G. 1992. Characterization of big, big prolactin in patients with hyperprolactinemia. *Clin. Endocrinol.* **37**: 365
- [186] Moran C., Tena G., Fonseca M.E., Ochoa R., Bermudez J.A. and Zarate A. 1994. Changes in the prolactin serum isoforins secreted by a pituitary adenoma associated to therapy. *Arch. Med. Res.* **25**: 1.
- [187] Romero C., Leon J., Jara R. and Gonzalez O. 1993. Importancia de las isoformas de prolactina sobre la función ovárica en mujeres hiperprolactinémicas. *Rev. Chil. Ginecol.* **58**: 465.
- [188] Mena F., Hummett G., Aguayo D., Clapp C., Martínez de la Escalera G. and Morales M.T. 1992. Changes in molecular variants during *in vitro* transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology.* **130**: 3365.
- [189] Pernasetti F., Caccavelli L., Van de Weerd C., Martial J.A. and Muller M. 1997. Thyroid hormone inhibits the human prolactin gene promoter by interfering with activating protein-1 and estrogen stimulations. *Mol. Endocrinol.* **11**: 986-96.
- [190] Kuiper G.G.J.M. et al. 1998. Cloning, Expression and Function of a Novel Estrogen Receptor. In Estrogen and the Vessel Wall. (Ed. Rubanyi, G.M. and Kauffman, R.) Harwood Academic Press. USA. p1-17.
- [191] Maragoudakis M.E. 1998. Angiogenesis: Models, Modulators, and Clinical Applications. *NATO ASI Series Vol. 298*. Ed. Plenum Press. New York.
- [192] Gaasenbeek M., Gellersen B. and DiMattia G.E. 1999. Dnase I hypersensitivity analysis of non-pituitary human prolactin gene expression. *Mol. Cell Endocrinol.* **152** (1-2): 147-59.
- [193] Gellersen B., Kempf R., Telgmann R. and DiMattia G.E. 1994. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol. Endocrinol.* **8**: 356-73.
- [194] Endocrinology 1992 131 (3) p1017

# Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium

Marcos Cajero-Juárez<sup>a</sup>, Bibiana Avila<sup>a</sup>, Alejandra Ochoa<sup>a</sup>, Efraín Garrido-Guerrero<sup>b</sup>, Alfredo Varela-Echavarría<sup>a</sup>, Gonzalo Martínez de la Escalera<sup>a</sup>, Carmen Clapp<sup>1b</sup>

<sup>a</sup> Neurobiology Center, National Autonomous University of México, Querétaro/México

<sup>b</sup> Department of Genetics and Molecular Biology, Center of Research and Advanced Studies of IPN, México/México

Received March 12, 2001

Received in revised version August 29, 2001

Accepted September 12, 2001

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Endothelium cell line – bovine umbilical vein – immortalization – oncogenes – prolactin*

Endothelial cells perform a large array of physiological functions that are influenced by their cellular heterogeneity in the different vascular beds. Vein endothelial cells isolated from the umbilical cords are commonly used to study vascular endothelium. Primary cultures of these cells, however, have low proliferative capacity and a limited life span. We have immortalized bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) by transfection with an expression vector containing the human papillomavirus type 16 E6E7 oncogenes. Expression of E6E7 extended the life span of BUVEC from 40 to more than 120 cell replication cycles with no signs of senescence. Four immortalized clones were isolated and found to maintain endothelial cell properties, such as the uptake of acetylated low density lipoprotein, the expression of the von Willebrand protein, the binding of endothelial cell-specific lectins and proliferative responses to the specific endothelial cell mitogen, vascular endothelial growth factor. Moreover, clone BVE-E6E7-1, like its wild-type counterparts, expressed prolactin mRNA and decreased its proliferation in response to the anti-angiogenic 16-kDa fragment of prolactin. This clone showed little signs of genetic instability as revealed by centrosome and chromosome number analysis. Thus, immortalized E6E7 BUVEC cell lines retain endothelial cell characteristics and could facilitate studies to investigate the action of regulatory factors of vascular endothelium. Moreover, being the first non-human umbilical vein endothelial cell lines, their use should provide insights into the mechanisms governing species-related heterogeneity of endothelial cells.

## Introduction

Endothelial cells play critical roles in a large number of physiological and patho-physiological processes such as leukocyte trafficking, inflammation, wound healing, tumor metastasis, and angiogenesis. The role of endothelial cells in these events varies between macrovascular and microvascular endothelium and is influenced by the tissue to which the vascular bed is associated (Augustin et al., 1994; Lelkes et al., 1996).

Much of the knowledge of the properties and functions of the vascular endothelium has been obtained from primary cultures of endothelial cells. Many of the studies on macrocirculation have relied on cells derived from human umbilical veins, as umbilical cords are widely available, and the endothelial cells are relatively easy to isolate and culture. Umbilical vein endothelial cells, however, have reached the end of their normal *in vivo* life span and present various culture disadvantages. They frequently require special culture substrata, growth factors, cofactors and high serum concentrations (Jaffe et al., 1973; Maciag et al., 1984; Watson et al., 1995). In addition, cultures of human umbilical vein endothelium have a low proliferative potential and exhibit long population doubling times (Jaffe et al., 1973; Takahashi et al., 1990). These characteristics limit the quantity of cells available for study and often require pooling cells isolated from several donors, which in turn leads to heterogeneous populations of cells.

The above limitations have prompted the generation of umbilical vein endothelial cell lines that could serve as models for the study of vascular endothelium (Gimbrone and Fareed, 1976; Edgell et al., 1983; Faller et al., 1988; Takahashi et al., 1990; Lassalle et al., 1992; Punched et al., 1994). Herein, we report the transfection and immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) by human papillomavirus type 16 E6E7 oncoproteins and describe a line that retains morphological, phenotypic and functional characteristics of endothelial cells for many passages.

