



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR

**“El inhibidor de la convertasa furina, alfa-1- PDX, disminuye  
la proliferación de las células U937”  
Que para obtener el título de Licenciado en Biomedicina**

**TESIS PROFESIONAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA EN BIOMEDICINA**

PRESENTA

**Blanca Silvana Barreda Balbuena**

**DIRECTORA DE TESIS**

Dra. María Rosa Padrós Semorile.

**ASESOR METODOLÓGICO**

Mtra. Cenobia Silvia Durán  
González

**Puebla, Pue., 2016**

## AGRADECIMIENTOS

Le quiero agradecer a todas aquellas personas que me han brindado su apoyo y me han impulsado a seguir adelante, en esta sección les dedico con todo mi corazón algunas palabras.

A la Dra. María Rosa por haberme brindado la oportunidad de formar parte del laboratorio de Bioquímica Celular y emprender este camino en la investigación y la ciencia, por su gran paciencia, tiempo, facilidades brindadas, apoyo y por todas las enseñanzas que me llevo con respeto, cariño y admiración.

A Silvia por todo su apoyo en el laboratorio y los experimentos, por su ayuda para que realizara un trabajo de calidad, porque me contagiaba su alegría y sus ánimos, así como por las pláticas tan interesantes, llenas de aprendizaje y risas.

A mis padres Blanca y Ernesto que siempre han sido mi apoyo e impulso, porque siempre han creído en mí y no me han dejado caer, porque con su ejemplo he aprendido que con esfuerzo y sinceridad se pueden alcanzar grandes logros en la vida, porque gracias al amor, respeto y cariño incondicional que me dan, tengo la confianza de seguir adelante y aunque apenas comienzo este camino espero que estén orgullosos de mí, ya que lo que soy es en buena parte por ustedes. A ti papá por tu fortaleza y por ser mi guía y a ti mamá por tus cariños y alegría, y porque me impulsas a ser siempre una mejor persona, los amo.

A mis hermanitos Moni, Netito y Roy quienes siempre me llenan de ánimos y entusiasmo, porque siempre me han cuidado y apoyado más bien como unos padres y están dispuestos a socorrerme en cualquier ocasión, por todos los momentos juntos, por los “miércoles en familia”, así como el enseñarme que la verdadera riqueza está en ayudar a los demás, por ser un ejemplo para mí, los adoro.

A mis mejores amigas Sofía por ser tan excelente amiga y haberme acompañado todo este tiempo, porque el haber crecido juntas y estar lado a lado en todas las experiencias y decisiones importantes que hemos tomado en la vida ha sido una gran experiencia; Rosario “Cha” porque hiciste de mi estancia en Biome, un lugar menos estresante o a veces aburrido, porque a pesar de la diferencia de opiniones e intereses, siempre reímos juntas y fuiste mi persona favorita en esa gran experiencia de la universidad; y a Lauris que en tan poco tiempo se ha vuelto para mí una persona difícil de olvidar y muy fácil de querer, por enseñarme, comprenderme, apoyarme y alentarme en todo momento. A ellas, únicas y especiales, porque sin importar la distancia sé que en todo momento estamos y estaremos unidas y que aún nos faltan muchas más cosas que disfrutar y vivir.

A mis compañeros de laboratorio, de generación “Biomé 2009” y a mis profesores, ya que todos formaron parte importante en mi experiencia y mi vida, aprendí de cada uno como persona y académicamente, por la convivencia y momentos agradables e incluso por aquellos momentos que pasamos juntos, de estrés o nostalgia pero que siempre recordaré con una sonrisa en el rostro.

A mis amigos Alex, Moya, Chava y Alba, que estuvieron pendientes en todo momento de como progresaba mi tesis y que desde que los conocí han sido fuente de interminables risas, de momentos grandiosos y siempre me han apoyado y alentado a seguir adelante. Los quiero chamacos.

A mi “nueva familia” en especial a mi Suegra, la Abuela, Vicki, Porfirio, Tania y Vieho; quienes me han recibido con gran cariño y estoy agradecida de conocerlos, así como agradezco el apoyo incondicional en distintos momentos de mi vida, los quiero.

Y por último pero nunca menos importante a Rodolfo, mi compañero de vida, que aunque no estuvo durante aquellas clases de locura, maratones de estudio o exámenes casi mortales, siento que llegó a mi vida en el mejor y más indicado momento... la preparación de mi tesis, él observó mi frustración al no obtener resultados esperados en los experimentos y mi inundación de alegría al obtener frutos o consumir este proyecto, siempre fue solidario y empático conmigo, me apoyó total e incondicionalmente en todos los ámbitos, luchó hombro a hombro conmigo y espero que él también se encuentre orgulloso de este triunfo para mí pues también lo es para él ya que ha sido mi motor, mi soporte y guía; gracias por creer en mí, TE AMO.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN .....	3
ANTECEDENTES .....	5
Antecedentes generales .....	5
La familia de las proproteín convertasas .....	5
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS .....	8
Furina.....	8
Organización del gen de Furina.....	9
Estructura de furina .....	9
Autoproteólisis y Localización intracelular de Furina .....	10
Expresión de furina durante el desarrollo. ....	15
Furina en el cáncer.....	16
TGF-beta 1 .....	17
Receptor de IGF-1 .....	19
Inhibidores de furina .....	20
Cepa U937 .....	23
JUSTIFICACIÓN .....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
HIPÓTESIS CIENTÍFICA .....	25
OBJETIVOS .....	25
Objetivo General.....	25
Objetivos Particulares .....	25
ESQUEMA DE TRABAJO .....	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
Análisis de datos.....	33
RESULTADOS .....	34
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES .....	44
REFERENCIAS .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.a	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína cinasa B
Arg	Arginina
ARNm	Ácido ribonucléico mensaje
Ca <sup>2+</sup>	Ión Calcio
CIM	Chaperona Intramolecular
Cys	Cisteína
ERGIC	Compartimento intermediario ER- GOLGI
FCN-β	Factor de crecimiento β nervioso
FES	Oncogén de sarcoma de Felino
FUR	Gen de Furina
Glu	Glutamato
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleucina
IRS-1	Sustrato 1 del receptor de insulina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
ki	Constante de disociación
Lys	Lisina
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
Mn	Manganeso

NH <sub>2</sub>	Radical amino
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
PC	Proprotein Convertasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pH	Potencial de hidrógeno
PMH4	Proteína morfogénica de hueso 4
Pro	Prolina
RE	Retículo endoplásmico
Ser	Serina
TGF	Factor transformante del crecimiento
TGN	Red Trans-Golgi
Thr	Treonina
TNF	Factor de necrosis tumoral
Val	Valina
Zn	Zinc
μM	Micromolar
g	Gramos
G	Gravedades
L	Litro
NaCl	Cloruro de Sodio
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBS	Buffer Tris salino
TEMED	Tetrametiletilendiamina

## RESUMEN

Diversas proteínas, incluyendo proteínas virales, hormonas, factores de crecimiento y receptores, son sintetizados como precursores inactivos, que deben ser procesados proteolíticamente para ser biológicamente activos. La activación proteolítica de estas proteínas se lleva a cabo por las proteínas convertasas, (PC). Este es un mecanismo importante para la generación de péptidos bioactivos como la activación de diversas enzimas y factores de crecimiento que están implicados en muchos eventos fisiológicos importantes.

Furina es la PC mejor caracterizada, es una serin-proteasa dependiente de  $Ca^{+2}$ , que ejerce su función dentro de la vía secretoria constitutiva y participa en un ciclaje dinámico entre el TGN, la membrana celular y los endosomas. Se encuentra de forma ubicua, capaz de procesar a un gran número de sustratos y se ha visto que tiene funciones esenciales en la embriogénesis y la homeostasis, pero también está implicada en diversas patologías como en la neurodegeneración, varias enfermedades causadas tanto por bacterias como por virus e incluso en el cáncer. Por lo que esta proteína es una probable molécula diana para aplicaciones terapéuticas

Previos estudios han revelado que la inhibición de la expresión de furina genera cambios en el procesamiento de distintos sustratos que activan la proliferación celular, siendo de gran interés para nosotros en este proyecto, los involucrados en el cáncer.

En el presente trabajo de Tesis se investigó el papel del inhibidor específico de furina, alfa1-PDX, en una línea celular de leucemia monocítica de origen humano: U937. Para lograr dicho objetivo se realizaron transfecciones transitorias en cultivos de la línea celular U937, con el inhibidor específico alfa-1 PDX, se empleó el plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen) con el inserto del cDNA que codifica para el inhibidor  $\alpha$ 1-PDX, el mismo plásmido pcDNA3.1 sin inserto como control de la transfección y las células silvestres sin transfectar. Analizamos el efecto del mismo sobre la proliferación celular, mediante el ensayo de MTT. Los resultados

obtenidos muestran que la inhibición catalítica de la enzima furina, disminuye significativamente la proliferación celular de la línea U937.

Posteriormente para evaluar la expresión de las proteínas de interés, sustratos de furina que activan la proliferación celular, se utilizó la metodología de western blot, utilizando geles SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes acoplada al revelado con anticuerpos específicos para el IGF1-R y TGF- $\beta$ 1 y la proteína actina que se utilizó como control interno.

Los resultados que obtuvimos en el laboratorio confirmaron que la inhibición de furina alteró el procesamiento normal del TGF- $\beta$ 1 y del receptor de IGF1 principalmente en su forma madura, observando una disminución en los niveles de ambos sustratos al ser analizados mediante western blot.

# INTRODUCCION

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Antecedentes Generales

La idea de que las hormonas peptídicas y proteínas se sintetizan originalmente de grandes precursores inactivos fue reconocida en la década de 1960, pero las enzimas que escinden estos precursores para generar especies bioactivas resultó difícil de alcanzar hasta las siguientes décadas. Desde entonces, muchos estudios concentraron esfuerzos en la identificación de las enzimas que median no sólo la escisión de los precursores sino también modificaciones postraduccionales adicionales, tales como la sulfatación, glicosilación y fosforilación, que a menudo se requieren para su bioactividad.

Diversos péptidos necesitan de esta serie de transformaciones, como lo son las hormonas peptídicas, los factores de diferenciación, los receptores, los neuropéptidos, los factores de crecimiento, las enzimas, las moléculas de adhesión, factores de coagulación sanguínea, proteínas plasmáticas, toxinas bacterianas y glicoproteínas de superficie virales. Posteriormente se descubrió que existe una familia de enzimas específicas que se encargan de dicho procesamiento: Las proproteín convertasas (Seidah and Chretien 1999; Taylor, Van De Ven et al. 2003; Khatib 2006; Scamuffa, Calvo et al. 2006; Soria-Valles, López-Otin et al. 2012).

### LA FAMILIA DE LAS PROPROTEÍN CONVERTASAS

Las proproteín convertasas de mamíferos constituyen una familia de nueve serin proteasas secretoras, que están relacionadas con la subtilisina bacteriana y la Kexina en levaduras. Siete de ellos Furina, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 y PC7, son proteasas específicas que activan proteínas precursoras celulares actuando en aminoácidos básicos individuales o en pares, mientras que la SKI-1/S1P (subtilisin/kexin-like isozyme-1) y NARC-1/PCSK9 (neural apoptosis-

regulated convertase-1) las cuales prefieren actuar en residuos hidrofóbicos y ácidos, respectivamente (Seidah and Chretien 1999; Scamuffa, Calvo et al. 2006; Morash, MacDonald et al. 2009).

Se observó que la familia de las proproteín convertasas corresponde a enzimas dependientes de pH e iones  $\text{Ca}^{2+}$  y cuyo motivo general de reconocimiento de sus sustratos es: (K/R)-(X)<sub>n</sub>-(K/R)<sub>2</sub>, donde K es Lys, R es Arg, X cualquier aminoácido excepto Cys y n es 0, 2, 4, o 6. En su lugar SKI-1 reconoce el motivo (R/K)-X-(L, I, V)-Z<sub>2</sub>, donde Z es cualquier aminoácido excepto Cys, Pro, Glu y Val; y por último PCSK9 quien escinde su prosegmento de manera autocatalítica en el motivo VFAQ<sub>2</sub>SIP (Scamuffa, Calvo et al. 2006; Seidah 2011).

Aunque cada una de las PCs tiene características particulares, en su estructura terciaria comparten los dominios descritos a continuación como se observan esquematizados en la Figura 1.

Un **péptido señal** en el extremo N-terminal, el cual direcciona la proteína co-traduccionalmente hacia el retículo endoplásmico para ingresar así en la vía secretora.

