



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Eje de Fisiología

Laboratorio de Bioquímica Celular

***“EXPRESIÓN Y LIBERACIÓN DE LAS FORMAS DE
FURINA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR Y
LA ACTIVACIÓN DE MACROFAGOS CON LPS.”***

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

PRESENTA

Jennifer Ortega Reyes

Directora: **Dra. María Rosa Padrós Semorile**

Director metodológico: **Mtra. Cenobia Silvia Durán
González**

Octubre 2015

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a Dios que siempre ha estado conmigo, que nunca me ha dejado. Siempre abrió las puertas y ventanas para que este sueño pudiera ser posible, por ser mi padre y por qué siempre me dio su gracia muy a pesar de mis limitaciones; aun cuando muchos dijeron "no es posible" el me dio el Sí y el amen.

A mi directora de Tesis la Doctora María Rosa Padrós y al Doctor Osvaldo Vindrola por acogerme en su grupo de investigación y confiar en mí para la realización de este trabajo, por su gran apoyo e inagotable paciencia, gracias por todo, tienen mi admiración, cariño y aprecio.

A la Maestra Silvia Duran por su amable guía, por los momentos gratos, las pláticas, anécdotas y aventuras en el laboratorio.

A mi padre por ser mi inspiración siempre y motivación en lo que hago, por haberme dejado muchos consejos, armas y bases fuertes para seguir adelante, para ti papito con amor.

A mi mami que después de que murió mi padre, hizo los 2 papeles, una pieza fundamental para que esta meta fuera posible, gracias mami por siempre darme ánimo, por tu paciencia, por tus consejos, tu amor, todo tu apoyo, tu ejemplo de mujer fuerte y por ser mi guía siempre, te amo.

A mis amados 3 hermanos por ser mi ejemplo, su amor y sus consejos gracias manitos, son mi orgullo, los amo con todo mi corazón.

A mi abuelita adoptiva Elizabeth Nieto Márquez por ser mi apoyo en oración y un ejemplo de Fe para mi, por el cuidado que me tuvo, muchas gracias.

A la familia Borja por ser un apoyo moral crucial en mi vida, mis mentores y amigos.

A mis grandes amigos de biomedicina a Luis, Gibrán y Rubén por brindarme su amistad sincera, siempre sentí su apoyo; por hacer los momentos de estrés tolerables, por los detalles que quedaran guardados en mi corazón, esta por demás decirles que los quiero mucho.

A Joce una gran amiga también; gracias por todos los momentos que compartimos, tu apoyo, cariño, las risas, las pláticas y por tu amistad que hizo más divertida mi estancia en la carrera, te quiero mucho amiga.

A Pili gracias por darme ánimos en algunos momentos, por orientarme, tu paciencia, te aprecio y admiro.

A mis compañeros y amigos en el laboratorio Cris, Angie, Silvana, Isra, Ofe, Arturin e Inés, ustedes hicieron muy ameno el trabajo en el laboratorio, por sus consejitos, paciencia y amistad estoy muy agradecida.

A mis compañeros Jean, Mike, Miris, Edy, Karencita y Lau ustedes siempre serán personas importantes que nunca olvidare. Gracias por esos días de convivir, viajar, estudiar, platicar, etc. los quiero mucho y Les deseo lo mejor.

ÍNDICE

	Página
1.- ABREVIATURAS	1
2.- RESUMEN.....	3
3.- INTRODUCCION.....	4
3.1 Antecedentes generales.....	4
3.1.1 Furina.....	5
3.1.2 Estructura de Furina.....	6
3.1.3 Biosíntesis de Furina.....	7
3.1.4 Localización intracelular de furina.....	9
3.1.5 Sustratos de Furina.....	10
3.1.6 Liberación de Furina.....	13
3.1.7 Exosomas.....	13
3.1.8 Estructura del os exosomas.....	15
3.1.9 Biogénesis de los exosomas.....	16
3.1.10 Secreción de exosomas.....	18
4.- ANTECEDENTES PARTICULARES	19
5.- JUSTIFICACIÓN	21
6.- HIPOTESIS	22
7.-OBJETIVOS.....	22
7.1 Objetivo general	22
7.2 Objetivos particulares	22
8.- METODOLOGÍA	23
8.1 Descongelamiento de líneas celulares	23
8.2 Cultivos celulares	23
8.3 Diferenciación celular	23
8.4 Liberación de exosomas en el medio sobrenadante	23
8.5 Obtención de exosomas	24
8.6 Obtención de sobrenadante post-exosoma	24
8.7 Concentración del sobrenadante post-exosoma	26
8.8 Obtención de extractos celulares	26
8.9 Preparación de muestras	26
8.10 Inmunoelctrotransferencia o western blot	27

9.-RESULTADOS	29
9.1 Detección de de furina por Western-blot: curva de volúmenes	29
9.2 Expresión de furina durante la diferenciación y activación de los macrófagos.	30
9.3 Obtención de exosomas en el medio extracelular	33
9.4 Liberación de furina madura de 97 kDa en los exosomas	34
9.5 Liberación de furina soluble de 82 kDa en el sobrenadante post-exosomas...	35
10.- DISCUSIÓN.....	37
11.- CONCLUSIONES	44
12.-BIBLIOGRAFÍA.....	45

1. ABREVIATURAS

μM	Micro molar
a.a	Aminoácidos
Arg	Arginina
ARNm	ARN mensajero
Atp6ap1	Proteína accesoria 1 de transporte de H ⁺ lisosomales
BMP4	proteína 4 morfogénica de hueso
Ca²⁺	Calcio
CD	Grupo de diferenciación
CK-2	Casein-kinasa 2
Cys	Cisteína
ESCRT	Complejos Endosomales de Clasificación Requeridos para el Transporte
g	Gravedades
HL-60	Leucemia promielocítica humana
IgG	Inmunoglobulina G
ILVs	Vesículas intraluminares
K⁺	Potasio
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolisacáridos
Lys	Lisina
MCH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min	Minutos

ml	Mililitro
mM	Milimolar
mV	Milivolts
MVCs	Cuerpos multivesiculares
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
Ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
PBS	Buffer fosfato salino
PC	Proprotein Convertasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNARE	Acronimo de receptor de proteínas SNAP
TBS	Buffer tris salino
TEMED	Tetrametiletilenediamina
TEMS	Microdominios enriquecidas en tetraspanina
TGN	Red Trans Golgi
Thr	Treonina
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
U-937	Leucemia monoblástica humana

2.- RESUMEN

Desde su descubrimiento en 1990, se ha demostrado que la enzima furina participa en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, a través del procesamiento de sus pro-proteínas sustrato en los compartimientos subcelulares donde esta convertasa reside y/o transita. Esta endoproteasa es de expresión ubicua y transita intracelularmente mediante dos ciclos de reciclaje desde y hacia la membrana plasmática-endosomas-TGN, y probablemente por los cuerpos multivesiculares (MVCs). No se ha esclarecido aún cuáles formas de furina se producen y liberan durante la diferenciación a macrófagos y cuáles cambian sus niveles durante la activación de los macrófagos por LPS, considerando que esta célula cumple importantes funciones durante el proceso inflamatorio.

En el presente trabajo se utilizó la línea celular U937, la cual expresa elevadas concentraciones de furina endógena y además es capaz de diferenciarse in vitro hacia macrófagos, por el agregado a los cultivos celulares, de un éster de forbol (TPA) por 48 horas. Posteriormente, los macrófagos adheridos al plástico se activaron con LPS por 4 y 24 hrs. Se analizó la presencia de las diferentes formas de furina en las células y en el medio sobrenadante por western blot realizando el Inmunorevelado con anticuerpos específicos.

Se encontró que la diferenciación celular de la línea U937 hacia macrófagos aumenta considerablemente las concentraciones intracelulares de pro-furina de 110 kDa, furina madura de 97 kDa y la forma soluble o truncada de 82 kDa: y que la activación de los macrófagos con LPS induce un aumento de furina soluble de 82 kDa con respecto a las células sin LPS.

Por otra parte, del medio sobrenadante se obtuvieron dos fracciones: los exosomas aislados por centrifugación diferencial y el medio post-exosomal. Las vesículas aisladas corresponden a exosomas, verificado por la presencia de sus proteínas marcadoras específicas: CD81, CD63, HLA- α . Además se comprobó que los exosomas liberados por los macrófagos estimulados con LPS contienen

mayores niveles de la convertasa furina de 97 kDa que los exosomas provenientes de macrófagos sin el estímulo por 4hrs y 24 Hrs.

En la fracción post-exosomal se encontró que la diferenciación a macrófagos induce un aumento de la liberación de la molécula de 82 kDa, tanto a las 4 como a las 24; y que el agregado de LPS a los macrófagos incrementa la secreción de furina soluble de 82 kDa , en un 132.9%% y 398.2% a las 4 y 24 hrs de liberación, respectivamente, en comparación con los niveles liberados por los macrófagos sin estimulación.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Antecedentes generales

El correcto procesamiento proteolítico de factores de crecimiento, receptores, moléculas de adhesión celular, toxinas bacterianas y glicoproteínas virales, etc, se debe a la acción de un grupo de enzimas serín-proteasas estructuralmente relacionadas, conocidas como Convertasas de Proproteínas parecidas a subtilisina y kexina de las levaduras (PCSKs). Estas enzimas llevan a cabo la maduración de sus sustratos generando cortes en sitios de pares de aminoácidos básicos (Fugère & Day, 2002). Hasta la fecha se han identificado siete genes distintos que codifican PCs y sus varias isoformas: PC1 (furina o PACE), PC2 (PC2), PC3 (PC1 o PC3), PC4 (PACE4), PC5 (PC4), PC6 (PC5 o PC6), PC7 (LPC, PC7 o PC8) (Bergeron, Leduc, & Day, 2000).

Todas las PCs contienen varios dominios comunes: un péptido señal en el extremo N-terminal, un propéptido de aproximadamente 80 a 100 residuos, un dominio catalítico, un dominio P y un dominio carboxilo terminal específico para cada PC (Fugère & Day, 2002). La mayor similitud entre ellas reside en el dominio catalítico, similar a la subtilisina bacteriana o a la kexina de las levaduras, el cual es de más de 330 a.a. y consiste de residuos de Aspartato, Histidina y Serina, los cuales forman la Tríada Catalítica. Las secuencias adyacentes a estos residuos también son bien conservadas, así como el dominio P, el cual es esencial para la

actividad enzimática, la modulación del pH y los requerimientos de calcio (Zhou, Martin, Lipkind, LaMendola, & Steiner, 1998) (**Figura 1**).

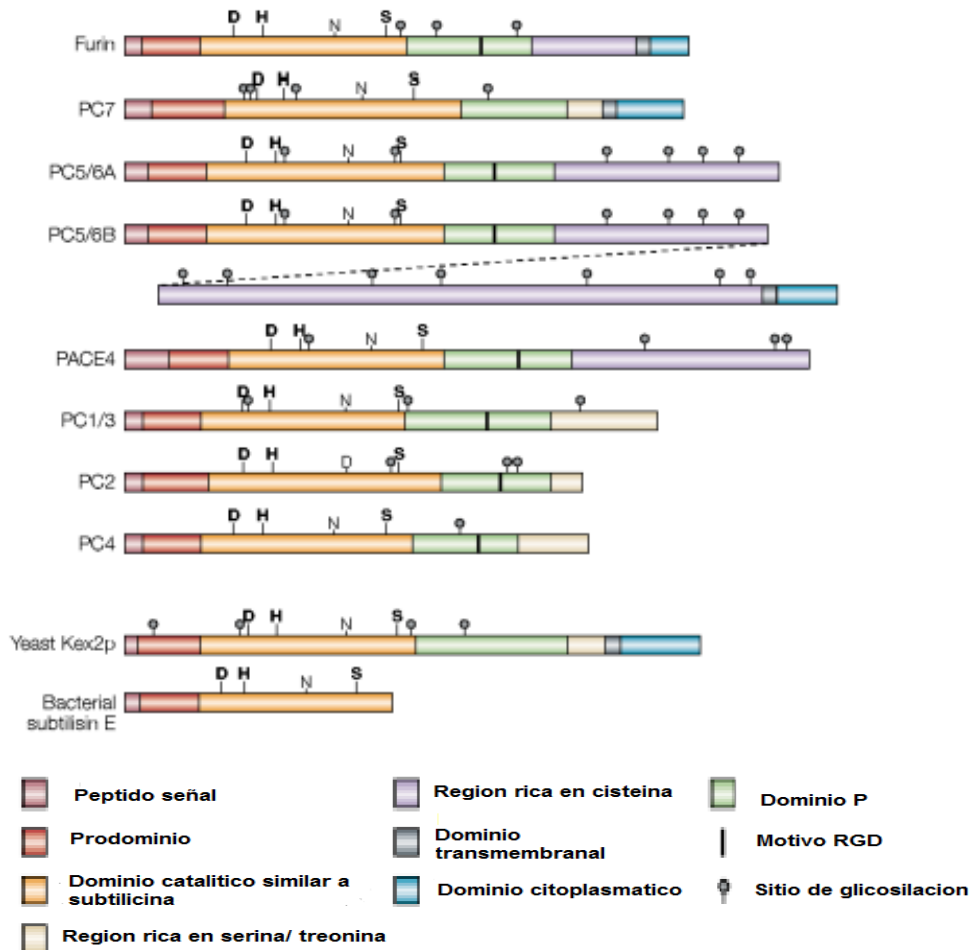


Figura 1. Diagrama esquemático de la familia Convertasas de Proproteínas. (PC's) (Thomas, 2002).

3.1.1 Furina

Por medio de una búsqueda en una base de datos, se identificó una proteína reportada previamente y que está codificada por el locus *FUR*, un marco abierto de lectura adyacente al proto-oncogen *fes/fps*, como el primer gen homólogo de mamífero de la enzima Kex2 (Roebroek, 1986) (Fuller, Brake, & Thorner, 1989).

El gen *FUR* que codifica a la enzima furina, es transcrito a partir de al menos tres promotores distintos; uno de ellos puede ser regulado, mientras que

los otros dos tienen características de promotores de genes de mantenimiento (Nakayama, 1997). A partir de la localización del gen *FES*, se concluyó que el gen *FUR* está localizado en el cromosoma 15q26.1.

Pronto se demostró que furina procesaba correctamente diversos factores de crecimiento, receptores para estos últimos, moléculas de adhesión, proteínas de la matriz extracelular y séricas, etc. (Molloy, Bresnahan, Leppla, Klimpel, & Thomas, 1992) (Bresnahan, 1990) (Wise, 1990). Además furina desempeña una importante función durante la embriogénesis, ya que los ratones knock-out de esta enzima mueren al décimo día embrionario (Thomas, 2002).

