



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

# EVALUACIÓN DE ECTODOMINIOS DE E-CADHERINA, SINDECANO-1 Y SINDECANO-2 Y SU IMPLICANCIA EN CÁNCER DE PRÓSTATA

MEMORIA PARA OPTAR EL TÍTULO DE BIOQUÍMICO Y MAGISTER EN BIOQUÍMICA

## VALENTINA DANITZA MUÑOZ ROJAS

**Director de Memoria**  
Dr. Héctor Contreras Muñoz  
Programa de Fisiología y Biofísica  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**Santiago - Chile**  
**2010**

Dedicado a mis padres, Cristina y Juan por todo su apoyo.

## Agradecimientos

A mis padres Cristina y Juan que me han incentivado y acompañado siempre, a mi hermana Karina y Óscar que siempre se han preocupado y dado una mano en todo. Y a mi peluda Nice, que siempre al llegar a mi casa, me hacía olvidar todos los experimentos frustrados y malos ratos.

A Dr. Héctor Contreras y Dr. Enrique Castellón por darme la oportunidad de ser parte de su Laboratorio, asesorarme en este largo camino y aportar con críticas constructivas para mi formación. Y por permitir perdurar el grato ambiente del Laboratorio, aguantar mis bromas y obras de arte pegadas en el refrigerador. A mis compañeros del Lab: Vivi, Sol, Ale, Juan, Che Paola e Inga por soportarme día a día con mis locuras, animarme y ayudarme hasta cuando los Western Blot parecían sonreír. Quiero agradecer en especial a Graciela Caroca por su gigante-enorme-gran voluntad, disposición y mucha paciencia hasta enseñarme cosas básicas que todo BQ llega sin saber. Y por supuesto a Catherine Sánchez, por su graaaaaaaaan paciencia en responder las dudas de todos en el Lab, una tras otra, orientarme y apoyarme en el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos Ame, Clau, Blanca, Feitu y Alonso que me hicieron llevaderos estos años de Universidad, más afuera que dentro de las salas, y tantas risas, ideas y toxi-jugos que compartimos. Y para todos lo que pasaron por el selecto y reducido grupo de “Los de atrás” que a punta de Publímetros, payasadas y afirmar la pared, hicieron que los años de Universidad fuesen entretenidos!

Al profe’ Dante, Margarita y Gladys, gracias por siempre recibirme con una sonrisa, enseñarme lo importante del lado humano en este mundo lleno de experimentos y *papers* e instruirme en mis primeros años de ciencia y Universidad.

Y a todos los que han pasado en estos años, más de alguno se me debe haber olvidado, pero ustedes saben que tengo pésima memoria...

Memoria realizada en el Laboratorio de Andrología Celular y Molecular perteneciente al Programa de Fisiología y Biofísica del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La dirección de este proyecto estuvo a cargo del profesor Dr. Héctor Contreras y contó con el financiamiento parcial del proyecto FONDECYT 11060500.

---

**TABLA DE CONTENIDOS**

	Pág.
Índice.....	iv
Índice de Tablas y Figuras.....	vii
Abreviaturas .....	ix
Resumen .....	x
Summary .....	xi

---

**INTRODUCCIÓN**

1.1 Próstata	1
1.1.1 Anatomía e Histopatología de la Próstata	1
1.2 Cáncer de Próstata	3
1.2.1 Perspectiva General	3
1.2.2 Estadística y Epidemiología	4
1.2.3 Métodos de Diagnóstico y Pronóstico	5
1.3 Moléculas de Adhesión	7
1.3.1 Sindecano-1	10
1.3.2 Sindecano-2	14
1.3.3 E-Cadherina	16

---

**HIPÓTESIS**

2.1 Hipótesis	19
2.2 Objetivo general	19
2.3 Objetivo específicos	19

---

**MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1	Materiales	
3.1.1	Reactivos químicos	21
3.1.2	Líneas comerciales	21
3.2	Metodología	
3.2.1	Cultivos celulares	22
3.2.2	Muestras de plasma sanguíneo	23
3.2.3	Extracción y determinación de proteínas	23
3.2.4	Recolección de medios condicionados	24
3.2.5	Western Blot	24
3.2.6	Zimografía	25
3.2.7	Inmunofluorescencia	26
3.2.8	Enzimoimmunoanálisis (ELISA)	27
3.2.9	Análisis estadístico	28
3.2.10	Diseño experimental	29

---

**RESULTADOS**

4.1	Expresión de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares	30
4.2	Localización celular del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares	34
4.3	Evaluación del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares	36
4.4	Evaluación del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en medios condicionados de CaP de distintos pasajes	39
4.5	Determinación de la actividad de MMP-9 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares	41
4.6	Presencia de ectodominios de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en plasmas sanguíneos de individuos chilenos	42

**DISCUSIONES**

5.1	Expresión de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares	46
5.2	Ectodominios de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares	49
5.3	Ectodominios de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en plasmas sanguíneos de hombres chilenos	52

---

	<b>CONCLUSIONES</b>	56
--	---------------------	----

---

	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	57
--	---------------------	----

---

## INDICE DE TABLAS

	Pág.	
Tabla 1	Predisposición de patologías prostáticas	3
Tabla 2	Incidencia y mortalidad del Cáncer de Próstata	4
Tabla 3	Mortalidad por carcinoma prostático en Chile	4
Tabla 4	Condiciones experimentales de <i>Western Blot</i>	25
Tabla 5	Condiciones experimentales de Inmunofluorescencia	26
Tabla 6	Condiciones experimentales de ELISA Indirecto	28
Tabla 7	Demografía de los individuos evaluados	42

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Ubicación de la próstata	1
Figura 2	Anatomía de la próstata	2
Figura 3	Moléculas de adhesión celular	7
Figura 4	Estructura de Sindecanos	8
Figura 5	Cadherinas y la movilidad celular	9
Figura 6	Estructura de Sindecano-1	10
Figura 7	<i>Shedding</i> de Sindecano-1	13
Figura 8	Estructura de Sindecano-2	14
Figura 9	Estructura de E-Cadherina	16
Figura 10	<i>Shedding</i> de E-Cadherina	17
Figura 11	Esquema de ELISA Indirecto manual	28
Figura 12	Diseño experimental del proyecto	29
Figura 13	Ensayo de viabilidad celular a distintas condiciones y tiempos	30
Figura 14	Nivel proteico de E-Cadherina en cultivos primarios y líneas celulares	31
Figura 15	Nivel proteico de Sindecano-1 en cultivos primarios y líneas celulares	32
Figura 16	Nivel proteico de Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares	33
Figura 17	Localización de los ectodominios de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios de CaP e HPB	34



---

Figura 18	Localización de los ectodominios de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en líneas celulares	35
Figura 19	Niveles del ectodominio de E-Cadherina en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares	37
Figura 20	Niveles del ectodominio de Sindecano-1 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares	37
Figura 21	Niveles del ectodominio de Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares	38
Figura 22	Evaluación del ectodominio de E-Cadherina en medios condicionados de cultivos de CaP de distintos pasajes	39
Figura 23	Evaluación del ectodominio de Sindecano-1 en medios condicionados de cultivos de CaP de distintos pasajes	40
Figura 24	Evaluación del ectodominio de Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos de CaP de distintos pasajes	40
Figura 25	Evaluación de la actividad de MMP9 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares	41
Figura 26	Determinación del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en plasmas sanguíneos de hombres chilenos	43
Figura 27	Representación de los niveles de ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 del grupo CaP según grado <i>Gleason</i>	44
Figura 28	Evaluación del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en plasmas sanguíneos mediante <i>Western Blot</i>	45

**ABREVIATURAS**

BSA	Albúmina de suero bovino
DMEM	Medio Dulbecco modificado
CAD	Cadherina
CAM	Molécula de Adhesión Celular
CaP	Cáncer de Próstata
cDNA	DNA complementario
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CS	Condroitin Sulfato
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DHT	Dihidrotestosterona
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Fluoresceína Isotiocianato
GAGs	Glicosaminoglicanos
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HS	Heparan Sulfato
MMP	Metaloproteinasa de matriz extracelular
mRNA	RNA mensajero
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio
PBS	Tampón fosfato salino
PGs	Proteoglicanos
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PSA	Antígeno prostático específico
SDS-PAGE	Electroforesis de geles de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente (25°C)
TBS	Tampón Tris salino
TEM	Transición epitelio - mesenquimal
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ZO-1	Zona Ocluyente 1 (zonula ocludens)

## RESUMEN

El carcinoma prostático es la patología tumoral con mayor incidencia en hombres en el mundo. A pesar del uso de métodos de *screening* como el PSA Libre versus PSA Total, posee una mortalidad de un 11%. Los estudios clínicos están enfocados en la búsqueda de complementos para el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad.

Uno de los primeros cambios en las células tumorales es la transición epitelio-mesenquimal. La modificación en la expresión de moléculas de adhesión lleva a pérdida de la morfología y ganancia de marcadores mesenquimáticos. A pesar de ser un proceso poco estudiado, la liberación proteolítica o *shedding*, del ectodominio de proteínas transmembrana puede no sólo significar una forma de regulación, sino formas de eliminar factores inhibitorios unidos a la célula, capturar factores solubles o actuar como polipéptido solubles con capacidad paracrina.

En el presente estudio, se analizaron las proteínas E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos celulares primarios de cáncer de próstata e hiperplasia benigna prostática y en líneas celulares derivadas de metástasis de carcinoma prostático PC3 y LNCaP. Los estudios demostraron expresión celular de las tres proteínas, *shedding* de E-cadherina y Sindecano-1 y un rol tumorigénico de Sindecano-2 en Cáncer de Próstata. En líneas celulares PC3 y LNCaP se confirmó la existencia de *shedding* en ambos casos, con un aumento estadísticamente significativo en PC3 lo que permite relacionar el proceso de *shedding* con células con mayor capacidad agresiva. Finalmente, los polipéptidos originados del corte del ectodominio fueron encontrados en plasmas sanguíneos, corroborando su difusión y dando pie para ser analizados en otros fluidos del organismo.

Los resultados permiten sugerir la realización del *shedding* en otras proteínas transmembrana, su utilización para pronóstico y posible blanco terapéutico en cáncer de próstata.

## SUMMARY

Prostate carcinoma is the tumoral pathology with the greatest incidence on men around the world. Despite the use of screening methods like Free PSA versus Total PSA, it has a mortality of 11%. Clinical studies are focused on finding complements for the diagnosis and prognosis of this illness.

One of the first changes in the tumor cells is the epithelial-mesenchymal transition. The modification in the expression of cell adhesion molecules leads to morphology loss and mesenchymal markers gain. Despite being a not much studied process, the proteolytic release (or shedding) of the transmembrane protein ectodomain could not only mean a regulation way, but also ways of removing inhibiting factors joined to the cell, catching soluble factors or acting as soluble polypeptides with paracrine capability.

In the present study, E-Cadherin, Syndecan-1 and Syndecan-2 proteins were analyzed in primary cell cultures of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia, and also in cell lines (PC3 and LNCaP) derived from prostate carcinoma metastasis. Studies showed cell expression of the three proteins, E-Cadherin and Syndecan-1 shedding, and a tumorigenic role of Syndecan-2 in the prostate cancer. In PC3 and LNCaP cell lines it was confirmed the existence of shedding with a statistically significant PC3 increase, which allows to relate the shedding process to cells that have more aggressive capability. Finally, polypeptides originated from the ectodomain cut were found in blood plasmas, which confirms their spreading and gives occasion to polypeptides for being analyzed in other fluids of the organism.

The results obtained allow to suggest that shedding is performed in other transmembrane proteins, and also allow to project its use to prognosis and possible therapeutic target in prostate cancer.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 PRÓSTATA

### 1.1.1 ANATOMÍA E HISTOLOGÍA PROSTÁTICA

La próstata es una glándula exocrina perteneciente al aparato genitourinario masculino. Su principal función es aportar con el 30% del líquido seminal mediante proteínas y enzimas que favorecen la movilidad y nutrición de los espermatozoides. Se encuentra ubicada en la cavidad abdominal bajo la vejiga, rodeando un segmento de la uretra (Fig. 1), hacia donde vierte su secreción. Su forma es similar a una castaña, con el vértice hacia abajo y la base hacia arriba, de coloración blanquecina y consistencia firme [82].

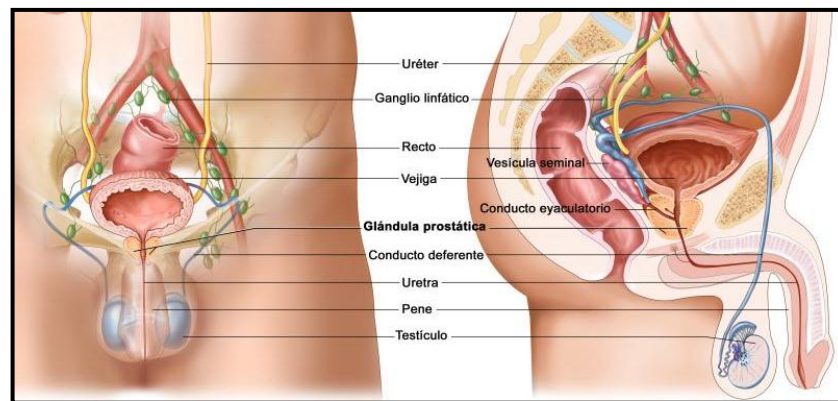
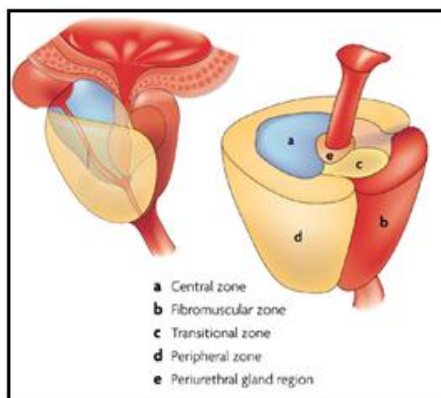


Figura 1. Ubicación de la próstata. Esquema que indica la ubicación de la próstata y de las estructuras del sistema reproductor masculino [81]

Anatómicamente, se distinguen cuatro regiones concéntricas: 1) la zona periférica o externa, en el área posteroinferior, compuesta por aproximadamente un 65% de tejido glandular, productora de la mayor cantidad de secreción; 2) la zona central o transicional formada por un 25% de tejido glandular que contiene los conductos eyaculadores, 3) la zona de transición periuretral compuesta por un 10% de tejido glandular y 4) la zona anterior, principalmente tejido fibromuscular sin glándulas secretoras (Fig. 2) [40].

El tejido prostático está compuesto mayoritariamente de glándulas individuales o acinos, mientras que el estroma está formado de fibras de músculo liso y tejido conectivo fibroso, que expulsan la secreción a través de un sistema ductal que conecta los acinos con la uretra prostática [40].



**Figura 2. Anatomía de la próstata.** Ubicación anatómica de las distintas zonas de la próstata [40].

La unidad histológica de la próstata es el acino, de tamaño variable y configuración esférica que deja una escasa luz en el centro. Posee un epitelio con doble capa de células: la capa luminal ubicada hacia la luz, formada por células secretoras cilíndricas con núcleos basales que producen nutrientes, y una segunda capa compuesta por células basales aplanadas que actúan como células de reserva para reemplazar a las células secretoras muertas [85].

En varones cerca de los 30 años de edad, la próstata puede presentar diversas alteraciones histológicas, como atrofia focal e inflamación crónica focal, alteraciones que afectan preferentemente la zona periférica (Tabla 1) [2,40,85]. Sin embargo, en edades avanzadas, la próstata puede desarrollar otras patologías no malignas, pero que alteran su normal fisiología. Una de éstas, la prostatitis, corresponde a una inflamación aguda debido a origen bacteriano o viral, en menores de 40 años, o crónica relacionada con la hiperplasia prostática benigna (HPB) en mayores de 50 años. También es posible encontrar con menos frecuencia prostatitis granulomatosa, por escape de secreción glandular al intersticio del órgano [40].

La HPB corresponde a un aumento del tamaño de la zona periuretral debido a un proceso expansivo del tejido glandular, preferentemente del estroma. La glándula presenta un aspecto multinodular amarillento con bandas de tejido fibroso y de consistencia menor que en el cáncer de próstata [77]. Se presenta por sobre los 40 años y afecta al 80% de los hombres mayores de 70 años. El principal síntoma es la obstrucción urinaria, que puede provocar hipertrofia e hiperplasia de la pared vesical de la vejiga, además de infecciones frecuentes [40].

	Prostate zone		
	Peripheral	Transition	Central
Focal atrophy	High prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Acute inflammation	Low prevalence	None	None
Chronic inflammation	Medium-high prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Benign prostatic hyperplasia	None	High prevalence	Low prevalence
High-grade PIN	Medium-high prevalence	Low prevalence	None
Carcinoma	Medium-high prevalence	Low prevalence	None

■ High prevalence      ■ Low prevalence  
■ Medium-high prevalence      ■ None

**Tabla 1. Predisposición de patologías prostáticas.** Listado de enfermedades y su correlación con las zonas de la próstata [40].

## 1.2 CÁNCER DE PRÓSTATA

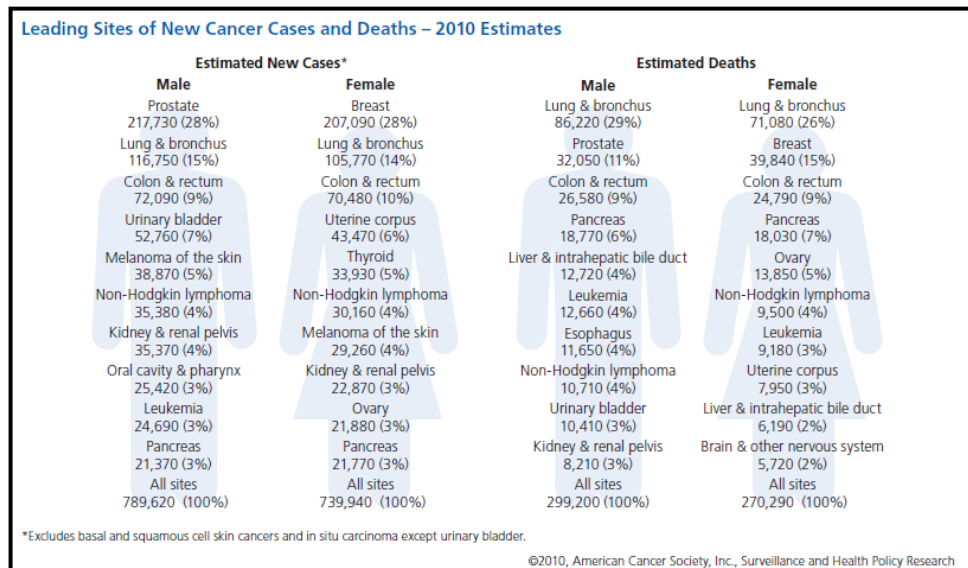
### 1.2.1 PERSPECTIVA GENERAL

El cáncer de próstata (CaP) corresponde a un tipo de cáncer originado en células basales. Aunque la próstata está formada por variados tipos celulares, el 99% de los CaP corresponden a adenocarcinomas, por la continua división celular que presentan los acinos glandulares y su mayor riesgo de mutaciones; menos del 3% deriva en un carcinoma ductal [2,85]. El 85% del cáncer de próstata tiene un origen multifocal, es decir, se originan en varios sitios de la glándula, con una mayor propensión al tejido glandular, por lo cual el área más afectada es la zona periférica o externa [30].

En primeras etapas, el CaP suele ser asintomático y puede presentar metástasis a ganglios linfáticos y huesos. Es común que un paciente presente dolor en la parte inferior de la espalda, por metástasis ósea, antes de tener síntomas por el tumor primario en la próstata [85].

**1.2.2 ESTADÍSTICA Y EPIDEMIOLOGÍA**

El CaP tiene una incidencia del 28% (el más frecuente diagnosticado en hombres), mientras que su mortalidad es de un 11% siendo superado solamente por el cáncer pulmonar como se visualiza en la Tabla 2. Su pronóstico depende exclusivamente del estadio en que se diagnostica: el 28% de los pacientes tiene otro órgano comprometido al momento del diagnóstico, mientras que el 30% presentará una micro metástasis diseminada, oculta e indetectable, al momento de la cirugía [9].