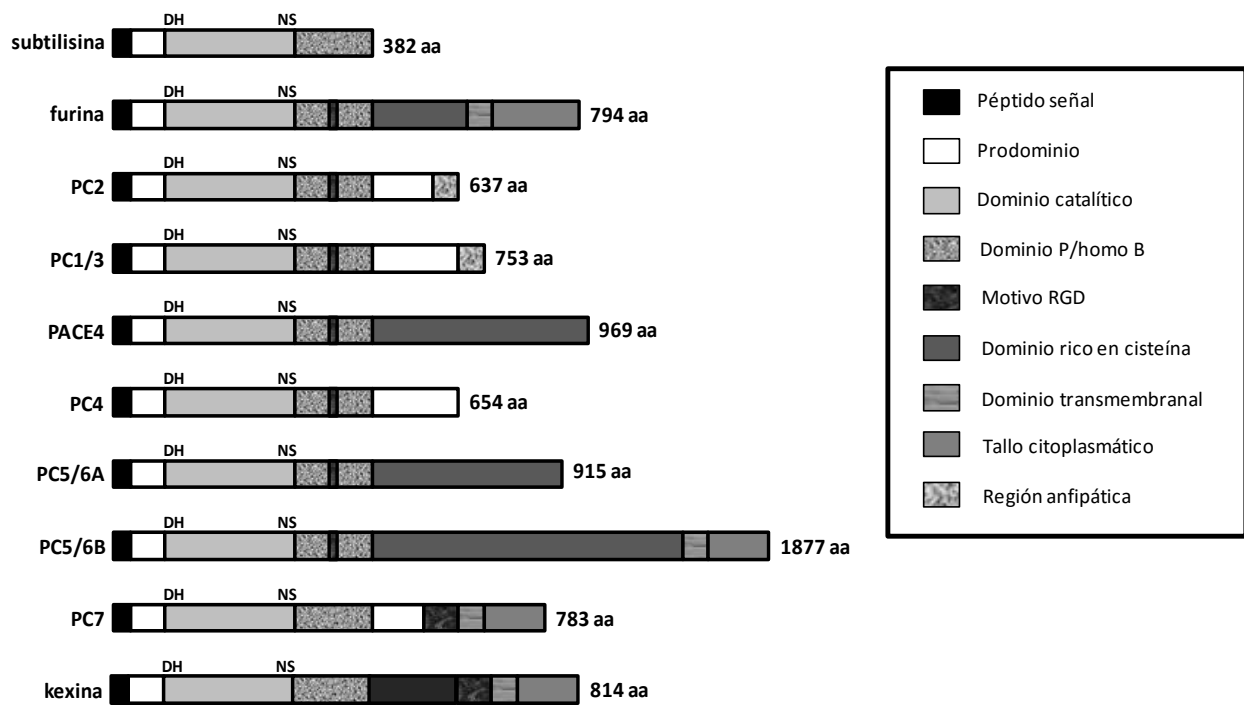
Un **prodominio**, el cual es auto-procesado en posición cis por la propia PC (con excepción de la enzima PC2), pero permanece unido al sitio activo hasta alcanzar el compartimento intercelular de destino, donde se separa de la enzima. Esto significa que el prodominio actúa entonces como una chaperona intramolecular (ó inhibidor competitivo) que facilita el transporte, plegamiento y control de la actividad enzimática. Normalmente tiene una extensión de 80-90 aminoácidos en donde el sitio consenso de rompimiento es arginina-X-lisina/arginina-arginina (R-X-K/R-R) (Khatib 2006; Dillon, Williamson et al. 2012).

Un **dominio catalítico**, el cual contiene el sitio activo que presenta la tríada catalítica de los aminoácidos aspartato D, histidina H y serina S. Además contiene un residuo conservado de cisteína C localizado a cuatro aminoácidos de distancia dirección C-terminal del residuo H, lo cual constituye un grupo tiol libre que les confiere sensibilidad a cationes divalentes como  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$ . Contiene además un

residuo de asparagina N en un agujero oxianión para estabilizar (a través de su grupo NH<sub>2</sub>) la carga negativa generada en el enlace peptídico, como resultado del ataque nucleofílico (hidrólisis) proveniente de la serina de la triada. Es el dominio más conservado de la familia, manteniendo una homología del 35% entre todos los miembros, donde PACE4 y PC5 son las enzimas más parecidas (74% de homología) y PC2 es la que contiene la secuencia aminoacídica menos común (Taylor, et al, 2003). Se conforma de 240 aminoácidos, aproximadamente.

Un **dominio P** (Homo B), que con su conformación tridimensional en forma de barril le confiere estabilidad y cohesión estructural, además de la dependencia al pH y a los iones Ca<sup>+2</sup>. Dentro de este dominio se encuentra una estructura pentapeptídica RRGD<sub>L</sub> (arginina-arginina-glicina-asparagina-leucina) que contiene la secuencia RGD, la cual puede interactuar con las proteínas del tipo de las integrinas. Tiene una extensión promedio de 150 aminoácidos (Hoshino and Lindberg 2012).

**Figura1. Estructura general de las enzimas PCs**(Modificado de "Bruzzaniti , Mains, 2002").



Un **dominio C-terminal**, que es el más variable de todos los dominios de la familia, ya que presentan secuencias de unión a membrana, regiones ricas en cisteína (FURINA, PACE4, PC5/PC6a y PC5/PC6b), regiones ricas en serina y treonina (PC7), señales de localización intracelular, grupos funcionales de interacción iónica, dominios transmembranales (FURINA, PC5/PC6b y PC7), dominios citoplasmáticos (FURINA, PC5/PC6b y PC7), así como regiones anfipáticas (PC1 y PC2) (Hoshino and Lindberg 2012).

## **1.2 Antecedentes específicos**

### **FURINA**

Furina, es una endoproteasa celular, y fue una de las primeras proproteín convertasas en ser identificada en el año de 1990. Ha sido ampliamente estudiada y activa proteolíticamente a un gran número de sustratos en la vía de secreción constitutiva. Se ha demostrado que se expresa en todos los tejidos y líneas celulares examinadas, se localiza principalmente en la red trans-Golgi y en la membrana plasmática. Se conoce también que ocurre un tráfico intracelular de esta enzima anclada a las membranas, el cual incluye ciclos de reciclaje desde y hacia la membrana plasmática,-endosomas-TGN, y probablemente por los cuerpos multivesiculares (MVCs) (Griffiths G , Simons K, 1986; Wan L, et al. 1998; Molloy SS, Anderson ED, et al. 1999; Gu F, et al. 2001).

Además de la activación de agentes patógenos, furina tiene un papel esencial en la embriogénesis, y cataliza la maduración de una sorprendentemente variada colección de sustratos proteicos. Estos abarcan desde los factores de crecimiento y receptores hasta proteínas de la matriz extracelular típicamente en los sitios marcados por la secuencia consenso Arg-Xaa- (Lys/Arg) Arg; e incluso otros sistemas de proteasas que controlan enfermedades como el ántrax, el cáncer, la gripe aviar e incluso la fiebre de Ébola. (Zhou A, et al. 1999; Jernigan JA, et al. 2001; CDC 2001; CDC 2002).

### ***Organización del gen de furina.***

El gen *FUR* se transcribe a partir de al menos tres promotores distintos; uno es un promotor regulado, mientras que los otros dos tienen las características de los promotores de los genes constitutivos. El análisis de Northern-blot ha revelado que el transcrito principal de ~4,0 kb de furina está presente en todos los tejidos y líneas celulares examinadas. Este gen está situado en estrecha proximidad al miembro de la familia de proproteín convertasa subtilisina / kexina tipo 6 y aguas arriba del oncogén FES. El gen *FUR* está localizado en el cromosoma 15q26.1 y tiene una longitud de 14,803 pb. La secuencia de ADN contiene 16 exones, la longitud del transcrito es de 4,244 pb, que se traducen a una proteína de 794 aminoácidos. (Obtenido de RefSeq, Jan 2014)

### ***Estructura de furina.***

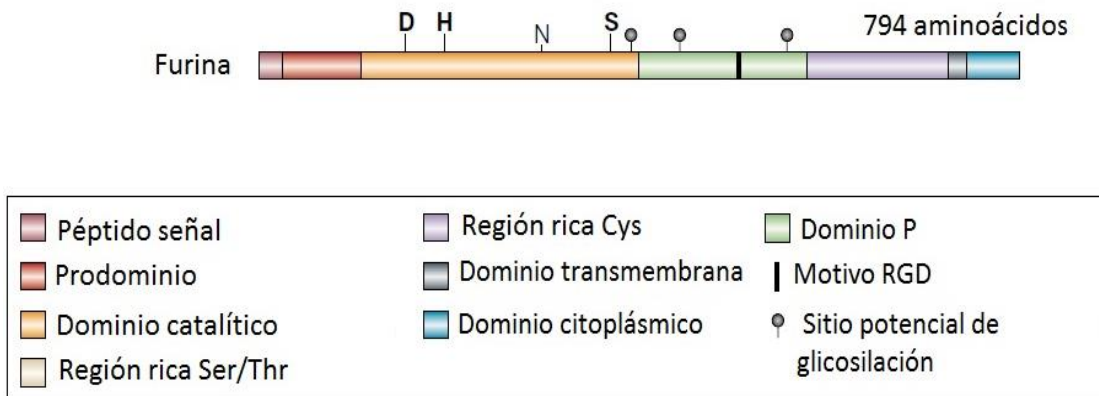
Furina es una proteína transmembranal de tipo I, que consta de 794 aminoácidos y es expresada de forma ubicua ya que se encuentra en todos los vertebrados y muchos invertebrados. Esta proteína se produce como un zimógeno de 104 kDa que se convierte en una forma madura de 98 kDa después de la escisión autocatalítica en dos sitios. El procesamiento de profurina se produce durante la progresión de la enzima desde el retículo endoplásmico a la red trans-Golgi (TGN). (Bergeron F, et al. 2000).

Furina, al igual que el resto de los miembros de la familia de las PC, está constituida por múltiples dominios. Éstos son: el péptido señal, el prodominio, el dominio catalítico que consta de aproximadamente 330 a.a., es altamente conservado entre las convertasas de proproteínas eucarióticas; está formado por Aspartato (Asp), Histidina (His) y Serina (Ser), los cuáles conforman la tríada catalítica; el dominio P con 140 a.a. aproximadamente que es esencial para la actividad enzimática y la modulación de los requerimientos de pH y calcio y un extremo COOH-terminal variable. En este último, se encuentran una región rica en cisteína (RRC), un dominio transmembranal y, finalmente, un dominio citosólico, el cual contiene múltiples señales que controlan la localización y transporte de furina

en la red trans Golgi (TGN), el sistema endosomal y la membrana plasmática. (Seidah N, et al. 1998; Zhou A, et al. 1998; Thacker C, et al. 2000).

Furina es activa en un intervalo amplio de pH óptimo; tiene más del 50% de su actividad enzimática entre pH 5 a 8, dependiendo del sustrato que se está escindiendo. Furina es estrictamente dependiente del calcio, requiere de aproximadamente 1 mM de este ión para su actividad completa. Estudios de modelado basados en la alineación de furina con la estructura de la termitasa bacteriana (una subtilisina bien caracterizada que comparte 29% de identidad de secuencia con el dominio catalítico de la furina), indican que la furina tiene dos sitios de unión a calcio: uno con afinidad media y uno con afinidad alta. (Thomas G. 2002).

**Figura 2. Estructura de Furina** (Modificado de "Thomas G, 2002").



### ***Autoproteólisis y Localización intracelular de Furina.***

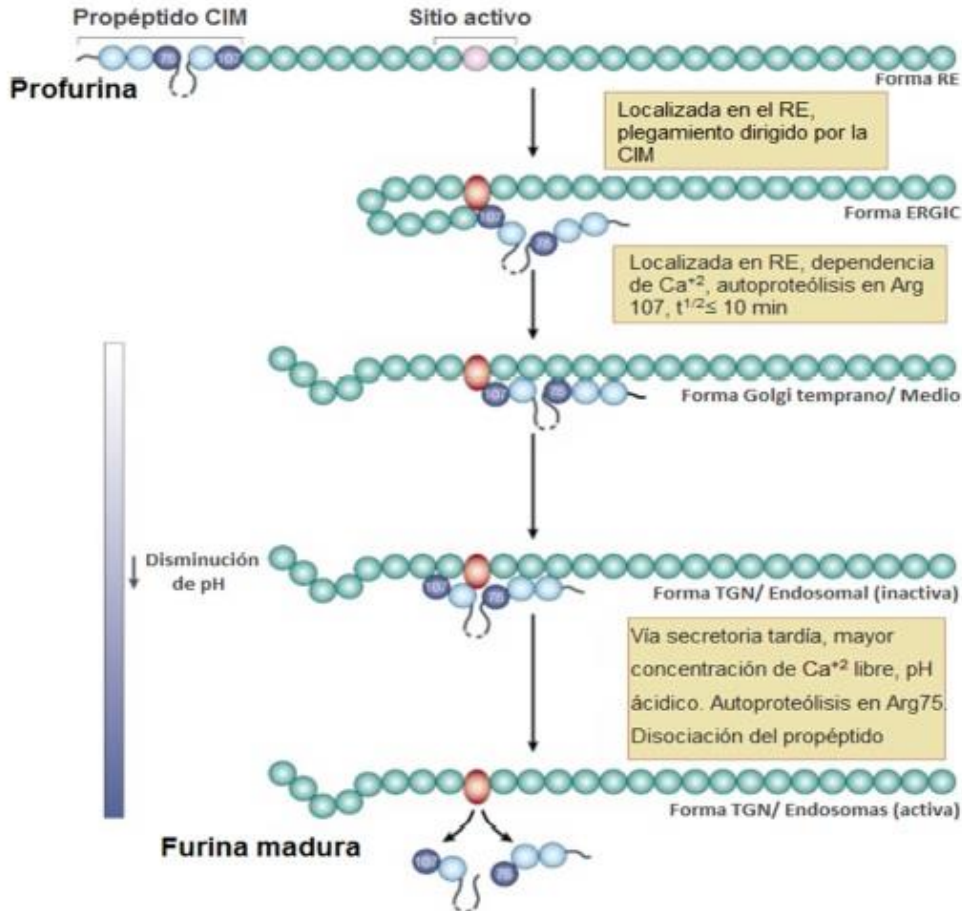
Furina, al igual que una gran cantidad de enzimas proteolíticas, es sintetizada como una proenzima inactiva o zimógeno. Después de que el péptido

señal es removido, el propéptido N-terminal (83 aminoácidos) actúa como una chaperona intramolecular (CIM) que facilita el plegamiento del dominio catalítico inactivo en su conformación activa (Figura 3). Ello ocurre en el retículo endoplásmico (RE), donde por las condiciones de pH neutro, se produce una primera escisión auto-proteolítica muy rápida en el sitio consenso –Arg-Thr-Lys-Arg<sub>107</sub>↓. Este propéptido no es liberado, sino que se asocia con la forma madura de furina funcionando como un autoinhibidor. (Thomas G. 2002; Anderson E, et al. 2002; Seidah N, et al. 2003).