<sup>1</sup> Dra. Carmen Clapp, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, Oro, México, e-mail: clapp@servidor.unam.mx, Fax: +525556234028.



## Materials and methods

### Reagents

1,1-Dioctadecyl-1,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate acetylated low-density lipoprotein (Dil-Ac-LDL) was purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA). Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)-labeled *Banisteria simplicifolia* I isolectin B4 (BSI) and *Ulex europaeus* I (UEA-I) lectin were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Monoclonal antibodies against HPV16 E7 and human von Willebrand proteins were obtained from ZYMED Laboratories (South San Francisco, CA, USA), and Accurate Chemical & Scientific Corporation (Westbury, NY, USA), respectively. Genentech (South San Francisco, CA, USA) provided vascular endothelial growth factor (VEGF). The N-terminal 16-kDa fragment of prolactin was generated by the enzymatic proteolysis of rat 23-kDa prolactin with a particulate fraction from rat mammary glands and isolated by gel filtration and carbamidomethylation, as reported (Clapp 1987). Normal goat serum and secondary antibodies against mouse or rabbit IgG coupled to TRITC were purchased from Jackson Immuno-research Laboratories (West Baltimore, PA, USA). Bovine PRL cDNA was generously supplied by Linda A. Schuler (University of Wisconsin, Madison, WI, USA).

### Bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC)

BUVEC were isolated from fresh bovine umbilical cords following the method previously described (Olsen, 1994). Briefly, the umbilical vein was cannulated, washed with Hanks' salt solution (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), and filled with 0.05% trypsin-EDTA-1 Hanks' salt solution. After incubation for 15 min at 37 °C, the cell suspension was centrifuged, and the cell pellet was resuspended in culture medium (F12K medium (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco BRL)). Cells were cultured on 100-mm plastic dishes (Corning Costar Corp., Cambridge, MA, USA), and media were changed every other day until confluency at which time cells were split 1:3.

### Transfection of BUVEC with pCMV-E6E7

BUVEC were transfected with an expression vector for the human papillomavirus type 16 E6E7 (HPV-16 E6E7) proteins. The expression vector was constructed as follows: The E6E7 Hind III fragment from pSV-E6E7 (Kanda et al., 1988) was cloned into the Hind III site of pCDNA3 to yield pCMV-E6E7 for expression of the oncoproteins from the cytomegalovirus promoter. Passage-4 BUVEC were electroporated with pCMV-E6E7 with a Gene Pulser device (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) ( $2 \times 10^6$  cells, 10 µg plasmid DNA, 320 V, and 900 µF in a 4-mm cuvette). After electroporation, cells were cultured for 48 h in F12K culture medium and then selected in the same medium containing 500 µg/ml geneticin (G-418) for 4 weeks. The selected cells were maintained in subconfluent cultures with 300 µg/ml of the drug. These selected cells will be herein referred to as transfected BUVEC.

### Polymerase chain reaction (PCR)

Integration of the pCMV-E6E7 vector into genomic DNA was confirmed by PCR. Genomic DNA was purified using the glass milk method (Attal et al., 1995) and subjected to conventional PCR using two different pairs of primers. The first set, which yields a 1000-bp product was: primer 1 (5'-TAATACGACTACTATAGGG-3') and primer 2 (5'-ATTAGGTGACATTAG-3'). The second set which generates a 410-bp product was: primer 3 (5'-AACATGAACATCAAAGGATC-3') and primer 4 (5'-GCTTAGCAGTTGTGTGTG-3'). For bovine prolactin mRNA detection three sets of primers were used as previously reported (Clapp et al., 1988). The first set, which yields a 473-bp product was: primer 1 (5'-ACCTCTCCCTGGAAATGFTCAA-3') and primer 2 (5'-TGTAGATGATCTTGCAATTCAG-3'). The second set generating a 428-bp product was: primer 3 (5'-AGGGCAAAGGGTTCATTACAT-3') and primer 2. The third set yields a 395-bp product and was primer 3 and primer 4 (5'-AAGTGTCAATCTGCTTGAATC-3'). PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

### Proliferation rate of BUVEC transfected with pCMV-E6E7

Normal and transfected BUVEC were seeded ( $2 \times 10^4$  cells per 60-mm dish) and harvested every 24 hours. At each time point cell numbers were determined with a hemocytometer to estimate proliferation rate and the length of the replication cycle. Cell numbers doubled in approximately 24 h indicating the length of the replication cycle. To investigate serum requirements for cell proliferation, normal (passage 6) and transfected BUVEC (passage 32) were plated ( $10^4$  cells per 60-mm dish) and cultured in the presence of different concentrations of FBS for 4 days, at which time cell number was recorded.

### Cloning

BUVEC transfected with the plasmid pCMV-E6E7 were subcloned by limiting dilution and plating onto a monolayer of untransfected feeder cells followed by G-418 selection. Four clones were isolated and their proliferation rate determined using the method described above.

### Immunocytochemistry, lectin-binding and Dil-Ac-LDL uptake

Each of the four clones was grown on fibronectin-coated glass coverslips, fixed in 2% formaldehyde-PBS, and immunostained with a monoclonal antibody against von Willebrand factor (1 µg/ml) and secondary goat anti-mouse antibodies coupled to rhodamine (Corbacho et al., 2001). For lectin-binding experiments, cells were incubated for 20 min with either BSI (25 µg/ml) or UEA-I (100 µg/ml) in PBS supplemented with 0.1 mg/ml CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> as described (Holthofer et al., 1982; Magee et al., 1994). For LDL uptake, live cells on coverslips were incubated for 4 h with Dil-Ac-LDL (10 µg/ml) in 10% FBS-F12K as indicated (Novta et al., 1984), fixed as above, and examined under an epifluorescence microscope. Cloned cells were characterized at passages 35 and 50 and compared to untransfected BUVEC (passages 6–9).