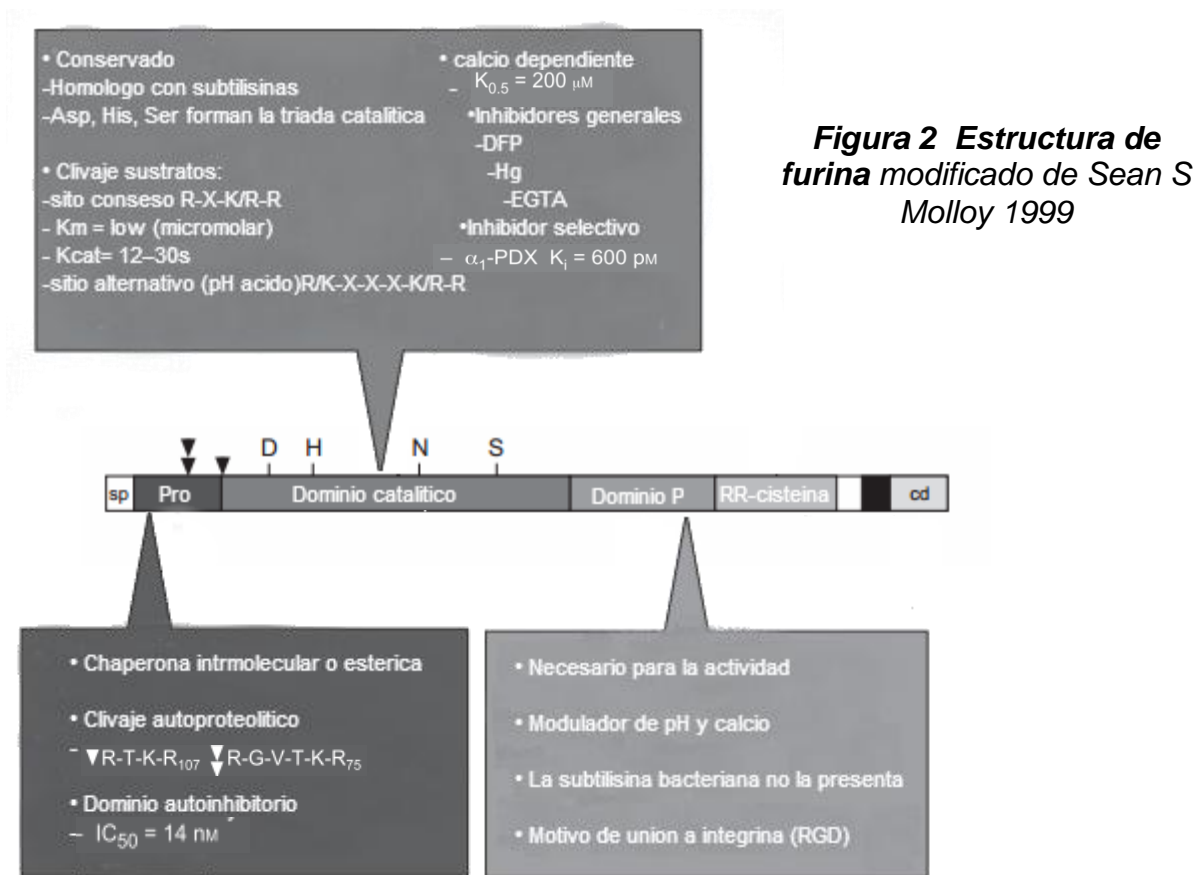
3.1.2 Estructura de furina

Furina, es una proteína transmembranal tipo-I de 794 aminoácidos, cuenta con un péptido señal unido al prodominio que está flanqueado en el extremo amino-terminal por el sitio de autoproteólisis; un dominio catalítico que se encuentra altamente conservado entre las PC en eucariotas. A dicho dominio se le denomina triada catalítica y está conformado por los aminoácidos: Aspartato, Histidina y Serina. Además esta enzima presenta un dominio P, altamente conservado en las otras PC, que es importante para el censo del pH y del calcio; una región rica en cisteína; una región transmembranal y un dominio citoplasmático. (An Zhou 1998). **(Figura 2).**

En las células, su extremo carboxilo terminal está orientado hacia el citoplasma y el amino-terminal hacia el lumen de los compartimientos intracelulares, o bien, extracelularmente (Seidah, Day, Marcinkiewicz, & Chretien, 1998). Furina lleva a cabo más del 50% de su actividad enzimática en el rango de pH de 5 a 8, dependiendo del sustrato y al igual que otros miembros de la superfamilia subtilisina-kexina es extremadamente dependiente de calcio, ya que requiere de una concentración aproximadamente de 1mM de Ca^{2+} para su actividad completa (Thomas, 2002).

Furina también se une a potasio, aunque de manera más débil. Una concentración de 20 mM de potasio incrementa la actividad de furina al mejorar la tasa del

proceso de desacilación, el cual es importante durante el ciclo catalítico de furina (Rockwell & Fuller, 2002).



3.1.3 Biosíntesis de Furina

Furina se sintetiza en el retículo endoplásmico como una pro-enzima inactivada o zimógeno, cuando es cortado el péptido señal, el prodominio de furina de 83 a.a. actúa como un pro-péptido chaperón intramolecular que dirige el plegamiento y la activación de la endoproteasa a través de un par de rompimientos en el prodominio (Figura 3), los cuales suceden mediante una serie de pasos y en un compartimiento específico, para dar lugar a la enzima activa, cuyo peso molecular es de 97kDa, mientras que el peso molecular de pro-furina es de 110kDa. (Thomas, 2002). El primer corte durante la auto-activación de furina, ($t_{1/2} = 10 \text{ min}$) ocurre en el ambiente de pH neutro del retículo endoplásmico después del residuo Arg107 dentro del sitio consenso ($-\text{Arg-Thr-Lys-Arg}_{107}^{\downarrow}-$), el cual está localizado en

el límite del dominio catalítico. El segundo corte ($t_{1/2} = 2$ hrs) es hecho después del residuo Arg75 del sitio de furina en el TGN, en donde se encuentran condiciones de pH más ácido y mayor concentración de Ca^{2+} (Thomas, 2002).

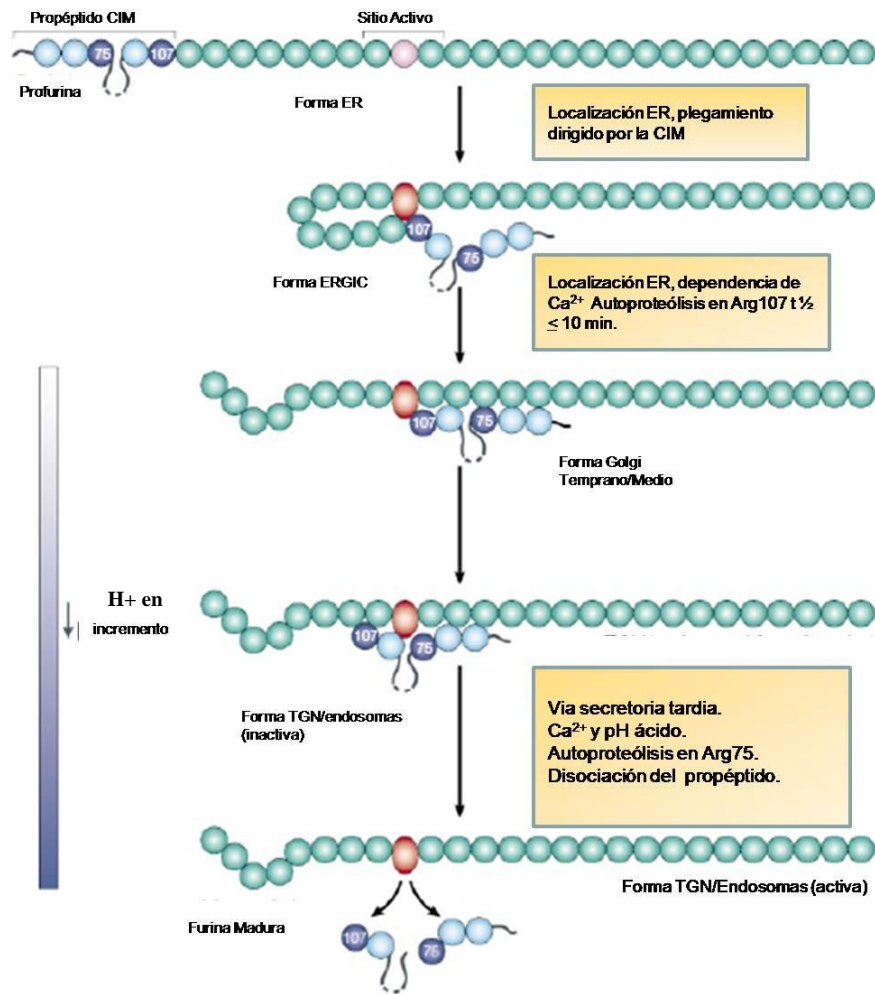


Figura 3. Autoproteólisis de Furina. (Modificado de Thomas, 2002)

3.1.4 Localización intracelular de furina

Furina se localiza en el TGN, la cual es una estructura del aparato de Golgi responsable de dirigir a proteínas de la vía secretoria a sus destinos finales, como la superficie celular, los endosomas, lisosomas y gránulos secretorios (Griffiths & Simons, 1986) (Cu, Crump, & Thomas, 2001). A partir del TGN, furina transita una vía altamente regulada a través de varios compartimientos del TGN, endosomas y la superficie celular, lo cual explica en parte la habilidad de furina de procesar una diversa gama de sustratos pro-proteicos *in vivo* (Thomas, 2002). (Ver subtema siguiente y tabla 1).

La localización de furina en el TGN y su ciclaje dinámico son controlados por secuencias contenidas dentro de su dominio citoplasmático de 56 aminoácidos. Un motivo doble compuesto por: 1) un grupo ácido capaz de ser fosforilado por casein-kinasa 2 (CK-2) que controla dos etapas de un circuito de ciclaje local y la eficiente recuperación de furina desde los endosomas hacia el TGN; y 2) un segmento próximo a membrana que contiene dos motivos hidrofóbicos (YKGL y LI) es necesario para la eficiente salida de furina desde el TGN hacia los endosomas (Figura 4). (Molloy, Thomas, VanSlyke, Stenberg, & Thomas, 1994) (Takahashi, Nakagawa, Banno, Watanabe, Murakami, & Nakayama, 1995) (Wan, y otros, 1998).

La localización constante de furina en el TGN es evidencia de que esta endoproteasa rompe los sustratos pro-proteicos en este compartimiento y que quizás además de su función de resguardar estos procesos enzimáticos, este compartimiento también podría funcionar como un reservorio estratégicamente localizado de moléculas de furina que no están activas en el procesamiento pro-proteico (Thomas, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que furina también puede procesar varios precursores proteicos en la vía endocítica, en la superficie celular y también en el espacio extracelular después de haber sido despojada proteolíticamente de sus dominios transmembranales en la membrana celular. Otros autores dicen que este corte ocurre desde el TGN. Esto significa que furina se transloca desde el aparato de Golgi a la membrana celular como una entidad molecular diferente a las previamente mencionadas, con un peso molecular de 80-

82 kDa. Se conoce que esta forma de furina soluble tiene actividad enzimática en el espacio extracelular. (Denault, Bissonnette, Longpré, Charest, Lavigne, & Leduc, 2002).

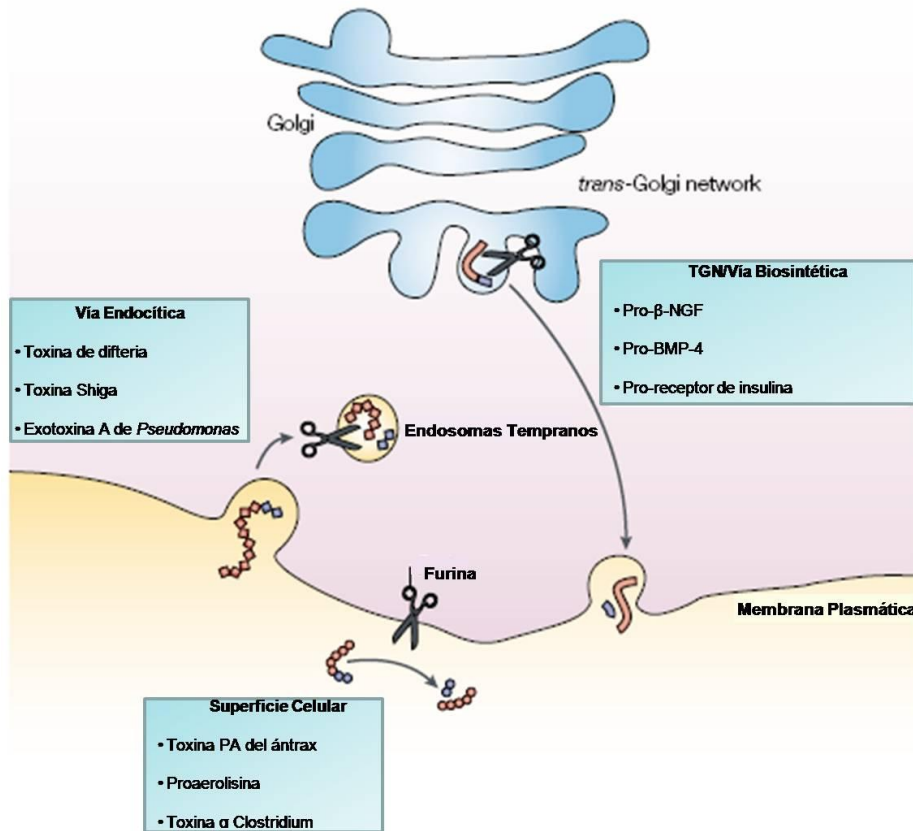


Figura 4. Compartimientos intracelulares de furina. (Modificado de Thomas, 2002)

3.1.5 Sustratos de furina

El sitio consenso que furina rompe está situado después del residuo de Arg carboxi-terminal en la secuencia $-\text{Arg-X-Lis/Arg-Arg}^{\downarrow}-$ el cual fue determinado bioquímicamente utilizando dos sustratos de furina: el antígeno protector de la toxina de ántrax (PA) y la hemaglutinina del virus de la influenza aviar (HA) (Molloy, Bresnahan, Leppla, Klimpel, & Thomas, 1992). Los residuos de Arg en las posiciones P1 y P4 del sitio de corte son esenciales, mientras que el aminoácido básico en la posición P2 (Lys/Arg) no lo es, pero puede mejorar sustancialmente la

eficiencia del procesamiento. Por lo tanto, -Arg-X-X-Arg[↓]- representa el mínimo sitio de corte de furina (Krysan, Rockwell, & Fuller, 1999). Sin embargo, algunos precursores son cortados en sitios no básicos tales como Ala, Ser, Thr, Met, Val y Leu (Seidah & Chrétien, 1999).

A diferencia de otras convertasas de pro-proteínas, la amplia distribución de furina en diferentes tejidos, permite el procesamiento y activación de una variada gama de sustratos pro-proteicos. Estudios llevados a cabo utilizando la co-expresión de furina y precursores de sustratos en líneas celulares de mamífero en cultivo han demostrado que furina es capaz de procesar precursores del factor de crecimiento nervioso-β (NGF-β), el factor von Willebrand, C3 del complemento y albúmina (Nakayama, 1997).

En la tabla siguiente se muestran algunos de los diferentes sustratos pro-proteicos que pueden ser procesados por furina.