Una vez que el complejo furina-propéptido es transportado a la red trans del Golgi (TGN), las condiciones ácidas (pH 6.6) y de alto contenido de calcio de este compartimento facilitan un segundo corte auto-proteolítico intramolecular del propéptido en la posición –Arg<sub>70</sub>Gly-Val-Thr-Lys-Arg<sub>75</sub>↓. Se produce una rápida disociación del propéptido y por lo tanto, la pérdida de la inhibición de furina. Las concentraciones de 1-2 mM de calcio estimulan la actividad total de la proteasa, pero de 5-10 mM la inhiben. La enzima furina ejerce su actividad en un amplio rango de pH, de 5.0 a 8.0, dependiendo del sustrato que ella procese. (Thomas G. 2002; Anderson E, et al. 2002; Than M, et al. 2005).

El sitio consenso en el cual furina realiza el corte de sus proteínas sustratos, está posicionado después de la Arg carboxilo terminal en la secuencia –Arg-X-Lys/Arg-Arg↓ (donde Lys es lisina, X es cualquier otro aminoácido y ↓ identifica el sitio de corte); aunque también puede procesar sustratos que contengan la secuencia Arg-X-X-Arg↓, la cual representa la secuencia mínima consenso (Hosaka M, et al. 1991; Thomas G, 2002). Es decir que las Arg, en las posiciones P1 y P4 en la molécula sustrato son esenciales para el reconocimiento y el procesamiento por parte de esta enzima (Henrich S, et al. 2003).

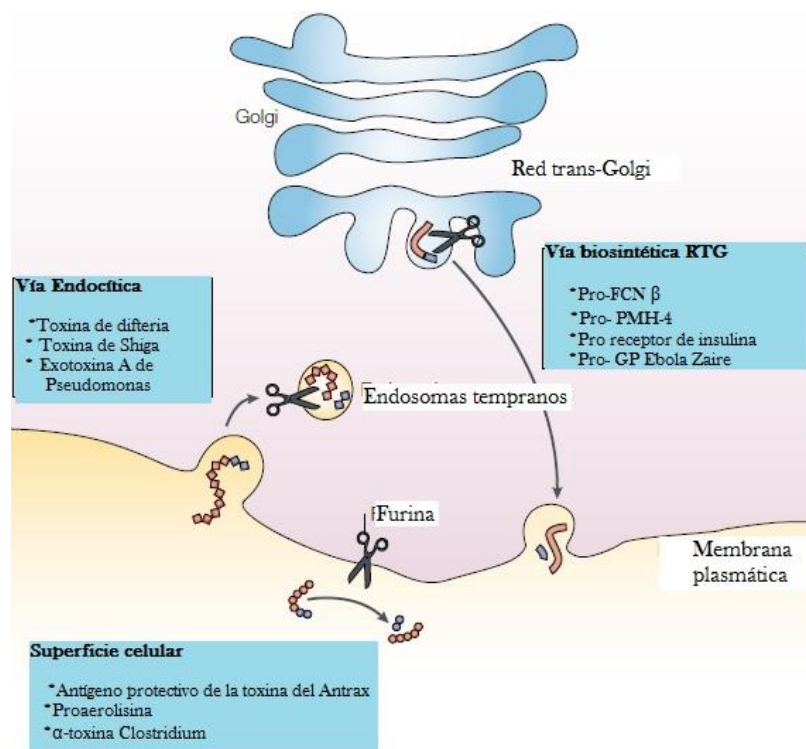
**Figura 3. Esquema de autoactivación de furina** (Modificado de "Thomas G, 2002").



La convertasa furina una vez translocada en el retículo endoplásmico como precursor, transita a través de varios compartimentos celulares fundamentalmente anclada a sus membranas (Figura 4). Estos lugares incluyen el TGN, la superficie celular, endosomas y lisosomas, pudiendo realizar ciclos de reciclaje entre la membrana plasmática – endosomas – TGN. Este complejo tránsito celular es llevado a cabo a través de las señales y motivos localizados en su extremo C- terminal de 56 aminoácidos. Además furina en el TGN, puede sufrir un segundo procesamiento entre sus dominios Homo B y transmembranal, produciendo una forma de la enzima activa soluble con un peso molecular de 85 KDa, capaz de ser secretada al espacio extracelular.

Como furina se encuentra activa en los compartimientos celulares mencionados, puede actuar en cada uno de ellos rompiendo una gran variedad de sustratos como los que se resumen en la figura 4. (Hosaka M, et al. 1991; Vey M, et al. 1994; Schafer W, et al. 1995; Thomas G, 2002).

**Figura 4. Localización intracelular de Furina.** (Modificado de "Thomas G, 2002").



La amplia distribución de Furina madura activa en diferentes tejidos y a su vez en diferentes compartimientos intracelulares, como son: TGN, endosomas, membrana plasmática; permite el procesamiento y activación de una amplia gama de sustratos pro-proteicos en la vía de secreción constitutiva. Ver Tabla 1. Estudios iniciales utilizando co-expresión de furina y de sustratos precursores en líneas celulares cultivadas de mamíferos han demostrado que furina es capaz de escindir los precursores de factor de crecimiento  $\beta$ -nervioso, el

factor de von Willebrand, complemento C3, y la albúmina. (Nakayama 1997; Seidah N, et al. 2012).

**Tabla 1. Sustratos y sitio de corte en dónde actúa furina.** (Modificado y obtenido de Nakayama, 1997; Thomas G, 2002; Seidah N, 2012).

<b>PRECURSORES</b>	<b>SITIO DE CORTE</b>	
<b>Factores de crecimiento y Hormonas</b>	<b>P6 P4 P2P1 ↓ P1'</b>	
Pro -factor de crecimiento $\beta$ nervioso de ratón	RTHRSKR	SS
Pro- factor neurotrófico derivado de cerebro porcino	MSMRVRR	HS
Pro- neurotrofina 3 humana	RTSRRKR	YA
Pro- factor de crecimiento $\beta$ -1 transformante humano	QSSRHRR	AL
Pro- sustancia inhibidora Mülleriana de rata	GRGRAGR	SK
Pro- factor de crecimiento insulínico tipo 1 humano	KPAKSAR	SV
Pro- endotelina 1 humana	RLRRSKR	CS
Pro- péptido relacionado a hormona paratiroidea humano	SLRRLKR	AV
Pro- hormona paratiroidea humana	KSVKKR	SV
<b>Receptores</b>	<b>P6 P4 P2P1 ↓ P1'</b>	
Pro- receptor de insulina humana	RPSRKRR	SL
Pro- receptor de factor de crecimiento hepatocitario humano	TEKRKKR	ST
Pro- proteína de resistencia pulmonar humana	TSNRHRR	QI
Pro- integrina $\alpha$ -3 humana	SPQRRRR	QL
Pro- integrina $\alpha$ -6 humana	HNSRKKR	EI
Pro- receptor de factor de crecimiento insulínico tipo I	RKRRRKR	ST
<b>Proteínas plasmáticas</b>	<b>P6 P4 P2P1 ↓ P1'</b>	
Pro-albúmina humana	RGVFRR	DA
Pro- complemento C3 de rata	PAARRRR	SV
Pro- factor IX humano	ILNRPKR	YN
Pro- factor X humano	TLERRKR	SV
Pro- factor Von- Willebrand humano	LSHRSKR	SL
Pro- proteína C humana	KRSHLKR	DT
<b>Metaloproteinasas de la matriz</b>	<b>P6 P4 P2P1 ↓ P1'</b>	
Estromelisina 3 humana	ARNRQKR	FV
MT- MMP1 humana	ANVRRKR	YA
<b>Glicoproteínas de la envoltura viral</b>	<b>P6 P4 P2P1 ↓ P1''</b>	
Virus de inmunodeficiencia humana gp160	VVQREKR	AV
Glucoproteína B del citomegalovirus humano	THNRTKR	ST
Superantígeno virus 7 de tumor mamario de raton	IENRKRR	ST

Hemaglutinina del virus de la influenza aviar A	SKKREKRR	GL
Virus de sarampión F0	SSRRHKR	FA
Virus de enfermedad de Newcastle F0	GGRRQRR	FI
Virus Sindbis gpE2	SSGRSKR	SV
Virus parainfluenza humana tipo 3 F0	TDPRTKR	FF
<b>Exotoxinas bacterianas</b>	<b>P6 P4 P2P1 ↓ P1'</b>	
Antígeno protector – toxina del Ántrax	SNSRKRR	ST
Toxina de la difteria	AGNRVRR	SV
Exotoxina A de Pseudomonas	TRHRQPR	GW
Toxina de Shiga	HASRVAR	MA
<b>Otras</b>	<b>P6 P4 P2P1 ↓ P1'</b>	
Pro- Furina humana	AKRRTKR	DV
Pro- endopeptidasa de rata 3.4.24.18	QPSRPKR	SV
Pro-7B2 de ratón	GQRRKRR	SV

### ***Expresión de furina durante el desarrollo***

Se ha observado la expresión de furina durante el desarrollo de la rata mediante hibridación *in situ*. En ratas, el ARNm de furina se detectó por primera vez tanto en endodermo como en mesodermo en el día embrionario 7 (E7) en la etapa primitiva de la embriogénesis; y permanece expresado de manera uniforme hasta E10, cuando se observa un nivel claramente superior de expresión en el corazón y el hígado principalmente (Zheng, M., Streck, R. D., et al. 1994; Nakayama 1997).

En etapas media y tardía de la gestación, furina se expresa ampliamente en los tejidos periféricos. El patrón de expresión de furina durante la embriogénesis es distinto de los de otras convertasas de expresión ubicua, PACE4 y PC5 / PC6. Estas observaciones sugieren que furina juega un papel crítico en el procesamiento de diversas proproteínas, tales como precursores de factor de crecimiento, durante el desarrollo. Varios estudios muestran que la expresión de furina está regulada durante el desarrollo y aparece para controlar el crecimiento y la diferenciación de las células, tales como las células de los islotes pancreáticos y de la mucosa gástrica. (Nakayama 1997; Constam and Robertson 2000).

Los modelos de ratones *knockout* de furina, resultan en muerte en el día embrionario 11, la cual se debe a una insuficiencia hemodinámica y defectos de cierre ventral cardíaco. Los factores de crecimiento tipo-TGF y la proteína morfogenética ósea 10 (BMP10), los cuales son procesados eficientemente por furina, son algunos de los sustratos que pueden estar implicados en estos fenotipos. Por otra parte, los embriones knockout de BMP10 y furina mueren en la misma etapa del desarrollo. Hasta ahora y, probablemente, debido a su importancia en múltiples eventos de procesamiento, no se han descrito mutaciones de furina implicadas en enfermedades humanas. Además, los ratones heterocigotos son viables y no muestran fenotipos evidentes, lo que sugiere que sólo una pequeña cantidad de furina activa es suficiente para realizar la mayoría de sus funciones variadas (Thomas G. 2002).

Se ha observado que la supresión de furina deteriora la función de células reguladoras y efectoras T, quienes producen menos TGF- $\beta$ 1. La inactivación de furina en las glándulas salivales también tiene un papel clave en la activación del PLAG1 (Gen de adenoma pleomorfo 1) que induce la formación de tumores de glándulas salivales cuando se sobreexpresa en ratones. (Seidah N, et al. 2012).