### Effect of VEGF and 16K prolactin on cell proliferation

The proliferative effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of the N-terminal 16-kDa fragment of prolactin (16K prolactin) were determined on clone BVE-E6E7-1 (passage 37) and untransfected BUVEC (passage 7) and measured by reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) as previously described (Carley et al., 1992). Briefly, cells were incubated with MTT (500 mg/ml) at 37 °C for 4 h. The formazan precipitate was solubilized with 0.4 N HCl-10% SDS for 30 min at room temperature and quantitated by measuring absorbance at 590 nm. This colorimetric assay which has been validated as an index of cell proliferation (Carley et al., 1992), allowed the use of both growth factors in limited amounts.

### Genomic instability

Centrosome abnormalities have been linked to chromosome missegregation and genetic instability (Pihan et al., 1998). Centrosomes of BVE-E6E7-1 were visualized by staining for  $\gamma$ -tubulin as described (Ducsing et al., 2000), using a polyclonal antibody against  $\gamma$ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at a 1:50 dilution, followed by a rhodamine red-labeled donkey anti-rabbit IgG antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) at a 1:2000 dilution. Nuclei were visualized by using DAPI DNA dye (Boehringer Mannheim, Germany). Also numeric chromosomal alterations were evaluated by metaphase analysis. Briefly, confluent BVE-E6E7-1 were trypsinized and seeded into T25 flasks ( $\sim 10^6$  cells) in 5 ml of culture medium. The medium was changed after 24 h, and colchicine (Sigma) and 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; Sigma) were added at a final concentration of 100 and 0.6 µg/ml, respectively. Cells were harvested and dropped on clean wet slides as described (Rooney and Czepulkowski 1992), and the slides were aged at 60 °C overnight and banded using the trypsin-Giemsa method (Seabright, 1971). Chromosome number was determined by light microscope analysis. Comparisons were made between clone BVE-E6E7-1 (passage 34) and untransfected BUVEC (passage 9).

### Statistical analysis

The data were analyzed for statistical significance by Student's *t*-test. All results are the average of at least three experiments.

## Results

### Transfection of BUVEC with pCMV-E6E7 plasmid

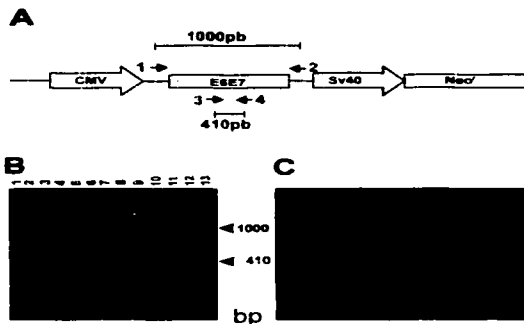
BUVEC were transfected with pCMV-E6E7 plasmid and selected with G-418. Transfected cells (BUVEC-E6E7) showed resistance to G-418 treatment while the untransfected cells died within 3 weeks (Fig. 1). BUVEC-E6E7 proliferated rapidly and were passaged every 48 h.

Genomic integration of HPV16 E6E7 sequences was verified by PCR amplification using two sets of primers designed to amplify the complete E6E7 sequence (1000 bp) and a partial one (410 bp) (Fig. 2A). Both products were amplified from genomic DNA from BUVEC-E6E7 (Fig. 2B, lanes 5-8) but not from BUVEC (Fig. 2B, lanes 1-4). Moreover, expression of the E7 oncoprotein was demonstrated in BUVEC-E6E7 cells by immunostaining with a mAb against HPV E7 (Fig. 2C).

### Growth properties of BUVEC-E6E7

BUVEC-E6E7 have been maintained in continuous subconfluent culture for more than 4 months (60 passages) (Fig. 3). Since the replication time is 24 h, this represents more than 120 replications. Senescence of primary cultures is characterized by lack of cell division, increased cell volume, and cell death (Jha et al., 1998). No sign of senescence has been observed in BUVEC-E6E7, as the proliferation rate has remained constant throughout this time (Fig. 3), and the cells have continued to display a morphology and size similar to those of BUVEC at earlier passages (Fig. 4A and C). In contrast, untransfected BUVEC showed increased cell volume and drastically reduced their proliferation after passage 20 (Figs. 3 and 4).

To determine the serum requirements for growth, BUVEC-E6E7 and untransfected BUVEC were cultured in medium supplemented with various concentrations of serum (Fig. 5). Both types of BUVEC failed to proliferate in low (0.1%) serum and responded to it in a dose-dependent fashion. Transfected BUVEC-E6E7 showed a significantly higher proliferative response than untransfected cells. The later reached maximal growth with 10% serum, while BUVEC-E6E7 continued to grow at higher serum concentrations.



**Fig. 2.** Integration of E6E7 oncogene sequences and cellular expression of HPV16 oncoproteins. **A.** pCMV-E6E7 (6.4 kb) which contains the CMV promoter, E6E7 oncogene sequences, SV40 promoter, and Neo resistance gene. Each expression unit has a polyadenylation sequence (not shown). PCR using primers 1 and 2 (upper arrows) amplify a 1000-bp product, while primers 3 and 4 (lower arrows) yield a 410-bp fragment. **B.** PCR analysis of genomic DNA from untransfected (lanes 1-4) and transfected (lanes 5-8) BUVEC amplified alternatively with primers 3 and 4 or 1 and 2. Amplified products are indicated by arrowsheads. pCMV-E6E7 positive control (lanes 10 and 11), negative controls without DNA (lanes 12 and 13), molecular weight markers (lane 9) are also shown. **C.** Detection of the E7 oncoprotein using anti-E7 mAb and fluorescence microscopy. Scale bar: 38 µm.