Precusores	Precusores
<i>Factores de Crecimiento y Hormonas</i>	<i>Metaloproteinasas de Matriz</i>
Pro-factor de crecimiento nervioso β de ratón	Estromelisina-3 de Humano
Pro-factor neurotrófico derivado del cerebro porcino	MT-MMP1 de Humano
Pro-neurotrofina 3 de Humano	Pro ADAMs 10, pro ADAM 12, pro ADAM 15, TACE, pro ADAMTS1, pro ADAMTS4 y ADAMTS4.
Pro-factor de crecimiento transformante β1 de Humano	MMPs 11, MMPs 2, MMPs 3 ,Pro MMPs 2, Pro MMPs 3
Pro-sustancia inhibidora Mülleriana de Rata	<i>Glicoproteínas de Envoltura Viral</i>
Pro-factor de crecimiento parecido a insulina 1 de Humano	Gp160 del virus de inmunodeficiencia Humano
Pro-endotelina-1 de Humano	Glicoproteína B de citomegalovirus Humano
Pro-péptido relacionado de la hormona paratiroidea de Humano	Superantígeno del virus-7 de tumor mamario de ratón
Pro-hormona paratiroidea de Humano	Hemaglutinina A del virus de la influenza aviar
Pro-BMP4 y BMP4	Virus F0 de Sarampión

Pro-factor de crecimiento vasculo endotelial D (pro-VEGF-D)	Virus F0 de la enfermedad de Newcastle
Pro-PDGF cadena B	Gp E2 del virus Sindbis
Pro GDF5	Virus de parainfluenza Humano tipo 3
Factor de crecimiento parecido a insulina 1	Proteínas cápside menor L2 del papiloma virus
Factor de crecimiento parecido a insulina 2	<i>Otros</i>
<i>Receptores</i>	Pro-furina de Humano
Pro-receptor de insulina Humano	Pro-endopeptidasa 3.4.24.18 de Rata
Pro-receptor de factor de crecimiento de hepatocitos Humano	Superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn]
Pro-proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad Humano	Pro-Lactasa-Florizina Hidrolasa
Cadena α -3 de integrina Humana	Pro-7B2 de Ratón
Cadena α -6 de integrina Humana	Aerolisina
Cadena α -5de integrina	atp6ap1
Cadena α -4de integrina	BACE1
Precursor Cadena α -3 de integrina	Desmogleina 1
Pro-receptor de IGF-1,2 Humano	Pro-Desmogleina 3
Pro-receptor VEGF	Ectodisplasina-A
Pre-cubilina	PRB4 humano
<i>Exotoxinas Bacterianas</i>	Proencefalina B
Antígeno protector de la toxina de Antrax	Semaforina D
Precursor de la Toxina de la Difteria	Semaforina 3F
Exotoxina A de Pseudomonas	Vitronectina
Toxina Shiga	Fibrilina-1
<i>Proteínas Plasmáticas</i>	Gliomedina
Pro-albúmina Humana	gp40/gp15
Pro-C3 de complemento de Rata	LECT1
Pro-factor IX Humano	Pro-lipasa endotelial
Pro-factor X Humano	Pro-péptido natriurético tipo B
Colágeno tipo XXIII	
Pro-proteína C Humana	

Tabla 1. Precursores procesados por furina. (Modificado de Nakayama, 1997)

3.1.6 Liberación de Furina

La exocitosis o secreción de proteínas puede dividirse en 2 formas: constitutiva (independiente de Ca^{++}) y regulada (dependiente de Ca^{++}). La primera ocurre en todas las células y su finalidad es la de secretar componentes de la matriz extracelular o proteínas de nueva síntesis por medio de vesículas de transporte que van dirigidas a la membrana plasmática. En cuanto a la vía de secreción regulada, las moléculas cargo están almacenadas en los gránulos secretorios y luego de un estímulo externo estos gránulos se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido en el espacio extracelular. Existe también otro mecanismo de exocitosis y es el que sucede cuando los cuerpos multivesiculares (MVC) se fusionan con la membrana plasmática y subsecuentemente liberan sus vesículas intraluminares o “exosomas”; las cuales tienen su origen en la vía endocítica. [Figura 5] (Denzer, Kleijmeer et al. 2000; Keller, Sanderson et al. 2006).

Como ya se ha mencionado anteriormente, furina en su forma soluble de 80-82 kDa puede liberarse por las células por secreción constitutiva, y así actuar sobre sus proteínas sustrato en el espacio extracelular. Sin embargo, también se ha encontrado que la forma de furina madura activa de 97 kDa (forma transmembranal) también es capaz de liberarse pero por la vía de los exosomas (Anuart Munive V, 2010).

A continuación se explican las características de los exosomas y su función como comunicadores intercelulares.

3.1.7 Exosomas

Los exosomas son vesículas de un diámetro de 30-100 nm, son liberados por diversos tipos celulares, tales como: células T citotóxicas, plaquetas, células cebadas, neuronas, oligodendrocitos, células de Schwann, células epiteliales del intestino, macrófagos, linfocitos B y células tumorales. Con la ayuda de la criomicroscopía electrónica se ha podido verificar que los exosomas presentan una forma perfectamente redondeada (Conde-Vancells, Rodriguez-Suarez et al. 2008). Se encuentran presentes en diversos fluidos biológicos tales como el

semen, la sangre, la saliva, orina (Pisitkun, Shen et al. 2004), leche, líquido amniótico, líquido ascítico, líquido cerebroespinal, líquido broncoalveolar, líquido sinovial y bilis.

Además los exosomas presentan una densidad de sedimentación que varía de 1.13 g/ml a 1.21g/ml, dependiendo del tipo celular del que se trate. Es decir, los exosomas derivados de las células intestinales tienen una densidad de sedimentación de 1.19g/ml (Van Niel, Mallegol et al. 2003), mientras que para los exosomas provenientes de los linfocitos B es de 1.13g/ml y para los de las células dendríticas derivadas de monocitos es de 1.21g/ml (Schorey and Bhatnagar 2008).

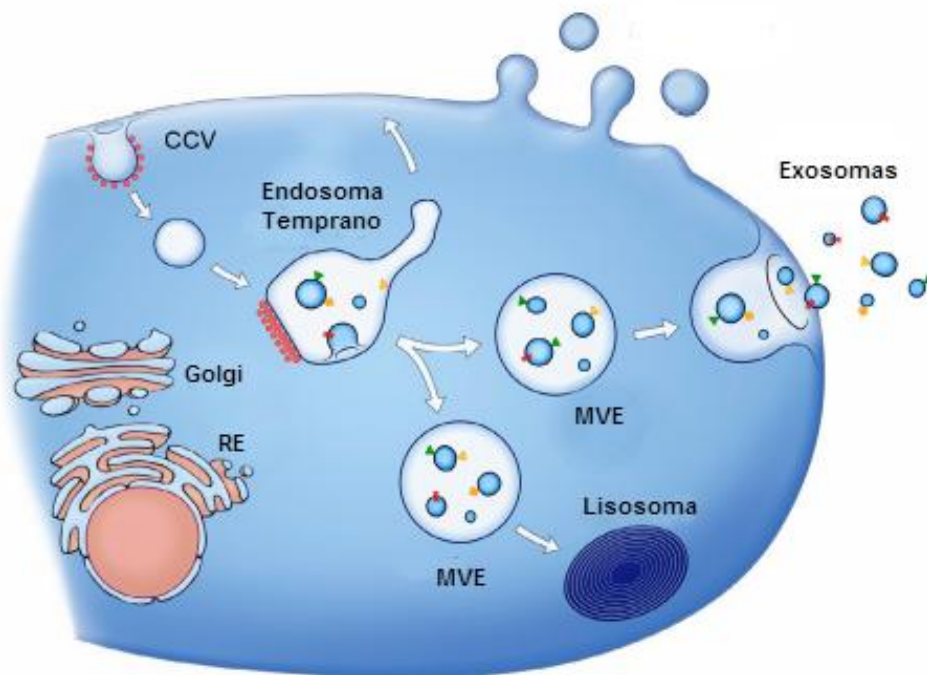


Figura 5 Liberación de exosomas y de cuerpos multivesiculares: gemación de las vesículas en los endosomas tempranos, formación de MVCs y por último la fusión de éstos a los lisosomas para su degradación o a la membrana plasmática para la liberación de exosomas.

(Modificado de Raposo 2013)

3.1.8 Estructura de los exosomas

La composición proteica de las vesículas extracelulares incluyendo en este caso los exosomas fueron determinadas por técnicas como western blotting, espectrometría de masa, análisis proteómico y separación por cuentas-magnéticas activadas por fluorescencia (Thery, Duban et al. 2002).

Los exosomas como tienen un origen endocítico no contienen proteínas del retículo endoplásmico, del núcleo o de las mitocondrias, sólo poseen proteínas del citosol y de la membrana plasmática. Por lo tanto, estas vesículas presentan proteínas que están involucradas en el transporte vesicular y aquellas que intervienen en la fusión de las mismas, como son las Rab-GTPasas, anexinas, flotilina; y proteínas involucradas en la biogénesis de los MVCs como son Alix y Tsg101 (Keller, Sanderson et al. 2006; Schorey and Bhatnagar 2008; Raposo 2013).

También los conforman una familia de proteínas de transmembranales que funcionan como marcadores característicos de los exosomas que son conocidas como tetraspaninas, entre las cuales destacan CD63, CD9, CD81, CD82 ; proteínas de choque térmico como HSC70 y HSP90; enzimas metabólicas como peroxidasas, piruvato, enolasa-1, gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa, enolasa y moléculas del MCH; proteínas citosólicas como tubulina, actina y proteínas de unión a actina y otras moléculas que están implicadas en señales de transducción como son las proteínas G heterotriméricas y proteín-quinasas (Schorey and Bhatnagar 2008). En cuanto a la composición lipídica de estas nanovesículas se ha encontrado que están ampliamente enriquecidas con colesterol, esfingomiélin y hexocilceramida a espensas de la fosfatidilcolina y fosfatiletalonamina, y en cuanto a los ácidos grasos son en su mayoría insaturados y monoinsaturados [Figura 6].(Raposo 2013).

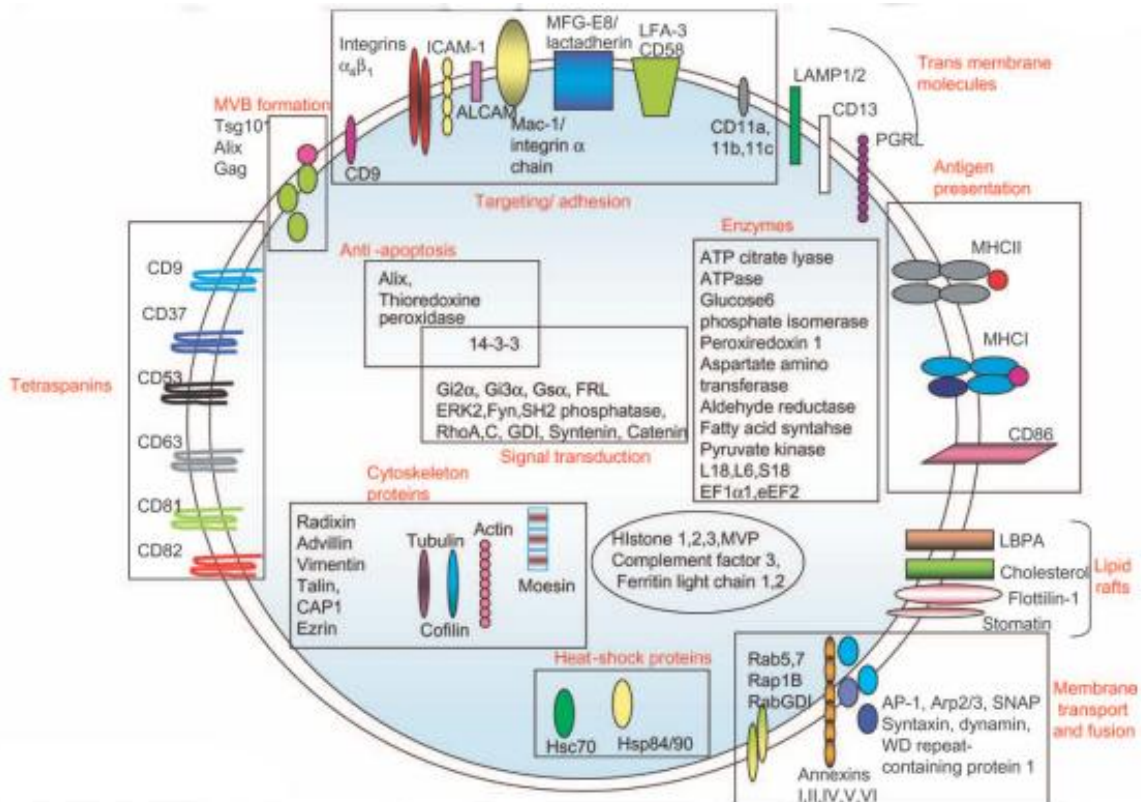


Figura 6: Composición proteica citosólica y de la membrana de los exosomas. (Schorey, j y cols. 2008)

3.1.9 Biogénesis de los exosomas

Los endosomas tempranos sufren diversos cambios y se convierten en endosomas tardíos y las moléculas cargo que contienen podrán ser degradadas o exportadas o pueden ser transportadas dentro de unas vesículas que brotan o geman dentro del lumen de los endosomas tardíos. A estas pequeñas vesículas formadas se les nombra como vesículas intraluminares (ILVs) o exosomas.

También a los endosomas tardíos se les conoce en ese momento como MVCs. Estos MVCs pueden seguir 2 rutas, la primera consiste en fusionarse con los lisosomas donde se degrada su contenido o se fusionan con la membrana plasmática y como consecuencia se produce la liberación de los exosomas [Figura 7]. Debido a que los exosomas se originan por 2 invaginaciones sucesivas: una proveniente de la membrana plasmática y la otra de los MVCs, su orientación de membrana es similar a la membrana plasmática. (Sahoo and Losordo 2014)

Algunos trabajos en levaduras y en cultivo de tejidos han ayudado a elucidar que existen 3 mecanismos importantes para la formación de los exosomas. Uno

involucra la organización de la familia de proteínas antes mencionadas como tetraspaninas que se encuentran en regiones especializadas o microdominios de la membrana (TEMS), su estructura es terciaria y cuentan con 4 dominios transmembranales variables y definen específicamente las interacciones proteína-proteína; por lo tanto los TEMS agrupan las proteínas necesarias para la formación de los exosomas a través de estas interacciones. (Jansen, Krijgsveld et al. 2009).

El segundo mecanismo para la formación de los exosomas involucra a los complejos endosomales ESCRT (Complejos Endosomales de Clasificación Requeridos para el Transporte) conformados por 20 proteínas, los cuales forman 4 complejos ESCRT I, II, III, 0 según lo reportado en estudios con levaduras mutantes. Los complejos ESCRT I, II y 0 son los encargados de secuestrar las proteínas ubiquitinizadas en la membrana endosomal, y el complejo ESCRT III se ha visto que es el responsable de la gemación de las ILVs o exosomas [Figura 7] (Schorey and Bhatnagar 2008; Akers, Gonda et al. 2013; Raposo 2013).