### ***Furina en el cáncer.***

Si bien la enzima Furina es indispensable para el desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis celular, paradójicamente, su actividad puede desencadenar una gran variedad de fisiopatologías, mediante el procesamiento de proteínas precursoras de toxinas bacterianas o de glicoproteínas virales, como de aquellas relacionadas en el desarrollo y la progresión del cáncer. (Bergeron, Leduc, et al. 2000; Rockwell, et al. 2002).

En tejidos humanos normales, furina se encuentra expresada en bajos niveles, por el contrario, su sobreexpresión está asociada con el desarrollo de un fenotipo celular maligno. Altos niveles del ARNm de furina y de la proteína madura se han encontrado en tumores humanos de pulmón, de células escamosas de cuello y cabeza, adenocarcinoma, colon, mama y ovario; así como en líneas

celulares tumorales de diferentes tejidos, esto considerando que furina es capaz de activar a muchas proteínas que juegan un papel crucial en el cáncer tales como las metaloproteinasas, factores de crecimiento y sus receptores, así como moléculas de adhesión y factores angiogénicos (Dubois C, Blanchette F, et al. 2001; Page RE, Klein-Zsanto AJP, et al.2007).

Estudios de Northern-blot han demostrado que el ARNm de furina se encuentra sobre-expresado en diferentes líneas celulares leucémicas (promastocito MC-6, progenitor mieloide FDCP1, WEHI, K562, HL-60, Dami y HEL), líneas pro-B y pro-T (Jurkat y EL-4). Por el contrario, la inhibición de la actividad de furina, resultó en la reducción del procesamiento de sustratos clave relacionadas con cáncer, como en los carcinomas humanos de células escamosas (SCC), adenocarcinoma de colon y líneas celulares de astrocitoma. Paralelamente se observan cambios en la proliferación celular y la capacidad invasiva y metastásica. Mediante el control de la maduración / activación de las proteínas clave asociadas con el cáncer, furina actuaría como "interruptor maestro" a diferentes niveles durante el desarrollo y progresión tumoral. Varios factores de crecimiento promueven el crecimiento tumoral y la metástasis al interactuar con sus respectivos receptores, como son por ejemplo: TGF- $\beta$ , PDGF, IGF, etc. Y algunos de ellos son secretados por la misma célula maligna o por las células del estroma adyacente. (Bassi D, Mahloogi H, Al-Saleem L, et al. 2001., Bassi D, Mahloogi H, Lopez De Cicco R, et al. 2003., Bassi D, Mahloogi H, Klein-Szanto A, 2005).

### ***TGF-beta 1***

Uno de los sustratos más estudiados de furina es el factor transformante del crecimiento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), el cual se ha reportado que tiene un efecto dual en el desarrollo del tumor; por una parte presenta una actividad supresora de la tumorigénesis epitelial en los estadios iniciales, y por otra parte, se comporta como un activador del crecimiento y metástasis en las etapas tardías del tumor. Existen tres isoformas de TGF- $\beta$  de mamíferos que se sintetizan primero como precursores biológicamente inactivos más grandes con un peso de 75kDa, que se

procesan proteolíticamente para producir un homodímero de 25-kDa. La isoforma  $\beta 1$  es la más ampliamente estudiada y generalmente considerada como el prototipo de la familia TGF- $\beta$ . TGF- $\beta 1$  se sintetiza inicialmente como una molécula precursora de 390 aminoácidos. (Annes JP, Munger JS, et al. 2003; Muraoka-Cook R, Dumont N, et al. 2005).

El TGF- $\beta 1$  actúa a través de receptores acoplados a enzimas que atraviesan una sola vez la membrana y con dominios serina/treonina quinasa sobre la cara citosólica de la membrana plasmática. Existen dos clases de estos receptores serina/treonina, tipo I y tipo II que son estructuralmente homodímeros similares. La unión de TGF $\beta$  a un receptor de tipo II, provoca que el receptor reclute y fosforile un receptor de tipo I; el receptor de tipo I fosforilado, recluta y fosforila una proteína reguladora de la expresión génica en estado latente de la familia “**Smad**” (Smad2 o Smad3). Cuando una de estas Smad ha sido fosforilada, se disocia del receptor y se une a Smad4, el oligómero Smad2/3-smad4 migra al núcleo, recluta otras proteínas reguladoras de la expresión génica y activa la transcripción de genes diana específicos para llevar a cabo procesos diversos en las células. (Alberts B, et al. 2008).

Existen evidencias concluyentes que indican que furina actúa en el primer paso de la maduración de TGF- $\beta 1$  en ensayos experimentales realizados tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, TGF- $\beta 1$  sobre-regula la expresión del gen *FUR*, resultando de esta manera en una retroalimentación positiva, que genera un aumento en el procesamiento de la enzima y, por consiguiente, de más TGF- $\beta 1$  activo. Sin embargo, este ciclo de retroalimentación no parece ser la regla general en todo tipo celular, ya que en células de glioma se ha encontrado que TGF- $\beta 1$  no induce la expresión del ARNm de furina. (Dubois C, Blanchette F, et al. 2001., Leitlein J, Aulwurm S, Waltereit R, et al. 2001., Muraoka-Cook R, Dumont N, et al. 2005).

En otros reportes se demuestra que la inhibición de la actividad de esta convertasa produce una reducción del procesamiento de TGF- $\beta 1$  y del receptor 1

del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R) el cual es también procesado por furina, resultando en una disminución de la proliferación de una línea celular de astrocitomas. Sugiriendo de esta manera que la activación de ambas pro-proteínas por furina es un paso indispensable para la progresión del cáncer. (Baserga R. 1999., Mercepide J, De Cicco L, et al. 2002).

### ***Receptor de IGF-1***

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el cual consiste de 70 aminoácidos con un peso molecular de 7.5 kDa; y su receptor respectivo IGF-1R, compuesto por dos subunidades alfa (130 kDa cada una) y dos subunidades beta (98 kDa cada uno) unidas por enlaces disulfuro, (previamente sintetizado como un pre-propeptido de cadena simple con una subunidad alfa de 80 kDa y una subunidad beta de 71kDa) ; han aparecido como piezas claves en la regulación de la mitogénesis y tumorigenicidad. Esto es debido a que el IGF-1R activado, al igual que otros receptores con actividad de tirosina cinasas ubicados en la superficie celular, inicia varias cascadas de señalización intracelular, que promueven la progresión del ciclo celular e inhiben la apoptosis. (Dricu A, Kanter L, et al. 1999; Wu Y, Yakar S, Zhao L, et al. 2002; Haisa M, 2013).

La acción principal del IGF-1 es mediada por la unión a su receptor específico, el receptor de factor de crecimiento insulínico tipo 1, abreviado como IGF1R, presente en muchos tipos de tejidos. Esta unión permite que el dominio tirosina/quinasa intracelular, fosforile determinadas cadenas laterales de tirosina tanto de la propia proteína receptora como de otras proteínas de señalización intracelular. En muchos receptores tirosina quinasa (RTK) cómo lo es IGF1R, la unión del ligando hace que las cadenas de los receptores dimericen, juntando entre sí los dominios quinasa de dos receptores de forma que se fosforilan de forma cruzada sobre varias tirosinas, un proceso denominado transautofosforilación. El IGFR1 es un tetrámero y se cree que la unión del ligando induce una reordenación de las cadenas transmembrana de los receptores,

desplazando los dos dominios quinasa que quedan muy juntos. Además, la mayoría de los lugares de unión a fosfotirosinas generados por la unión del ligando no se localizan en el propio receptor, sino en una proteína de unión especializada denominada sustrato-1 del receptor de insulina (IRS1: insulin receptor substrate-1). El receptor activado primero transautofosforila sus dominios quinasa, los cuales entonces fosforilan IRS1 en varios residuos tirosina, con lo que se generan muchos más lugares de unión que los que podrían darse en el receptor. La unión puede ser suficiente para activar la proteína señalizadora unida induciendo cambios de conformación en la proteína o acercándola a la siguiente proteína de la vía de señalización. Así, la transautofosforilación actúa como un interruptor que desencadena el ensamblaje transitorio de un complejo señalizador intracelular, el cual puede transmitir la señal a través de varias rutas hacia varios destinos de la célula (Alberts B, et al. 2008).

En el caso de las células cancerosas, se ha encontrado que la expresión de este receptor se encuentra sobre-regulada, resultando de esta forma en una acumulación de los efectos causados por el IGF-1R. El IGF-1R juega un papel importante tanto en el crecimiento normal y anormal. Es particularmente importante en el crecimiento independiente de anclaje. El deterioro de su función provoca la apoptosis de las células tumorales y la inhibición del crecimiento tumoral en animales de experimentación. Sin embargo, el IGF-1R también puede inducir la diferenciación, y, finalmente, la muerte celular, de ciertos tipos de células. (Baserga R. 1999., Wu Y, Yakar S, Zhao L, et al. 2002).

### ***Inhibidores de Furina.***

Los requerimientos del sitio consenso de corte de furina han servido de base para la generación de inhibidores peptídicos y proteicos de esta PC, que bloquean su actividad tanto *in vitro* como *in vivo*. Algunos ejemplos de los inhibidores peptídicos de furina son el decanoil-Tyr-Arg-Val-Lys-Arg-clorometil-cetona (Dec-RVKR-CH<sub>2</sub>Cl) y péptidos con secuencias de múltiples Arg. (Cameron A, Appel J, et al. 2000).

Respecto a los inhibidores proteicos, se encuentran variantes mutantes de  $\alpha$ 1-antitripsina, como  $\alpha$ 1-antitripsina Pittsburgh ( $\alpha$ 1-PIT) y  $\alpha$ 1-antitripsina Portland ( $\alpha$ 1-PDX). Los inhibidores de furina más empleados son Dec-RVKR-CH2Cl y  $\alpha$ 1-PDX que bloquean la activación de Furina, previenen la formación de virus patógenos, la activación de toxinas bacterianas, el crecimiento, invasión y metástasis de la célula tumoral (Molloy, Thomas 2001).

Dec-RVKR-CH2Cl inhibe todas las PCs que llevan a cabo su corte en sitios de pares de aminoácidos básicos, esto con una  $K_i$  dentro de un rango bajo nanomolar (nM), particularmente para furina con una  $K_i = 2.0$  nM. Sin embargo, el inhibidor de mayor selectividad de furina es  $\alpha$ 1-PDX de 418 aminoácidos, con una  $K_i = 0.6$  nM *in vitro*. Esta molécula proteica fue generada por mutagénesis dirigida en el inhibidor  $\alpha$ 1-antitripsina, para obtener en su asa reactiva una secuencia consenso mínima del sitio de corte de furina (–Arg–Ile–Pro–Arg–↓). Estudios cinéticos mostraron que  $\alpha$ 1-PDX inhibe a furina por un mecanismo lento de fuerte unión, característico de las moléculas serpinas (inhibidores de serin-proteasas) y opera como un sustrato-inhibidor suicida. Asimismo, se ha demostrado que la transfección (transiente o estable) de  $\alpha$ 1-PDX bloquea el procesamiento de sustratos bien caracterizados de furina, lo que evidencia la inhibición de esta proteasa por  $\alpha$ 1-PDX, por lo que esta serpina ha sido empleada como un inhibidor específico en distintos estudios bioquímicos, celulares y en animales de experimentación. (Jean F, et al. 1998; Cameron A, et al. 2000; Thomas G 2002; Seidah N, et al. 2012).

Mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que la expresión de manera estable de  $\alpha$ 1-PDX en una línea celular de coloncarcinoma (HT-29), disminuyó la proliferación y la vascularización del tumor, así como también alteró la invasividad y el fenotipo maligno de estas células. Lo cual fue puesto en evidencia mediante la disminución en el procesamiento del receptor IGF-R1 (receptor 1 del factor de crecimiento similar a la insulina), el cual juega un papel clave en la mitogénesis y tumorigenicidad (Baserga R. 1999., Wu Y, Yakar S, Zhao L, et al. 2002).

La transfección estable del ADNc del inhibidor  $\alpha$ 1-PDX en dos líneas celulares de astrocitomas (U87MG y U118MG) y en una línea celular de carcinoma de cuello y cabeza (HNSC) redujo de manera significativa la proliferación, tumorigenicidad e invasividad de estas células tumorales, al bloquear la activación de furina sobre las enzimas que degradan la matriz extracelular, MMP-14 y MMP-2, y un bajo procesamiento de TGF- $\beta$ 1. Estos efectos inhibitorios de  $\alpha$ 1-PDX fueron corroborados tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*. (Bassi D, Mahloogi H, et al. 2001., Mercapide J, De Cicco L, et al. 2002., Bassi D, Mahloogi H, Lopez De Cicco R, et al. 2003).