### Characterization of clones

At passage 21, BUVEC-E6E7 were cloned by limiting dilution. Four clones showing the expression of E7 oncoprotein by immunocytochemistry (Fig. 6A), were found to proliferate at a constant rate for more than 40 passages (not shown). The four clones were evaluated to determine whether they retained endothelial cell morphological and phenotypical characteristics. Results with clone BVE-E6E7-1 (passage 35) (Fig. 6) are representative of all clones, and show that they all assumed a cobblestone morphology (Fig. 6B), stained positively for von Willebrand protein (Fig. 6C), displayed the uptake of DiI-Ac-LDL (Fig. 6D), and bound the fluorescent endothelial cell-specific lectins, BSI and UEA-I (Fig. 6E and F, respectively).



**Fig. 1.** Selection for stable integration of pCMV-E6E7 plasmid. Untransfected (**A, B**) and transfected (**C**) BUVEC were plated and cultured for 4 weeks in complete medium with (**B, C**) or without (**A**) 500 µg/ml of G-418. Scale bar: 67 µm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

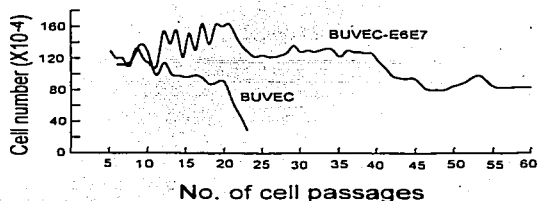


Fig. 3. Life span of normal (BUVEC) and transfected (BUVEC-E6E7) cells. Cells were seeded at a density of  $5 \times 10^5$  per 100-mm dish, and cell number per dish was recorded at every passage (performed every 48 h).

All of these characteristics continued to be apparent at later stages (passage 50). Consistent with maintaining the endothelium phenotype, clone BVE-E6E7-1 proliferated in response to increasing concentrations of the specific endothelial cell mitogen VEGF (Fig. 7). The clone showed a higher proliferative response than wild-type cells, as it reached maximal growth at a lower VEGF concentration (5 ng/ml) and maintained this growth at the highest VEGF concentration (100 ng/ml).

The potential use of BUVEC cell lines to study the action of factors that regulate angiogenesis was investigated by assessing their response to the anti-angiogenic, 16-kDa fragment of prolactin, 16K Prolactin inhibited in a dose-dependent fashion the proliferation induced by VEGF of clone BVE-E6E7-1 and of untransfected BUVEC (Fig. 8A). In both cell types, the VEGF-induced proliferation was significantly reduced by two concentrations of 16K prolactin. Moreover, both the BVE-E6E7-1 clone and wild-type cells express prolactin mRNA (Fig. 8B). RT-PCR amplification with three primer sets having annealing sites within exons 2 to 5 of the bovine PRL gene, yielded products in BVE-E6E7-1 (lanes 4–6) that were indistinguishable in size from those amplified from BUVEC cDNA (lanes 1–3) and the cloned bovine prolactin cDNA (lanes 7–9). No signal was detected in the absence of reverse transcriptase (lane 11) nor in the negative control without RNA (lane 10).

Finally, more than one hundred cells of each the immortalized and the wild-type cells were investigated for genomic instability by quantifying abnormal centrosome numbers. Cells with  $n > 2$  centrosomes were 8.8% and 5.8% in BVE-E6E7-1 and BUVEC, respectively. Thus, there was only a small variation (3%) in centrosome numbers between the two

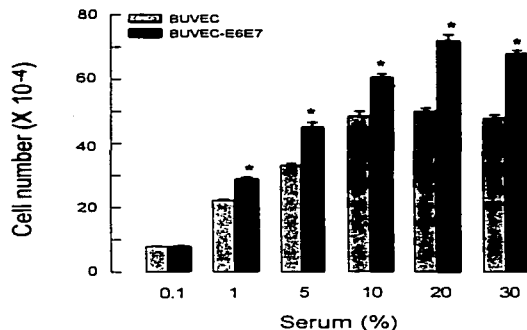


Fig. 5. Dose-dependent stimulation of the proliferation of BUVEC (passage 6) and BUVEC-E6E7 (passage 32) with increasing concentrations of serum. Values are cell number per well and represent the mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations. \*  $p < 0.05$  versus untransfected BUVEC.

cellular populations. Likewise, metaphase spread analysis showed a small difference in the chromosome number between the wild-type and the immortalized cultures. Thus, compared to the reported 60 chromosomes of *Bos taurus* (Riggs et al., 1997), an average of 59.8 chromosomes were found in wild-type cells at passage 9, and 59.6 chromosomes in the BVE-E6E7 clone at passage 34.