**Tabla 2. Incidencia y mortalidad del Cáncer de Próstata.** El Cáncer de Próstata es la patología tumoral más común que afecta a hombres, y el segundo en causar su muerte [3].

A nivel nacional, un estudio de prevalencia realizado en el año 2001, señala que 14.600 hombres comprendidos entre 40 y 59 años padecen de CaP [7]. La mayoría de los estudios epidemiológicos sugieren que la incidencia y mortalidad del cáncer de próstata se ha incrementado a lo largo de los años, debido al perfeccionamiento de la detección y comunicación de los casos de CaP (Tabla 3) [5].

Mortalidad por Cáncer Prostático en Chile				
	1960	1990	2002	2006
Defunciones	192	696	1597	1594
Tasa cruda por 100.000 hombres	5,1	10,7	20,5	19,6

**Tabla 3. Mortalidad por carcinoma prostático en Chile.** Los avances en el diagnóstico han permitido identificar más muertes por cáncer de próstata [5].



Alrededor del 80% de los cánceres de próstata se descubren en una etapa localizada. La tasa de supervivencia relativa de cinco años de los pacientes diagnosticados en estas etapas es de casi 92%. La tasa de supervivencia para aquellos diagnosticados en una etapa distante es de aproximadamente 31% [3]. Una buena prognosis dependerá de un temprano diagnóstico y una eficaz terapia acorde a las características del CaP.

Los factores de riesgo asociados al CaP son la edad, raza e historial familiar: la frecuencia de la enfermedad es mayor sobre los 50 años y se incrementa con la edad, donde un 63% de los casos son diagnosticados en hombres mayores a 65 años. En cuanto a la raza, se ha observado que la población descendiente de africanos tiene la mayor incidencia en el mundo. Y por último, los estudios genéticos sugieren una fuerte predisposición responsable del 5% a 10% de los casos de CaP [3].

### 1.2.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

El diagnóstico de CaP incluye el tacto rectal positivo y el valor de Antígeno Prostático Específico (PSA) elevado en sangre, siendo la biopsia el procedimiento de confirmación. Dado que el tacto rectal no permite explorar toda la próstata, sólo es posible palpar su región posterior y lateral, quedando un 25-35% de los tumores sin pesquisar [58,61]. Por otro lado, con la incorporación del PSA como examen de *screening* se ha logrado aumentar la detección y diagnóstico de CaP [3]. Sin embargo, y a pesar de las herramientas de detección, se ha identificado que más del 50% de los hombres no presentan CaP a pesar de que sus valores de PSA son sobre lo normal (zona gris 4 -10 ng/mL), y un 20% de los pacientes con un PSA menor a 4 ng/mL (valor máximo de normalidad) se les ha confirmado CaP mediante biopsia. Condiciones benignas como HPB, o factores como eyaculación, irritación, infección o reposo en cama, pueden causar una variación del PSA [35,116].

Las investigaciones actuales buscan formas de distinguir entre las patologías prostáticas, mejorar el diagnóstico y pronóstico del CaP. Algunos métodos son:

1. Cambio de la concentración de PSA en el tiempo [3,85].
2. La relación entre la concentración de PSA y el tamaño de la próstata. [3,85].
3. Nivel de corte del PSA ajustado según la edad [3,85].
4. Disminuir el punto de corte de PSA [3,85].
5. Observación y seguimiento de neoplasia prostática intraepitelial (PIN) [3,77].

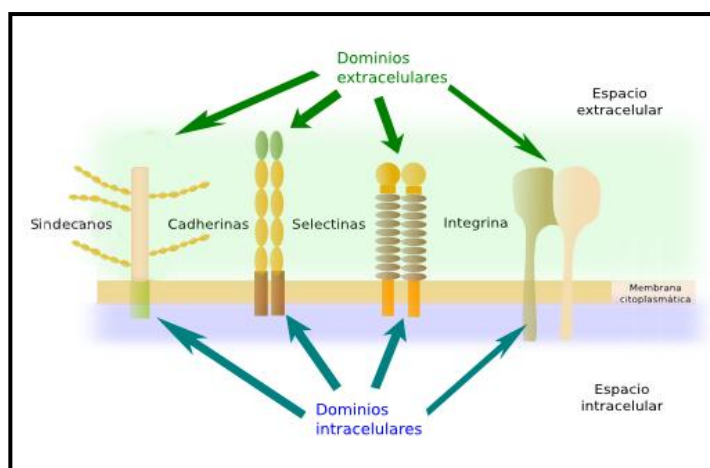
Sin embargo, el método más aceptado por clínicos es la relación PSA libre versus PSA unido. El PSA circula tanto libre como unido en la sangre; en afecciones benignas de la próstata existe más PSA libre circulante, mientras que CaP produce más PSA unido. La relación  $PSA_{Libre}/PSA_{Total}$  es mayor en pacientes con HPB y menor en pacientes con CaP y cuenta con un 22% más de especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo y exactitud que el PSA total [3,85].

Debido a que las opciones de tratamiento son escasas en los estados avanzados del CaP, estudios recientes identifican nuevos marcadores que proporcionan información sobre el desarrollo del tumor, con el fin de prevenir y dar un diagnóstico temprano [34].

En estadios tempranos, las células tumorales disminuyen su capacidad de unión con las células adyacentes, y aumentar su potencial de proliferar, degradar la lámina basal, invadir el estroma, entrar al torrente sanguíneo y diseminarse a otros órganos donde causarán metástasis. En esta transformación permanente, el primer cambio en la célula tumoral es modificar el patrón de expresión de las moléculas de adhesión celular [76]. Estudios en diversos tipos de cáncer de origen epitelial, muestran una alteración denominada transición epitelio-mesenquimal (TEM) [16,69,76], originando cambios en el epitelio como pérdida de la morfología característica y ganancia parcial o total de marcadores mesenquimáticos [47].

### 1.3 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las alteraciones morfológicas presentes en el tejido histológico del CaP son producto de múltiples procesos que modifican la función normal de la maquinaria celular [2]. Las moléculas de adhesión celular (CAM) son glicoproteínas ubicadas en la superficie celular que constituyen receptores celulares y mediante las cuales se efectúan las interacciones específicas célula-célula y célula-matriz. El extremo C-terminal se encuentra asociado al citoesqueleto, seguido de una región transmembrana y una zona extracelular N-terminal que da la especificidad a la molécula para unirse a otras CAM [2,100].

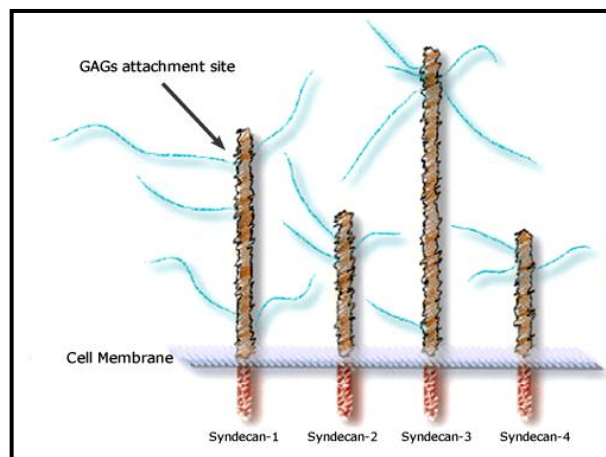


**Figura 3. Moléculas de adhesión celular.** Estructura de los principales tipos de CAMs, señalando los distintos dominios y forma estructural [53].

Todas las funciones biológicas requieren o son influenciadas por estas interacciones, especialmente la embriogénesis, morfología celular, desarrollo tisular, adhesión y migración celular, procesos inflamatorios e inmunológicos. Estructuralmente existen cinco familias de CAM: Proteoglicanos (PGs), Cadherinas (CADs), Inmunoglobulinas, Integrinas y Selectinas (ver Fig. 3) [2].

Los PGs son macromoléculas formadas por una proteína central, a la cual se asocian por su extremo terminal, numerosas moléculas de glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados, originando una amplia variedad según la longitud de éstos: heparan (HS), condroitina (CS), dermatan o keratan sulfato y ácido hialurónico [60,98].

La mayoría de las funciones estructurales de los PGs se relacionan con sus características moleculares: forman un gel altamente hidratado que constituye la matriz extracelular en la cual se encuentran células y fibras conjuntivas [98].



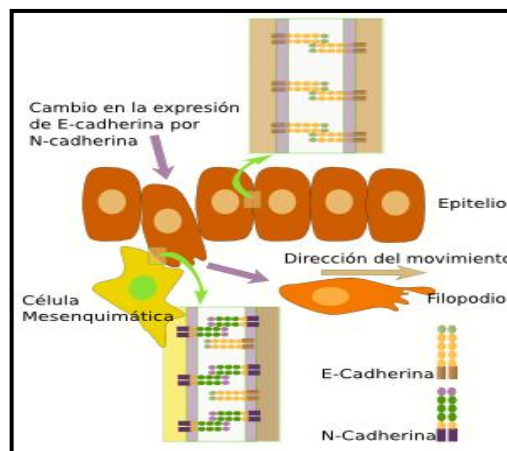
**Figura 4. Estructura de Sindecanos.** Los Sindecanos se diferencian en el número de GAGs, esquematizados en azul, que les confieren interacciones particulares a cada tipo [113].

Los Sindecanos son una familia de PGs constituida por cuatro miembros (Fig. 4) insertos en la membrana plasmática: Sindecano-1 principalmente en células epiteliales, Sindecano-2 en fibroblastos, Sindecano-3 en tejido neuronal y Sindecano-4 en fibroblastos, epitelio y músculo liso [13,14,113,121]. Presentan un dominio citoplasmático y transmembrana con un alto grado de conservación, y un dominio extracelular (ectodominio) con sitios de unión para tres a cinco GAGs de HS. Todos los Sindecanos tienen una secuencia en su extremo C-terminal que puede interactuar con el dominio PDZ de proteínas como ZO-1 [14,113].

La presencia de cadenas de HS le confiere la habilidad de unir proteínas extracelulares y formar complejos de señalización, entre los cuales existen numerosos factores de crecimiento y morfogénicos como FGFs, VEGFs, TGF- $\beta$ , HGF. Además, pueden unirse a proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y proteínas plasmáticas como antitrombina-1, por lo cual tienen un rol importante en la adhesión y señalización celular [13,22,113]. El  $\gamma$ -interferon y varias quimioquinas unidas a cadenas de HS junto a heparina son capaces de prevenir la coagulación sanguínea [17].

Otros miembros de las CAMs son las Cadherinas (CADs), glicoproteínas transmembrana dependientes de calcio identificadas en mamíferos, aves y anfibios, expresadas en el desarrollo embrionario y en órganos adultos. El ectodominio es responsable de la interacción célula-célula, y su dominio citoplasmático de unirse al citoquesqueleto mediante cateninas [2].

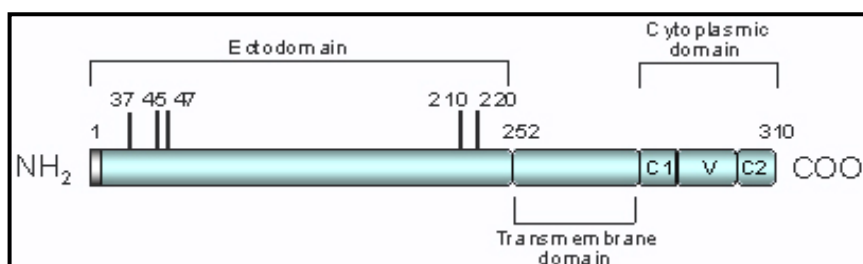
Las CADs permiten la adhesión celular y la mantención de los tejidos, los espacios intercelulares, el desarrollo embrionario y la morfogénesis. Los carcinomas han sido asociados con la pérdida de la morfología epitelial y la adquisición de un fenotipo mesenquimal [41]. Las células epiteliales expresan E-Cadherina, mientras que las células mesenquimáticas, que son móviles como se ejemplifica en la Fig. 5, expresan un conjunto de cadherinas entre las que se encuentran las N-cadherinas, R-cadherinas y cadherina 11. Las N-cadherinas favorecen la movilidad de las células, si células tumorales no expresan N-cadherina, no son metastásicas [119].



**Figura 5. Cadherinas y la movilidad celular.** Influencia en la movilidad y en el cambio de morfología epitelial a mesenquimal [53].

### 1.3.1 SINDECANO-1

Corresponde una proteína de 310 aminoácidos (Fig. 6) con tres dominios: citoplasma, transmembrana y ectodominio. En este último es posible encontrar 5 sitios de unión de GAG, en los aminoácidos 37, 45, 47, 210 y 220, correspondientes a cadenas de HS o CS. El gen humano de Sindecano-1 se ubica el cromosoma 2p23 [93].



**Figura 6. Estructura de Sindecano-1.** Dominio citoplasmático, transmembrana y ectodominio. Las líneas en los aminoácidos indican los lugares de unión de cadenas de HS y CS [93].

Fue aislado por primera vez desde células de epitelio mamario de ratón [75] y luego identificado como una proteína altamente expresada en células epiteliales humanas donde interactúa con el citoesqueleto de actina para modular la adhesión celular y la señalización de los factores de crecimiento [113]. Se expresa en pre-Linfocitos B donde se pierde una vez que la célula madura es liberada a la circulación [101] y en células mieloides [97].

La regulación de la expresión de Sindecano-1 se ve afectada por factores de crecimiento y citoquinas en cultivos celulares [54,123]. Los niveles de Sindecano-1 se correlacionan con los niveles de su mRNA, sugiriendo que la regulación es principalmente controlada a nivel transcripcional, pero se ha observado una fuerte regulación post-transcripcional en células mesenquimales durante la formación del riñón [114]. También se ha observado el *shedding* del ectodominio, lo que afecta el control funcional de la célula [55]. El *shedding* corresponde a un proceso en el cual el dominio extracelular de una variedad de proteínas transmembranas puede ser liberado proteolíticamente al medio extracelular [6].

La expresión de Sindecano-1 puede verse alterada en modelos de transformación celular. En células mamarias tumorales de ratón, la re-expresión de Sindecano-1 mediante transfección reestablece la morfología celular [66]. Al contrario, la inhibición de la expresión de Sindecano-1 en células de epitelio normal mamario de ratón NMuMG, induce cambios hacia una morfología tipo mesenquimal [58].

Debido a que su expresión está asociada con la morfología epitelial, la disminución en su expresión puede ser considerada como un evento temprano que contribuye a la progresión del tumor. En los carcinomas hepatocelulares con alto grado metastático existe una disminución en la expresión de Sindecano-1 [78], al igual que en el carcinoma colorrectal donde además se relaciona con metástasis a nódulos linfáticos, y aumenta su expresión en el estroma local [50]. En cáncer endometrial, se ha reportado una sobre-expresión de Sindecano-1 correlacionada con carcinogénesis, grado tumoral y viabilidad de células malignas en el endometrio [26].

Por otro lado, la pérdida de Sindecano-1 epitelial y un aumento del de origen estromal es asociado con progresión tumoral y mal pronóstico [49]. En cáncer mamario al sobre-expresar Sindecano-1 en tejido estromal se promueve la proliferación [73] y se relaciona positivamente con el tamaño tumoral y mal pronóstico [10]. En cáncer pancreático existe una marcada sobre-expresión de mRNA Sindecano-1, aunque no se observan diferencias entre tumor temprano y avanzado, mientras que otros cáncer gastrointestinales como esofágico y gástrico no presentan diferencias significativas entre los niveles observados en muestras normales y tumorales [31]. Por lo tanto, Sindecano-1 muestra un papel dual en la tumorigénesis con una función tejido específico [13].

Estudios inmunohistoquímicos en CaP indican una expresión alterada tanto en patologías benignas como malignas, sugiriendo una regulación negativa de la expresión de Sindecano-1 y una correlación inversa entre su nivel de expresión y el aumento de la agresividad tumoral [25,33,62,126], sugiriendo a este PG como un marcador pronóstico del grado de diferenciación tumoral.

Dentro de los mecanismos de regulación de Sindecano-1, el *shedding* de su ectodominio, genera una molécula soluble, disminuyendo su presencia en la membrana plasmática. El fragmento liberado, aún posee la propiedad de unir los mismos ligandos extracelulares, por lo tanto, se produce una competencia entre el ectodominio soluble y el estructural [52,97]. El ectodominio es responsable de los cambios en el comportamiento celular. Mediante proteínas quiméricas se demostró que la actividad de Sindecano-1 se mantiene inalterada cuando el ectodominio es expresado unido a una proteína de superficie celular [70]. En células mieloides, el *shedding* de Sindecano-1 promueve la invasión endotelial y la angiogénesis [94].

El *shedding* es altamente regulado por Heparanasa mediante acción enzimática [94,124] y puede ser inducido por variados factores (Fig. 7) como trombina, elastasa y MMPs [18,42,110], por estrés celular que activen la vía de las kinasas [28], por factores de crecimiento [59,110], por desintegrina y ADAM17 [92], MMP7 y MMP9 [27], entre otros. Por otro lado, el *shedding* puede ser inhibido por TIMP-3 [45].

El ectodominio de Sindecano-1 puede suprimir el crecimiento tumoral, estimular la polimerización de actina e inducir morfología epitelial [66]. El ectodominio con cadenas de HS es capaz de suprimir el crecimiento, mientras que la degradación de esta estructura no permite la inhibición del crecimiento [74]. En cáncer mamario humano, el ectodominio estructural y soluble de Sindecano-1 tiene papeles distintos: la forma soluble origina la conversión de un fenotipo proliferativo a uno invasivo, que normalmente permanece inhibido por el Sindecano-1 unido a membrana. Además, la expresión de E-Cadherina es disminuida en células que sobre-expresan el ectodominio soluble de Sindecano-1 [86]. Sin embargo, en cáncer mamario la agresividad está relacionado con la sobre-expresión de Sindecano-1 estromal [61], en CaP el origen tumoral es principalmente epitelial glandular.



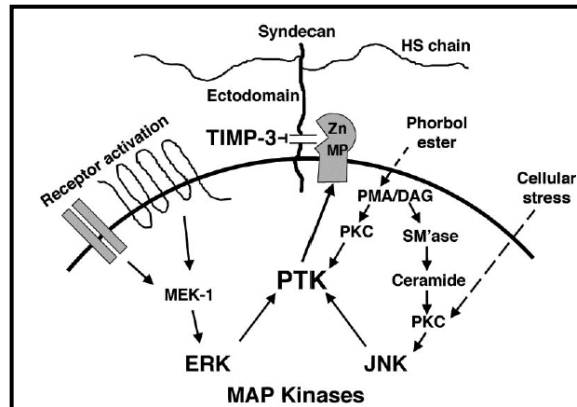
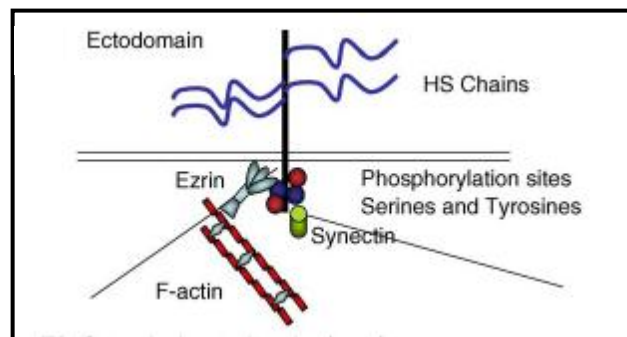


Figura 7. *Shedding* de Sindecano-1. Esquema de modelo propuesto para el corte proteolítico del ectodominio de Sindecano-1 [45].