Furina es una enzima a menudo regulada positivamente en diversos tipos de cáncer y metástasis, y por lo tanto ha sido propuesta como una posible proteína diana terapéutica en este contexto. En apoyo de esto, la inyección de células cancerosas que expresan ya sea  $\alpha$ 1-PDX o el prosegmento de furina como un inhibidor de esta convertasa en ratones inmunosuprimidos, da como resultado una disminución en el número de diversos tumores y de focos metastásicos (Seidah N, 2012).

Se ha encontrado que la sobreexpresión de  $\alpha$ 1-PDX y la disminución de la expresión de furina, inhibe el procesamiento del receptor IGF-1 y su posterior activación para inducir la fosforilación de IRS-1 y de Akt, todo esto es importante en la metástasis del carcinoma de colon. Estos datos sugieren que furina es por lo tanto la convertasa de mayor relevancia para el receptor IGF-1. La expresión de  $\alpha$ 1-PDX reduce la producción de TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\alpha$  por las células de carcinoma de colon humano. Además,  $\alpha$ 1-PDX ha sido efectivo también en la inhibición de la expresión y/o activación de varias proteínas involucradas en la metástasis hepática de coloncarcinoma. Es decir, las células de carcinoma de colon en las que la actividad de furina fue inhibida por la sobreexpresión de  $\alpha$ 1-PDX cuando se inyecta en la vena porta de ratones, mostraron una capacidad reducida de manera significativa a formar metástasis hepáticas. Esto sugiere que la inhibición de la convertasa furina es una estrategia potencialmente prometedora para la

prevención de la metástasis. (Bassi D, et al. 2005; Scamuffa N, et al. 2006; Seidah N, et al. 2012).

### ***Cepa U937.***

La leucemia es un tipo de cáncer que afecta la médula ósea y la sangre, se caracteriza por la proliferación anormal de células inmaduras. Los efectos secundarios de los tratamientos, hacen deseable el análisis de nuevas alternativas terapéuticas. Las células U937 de leucemia monocítica aguda son un modelo de leucemias humanas de gran utilidad para el estudio de esta enfermedad. La cepa U937 proviene de una línea celular humana obtenida a partir de las células malignas de un derrame pleural de un paciente caucásico masculino de 37 años de edad, con linfoma histiocítico difuso. Es una de las pocas líneas celulares que muestran muchas de las características de los monocitos y por lo tanto ha servido como modelo para la diferenciación de los monocitos y macrófagos *in vitro*, así como para pruebas antitumorales y de tumorigenicidad (Okuma E, et al. 2002; Zhang W, Wang J, et al. 2015, Kumar D, Bimolendu D, 2005)

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Furina es una serin proteasa ubicua, capaz de procesar a un gran número de sustratos (Gu F, et al. 2001). Alteraciones en su procesamiento y/ o actividad, pueden llevar a la generación de distintas fisiopatologías. (Rockwell, et al. 2002). Se han encontrado altos valores de ARNm de profurina y furina en tumores humanos de pulmón, adenocarcinoma, así como en líneas celulares tumorales de diferentes tejidos (Page RE, Klein-Zsanto AJP, et al.2007). Mediante estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que al regular el procesamiento de diversos sustratos de furina relacionados con el cáncer, se generan cambios en la proliferación y fenotipos celulares (Wu Y, Yakar S, Zhao L, et al. 2002). Estudios sobre el inhibidor específico de furina  $\alpha$ 1-PDX demuestran que su expresión en una línea celular de coloncarcinoma, disminuyó la proliferación del tumor así como la disminución de receptores y factores del crecimiento (Bassi D, Mahloogi H, Lopez De Cicco R, et al. 2003). En las leucemias, los efectos secundarios de los tratamientos hacen deseable el análisis de alternativas terapéuticas y en este tipo de cáncer no se han realizado estudios en los que se pruebe el inhibidor  $\alpha$ 1-PDX de furina en relación a la proliferación celular; el cual podría dar resultados favorables en este tema.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que la cepa U937 expresa altas concentraciones de la enzima furina (Ortega Reyes J., 2015). Si bien se sabe que alteraciones en los niveles o en la expresión de la proteína convertasa furina, modifican el procesamiento de diversos sustratos, siendo de nuestro interés aquellos involucrados con el cáncer; no se ha estudiado el papel del inhibidor específico  $\alpha$ 1-PDX en líneas celulares leucémicas. Por lo cual en el laboratorio y en este proyecto, nos planteamos analizar el papel de este inhibidor en las células malignas U937 y su efecto sobre la proliferación a través de los niveles del receptor de IGF1 y del factor TGF- $\beta$ 1, los cuales son sustratos de la convertasa furina.

### **4. HIPOTESIS CIENTÍFICA:**

El inhibidor de la convertasa furina  $\alpha$ 1-PDX, disminuye la proliferación celular en la cepa U937.

### **5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS DEL PROYECTO**

#### **5.1 Objetivo General:**

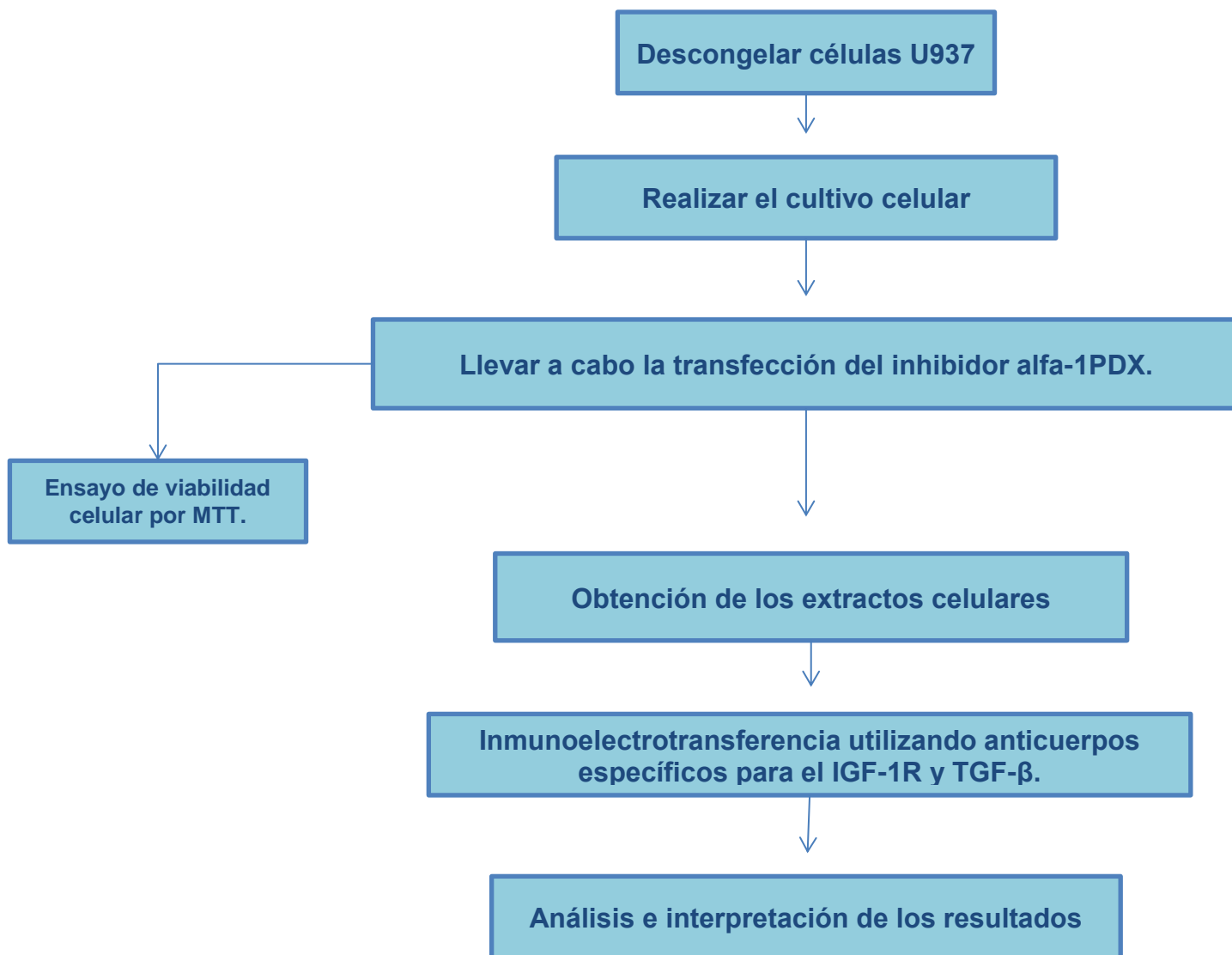
- Estudiar el efecto del inhibidor específico  $\alpha$ 1-PDX de furina, sobre la proliferación celular, en la cepa U937 (leucemia monocítica aguda).

#### **5.2 Objetivos Particulares:**

- Analizar el efecto del inhibidor específico  $\alpha$ 1-PDX sobre la proliferación de las células U937.

- Investigar los niveles del receptor IGF1 en las células U937 transfectadas con el inhibidor  $\alpha$ 1-PDX.
- Investigar los niveles del factor transformante del crecimiento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) en las células U937 transfectadas con el inhibidor  $\alpha$ 1-PDX.

## 6. ESQUEMA DE TRABAJO



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Cultivo celular***

Las células U-937 fueron descongeladas del vial que se encontraba almacenado en nitrógeno líquido, y se colocaron en un baño de agua a 37°C. Se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2mM de glutamina, 10mM de NaHCO<sub>3</sub>, 100 UI/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina a 37°C en el incubador húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células son no adherentes y su densidad celular se obtiene contando las células en una cámara de Neubauer.

### **Transfección transitoria del inhibidor alfa-1PDX**

Se empleó el plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen) con el inserto del cDNA que codifica para el inhibidor de furina  $\alpha$ 1-PDX, o el mismo plásmido pcDNA3.1 sin inserto como control. Se prepararon placas de 60mm de diámetro, cada una sembrada con  $5 \times 10^6$  células en medio completo, y se mantuvieron en incubación. Luego se procedió a realizar la transfección transitoria con los plásmidos mencionados. Los complejos DNA/liposomas se prepararon a una relación de 1:2:5. Para ello se agregaron 8 µg del DNA plasmídico y 20 µg de liposomas en un volumen total de 1 ml en medio Opti-MEM. Estos complejos DNA/liposomas, denominados lipoplex, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente, y luego se agregaron a las células, previamente lavadas con medio Opti-MEM. Después se mantuvieron en incubación por 4 hrs, en ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de este tiempo, se retiraron los lipoplex de cada placa, y se agregó medio completo RPMI 1640 con 10% de SBF. Finalmente, las células fueron nuevamente incubadas a los tiempos indicados en cada experimento.

### ***Ensayo de proliferación celular por MTT***

Descrito en 1983 por Mosmann y modificado por François Denizot y Rita Lang en 1986; este método se basa en la reacción metabólica del bromuro de 3-

(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa que lo reduce a un compuesto de color azul conocido como formazan. La cantidad de formazan producida es directamente proporcional a la cantidad de células vivas (de Castro 2006). La cantidad de MTT-formazan puede ser determinada espectrofotométricamente una vez que el MTT- formazan es disuelto en un solvente adecuado (Freshney 2005).

Para este estudio a cada pozo de una placa de 96 pocillos se sembraron  $5 \times 10^5$  células, por sextuplicado y se les sometió a una transfección transitoria con los plásmidos control y con  $\alpha 1$ -PDX. (Ver apartado de transfecciones transitorias); luego de 48 hrs postransfección se realizó esta medición. A cada pozo se le agregaron 10  $\mu$ l de una solución de 2 mg/ml de MTT en medio HEPES. A continuación las placas se incubaron durante 4 horas con 5% CO<sub>2</sub> y a 37 °C, para después centrifugarlas a 1,200 rpm durante 5 minutos y a 20 °C.

Una vez que se cumplió este proceso se retiró el medio e inmediatamente se añadieron 200  $\mu$ l de DMSO, a cada pozo, se resuspendió hasta notar que los sedimentos del formazan se disgregaran, en este paso los pozos cambian a color morado. Finalmente se agregaron 25  $\mu$ l del buffer glicina Sorensen (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH 10.5) por pozo antes de llevar a cabo la lectura espectrofotométrica. La lectura de cada placa se realizó en el lector de microplaca BIO-RAD modelo 550 a  $\lambda=570$  nm.

### ***Obtención de los Extractos celulares***

Todo este procedimiento se realizó a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante de los cultivos, el cual se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por media hora para eliminar los restos celulares, y se congeló a -20°C hasta su uso.

Por otro lado, las células se homogeneizaron haciéndolas pasar por agujas de distinto calibre (20G y 25G). Después fueron centrifugadas por 30 minutos a 14,000 rpm a 4°C. El extracto celular fue separado de los pellets, trasvasado a un nuevo tubo eppendorf y almacenado a -20°C hasta su uso.