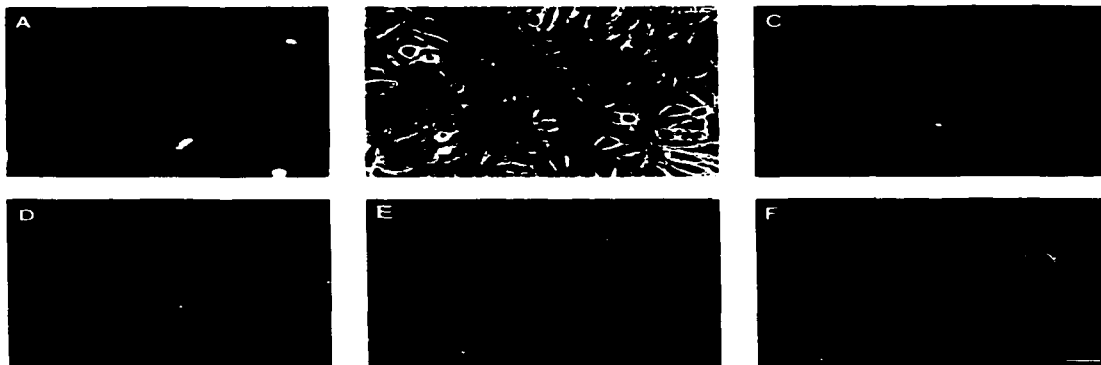
## Discussion

The vasculature is one of the first systems to function during vertebrate development, and the establishment of a network of blood vessels is absolutely essential for embryonic survival and growth. Likewise, angiogenesis, or formation of new blood vessels from pre-existing ones, occurs during uterine cycling, placental growth, wound healing, inflammatory responses, and tumor neovascularization. Moreover, vascular endothelium plays a key role in vascular homeostasis as it has the ability to produce various vasoactive mediators that regulate platelet, leukocyte and smooth muscle cell functions.

The study of the cellular and molecular mechanisms whereby endocrine and autocrine/paracrine factors affect endothelial



Fig. 4. Morphology of untransfected (A, B) and transfected E6E7 (C) BUVEC after passage 6 (A) or passage 21 (B, C). Scale bar: 67  $\mu$ m.



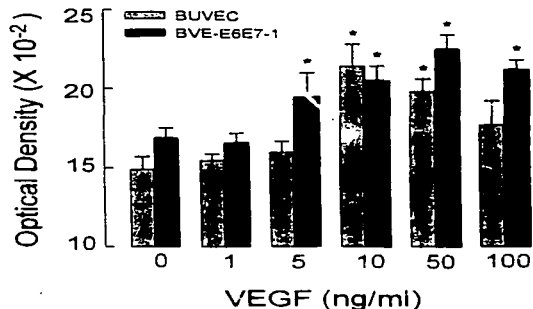
**Fig. 6.** Characterization of BVE-E6E7-1 (passage 35) by phase-contrast and fluorescence microscopy. Clone BVE-E6E7-1 cells show immunostaining for E7 oncoprotein (A) and the endothelial marker, von Willebrand protein (C). They form monolayers (B), incorporate

fluorescent, acetylated low density lipoprotein (D) and react with fluorescent endothelial cell-specific BSI (E) and UEA-I (F) lectins. Scale bar: 38  $\mu$ m for A, E and F; and 67  $\mu$ m for B, C and D. Similar results were obtained with the other three BVE-E6E7 clones.

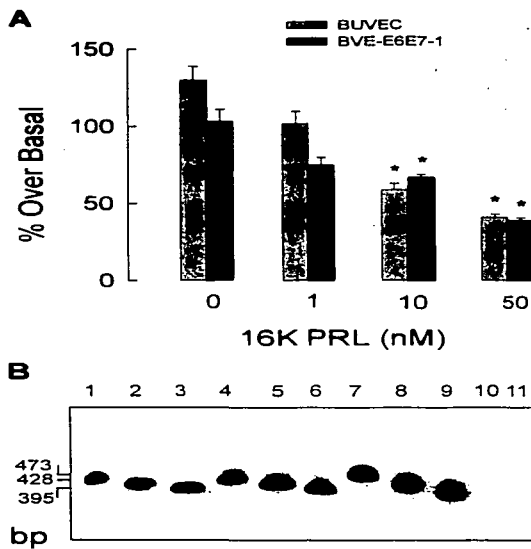
cell functions has been hampered by the lack of endothelial cell lines that retain a differentiated phenotype. Normal primary endothelial cells are not ideal for long-term studies because they undergo some de-differentiation in culture (e.g., loss of growth factor/cytokine responsiveness) and have an inherently short replicative life span before senescence (Mischeck et al., 1989; Meyer et al., 1990). Moreover, not all vascular endothelial cells are alike. Endothelial cells residing in various anatomical locations are endowed with a unique repertoire of gene products and cellular mechanisms which enable them to

perform their basic "task" in a selective, tissue-specific manner (Augustin et al., 1994; Lelkes et al., 1996). For example, basic fibroblast growth factor enhances tissue-type plasminogen activator production in aortic endothelial cells while suppressing it in venous endothelium (Yamamoto et al., 1994). Also, there are differences in the types and amounts of cell adhesion molecules expressed by microvascular and large-vessel endothelial cells (Sewerlick et al., 1992; Sewerlick and Lawley, 1993). This functional heterogeneity also extends to differences between the adult and the developing fetal vasculature (Davison et al., 1983; Ausprunk et al., 1991; Augustin et al., 1994; Carmeliet, 2000) and between species (Fajardo, 1989). For these reasons, a model endothelial cell line could provide a useful reference point and facilitate the standardization of observations made from studies of endothelial cells from different species or different vascular beds. Likewise, a model endothelial cell line may also overcome some of the difficulties encountered with primary endothelial cell cultures and provide a consistent model system to study endothelial cell function.

The large majority of the studies performed in vitro on vein endothelium have used cells derived from human umbilical veins (HUVEC). These cells are limited in their usefulness because of their long doubling times, their requirements for significant concentrations of serum for growth, and their lot-to-lot variability in functional assays (Jaffe et al., 1973; Maciag et al., 1984; Takahashi et al., 1990; Watson et al., 1995). Several cell lines of HUVEC origin have been reported, ranging from an almost normal phenotype (Faller et al., 1988), to the lack of endothelial-specific functions such as von Willebrand protein expression (Takahashi et al., 1990; Lassalle et al., 1992; Pouchard et al., 1994), to those displaying an entirely transformed phenotype (Takahashi et al., 1990). HUVEC cell lines include one that was spontaneously transformed (Edgell et al., 1983) and others produced by artificial means. The latter were obtained by transfection with cellular (Punchard et al., 1994) or



**Fig. 7.** VEGF-induced proliferation of untransfected cells (BUVEC, passage 7) and clone BVE-E6E7-1 (passage 37). Data are mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations. \*  $p < 0.05$  versus control without VEGF.