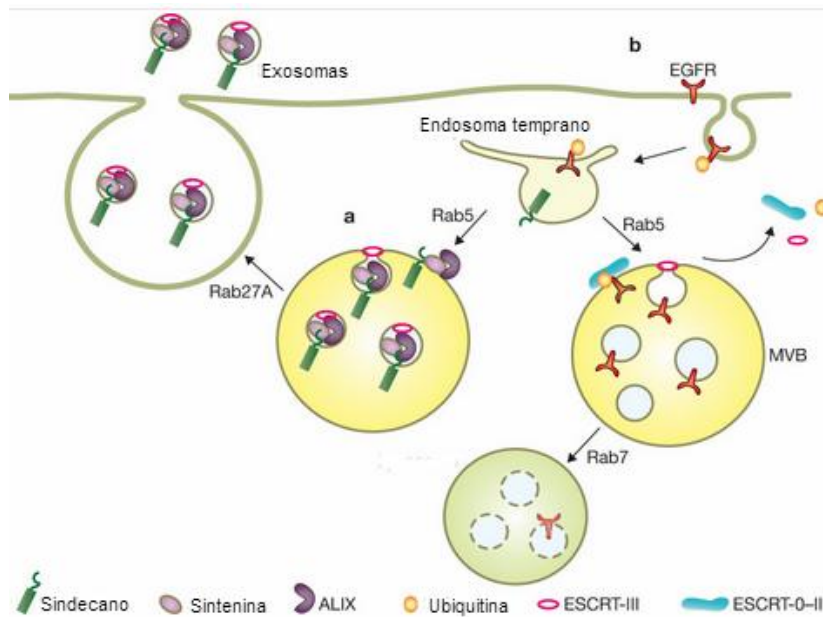


Figura 7: Funciones de los cuerpos multivesiculares en la biogénesis de los exosomas y proteínas de clasificación lisosomales.

James H. 2012

En mamíferos se ha demostrado que existen vías adicionales o alternativas para la formación de los MVC, pues mediante la inactivación de las subunidades de ESCRT pertenecientes a los 4 complejos se ha visto que no se impide totalmente

la formación de los mismos (Schorey and Bhatnagar 2008; Akers, Gonda et al. 2013; Raposo 2013)

En cuanto a los mecanismos independientes de ESCRT, se produce la hidrólisis de la esfingomielina a ceramida por las esfingomielinasas (Trajkovic, Hsu et al. 2008). La ceramida forma la curvatura negativa de la membrana promoviendo la invaginación de los exosomas. En estudios más recientes realizados en células de melanocitos se ha encontrado que la tetraspanina CD63 también forma parte de los mecanismos independientes de ESCRT (van Niel, Charrin et al. 2011).

3.1.10 Secreción de exosomas

Los mecanismos que llevan a la liberación de los exosomas son muy similares a los que están implicados en los lisosomas secretorios (Thery, Regnault et al. 1999; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008). Es un proceso en el cual están involucrados el citoesqueleto (actina y los microtúbulos), interruptores moleculares como las pequeñas GTPasas (proteínas Rab), motores moleculares como la miosina y kinesina, y la maquinaria de fusión (SNAREs) (Lakkaraju and Rodriguez-Boulan 2008; Raposo 2013).

Las proteínas Rab participan en el anclaje y unión de la vesícula, pues éstas tienen la habilidad de organizar los microdominios de membrana así como de reclutar moléculas efectoras, aunque aún falta mucho que estudiar para esclarecer la regulación de la fusión de los MVCs a la membrana plasmática (Akers, Gonda et al. 2013).

Algunos estudios sugieren que las Rab11, Rab27 y Rab35 están implicadas en la liberación de los exosomas. La participación de estas GTPasas parece ser de tipo complementario o que indirectamente regulan río arriba las vías para la secreción de los exosomas. En trabajos recientes se ha demostrado que la inhibición de cada una de estas Rab sólo afecta el proceso de liberación parcialmente (Akers, Gonda et al. 2013; Raposo 2013).

En cuanto al proceso de fusión de los MVCs con la membrana plasmática, se sabe que se produce por la acción de los complejos SNAREs y miembros de la familia

de sinaptotagmina. Ya se ha reportado un proceso similar durante la secreción y fusión convencional de los lisosomas con la membrana plasmática (Schorey and Bhatnagar 2008).

Los estudios realizados en líneas celulares de eritroleucemia humana y células cebadas indican que la secreción de los exosomas es susceptible a los cambios intracelulares de calcio (Blott and Griffiths 2002; Savina, Fader et al. 2005); mientras que en otro trabajo hecho en cultivos primarios de neuronas corticales se ha comprobado que cuando ocurre la despolarización por el ión K⁺ se ve incrementada la liberación de los exosomas (Faure, Lachenal et al. 2006).

4.- ANTECEDENTES PARTICULARES

La expresión de furina en la línea celular hemática HL-60 aumenta durante la diferenciación celular a macrófagos, tanto a nivel del ARNm como de proteína (Padrós MR y cols, 2005). La inmunoelectrotransferencia de los extractos celulares, reveló que las células HL-60 indiferenciadas contenían bajos niveles del precursor de 110 kDa y de las formas procesadas de furina de 97 kDa y otra menor, no reportada por otros investigadores, de 58 kDa. La diferenciación a macrófago aumenta el contenido de las tres formas de furina y la activación de los mismos con LPS produce un aumento del procesamiento de pro-furina (Padrós MR y cols, 2005). Sin embargo, otros autores han reportado independientemente por northern blot o por PCR, que en particular esta línea celular no expresa el ARNm del gen *FUR* o lo hace débilmente (Laprise M.H y cols., 2002; Seidah N y cols, 2012).

Cabe destacar que en el trabajo de Padrós y cols, de 2005 la extracción de proteínas celulares se realizó utilizando el buffer RIPA, como hasta ese momento se realizaba por otros grupos de investigación; y luego se reportó que esta convertasa se encuentra anclada en pequeños microdominios membranales. Posteriormente, Anuart Munive V (2010), estandarizó el método de aislamiento y purificación de exosomas; encontrando que esta forma de la convertasa de 97 kDa

está presente en los exosomas provenientes de los macrófagos de la línea HL.60 kDa en la fracción post-exosoma (Anuart Munive V 2010). Posteriormente, se estandarizó el método de purificación de exosomas liberados al medio extracelular por los macrófagos derivados de la línea celular HL-60 (Anuart Munive V, 2010). Se confirmó la existencia de una vía alternativa de secreción de furina transmembranal de 97 kDa al medio extracelular, en bajas concentraciones, en los exosomas provenientes de los macrófagos de la línea HL.60, así como la forma soluble de la enzima de 80-82 kDa en la fracción post-exosomal (Anuart Munive V, 2010).

5.- JUSTIFICACIÓN

Furina es una endoproteasa que juega un papel importante en la maduración proteolítica de moléculas precursoras de una amplia variedad de proteínas en la vía secretoria y se expresa en forma ubicua en todos los tejidos hasta ahora estudiados. (Plaimauer, Mohr et al. 2001; Denault, Bissonnette et al. 2002; Thomas 2002). Se ha demostrado 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 MVCs (Griffiths y Simons, 2001; Gu y cols, 2001, Wan y cols 1998, Molloy y cols, 1999). En un trabajo previo en el Laboratorio, se confirmó la existencia de una vía alternativa de secreción de furina transmembranal de 97 kDa al medio extracelular, en bajas concentraciones, en los exosomas provenientes de los macrófagos de la línea HL.60 sin transfectar (furina endógena), así como la forma soluble de la enzima de 80-82 kDa en la fracción post-exosomal (Anuart Munive V, 2010). Actualmente contamos en el Laboratorio con la línea celular hemática U-937, la cual sintetiza furina endógena en altas concentraciones, siendo también estas células susceptibles de diferenciarse in vitro a macrófago por el agregado de TPA.

Por otra parte, se ha demostrado que los macrófagos activados secretan una variedad de mediadores celulares como los exosomas que pueden mediar la comunicación intercelular local y sistémica.(McDonald, Tian et al. 2014).

No se ha esclarecido aún cuáles formas de furina se producen y liberan durante la diferenciación a macrófagos y cuáles cambian sus niveles durante la activación de estas células por LPS, considerando que el macrófago es una célula con gran actividad en los procesos inflamatorios. Posteriormente se podrá investigar el papel fisiológico/funcional de furina exosomal liberada por los macrófagos activados, la cascada de señalización y su participación en la regulación de la inflamación.

6.-HIPOTESIS

La expresión y liberación de la convertasa furina está incrementada en los macrófagos activados con LPS derivados de la línea celular U-937

7.-OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Analizar la expresión y liberación de las formas de la enzima Furina durante la diferenciación y la activación de macrófagos con LPS, derivados la línea celular U-937.

7.2 Objetivos particulares

1. Determinar la expresión de las formas transmembranal y soluble de la enzima furina durante la diferenciación celular a macrófagos en la línea U-937.
2. Analizar la liberación de furina en los exosomas provenientes de macrófagos activados o no por LPS.
3. Corroborar que las vesículas aisladas del medio extracelular corresponde a los exosomas mediante marcadores específicos para ellos.

8.-METODOLOGIA

8.1 Descongelamiento de líneas celulares

Primero se descongelaron los crioviales a baño maría a 37°C, y se colocaron las células en el medio correspondiente. Posteriormente se centrifugó para eliminar los restos del medio de congelación, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente. Las células se contaron en una cámara de Neubauer.

Por último se sembraron las células en un frasco T25 y se expandieron en el medio completo hasta obtener la cantidad de células suficientes para realizar la diferenciación celular.

8.2 Cultivos celulares

La línea celular U-937 se cultivó en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2mM de glutamina, 10mM de NaHCO₃, 100 UI/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomycin a 37°C en el incubador húmedo con 5% de CO₂.

8.3 Diferenciación celular

Las células indiferenciadas U-937 se cultivaron en frascos T75 a una concentración de 1.10^6 células/ml en el medio de cultivo completo. Posteriormente, se diferenciaron a macrófagos por el agregado de 10ng /ml de TPA por 48 Hrs. Un frasco T75 de macrófagos fue posteriormente incubado con LPS 50 µg/ml para su activación por otras 24 hrs.

Los macrófagos adheridos al plástico, activados o no, del frasco de cultivo se lavaron con PBS 3 veces y se despegaron en medio libre de suero. Posteriormente se procedió a obtener los extractos celulares de cada condición.

8.4 Liberación de exosomas en el medio sobrenadante

Para la liberación de exosomas, cada frasco de células indiferenciadas y diferenciadas a macrófagos con o sin activación con LPS se lavaron con medio libre de suero (tres veces) y se recolectó el medio sobrenadante luego de incubar por 4 y 24 hrs a 37°C en el incubador húmedo con 5% de CO₂.

8.5 Obtención de exosomas

****Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo o en centrifugación a 4°C****

- Se utilizó el método descrito por Raposo G. y cols 1996, y reportado por otros autores (Théry C. 2002, Denzer K. 2000, Février 2004). Los sobrenadantes de cultivo de las células diferenciadas a macrófagos se descongelaron y colocaron en hielo. La obtención de exosomas se realizó mediante centrifugaciones seriadas de estos sobrenadantes, como se indica (tabla 2).

Tabla 2

Centrifugaciones seriadas para la obtención de exosomas

	Gravedades	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Centrífuga
1	400	1,400	10	4	Beckman
2	3500	5,800	5	4	Sorvall
3	4500	6,710	5	4	Sorvall
4	10,000	9,800	30	4	Sorvall
5	14,000	16,000	30	4	Sorvall
6	100,000	35,000	60	4	Ultracentrífuga Beckman

El sobrenadante de cada paso se sometió a la siguiente centrifugación, y así sucesivamente. Luego de la ultracentrifugación a 100,000 g, el pellet obtenido se resuspendió directamente en 200 µl de buffer Laemmli 2x, y se guardó a -20°C hasta su uso en la electroforesis.

8.6 Sobrenadantes post-exosoma

El sobrenadante que queda de la ultracentrifugación, denominado sobrenadante post-exosoma contiene proteínas solubles, las cuales se concentraron en columnas de Centricon C-10. Dichas columnas se centrifugaron a 4,000 rpm durante 30 minutos a 4°C hasta obtener aproximadamente 100 µl de la solución.

Se lavaron con 1 ml de PBS centrifugando a 4,000 rpm durante 30 minutos a 4°C, para eliminar las trazas del rojo de fenol del medio de cultivo inicial. Las columnas se agitaron en el vortex para invertirla y obtener el material que quedó retenido, llevando a un volumen final de 200 µl en PBS, los cuales se guardaron a -20°C para su posterior uso en la electroforesis.

A continuación se presenta un esquema de todo el procedimiento para la purificación de exosomas (figura 8).

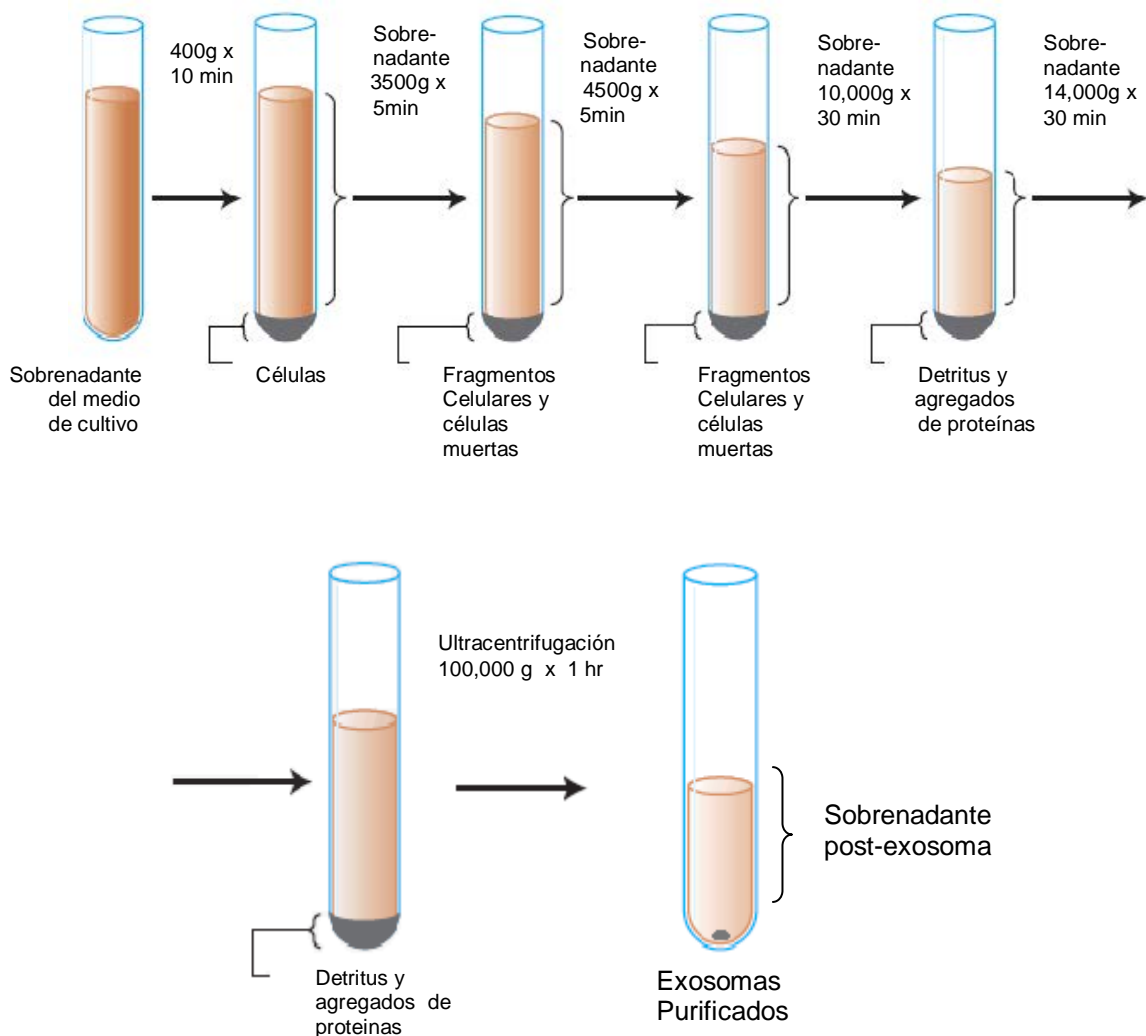


Figura 8: Proceso de purificación de exosomas y obtención del sobrenadante post-exosoma.