## ***Determinación de proteínas por el método de Bradford***

La determinación del contenido de proteínas de los extractos celulares y los medios se realizó utilizando la metodología descrita por Marion Bradford en 1976. Esta metodología es ampliamente utilizada y aprovecha la capacidad de reducirse del cobre cuando éste se asocia a residuos de asparagina en un medio ácido. Esta asociación provoca un cambio en la longitud de onda de refracción, la cual puede ser leída con una longitud de onda de 595 nm emitida por una lámpara de Tungsteno (Bradford, 1976).

Primero se creó una curva estándar a partir de soluciones de albúmina purificada de concentración conocida, para ello se agregaron 2µl de cada muestra a 1ml de agua desionizada y posteriormente se adicionaron 200 µl del reactivo concentrado de coloración Bio-Rad (No. Catálogo 500-006); se vortexeó la muestra, para después leer la absorbancia en espectrofotómetro con lámpara de tungsteno a una longitud de onda de 595nm. Los datos de absorbancia se interpolaron en una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) con el programa GraphPad Prisma IV, con el fin de conocer su concentración.

## ***Western blot***

El western blot es la metodología utilizada en este trabajo de Tesis para el análisis de las proteínas de los extractos celulares y de los medios sobrenadantes, provenientes de las células U937. Se siguieron los pasos utilizados anteriormente por Vindrola y col. en 1998.

Los geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización de la acrilamida y la bis-acrilamida. Variando la cantidad de ambas sustancias obtenemos geles de diferente tamaño de poro.

En la preparación del gel, la polimerización de los monómeros de acrilamida produce cadenas lineales, que al agregarle bis-acrilamida, da lugar a la formación de puntos de ramificación en el polímero, lo que permite la formación de una

matriz tridimensional, la poliacrilamida. El agente iniciador de la polimerización es el radical persulfato de amonio que activa al tetrametil etilendiamina (TEMED), el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice.

En esta metodología de electroforesis se utilizó la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Se mezclaron las proteínas con el detergente aniónico SDS para mantener a las proteínas desnaturalizadas; además el SDS se une a las proteínas en proporción a su tamaño: 1.4 g SDS/g de proteína. De esta manera se forma un complejo SDS-proteína en la cual la carga de la proteína queda enmascarada, por lo que en esta modalidad de electroforesis, la separación de las proteínas se hace en función de su masa molecular. Además, se ocupó azul de bromofenol como colorante y que sirve de referencia para poder seguir el avance de las muestras durante la corrida.

Para montar la cámara de electroforesis se lavaron perfectamente las placas de vidrio y se prepararon primero el gel separador, que es un gel de poliacrilamida al 8.8%, al 12 % o al 15%, dependiendo del peso molecular de las proteínas de interés (Tris-HCl 1.5 M pH8.8, acrilamida al 8.8%, al 12% o al 15%, bis-acrilamida al 0.23%, SDS al 0.1%, persulfato de amonio al 10% y TEMED), inmediatamente después de haber agregado el gel separador, se le añadió una pequeña cantidad de butanol encima de éste. Una vez que polimerizó el gel se lavó con agua tridestilada para remover totalmente el butanol, y se secó con un papel de filtro. Después se añadió el gel de empaquetamiento al 4% de poliacrilamida (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, acrilamida al 4%, bis-acrilamida al 0.21%, SDS al 0.1%, persulfato de amonio al 10% y TEMED). Una vez agregado el gel de empaquetamiento, y antes que polimerizara se insertó el peine para poder formar los carriles donde se iban a colocar las muestras. Después de la polimerización se retiraron los peines de los geles y se colocaron en una cámara de electroforesis, la cual se llena con el buffer de corrida (glicina 0.19 M, Tris-HC 0.025 M y SDS al 0.1%), quedando listo para la aplicación de las muestras.

Para realizar la electroforesis, se tomó un volumen de muestra con 30 ug de proteínas que se diluyó previamente en buffer Laemmli 2X y se hirvió por 5 minutos, para agregar 40 µl de volumen final en cada carril del gel.

La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 100 voltios (V) durante 2 horas; posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con un poro de 0.45µm de diámetro, con una corriente constante de 190 amperios (A) y un voltaje de 140 V durante 90 minutos dentro de una solución de Tris-HCL 25mM, glicina 102mM y metanol al 20%.

Posteriormente las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora con buffer TBS, Tween al 0.1%, en agitación constante y a temperatura ambiente y después se incubaron con los primeros anticuerpos diluidos en la misma solución de bloqueo, durante toda la noche, con agitación constante y a 4 °C.

Al día siguiente se realizaron cuatro lavados a cada membrana de 10 minutos cada uno, con buffer TBS y Tween 20 al 0.1%. Posteriormente se incubaron durante 1 hora con el segundo anticuerpo diluido con la solución de bloqueo y luego se realizaron otros cuatro lavados. Finalmente las membranas de nitrocelulosa se expusieron al revelado con el kit AP color de Bio-Rad, se añadieron 50 µl del reactivo A y 50 µl del reactivo B a 10 ml de buffer AP color para cada membrana. Los lavados, la incubación con el segundo anticuerpo y el revelado se harán con agitación constante y a temperatura ambiente. Para determinar el peso molecular de las proteínas se usaron marcadores de peso molecular de rango completo o de bajo rango (Amersham, USA).



**Figura 5. Marcadores de peso molecular empleados.** Full Range Rainbow RPN800E GE Healt Care (izquierda) y Low Range Rainbow RPN755E GE Healt Care (derecha).

**Tabla 2. Anticuerpos empleados**

Anticuerpos Utilizados	
Anticuerpo	Fuente
Anti-TGF- $\beta$ , Policlonal de conejo	Santa Cruz biotechnology, inc.
Anti-IGF1-R, Policlonal de conejo	Santa Cruz biotechnology, inc.
Anti-Actina, Policlonal de conejo	Santa-Cruz biotechnology, inc
2do anticuerpo: FA-IgG anti-conejo obtenido en chivo	Jackson Laboratories, inc.

## **8. Análisis de datos**

Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas por los diferentes anticuerpos con el método de western blot. Se llevó a cabo con el programa ImageJ, mediante el cual se obtienen unidades de densidad óptica (DO) y se pueden comparar los resultados obtenidos con cada uno de los anticuerpos usados relacionándolos con los valores de Actina para cada muestra.

### **8.1 Análisis estadístico**

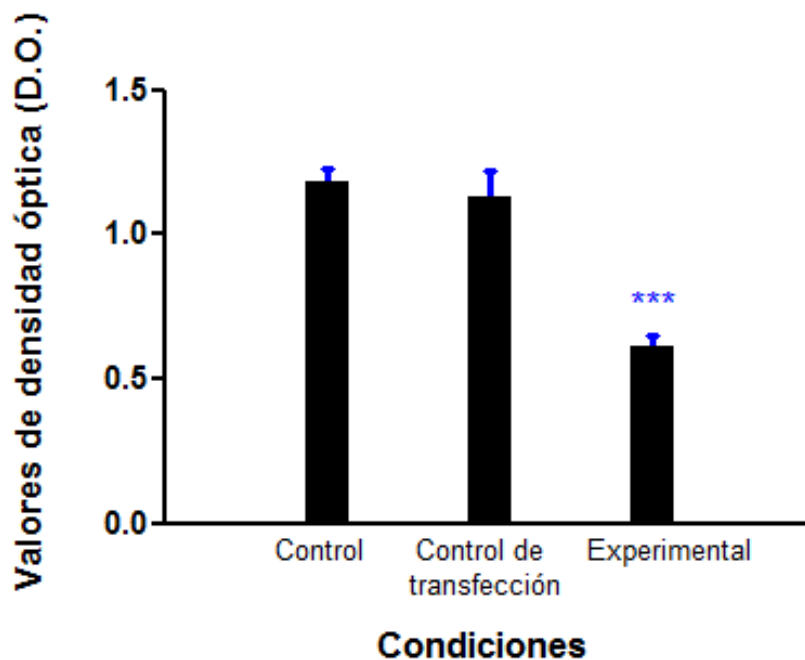
Resultados del ensayo MTT: se aplicaron prueba t-student para muestras no empataadas. Para dicho análisis y elaborar las gráficas se utilizó el software GraphPad Prism version 6.00 for Windows, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

## 9. Resultados

### Efecto del inhibidor específico de furina alfa-1PDX, sobre la proliferación celular.

Los ensayos de viabilidad celular, que son una medida de la proliferación celular, son empleados para calcular la proporción de células viables después de un procedimiento que podría afectar la integridad de la membrana o vías metabólicas relacionadas con la capacidad proliferativa o la supervivencia (Freshney 2005).

**Figura 6. Proliferación celular durante el tratamiento con el inhibidor alfa-1PDX.** Promedio y desviación estándar, de cultivos realizados por sextuplicado, correspondientes a las lecturas de cada una de las condiciones tratadas en el ensayo de proliferación celular por MTT. (Control = células sin transfectar, Control de la transfección = sólo con pcDNA 3.1 sin el inserto, Experimental = células transfectadas con  $\alpha$ 1-PDX). La prueba T de Student mostró una diferencia significativa. Los asteriscos indican la diferencia al grupo control: \*\*\* =  $p < 0.001$



Se realizó el ensayo de MTT en las condiciones experimentales que se observan en la gráfica anterior por sextuplicado. Se observa una disminución de la proliferación celular del 48.4 % de la condición experimental vs el control y vs el control de transfección (Figura 6). Posteriormente se aplicó el análisis estadístico para comprobar tal diferencia, mediante la prueba de T de Student. Se demostró que existen diferencias significativas entre estas condiciones, esto nos indica que la proliferación celular de las células U-937 se ve disminuida por la presencia del inhibidor alfa-1PDX. Además no encontramos que el procedimiento realizado para la transfección transitoria afecte la capacidad proliferativa de las células U937 (Figura 6, comparar barras control vs control de transfección).

Dado que observamos una disminución en la proliferación celular de las muestras transfectadas con el inhibidor alfa-1PDX; se decidieron realizar los siguientes protocolos, utilizando la técnica de Inmunoelctrotransferencia para investigar los niveles del receptor IGF1 y del factor transformante del crecimiento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) en las células U937 transfectadas con el inhibidor específico, ya que ambos sustratos de furina afectan positivamente la proliferación celular.

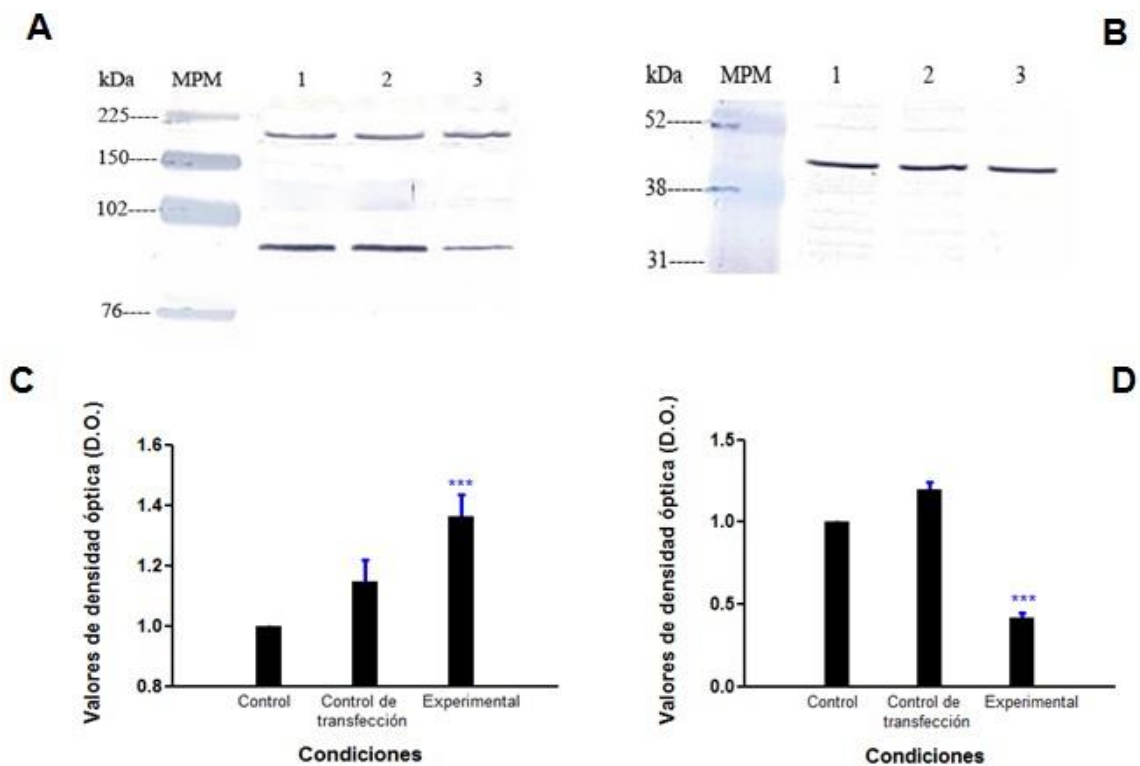
### **Efecto del inhibidor alfa-1PDX sobre los niveles del precursor del receptor IGF1 y del receptor en su forma madura**

Para conocer el efecto del inhibidor de furina alfa-1PDX sobre los niveles del receptor IGF1 se realizaron los cultivos celulares con las condiciones antes mencionadas (control, control de la transfección y experimental). Se obtuvieron los extractos celulares como se indica en Material y Métodos.