**Fig. 8.** **A.** Inhibition of VEGF-stimulated proliferation by increasing concentrations of 16K PRL. BUVEC and BVE-E6E7-1 were treated with 10 ng/ml of VEGF alone or together with different concentrations of 16K PRL. Values are expressed as the percentage of increase in proliferation in the presence of VEGF relative to untreated cells (basal proliferation). Data are mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations. \*  $p < 0.05$  versus respective value without 16K PRL. **B.** Expression of PRL mRNA in BUVEC and BVE-E6E7-1 cells. Southern blot analysis of RT-PCR products amplified with three combinations of PRL primers. Similar PCR products were amplified from wild-type BUVEC (lanes 1–3), BVE-E6E7-1 cells (lanes 4–6) and from PRL cDNA (lanes 7–9). Negative controls were omission of BUVEC RNA (lane 10) and BVE-E6E7-1 RNA without reverse transcriptase (lane 11). BUVEC and BVE-E6E7-1 were used at passages 7 and 37, respectively.

viral oncogenes (SV40 large T-antigen (Lassalle et al., 1992), v-ras and v-mos (Faller et al., 1988), or HPV16 oncoproteins (Punchard et al., 1994)) or by fusion with the human lung carcinoma cell line A549 (Edgell et al., 1983). To our knowledge, immortalized umbilical vein endothelial cell lines have not been described for non-human species. Here we report the generation of an immortalized bovine umbilical vein endothelial cell line that retains characteristics of differentiated vascular endothelium.

Multiple studies have shown that expression of the E6E7 early region from HPV16 efficiently immortalizes various cell types including fibroblasts (Shiga et al., 1997), epithelial cells (Coursen et al., 1997), keratinocytes (Munger et al., 1989), smooth muscle cells (Lochmuller et al., 1999), and porcine brain endothelial cells (Teifel and Friedel, 1996). Consistent

with these findings, bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) transfected with the HPV16 E6E7 expression vector were successfully immortalized since they have been maintained well beyond the normal life span of the primary culture and display a high proliferation rate with no signs of senescence.

The principal mechanisms by which expression of E6E7 oncoproteins are thought to elicit immortalization have been proposed for some time. It has been shown that the E6 protein binds p53 protein and hastens its destruction, while the E7 protein binds to the retinoblastoma gene product (Rb) and inactivates it (Dyson et al., 1989; Jones et al., 1999). The blocking of p53 and Rb, which act as tumor suppressors by controlling cell proliferation, results in cell immortalization. Although these findings are consistent with a critical role of E6E7 proteins in carcinogenesis, HPV-E6E7 immortalized cell lines are not completely transformed. They are incapable of anchorage-independent growth, are not tumorigenic in nude mice, and may retain the stable phenotypes of their cell type origin (Tsao et al., 1995; Teifel and Friedel, 1996; Fichorova et al., 1997). Thus, transfection with HPV-16 E6E7 is a useful method to generate cell lines that retain characteristics of their differentiated primary cell counterparts.

Consistent with the above, BUVEC-E6E7 showed serum-dependent growth equivalent to normal BUVEC. Likewise, the four isolated BVE-E6E7 clones conserved the endothelial cell phenotype as defined by commonly accepted criteria (Gerritsen et al., 1988). They express the von Willebrand factor, take up acetylated LDL, and stain positive with the endothelial cell-specific lectins UEA-1 and BSI. Furthermore, clone BVE-E6E7-1 responds to the specific endothelial cell mitogen, VEGF. Therefore, BUVEC E6E7 clones remain phenotypically similar to early-passage untransfected cells. Nevertheless, cells immortalized by E6 and E7 oncogenes may present a loss of genomic integrity (Duensing et al., 2000). Alterations in centrosome and chromosome numbers were detected between BVE-E6E7-1 and untransfected BUVEC. However, these alterations are small when considering the advantages conferred by the increase in the life span of the immortalized cells versus wild-type cultures.

The ability of BUVEC cell lines to retain a differentiated phenotype is in contrast to findings using HUVEC immortalized by transfection with HPV16 DNA (Punchard et al., 1994). The latter have a HUVEC-like morphology and are positive for von Willebrand Factor and UEA-1 lectin binding at early passages. As passages continue, however, HPV16-transfected HUVEC cultures showed an increased number of giant cells, a change from the cobblestone appearance and a gradual loss of von Willebrand protein (Punchard et al., 1994). Although these changes may involve clonal differences within the mass culture of transfected HUVEC, they may also reflect a loss of endothelial cell characteristics. In this regard, the ability of BUVEC to retain endothelial characteristics upon transfection with HPV16 oncoproteins may reflect species-related differences. Our results show that BUVEC have less fastidious exogenous growth requirements than HUVEC. In contrast to HUVEC (Jaffe et al., 1973; Maciag et al., 1984; Watson et al., 1995), BUVEC cultures showed no additional need of growth factors, cofactors (heparin, ascorbic acid) or a special culture substrate (fibronectin and gelatin). Moreover, BUVEC displayed a population doubling time of 24 h in contrast with the 92 h reported for HUVEC (Jaffe et al., 1973; Takahashi et al., 1990). Parallel transfection of HUVEC and BUVEC with the

same vectors in future experiments should help strengthen these conclusions.