8.7 Concentración del sobrenadante post-exosoma

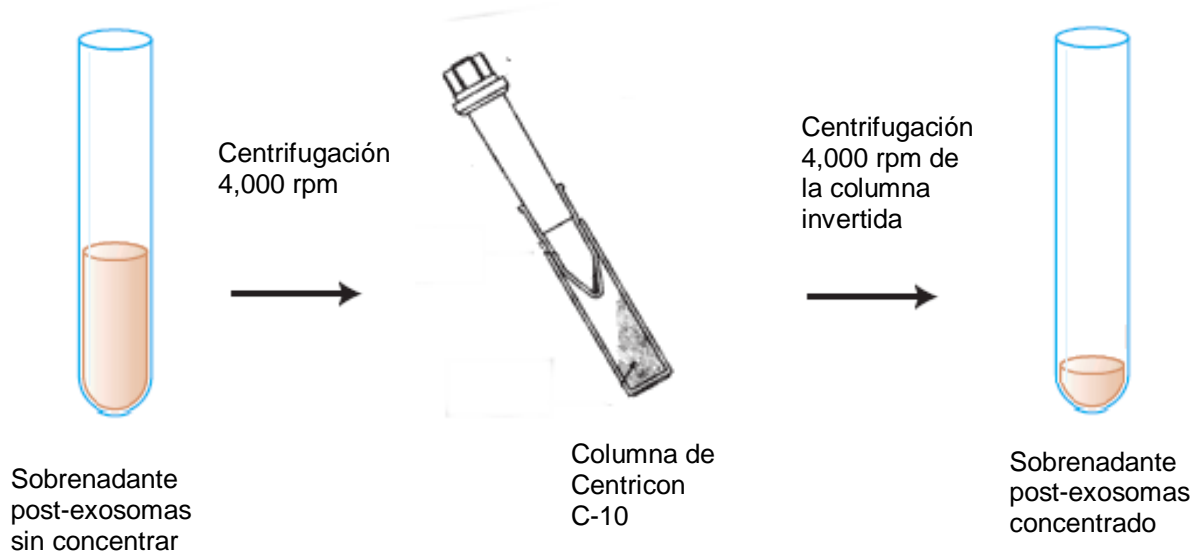


Figura 9: Concentración del sobrenadante post-exosoma

8.8 Obtención de extractos celulares

A las células y a los exosomas se les agregó la cantidad adecuada de buffer Laemmli 2X sin azul de bromo-fenol, y se dejaron incubando durante 5 min/ temperatura ambiente. Las muestras fueron hervidas por 5 min, posteriormente se homogenizaron haciendo pasajes con aguja de diferentes diámetros, y después se centrifugaron a 14,000 rpm/15 min/ 4 °C. Se separó el sobrenadante de la pastilla. Los extractos se guardaron en congelación, para luego analizarlas por western-blot.

8.9 Preparación de las muestras para electroforesis

Los extractos correspondientes a cada muestra, ya sea de células, exosomas o sobrenadante post-exosoma) se resuspendieron en buffer Laemmli 2X y después se hirvieron por 5 minutos. Igual procedimiento se realizó con el estándar de alto peso molecular. Después se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos, y así poder usarlas para la electroforesis.

8.10 Inmunolectrotransferencia o western-blot

La técnica de Western Blot, permite la identificación de proteínas mediante su separación en base a sus pesos moleculares y su identificación por medio de anticuerpos específicos. La separación se realiza por medio de una técnica llamada electroforesis donde las muestras que contienen las proteínas de interés son depositadas en una base de gel. Luego se hace pasar un campo eléctrico, y las proteínas inician su migración hacia el ánodo en relación a sus pesos moleculares, la carga neta y a la porosidad de la poliacrilamida. Posteriormente se realiza otra técnica llamada electrotransferencia, por medio de la cual las proteínas ya separadas en el gel son transferidas a una membrana de nitrocelulosa por medio de un campo eléctrico.

Finalmente la inmunodetección se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos a las moléculas que son de nuestro interés. De esta manera se visualiza la presencia y los patrones de expresión de dichas proteínas.

Para este trabajo se utilizaron geles de poliacrilamida al 8.8, 12 y 15%, para realizar los western-blot de las muestras. Se sembraron 20 μ l de cada homogenado total extraído en buffer Laemmli 2X. Como estándar de peso molecular se utilizaron 5 μ l del marcador de peso molecular de rango completo y bajo rango (Amersham, GE Healthcare) (Figura 10); diluidos en 25 μ l de buffer Laemmli 2X.

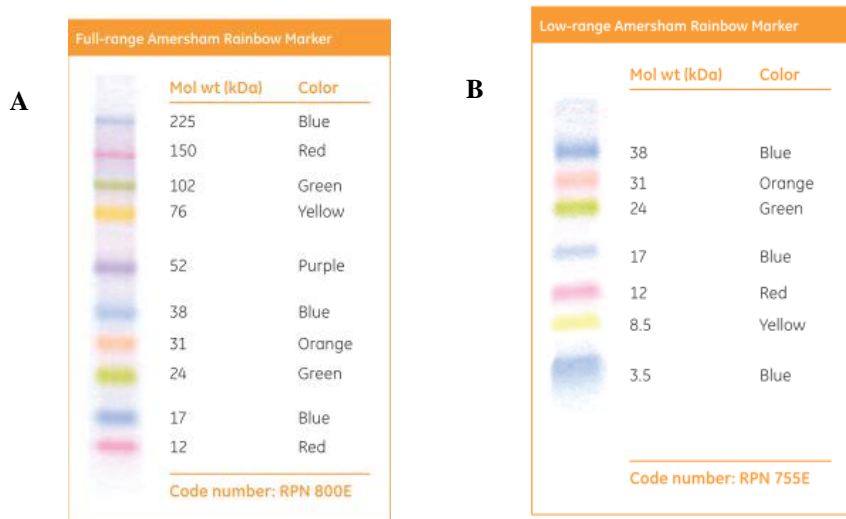


Figura 10: Estándar de peso molecular utilizado para Western Blot.

- A)** High-range Rainbows Molecular Weight Markers, Code: RPN756E.
- B)** Low-range Rainbow Molecular Weight markers.

La electroforesis se corrió a 100V/ 2 hrs 15 min, la electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa se hizo en dos tiempos a 140 V/190 mA/45 min cada uno, Se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos de la membrana con solución TBS/Tween 20 0.1% en agitación constante.

Tabla 3.

Anticuerpos empleados

<i>Anticuerpo</i>	<i>Porción reconocida</i>	<i>Procedencia</i>
anti-furina (Primario)	Dirigido contra diferentes epítopes de la región amino-terminal de furina.	Casa Comercial Santa Cruz Biotechnology, USA.
anti-CD63 (Primario)	Dirigido contra la región comprendida entre los aminoácidos 45 a 238 de origen humano.	Casa Comercial Santa Cruz Biotechnology, USA.
anti-CD81 (Primario)	Dirigido contra los aminoácidos 90-210 de CD81 de origen humano.	Casa Comercial Santa Cruz Biotechnology, USA.
anti-HLA- α (Primario)	Dirigido contra la cadena α del antígeno leucocitario humano.	Casa Comercial Santa Cruz Biotechnology, USA.
anti- β -actina (Primario)	Dirigido contra aminoácidos 76 a 375 de la actina de origen humano.	Casa Comercial Santa Cruz Biotechnology, USA.
anti-rabbit IgG (secundario)	dirigido contra las cadenas pesadas de IgG de conejo, acoplado a fosfatasa alcalina	Casa comercial Jackson Research Lab, USA.

Fuente: *Elaboración propia*

La incubación con el primer anticuerpo se hizo utilizando los primeros anticuerpos (Tabla 3.) Al siguiente día, se realizaron cuatro lavados con TBS/Tween al 0.1% por 10 minutos a temperatura ambiente, para luego incubar las membranas con el segundo anticuerpo por 1 hr a temperatura ambiente, y después se hicieron otros

cuatro lavados. Por último, el revelado de la membrana se realizó exponiéndola a la solución del Kit de color de BioRad en buffer AP.

9.- RESULTADOS

9.1 Detección de la expresión de furina por Western-blot: curva de volúmenes

Primeramente se realizó una curva de volúmenes de los extractos celulares de las células U-937 indiferenciadas en buffer Laemmli. Se sembraron 5, 10 y 20 μ l en un gel de poliacrilamida al 8.8% y para la inmunodetección se utilizó un anticuerpo específico dirigido contra diferentes epítopes de la región amino-terminal de furina.

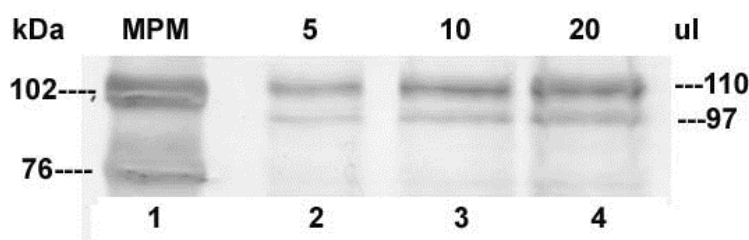


Figura 11. Curva de volúmenes de los extractos celulares de las células U-937 para furina, por western blot.

A partir de estos resultados se determinó que el volumen óptimo fue de 10 μ l, ya que las bandas de profurina de 110 kDa y su forma activa de 97 kDa se observan bien definidas (Figura 11, carril 3). Utilizando 20 μ l las bandas de ambas formas de esta convertasa aparecen más difusas. (Figura 11, carril 4).

Posteriormente se realizó la curva de volúmenes para la inmunodetección de una proteína constitutiva conocida como β -Actina, la cual nos servirá para normalizar nuestros datos al hacer las densitometrías correspondientes. El volumen óptimo de los extractos celulares para detectar esta proteína fue de igual manera de 10 μ l (Figura 12, carril 3).

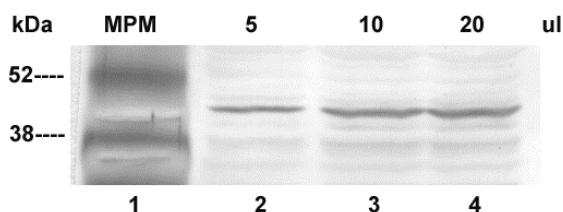


Figura 12. Curva de volúmenes de los extractos celulares de las células U-937 para β -actina, por western blot.

9.2 Expresión de furina durante la diferenciación y activación de los macrófagos

Para determinar la presencia de furina en los extractos celulares de células indiferenciadas (monoblastos), de las diferenciadas a macrófagos y a macrófagos activados por LPS realizamos un western blot en un gel al 8.8%, y la inmunodetección con el mismo anticuerpo utilizado en el experimento anterior (Figura 13).

Las formas de furina encontradas en todas las muestras fueron la forma precursora de 110 kDa, la madura de 97 kDa y la soluble de 82 kDa (Figura 13 A, carriles del 2 al 6). Los macrófagos estimulados o no con LPS muestran mayores niveles de profurina de 110 kDa, de furina madura de 97 kDa y de su forma soluble de 82 kDa comparados con las células controles indiferenciadas (Figura 13 A, comparar los carriles 3 al 6 vs el carril 2). Es decir que el proceso de diferenciación celular induce un aumento de la expresión y del procesamiento post-traducciona de la convertasa furina.

Además los macrófagos activados con LPS aumentan la presencia de la forma soluble de furina de 82 kDa cuando se comparan con los macrófagos sin el estímulo, a los dos tiempos estudiados de 4 y 24 hrs (Figura 13 A, carril 4 vs 3; y carril 6 vs 5). La Figura 13 B muestra las bandas de β -actina correspondientes a cada una de las muestras de la Figura 13 A.

Posteriormente se hizo el correspondiente análisis densitométrico mediante la aplicación del programa Image J, donde se determina la densidad óptica de las bandas de interés de la Figura 13 A y B, y se normalizan los datos con los de β -actina (Figura 13 C).

Los niveles de profurina de 110 kDa aumentan en un rango de 18% al 53.6% con respecto a las células indiferenciadas. Para la expresión de furina madura de 97 kDa y de la forma soluble de 82 kDa se observan patrones de expresión similares, con aumentos que van desde un 74.5% al 137.8% y de un 8% al 148.4%, respectivamente, en comparación con las células controles (Figura 13 C).

La estimulación de los macrófagos con LPS, por 4 y 24 hrs, solamente induce cambios en los niveles de las moléculas de 110 kDa y de 97 kDa que no superan el 25% (Figura 13 C). Por el contrario, dicha estimulación produce en los macrófagos evidentes aumentos en las concentraciones de la forma truncada de furina de 82 kDa de un 124.6 % y 55.7% a las 4 y 24 horas, respectivamente, con respecto a los macrófagos sin activación (Figura 13 C).

Este análisis densitométrico nos permite ver con más claridad dos hechos importantes: 1) que la diferenciación celular hacia macrófagos aumenta considerablemente las concentraciones de las formas de furina de 110 kDa, de 97 kDa y de 82 kDa; y 2) que la activación de los macrófagos con LPS induce un aumento de la presencia de furina soluble de 82 kDa.

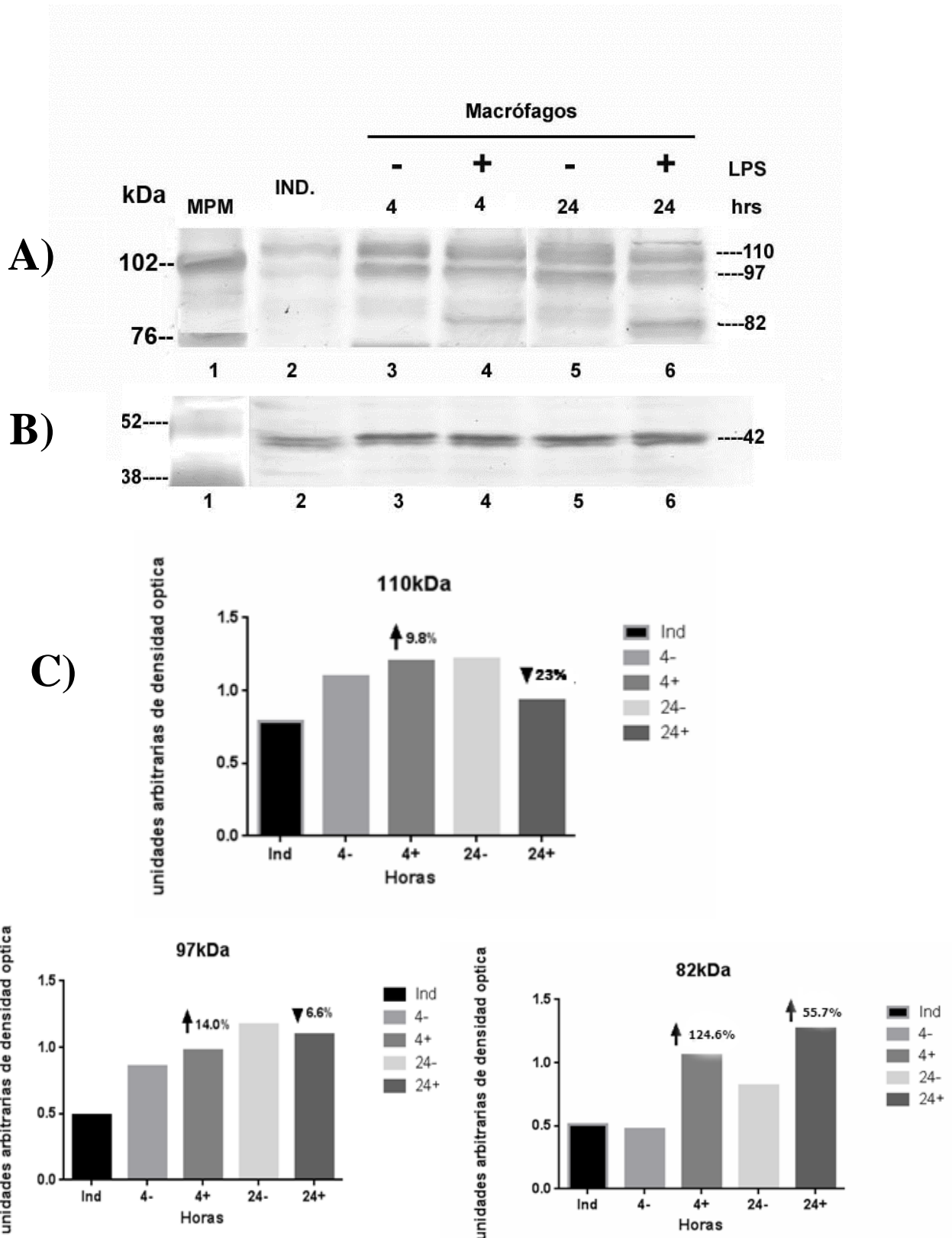


FIGURA 13: Expresión de las formas de furina durante la diferenciación celular a macrófagos de la línea U-937. A) Western blot de furina en los extractos celulares de monoblastos (células indiferenciadas), macrófagos no activados y activados por LPS por 4hrs y 24hrs. **B)** Western blot de β -actina en los extractos celulares de las muestras correspondientes de la sección A. **C)** Análisis densitométrico de las bandas de furina de PM 110 kDa, 97 kDa y 82 kDa de la sección A y normalizadas con las de β -actina de la sección B, utilizando el programa Image J.

9.3 Obtención de exosomas en el medio extracelular

Para analizar la liberación de furina en el medio extracelular se obtuvieron las microvesículas o exosomas y el sobrenadante post-exosomas. Para corroborar que las vesículas aisladas correspondían a los exosomas se realizaron western blot de estas muestras y se midió la presencia de proteínas o marcadores específicos para ellos, tales como: CD81, CD63, HLA- α y β -actina, cada uno de ellos detectados con anticuerpos específicos (Figura 14)

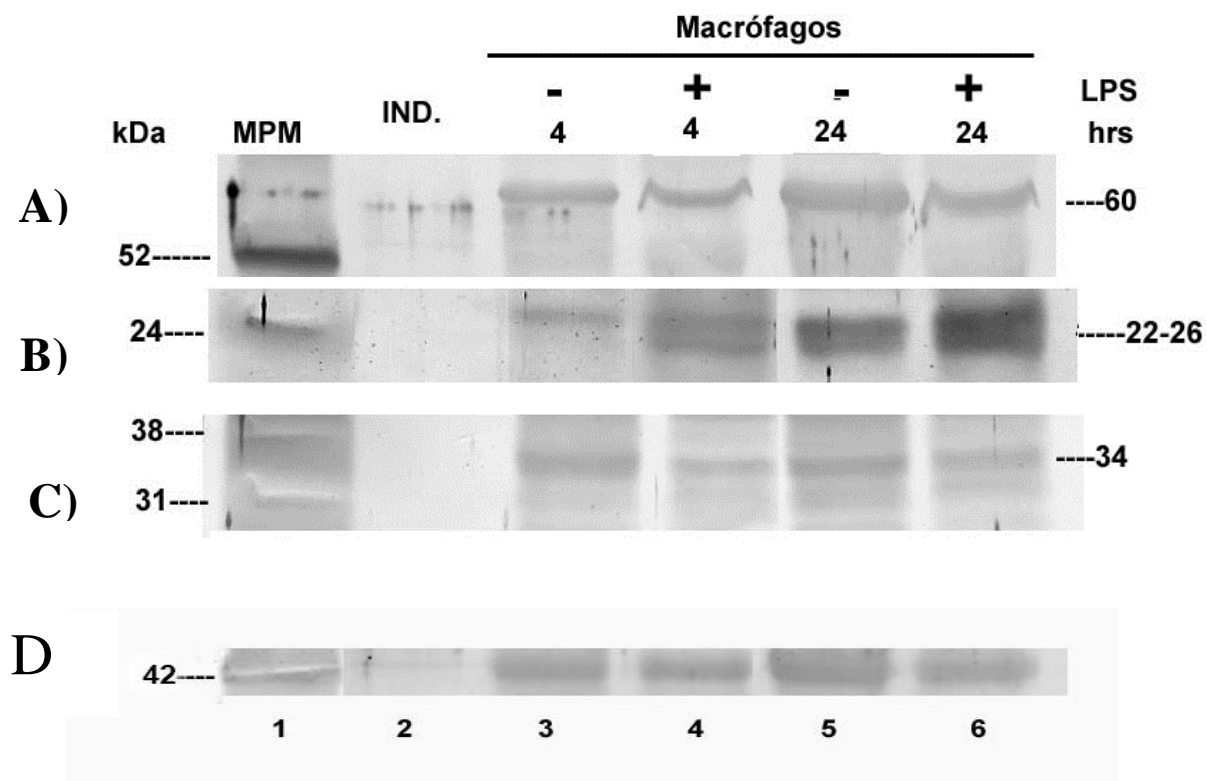


FIGURA 14 Marcadores moleculares de los exosomas liberados al medio extracelular. Células indiferenciadas (carril 2), macrófagos sin estimular por 4 y 24 hrs (carriles 3 y 5, respectivamente); y macrófagos estimulados por LPS por 4 y 24 hrs (carriles 4 y 6, respectivamente). **A)** Western blot para CD63, **B)** Western blot para CD81, **C)** Western blot para HLA- α . **D)** Western blot para β -actina.

Como se muestra en la Figura 14 A, B, C y D (carriles 2) las células indiferenciadas liberan muy baja cantidad de exosomas al medio de cultivo, dando bandas muy tenues o en algunos casos no detectables para los diferentes

marcadores moleculares. Por el contrario, los macrófagos activados con LPS (carriles 4 y 6) o sin activación (carriles 3 y 5) secretan cantidades considerables de exosomas, pudiéndose observar las bandas correspondientes a CD63, CD81, HLA- α y β -actina, tanto a las 4 como a las 24 hrs de liberación (Figura 14 A, B, C y D; carriles 3 al 6).

Para evitar que la preparación de los exosomas liberados por los macrófagos pudieran contener exosomas provenientes del suero bovino fetal (Lamparski y cols.2002; Clayton y cols. 2001) que se utiliza para el cultivo de células, dejamos liberar los mismos en medio libre de suero.

9.4 Liberación de furina madura de 97 kDa en los exosomas

Posteriormente se determinó la presencia de furina en los exosomas provenientes de las células indiferenciadas (monoblastos), macrófagos (4hrs y 24hrs) y macrófagos activados (4hrs y 24hrs) en un gel de poliacrilamida al 8.8% usando un anticuerpo específico para extremo amino-terminal de furina.

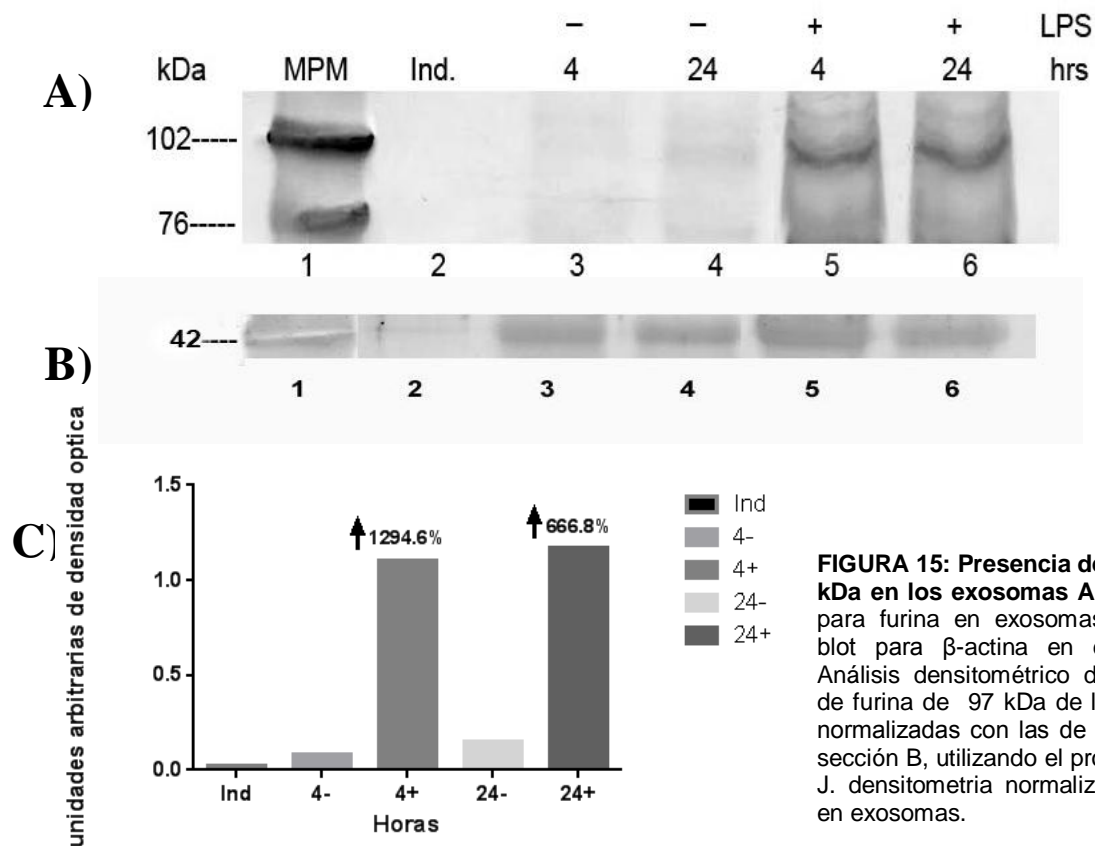


FIGURA 15: Presencia de furina de 97 kDa en los exosomas A) Western blot para furina en exosomas **B)** Western blot para β -actina en exosomas **C)** Análisis densitométrico de las bandas de furina de 97 kDa de la sección A y normalizadas con las de β -actina de la sección B, utilizando el programa Image J. densitometria normalizada de furina en exosomas.

Como se muestra en la Figura 15 A, casi no se detectan bandas correspondiente a furina madura en los exosomas (carril 2) provenientes de las células sin diferenciar, resultado esperado ya que en base a los datos obtenidos de la sección anterior Figura 14 A, B ,C, y D carriles 2, dichas células casi no secretan estas vesículas al medio extracelular.

Los macrófagos liberan exosomas en los tiempos estudiados de 4 y 24 horas y en ellos se detecta furina de 97 kDa a bajas concentraciones, lo cual se evidencia en las bandas débiles que arroja el western blot (Figura 15A, carriles 3 y 4). Mientras que bajo el estímulo con LPS, tanto a las 4 como 24 horas, los macrófagos secretan exosomas que contienen tan altos niveles de esta convertasa (Figura 15, carriles 5 y 6), que hacen que las bandas se curven un poco en la inmunoelectrotransferencia.

La densitometria correspondiente realizada con base a la expresión de la proteína de expresión constitutiva β -actina, demuestra que los niveles de furina en los exosomas liberados por los macrófagos estimulados con LPS se incrementan considerablemente vs los niveles de esta convertasa secretada en los exosomas de macrófagos sin el estímulo por 4hrs y 24 Hrs, y se producen aumentos muy elevados de dichos niveles de furina de 97 kDa, de un 1,294.6% y de 666.8%, respectivamente; (Figura 15C).

9.5 Liberación de furina soluble de 82 kDa en el sobrenadante post-exosomas

Posteriormente, se analizó la liberación de furina soluble de 82 kDa de las células indiferenciadas, los macrófagos en presencia o ausencia del LPS por 4 y 24 hrs en la fracción post-exosomas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16.

Se observa que para las células indiferenciadas casi no se detecta la banda correspondiente a esta forma de la convertasa (Figura 16 A, carril 2), dato que concuerda con los ya analizados para estas células en los extractos celulares (Figura 13 A carril 2). Es decir que en los monoblastos se produce muy poco el

procesamiento post-traducciona l hacia esta forma de furina soluble en el TGN y se liberan cantidades mínimas al medio extracelular. Sin embargo, la diferenciación a macrófagos induce un aumento de la expresión de todas las formas de furina y de la liberación de la molécula de 82 kDa, tanto a las 4 como a las 24 hrs (Figura 16 A, carriles 3 y 4, respectivamente). El agregado del LPS aumenta aún más la secreción de esta molécula en el medio post-exosomas, observándose bandas muy intensas a las 4 y 24 hrs (Figura 16 A, carriles 5 y 6).

Al realizar las densitometrías de estas bandas se aprecia un aumento en las concentraciones de furina soluble secretada de un 132.9%% y 398.2%%, a las 4 y 24 hrs de liberación, respectivamente, en comparación con los niveles de furina de 82 kDa de los macrófagos sin estimulación (Figura 16 B). Estos resultados demuestran que el LPS acelera el procesamiento post-traducciona l de furina madura de 97 kDa hacia la forma truncada y liberada de 82 kDa.

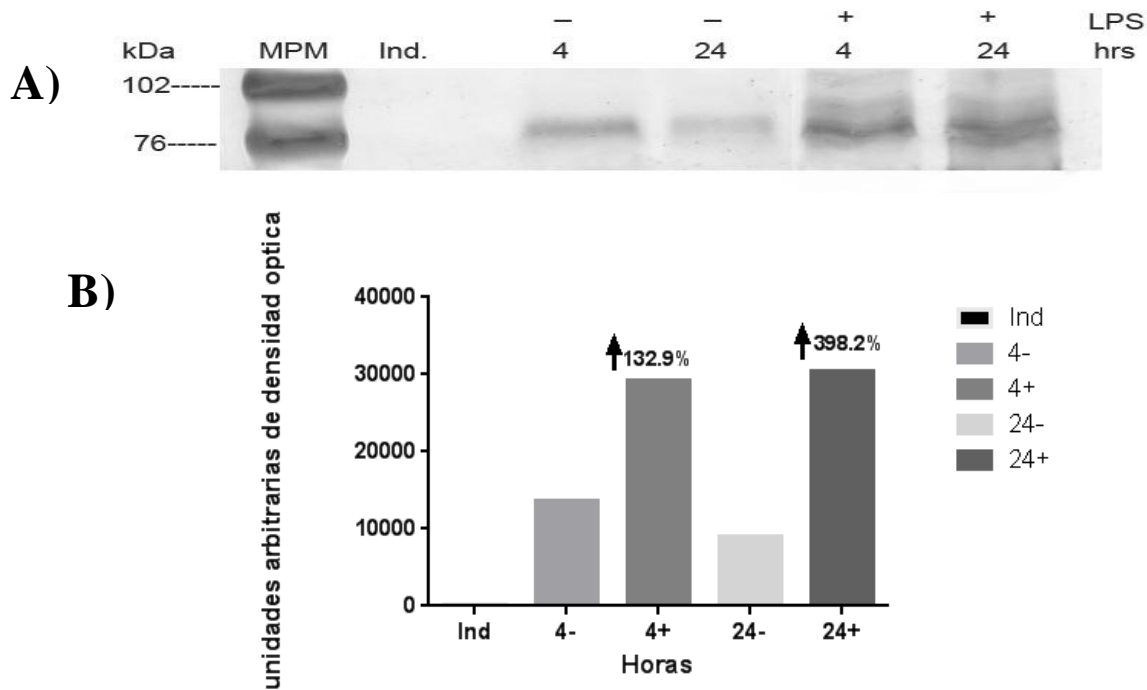


FIGURA 16 Liberación de furina soluble de 82 kDa al medio extracelular A) Western blot de furina soluble en el sobrenadante post-exosoma. B) Análisis densitométrico de las bandas de furina de 82 kDa de la sección A, utilizando el programa Image J.

10.- DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento en 1990, varios reportes en la literatura han demostrado que la enzima furina participa en una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, a través del procesamiento de sus pro-proteínas sustrato en los compartimientos subcelulares donde esta convertasa reside y/o transita. (Seidah N., 2013; Thomas G, 2002; Griffiths y Simons, 2001; Gu y cols., 2001; Wan y cols., 1998; Molloy y cols., 1999). Esta endoproteasa se expresa en forma ubicua en todos los tejidos hasta ahora estudiados. (Plaimauer, Mohr et al. 2001; Denault, Bissonnette et al. 2002; Thomas 2002).

Se ha demostrado previamente que la expresión de furina en la línea celular hemática HL-60 se ve afectada durante la diferenciación celular a macrófagos, tanto a nivel del ARNm como de proteínas. La inmunoelectrotransferencia de los extractos celulares, reveló que las células HL-60 indiferenciadas expresaban bajos niveles del precursor de 110 kDa y de las formas procesadas de furina de 97 kDa y otra menor, no reportada por otros investigadores, de 58 kDa. La diferenciación a macrófago aumentó el contenido de las tres formas de furina y la activación de los mismos con LPS producía un aumento del procesamiento de pro-furina (Padrós MR y cols, 2005). Sin embargo, otros autores habían reportado por northern blot, que en particular esta línea celular, no expresa el ARNm del gen *FUR* (Laprise M.H y cols., 2002); aunque otro grupo de investigación demostró que las células HL-60 presentan furina en bajas concentraciones, también analizada por técnicas de biología molecular, en este caso por PCR (Seidah N y cols, 2012). Teniendo en cuenta estos trabajos no quedaba bien esclarecido aún cuáles formas de furina se producen y liberan durante la diferenciación a macrófagos y cuáles cambian sus niveles durante la activación de estas células por LPS.

Por otra parte, en el trabajo de Padrós y cols, de 2005 la extracción de proteínas celulares se realizó utilizando el buffer RIPA, y un año más tarde se reportó que esta convertasa se encuentra en pequeños microdominios membranales denominados balsas lipídicas, las cuales son resistentes a la acción de Tritón X-

100 (Tellier E. y cols, 2006); por lo que el buffer RIPA no sería en su totalidad suficiente para extraer todas las formas de furina, especialmente las transmembranales de 110 y 97 kDa.

En la presente Tesis se trabajó con la línea U-937, la cual ya se ha demostrado que presenta niveles altos de furina (Seidah N y cols, 2012) y se puede diferenciar *in vitro* a macrófago con el agregado de un éster de forbol. La extracción proteica se realizó con el buffer Laemmli 2x para estar seguros de despegar las formas de esta convertasa que, como ya se ha mencionado, se encuentran en las balsas lipídicas de las membranas de las células. Se conoce que la composición química de cada solución de extracción juega un papel decisivo en los productos proteicos que serán obtenidos: y dicha composición química es diferente entre el buffer RIPA y el Laemmli 2x (Parkin y cols, 1995).

La primera solución contiene detergentes iónicos útiles en la disociación de las interacciones proteína-proteína, tales como el dodecil-sulfato de sodio a baja concentración (SDS al 0.1%) y deoxicolato de sodio; pero además contiene el detergente no iónico Nonidet P-40. En cambio, la solución Laemmli 2x contiene una mayor concentración de SDS (4%) que el buffer RIPA y un agente reductor como el β -mercaptoetanol, el cual rompe los puentes disulfuro que se puedan encontrar intra- o intercatenarios en las proteínas a extraer. Este buffer Laemmli 2x es utilizado para disociar las uniones fuertes entre proteínas y entre lípidos-proteínas. Además esta solución tiene mayor concentración de sales y un pH más bajo que la solución RIPA (Neugebauer JM, 1990).

En la presente Tesis encontramos que las células U-937 expresan pro-furina de 110 kDa y furina madura de 97 kDa. El proceso de diferenciación celular, inducido por el agregado de TPA, produjo un aumento muy notorio de la síntesis y el procesamiento post-traducciona l de la convertasa furina; dando origen así al precursor, la enzima madura y la soluble de 82 kDa. Esta última no se detecta en las células indiferenciadas.

Nuestros resultados concuerdan con los de otro grupo de investigación, quienes trabajan con la línea celular THP-1 de monocitos humanos diferenciados a macrófagos con otro éster de forbol: PMA (Stawowy P y cols, 2005). Estos autores

encuentran también un aumento de la expresión de furina madura a las 48 hrs del agregado del agente de diferenciación y determinan dicha expresión por western-blot y citometría de flujo. Sin embargo, ellos no mencionan las otras formas de furina: pro-furina y furina soluble que pudieran estar presentes en esos macrófagos.

Casi desde el descubrimiento de furina en humanos se ha reportado la formación de una forma soluble, que carece de los dominios transmembranal y citoplasmático (Wise RJ, y cols, 1990). Se ha remarcado la importancia de este cambio post-traducciona l de furina madura debido a que es un proceso observado también *in vivo* (Thimon V y cols, 2006; Paleyanda RK, 1997), y que aún después de ser escindida de la membrana, esta molécula de 80-82 kDa mantiene su actividad catalítica (Vey M. y cols, 1994; Thimon V y cols, 2006; Paleyanda RK, 1997).

Nuestros resultados además muestran que la posterior activación de los macrófagos con LPS induce un aumento de un 124,6% y 55.7% a las 4 y 24 horas, respectivamente, con respecto a los macrófagos sin activación de la presencia de furina soluble de 82 kDa; y las formas precursora y madura de esta convertasa sólo cambian ligeramente sus niveles a los tiempos estudiados. Esto puede ser debido a un aumento en la velocidad del procesamiento hacia la forma soluble. Para dilucidarlo se necesitarían realizar otro tipo de experimentos y medir la tasa de síntesis y formación de la forma truncada con experimentos de pulso y caza.

Varias evidencias experimentales han comprobado que el tráfico intracelular de furina incluye ciclos de reciclaje desde y hacia la membrana plasmática-endosomas-TGN; y probablemente CMV (Griffiths y Simons, 2001; Gu y cols., 2001; Wan y cols., 1998; Molloy y cols., 1999); y se ha demostrado que es en los CMV donde se produce la biogénesis de los exosomas (Schorey J. y cols , 2008). Por otra parte, datos anteriores en el Laboratorio indican que los macrófagos derivados de la línea celular HL-60 liberan furina transmembranal de 97 kDa al medio extracelular, en bajas concentraciones (Padrós MR y cols, 2005). Esto nos abrió nuevos interrogantes ya que está bien documentado en la literatura que la

enzima furina de dicho peso molecular se encuentra anclada en las membranas pues no ha perdido el segmento transmembranal (Thomas G, 2002). Sin embargo, existe un trabajo previo, donde reportan que las células de glioblastoma secretan furina de aproximadamente 98 kDa al medio de cultivo, pero los autores solamente muestran estos resultados en un inmunoblotting y no discuten ni investigan cómo es posible que esta forma completa de la enzima pueda liberarse (Leitlen J y cols, 2001).

Posteriormente, Anuart Munive V (2010), estandarizó el método de aislamiento y purificación de exosomas; encontrando que esta forma de la convertasa de 97 kDa está presente en los exosomas provenientes de los macrófagos de la línea HL.60 sin transfectar (furina endógena), así como la forma soluble de la enzima de 80-82 kDa en la fracción post-exosoma (Anuart Munive V 2010).

Basándonos en estos resultados y teniendo en cuenta que las células U-937 expresan mayores niveles de furina que las HL-60 (Seidah N y cols, 2012) decidimos analizar la liberación de las formas de furina al medio extracelular en los macrófagos (activados o no con LPS) provenientes de la diferenciación de esta línea celular. Para ello obtuvimos y purificamos la fracción exosomal y la post-exosomal, según se detalla en Materiales y Métodos.

Los macrófagos liberan exosomas en los tiempos estudiados y en ellos se detecta furina de 97 kDa a bajas concentraciones; mientras que bajo el estímulo con LPS, tanto a las 4 como 24 horas, los macrófagos secretan exosomas que contienen muy elevados niveles de furina de 97 kDa, que van de un 1,294.6% y de 666.8%, respectivamente.

El tráfico intracelular de furina tiene similitud con el del receptor de transferrina, reportado por Pan y cols en 1985. Este receptor es continuamente internalizado en los endosomas de reciclaje, regresa a la superficie celular y es secretado en exosomas cuando la célula se diferencia de reticulocito a eritrocito, como una vía de eliminación de proteínas que ya no son necesarias. En el presente trabajo, los macrófagos activados con LPS liberan mayores cantidades de la molécula de 97 kDa vía exosomas al medio extracelular. Pero a diferencia de lo que ocurre con el receptor de transferrina no creemos que ésta sea una forma de eliminar la furina

innecesaria. Es posible, aunque no podemos verificarlo en este proyecto de Tesis, que furina madura de 97 kDa se encuentre activa en los exosomas y que pueda continuar actuando a niveles parácrinos y/o yuxtácrinos (Schorey J. y cols, 2008). Furina madura puede degradar directamente proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina) e incluso factores de crecimiento, citocinas y receptores de la superficie celular; o a través de sus pro-proteínas sustrato iniciando la cascada enzimática de las metaloproteinasas: MT1-MMP, MMP-2 y MMP-9, las cuales tienen una participación activa en el proceso inflamatorio y la migración de los macrófagos (Zhou A y cols, 1999; Roebroek y cols, 1986; Stawowy P y cols, 2005, Seidah N y cols, 2012).

Además la presencia de los marcadores exosomales CD63, CD81, HLA-I α y β -actina en las pastillas luego de ultracentrifugar a 100,000 g confirma que las organelas obtenidas son exosomas. Se ha demostrado que los primeros tres son proteínas integrales de membrana y están presentes en los exosomas provenientes de macrófagos (Théry y cols, 2001; Nguyen y cols, 2003; Pelchen y cols, 2004). CD63 y CD81 son miembros de la superfamilia TM4 de glicoproteínas leucocitarias y son tetraspaninas que contienen cuatro regiones transmembranales. En general se conoce que las tetraspaninas intervienen en la biogénesis de los exosomas permitiendo la invaginación de la membrana intraluminal en los CMV (Théry y cols, 2001; Nguyen y cols, 2003; Pelchen y cols, 2004; Schorey J. y cols, 2008).

Por otra parte, desconocemos el mecanismo por el cual el LPS induce una mayor secreción de furina madura de 97 kDa en los exosomas. Es probable que las vías de transducción que se generan por este activador produzcan una mayor fosforilación del dominio de serinas del extremo carboxilo-terminal de furina, y así pueda iniciar el proceso de formación de vesículas intraluminares. Shapiro y cols, en 2004, reportan que la fosforilación del dominio de serinas juega un papel importante actuando como una señal de microdominio activa que mediaría el ingreso de furina a los endosomas tardíos.

En cuanto a la fracción post-exosomas, encontramos que ésta contiene la furina soluble de 82 kDa. Los monoblastos liberan cantidades mínimas de esta molécula

al medio extracelular. Sin embargo, la diferenciación a macrófagos que induce un aumento de la expresión de todas las formas de furina, además promueve la liberación de la molécula de 82 kDa, tanto a las 4 como a las 24 hrs. El agregado del LPS aumenta aún más la secreción de esta molécula en el medio post-exosomas, observándose un incremento en sus concentraciones de un 132.9% y 398.2%, a las 4 y 24 hrs de liberación, respectivamente, en comparación con los niveles de furina de 82 kDa de los macrófagos sin estimulación.

Estos datos no se corresponden en su totalidad con los reportados por otros grupos de investigación, los cuales realizan transfecciones con diferentes construidos de furina, y encuentran concentraciones menores de la forma secretada de 80-82 kDa en relación a los de furina unida a la membrana (Halban PA y cols, 1994; Thomas G, 2002; Wells y cols, 1983). Además, si bien furina es una proteína que se encuentra constantemente en el TGN, la isoforma predominante en ese compartimento subcelular es la que está unida a la membrana pues la forma soluble, al carecer del segmento citosólico, no posee las secuencias de retención en esta organela, pudiendo ser fácilmente exocitada.

Algunos autores reportan varios sitios consenso de corte que pueden dar lugar a la molécula de furina soluble o truncada (80-82kDa).

Dichos sitios corresponden a aminoácidos básicos únicos que se encuentran en una región cercana a residuos de cisteínas previo al dominio transmembranal (Plaimauer, Mohr, Wernhart, Himmelspace, Dorner, & Schlokot, 2001) (Vidricaire, DeNault, & Leduc, 1993). Los sitios probables de corte se sitúan en las posiciones Arg 637, 677, 683, 693, 703 y 705 (Vidricaire, DeNault, & Leduc, 1993). Aunque de éstos solamente se ha demostrado que el sitio de corte ocurre en Arg 683, 693, 703 y 705; y que además la integridad de la región rica en cisteínas le confiere la estabilidad conformacional necesaria para que se realice la ruptura (Plaimauer, Mohr, Wernhart, Himmelspace, Dorner, & Schlokot, 2001).

En conclusión, el proceso de diferenciación celular hacia macrófagos induce un incremento del contenido celular de las diferentes formas de furina, el cual aumenta aún más con la posterior activación de estas células con LPS. Además, corroboramos que furina madura transmembranal de 97 kDa se libera vía exosomal y la soluble de 82 kDa lo hace por la vía secretoria constitutiva. Ambas formas de esta convertasa liberadas podrían actuar sobre sus pro-proteínas sustrato de la matriz extracelular para permitir la migración y extravasación de los macrófagos al sitio de inflamación, así como sobre receptores de membrana de citocinas proinflamatorias, como es el caso del receptor para TNF- α .

11.- CONCLUSIONES:

1. La diferenciación celular de la línea U937 hacia macrófagos aumenta considerablemente las concentraciones intracelulares de las formas de furina de 110 kDa, de 97 kDa y de 82 kDa.
2. La activación de los macrófagos con LPS induce un aumento de la presencia de furina soluble de 82 kDa con respecto a las células sin LPS.
3. Las vesículas aisladas en el medio sobrenadante corresponden a exosomas, verificado por la presencia de sus proteínas marcadoras específicas: CD81, CD63, HLA- α y β -actina.
4. Los exosomas liberados por los macrófagos estimulados con LPS contienen mayores niveles de la convertasa furina de 97 kDa que los exosomas provenientes de macrófagos sin el estímulo por 4hrs y 24 Hrs.
5. La diferenciación a macrófagos induce un aumento de la expresión y liberación de la molécula de 82 kDa, tanto a las 4 como a las 24.
6. El agregado del LPS a los macrófagos incrementa la secreción de furina soluble de 82 kDa en el medio post-exosomal, en un 132.9%% y 398.2%%, a las 4 y 24 hrs de liberación, respectivamente, en comparación con los niveles liberados por los macrófagos sin estimulación.

12.- BIBLIOGRAFÍA

- Abemayor, E., & Sidell, N. (1989). Human neuroblastoma cell lines as models for the in vitro study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environmental Health Perspectives* , 80, 3-15.
- Akers, J. C., D. Gonda, et al. (2013). "Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies." *J Neurooncol* 113(1): 1-11.
- An Zhou, S. M., Gregory Lipkind, Joseph LaMendola, and Donald F. Steiner (1998). "Regulatory Roles of the P Domain of the Subtilisin-like Prohormone Convertases." *J. Biol. Chem.* 1998 Vol. 273, No. 18(May 1): 11107–11114.
- Anuart Munive V "liberación de furina mediada por exosomas en sublinea HL-60/ α 1-PDX" [Tesis] Puebla; Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2010.61p.
- Bergeron, F., Leduc, R., & Day, R. (2000). Subtilase-like pro-protein convertases: From molecular specificity to therapeutic applications. *Journal of Molecular Endocrinology* , 24, 1-22.
- Bhatnagar, S. and J. S. Schorey (2007). "Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory." *J Biol Chem* 282(35): 25779-25789.
- Blott, E. J. and G. M. Griffiths (2002). "Secretory lysosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(2): 122-131.
- Bobrie, A. and C. Thery (2013). "Unraveling the physiological functions of exosome secretion by tumors." *Oncoimmunology* 2(1): e22565.
- Bresnahan, P. A. (1990). Human fur gene encodes a yeast Kex2-like endoprotease that cleaves pro- β -NGF in vivo. *J. Cell. Biol.* , 111, 2851-2859.
- Chertova, E., O. Chertov, et al. (2006). "Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages." *J Virol* 80(18): 9039-9052.
- Chretien, M., & Li, C. H. (1967). Isolation, purification and characterization of γ -lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can. J. Biochem.* , 45, 1163-1174.

Colin Adrain , Markus Zettl , Yonka Christova, Neil Taylor1, y Matthew Freeman (2012). "Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE" *Science*. January 13; 335(6065): 225–228.

Conde-Vancells, J., E. Rodriguez-Suarez, et al. (2008). "Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes." *J Proteome Res* 7(12): 5157-5166.

Cu, F., Crump, C., & Thomas, G. (2001). Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol. Life Sci.* , 58, 1067 - 1084.

Davis L, Kuehl M, Battey J. *Basic Methods in Molecular Biology*. 1996 2^a Edición. Editorial Appleton and Lange.

Denault, J., L. Bissonnette, et al. (2002). "Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region." *FEBS Lett* 527(1-3): 309-314.

Denault, J., L. Bissonnette, et al. (2002). "Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region." *FEBS Lett* 527(1-3): 309-314.

Denault, J.-B., Bissonnette, L., Longpré, J.-M., Charest, G., Lavigne, P., & Leduc, R. (2002). Ectodomain shedding of furin: kinetics and role of the cysteine-rich region. *FEBS Letters* , 527, 309 - 314.

Denzer K, van Eijk M, et al. (2000) "Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*. 2000 Aug 1;165(3):1259-65.

Denzer, K., M. J. Kleijmeer, et al. (2000). "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device." *J Cell Sci* 113 Pt 19: 3365-3374.

Duguay J., S., & et.al. (1997). Processing of Wild-type and Mutant Proinsulin-like Growth Factor-IA by Subtilisin-related Proprotein Convertases. *The Journal of Biological Chemistry* , 272 (10), 6663-6670.

Duman S., R., Nakagawa, S., & Malberg, J. (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* , 25 (6), 836-844.

Edsjö, A., Holmquist, L., & Pahlman, S. (2006). Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Seminars in Cancer Biology*.

Elisabetta Rovida, Alessandro Paccagnini, Mario Del Rosso, Jacques Peschon, y Persio Dello Sbarba (2001). "TNF- α -Converting Enzyme Cleaves the Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor in Macrophages Undergoing Activation" *The Journal of Immunology*, 166: 1583–1589.

Englund, C., & et.al. (2005). NeuN expression correlates with reduced mitotic index of neoplastic cells in central neurocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* , 31 (4), 429-438.

Faure, J., G. Lachenal, et al. (2006). "Exosomes are released by cultured cortical neurones." *Mol Cell Neurosci* 31(4): 642-648.

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., y otros. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 84, 7413-7417.

Fugère, M., & Day, R. (2002). Inhibitors of the Subtilase-Like Pro-Protein Convertases (SPCs). *Current Pharmaceutical Design* , 8 (7), 549-562.

Fuller, R. S., Brake, A. J., & Thorner, J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* , 246, 482-486.

Gerdes, H.-H., & Kaether, C. (1996). Green Fluorescent Protein: Applications in Cell Biology. *FEBS Letters* , 44-47.

Griffiths, G., & Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* , 234, 438-443.

Halban PA, Irminger JC. 1994. Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem J* 299 (Pt 1): 1-18

Hallbergson, A. F., Gnatenco, C., & Peterson, D. A. (2003). Neurogenesis and Brain Injury: Managing a renewable resource for repair. *J. Clin. Invest.* , 112 (8), 1128-1133.

Harrington, A., Leiner, B., Blechschmitt, C., Arevalo, J., Lee, R., Morl, K., y otros. (2004). From the cover: secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 101, 6226-6230.

Irène Juhan-Vague, Gilles Nalbone, Franck Peiretti. 2006. Experimental Cell Resesarch. 312: 3969–3980. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts

Jansen, F. H., J. Krijgsveld, et al. (2009). "Exosomal secretion of cytoplasmic prostate cancer xenograft-derived proteins." *Mol Cell Proteomics* 8(6): 1192-1205.

Johnstone, R. M., M. Adam, et al. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." *J Biol Chem* 262(19): 9412-9420.

Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., & Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine- cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* , 37, 1075-1089.

Keller, S., M. P. Sanderson, et al. (2006). "Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function." *Immunol Lett* 107(2): 102-108.

Krysan, D. J., R|ockwell, N. C., & Fuller, R. S. (1999). Quantitative Characterization of Furin Specificity. *The Journal of Biological Chemistry* , 274 (33), 23229-23234.

Lacayo, N. J. (14 de Noviembre de 2007).

Lakkaraju, A. and E. Rodriguez-Boulan (2008). "Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity." *Trends Cell Biol* 18(5): 199-209.

Laprise M.H., Grondin F., Cayer P., McDonald P.P. and Dubois C.M. (2002). *Blood* 100: 3578-3587.

Leduc, R., Molloy, S., Thorne, B., & Thomas, G. (1992). Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* , 267, 14304-14308.

Lee, R., Kermani, P., Teng, K., & Hempstead, B. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* , 294, 1945-1948.

Lim, K.-C., Tyler M., C., Lim T., S., Giuliano, R., & Federoff J., H. (2007). Proteolytic processing of proNGF is necessary for mature NGF regulated secretion from neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 599-604.

Loechel, F., B. J. Gilpin, E. Engvall, R. Albrechtsen y U. M. Wewer (1998). "Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease." *J Biol Chem* 273(27): 16993-7.

Magavi, S. S., & Macklis, J. D. (2001). Manipulation of neural precursors in situ: Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Neuropsychopharmacology* , 25 (6), 816-835.

McDonald, M. K., Y. Tian, et al. (2014). "Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain." *Pain* **155**(8): 1527-1539.

Misawa, K., Nosaka, T., Morita, S., Kaneko, A., Nakahata, T., Asano, S., y otros. (1999). A method to identify cDNAs based on localization of green fluorescent protein fusion products. *PNAS* , 97 (7), 3062-3066.

Molloy, S. S., Bresnahan, P. A., Leppla, S. H., Klimpel, K., & Thomas, G. (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* , 267, 16396-16102.

Molloy, S. S., Thomas, L., VanSlyke, J. K., Stenberg, P. E., & Thomas, G. (1994). Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *The EMBO Journal* , 13 (1), 18-33.

Mullen J., R., Buck R., C., & Smith M., A. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* , 116, 201-211.

Nakayama, K. (1997). "Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins." *Biochem J* 327 (Pt 3): 625-635.

Neugebauer JM. 1990. Detergents: An overview. *Methods Enzymol.* 182: 239-250.

Padrós MR. Expresión de furina durante la diferenciación celular de la línea celular HL-60 y clones HL-60/ α 1-PDX. XXV Congreso Nacional de Bioquímica. Ixtapa, México. Noviembre 2004.

Pahlman, S., Hoehner, J., Nanberg, E., Hedborg, F., Fagerstrom, S., Gestblom, C., y otros. (1995). Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur. J. Cancer* , 453-458.

Paleyanda RK, Drews R, Lee TK, Luboń H. 1997. Secretion of Human Furin into Mouse Milk. *Journal of Biological Chemistry* 272: 15270-4.

Pan, B. T., K. Teng, et al. (1985). "Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes." *J Cell Biol* 101(3): 942-948.

Parkin MC, Wei H, O'Callaghan JP, Kennedy Rt. 2005. Sample-dependent effects on the neuropeptidome detected in rat brain tissue preparations by capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77: 6331-6338.

Pearson DJ, Nirunsuksiri W, Rehemtulla A, Lewis SP, Presland RB, Dale BA. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Experimental Dermatology.* 2001;10(3) 193-203.

Pegtel, D. M., M. D. van de Garde, et al. (2011). "Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion." *Biochim Biophys Acta* 1809(11-12): 715-721.

Peiretti F, Canault M, Deprez-Beauclair P, Berthet V, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G. Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Experimental Cell Research.* 2003;285(2) 278-285.

Pisitkun, T., R. F. Shen, et al. (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36): 13368-13373.

Plaimauer, B., G. Mohr, et al. (2001). "'Shed' furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus." *Biochem J* 354(Pt 3): 689-695.

Raposo, G. a. S., W. et a (2013). "' Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends'." *J. Cell Biol.* 200: 373–383.

Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." *J Exp Med* 183(3): 1161-1172.

Rockwell, N. C., & Fuller, R. S. (2002). Specific Modulation of Kex2/Furin Family Proteases by Potassium. *The Journal of Biological Chemistry* , 277 (20), 17531-17537.

Roebroek, A. J. (1986). Characterization of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Mol. Biol. Rep.* , 11, 117-125.

Roghani, M., J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst y C. P. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." *J Biol Chem* 274(6): 3531-40

S.L., P., Larsson, O. E., Grotte, G., & Nilsson, K. (1981). Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int. J. Cancer* , 28, 583-589.

Sahoo, S. and D. W. Losordo (2014). "Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction." *Circ Res* 114(2): 333-344.

Savina, A., C. M. Fader, et al. (2005). "Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner." *Traffic* 6(2): 131-143.

Schlondorff, J., J. D. Becherer y C. P. Blobel (2000). "Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE)." *Biochem J* 347 Pt 1: 131-8.

Schorey, J. S. and S. Bhatnagar (2008). "Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology." *Traffic* 9(6): 871-881.

Seidah NG and Prat A. 2012. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews Drug Discovery* 11: 367-383.

Seidah, N. G., & Chrétien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Research* , 848, 45-62.

Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., y otros. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem. J.* , 314, 951-960.

Seidah, N. G., 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.

Siegfried, G., & et.al. (2003). The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* , 111, 1723-1732.

Stawowy P., Meyborg H., et al. (2005).Furin-Like Proprotein Convertases Are Central Regulators of the Membrane Type Matrix Metalloproteinase–Pro-Matrix Metalloproteinase-2 Proteolytic Cascade in Atherosclerosis. *Circulation.* 111:2820-2827.

Steiner, D., Cunningham, D., Spigelman, L., & Aten, B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* , 157, 697-700.

Takahashi, S., Nakagawa, T., Banno, T., Watanabe, T., Murakami, K., & Nakayama, K. (1995). Localization of Furin to the trans-Golgi Network and Recycling from the Cell Surface Involves Ser and Tyr Residues within the Cytoplasmic Domain. *The Journal of Biological Chemistry* , 270 (47), 28397-28401.

Taupin, P., & Gage, F. (2002). Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of Neuroscience Research* , 69, 745-749.

Tellier E, Matthias Canault, Laure Rebsomen, Bernadette Bonardo, Irène Juhan-Vague, Gilles Nalbone, Franck Peiretti. 2006. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Experimental Cell Research* Volume 312, Issue 20, Pages 3969–3980.

Théry C , Zitvogel L, Amigorena S. (2002) "Exosomes: composition, biogenesis and function" *Nat Rev Immunol*. 2002 Aug;2(8):569-79.

Théry, C., A. Regnault, et al. (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." *J Cell Biol* 147(3): 599-610.

Théry, C., L. Duban, et al. (2002). "Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." *Nat Immunol* 3(12): 1156-1162.

Thimon V, Belghazi M, Dacheux J-L, Gatti J-L. 2006. Analysis of furin ectodomain shedding in epididymal fluid of mammals: demonstration that shedding of furin occurs in vivo. *Reproduction* 132: 899-908

Thomas, G. (2002). "Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(10): 753-766.

Trajkovic, K., C. Hsu, et al. (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." *Science* 319(5867): 1244-1247.

Van Niel, G., J. Mallegol, et al. (2003). "Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice." *Gut* 52(12): 1690-1697.

van Niel, G., S. Charrin, et al. (2011). "The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis." *Dev Cell* 21(4): 708-721.

Vey M, Schafer W, Berghofer S, Klenk HD, Garten W. 1994. Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* 127: 1829-42

Vey, M., Schäfer, W., Berghöfer, S., Klenk, H.-D., & Wolfgang, G. (1994). Maturation of the trans Golgi Network Protease Furin: Compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage and COOH terminal truncation. *The Journal of Cell Biology* , 127 (6), 1829-1842.

Vidal, M., P. Mangeat, et al. (1997). "Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation." *J Cell Sci* 110 (Pt 16): 1867-1877.

Vidricaire, G., DeNault, J. B., & Leduc, R. (1993). Characterization of a secreted form of human furin endoprotease. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* , 195 (2), 1011-1018.

Walker J. M. *Basic protein and peptide protocols* (1995) Human Press, 1^a edición;

Wan, L., Molloy, S. S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Ryback, S. L., y otros. (1998). PACS-1 Defines a Novel Gene Family of Cytosolic Sorting Proteins Required for trans-Golgi Network Localization. *Cell* , 94, 205-216.

Wells JA, Ferrari E, Henner DJ, Estell DA, Chen EY. 1983. Cloning, sequencing, and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 11: 7911-25

Whitt, M., Buonocore, L., & Rose, J. K. (2006). Liposome-Mediated Transfection. En *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc.

Wise, R. J. (1990). Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc. Natl Acad Sci.* , 87, 9378-9382.

Zhou A, Webb G, Zhu X, Steiner DF. 1999. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem* 274: 20745-8