Posteriormente se efectuó la Inmunoelctrotransferencia cuyos resultados se muestran a continuación en la Figura 7A; donde se observa en los carriles superiores del western blot la banda para la molécula precursora de IGF1-R de 200 kDa (pro-IGF1-R). Al comparar visualmente la intensidad de esta banda en las diferentes condiciones experimentales se observa un ligero aumento en la

condición experimental, es decir, cuando está presente el inhibidor de la enzima (Figura 7 A, carril 3 vs carriles 1 y 2).

En contraste, la intensidad de las bandas para IGF1-R en su forma madura de 93 kDa en la parte inferior, se encuentra una marcada diferencia entre la intensidad de las bandas. Podemos notar que la banda del carril 3 es notoriamente menor en intensidad que las bandas de los otros carriles (Figura 7 A, carril 3 vs carriles 1 y 2).



**Figura 7. Efecto del inhibidor alfa-1PDX sobre los niveles del precursor del receptor IGF1.** A. Western blot. de IGF1R, precursor y forma madura. Para la electroforesis se utilizó como primer anticuerpo el Anti-IGF1-R, Policlonal de conejo. B. Western Blot de Actina. C. Histograma del análisis densitométrico para pro-IGF1R. D. Histograma del análisis densitométrico para IGF1R en su forma madura. ). La prueba T de Student mostró diferencia significativa. Los asteriscos indican la diferencia al grupo control: \*\*\* =  $p < 0.001$

Paralelamente se realizó para cada una de las muestras, la Inmunoelctrotransferencia para  $\beta$ - Actina ya que se trata de una proteína de expresión constitutiva, y se la utiliza como referencia para relacionar los niveles del pro-IGF1R y de IGF1-R maduro detectados en el western-blot (Figura 7B), y de esta manera hacer semi-cuantitativos los resultados obtenidos.

El análisis densitométrico revela un aumento significativo de las concentraciones del pro-IGF1R con respecto a los controles (Figura 7 C); en cambio podemos observar una marcada disminución del nivel de IGF1-R en su forma madura, en comparación a las células control (Figura 7 D). Es decir que el inhibidor de furina está actuando sobre la enzima impidiendo que ésta pueda procesar el pro-IGF1R hacia su forma madura IGF1R.

Tomando en consideración los datos que obtuvimos tras los análisis densitométricos, decidimos llevar a cabo el análisis estadístico para comprobar que las diferencias (aumento en de los niveles para el caso de pro-IGF1R y disminución de las concentraciones para la forma madura) fueran verdaderamente significativas. Tras la aplicación de la prueba T de Student; se demostró que sí existen diferencias significativas con una  $p < 0.001$  entre la condición experimental vs los controles, esto se denota con asteriscos en las imágenes 7 C y 7 D.

### **Efecto del inhibidor alfa-1PDX sobre los niveles del factor transformante del crecimiento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).**

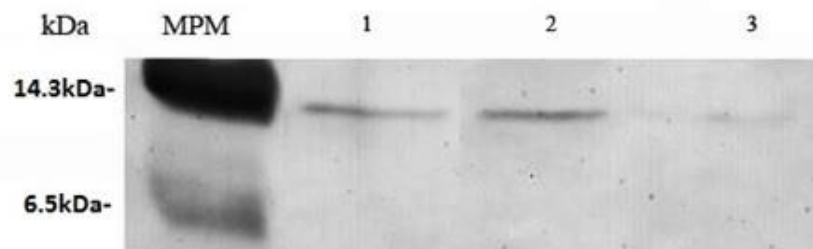
El siguiente objetivo en este proyecto fue medir los niveles y el efecto del inhibidor alfa-1PDX sobre otro importante sustrato de furina: el factor transformante del crecimiento-  $\beta$ 1, el cual al igual que el receptor de IGF1, juega un papel en el cáncer, desencadenando vías de señalización que aumentan la proliferación celular.

Realizamos entonces la Inmunoelctrotransferencia y obtuvimos la imagen de la membrana de nitrocelulosa que se muestra a continuación (Figura 8 A); en ella podemos observar bandas correspondientes al factor activo de 14.3 kDa con

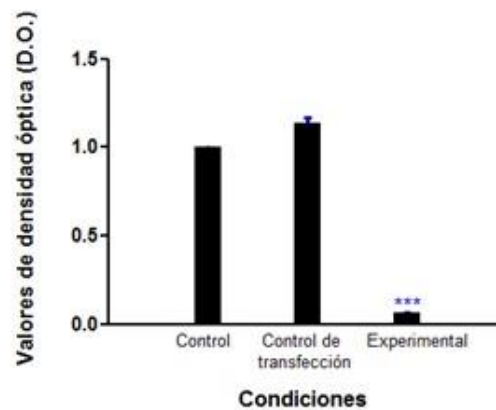
intensidades similares en los carriles 1 y 2, y una tercera banda aparentemente mucho más débil, la cual corresponde a las células transfectadas con el inhibidor de nuestra enzima (Figura 8 A, carril 3).

Al analizar estas bandas densitométricamente, logramos comprobar que si existe una disminución notoria en los niveles de TGF-  $\beta$  activo en comparación al control, representándolo gráficamente en el histograma de la Figura 8 B.

**A**



**B**



**Figura 8. Efecto del inhibidor alfa-1PDX sobre los niveles del factor transformante del crecimiento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).** A. Western blot. de TGF- $\beta$ 1. Para la electroforesis se utilizó como primer anticuerpo el Anti-TGF- $\beta$ , Policlonal de conejo. B. Histograma del análisis densitométrico. ). La prueba T de Student mostró diferencia significativa. Los asteriscos indican la diferencia al grupo control: \*\*\* =  $p < 0.001$

Del mismo modo que para IGF1-R decidimos verificar mediante un análisis estadístico con la Prueba T de Student, donde obtuvimos que sí existe una disminución significativa entre la condición experimental y los controles con una  $p < 0.001$  (Figura 8 B).

Podemos concluir que la presencia del inhibidor  $\alpha 1$ -PDX afecta negativamente la producción del factor activo

## **10. Discusión**

Furina es una proteína transmembranal tipo I, sintetizada como pro-furina, y después de un proceso de autoproteólisis da origen a furina madura activa de 97 kDa. Es una serin proteasa ubicua, capaz de procesar a un gran número de sustratos (Gu F, et al. 2001). A pesar de que furina es una enzima indispensable para el desarrollo, alteraciones en su procesamiento y/ o actividad, pueden llevar a la generación de distintas fisiopatologías, por ejemplo la sobreexpresión de esta proteína se encuentra asociada con el desarrollo de fenotipos celulares malignos (Rockwell, et al. 2002).

En distintos estudios se han encontrado altos valores de ARNm de profurina y furina en tumores humanos de pulmón, adenocarcinoma, así como en líneas celulares tumorales de diferentes tejidos (Page RE, et al.2007).

Como se ha mencionado anteriormente, distintos trabajos relacionan a la convertasa Furina con el cáncer y la proliferación celular. En ellos se tiene a furina como una potente convertasa implicada en la activación de varios sustratos relacionados con el cáncer, sintetizándose como un zimógeno inactivo, lo cual minimizaría así la aparición de la actividad enzimática prematura que conduciría a la activación de la proteína inapropiada o degradación. En el trabajo de Mercapide, J; Cicco, R. y colaboradores, se sugiere la posibilidad de realizar transfecciones de inhibidores conocidos para furina o en otro caso tranfecciones de células con furina inhibida que podrían tener repercusiones en distintas propiedades tumorales de las células cancerosas. Estos cambios biológicos están directamente

relacionados con la inhibición de la activación de furina que impiden la maduración y actividad de sustratos cruciales relacionados con el cáncer, tales como el receptor de IGF1, el factor transformante del crecimiento  $\beta$  y el factor de crecimiento endotelial vascular C. Klein- Szanto y colaboradores en 2007, realizan la transfección completa de la secuencia del cDNA de ppFUR ( propiedades del prosegmento de furina) y observan que la expresión de éste en líneas celulares de carcinoma de células escamosas, muestra una relación mecanicista entre la inhibición de furina, la disminución del procesamiento de sustrato, la proliferación celular, y la capacidad invasiva. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de furina es un enfoque viable para mejorar e incluso suprimir el fenotipo maligno de diversos tumores malignos.

En el laboratorio de Bioquímica Celular donde se llevó a cabo este proyecto de tesis, se ha estudiado a furina ampliamente, su expresión distribución y papel funcional en diferentes líneas celulares (Muñoz O, 2012), así como se ha trabajado con líneas celulares que sobre- expresan el cDNA del inhibidor de furina alfa- 1PDX por transfección estable (Guillén-Hernández B, 2004), siendo estos antecedentes para nosotros de gran interés pues contamos con una técnica que permite la inhibición específica de furina.

Se ha estudiado que las transfecciones estables del cDNA del inhibidor alfa- 1PDX, codifican para un potente inhibidor de Proteín convertasas, siendo de nuestro interés furina por su ubicuidad y conocimiento previo; esto fue analizado en las células HT-29 (células de carcinoma humano de colon) y en otras líneas

celulares (Khatib A, 2006). En este trabajo demuestran que la expresión del alfa-1PDX resulta en un bloqueo del procesamiento del receptor IGF1.

Ya que los antecedentes sobre el estudio de la inhibición de furina se han realizado en líneas celulares no leucémicas; y en las leucemias, los efectos secundarios de los tratamientos hacen deseable el análisis de alternativas terapéuticas, en este trabajo decidimos investigar el efecto de la presencia del inhibidor de furina en relación a la proliferación celular.

Los resultados arrojados por nuestra investigación sugieren que existe una disminución de la proliferación celular en las células U937 transfectadas con el inhibidor específico alfa-1PDX, cuando se compara con las células controles (U937 silvestres y U937 transfectadas con el plásmido vacío). Nuestros resultados están de acuerdo con las investigaciones, antes mencionadas, realizadas por Klein- Szanto en 2007 y por otra parte apoyadas por Scamuffa N, y colaboradores en 2008, en otros tipos celulares cancerosos.

Posteriormente gracias a la técnica de western blot, logramos observar una disminución en los niveles de IGF1R y de TGF- $\beta$ , siendo ambos sustratos de furina y de nuestro interés por su papel crucial en el desarrollo del cáncer como se menciona en los antecedentes, e involucrados primordialmente en la proliferación celular (Bassi D, et al, 2005)

Se hace referencia importante que la disminución de estos valores ha sido observada con claridad tanto para el TGF- $\beta$  como para el IGFR1 en su forma madura. En cambio para la pro-forma de este receptor, nuestros resultados indican que no se encuentra procesado cuando está presente el inhibidor  $\alpha$ 1-

PDX, por lo cual asumimos que furina se encuentra impedida para realizar su actividad catalítica y originar el receptor en su forma madura y activa. Esto nos llevó a revisar la investigación realizada por Santi M y colaboradores 2016, en la cual hacen referencia al procesamiento de esta forma precursora del receptor IGF y sugieren que la presencia de esta forma inmadura es localizada sólo intracelularmente, lo cual está de acuerdo con otros reportes que indican que furina ya está activa en el TGN para poder procesar a sus sustratos (Hosaka M, et al. 1991; Vey M, et al. 1994; Schafer W, et al. 1995; Thomas G, 2002).

Por su parte Minoru Haisa en 2013 destacan que existe una diferencia en la estructura tridimensional de pro-IGF1-R en relación a la forma madura, teniendo esta última mayor complejidad. En el mismo trabajo Haisa demuestra su aprobación al usar la inhibición de furina sobre estos sustratos precursores, como un blanco terapéutico en las enfermedades relacionadas con el cáncer.

En conclusión al encontrar una disminución en los niveles de estos precursores involucrados en el cáncer y al observar la disminución de la proliferación celular gracias al ensayo MTT, tenemos evidencia suficiente para comprobar que nuestra hipótesis propuesta en este trabajo es verdadera. Además los resultados sugieren por primera vez un estudio de esta alternativa de inhibición en líneas celulares leucémicas, lo que llevaría en un futuro a nuevas estrategias terapéuticas en investigación o desarrollo.

## CONCLUSIONES

- 1) La presencia del inhibidor de la enzima furina,  $\alpha$ 1-PDX, disminuye significativamente la proliferación celular de la línea U937.
- 2)  $\alpha$ 1-PDX disminuye los niveles del IGF1-R maduro de 93 kDa y aumenta los del precursor pro-IGF1-R, por efecto de su inhibición sobre la actividad de furina.
- 3)  $\alpha$ 1-PDX disminuye los niveles de TGF- $\beta$  maduro activo en el medio extracelular, por efecto de su inhibición sobre la actividad de la convertasa furina.

## 11. Referencias

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2008). *Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition*, New York, NY, USA; Garland Science. ISBN-10:0-8153-3218-1.
- Anderson E, Molloy S, Jean F, Fei H, Shimamura S, Thomas G. (2002). The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem* 277 (15): 12879-90.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.*;116(Pt 2):217–224. doi: 10.1242/jcs.00229.
- Artenstein, A. W., & Opal, S. M. (2011). Proprotein convertases in health and disease. *The New England Journal of Medicine*, 365(26), 2507–18.
- Ayoubi, T. A. Y., Creemers, J. W. M. (1994). Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J. Biol. Chem.* 269, 9298-9303
- Baserga R. (1999). The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res*; 253:1-6.
- Bassi D, Mahloogi H, Al-Saleem L, Lopez De Cicco R, Ridge J, Klein-Szanto A. (2001). Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog*; 31: 224-32.
- Bassi D, Mahloogi H, Klein-Szanto A. (2005). Proprotein convertases: “master switches” in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog*; 28: 63-9.
- Bassi D, Mahloogi H, Lopez De Cicco R, Klein-Szanto A. (2003). Increased furin activity enhances the malignant phenotype of human head and neck cancer cells. *Am J Pathol*; 162: 439-47.
- Bergeron F, Leduc R, Day R. (2000). Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol.* Feb;24(1):1-22.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Bruzzaniti A, Mains RE. (2002). Enzymatic activity of soluble and membrane tethered peptide pro-hormone convertase 1. *Peptides*. 2002 May;23(5):863-75.

- Cameron A, Appel J, Houghten RA, Lindberg I. (2000). Polyarginines Are Potent Furin Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 275: 36741-9
- Constam, D. B. & Robertson, E. J. (2000). Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/ SPC1 during embryonic turning and heart looping. *Development* 127, 245–254 .
- Costa, E., Mocchetti, I., Supattapone, S., & Snyder, S. H. (1987). Opioid peptide biosynthesis: enzymatic selectivity and regulatory mechanisms. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1(1), 16–21.
- Creemers JW, Khatib AM. (2008 ). Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Front Biosci.* May 1;13:4960-71.
- Dey A, Norrbom C, Zhu X, Stein J, Zhang C, Ueda K, Steiner DF. (2004 ). Furin and prohormone convertase 1/3 are major convertases in the processing of mouse pro-growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology.* Apr;145(4):1961-71.
- Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB Life*, 61(5), 510–5.
- Dillon, S. L., D. M. Williamson, et al. (2012). "Propeptides are sufficient to regulate organelle-specific pH-dependent activation of furin and proprotein convertase 1/3." *J Mol Biol* 423(1): 47-62.
- Dricu A, Kanter L, Wang M, Nilsson G, Hjertman M, Wejde J, Larsson O. (1999). Expression of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) in breast cancer cells: evidence for a regulatory role of dolichyl phosphate in the transition from an intracellular to an extracellular IGF-1 pathway. *Glycobiology.*;9(6):571–579.
- Dubois C, Blanchette F, Laprise M, Leduc R, Grondin F, Seidah N. (2001). Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta-1-converting enzyme. *Am J Pathol*; 158: 305-16.
- Eipper, B. A. (2014). *Posttranslational Modification of Proteins : Expanding Nature ' s Inventory . Posttranslational Modification of Proteins : Expanding Nature ' s Inventory by Christopher T . Walsh Review by: By Betty A . Eipper The Quarterly Review of Biology , Vol . 83 ,. University Of Chicago.*
- From the Centers for Disease Control and Prevention Update: investigation of bioterrorism-related Anthrax–Connecticut. (2001). *JAMA.* 2002;287:34–35.

- Fugère M, Day R. (2005). Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends Pharmacol Sci. Jun*;26(6):294-301. Review.
- Fuller RS, Brake A, Thorner J. (1989). Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci U S A. Mar*;86(5):1434-8.
- Griffiths G, Simons K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science*.;234:438–443.
- Gu F, Crump CM, Thomas G. (2001). Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol. Life Sci.* ;58:1067–1084.
- Haisa M. (2013). The type 1 insulin-like growth factor receptor signalling system and targeted tyrosine kinase inhibition in cancer. *J Int Med Res.*;41:253–264. doi: 10.1177/0300060513476585.
- Henrich S, Cameron A, Bourenkov GP, Kiefersauer R, Huber R, Lindberg I, Bode W, Than ME. (2003). The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol. Jul*;10(7):520-6.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W., & Than, M. E. (2005). Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: Explanation of their specificity. *Journal of Molecular Biology*, 345(2), 211–227.
- Hosaka M, Nagahama M, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, Murakamy K, et al. (1991). Arg- X- Lys/Arg – Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* ; 266 (19): 12127-30
- Hoshino, A. and I. Lindberg (2012). Peptide biosynthesis: prohormone convertases 1/3 and 2. *Colloquium Series on Neuropeptides, Morgan & Claypool Life Sciences*. 1: 3-34.
- Jean F, Stella K, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Reason AJ, Thomas G. (1998).  $\alpha$ 1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: Application as an antipathogenic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 7293-8
- Jernigan JA, Stephens DS, Ashford DA, et al. (2001). Bioterrorism-related inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. *Emerg Infect Dis*;7:933--44.

- Khatib AM, Siegfried G, Chrétien M, Metrakos P, Seidah NG. (2002). *Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. Am J Pathol.* 2002 Jun;160(6):1921-35.
- Khatib, A.-M. (2006). *The ever expanding saga of the Proprotein Convertases: From bench to bedside. Regulation of carcinogenesis, angiogenesis and metastasis by the proprotein convertases (PCs): a new potential strategy in cancer therapy.* Holanda, Springer: 7-25.
- Kumar D, Das B, Sen R, Kundu P, Manna A, Sarkar A, et al. (2015). *Andrographolide Analogue Induces Apoptosis and Autophagy Mediated Cell Death in U937 Cells by Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway. PLOS ONE* 10(10):e0139657.
- Leitlein J, Aulwurm S, Waltereit R, et al. (2001). *Processing of immunosuppressive pro-TGF-beta 1,2 by human glioblastoma cells involves cytoplasmic and secreted furin-like proteases. J Immunol;* 166: 7238-43.
- Mercapide J, De Cicco L, Bassi D, Castresana S, Thomas G, Klein-Szanto A. (2002). *Inhibition of furin-mediated processing results in suppression of astrocytoma cell growth and invasiveness. Clin Cancer Res;* 8: 1740-6.
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S., & Matsuo, H. (1989). *Characterization of KEX2-encoded endopeptidase from yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochemical and Biophysical Research Communications,* 159(1), 305–311.
- Molloy SS, Anderson ED, Jean F, Thomas G. (1999). *Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. Trends Cell Biol.* ;9:28–35.
- Molloy, S.S. & Thomas, G. (2001). *In the Enzymes* 199-235 (Academic Press, San Diego, CA)Cameron A, Appel J, Houghten RA, Lindberg I. 2000. *Polyarginines Are Potent Furin Inhibitors. Journal of Biological Chemistry* 275: 36741-9
- Morash, M. G., A. B. MacDonald, et al. (2009). *"Molecular cloning, ontogeny and tissue distribution of zebrafish (Danio rerio) prohormone convertases: pcsk1 and pcsk2." Gen Comp Endocrinol* 162(2): 179-187.
- Muraoka-Cook R, Dumont N, Arteaga C. (2005). *Dual role for transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression. Clin Cancer Res;* 11: 937s-43s.
- Nakayama Kim, W.-S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T., K., & Murakami, K. (1992). *Identification of the fourth member of the*

- mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. *J. Biol. Chem.*, 267, 5897–5900.
- Nakayama, K. (1997). *Furin : a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. Biochem. J. (1997) 327, 625-635.*
- Okuma E, Inazawa Y, Saeki K, You A. (2002). *Potential role of extracellular signal-regulated kinase but not p38 during myeloid differentiation of U937 cells stimulated by cytokines: augmentation of differentiation via prolonged activation of extracellular signal-regulated kinase. Exp Hematol.;30:571–581.*
- Page RE, Klein-Zsanto AJP, Litwin S, et al. (2007). *Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. Cell Oncol; 29: 289-99.*
- Polgár, L. (2005). *The catalytic triad of serine peptidases. Cellular and Molecular Life Sciences, 62(19-20), 2161–2172.*
- Rockwell NC, Fuller RS. (2002). *Specific modulation of Kex2/Furin family proteases by potassium. J. Biol. Chem.;277:17531–17537.*
- Roebroek, a J., Creemers, J. W., Ayoubi, T. a, & Van de Ven, W. J. (1994). *Furin-mediated proprotein processing activity: involvement of negatively charged amino acid residues in the substrate binding region. Biochimie, 76(3-4), 210–216.*
- Rouillé, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., ... Steiner, D. F. (1995). *Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. Frontiers in Neuroendocrinology.*
- Scamuffa, N., F. Calvo, et al. (2006). *"Proprotein convertases: lessons from knockouts." FASEB J 20(12): 1954-1963.*
- Schafer W, Stroh A, Berghofer S, Seiler J, Vey M, Kruse ML, Kern HF, Klenk HD, Garten W. (1995). *Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. EMBO J 14: 2424-35*
- Seidah N, Benjannet S, Wickham L, et al. (2003). *The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. Proc Natl Acad Sci USA; 100 (3): 928-33*

- Seidah NG, Day R, Marcinkiewicz M, Chretien M. (1998). Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci*;839:9–24.
- Seidah, N. G. (2011). "What lies ahead for the proprotein convertases?" *Ann N Y Acad Sci* 1220: 149-161.
- Seidah, N. G. and M. Chretien. (1999). "Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides." *Brain Res* 848(1-2): 45-62.
- Seidah, N. G., & Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(5), 367–383.
- Seidah, N. G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., & Chrétien, M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for prohormone processing proteinases. *DNA and Cell Biology*, 9(10), 789.
- Seidah, N. G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M. G., ... Chrétien, M. (1991). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(1), 111–122.
- Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., ... Prat, A. (2008). The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(6-7), 1111–1125.
- Seidah, N. G., Sadr, M. S., Chrétien, M., & Mbikay, M. (2013). The multifaceted proprotein convertases: Their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), 21473–21481.
- Siezen, R. J., Creemers, J. W. M., & Van De Ven, W. J. M. (1994). Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *European Journal of Biochemistry*, 222(2).
- Soria-Valles, C., C. López-Otin, et al. (2012). "Matrix Proteases and the Degradome." *Matrix Proteases in Health and Disease*: 5.
- Taylor, N. A., W. J. Van De Ven, et al. (2003). "Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology." *FASEB J* 17(10): 1215-1227.

- Thacker C, Rose AM. (2000). A look at the *Caenorhabditis elegans* Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family. *Bioessays*;22:545–553.
- Than ME, Henri S, Bourenkov G, Bartunik HD, Huber R, Bode W. (2005). The endoprotease furin contains two essential Ca<sup>2+</sup> ions stabilizing its N-terminus and the unique S1 specificity pocket. *Acta Cryst, D61*: 505-12
- Thomas, G. (2002). *Furin at the Cutting Edge: From Protein Traffic To Embryogenesis And Disease*. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(10), 753–766.
- Update: Investigation of bioterrorism-related anthrax–Connecticut. (2001). M. M. W. R. *Morb. Mortal. Wkl. Rep.* 2001;50:1077–1079.
- Van de Ven, W. J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A. M., van Duijnhoven, H. L., ... Siezen, R. J. (1990). Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Molecular Biology Reports*, 14(4), 265–75.
- Vey M, Schafer W, Berghofer A, Klenk H, Garten W. (1994). Maturation of trans-golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, y COOH – terminal truncation. *J Biol Chem*; 127: 1829-42
- Wan L, et al. (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell.* ;94:205–216. Identifies PACS-1 as a sorting protein that localizes phosphorylated furin to the TGN. Subsequent studies, as summarized in the text, revealed additional roles for PACS-1 in protein traffic and viral pathogenesis.
- Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, Leroith D. (2002). Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res*; 62: 1030-5.
- Zhang W, Wang J, Wang Y, Dong F, Zhu M, Wan W, et al. (2015). B7-h3 silencing by rna1 inhibits tumor progression and enhances chemosensitivity in U937 cells. *Onco Targets and Therapy.* 2015;8 1721–1733.
- Zheng, M., Streck, R. D., et al. (1994). The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *J. Neurosci.* 14, 4656–4673
- Zhou A, Martin S, Lipkind G, LaMendola J, Steiner DF. (1998). Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.*; 273:11107–11114.

Zhou A, Webb G, Zhu X, Steiner DF. (1999). *Proteolytic processing in the secretory pathway. J. Biol. Chem.*;274:20745–20748.