The utility of BUVEC cell lines as a tool to study the action of factors that regulate angiogenesis is substantiated by their ability to express and respond to prolactin molecules. Prolactin is a pleiotropic hormone and cytokine with functions that range from reproduction and osmoregulation to immunomodulation and angiogenesis (Bole-Feysot et al., 1998; Corbacho et al., 2001). Prolactin can be proteolytically cleaved to 16K prolactin, a fragment with anti-angiogenic properties. 16K Prolactin acts as an inhibitor of angiogenesis *in vivo* (Dueñas et al., 1999) and *in vitro* (Clapp et al., 1993) inhibiting endothelial cell proliferation (Clapp et al., 1993), and stimulating type 1 plasminogen activator inhibitor expression (Lee et al., 1998) and apoptosis (Martini et al., 2000). Moreover, endothelial cells from different vessels and species express the prolactin gene and synthesize prolactin and 16K prolactin (Clapp et al., 1998; Corbacho et al., 2000; Ochoa et al., 2001). We found that the BVE-E6E7-1 cells, like their wild-type counterparts, express prolactin mRNA and respond to anti-angiogenic 16K prolactin. Thus these cells may help establish the role of prolactin proteins in the regulation of angiogenesis.

In summary, we have generated BUVEC cell lines that retain features of vascular endothelium, and their use may provide novel insights into the mechanisms governing endothelial cell heterogeneity and function.

**Acknowledgments.** We gratefully acknowledge F. López-Barrera, G. Nava, P. Galarraga, and C. Mejía for their expert technical assistance. We are also grateful to D. D. Pless for editing the manuscript. This work was supported by grants from the Howard Hughes Medical Institute (58000985), the National Council of Science and Technology (CONACYT 27980-N) and National University of Mexico (IN226799).

## References

- Aital, J., Cajero-Juarez, M., Houdebine, L.-M. (1995): A simple method of DNA extraction from whole tissues and blood using glass powder for detection of transgenic animals by PCR. *Transgenic Research* **4**, 149-150.
- Augustin, H. G., Kozian, D. H., Johnson, R. C. (1994): Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays* **16**, 901-906.
- Ausfrunk, D., Dethlefsen, S. M., Higgins, E. R. (1991): Distribution of fibronectin, laminin and type IV collagen during development of blood vessels in the chick chorioallantoic membrane. In: R. N. Feinberg, G. K. Sherer, R. Auerbach (eds.): *The Development of the Vascular System*. Karger, Basel, Vol. 14, pp. 93-108.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P. A. (1998): Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Rev.* **19**, 225-268.
- Carley, W., Niedbala, M., Gerritsen, M. (1992): Isolation, cultivation, and partial characterization of microvascular endothelium derived from human lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **7**, 620-630.
- Carmeliet, P. (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med.* **6**, 389-395.
- Clapp, C. (1987): Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat. characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* **121**, 2055-2064.
- Clapp, C., Martini, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delrue, F., Weiner, R. I. (1993): The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**, 1297-1299.
- Clapp, C., López-Gómez, F., Nava, G., Corbacho, A. M., Torner, L., Macotela, Y., Dueñas, Z., Ochoa, A., Noris, G., Acosta, E., Garay, E., Martínez de la Escalera, G. (1998): Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J. Endocrinol.* **158**, 137-144.
- Corbacho, A. M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Dueñas, Z., Noris, G., Morales, M. A., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (2000): Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J. Endocrinol.* **166**, 53-62.
- Corbacho, A. M., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (2001). Angiogenesis: Actions of prolactin and of other members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family. *J. Endocrinol.* In press.
- Coursen, J. D., Bennett, W. P., Gollahon, L., Shay, J. W., Harris, C. C. (1997): Genomic instability and telomerase activity in human bronchial epithelial cells during immortalization by human papillomavirus-16 E6 and E7 genes. *Exp. Cell Res.* **235**, 245-253.
- Davison, P. M., Bensch, K., Karasek, M. A. (1983): Isolation and long-term serial cultivation of endothelial cells from the microvessels of the adult human dermis. *In vitro* **19**, 937-945.
- Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S., Gonzalez, S., Crum, C. P., Mungler, K. (2000): The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10002-10007.
- Dueñas, Z., Torner, L., Corbacho, A. M., Ochoa, A., Gutiérrez-Ospina, G., López-Barrera, F., Barrios, F. A., Berger, P., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16 kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 2498-2505.
- Dyson, M., Howley, P. M., Munger, K., Harlow, E. (1989): The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-937.
- Edgell, C. J. S., McDonald, C. C., Graham, J. B. (1983): Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3734-3737.
- Ejajaro, L. F. (1989): The complexity of endothelial cells: A review. *Am. J. Clin. Pathol.* **92**, 241-250.
- Faller, D. V., Kourambas, S., Ginsberg, D., Hannan, R., Collins, T., Weinstein, B. M., Pober, J. S., Tancrède, R. (1988): Immortalization of human endothelial cells by murine arecoma viruses, without morphological transformation. *J. Cell. Physiol.* **134**, 47-56.
- Fichorova, R. N., Rheinwald, J. G., Anderson, D. J. (1997): Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical, and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins. *Biol. Reprod.* **57**, 847-855.
- Gerritsen, M., Carley, W., Millici, A. (1988): Microvascular endothelial cells: isolation, identification, and cultivation. In: K. Maramorosch (ed.): *Advances in cell culture*. Academic Press, New York, Vol. 6, pp. 35-65.
- Gimbrone, M. A., Fareed, C. C. (1976): Transformation of cultured human vascular endothelium by SV40 DNA. *Cell* **9**, 685-693.
- Holthofer, H., Virtanen, I., Karimäki, L., Hormia, M., Linder, E., Miettinen, A. (1982): *Cyclosporin A* lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab. Invest.* **47**, 60-66.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., Minick, C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745-2756.
- Jha, K. K., Banga, S., Palejwala, V., Ozer, H. L. (1998): SV40-mediated immortalization. *Exp. Cell Res.* **245**, 1-7.
- Jones, D. L., Thompson, D. A., Shu-Burgmann, E., Grace, M., Mungler, K. (1999): Expression of the HPV E7 oncoproteins mimics but does not evoke a p53-dependent cellular DNA damage response pathway. *Virology* **258**, 406-414.
- Kanda, T., Watanabe, S., Yoshike, K. (1988): Immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic DNA fragments controlled by the SV40 promoter. *Virology* **165**, 321-325.