En zonas de tejido dañado e inflamación, existe un aumento del ectodominio soluble de Sindecano-1 [62,110] así como en suero y aspirados de médula ósea en pacientes con mieloma múltiple [102]. Estudios en plasma sanguíneo también han evidenciado su correlación con distintos tipos de cáncer. En mieloma múltiple, en un 79% de los pacientes se encontraron niveles elevados, asociado con un pronóstico de vida de 20 meses [71,102]. En leucemia linfocítica el pronóstico es similar [56]. En cáncer pulmonar, pacientes con niveles altos del ectodominio (>59 ng/mL) tiene una expectativa de vida en promedio de sólo 4 meses en comparación con los 11 meses en pacientes con niveles séricos bajos [57].

### 1.3.2 SINDECANO-2

También denominado fibroglicano, corresponde a una proteína lineal organizada en tres regiones: ectodominio N-terminal, dominio transmembrana y citoplasma altamente conservado. En el ectodominio es posible encontrar sitios para unión de GAGs, específicamente HS (Fig. 8), que son adicionados en el aparato de Golgi [43].



**Figura 8. Estructura de Sindecano-2.** Se representa en líneas azules los sitios de unión de GAGs y las proteínas con que interactúa en el citoplasma como Ezrin y Sinectina [43].

Sindecano-2 participa en la regulación de la señalización por TGF- $\beta$ , mediante unión proteína-proteína a diferencia de los otros Sindecanos, lo cual junto a su unión al citoesqueleto de actina permite modular directamente la respuesta a los factores de crecimiento en términos de migración celular [13,43].

Se ha identificado Sindecano-2 en líneas celulares de cáncer de colon, donde su expresión es elevada en comparación con células normales, a diferencia de Sindecano-1 que se encuentra disminuido; la sobre-expresión se relaciona con la pérdida de interacciones célula-sustrato contribuyendo tanto a la tumorigénesis como angiogénesis, facilitando el crecimiento tumoral y la metástasis [13,89]. En células con alta tasa de proliferación, una disminución de la expresión de Sindecano-2 mediante cDNA antisense, causa una reversión del fenotipo transformado a monocapas que desarrollan un citoesqueleto organizado [89]. En cáncer de ovario su expresión también se ve aumentada [38].

En contraposición, Sindecano-2 actúa como supresor tumoral en cáncer de pulmón inhibiendo la activación de MMP2 por interacción con las cadenas de HS. Además, Sindecano-2 junto con la integrina  $\alpha 5\beta 1$  participan en la regulación del citoesqueleto de actina durante la adhesión celular a fibronectina, generando fibras de estrés y estructuras con fuerte adhesión celular [83]. En células de osteosarcoma MG63, un aumento de Sindecano-2 induce apoptosis celular mediante señalización del dominio citoplasmático [80], mientras que en células U2OS es capaz de aumentar la sensibilidad a drogas quimioterapéuticas [88]. El uso del ectodominio de Sindecano-2 promueve la formación tubos capilares de membrana en células endoteliales cerebrales [44].

La sobre-expresión de Sindecano-2 en la línea celular LNCaP, derivada de metástasis de CaP, concluyó que Sindecano-2 es capaz de inducir una morfología celular TEM [115]. Un estudio histológico de biopsias de CaP y su metástasis a nódulos linfáticos y médula ósea realizado en nuestro laboratorio [29] ha concluido que existe un reordenamiento celular de Sindecano-2, apareciendo principalmente en el citoplasma. Además, un mayor grado de Gleason en CaP ha sido relacionado con una disminución de la expresión de Sindecano-2 [32,33]. Por el contrario, otro estudio inmunohistoquímico detectó una sobre-expresión en CaP, asociado con mal pronóstico, alto grado de Gleason y metástasis [91]. Considerando la evidencia de un *shedding* de Sindecano-2, proceso mediado por MM7 en cáncer de colon [99] y que el uso del ectodominio de Sindecano-2 en células endoteliales de cerebro de ratón promueve la formación tubos capilares [44], se explicaría la discrepancia en la intensidad encontrada en los análisis histológicos, y reforzaría un rol tumorigénico de Sindecano-2.

### 1.3.3 E-CADHERINA

Perteneciente a la familia de Cadherinas, es también denominada Cell-CAM 120/180 en humanos y uvomorulina en ratones. Se encuentra en el tejido epitelial y su función es mantener la estructura de las capas epiteliales durante el desarrollo y adultez. La proteína E-Cadherina madura (Fig. 9) presenta cinco dominios extracelulares que regulan las interacciones homofilicas celulares, un pequeño dominio transmembrana y uno citoplasmático que la vincula con el citoesqueleto de actina en conjunto con  $\beta$ -catenina [19,90].

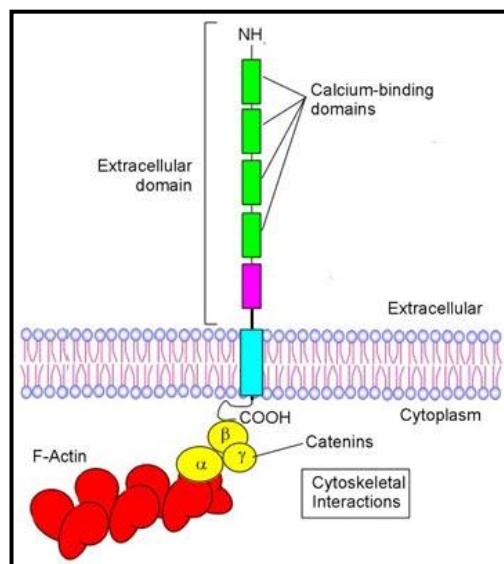
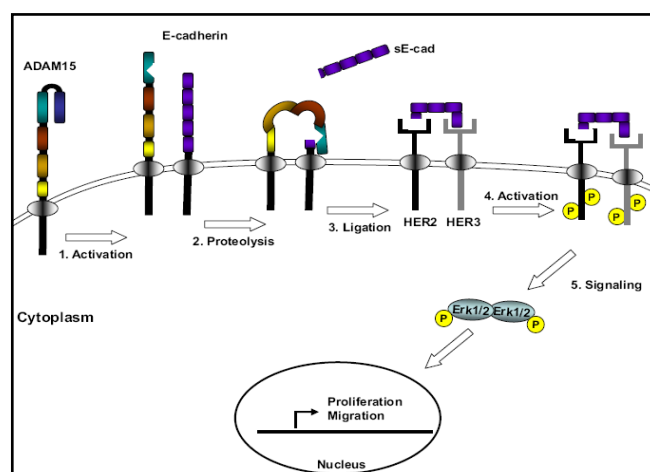


Figura 9. Estructura de E-Cadherina. Esquema indicativo de las diferentes zonas de E-Cadherina y proteínas con que interactúa [90].

La expresión de esta molécula se encuentra ampliamente documentada en patologías tumorales. Está disminuida en carcinoma de células basales, melanoma y cáncer metastático, siendo inversamente proporcional a la progresión del tumor [41]. En cáncer mamario, su pérdida en el epitelio celular promueve la génesis e invasión del tumor, por ende, su ausencia sirve como marcador de un pronóstico desfavorable. En algunos casos, la expresión de E-Cadherina se correlaciona inversamente con el grado histológico, con periodos libres de metástasis [63].

La expresión de E-Cadherina en CaP ha tenido una correlación inversa con el grado y estadio del tumor. De 12 estudios que evaluaron el rol pronóstico de E-Cadherina en material histológico, 11 encontraron una correlación negativa con el grado y estadio o un mal pronóstico en pacientes con una baja expresión celular de E-Cadherina. En combinación con los niveles de expresión de otras proteínas de adhesión celular o matriz extracelular como MMP2 y MMP9, se obtendría un valor pronóstico para CaP localizado [116].

Entre otros mecanismos de regulación de la expresión de E-Cadherina como mutaciones, endocitosis y degradación proteosómica, también se ha descrito el *shedding* [100]. La proteólisis de E-Cadherina madura (120 kDa) resulta en un fragmento de 80 kDa que puede tener actividad funcional como competidor paracrino/autocrino [37]. Este fragmento ha sido observado en medios condicionados de líneas celulares de cáncer mamario, y su *shedding* puede ser realizado por variadas metaloproteinasas como MMP9, MMP7, MMP3 y ADAM15 [37,84].



**Figura 10. Shedding de E-cadherina.** Esquema de uno de los modelos propuestos para el corte proteolítico del ectodominio de E-Cadherina [84].

Los estudios del ectodominio de E-Cadherina en pacientes con cáncer han sido en algunos casos categóricos. En cáncer de mama no lobular, la ausencia de E-Cadherina se ha relacionado con la progresión, metástasis y recurrencia [95,106]. En cáncer colorrectal se comparó con los niveles plasmáticos del marcador tumoral CEA: la concentración de E-Cadherina fue mayor en pacientes con cáncer que con enfermedades benignas (control), pero no hubo una correlación significativa con el CEA sérico, careciendo de utilidad en la rutina clínica [120]. En CaP, se evaluó el fragmento soluble de 80 kDa proveniente de E-Cadherina, existiendo una diferencia marcada entre pacientes sanos y con HPB, y este a su vez con CaP localizado y metástasis. Además, el riesgo de una falla después de la cirugía (corto pronóstico de vida) era 55 veces más alto en el grupo con E-Cadherina soluble aumentada que en pacientes con niveles bajos [64].

En base a los antecedentes planteados, el ectodominio de las moléculas de adhesión celular presentadas y la liberación de su ectodominios, se plantea como uno de los primeros eventos en la transformación tumoral, facilitando la desadhesión de las células epiteliales, la invasividad, tumorigénesis y angiogénesis, afectando a células adyacentes aún sin capacidad tumorigénica.

El presente trabajo pretende detectar los ectodominios de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en medios condicionados provenientes de cultivos primarios y líneas celulares, y provenientes de plasma de pacientes con diferentes patologías prostáticas. El propósito final es asignar un rol pronóstico en etapas tempranas de la enfermedad y puedan contribuir al manejo clínico del paciente.

# HIPÓTESIS

## 2.1 HIPÓTESIS

Los ectodominios de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 presentes en medios condicionados de cultivos primarios, líneas celulares y en plasmas sanguíneos, se asocian positivamente con Cáncer de Próstata.

## 2.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar en medios condicionados de cultivos primarios, líneas celulares y plasmas sanguíneos de hombres chilenos la presencia de los ectodominios de las proteínas transmembrana E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 y relacionar su expresión con Cáncer de Próstata.

## 2.3 OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión de los ectodominios de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares PC3 y LNCaP a través de *Western Blot*.
2. Detectar la localización de los ectodominios de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares PC3 y LNCaP mediante inmunofluorescencia.

3. Evaluar la presencia de los ectodominios de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en medios condicionados provenientes de cultivos primarios y líneas celulares por medio de *Western Blot*.
4. Cuantificar los ectodominios de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 mediante ELISA en muestras de plasma sanguíneo de varones chilenos.
5. Correlacionar los niveles de los ectodominios de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2, tanto de cultivos primarios como plasmas sanguíneos con patologías prostáticas.



# MATERIALES Y MÉTODO

## 3.1 MATERIALES

### 3.1.1 REACTIVOS QUÍMICOS

Azul de Bromofenol, Tween-20, Glicina, EDTA, Triton X-100, Gelatina, BSA, Sacarosa y Rojo Ponceau provenientes de Sigma-Aldrich, San Luis, MO. Estándar de peso molecular (Winkler BM-1110, Chile), Solución EZ-CL (Biological Industries, Israel), Azul de Coomassie R-250 y reactivo para Bradford (BioRad, EE.UU),  $\beta$ -Mercaptoetanol, NaCl, Tris, HCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaN}_3$ , Paraformaldehído, Metanol y Ácido Acético provienen de Merck (Darmstadt, Alemania).

### 3.1.2 LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron las líneas celulares PC3 (#CRL-1435) y LNCaP (#CRL-1740) adquiridas a ATCC (American Type Culture Collection, EE.UU.).

- LNCaP: derivada de metástasis a nódulos linfáticos provenientes de un tumor primario de carcinoma prostático, pertenecientes a un hombre caucásico de 50 años. Poseen una morfología epitelial con un crecimiento adherente, como células aisladas o débilmente agrupadas, dependientes de DHT para su crecimiento.
- PC3: derivada de metástasis ósea de carcinoma prostático de un hombre caucásico de 62 años. Tienen morfología epitelial con un crecimiento adherente, alta tumorigenicidad y crecimiento independiente de testosterona, no presentan receptores para andrógenos.

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron muestras de tejido prostático fresco provenientes de piezas quirúrgicas de pacientes que presentaron patologías prostáticas como adenocarcinoma prostático o hiperplasia prostática benigna, extraídas por prostatectomía radical o resección prostática, respectivamente. El protocolo de obtención de las muestras y el correspondiente consentimiento informado cuentan con la aprobación de los Comités de Bioética de la Facultad de Medicina y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (FONDECYT 11060500). Las muestras fueron derivadas desde el Servicio de Urología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, por los urólogos Drs. C. Huidobro, C. Acevedo y J. Cabezas asociados a los proyectos Fondecyt 11060500, 9786861 y 1100183 desarrollados en el Laboratorio de Andrología Celular y Molecular.

Las muestras fueron procesadas en trozos pequeños ( $1\text{mm}^3$ ), e incubados con colagenasa (2mg/mL), hialuronidasa (1 mg/mL) y desoxirribonucleasa (0,5 mg/mL) en agitación a  $37^\circ\text{C}$  durante 12-14 horas. A continuación, se dejaron en reposo 10 minutos para la formación de dos fases: una superior enriquecida en células estromales y una inferior que contiene principalmente agregados de células epiteliales. Esta última fracción, fue lavada con DMEM a  $37^\circ\text{C}$  y se centrifugó a  $1500 \times g$  durante 7 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en medio DMEM/F12 7% FBS, fueron sembradas e incubadas con 5%  $\text{CO}_2$  para permitir su asentamiento y crecimiento [21].

Las líneas celulares utilizadas (LNCaP y PC3) fueron cultivadas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% FBS a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ . La siembra tanto de líneas celulares como de cultivo primario fue realizada en botellas de  $25 \text{ cm}^2$  y en placas de 60x15 (Orange Scientific, EE.UU.). Las líneas celulares controles MCF7, HeLa y HEK fueron cultivadas en condiciones similares en botellas de  $25 \text{ cm}^2$ .

### 3.2.2 MUESTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO

Las muestras de plasma sanguíneo provienen de individuos chilenos que asistieron al programa Semana de la Próstata del año 1999 organizado por la Corporación Nacional del Cáncer (CONAC). Las muestras corresponden a hombres chilenos de edad entre 50 y 75 años. Las muestras se mantuvieron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

De un universo de 2617 plasmas sanguíneos se seleccionaron aquellos sin hemólisis, con anticoagulante heparina, ficha CONAC y sin tratamientos previos, dando un total de 1420 muestras. A continuación, las muestras se seleccionaron y separaron de acuerdo a los siguientes criterios y categorías ( $n = 71$ ): grupo control de 18 individuos con tacto rectal normal y PSA  $< 4$  ng/mL, grupo HPB representado por 21 individuos con tacto rectal indicativo de HPB y biopsia negativa para CaP, y un grupo CaP de 32 individuos con tacto normal, anormal o indicativo de HPB con biopsia positiva para CaP. Este grupo se subdividió según el grado Gleason de los focos cancerígenos informados en la biopsia: Gleason 3 ( $n = 9$ ), Gleason 4 ( $n = 6$ ), Gleason 5 ( $n = 9$ ), Gleason 6 ( $n = 2$ ) y Gleason 7 ( $n = 6$ ).

### 3.2.3 EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Se sembraron líneas celulares y cultivos primarios en botellas de  $25\text{ cm}^2$  y dejaron crecer hasta una confluencia del 80% para luego ser tripsinizadas por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se inactivó la tripsina con DMEM F12 suplementado con FBS y se levaron las células con PBS frío. Las células se resuspendieron en tampón RIPA (Tris-HCL 50 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, Deoxicolato de sodio 1%, NP40 1%, SDS 1%, EDTA 5 mM, con inhibidores de proteasas (benzamidina 0,01 mg/mL, antipaína 0,002 mg/mL, leupeptina 0,005 mg/mL, PMSF 4mM) y de fosfatasas ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM). Las células se disgregaron mecánicamente con pipeta y se agitaron durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para luego ser centrifugadas a  $12000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se conservó el sobrenadante y se determinó su concentración proteica mediante el método de Bradford a 570 nm. La determinación de concentración de proteínas para muestras de plasma sanguíneo se realizó utilizando el método de Biuret.

### 3.2.4 RECOLECCIÓN DE MEDIOS CONDICIONADOS

Se denomina medio condicionado al medio de cultivo celular que contiene los productos secretados por un cultivo celular en un tiempo determinado. La elección del tiempo adecuado para la recolección de medios se realizó mediante ensayo de viabilidad con MTT a 24, 48 y 72 horas en condiciones de cultivo con 7% FBS, sin FBS y sin FBS ni F12 (factores de crecimiento). Se estandarizó la recolección de medios a 48 horas con medio de cultivo DMEM/F12 y 7%-10% FBS según el cultivo celular. Una vez alcanzada una confluencia del 70% en las líneas celulares y cultivos primarios, se procedió a lavar tres veces con PBS e incubar con 2 mL DMEM/F12 con 7% ó 10% FBS, según corresponda, por 48 horas en condiciones normales. Una vez concluido, se recogió el medio condicionado y se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos para remover todo resto celular. Se determinó la concentración proteica mediante el método de Bradford a 570 nm y se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

### 3.2.5 WESTERN BLOT

Para cada muestra se tomó una cantidad equivalente a 50 ó 90 ug de proteínas, según el caso, y Buffer Sample 5x en relación 1:1 (Tris-HCl 1M, SDS 2%, Glicerol 14%, Azul de Bromofenol 0,02%, Glicerol, SDS, Tris-HCl 1M, Mercapto-etanol, Azul Bromofenol,  $\beta$ -Mercaptoetanol 5%, pH 6,8), se incubaron a 100°C durante 5 minutos y se cargaron en un gel de SDS-PAGE; en cada experimento se incluyó un carril con 5 uL de estándar de peso molecular y se corrió la electroforesis a 75 V por 30 minutos, y luego 150 V por una hora, todo el proceso a TA.

A continuación, se realizó la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa 0,45  $\mu$ m (#162-0115, BioRad, EE.UU.) a 300 mA a 4°C por 1 hora o 50 mA a 4°C *overnight*, según fuese el caso. El proceso que fue comprobado a través de la tinción con Rojo Ponceau. Las membranas fueron bloqueadas con una solución TBS-Tween (Tris-HCl 100mM, NaCl 0,9%, Tween-20 0,1%, pH 7,5) y leche descremada 5% durante una hora a TA. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo primario con agitación toda la noche a 4°C, lavadas en TBS-Tween e incubadas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa por 1 hora a TA.

Las membranas se incubaron en solución EZ-ECL durante 2 minutos y se detectó su quimioluminiscencia mediante placas radiográficas. Éstas fueron digitalizadas y se analizó las intensidades de sus bandas con el programa UN-SCAN-IT Gel (Silk Scientific Corporation, Utah, EE.UU.).

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y las condiciones experimentales se describen a continuación:

	ANTICUERPO	FABRICANTE	EPITOPE	DILUCIÓN	CONDICIÓN
PRIMARIO	Policlonal Rabbit Anti-E-cadherin (H-108)	Santa Cruz Biotechnology SC-7870	Dominio extracelular	1:200 en TBS-T Leche 5%	Overnight 4°C
	Policlonal Rabbit Anti-Sindecano-1 (H-174)	Santa Cruz Biotechnology SC-5632	Dominio extracelular	1:200 en TBS-T Leche 5%	Overnight 4°C
	Policlonal Rabbit Anti-Sindecano-2 (M-140)	Santa Cruz Biotechnology SC-15348	Dominio extracelular	1:200 en TBS-T Leche 5%	Overnight 4°C
	Secundario anti-Rabbit conjugado con HRP	Jackson Immuno Research 111-035-003	IgG H+L	1:10000 en TBS-Tween 20	1 hora TA

**Tabla 4. Condiciones experimentales de Western Blot.** Detalle de los anticuerpos primarios, anticuerpo secundario y las condiciones como dilución, tiempo y temperatura de incubación para Western Blot.

### 3.2.6 ZIMOGRAFÍA

Para el análisis de actividad de MMP9 en los medios condicionados se prepararon geles de poliacrilamida al 8% co-polimerizados con gelatina al 0,1%. Un volumen equivalente a 50 ug de proteína por muestra se incubó con Buffer Sample 1x (SDS 2,5%, Sacadora, Rojo Fenol 0,01%) durante 30 minutos a TA. Una vez corrida la electroforesis, los geles se lavaron en 50 mL de Triton X-100 2,5% tres veces durante 20 minutos y se incubaron con Buffer de Revelado (Tris-base 3mM, Tris-HCl 40 mM, NaCl 0,2 M, CaCl<sub>2</sub> 7 mM, Tritón X-100 1,25%, NaN<sub>3</sub> 0,6 mM) por 2 días a 4°C. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 0,5% durante 12 horas para luego incubarlos en una solución de re-naturalización (metanol 50%, ácido acético 10%, agua bidestilada 40%). Las bandas claras corresponden a la actividad gelatinasa [107].

### 3.2.7 INMUNOFLUORESCENCIA

Las líneas celulares y cultivos primarios se sembraron e incubaron en cubreobjetos (12mm de diámetro) hasta obtener una confluencia del 70%. Se lavaron con PBS 1x, incubaron con Buffer de Fijación (Paraformaldehído 16%, Buffer fosfato 0,2M, Sacarosa 1M) durante 20 minutos a temperatura ambiente y se conservaron a 4°C en PBS/Azida sódica. Al momento de realizar la inmunocitoquímica, los cubreobjetos se lavaron con PBS-Glicina por 10 minutos y permeabilizaron con PBS-Glicina-Tris (PBS 1x, Glicina 0,15%, Tris 0,1%) durante 5 minutos.

A continuación, se bloquearon por 10 minutos con PBS-Glicina-BSA (PBS 1x, Glicina 0,15%, BSA 1%) a temperatura ambiente. Se incubaron con anticuerpo primario *overnight* a 4°C. Para detectar y amplificar la señal se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con FITC por 40 minutos a 37°C protegido de la luz. Para la contra-tinción se incubó por 3 minutos con DAPI 0,5uL/mL PBS, lavados con PBS 1x y fijados en portaobjetos con medio de montaje (S-3023, Dako). La fluorescencia fue observada a un aumento de 400x en un microscopio Olympus BX-UCB del Laboratorio de Fisiología Integrativa, ICBM.

El detalle del tipo de anticuerpo utilizado y las condiciones experimentales se describen a continuación:

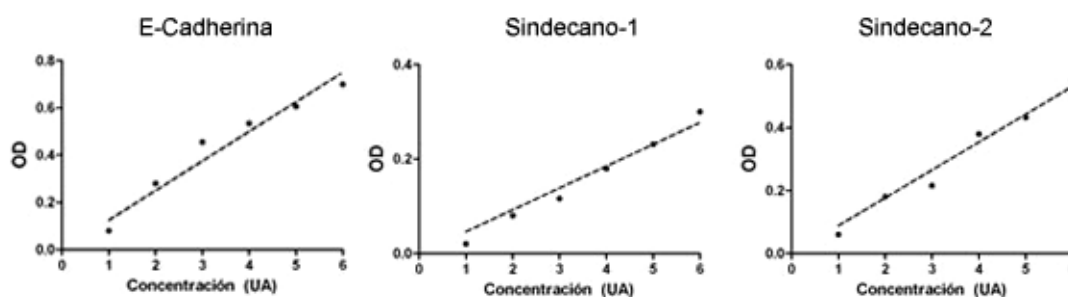
	ANTICUERPO	FABRICANTE	EPITOPE	DILUCIÓN	CONDICIÓN
PRIMARIO	Policlonal Goat Anti-E-cadherin (K-20)	Santa Cruz Biotechnology SC-31021	Dominio extracelular	1:200 en PBS-Glicina-BSA	Overnight 4°C
	Policlonal Rabbit Anti-Sindecano-1 (H-174)	Santa Cruz Biotechnology SC-5632	Dominio extracelular	1:200 en PBS-Glicina-BSA	Overnight 4°C
	Monoclonal Rabbit Anti-Sindecano-2 (HARPO)	Contreras et al. [24]	Dominio extracelular	1:200 en PBS-Glicina-BSA	Overnight 4°C
SECUNDARIO	Anti-Goat Conjugado FITC (Fluoresceína)	Santa Cruz Biotechnology	IgG H+L	1:200 en PBS-Glicina-BSA	40 min 37°C
	Anti-Rabbit Conjugado FITC (Fluoresceína)	Thermo Scientific	IgG H+L	1:200 en PBS-Glicina-BSA	40 min 37°C

**Tabla 5. Condiciones experimentales de Inmunofluorescencia.** Detalle de los anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios y las condiciones como dilución, tiempo y temperatura de incubación para Inmunofluorescencia.

### 3.2.8 ENZIMOINMUNOANÁLISIS (ELISA)

Los niveles del ectodominio de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 fueron detectados en plasma sanguíneo mediante Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA Indirecto). Placas de ELISA de 96 pocillos (Nunclon, Dinamarca), fueron incubadas con las muestras de plasmas, estándares y controles durante toda la noche a 4°C. Se lavaron tres veces con Tween-20 0,2% en PBS y bloquearon con BSA 0,5% en PBS-T por 1 hora a 37°C. Se repitieron los lavados y se procedió a incubar con anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche, lavadas nuevamente tres veces e incubadas con anticuerpo secundario conjugado con HRP por 1 hora a TA. Para la detección colorimétrica se incubó con TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidine, BioRAD) por 20 minutos a TA y protegido de la luz. Se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se leyó su densidad óptica en un espectrofotómetro para placas a 450 nm [1,103].

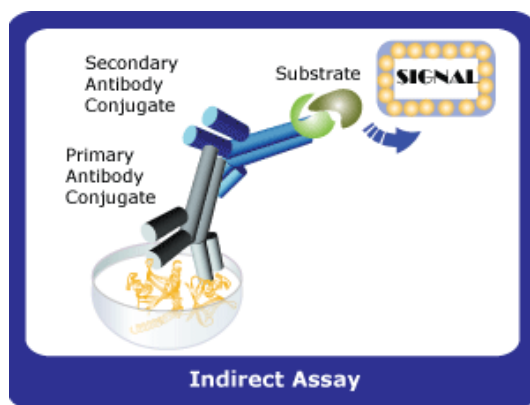
La precisión (repetitibilidad) fue evaluada por un CV intra-ensayo menor a 10% CV inter-ensayo menor a 20% en todas las pruebas realizadas. El límite de detección (concentración mínima detectable) fue determinado por el blanco  $\pm$  2 DE. De un pool de 5 muestras, se seleccionó aquella con mayor colorimetría en cada experimento para realizar curvas estándares a base de diluciones:



A continuación se presenta la tabla de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para cada placa.

	ANTICUERPO	FABRICANTE	EPITOPE	DILUCIÓN	CONDICIÓN
PRIMARIO	Policlonal Rabbit Anti-E-cadherin (H-108)	Santa Cruz Biotechnology SC-7870	Dominio extracelular	1:100 en PBS-T BSA 0,5%	Overnight 4°C
	Policlonal Rabbit Anti-Sindecano-1 (H-174)	Santa Cruz Biotechnology SC-5632	Dominio extracelular	1:100 en PBS-T BSA 0,5%	Overnight 4°C
	Policlonal Rabbit Anti-Sindecano-2 (M-140)	Santa Cruz Biotechnology SC-15348	Dominio extracelular	1:100 en PBS-T BSA 0,5%	Overnight 4°C
	Secundario anti-Rabbit conjugado con HRP	Jackson Immuno Research 111-035-003	IgG H+L	1:5000 en PBS-T	1 hora TA

**Tabla 6. Condiciones experimentales de ELISA Indirecto.** Detalle de los anticuerpos primarios, anticuerpo secundario y las condiciones como dilución, tiempo y temperatura de incubación para ELISA Indirecto.



**Figura 11. Esquema de ELISA Indirecto manual.** Explicación de ELISA indirecto utilizado y las moléculas. Foto adaptada de GenWay Biotech.

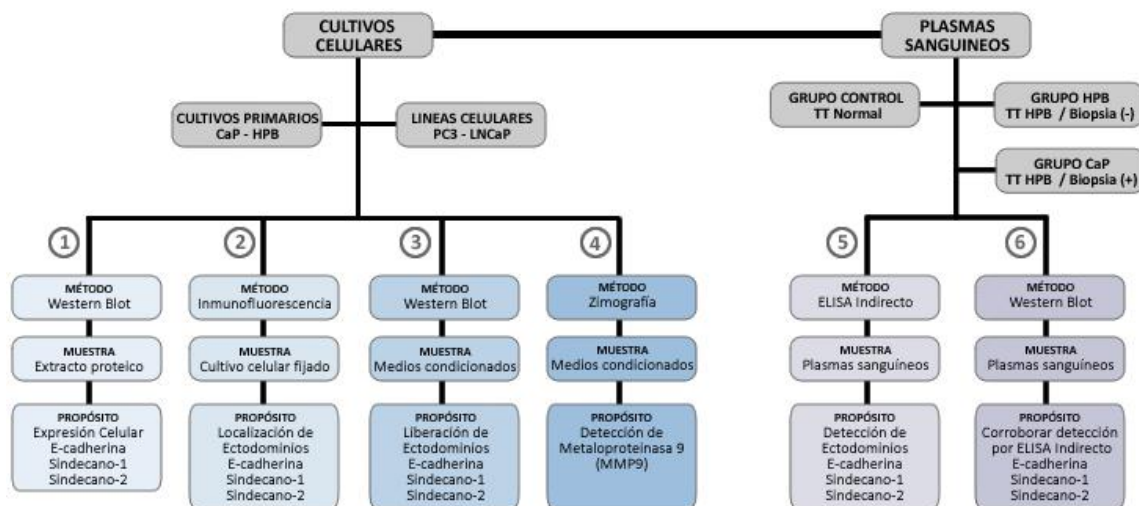
### 3.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación estadística para las comparaciones entre cultivos primarios y líneas celulares fue realizada mediante el análisis de t-test. En el análisis estadístico de los pasajes y de los ELISA se empleó 1Way ANOVA seguido de la corrección de Bonferroni para la comparación de múltiples test. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para  $p < 0,05$ . Los experimentos fueron repetidos entre 3 – 5 veces y los resultados son expresados como promedio  $\pm$  DE.



### 3.2.10 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental que se utiliza en este estudio se resume y esquematiza en la Figura 12. Una primera etapa buscó identificar los niveles de expresión de las proteínas E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios (CaP e HPB) y en líneas celulares (PC3 y LNCaP). Una vez determinada su expresión intracelular, se procedió a la segunda etapa consistente en evaluar la localización del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2, determinante en el planteamiento del presente trabajo. La tercera etapa, consistió en analizar la presencia de los ectodominios mencionados en medios condicionados de CaP, HPB, PC3 y LNCaP, así como un posible agente proteolítico mediante el estudio de la actividad de MMP9. A continuación, se caracterizaron los niveles de los ectodominios presentes en los medios condicionados de CaP a diferentes pasajes para visualizar su comportamiento en el tiempo. Finalmente, se realizó una búsqueda de los ectodominios en plasmas sanguíneos de tres grupos de individuos: controles, con HPB y con CaP.

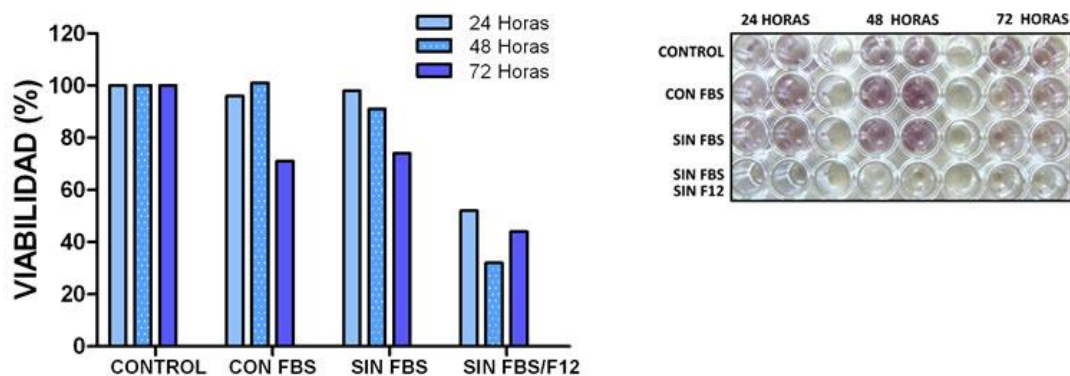


**Figura 12. Diseño experimental del proyecto.** El esquema ejemplifica la metodología empleada en cultivos primarios, líneas celulares y muestras de plasma sanguíneo de individuos chilenos. Los números y colores corresponden a las diferentes etapas y orden de trabajo.

## RESULTADOS

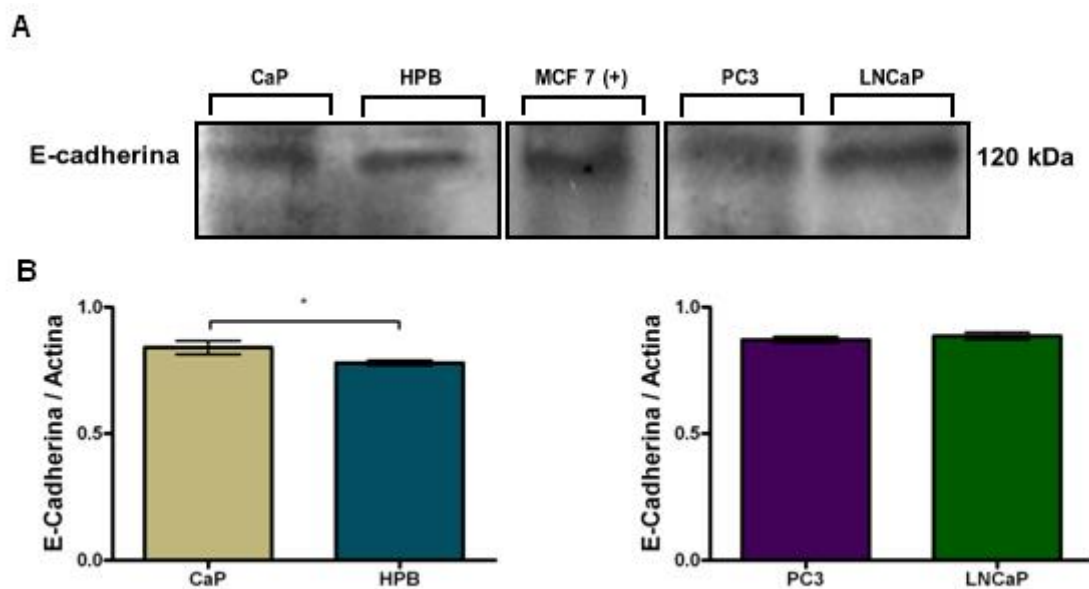
### 4.1 Expresión de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares

El primer paso fue establecer las condiciones óptimas para los cultivos celulares y la posterior recolección de sus medios condicionados. Para esto se realizó un ensayo de viabilidad celular con condiciones de medio de cultivo con 7% FBS, sin FBS y sin FBS – F12 a 24, 48 y 72 horas post-siembr. Los resultados obtenidos se grafican en la Figura 13 donde con FBS y sin FBS a las 48 horas fueron las condiciones más cercanas al control. Se optó por levantar las células y recolectar los medios condicionados a las 48 horas e incubados con DMEM/F12 con 7-10% FBS (según el tipo de cultivo celular).



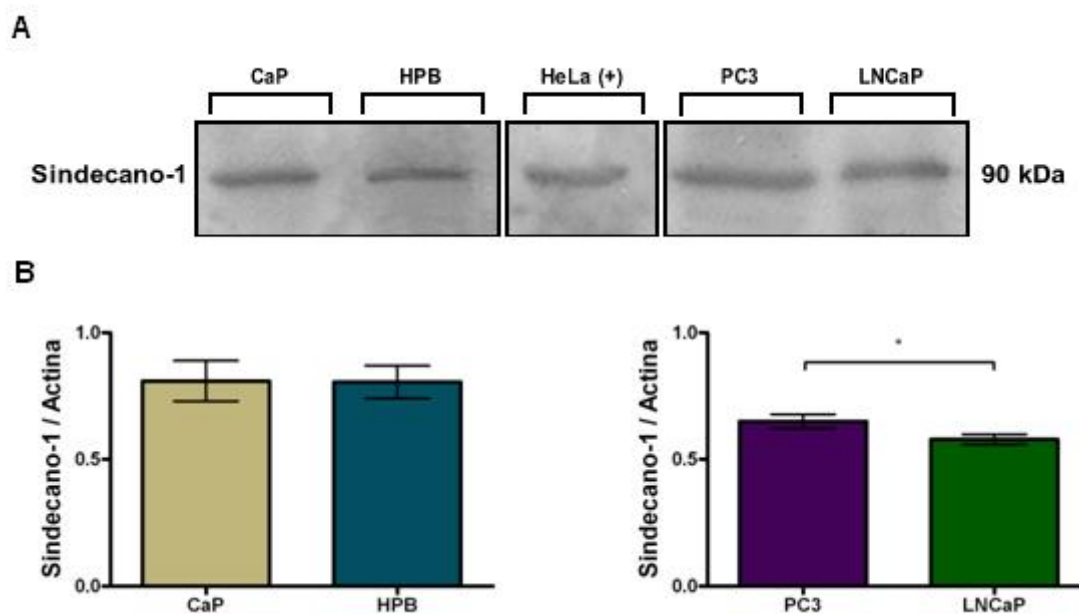
**Figura 13. Ensayo de viabilidad celular a distintas condiciones y tiempos.** Determinación de condiciones óptimas para el cultivo celular y recolección de medios condicionados. Se utilizaron cultivos celulares de CaP con medio de cultivo DMEM/F12 7% FBS, DMEM/F12 sin FBS, DMEM sólo (sin FBS ni F12). Experimento en duplicado.

Para determinar los niveles de expresión de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 se evaluaron los lisados celulares de cultivos primarios de CaP e HPB, y de las líneas celulares de metástasis de adenocarcinoma próstático PC3 y LNCaP mediante Western Blot. En la Figura 14A, se observa una banda de 120 KDa correspondiente a su forma madura y principal de E-Cadherina intracelular. La cuantificación establece una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre CaP e HPB, pero no entre PC3 y LNCaP (Fig. 14B). Se confirma que tanto los cultivos primarios como las líneas celulares expresan la proteína E-Cadherina.



**Figura 14. Niveles de expresión proteica de E-Cadherina en cultivos primarios y líneas celulares.** A) *Western blot* y B) Análisis cuantitativo de E-Cadherina en células epiteliales de cultivos primarios y líneas celulares. Los análisis cuantitativos de las bandas fueron normalizados contra  $\beta$ -actina. Control positivo con células MCF7. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ .

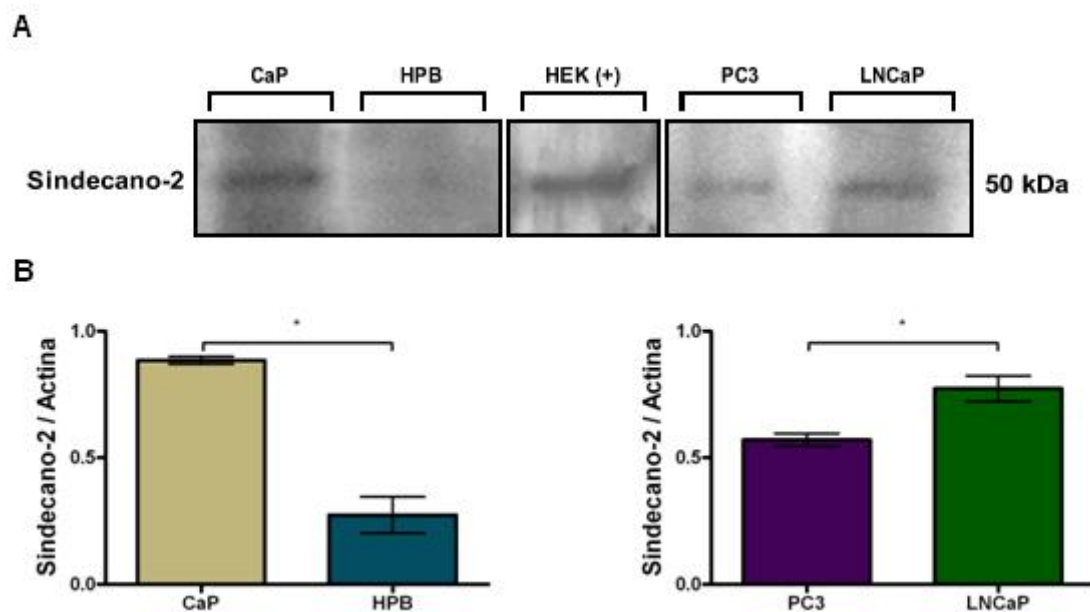
A continuación, se determinó el nivel intracelular de Sindecano-1 en los extractos proteicos de CaP, HPB, PC3 y LNCaP. El peso esperado para esta proteína es de 32 kDa, sin embargo el *core* proteico migra a menudo como un dímero a aproximadamente 77 kDa, que adicionalmente puede aumentar hasta 500-1000 kDa con todas las cadenas de HS o CS, por lo tanto en la Fig. 15A se observa una banda de 90 kDa correspondiente a la estructura de Sindecano-1 con una cantidad parcial de cadenas de GAGs. El análisis cuantitativo (Fig. 15B) indica un nivel similar de Sindecano-1 en los cultivos primarios de CaP e HPB, mientras que una diferencia significativa se establece entre PC3 y LNCaP ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, los cuatro modelos celulares estudiados expresan Sindecano-1, independiente del carácter maligno o benigno asociado.



**Figura 15. Niveles de expresión proteica de Sindecano-1 en cultivos primarios y líneas celulares.** A) *Western blot* y B) Análisis cuantitativo de Sindecano-1 en células epiteliales de cultivos primarios y líneas celulares. Los análisis cuantitativos de las bandas fueron normalizados contra  $\beta$ -actina. Control positivo con células HeLa. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ; n = 3.



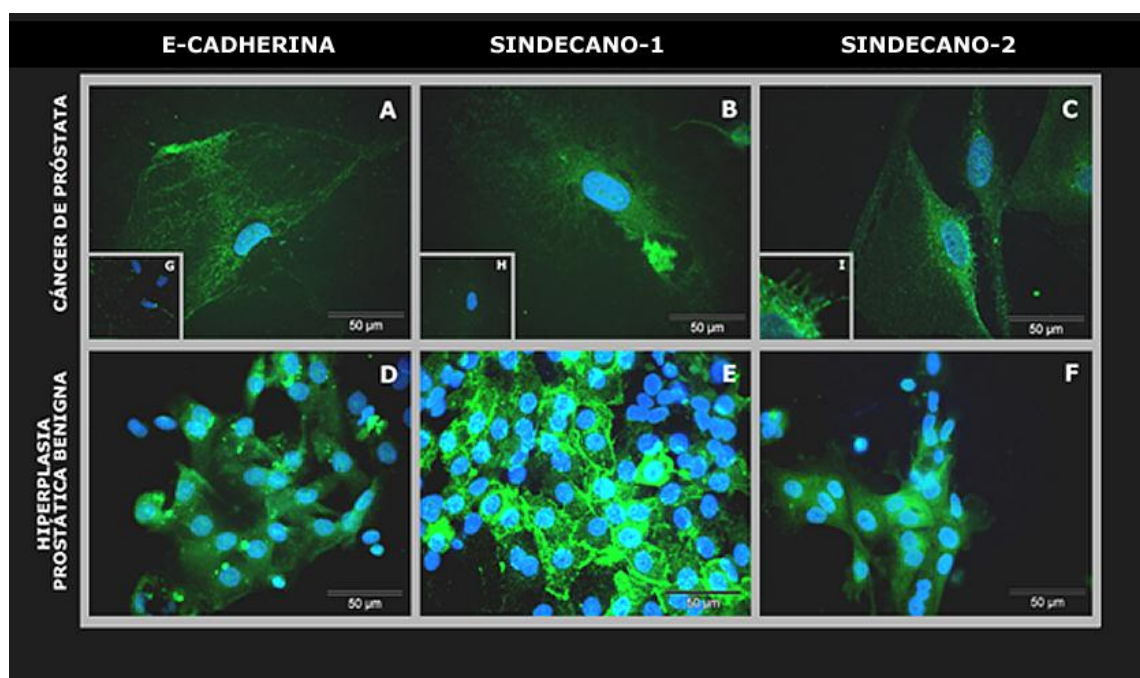
Finalmente, se evaluó también la expresión proteica de Sindecano-2 en los lisados celulares de cultivos primarios y líneas celulares derivadas de CaP. En la Figura 16A, se observa mediante *Western Blot*, una banda de 50 kDa para Sindecano-2, correspondiente a la estructura de Sindecano-2 (22 KDa) con restos de cadenas de GAGs. En el análisis densitométrico (Fig. 16B) se observa una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la expresión proteica de Sindecano-2 entre CaP vs HPB así como entre PC3 vs LNCaP. Se determina que la expresión de Sindecano-2 está presente en cultivos celulares con carácter maligno.



**Figura 16. Niveles de expresión proteica de Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares.** A) *Western blot* y B) Análisis cuantitativo de Sindecano-2 en células epiteliales de cultivos primarios y líneas celulares. Los análisis cuantitativos de las bandas fueron normalizados contra  $\beta$ -actina. Control positivo con células HEK. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ; n = 3.

#### 4.2 Localización celular del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares

Con el propósito de determinar la ubicación celular del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2, se realizó inmunofluorescencia en cultivos primarios y líneas celulares. En la Fig. 17A, se observa que en CaP la tinción para ectodominio de E-Cadherina es citoplasmática con un patrón que asimila la posible ruta de tránsito desde la zona perinuclear a la membrana celular. Para HPB la tinción es citoplasmática y homogénea (Fig. 17D), también se presenta en los contornos celulares.



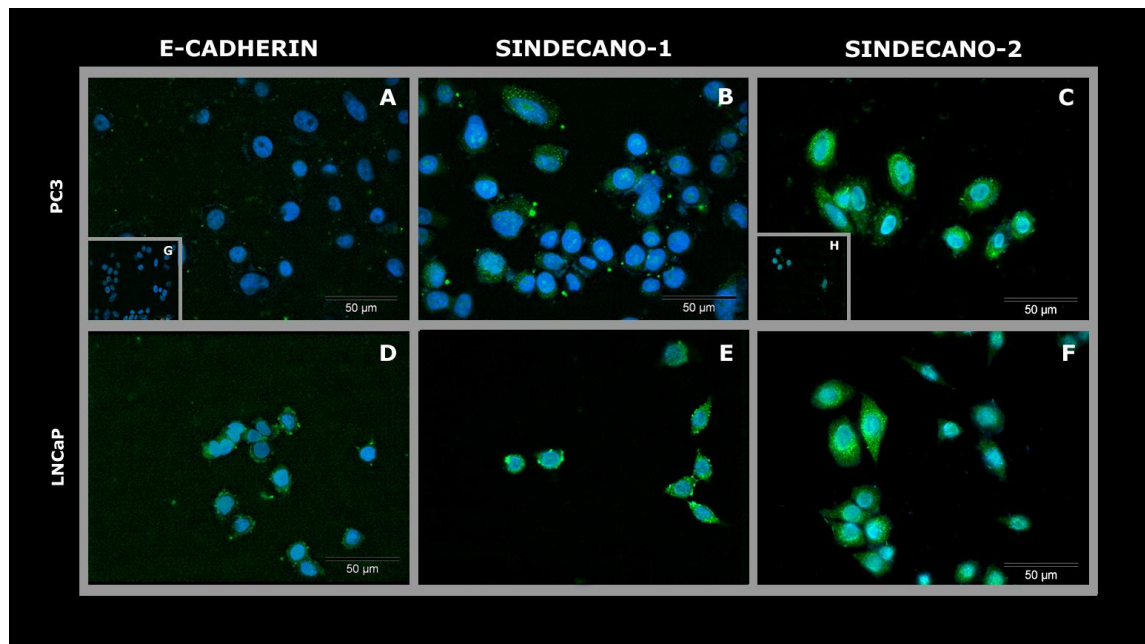
**Figura 17. Localización de ectodominio de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios.** A, B, C) Ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano 2, respectivamente, en células epiteliales de cultivo primario de CaP. D, E, F) Ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2, respectivamente, en cultivo primario de HPB. G, H) Controles negativos para anticuerpo policlonal Goat y Rabbit. I) Detalle de filopodios presentes en tinción contra Sindecano-2 en CaP. Tinción azul nuclear con DAPI. Aumento a 400x.

En la inmunofluorescencia para Sindecano-1 en CaP se observa que existe una tinción uniforme (Fig. 17B) que disminuye desde la zona perinuclear hacia la membrana celular, representado por un borde celular débil o ausente.

Por el contrario, en HPB se observa una tinción citoplasmática que se intensifica en las uniones intercelulares (Fig. 17E) formando un patrón reticulado.

En la Fig. 16C, se observa una tinción citoplasmática homogénea para el ectodominio de Sindecano-2 en CaP con un contorno celular altamente definido en toda la célula y visualización de filopodios (Fig. 17I). En HPB se observa una suave tinción citoplasmática homogénea (Fig 17F).

A continuación, se evaluó la localización del ectodominio E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 mediante inmunofluorescencia en las líneas celulares PC3 y LNCaP. En PC3 no es detectable la marca para E-Cadherina (Fig. 18A). Sin embargo, para LNCaP se observa tinción citoplasmática y agregados perinucleares (Fig. 18D).



**Figura 18. Localización de ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en líneas celulares de metástasis de cáncer de próstata.** A, B, C) Ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2, respectivamente, en cultivo celular de PC3. D, E, F) Ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2, respectivamente, en cultivo celular de LNCaP. G, H) Controles negativos para anticuerpo policlonal goat y rabbit. Tinción azul nuclear con DAPI. Aumento a 400x.



La distribución de Sindecano-1 en PC3 se caracteriza por una tinción citoplasmática granular y una membrana plasmática irregular, no definida (Fig. 18B). En LNCaP se visualiza una tinción citoplasmática intensa con agregados en la membrana celular (Fig. 18E).

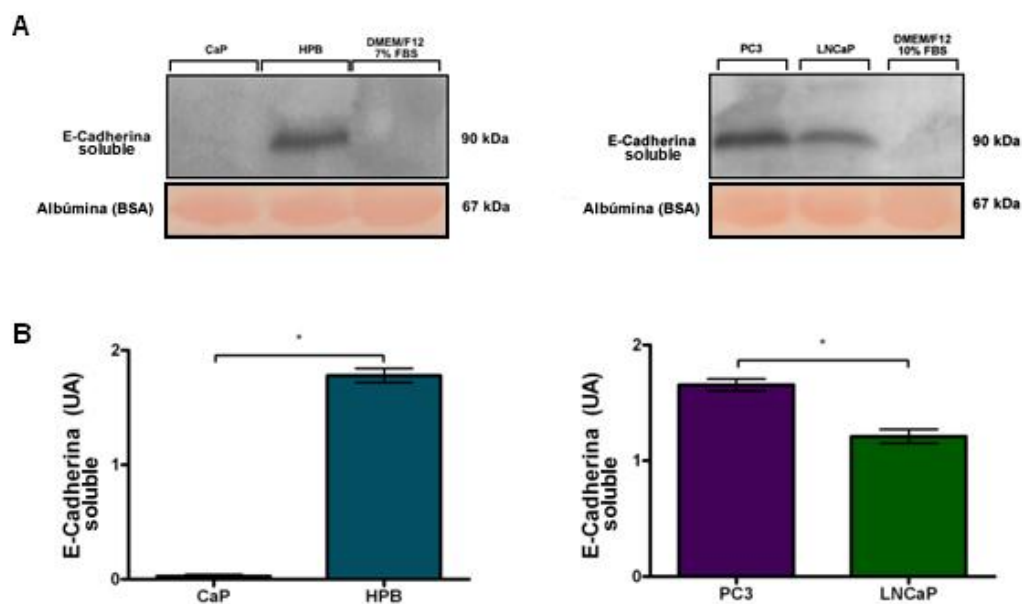
La localización de Sindecano-2 fue evidenciada por una fluorescencia homogénea en el citoplasma de PC3 como de LNCaP (Fig. 18C y 18F, respectivamente). Sin embargo, en la membrana celular la tinción permite ver un límite celular definido principalmente en LNCaP.

Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia confirman los resultados de expresión para E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 y sugieren la distribución intracelular en los cuatro modelos celulares estudiados. La tinción se presenta de manera perinuclear e incluso citoplasmática, pero en algunos casos la marca se vuelve débil o ausente en la membrana celular, posiblemente por procesos celulares para degradar e impedir la funcionalidad de las proteínas estudiadas.

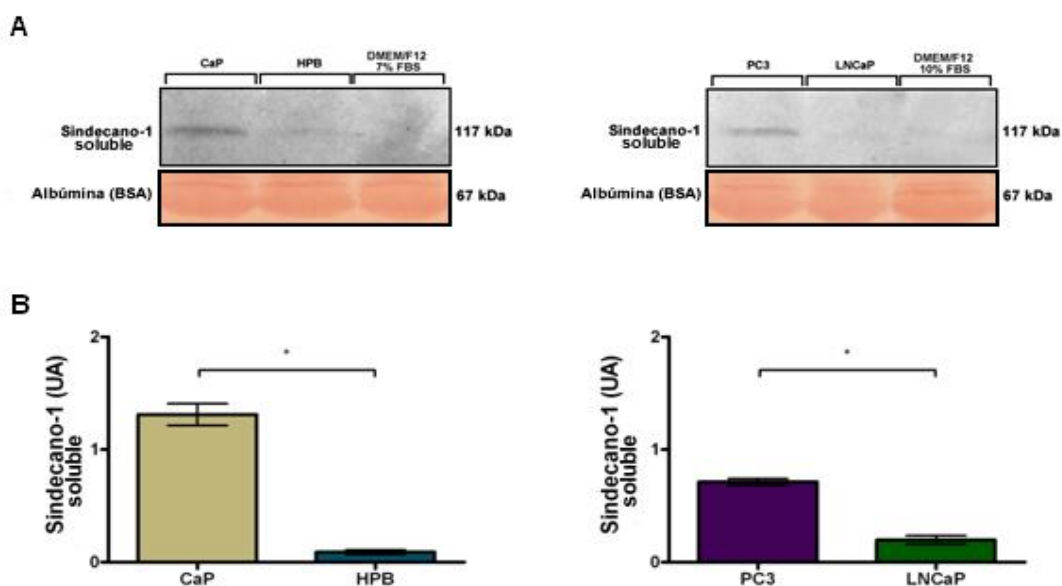
#### **4.3 Evaluación del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares**

En los *Western Blot* de medios condicionados de cultivos primarios y de líneas celulares, se incluyó un carril con muestra de medio de cultivo fresco (DMEM/F12 con FBS) para descartar como fuente de origen de los polipéptidos estudiados. Además, debido a la falta de una proteína de concentración constante como  $\beta$ -actina pero secretada al medio celular, se utilizó como control de carga la albúmina proveniente del FBS, teñida con rojo Ponceau luego de la electrotransferencia.

En relación al ectodominio de E-Cadherina, este se visualiza como una banda de 90 kDa (Fig. 19A) presente en los medios condicionados de HPB pero no de CaP. Por su parte, los medios condicionados procedentes de PC3 y LNCaP también presentan el fragmento de 90 kDa con una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) (Fig. 19B).



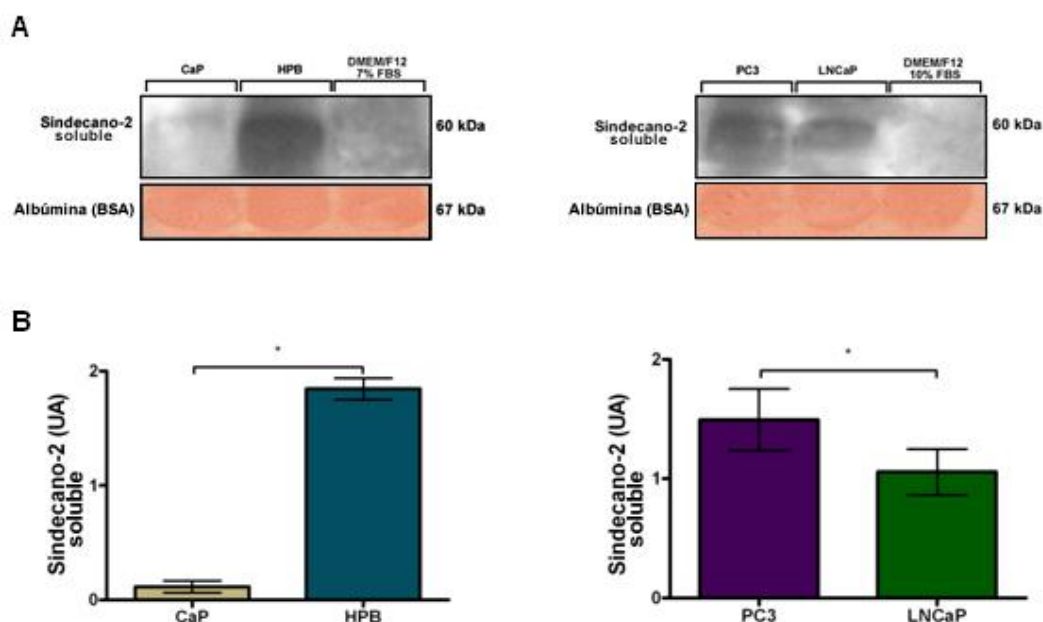
**Figura 19. Niveles del ectodominio de E-Cadherina en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares.** A) Western blot del ectodominio de E-Cadherina en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares y medio fresco. B) Análisis cuantitativo de los niveles del ectodominio de E-Cadherina en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares. Control de carga tinción Ponceau de Albúmina de FBS. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ; n = 5.



**Figura 20. Niveles del ectodominio de Syndecano-1 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares.** A) Western blot del ectodominio de Syndecano-1 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares y medio fresco. B) Análisis cuantitativo de los niveles del ectodominio de Syndecano-1 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares. Control de carga tinción Ponceau de Albúmina de FBS. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ; n = 5.

El análisis de los medios recolectados muestra el ectodominio de Sindecano-1 en una banda de 117 kDa tanto en CaP como PC3, pero no así en HPB y LNCaP (Fig. 20A). El análisis de las bandas indica que existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre CaP e HPB, como entre PC3 y LNCaP (Fig. 20B).

En seguida se realizó el *Western Blot* para identificar el ectodominio de Sindecano-2 en los medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares. Como se observa en la Figura 21A, una banda de 60 kDa aparece en los medios correspondientes a HPB, PC3 y LNCaP. Según el análisis densitométrico, la diferencia entre los niveles de CaP e HPB, y PC3 vs LNCaP son estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) (Fig. 21B).

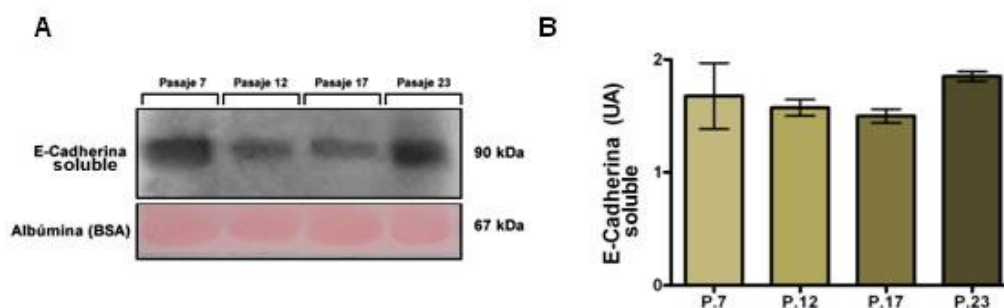


**Figura 21. Niveles del ectodominio de Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares.** A) *Western blot* del ectodominio de Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares y medio fresco. B) Análisis cuantitativo de los niveles del ectodominio de Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares. Control de carga tinción Ponceau de Albúmina de FBS. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

#### 4.4 Evaluación del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en medios condicionados de CaP de distintos pasajes

Con el propósito de identificar si el *shedding* de los ectodominios aumenta, disminuye o permanece constante en el tiempo, se procedió a sembrar células epiteliales prostáticas correspondientes a un cultivo primario de CaP con alto número de pasajes, que han adoptado una morfología y proliferación similar a una línea celular. Por lo tanto, son un modelo adecuado para estudiar la evolución de la liberación proteolítica del ectodominio en el tiempo.

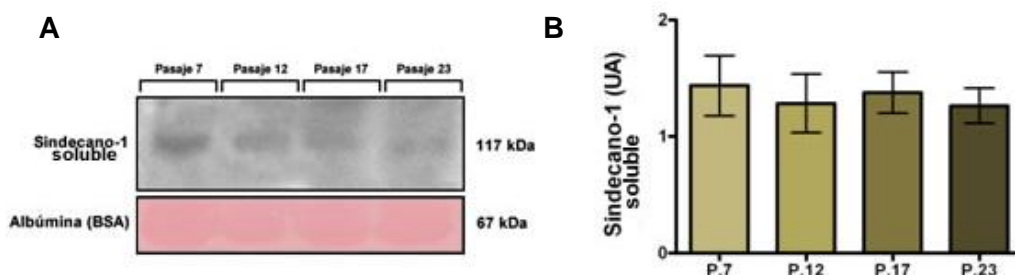
El primer análisis fue detectar el ectodominio de E-Cadherina en los medios recolectados de pasajes 7, 12, 17 y 23 mediante *Western Blot*. Los medios recolectados de células de CaP con elevado número de pasajes presentan el ectodominio de E-Cadherina, identificado por una banda de peso molecular similar al encontrado en HPB, PC3 y LNCaP (Fig. 19). La cuantificación de las bandas indica que los niveles del ectodominio de E-Cadherina serían constantes a distintos pasajes (Fig. 22B).



**Figura 22. Evaluación del ectodominio de E-Cadherina en medios condicionados de CaP de distintos pasajes.**

A) Western Blot de medios condicionados de CaP a distintos pasajes contra ectodominio de E-Cadherina. B) Análisis cuantitativo de los niveles de ectodominio de E-Cadherina en los medios recolectados. Control de carga tinción Ponceau de Albúmina de FBS. Unidades arbitrarias (UA) corresponden a E-Cadherina/ug de proteína. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ .

El siguiente ectodominio a analizar bajo estas condiciones fue el correspondiente a Sindecano-1. Mediante *Western Blot* se identificó una banda 117 kDa en los distintos pasajes estudiados (Fig. 23A) a niveles que no varían de manera significativa (Fig. 23B).



**Figura 23. Evaluación del ectodominio de Sindecano-1 en medios condicionados de CaP de distintos pasajes.** A) *Western Blot* de medios condicionados de CaP a distintos pasajes contra ectodominio de Sindecano-1. B) Análisis cuantitativo de los niveles de ectodominio de Sindecano-1 en los medios recolectados. Control de carga tinción Ponceau de Albúmina de FBS. Unidades arbitrarias (UA) corresponden a E-Cadherina/ug de proteína. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ; n = 3.

Por ultimo, se evaluó la presencia del ectodominio de Sindecano-2 en los medios de CaP a distintos pasajes. No se encontraron niveles del ectodominio en el tiempo (Fig. 24). El análisis cuantitativo no fue realizado debido a la falta de bandas a analizar.

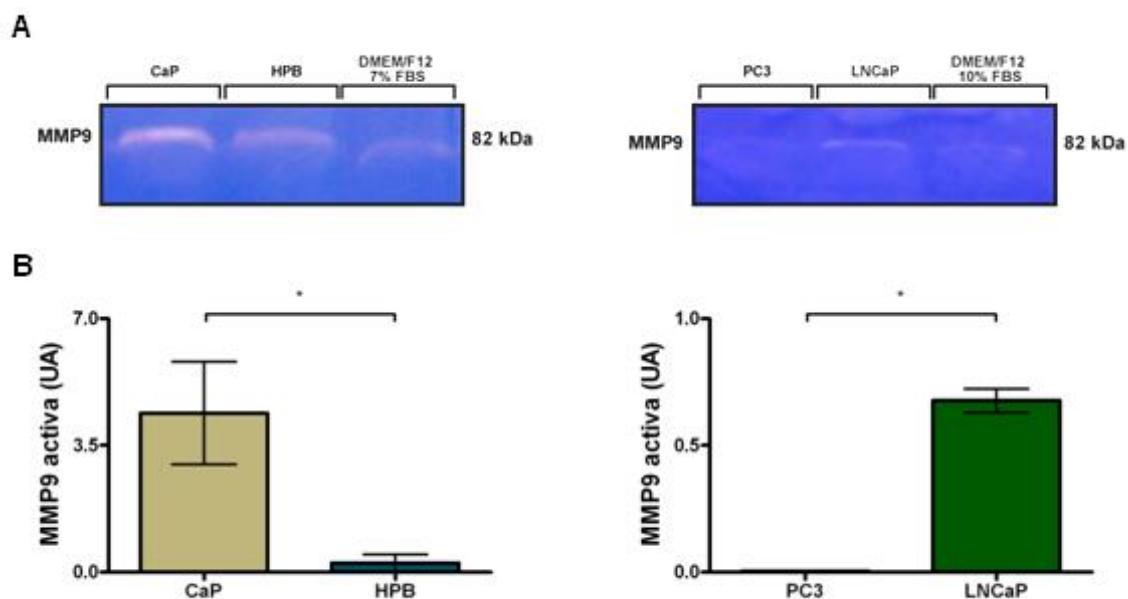


**Figura 24. Evaluación del ectodominio de Sindecano-2 en medios condicionados de CaP de distintos pasajes.** Western Blot de medios condicionados de CaP a distintos pasajes contra ectodominio de Sindecano-2. Control de carga tinción Ponceau de Albúmina de FBS.

#### 4.5 Determinación de la actividad de MMP-9 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares

Con el objetivo de evaluar la participación de MMP-9 como causante del *shedding*, se realizó una zimografía utilizando muestras de medios condicionados de cultivos primarios, líneas celulares y medio de cultivo fresco para descartar su presencia en el FBS del medio de cultivo.

Como se observa en la Fig. 25A, la zimografía muestra un halo de degradación de 82 kDa correspondiente a MMP9 activa. En CaP, el halo es más intenso que HPB, mientras que en las líneas celulares la degradación es escasa; el medio de cultivo fresco presenta trazas de MMP9 activa que fueron restadas para los análisis cuantitativos. Estos resultados dan cuenta de una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los niveles de MMP9 activa entre CaP e HPB, y su vez entre PC3 y LNCaP. (Fig. 25B).



**Figura 25. Evaluación de la actividad de MMP9 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares.** A) Zimografía de medios condicionados de cultivos primarios, líneas celulares y medio fresco. Los medios fueron recolectados luego de 48 horas. B) Análisis cuantitativo de los niveles de MMP9 activa en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \*  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ .

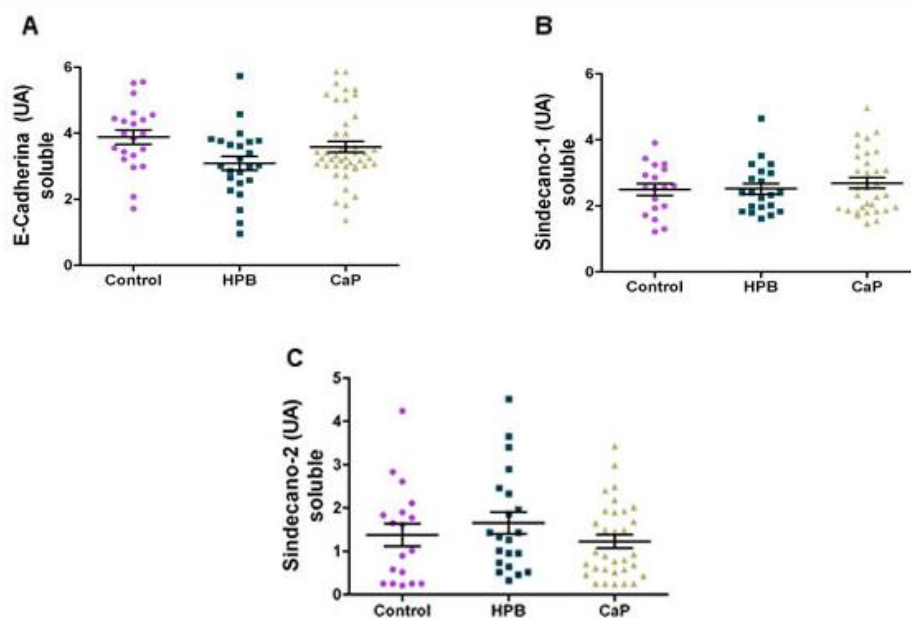
#### 4.6 Presencia de ectodominios de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en plasmas sanguíneos de individuos chilenos

Para evaluar si los ectodominios encontrados en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares se extrapolan a los niveles fisiológicos en pacientes, se realizaron ELISA Indirectos a muestras de plasma sanguíneo obtenidos de individuos que asistieron voluntariamente a la Semana de la Próstata Año 1999. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. En la Tabla 7 se presentan los grupos Control, CaP e HPB y cantidad de individuos (n), criterios utilizados, promedio de edad (años) y PSA (ng/mL).

Grupo	Casos (n)	Criterio	Edad (años)	PSA (ng/mL)
Control	18	TR normal - PSA < 4 ng/L	65	1,52
CaP	32	TR anormal/HPB - Biopsia positiva	64	12,1
<i>Gleason</i>				
3	9		61	5,86
4	6		69	10,2
5	9		64	6,73
6	2		67	6,0
7	6		64	33,2
HPB	21	TR anormal/HPB - Biopsia negativa	63	4,94

**Tabla 7. Demografía del estudio en individuos chilenos.** Las muestras de plasma sanguíneos fueron agrupadas según el criterio descrito. Se presentan el número de casos (n), promedio de edad (años) y PSA (ng/mL) de cada grupo. HPB: grupo con hiperplasia prostática benigna, CAP: grupo con cáncer de próstata, TR: tacto rectal.

En la Figura 26 se muestran los gráficos obtenidos del ensayo realizado contra el ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en las muestras de plasmas sanguíneos de pacientes resumidos en la Tabla 7. En el primer gráfico (Fig. 26A), correspondiente al ectodominio de E-Cadherina, el promedio del grupo Control fue mayor que el encontrado en los grupos CaP e HPB, sin embargo, la comparación estadística entre el grupo Control y CaP, y entre el grupo Control e HPB no fue estadísticamente significativa.



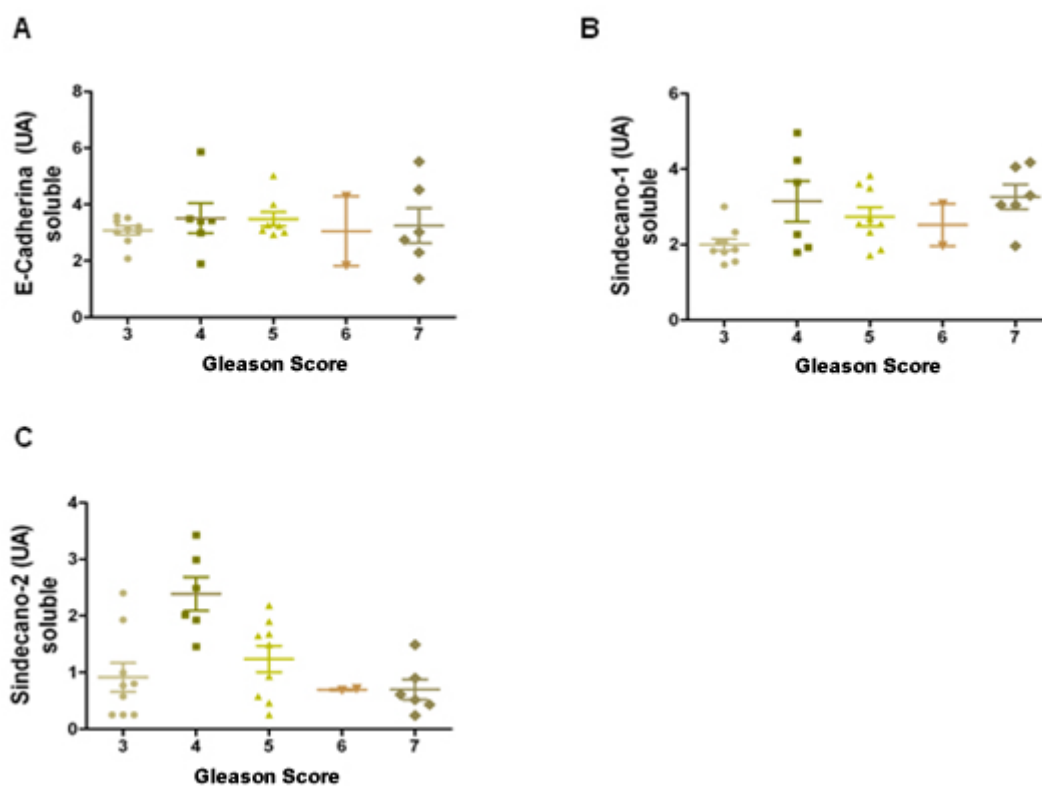
**Figura 25. Evaluación del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en plasmas sanguíneos de hombres chilenos.** Análisis de 71 muestras, separadas en tres grupos clínicos: Control (n = 18), CaP (n = 32) e HPB (n = 21), en busca de A) ectodominio de E-Cadherina, B) ectodominio de Sindecano-1, C) ectodominio de Sindecano-2. Cada círculo, triángulo o cuadrado es una muestra independiente. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ . Metodología adaptada de C. Seidel et al. J 2004.

En paralelo, se realizó el ensayo ELISA para el ectodominio de Sindecano-1 graficado en la Fig. 26B, con un promedio similar entre los tres grupos clínicos, corroborado mediante la comparación estadística entre grupo Control – CaP y grupo Control – HPB sin diferencias significativas.

Por último, se graficaron los resultados para el ectodominio de Sindecano-2 (Fig. 26C), donde el análisis cuantitativo del grupo Control vs CaP y grupo Control vs HPB no arrojaron diferencias significativas posiblemente por la amplia desviación estándar y promedios similares.



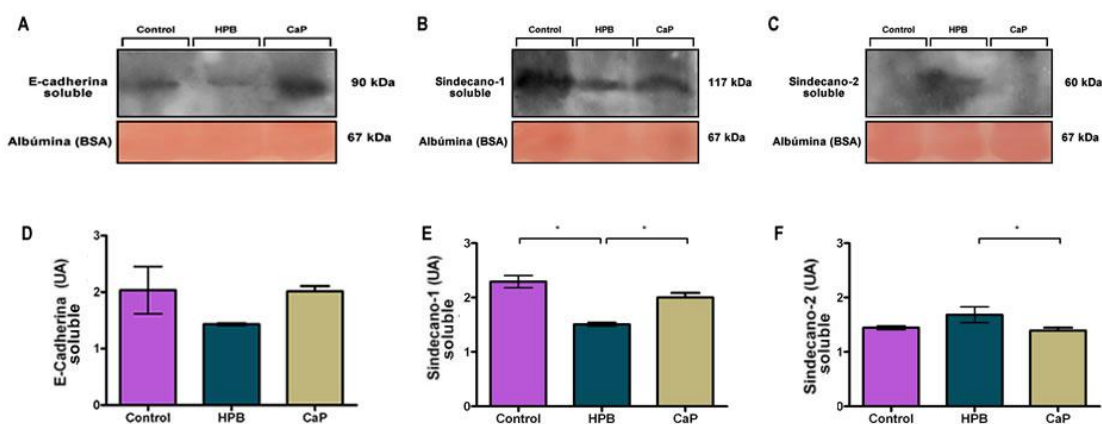
A continuación, se buscó determinar si las dispersiones presentes en el grupo CaP presentaban correlación con el grado de diferenciación de los carcinomas, es decir, si existe una relación directa o indirectamente proporcional entre los valores para cada muestra evaluada en el grupo CaP de la Figura 26 y el Gleason score establecido en la biopsia del mismo individuo al que le corresponde la muestra sanguínea.



**Figura 27. Representación de los niveles de ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 del grupo CaP según Gleason score.** Análisis de 32 muestras, separadas por el Gleason score informado en las biopsias A) ectodominio de E-Cadherina, B) ectodominio de Sindecano-1, C) ectodominio de Sindecano-2. Cada símbolo es una muestra independiente. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ . Metodología adaptada de C. Seidel et al. J 2004.

En la Figura 27 se observa el análisis por Gleason score de los resultados obtenidos para el grupo CaP evaluando el ectodominio de E-Cadherina (Fig. 27A), de Sindecano-1 (Fig. 27B) y de Sindecano-2 (Fig. 27C). En los tres casos, no existe una diferencia significativa entre las muestras con Gleason score 3 (G. 3) y Gleason score 7 (G.7), este último corresponde al mayor score encontrado entre las biopsias de este estudio. Tampoco se observa un aumento o disminución progresiva de los valores de ectodominios versus el Gleason score, similar a lo que se observa en el promedio de PSA señalado en la Tabla 7, que no aumenta a mayor diferenciación del carcinoma prostático.

Para confirmar los datos obtenidos, se seleccionaron tres muestras promedio de cada grupo clínico evaluado en la Figura 26 y se realizó la detección mediante Western Blot para el ectodominio de E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2. En los tres casos, se obtuvieron bandas de peso similar al encontrado en los medios condicionados. El análisis cuantitativo da cuenta de la misma tendencia obtenida mediante ELISA para E-cadherina y Sindecano-2, pero niveles distintos para Sindecano-1 en cual predomina el grupo control y no CaP.



**Figura 28. Evaluación del ectodominio de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en plasmas sanguíneos de hombres chilenos mediante Western Blot.** Análisis de 3 muestras de la zona promedio de cada grupo clínico (Control, HPB y CaP) obtenido por ELISA para A) ectodominio de E-cadherina, B) ectodominio de Sindecano-1, C) ectodominio de Sindecano-2. Control de carga tinción Ponceau de Albúmina. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE, \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ .

# DISCUSIÓN

## 5.1 Expresión de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en cultivos primarios y líneas celulares

Las moléculas de adhesión celular tienen importantes y variadas funciones que están involucradas en diferentes procesos celulares tales como embriogénesis, morfología celular, desarrollo tisular, adhesión y migración celular. A su vez, se ha descrito su participación en variadas patologías y tipos de cáncer, jugando en este último un papel importante en la transformación maligna celular y en la progresión del cáncer mismo [16,69,76].

Las cadherinas son moléculas de adhesión célula-célula dependientes de calcio, esenciales para el establecimiento y mantención de los epitelios. La E-cadherina (120 kDa) está relacionada con interacciones entre células epiteliales, y su pérdida o disminución se correlacionan con desdiferenciación celular e invasividad en diversos tipos de cánceres, tales como cáncer de próstata, mamario y pulmón, entre otros [39,111]. Nuestros resultados indican que los niveles encontrados en cultivos primarios de CaP, a diferencia de la literatura, fueron estadísticamente mayores con respecto al control no tumoral (HPB). Normalmente la disminución o pérdida de expresión de E-cadherina es debido a una represión transcripcional del gen [90]. En tanto, estudios previos en nuestro laboratorio ratifican niveles mayores tanto de E-cadherina como de  $\beta$ -catenina en CaP [120]. Una alteración en este complejo o la ausencia de  $\alpha$ -catenina induce una pérdida de unión de E-cadherina con el citoesqueleto lo que trae como consecuencia una pérdida de la adhesión celular y aumento en el potencial invasivo de las células [105]

De acuerdo a la información disponible, la expresión de E-cadherina en células PC3 es disminuida [33,116] a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio. Estudios en líneas celulares DU145 (también derivada de metástasis de CaP) dan cuenta del fenómeno de subpoblaciones existentes en las líneas celulares comerciales. De

acuerdo con esto, la expresión de proteínas es distinta, con lo cual una subpoblación celular expresa niveles similares al cultivo parental mientras que otras subpoblaciones carecen de la expresión de E-cadherina. Asociado con la disminución de la expresión de E-cadherina, el fenotipo celular resulta ser más agresivo e invasivo [28]. Esta diferencia también se observó en un estudio reciente utilizando PC3 que da cuenta de la plasticidad de E-cadherina y su re-expresión en un subcultivo para mantener la funcionalidad de células troncales remanentes y su capacidad de formar colonias en lugares distantes. Estos datos son concordantes con la alta capacidad tumorigénica y mayor poder metastático que presentan las células PC3 [65]. Este efecto no se daría en células LNCaP que se caracterizan por tener una baja capacidad tumorigénica, además de presentar receptores de andrógenos capaces de mantener los niveles de E-cadherina de manera constante bajo terapia hormonal [20].

Los proteoglicanos Sindecano-1 y Sindecano-2 presentan cadenas de HS que les confieren la habilidad de unir proteínas extracelulares y formar complejos de señalización con factores de crecimiento y morfogénicos [13,22]. Han sido implicados en diferentes cánceres con resultados como supresores o activadores tumorales dependiendo el tipo de cáncer [13,112]. Nuestros resultados revelan expresión de Sindecano-1 en cultivos primarios de CaP al igual que en el grupo no tumoral (HPB). Estudios previos en nuestro Laboratorio demostraron una correlación inversa entre la expresión de Sindecano-1 y el grado Gleason [33], considerando que los cultivos primarios provienen de CaP con índice de Gleason medios, es concordante encontrar aún expresión de Sindecano-1. También se ha indicado correlación entre un aumento de Sindecano-1 y la recurrencia de CaP [25]. Esta correlación también se observó en tejido metastizado lo que concuerda con la expresión encontrada en PC3 y LNCaP, ambas líneas celulares derivados de metástasis a huesos y nódulos linfáticos, respectivamente. La mayor expresión en PC3 en comparación con LNCaP relacionaría a Sindecano-1 con células con alta capacidad metastásica. Además, otros estudios han relacionado un incremento significativo de Sindecano-1 en células independientes de andrógenos como PC3 y DU145 en comparación con líneas celulares dependientes

de andrógenos como LNCaP, proceso revertido en este último tras deprivación androgénica. [104]. Por el contrario, se ha evidenciado que Sindecano-1 es regulado negativamente en cáncer de pulmón [4] y colorrectal [72] y su efecto en la progresión del tumor también ha sido relacionado con tejido estromal [73], confiriendo propiedades órgano y tejido específico.

Sindecano-2 es sobre-expresado en cáncer ovárico, osteosarcoma y tumores cerebrales [38,44,88]. En cáncer de pulmón y colon ha sido relacionado con promoción de la tumorigénesis mediante la regulación de la adhesión celular [13,89]. Una disminución de la expresión de Sindecano-2 se relaciona con un fenotipo epitelial de monocapas con citoesqueleto organizado [89], mientras que un aumento en su expresión conlleva cambios morfológicos, disminución de moléculas de adhesión celular y aumento del potencial invasivo y metastático [115]. Estudios previos señalan una sobre-expresión de Sindecano-2 en CaP y disminución o ausencia en tejido normal, de HPB y de origen estromal [91,115] concordante con lo encontrado en nuestros resultados para CaP e HPB.

Por otro lado, cuando se inmunolocalizan estas proteínas, tanto E-cadherina como Sindecano-1 fueron escasamente detectables en el límite celular, a diferencia de Sindecano-2 que se localizó claramente en la superficie y en estructuras celulares como filopodios, procesos que han sido descrito previamente en otros modelos como células embrionarias de riñón y neuronas de hipocampo [68].

## 5.2 Ectodominios de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en medios condicionados de cultivos primarios y líneas celulares

Dentro de los distintos tipos de regulación de una proteína, la liberación proteolítica del dominio extracelular de una proteína transmembrana, denominado *shedding*, es un proceso parcialmente estudiado. Se postula que el proceso permite liberar factores inhibitorios unidos a la célula, acumular grandes cantidades de polipéptido soluble para usar como señal paracrina o secuestrar factores solubles [27].

La regulación del funcionamiento de E-cadherina incluye mutaciones puntuales en los sitios de unión a calcio, pérdida de asociación con cateninas, las cuales forman enlaces con el citoesqueleto, y modificaciones postranscripcionales como proteólisis [79,105]. De manera constitutiva, la línea celular de cáncer mamario MCF7 libera un fragmento de 80 kDa al medio extracelular [118]. Según nuestros resultados, los cultivos primarios de CaP inicialmente no liberan el ectodominio E-cadherina, descartándose un proceso constitutivo.

Normalmente, la TEM va asociada a una disminución de la adhesión célula-célula, pérdida de la polaridad epitelial de las células, lo cual estimula un aumento de la capacidad invasiva y metastásica [41]. Sin embargo, en cáncer mamario se ha observado una TEM reversa (TME) con re-expresión de E-cadherina, siendo un paso crítico en la supervivencia celular en el nuevo microambiente que significa un sitio metastático. [23]. Considerando que los cultivos primarios de CaP son provenientes de prostatectomías radicales, el nuevo microambiente al que se exponen sería capaz de causar una TME que permitiría su asentamiento, y estaría dado por expresión celular de E-cadherina y la no realización de *shedding* del ectodominio. En un corto plazo, las células tumorales son capaces de generar un *switch* que genera de forma constante *shedding* del ectodominio de E-cadherina, como se evidenció a distintos pasajes, sugiriendo su regulación y conversión de las células al fenotipo TEM.

Las células metastásicas son capaces de re-expresar E-cadherina [65], por lo tanto en el microambiente de un nuevo órgano, la generación de un polipéptido soluble con propiedades autocrinas y paracrinas ayudaría a la activación de genes de proliferación celular. Esto explicaría el *shedding* tanto en PC3 como LNCaP, ambos derivados de metástasis ósea y nódulo linfático, respectivamente, de cáncer de próstata. El ectodominio soluble de E-cadherina encontrado sería capaz de causar dispersión en cultivos de células epiteliales [87], unirse y activar a los receptores HER2 y HER2, aumentando la activación y señalización de la vía Erk para ayudar a la migración y proliferación, proceso ya evidenciado en cáncer mamario [84].

El *shedding* en Sindecanos se lleva a cabo normalmente cerca de la membrana citoplasmática; la liberación del ectodominio no sólo reduce la transducción de señal, sino que convierte a receptores unidos a membrana en efectores solubles o antagonistas. Un Sindecano soluble puede competir con un Sindecano intacto por ligandos extracelulares en el ambiente pericelular [108]. El ectodominio soluble de Sindecano-1 ha sido encontrado en fluidos inflamatorios [110] y matriz extracelular de biopsias de mieloma [12]. En células de cáncer mamario MCF-7, con un fenotipo más benigno que otras líneas celulares, el ectodominio unido a membrana promueve la proliferación celular mediante señalización MAPK e inhibe la invasividad, mientras que el ectodominio soluble inhibe la proliferación y promueve la invasión celular [86]. En cambio, el *shedding* de Sindecano-1 desde tejido estromal de cáncer mamario se asocia a proliferación celular [109]. En nuestros resultados, se evidenció ectodominio en el medio extracelular de CaP y PC3 sugiriendo una relación con cultivos con mayor agresividad y crecimiento, similar a lo encontrado en mielomas [125].

En HT29, línea celular derivada de cáncer de colon, tanto la expresión como la liberación del ectodominio Sindecano-2 al medio extracelular se encuentran aumentadas [89]. Se presume que en cáncer de colon, debido a la alta expresión de Sindecano-2, las células producirían grandes cantidades de ectodominio soluble capaz

de unirse a receptores carcinógenos aún desconocidos. Sin embargo, los resultados obtenidos no muestran niveles de ectodominio de Sindecano-2 en los medios condicionados de cultivo primario CaP al corto plazo; por el contrario, las líneas celulares PC3 y LNCaP si lo liberan al medio extracelular sugere de una característica de líneas celulares comerciales. En células endoteliales se evidencia que el tratamiento con EGF, FGF-2 o VEGF provocan el *shedding* de Sindecano-2 y que el ectodominio induciría angiogénesis [44], pero no existe más literatura referente a condiciones no neoplásicas para contrastar los resultados obtenidos en HPB.

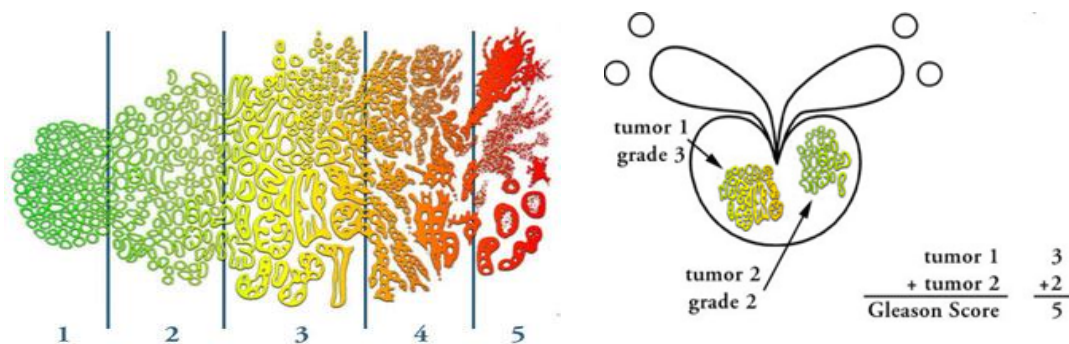
El proceso de liberación del ectodominio es altamente regulado y requiere acción directa de enzimas denominadas “sheddasas” como metaloproteinasas (MMPs) y desintegrinas (ADAMs). Bajo condiciones fisiológicas, la actividad de las MMPs es regulada por transcripción, activación de su precursor, interacciones con componentes específicos de la matriz extracelular e inhibidores (TIMP) que otorgan un balance para prevenir la excesiva degradación. En cánceres, las MMPs son sobre-reguladas y se correlacionan con una mala prognosis [36]. La evidencia muestra que MMP-7, MT1-MMP, MT3-MMP, ADAM17 y ADAMTS son capaces de cortar el ectodominio de Sindecano-1, las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 a ambos Sindecanos [42,67,92] y proteasas como MMP-3, MMP-7, MMP-9, ADAM10 y ADAM15 liberan el ectodominio de E-cadherina [41]. En este estudio se evidenció actividad de MMP-9 en los medios condicionados de cultivos primarios de CaP y LNCaP (6 veces menos), concordante con que niveles de RNAm de MMP-9 aumentados se relaciona con un mayor *score* de Gleason del CaP [122]. También podemos señalar que el aumento de la actividad de esta enzima en CaP, se correlaciona con el aumento de la agresividad de los cultivos primarios [84]. A diferencia de la literatura, PC3 presentó niveles indetectables de actividad de MMP9. Se ha detectado que la concentración de esta enzima en el medio extracelular es mayor en PC3 que LNCaP [115], por lo tanto, el tiempo de incubación de 48 horas puede no ser suficiente para acumular niveles detectables de MMP9 activa. Todas las MMPs solubles son secretadas como zimógenos activados posteriormente por la eliminación proteolítica del pro-péptido [75].



### 5.3 Ectodominios de E-Cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 en plasmas sanguíneos de hombres chilenos

El estudio de los procesos que conlleva el cáncer no es sólo importante para comprender la biología del tumor, sino para su uso en el diagnóstico y pronóstico de los cánceres. Muchos de los marcadores actuales son moléculas relativamente largas provenientes del lado apical de células epiteliales y su presencia en la circulación indica la pérdida de barreras locales de difusión y su concentración plasmática refleja el volumen del tumor.

El fragmento soluble de 80 kDa de E-cadherina ha sido estudiado en sueros y plasmas sanguíneos de pacientes con cáncer ovárico [46], vejiga [48], colorrectal [117], melanoma [15] y pulmón [24] correlacionado con un mayor grado tumoral, metástasis y mal pronóstico. En CaP, los estudios séricos señalan diferencias significativas entre pacientes control, con HPB, CaP localizado y CaP metastático, con un mayor nivel en este último [64]. Nuestros resultados muestran una tendencia a un mayor nivel en CaP que HPB, sin embargo, por los dos métodos utilizados el nivel encontrado en el grupo control fue mayor, por reacción cruzada u otros procesos capaces de elevar los niveles. Por otra parte, el grupo metastático analizado en la literatura corresponden a tumores de alto grado y mayor potencial invasivo. El Gleason score, sistema de clasificación de tumores en CaP (Figura 29), de las biopsias asociadas a cada muestra evidenció una variación en la tendencia en Gleason score 5 a 6, correspondiente al paso de tumores de grado medio a alto. Existe evidencia de que una menor expresión celular de E-cadherina, y sugerentemente mayores niveles de su ectodominio soluble, estaría asociado células tumorales más agresivas e invasivas. [28]. Células cancerígenas y normales de próstata han sido identificadas en semen [11] mientras que el fragmento de E-cadherina en orina, reflejo de *shedding* en el epitelio del tracto urinario [9], corroborando la posibilidad de estudio en otros fluidos fisiológicos.



**Figura 29. Interpretación de grado y score Gleason.** *Izquierda:* 1. Pequeño, glándulas uniformes, 2. Más tejido estromal entre glándulas, 3. Márgenes claramente infiltrantes, 4. Masas irregulares de glándulas neoplásicas, 5. Sólo formación de glándula ocasional. *Derecha:* cálculo del Gleason score. Imagen adaptada del sitio web de St. John Providence Health System.

Hemos demostrado que el dominio extracelular de Sindecano-1 puede ser liberado desde la superficie celular al medio extracelular en cáncer de próstata. El aumento de su ectodominio en sangre ha sido asociado a pacientes con mal pronóstico en cáncer pulmonar y reducido promedio de vida en pacientes con mieloma múltiple [57,102], resultado esperable debido a que la concentración de Sindecano-1 es el reflejo del número de células mieloide malignas. En nuestros resultados, se observa una tendencia al alza en los niveles del grupo CaP en comparación con los grupos control e HPB, concordante con los resultados obtenidos en análisis de medios condicionados. El análisis por Gleason score muestra variaciones, a diferencia de la correlación inversa expuesta por Contreras *et al.* [33], posiblemente por procesos inflamatorios subyacentes donde el ectodominio de Sindecano-1 actúa capturando quimioquinas para facilitar la resolución de la inflamación [51]. Sin embargo, entregamos los primeros hallazgos para el ectodominio de Sindecano-1 en plasma sanguíneo en Cáncer de Próstata, sumándose a los existentes en la predicción de fibrosis hepática en pacientes con Hepatitis C [127], mieloma múltiple [102] y cáncer de pulmón [57].

Para Sindecano-2 no se han realizado estudios clínicos en sangre, pese a la relación establecida entre la sobre-expresión de Sindecano-2 en cáncer de colon y su crecimiento tumoral [13,89] y que en cultivos celulares de HT29 se ha evidenciado el *shedding* del ectodominio [99]. Su expresión también se ha visto aumentada en cáncer de ovario [38]. Un análisis piloto en fluidos pleurales y ascíticos de mesoteloma, un tipo de cáncer poco común al revestimiento pulmonar, fue realizado para identificar Sindecano-2 pero sin el número de muestras necesarias para una correlación [103]. Nuestros resultados dan cuenta, tanto en medios condicionados como la tendencia en el ELISA de plasmas sanguíneos, que un mayor nivel de ectodominio soluble de Sindecano-2 está asociado a HPB, mientras que en CaP el nivel se ve disminuido por la sobre-expresión celular de esta proteína, reduciendo su liberación al medio extracelular. El Gleason score evidencia la disminución de ectodominio soluble de Sindecano-2 a medida que aumenta el score, y por ende la agresividad e invasividad del tumor. El quiebre en la tendencia entre Gleason score 3 y 4 puede deberse a múltiples razones: ser una zona gris similar a lo ocurrido en PSA Total, otras patologías benignas o tumorales subyacentes que alteren los valores, o un *switch* en el tumor local que hace necesario encender/apagar procesos para su crecimiento y proliferación.

Los análisis tuvieron el propósito de obtener una tendencia entre los diferentes grupos clínicos, sin embargo, se requiere mayor estandarización para poder correlacionar con parámetros como edad, género, tamaño tumoral y sobrevida. Las determinaciones se realizaron ELISA Indirecto, con menor sensibilidad que ELISA directo o de doble captura ocupados en clínica, pero con coeficiente de variación intra-ensayo menor al 10% que asegura la reproducibilidad de los datos. La curva estándar se utilizó realizando diluciones de una muestra analizada previamente, adaptado del protocolo de Seidel *et al.* frente a la carencia y costo de kits comerciales; para futuros análisis es imperativo la purificación y cuantificación de los ectodominios y definir estándares para ELISA. Poco además se sabe de la influencia del tiempo y temperatura de almacenamiento pudiendo afectar la inmunoreactividad, y del historial

clínico de los pacientes que involucre diferencias histológicas, metástasis u otras patologías, que pueden influir en los valores promedio obtenidos.

En definitiva, se presentó en este trabajo las primeras evidencias de la capacidad de re-expresión de E-cadherina en cultivos primarios de CaP y la ratificación en muestras de hombres chilenos de resultados encontrados en la literatura. Además, la evaluación del ectodominio de Sindecano-1 y su posible relación positiva en pacientes con carcinoma prostático, ratifica tanto para E-cadherina como Sindecano-1 la hipótesis propuesta de una relación positiva entre el aumento del ectodominio soluble de estas proteínas y Cáncer de Próstata. Por último, la evidencia obtenida con respecto a Sindecano-2, refuta parcialmente la hipótesis al no existir una relación positiva entre éste y Cáncer de Próstata, por el contrario, existe una disminución o ausencia de *shedding* a mayor grado tumoral; se sugiere que el *shedding* de Sindecano-2 es un proceso que puede afectar también a procesos benignos y que es una proteína con rol tumorigénico en Cáncer de Próstata, dando paso a un posible blanco terapéutico.

## CONCLUSIONES

1. E-cadherina, Sindecano-1 y Sindecano-2 están presentes en cultivos primarios (HPB y CaP) y líneas celulares de adenocarcinoma prostático (PC3 y LNCaP).
2. Sindecano-1 y E-cadherina desarrollan el proceso de *shedding* en Cáncer de Próstata. Sindecano-2 está sobre-expresado en Cáncer de Próstata y no es regulado mediante *shedding*.
3. Los péptidos resultantes del *shedding* de Sindecano 1, Sindecano-2 y E-cadherina pueden ser determinados en plasma sanguíneo.
4. Existe una relación positiva entre mayor cantidad de ectodominio de E-cadherina y Sindecano-1 versus Cáncer de Próstata, en plasma sanguíneo, y a su vez con tumores de mayor agresividad. Sindecano-2, concordante con la ausencia de *shedding*, tiene una relación negativa con respecto a tumores de mayor agresividad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ABCam. Resources: Indirect ELISA Protocol. 2010. <http://www.abcam.com>
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raaff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 3ª Edición. Barcelona, Omega 1996.
3. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures. 2010. <http://www.cancer.org>
4. Anttonen A, Heikkilä P, Kajanti M, Jalkanen M, Joensuu H. High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery. *Lung Cancer*. 2001 Jun;32(3):297-305.
5. Arenas J. Epidemiología del cáncer prostático en Chile. *Rev Chil Urol*. 2006; 71: 49-52
6. Arribas J, Coodly L, Vollmer P, Kishimoto TK, Rose-John S, Massagué J. Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem*. 1996 May 10;271(19):11376-11382.
7. Baechler R, Henríquez R, Aqueveque X, Martínez ME, Soto A. Prostate neoplasm prevalence in Talca, VII Region of Chile. *Rev Med Chil*. 2001. 129:1305-1310
8. Banks RE, Porter WH, Whelan P, Smith PH, Selby PJ. Soluble forms of the adhesion molecule E-cadherin in urine. *J Clin Pathol*. 1995 Feb;48(2):179-80.
9. Bao L, Loda M, Janmey PA, Stewart R, Anand-Apte B, Zetter BR. Thymosin beta 15: a novel regulator of tumor cell motility upregulated in metastatic prostate cancer. *Nat Med*. 1997. 2:1322-1328
10. Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*. 2003 Aug 1;98(3):474-83.
11. Barren RJ 3rd, Holmes EH, Boynton AL, Gregorakis A, Elgamal AA, Cobb OE, Wilson CL, Ragde H, Murphy GP. Method for identifying prostate cells in semen using flow cytometry. *Prostate*. 1998 Aug 1;36(3):181-8.
12. Bayer-Garner IB, Sanderson RD, Dhodapkar MV, Owens RB, Wilson CS. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Mod Pathol*. 2001 Oct;14(10):1052-8.
13. Beauvais DM, Rapraeger AC. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004. 7;2:3.
14. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992. 8:365-93
15. Billion K, Ibrahim H, Mauch C, Niessen CM. Increased soluble E-cadherin in melanoma patients. *Skin Pharmacol Physiol*. 2006;19(2):65-70
16. Blanco D, Vicent S, Elizegi E, Pino I, Fraga MF, Esteller M, Saffiotti U, Lecanda F, Montuenga LM. Altered expression of adhesion molecules and epithelial-mesenchymal transition in silica-induced rat lung carcinogenesis. *Lab Invest*. 2004 Aug;84(8):999-1012.
17. Bourin MC, Lindahl U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J*. 1993 Jan 15;289 ( Pt 2):313-330
18. Buczek-Thomas JA, Nugent MA. Elastase-mediated release of heparan sulfate proteoglycans from pulmonary fibroblast cultures. A mechanism for basic fibroblast growth factor (bFGF) release and attenuation of bfgf binding following elastase-induced injury. *J Biol Chem*. 1999 Aug 27;274(35):25167-72.
19. Calmon MF, Rahal P. CDH1 (cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. October 2007. <http://www.atlasgeneticsoncology.org/>

20. Carruba G, Miceli D, D'Amico D, Farruggio R, Comito L, Montesanti A, Polito L, Castagnetta LA. Sex steroids up-regulate E-cadherin expression in hormone-responsive LNCaP human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 17;212(2):624-31.
21. Castellon E, Venegas K, Saenz L, Contreras H, Huidobro C. Secretion of prostatic specific antigen, proliferative activity and androgen response in epithelial-stromal co-cultures from human prostate carcinoma. *Int J Androl* 29(1): 39-46, 2005.
22. Carey DJ. Syndecanos: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*. 1997 Oct 1;327 ( Pt 1):1-16.
23. Chao YL, Shepard CR, Wells A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol Cancer*. 2010 Jul 7;9:179.
24. Charalabopoulos K, Gogali A, Dalavaga Y, Daskalopoulos G, Vassiliou M, Bablekos G, Karakosta A, Constantopoulos S. The clinical significance of soluble E-cadherin in nonsmall cell lung cancer. *Exp Oncol*. 2006 Mar;28(1):83-5.
25. Chen D, Adenekan B, Chen L, Vaughan ED, Gerald W, Feng Z, Knudsen BS. Syndecano-1 expression in locally invasive and metastatic prostate cancer. *Urology*. 2004. 63:402-7.
26. Choi DS, Kim JH, Ryu HS, Kim HC, Han JH, Lee JS, Min CK. Syndecano-1, a key regulator of cell viability in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2007. 15;121(4):741-50.
27. Choi S, Lee H, Choi JR, Oh ES. Shedding; towards a new paradigm of syndecan function in cancer. *BMB Rep*. 2010 May;43(5):305-10.
28. Chunthapong J, Seftor EA, Khalkhali-Ellis Z, Seftor RE, Amir S, Lubaroff DM, Heidger PM Jr, Hendrix MJ. Dual roles of E-cadherin in prostate cancer invasion. *J Cell Biochem*. 2004 Mar 1;91(4):649-61.
29. Cifuentes F. Tesis de Magíster. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. 2009.
30. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. Manual Informativo sobre Cáncer de Próstata. Uruguay. <http://www.urucan.org.uy/>
31. Conejo JR, Kleeff J, Koliapanos A, Matsuda K, Zhu ZW, Goecke H, Bicheng N, Zimmermann A, Korc M, Friess H, Büchler MW. Syndecano-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers. *Int J Cancer*. 2000.1;88(1):12-20
32. Contreras HR, Fabre M, Granés F, Casaroli-Marano R, Rocamora N, Herreros AG, Reina M, Vilaro S. Syndecano-2 expression in colorectal cancer-derived HT-29 M6 epithelial cells induces a migratory phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 286 (4): 742-51, 2001.
33. Contreras HR, Ledezma RA, Vergara J, Cifuentes F, Barra C, Cabello P, Gallegos I, Morales B, Huidobro C, Castellón EA. The expression of syndecan-1 and -2 is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer. *Urol Oncol*. 2009 May 16.
34. Cowen ME, Miles BJ, Cahill DF, Giesler RB, Beck JR, Kattan MW. The danger of applying group-level utilities in decision analyses of the treatment of localized prostate cancer in individual patients. *Med Decis Making*. 1998. 18:376-380
35. Crawford ED, Schutz MJ, Clejan S, Drago J, Resnick MI, Chodak GW, Gomella LG, Austenfeld M, Stone NN, Miles BJ, et al. The effect of digital rectal examination on prostate-specific antigen levels. *JAMA*. 1992 Apr 22-29;267(16):2227-2228
36. Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8229-34.
37. Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell*. 1983. 34(2):455-466.
38. Davies EJ, Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC. Distribution and clinical significance of heparan sulfate proteoglycans in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 1;10(15):5178-86.

39. Davies G, Jiang WG, Mason MD. E-cadherin and associated molecules in the invasion and progression of prostate cancer. *Oncol Rep.* 1998 Nov-Dec;5(6):1567-76.
40. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007. 7(4):256-69
41. De Wever O, Derycke L, Hendrix A, De Meerleer G, Godeau F, Depypere H, Bracke M. Soluble cadherins as cancer biomarkers. *Clin Exp Metastasis.* 2007. 24(8):685-697.
42. Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem.* 2003. 17;278(42):40764-70.
43. Essner JJ, Chen E, Ekker SC. Syndecano-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006. 38(2):152-156.
44. Fears CY, Gladson CL, Woods A. Syndecano-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2006 May 26;281(21):14533-6
45. Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol.* 2000 Feb 21;148(4):811-24.
46. Gadducci A, Ferdeghini M, Cosio S, Annicchiarico C, Ciampi B, Bianchi R, Genazzani AR. Preoperative serum E-cadherin assay in patients with ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 1999 Jan-Feb;19(1B):769-72.
47. Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med.* 2008. 14(5):199-209.
48. Griffiths TR, Brothrick I, Bishop RI, White MD, McKenna DM, Horne CH, Shenton BK, Neal DE, Mellon JK. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer.* 1996 Aug;74(4):579-84.
49. Hasengaowa, Kodama J, Kusumoto T, Shinyo Y, Seki N, Hiramatsu Y. Prognostic significance of syndecan-1 expression in human endometrial cancer. *Ann Oncol.* 2005. 16(7):1109-15.
50. Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. Association of loss of epithelial syndecan-1 with stage and local metastasis of colorectal adenocarcinomas: an immunohistochemical study of clinically annotated tumors. *BMC Cancer.* 2008 Jun 30;8:185.
51. Hayashida K, Parks WC, Park PW. Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines. *Blood.* 2009 Oct 1;114(14):3033-43
52. Hooper NM. Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. *Clin Chim Acta.* 1997. 9;266(1):3-12.
53. Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 1999. 9(12):M33-7.
54. Jaakkola P, Vihinen T, Määttä A, Jalkanen M. Activation of an enhancer on the syndecan-1 gene is restricted to fibroblast growth factor family members in mesenchymal cells. *Mol Cell Biol.* 1997. 17(6):3210-9.
55. Jalkanen M, Rapraeger A, Saunders S, Bernfield M. Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells is shed by cleavage of its matrix-binding ectodomain from its membrane-associated domain. *J Cell Biol.* 1987. 105(6 Pt 2):3087-96.
56. Jilani I, Wei C, Bekele BN, Zhang ZJ, Keating M, Wierda W, Ferrajoli A, Estrov Z, Kantarjian H, O'Brien SM, Giles FJ, Albitar M. Soluble syndecan-1 (sCD138) as a prognostic factor independent of mutation status in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Lab Hematol.* 2008. Jan 7.
57. Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, Mäkitaro R, Alfthan H, Kinnula V, Leppä S. Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Res.* 2002. 15;62(18):5210-5217.
58. Kato M, Saunders S, Nguyen H, Bernfield M. Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells. *Mol Biol Cell.* 1995 May;6(5):559-76.



59. Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald ML, Ledbetter S, Ornitz DM, Bernfield M. Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med.* 1998 Jun;4(6):691-7.
60. Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem.* 1991. 60:443-475.
61. Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. Tumour-stromal interactions in breast cancer: the role of stroma in tumourigenesis. *Tumour Biol.* 2005 Jul-Aug;26(4):173-85
62. Kiviniemi J, Kallajoki M, Kujala I, Matikainen MT, Alanen K, Jalkanen M, Salmivirta M. Altered expression of syndecan-1 in prostate cancer. *APMIS.* 2004 Feb;112(2):89-97.
63. Knudsen KA, Wheelock MJ. Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem.* 2005. 1;95(3):488-496.
64. Kuefer R, Hofer MD, Zorn CS, Engel O, Volkmer BG, Juarez-Brito MA, Eggel M, Gschwend JE, Rubin MA, Day ML. Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer. *Br J Cancer.* 2005. 6;92(11):2018-23.
65. Kyung-Mi Bae, Nicole N. Parker, Yao Dai, Johannes Vieweg, and Dietmar W. Siemann. E-cadherin plasticity in prostate cancer stem cell invasion. *Am J Cancer Res* 2011;1(1):71-84
66. Leppä S, Mali M, Miettinen HM, Jalkanen M. Sindecano expression regulates cell morphology and growth of mouse mammary epithelial tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Feb 1;89(3):932-6.
67. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell.* 2002 Nov 27;111(5):635-46.
68. Lin YL, Lei YT, Hong CJ, Hsueh YP. Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *J Cell Biol.* 2007 Jun 4;177(5):829-41.
69. Liu BY, Kim YC, Leatherberry V, Cowin P, Alexander CM. Mammary gland development requires syndecan-1 to create a beta-catenin/TCF-responsive mammary epithelial subpopulation. *Oncogene.* 2003. 22(58):9243-9253.
70. Liu W, Litwack ED, Stanley MJ, Langford JK, Lander AD, Sanderson RD. Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. Sindecanos and glypican have distinct functions. *J Biol Chem* 1998. 273:22825-22832.
71. Lovell R, Dunn JA, Begum G, Barth NJ, Plant T, Moss PA, Drayson MT, Pratt G. Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *Br J Haematol.* 2005. 130(4):542-548.
72. Lundin M, Nordling S, Lundin J, Isola J, Wiksten JP, Haglund C. Epithelial syndecan-1 expression is associated with stage and grade in colorectal cancer. *Oncology.* 2005;68(4-6):306-13
73. Maeda T, Alexander CM, Friedl A. Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Jan 15;64(2):612-21.
74. Mali M, Andtfolk H, Miettinen HM, Jalkanen M. Suppression of tumor cell growth by syndecan-1 ectodomain. *J Biol Chem.* 1994 Nov 11;269(45):27795-8.
75. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* 2010 Oct;277(19):3876-89
76. Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2009. 1788(4):872-891.
77. Martinez C, Martinez L. Manual de Urología Esencial. Universidad Católica de Chile. <http://escuela.med.puc.cl/publ/manualurologia/Default.html>

78. Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer*. 1997 Oct 21;74(5):482-91.
79. Matsuura K, Kawanishi J, Fujii S, Imamura M, Hirano S, Takeichi M, Niitsu Y. Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinomatous fluid. *Br J Cancer*. 1992 Dec;66(6):1122-30.
80. Modrowski D, Orosco A, Thévenard J, Fromigué O, Marie PJ. Syndecano-2 overexpression induces osteosarcoma cell apoptosis: Implication of syndecan-2 cytoplasmic domain and JNK signaling. *Bone*. 2005 Aug;37(2):180-9.
81. McNeal JE, Bostwick DG, Kindrachuk RA, Redwine EA, Freiha FS, Staney TA. Patterns of progression in prostate cancer. *Lancet*. 1986. 11;1(8472):60-63
82. Miller F, Torkko K. Natural history of prostate cancer-epidemiologic considerations. *Epidemiol Rev*. 2001. 23(1):14-8.
83. Munesh S, Yoshitomi Y, Kusano Y, Koyama Y, Nishiyama A, Nakanishi H, Miyazaki K, Ishimaru T, Miyaura S, Okayama M, Oguri K. A novel function of syndecan-2, suppression of matrix metalloproteinase-2 activation, which causes suppression of metastasis. *J Biol Chem*. 2007. 21;282:28164-28174.
84. Najj AJ, Day KC, Day ML. The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):18393-401.
85. National Cancer Institute. Cáncer de Próstata. <http://www.cancer.gov/espanol>
86. Nikolova V, Koo CY, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R, Kelsch R, Fischgräbe J, Smollich M, Rossi LH, Sibrowski W, Wülfing P, Kiesel L, Yip GW, Götte M. Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis*. 2009 Mar;30(3):397-407
87. Noë V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM, Mareel M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*. 2001 Jan;114(Pt 1):111-118.
88. Orosco A, Fromigué O, Haÿ E, Marie PJ, Modrowski D. Dual involvement of protein kinase C delta in apoptosis induced by syndecan-2 in osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2006. 1;98(4):838-50.
89. Park H, Kim Y, Lim Y, Han I, Oh ES. Syndecano-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2002. 16;277(33):29730-29736.
90. Pečina-Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*. 2003. 14;3(1):17.
91. Popović A, Demirović A, Spajić B, Stimac G, Kruslin B, Tomas D. Expression and prognostic role of syndecan-2 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2010 Mar;13(1):78-82.
92. Pruessmeyer J, Martin C, Hess FM, Schwarz N, Schmidt S, Kogel T, Hoettecke N, Schmidt B, Sechi A, Uhlig S, Ludwig A. A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem*. 2010 Jan 1;285(1):555-64
93. Purushothaman A, Sanderson RD . SDC1 (Syndecano 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2009. <http://www.atlasgeneticsoncology.org/>
94. Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC, Sanderson RD. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood*. 2010. 25;115(12):2449-57.
95. Rakha EA, Abd El Rehim D, Pinder SE, Lewis SA, Ellis IO. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology*. 2005 Jun;46(6):685-93.
96. Rapraeger AC, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. A putative membrane proteoglycan associates quantitatively with lipid vesicles. *J Biol Chem*. 1983 Mar 25;258(6):3632-6.

97. Ridley RC, Xiao H, Hata H, Woodliff J, Epstein J, Sanderson RD. Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood*. 1993 Feb 1;81(3):767-74.
98. Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1988. 4:229-255
99. Ryu HY, Lee J, Yang S, Park H, Choi S, Jung KC, Lee ST, Seong JK, Han IO, Oh ES. Syndecano-2 functions as a docking receptor for pro-matrix metalloproteinase-7 in human colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2009 Dec 18;284(51):35692-701.
100. Saenz E. Moléculas de Adhesión Celular. *Revista de Medicina Interna chilena*. 1997. 1(2)
101. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul*. 1989. 1(1):27-35
102. Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, Waage A, Borset M. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*. 2000. 15;95(2):388-392.
103. Seidel C, Gulyás M, David G, Dobra K, Theocharis AD, Hjerpe A. A sandwich ELISA for the estimation of human syndecan-2 and syndecan-4 in biological samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2004 Mar 1;34(4):797-801.
104. Shimada K, Nakamura M, De Velasco MA, Tanaka M, O uji Y, Konishi N. Syndecan-1, a new target molecule involved in progression of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Sci*. 2009 Jul;100(7):1248-54.
105. Shimoyama Y, Nagafuchi A, Fujita S, Gotoh M, Takeichi M, Tsukita S, Hirohashi S. Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res*. 1992 Oct 15;52(20):5770-4.
106. Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ. Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1996. 105(4):394-402.
107. Singer C, Marbaix E, Lemoine P, Courtoy P, Eeckhout Y. Local cytokines induce differential expression of matrix metalloproteinases but not their tissue inhibitors in human endometrial fibroblasts. 1999. *Eur J Biochem* 259:40-44.
108. Steinfeld R, Van Den Berghe H, David G. Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. *J Cell Biol*. 1996 Apr;133(2):405-16.
109. Su G, Blaine SA, Qiao D, Friedl A. Shedding of syndecan-1 by stromal fibroblasts stimulates human breast cancer cell proliferation via FGF2 activation. *J Biol Chem*. 2007 May 18;282(20):14906-15
110. Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem*. 1997 Jun 6;272(23):14713-20.
111. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*. 1993 Oct;5(5):806-11.
112. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2010 Oct;277(19):3904-23
113. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecanos: new kids on the signaling block. *Circ Res*. 2005 Mar 18;96(5):488-500
114. Vainio S, Lehtonen E, Jalkanen M, Bernfield M, Saxén L. Epithelial-mesenchymal interactions regulate the stage-specific expression of a cell surface proteoglycan, syndecan, in the developing kidney. *Dev Biol*. 1989.134(2):382-9
115. Valdés S. Presencia de proteoglicanos de heparansulfato y moléculas de adhesión en carcinoma prostático humano. Tesis de Bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2009.

116. Van der Poel HG. Molecular markers in the diagnosis of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007. 61:104-139
117. Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR, Hall NR, Jones M, Wyatt J, Miller K, Ward U, Al-Maskatti J, Singh SM, Finan PJ, Ambrose NS, Primrose JN, Selby PJ. Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998 Jun;77(11):1857-63.
118. Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH. Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *J Cell Biochem*. 1987 Jul;34(3):187-202.
119. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR.. Cadherin switching. *The journal of cell sciences*. 2008. 121:727-735.
120. Wilmanns C, Grossmann J, Steinhauer S, Manthey G, Weinhold B, Schmitt-Gräff A, von Specht BU. Soluble serum E-cadherin as a marker of tumour progression in colorectal cancer patients. *Clin Exp Metastasis*. 2004. 21(1):75-78.
121. Woods A, Couchman JR. Syndecano-4 and focal adhesion function. *Curr Opin Cell Biol*. 2001.13(5):578-83.
122. Wood M, Fudge K, Mohler JL, Frost AR, Garcia F, Wang M, Stearns ME. In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis*. 1997 May;15(3):246-58.
123. Worapamorn W, Tam SP, Li H, Haase HR, Bartold PM. Cytokine regulation of syndecan-1 and -2 gene expression in human periodontal fibroblasts and osteoblasts. *J Periodontal Res*. 2002 Aug;37(4):273-8.
124. Yang Y, Macleod V, Miao HQ, Theus A, Zhan F, Shaughnessy JD Jr, Sawyer J, Li JP, Zcharia E, Vlodaysky I, Sanderson RD. Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem*. 2007. 4;282:13326-13333.
125. Yang Y, Yaccoby S, Liu W, Langford JK, Pumphrey CY, Theus A, Epstein J, Sanderson RD. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):610-7.
126. Zellweger T, Ninck C, Bloch M, Mirlacher M, Koivisto PA, Helin HJ, Mihatsch MJ, Gasser TC, Bubendorf L. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2005 Feb 10;113(4):619-628.
127. Zvibel I, Halfon P, Fishman S, Penaranda G, Leshno M, Or AB, Halpern Z, Oren R. Syndecan 1 (CD138) serum levels: a novel biomarker in predicting liver fibrosis stage in patients with hepatitis C. *Liver Int*. 2009 Feb;29(2):208-12