- Lassalle, P., LaGrou, C., Delneste, Y., Sanceau, J., Coll, J., Torpier, G., Wietzerbin, J., Stehelin, D., Tonnel, A.-B., Capron, A. (1992): Human endothelial cells transfected by SV40 T antigens: characterization and potential use as a source of normal endothelial factors. *Eur. J. Immunol.* **22**, 425-431.
- Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J., Weiner, R. I. (1998) Inhibition of urokinase activity by the anti-angiogenic factor 16K prolactin: Activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* **139**, 3696-3703.
- Lelkes, P. I., Manolopoulos, V. G., Silverman, M., Zhang, S., Karmiol, S., Unsworth, B. R. (1996): On the possible role of endothelial cell heterogeneity in angiogenesis. In: M. E. Margaoudakis (ed.), *Molecular, Cellular, and Clinical Aspects of Angiogenesis*. NATO ASI Series. Plenum Press, New York, Vol. 285, pp. 1-17.
- Lochmuller, H., Johns, T., Shoubridge, E. A. (1999): Expression of the E6 and E7 genes of human papillomavirus (HPV-16) extends the life span of human myoblasts. *Exp. Cell Res.* **248**, 186-193.
- Macieg, T., Hoover, G. A., Sterman, M. B., Weinstein, R. (1984): Factors which stimulate the growth of human umbilical vein endothelial cells in vitro. In: E. Jaffe (ed.): *Biology of Endothelial Cells*. Martinus Nijhoff Publisher, Boston, pp. 87-96.
- Magee, J. C., Stone, A. F., Oldham, K. T., Guice, K. S. (1994): Isolation, culture and characterization of rat lung microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **267**, 433-441.
- Martini, J. F., Plot, C., Humeau, L. M., Struman, I., Martial, J. A., Weiner, R. I. (2000): The anti-angiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1536-1549.
- Meyer, J., Mischeck, U., Vehl, M., Henzel, K., Galla, H.-J. (1990): Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* **512**, 305-309.
- Mischeck, U., Meyer, J., Galla, H.-J. (1989): Characterization of gamma-glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. *Cell Tissue Res.* **256**, 221-226.
- Munger, K., Phelps, W. C., Bubbs, V., Howley, P. M., Schlegel, R. (1989): The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* **63**, 4417-4421.
- Ochoa, A., Montes de Oca, P., Rivera, J. C., Dueñas, Z., Nava, G., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C. (2001): Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 1639-1645.
- Olsen, E. (1994): Culturing of human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. In: J. E. Cells (ed.): *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, San Diego, Vol. 1, pp. 142-147.
- Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Ouesenberry, P., Doxsey, S. J. (1998): Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* **58**, 3974-3985.
- Punchard, N. A., Jewers, R. J., Sankey, M. D., Watson, D. J., Kell, B., Cason, J., Best, J. M., Thompson, R. P. (1994): Use of viral and cellular oncogenes to immortalize endothelial cells. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 1975.
- Riggs, P. K., Owens, K. E., Rexroad, C. E. 3rd, Amaral, M. E., Womaek, J. E. (1997): Development and initial characterization of a *Bos taurus* x *B. gaurus* interspecific hybrid backcross panel. *J. Heredity* **88**, 373-379.
- Rooney, D. E., Czepulkowski, B. H. (1992): *Human Cytogenetics: A practical approach*. IRL Press New York, Vol. 1, 2nd ed., pp. 54-89.
- Seabright, M. (1971): A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **2**, 971-972.
- Sewerlick, R. A., Lee, K. H., Wick, T. M., Lawley, T. J. (1992): Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J. Immunol.* **148**, 78-83.
- Sewerlick, R. A., Lawley, T. J. (1993): Role of microvascular endothelial cells in inflammation. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 111S-115S.
- Shiga, T., Shirasawa, H., Shimizu, K., Dezewa, M., Masuda, Y., Simizu, B. (1997): Normal human fibroblast immortalized by introduction of human papillomavirus type 16 (HPV-16) E6-E7 genes. *Microbiol. Immunol.* **41**, 313-319.
- Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J.-I., Mukay, K., Goto, T. (1990): Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **25**, 265-274.
- Teifel, M., Friedel, P. (1996): Establishment of the permanent microvascular endothelial cell line PBNIEC/C1-2 from porcine brains. *Exp. Cell Res.* **228**, 50-57.
- Tsao, S. W., Mok, S. C., Fey, E. G., Fletcher, J. A., Wan, T. S. K., Chew, E. C., Muto, M. G., Knapp, R. C., Berkowitz, R. S. (1995): Characterization of human ovarian epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs). *Exp. Cell Res.* **218**, 499-507.
- Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E., Zetter, B. R. (1984): Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* **99**, 2034-2040.
- Watson, C. A., Camera-Benson, L., Palmer-Crocker, R., Pober, J. S. (1995): Variability among human umbilical vein endothelial cultures. *Science* **268**, 447-448.
- Yamamoto, C., Kaji, T., Furuya, M., Sakamoto, M., Kozuka, H., Koizumi, F. (1994): Basic fibroblast growth factor suppresses tissue plasminogen activator released from cultured human umbilical vein endothelial cells but enhances that from cultured human aortic endothelial cells. *Thromb. Res.* **73**, 255-263.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN