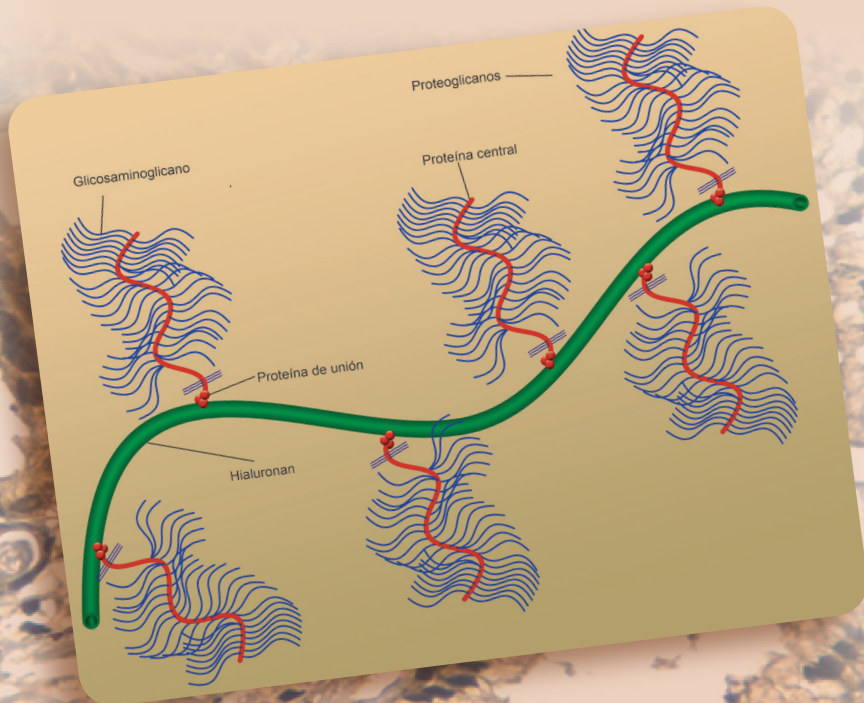


● Niradiz Reyes Ramos

Expresión de proteoglicanos en la próstata : biomarcadores potenciales con implicaciones patológicas



**EXPRESIÓN DE PROTEOGLICANOS
EN LA PRÓSTATA:
BIOMARCADORES POTENCIALES CON
IMPLICACIONES PATOLÓGICAS**

NIRADIZ REYES RAMOS

Expresión de proteoglicanos en la próstata: Biomarcadores potenciales con implicaciones patológicas

Autores: Niradiz Reyes Ramos

Primera Edición

ISBN: 978 958 8736 92 1

Rector:

Édgar Parra Chacón

Vicerrector de Docencia:

Federico Gallego Vásquez

Vicerrector de Investigación:

Jesús Olivero Verbel

Vicerrector Administrativo:

Orlando Alvear Tristancho

Secretaria General:

Marly Mardini Llamas

616.99468 / R33

Reyes Ramos, Niradiz

Expresión de proteoglicanos en la próstata: Biomarcadores potenciales con implicaciones patológicas / Niradiz Reyes Ramos; Fredy Badrán Padauí, editor -- Cartagena de Indias: Editorial Universitaria, c2016

189 páginas.

Incluye referencias (p. 188 – 189)

ISBN 978 958 8736 92 1

1. Biología de los proteoglicanos 2. Células de neoplasias de la próstata – Investigadores 3. Glicoproteína – Investigaciones 4. Proteoglicanos – Investigaciones 5. Genes de la neoplasias de la próstata – Patología I. Badrán Padauí, Fredy, editor.

CEP: Universidad de Cartagena. Centro de Información y Documentación José Fernández de Madrid.

Editor: Freddy Badrán Padauí, Jefe de Sección de Publicaciones

Universidad de Cartagena

Diseño de Portada: Jorge Barrios Alcalá

Diseño de figuras y tablas: Edison Reyes De Ávila

Diagramación: Alpha Editores

Derechos

©

Editorial Universitaria, Centro, Calle de la Universidad, Cra. 6, N° 36-100,
Claustro de San Agustín, primer piso
Cartagena de Indias, 2016

DEDICATORIA

A:

*Jonathan, Stephanie, y Christian, mis más valiosos tesoros, y
motores de mi vida*

Ciro, por su apoyo incondicional en todos estos años

Diógenes, por ser el mejor padre que pude tener

Vilma, por todos sus desvelos y todo su amor

Jesús, por colocarme en el camino que siempre quise explorar

Luis, por creer en mí

Jan, por su apoyo incondicional desde que lo conocí

DIOS, por estar siempre conmigo

LISTA DE CAPÍTULOS

Capítulos de revisión

Capítulo 1:

Proteoglicanos.

Autor: Niradiz Reyes

Capítulo 2:

Proteoglicanos pequeños ricos en leucina. Small leucine-rich proteoglycans/SLRPs.

Autores: Niradiz Reyes y Juan Rebollo

Capítulo 3:

La glándula prostática: enfermedades más comunes de la próstata.

Autores: Niradiz Reyes y Marlon Charris

Capítulo 4:

Atrofia inflamatoria proliferativa.

Autores: Inés Benedetti y Niradiz Reyes

Capítulos de Investigación

Capítulo 5:

Análisis transcriptómico global de líneas celulares de cáncer de próstata de rata: identificación de proteoglicanos diferencialmente expresados.

Autor: Niradiz Reyes

Capítulo 6:

Análisis transcripcional de un panel de biomarcadores. Fibromodulina y endocan: biomarcadores potenciales en cáncer de próstata.

Autores: Niradiz Reyes y Alfonso Bettín

Capítulo 7:

Expresión de fibromodulina en cáncer de próstata. Niveles transcripcionales y proteicos de fibromodulina en líneas celulares y tejido prostático humano.

Autores: Niradiz Reyes, Inés Benedetti, Alfonso Bettín, y Juan Rebollo.

CONTENIDO

SECCIÓN I	23
Capítulo 1.	
PROTEOGLICANOS	25
Proteoglicanos intracelulares	27
Presencia de proteoglicanos en el núcleo celular	29
Proteoglicanos de la superficie celular	30
Proteoglicanos pericelulares y de la membrana basal	32
Proteoglicanos extracelulares	33
Otros proteoglicanos	34
Comentarios finales	37
Referencias	37
Capítulo 2	
PROTEOGLICANOS PEQUEÑOS RICOS EN LEUCINA	44
Estructura y función de los SLRPs	47
SLRPs, inflamación, y cáncer	52
Fibromodulina: un pequeño proteoglicano rico en leucina	54
Decorina: un supresor de tumores	57
Biglicano: implicación en cáncer	60
Lumicano : inhibidor de la migración celular	61
Comentarios finales	64
Referencias	65
Capítulo 3.	
LA GLÁNDULA PROSTÁTICA	73
Hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata	76
El cáncer de próstata	80
Metástasis del cáncer de próstata	82
Expresión de proteoglicanos en tejido prostático normal y cáncer de próstata	83
Comentarios finales	84
Referencias	85

Capítulo 4.	
ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA :	94
Histopatología del adenocarcinoma prostático	97
Lesiones precursoras del adenocarcinoma prostático	100
Atrofia inflamatoria prostática	101
Caracterización morfológica de PIA	102
Alteraciones cromosómicas y moleculares en PIA	107
PIA: Lesión precursora de PIN y/o cáncer de próstata?	
<i>La evidencia en contra</i>	115
Comentarios finales	117
Referencias	119
SECCIÓN II	127
Capítulo 5.	
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO GLOBAL DE LINEAS CELULARES CANCEROSAS	129
Metodología	130
Resultados	131
Discusión	133
Conclusiones	135
Referencias	136
Capítulo 6.	
ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE UN PANEL DE MARCADORES	139
DESARROLLO DE UN PANEL DE BIOMARCADORES	140
Metodología	142
Resultados	146
Discusión	155
Conclusiones	157
Referencias	158
Capítulo 7.	
EXPRESIÓN DE FIBROMODULINA EN CÁNCER DE PRÓSTATA	162
Metodología	164
Resultados	170
Discusión	178
Conclusiones	181
Referencias	182

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación, características estructurales, y localización cromosómica de los miembros de la familia de SLRPs.	46
Tabla 2	Secuencias de los cebadores para ensayos de PCR.	147
Tabla 3	Datos de expresión para los genes analizados por PCR cuantitativa.	148
Tabla 4	Expresión transcripcional de FMOD y PSA en líneas celulares en cultivo.	149
Tabla 5	Secuencias de los cebadores para la amplificación por PCR de FMOD.	166
Tabla 6	Perfil de expresión transcripcional de fibromodulina in líneas celulares en cultivo.	171
Tabla 7	Perfil de expresión transcripcional de fibromodulina en biopsias de tejido prostático.	174

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de los proteoglicanos.	26
Figura 2	Organización molecular de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina.	48
Figura 3	Árbol filogenético de la familia de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina.	49
Figura 4	Organización cromosómica de varias clases de la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) en el humano.	50
Figura 5	Organización estructural de fibromodulina	55
Figura 6	Organización estructural de decorina.	57
Figura 7	Organización estructural de biglicano.	61
Figura 8	Organización estructural de lumicano.	63
Figura 9	PIA como precursor de PIN y CaP.	102
Figura 10	Morfología de la PIA.	103
Figura 11	PIA en transición con PIN y adenocarcinoma.	104
Figura 12	Agrupación jerárquica de genes sobreexpresados	105
Figura 13	Genes diferencialmente expresados en líneas celulares de cáncer de próstata.	150
Figura 14	Niveles transcripcionales en células LNCaP relativo a las células no-tumorigénicas PWR-1E.	151

Figura 15	Niveles transcripcionales en células PC-3 relativo a las células no-tumorigénicas PWR-1E.	152
Figura 16	Expresión relativa de transcritos para Fmod y PSA en un panel comercial de cDNA derivado de 39 pacientes.	153
Figura 17	Niveles de expresión transcripcional de fibromodulina en líneas celulares en cultivo.	171
Figura 18	Expresión del núcleo proteico central de Fibromodulina en líneas celulares prostáticas y fibroblastos.	173
Figura 19	Perfil de expresión transcripcional de fibromodulina en biopsias de tejido prostático.	175
Figura 20	Expresión de proteína fibromodulina en biopsias de tejido prostático.	176
Figura 21	Fibromodulina H-scoring en tejidos prostáticos cancerosos y benignos.	178

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado (Inglés/Español)
SLRP	Small leucine rich proteoglycans/ Proteoglicanos pequeños ricos en leucina
CS	Chondroitin sulfato
DS	Dermatan sulfato
KS	Keratan sulfate/Queratan sulfato
TGF-β	Tumor Growth Factor β /Factor de crecimiento transformante β
PG	Proteoglicano
GAG	Glicosaminoglicano
KDa	Kilodalton
NK	Natural killer/ Asesinas naturales
PMNC	Polymorpho nuclear cells / Células polimorfo nucleares
FGF	Fibroblast growth factor /Factor de crecimiento de fibroblastos
GPI	Glycosil-phosphatidil-inositol/Glicosil-fosfatidil-inositol
CSPG4/NG2	Chondroitin sulfate proteoglycan 4/ Neuron-glia antigen 2

HSPG	Heparan sulfate proteoglycans/Proteoglicanos de heparan sulfato
CD	Cluster of differentiation
LRR	Leucine rich repeats / Repeticiones ricas en leucina
BMP	Bone morphogenic protein/ Proteína morfogenética del hueso
VWF	Factor de von Willebrand
PDGF	Platelet derived growth factor/Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TNF α	Tumor necrosis factor α /Factor de necrosis tumoral α
PAMP	Pathogen associated molecular patterns/Patrones moleculares asociados a patógenos
RTK	Receptor tyrosine kinase/ Receptor tirosina quinasa
DAMP	Damage associated molecular patterns/ Patrones moleculares asociados a daños
NLR	Nod like receptores
CaP	Cáncer de próstata
HPB	Hiperplasia prostática benigna
DHT	Dihidrotestosterona
PIN	Prostatic intraepithelial neoplasia /Neoplasia intraepitelial prostática
PIA	Proliferative inflammatory atrophy/ Atrofia inflamatoria proliferativa
H&E	Hematoxilina y eosina
RRL/LRR	Repeticiones ricas en leucina/Leucine rich repeats

ACERCA DE ESTE LIBRO

Este libro está dirigido a estudiantes de posgrado e investigadores en el campo de las ciencias básicas biomédicas, con un interés en las áreas del desarrollo de biomarcadores, biología de los proteoglicanos, y patologías comunes de la próstata. Para una mejor comprensión de los temas desarrollados, el libro se ha dividido en dos grandes secciones. La primera sección brinda información detallada y profunda del estado actual del conocimiento de los proteoglicanos y su expresión en la próstata, revisa la implicación de estos componentes de la matriz extracelular en el cáncer de próstata, a la vez que revisa la fisiología de la glándula prostática y las características de las principales lesiones patológicas asociadas al cáncer de próstata.

En la segunda sección del libro se describen resultados originales de investigación obtenidos dentro de las líneas de investigación *Factores genéticos y ambientales de riesgo en cáncer y biomarcadores*, desarrolladas por el grupo de investigación Genética y Biología Molecular, dirigido por Niradiz Reyes, PhD, que se relacionan estrechamente con las temáticas descritas en la primera sección. Los resultados de investigación descritos en el libro han sido obtenidos durante la ejecución de proyectos de investigación financiados por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación / Colciencias y la Universidad de Cartagena. A través de su publicación con este libro, se está dando cumplimiento al requerimiento de publicación de libro de investigación.

PREFACIO

La investigación en el campo de los proteoglicanos está expandiéndose continuamente a medida que se descubren nuevas funciones para los diferentes miembros de este grupo de moléculas bioactivas. De gran interés es el descubrimiento de la ubicación intracelular de algunos proteoglicanos, lo cual ha sido objeto de investigación reciente. Es así que nuestro grupo de investigación ha dedicado parte de su quehacer científico al estudio de las implicaciones de estos compuestos en el desarrollo de patologías prostáticas comunes, como el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna. En el presente libro se describen los experimentos y resultados desarrollados por el grupo de investigación, los cuales lo han conducido a identificar la implicación en cáncer de próstata de miembros de este grupo biológico de componentes de la matriz extracelular conocidos como Proteoglicanos, especialmente los de la familia de Pequeños Proteoglicanos Ricos en Leucina. A su vez, tomamos ventaja de esta oportunidad para revisar la literatura científica alrededor del cáncer de próstata, la próstata misma, los proteoglicanos y su implicación en el desarrollo y progresión del cáncer, con especial énfasis en el cáncer de próstata. Algunos de estos resultados aún no han sido publicados en revistas científicas, por lo tanto son resultados inéditos de investigación.

La primera sección del libro está dividida en cuatro capítulos. En el primer capítulo del libro se describen los aspectos generales de los proteoglicanos en cada clase; en el segundo capítulo se revisan los Proteoglicanos Pequeños Ricos en Leucina (SLRP), y se hace énfasis en fibromodulina, un pequeño proteoglicano rico en leucina, y que en nuestros estudios hemos identificado su asociación al cáncer de próstata. En el tercer capítulo revisamos la literatura científica

relacionada con la glándula prostática y las enfermedades más comunes de la misma. El capítulo 4 está dedicado a las lesiones precursoras del cáncer de próstata.

Los capítulos de la segunda sección se dedican a presentar resultados originales que han sido obtenidos durante la realización de proyectos de investigación financiados al Grupo de Investigación Genética y Biología Molecular, adscrito a la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena. De esta manera, el capítulo cinco describe la sobre-expresión de los proteoglicanos fibromodulina y endocan en líneas celulares de cáncer de próstata de origen animal (rata), las cuales poseen diferentes fenotipos metastásicos (*Reyes, Tiwari et al. 2007*).

En el capítulo seis se describen los resultados de estudios subsecuentes que nos han permitido detectar la expresión transcripcional del proteoglicano endocan en líneas celulares humanas de cáncer de próstata. El silenciamiento de su expresión causa una disminución marcada en las propiedades de migración de una línea altamente metastásica de cáncer de próstata, mientras que ensayos ELISA nos han llevado a identificar la presencia de este proteoglicano circulando a niveles elevados en la sangre de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata (*N.Reyes et al. 2015. Manuscrito en preparación*).

El séptimo capítulo del libro describe los experimentos con los que demostramos la expresión a nivel de transcrito y de proteína del proteoglicano fibromodulina en líneas celulares y tejido prostático humano. Lo que se conoce sobre su expresión en la próstata, en estos momentos, es muy limitado. Por lo tanto, a través de nuestros estudios pretendemos aumentar el conocimiento sobre la expresión de este pequeño proteoglicano en la próstata y sus implicaciones en las enfermedades de la misma, principalmente la hiperplasia prostática benigna y el adenocarcinoma prostático. Estas son las dos enfermedades más comunes de la glándula prostática, las cuales representan una carga significativa para el paciente y para los sistemas de cuidado en salud de muchos países del mundo. Se caracterizan por ser enfermedades crónicas con una larga evolución, caracterizadas por lesiones precursoras y de lenta progresión.

Aún hay mucho por aprender acerca de la patogénesis de estas dos enfermedades responsables de una fracción importante de morbilidad y mortalidad en la población masculina, así como de la biología de los proteoglicanos y su participación en procesos patológicos complejos, tales como fibrosis, inflamación, y cáncer. Los retos futuros incluyen la elucidación de los eventos de señalización y vías particulares a través de las cuáles algunos proteoglicanos ejercen acciones biológicas específicas.

SECCIÓN I

REVISIÓN DE LA LITERATURA CIENTÍFICA

Capítulo 1

PROTEOGLICANOS

Niradiz Reyes, PhD

Resumen

Una gran variedad de proteoglicanos se encuentran haciendo parte de la matriz extracelular y su distribución depende de la naturaleza de esta matriz. Este grupo de compuestos representan una clase muy diversa de moléculas, las cuales se diferencian por su tamaño y composición de sus cadenas laterales de glicosaminoglicanos. Los proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRPs) contienen en su dominio central una serie de repeticiones ricas en leucina flanqueadas por cisteínas. Los diferentes proteoglicanos pueden portar cadenas laterales de condroitin-sulfato (CS), dermatan-sulfato (DS), o queratan-sulfato (KS). La función general de los proteoglicanos es ayudar a estabilizar y organizar las fibras de colágeno en tejidos conectivos, por ejemplo en tendones. En la córnea, los proteoglicanos de KS son importantes para el mantenimiento de la transparencia. Otros como la decorina, son capaces de secuestrar factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), sirviendo como depósitos que mantienen al factor de crecimiento secuestrado en la matriz que circunda a la mayoría de las células.

Aspectos generales

Los proteoglicanos (PG) son macromoléculas que consisten de un núcleo proteico unido covalentemente a una o más cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG) (Kjellen and Lindahl 1991) (Figura 1). En el genoma de los mamíferos se han identificado cuatro clases

principales de proteoglicanos, los cuales se encuentran codificados por cuarenta y tres genes diferentes, los que dan origen a un número mayor de proteoglicanos gracias a los procesos de corte y empalme alternativo, haciendo de los proteoglicanos un grupo de moléculas muy rico y biológicamente activo. Se ha propuesto clasificar los proteoglicanos de los mamíferos en cuatro clases principales tomando como base su localización celular y sub-celular, su homología a nivel genómico y proteico, y la presencia de módulos proteicos particulares, los cuales son compartidos con frecuencia por una clase determinada (Iozzo and Schaefer 2015).

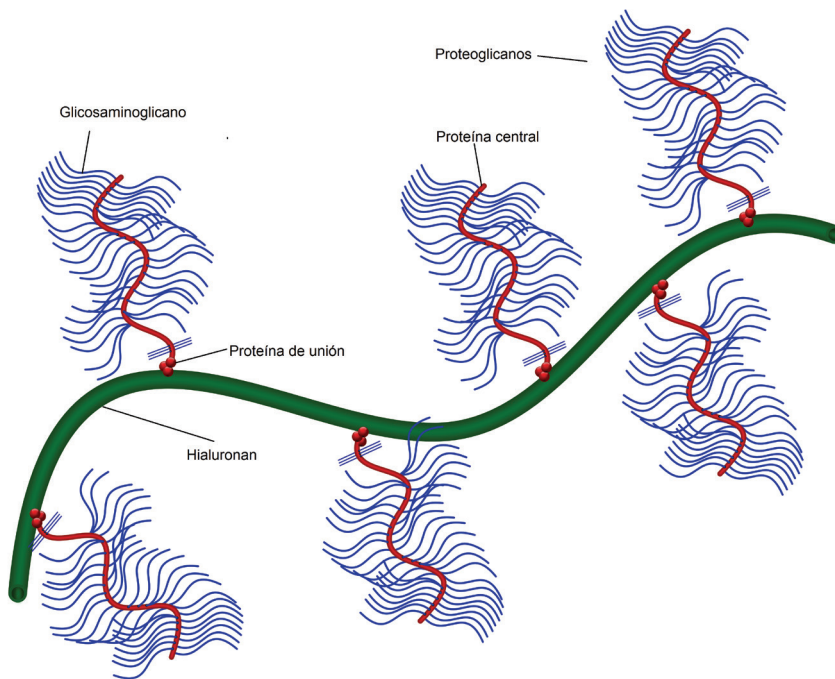


Figura 1. Estructura de los proteoglicanos

Los proteoglicanos son macromoléculas que consisten de una proteína central (núcleo proteico) unido covalentemente a una o más cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAG). Los GAG se unen a la proteína central en forma perpendicular formando una estructura en forma de cepillo. Los proteoglicanos forman grandes complejos

con otros proteoglicanos, proteínas fibrosas como el colágeno, y otros componentes de la matriz extracelular como el hialuronan.

De acuerdo a esto, las cuatro clases de proteoglicanos son:

- *Proteoglicanos intracelulares*
- *Proteoglicanos de la superficie celular*
- *Proteoglicanos pericelulares, y*
- *Proteoglicanos extracelulares.*

En las siguientes secciones se revisarán los aspectos más relevantes de cada clase de proteoglicanos y de sus miembros respectivos.

Proteoglicanos intracelulares

En esta clase encontramos un único proteoglicano intracelular conocido, la *serglicina*, la cual se encuentra dentro de los gránulos secretorios de las células hematopoyéticas, incluidas células mastoideas, leucocitos y eosinófilos. Este proteoglicano es el único conocido que porta cadenas laterales de heparina (Iozzo and Schaefer 2015), lo cual se ha descrito para las células mastoideas del tejido conectivo. Además de la heparina, también se ha encontrado que la serglicina puede estar unida covalentemente al glicosaminoglicano condroitin sulfato en su forma hipersulfatada, conocida como tipo E, lo cual se ha reportado en las células mastoideas de las mucosas y en macrófagos activados (Kolset and Tveit 2008). Más recientemente, la serglicina ha sido encontrada en una amplia variedad de células no inmunes, tales como células endoteliales, condrocitos, y células musculares lisas (Kolset and Pejler 2011). El núcleo peptídico de la serglicina está compuesto por repeticiones en tándem *glicina-serina* y tiene una masa estimada de 16 a 18 kd antes del agregado de glicosaminoglicano (GAG) y de 60 a 750 kDa después de la adición de múltiples cadenas heterogéneas de GAG. Por lo tanto, es un proteoglicano único por la secuencia distintiva de su proteína núcleo y su localización intracelular.

La serglycina es importante para la retención de importantes mediadores inflamatorios dentro de los gránulos de almacenamiento y vesículas secretorias. Este proteoglicano puede además modular la actividad de moléculas acompañantes en formas diferentes después de su secreción por células inmunes activadas, a través de la protección, transporte, activación, e interacciones con sustratos o células blancas. Por lo tanto, la serglycina es un proteoglicano con importantes funciones en reacciones inflamatorias (Kolset and Tveit 2008; Kolset and Pejler 2011), el cual además ha sido implicado en cáncer, ya que se ha encontrado que su expresión correlaciona con un fenotipo maligno más agresivo, y se ha sugerido que protege las células cancerosas de mama del ataque del complemento lo que conlleva a la supervivencia celular y la progresión (Korpetinou, Skandalis et al. 2013).

Diversos tipos celulares expresan serglycina en sus gránulos de almacenamiento, como plaquetas, células asesinas naturales (NK-cells), células T citolíticas, leucocitos polimorfonucleares (PMNC), células mastoideas de tejido conectivo, células mastoideas de las mucosas, células endoteliales y células acinares pancreáticas (Kolset, Prydz et al. 2004).

En el caso de las células acinares pancreáticas, se reportó que la distribución de serglycina a las vesículas secretorias de estas células fue dependiente de las cadenas de GAG, ya que la proteína central sin las cadenas unidas de GAG no llegaba a estas vesículas y cuando las células expresaban serglycina sin cadenas de GAG contenían pocos gránulos secretorios (Biederbick, Licht et al. 2003). La presencia de serglycina en los gránulos de estas células pudiera ser una indicación que este PG cumple una función en el almacenamiento de enzimas pancreáticas digestivas.

No obstante que la gran mayoría de los proteoglicanos están destinados al espacio extracelular, algunos de ellos también han sido encontrados en sitios intracelulares como el núcleo y los gránulos secretorios (Bhavanandan and Davidson 1975; Ishihara, Fedarko et al. 1986). Estos proteoglicanos encontrados en sitios intracelulares, son expresados por células que por lo general no están involucradas en interacciones extensas con la matriz extracelular o en la construcción

de tejidos, sino que por el contrario son móviles por naturaleza, como las del sistema inmune y las células tumorales metastásicas. Se cree que estos proteoglicanos intracelulares cumplen funciones semejantes a las de sus contrapartes que residen en las matrices y superficies celulares, pero también es posible que pudieran estar cumpliendo otras funciones en estas ubicaciones intracelulares (Kolset, Prydz et al. 2004).

Presencia de proteoglicanos en el núcleo celular

La presencia de GAGs o PGs en el núcleo fue sugerida décadas atrás (Bhavanandan and Davidson 1975; Ishihara, Fedarko et al. 1986), pero solo recientemente su presencia ha sido confirmada a través de técnicas de microscopía láser confocal, encontrándose además señales de localización nuclear funcionales en las proteínas centrales de proteoglicanos como glipican-1 y biglicano, un proteoglicano pequeño rico en leucina (*small leucine-rich proteoglycan*, SLRP) (Liang, Haring et al. 1997; Brockstedt, Dobra et al. 2002). Se desconoce como los PGs o GAGs se translocan al núcleo y cuáles son las moléculas que los acompañan en esa translocación.

La localización nuclear también ha sido observada para otros SLRPs, incluyendo PRELP, decorina y opticina, lo que ha llevado a proponer que estos compuestos participan en diferentes procesos nucleares (Liang, Haring et al. 1997; Banerjee, Bhattacharyya et al. 2003; Rucci, Rufo et al. 2009; Mikaelsson, Osterborg et al. 2013). Por ejemplo, se han encontrado diversas variantes de decorina en el citoplasma y en el núcleo de células epiteliales de cáncer oral humano proveniente de biopsias de pacientes, así como de líneas celulares (Banerjee, Bhattacharyya et al. 2003), determinándose que una de las variantes correspondió al núcleo proteico de decorina sin modificaciones postraduccionales, lo que llevó a sugerir que la decorina intranuclear pudiera estar participando en la migración e invasión de las células malignas (Dil and Banerjee 2011).

La localización nuclear de proteoglicanos puede resultar en nuevas interacciones proteína-proteína que pueden conducir a funciones nuevas o alteradas. Por lo tanto, es posible que los PGs o GAGs en

el núcleo cumplan funciones diferentes a las que cumplen cuando se encuentran asociados a la matriz o a la superficie celular. Además de servir de transporte desde la superficie celular a factores de crecimiento como el FGF-2 (factor de crecimiento de los fibroblastos-2) (Reiland and Rapraeger 1993), los PG localizados intracelularmente pueden tener nuevas funciones. Por ejemplo, algunos reportes indican que los GAGs pueden afectar la expresión génica (Busch, Martin et al. 1992). Además, el heparano sulfato de la superficie celular puede portar sitios de unión para virus y bacterias, por lo cual si estos componentes son direccionados al núcleo, se posibilita el ingreso de microorganismos infecciosos (Kolset, Prydz et al. 2004). Este direccionamiento nuclear de moléculas, dependiente de GAG, tiene relevancia médica, así como también en investigación farmacéutica, ya que puede ser aprovechada como mecanismo de entrega de genes o medicamentos (Sandgren, Cheng et al. 2002).

La investigación en el campo de los proteoglicanos está expandiéndose continuamente a medida que se descubren nuevas funciones para este grupo de moléculas bioactivas, incluyendo su ubicación intracelular, la cual ha comenzado a ser investigado solo recientemente. Resulta interesante pensar que los proteoglicanos localizados intracelularmente pueden estar destinados a funciones tan complejas y fascinantes como las desplegadas por sus contrapartes secretadas que viajan a destinos más lejanos (Kolset, Prydz et al. 2004).

Proteoglicanos de la superficie celular

Los proteoglicanos de la superficie celular son glicoproteínas ancladas a la membrana que contienen cadenas laterales de glicosaminoglicanos. Los proteoglicanos en esta clase, se encuentran codificados por trece genes, de los cuales siete codifican proteoglicanos de transmembrana tipo I (el extremo N-terminal se encuentra al exterior de la membrana plasmática) y seis codifican proteoglicanos anclados por glicosilfosfatidil-inositol (GPI). Los proteoglicanos transmembrana tipo I incluyen cuatro sindecanos (sindecanos 1-4), CSPG4/NG2, betaglicano y fosfacan, mientras que los anclados por GPI incluyen seis glipicanos (glipicanos 1-6) (Iozzo and Schaefer 2015).

Los sindecanos 1, 2, 3, y 4 son proteoglicanos de heparán sulfato, los cuales se expresan en diferentes tipos celulares, y su expresión se ve afectada por ciertas condiciones patológicas como la progresión tumoral, invasión y metastásis (Beauvais and Rapraeger 2004). La expresión del sindecano-1 se encuentra principalmente en células epiteliales (Rapraeger, Jalkanen et al. 1986), mientras que las células neuronales expresan el sindecano-3 (Chernousov and Carey 1993), las mesenquimales expresan el sindecano-2 (Couchman, Klass et al. 1999), y el sindecano-4 es de expresión ubicua (Couchman, Chen et al. 2001). Los sindecanos se localizan en la membrana plasmática donde funcionan como coreceptores en una variedad de procesos fisiológicos tales como adhesión celular, migración, respuesta a factores de crecimiento, y el desarrollo (Couchman, Chen et al. 2001).

Los sindecanos también se han visto implicados en procesos patológicos como la tumorigénesis, y su relevancia en cáncer ha sido estudiada principalmente respecto al sindecano-1, señalándolo como un posible supresor de tumores en carcinoma de células basales, mieloma múltiple y hepatocarcinoma (Bayer-Garner, Dilday et al. 2000; Aref, Goda et al. 2003; Li, Xie et al. 2005). Sin embargo, otros estudios han encontrado una expresión elevada de este proteoglicano en tumores de mama (Tsanou, Ioachim et al. 2004), páncreas (Conejo, Kleeff et al. 2000) y metástasis óseas de tumores hematológicos y de mama (Sanderson, Yang et al. 2004). En cuanto al cáncer de próstata, los resultados reportados son contradictorios, ya que algunos muestran que la sobreexpresión de sindecano-1 fue un predictor de la recurrencia temprana de este cáncer y estuvo además asociada significativamente con la sobrevida específica del tumor Gleason de alto grado, y sobreexpresión de Ki67 y Bcl-2 (Zellweger, Ninck et al. 2003); mientras que otros reportes muestran que la expresión de sindecano-1 en cáncer de próstata se encuentra alterada existiendo una relación inversa entre sus niveles de expresión y el grado Gleason del tumor (Kiviniemi, Kallajoki et al. 2004).

El otro grupo importante de proteoglicanos en esta clase es el de los glipicanos, los cuales constituyen una familia de proteoglicanos de heparán sulfato (heparan sulfate proteoglycans, HSPGs) que se

encuentran unidos a la superficie celular por un anclaje de glicosil-fosfatil-inositol (GPI). La proteína central de los glipicanos tiene un tamaño de entre 60 a 70 kDa, la cual despliega un péptido señal secretorio en su extremo N-terminal y un dominio hidrofóbico al extremo C-terminal el cual es necesario para la adición del anclaje de GPI. La expresión de los glipicanos ocurre predominantemente durante el desarrollo y sus niveles fluctúan de una manera dependiente de la etapa del desarrollo y del tejido específico, lo cual indica que cumplen una función en la regulación de la morfogénesis (Filmus and Selleck 2001). Los glipicanos además han sido implicados en cáncer de diferentes órganos, como páncreas, hígado, y ovario (Hsu, Cheng et al. 1997; Kleeff, Ishiwata et al. 1998; Lin, Huber et al. 1999).

En general, los proteoglicanos de la superficie celular (sindecanos y glipicanos) interactúan a través de sus dominios extracelulares con varias moléculas efectoras tales como factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, otras moléculas de la superficie celular y proteínas de la coagulación. Estos proteoglicanos muchas veces median la internalización de ligandos a través de su unión vía interacciones electrostáticas, seguida por endocitosis de los complejos resultantes (Poon and Garipey 2007).

Además, en diversas circunstancias los ectodominios de estos proteoglicanos superficiales pueden ser liberados al espacio extracelular como parte de una respuesta celular altamente regulada en respuesta a eventos biológicos; estos ectodominios luego actúan como reguladores de encuentros moleculares (Park, Reizes et al. 2000). Los ectodominios de estos proteoglicanos de la superficie celular son liberados prácticamente intactos y el proceso es catalizado por enzimas conocidas como “sheddasas” o secretasas.

Proteoglicanos pericelulares y de la membrana basal

Esta clase comprende cuatro proteoglicanos que se asocian estrechamente con la superficie de muchos tipos celulares a través de interacciones con integrinas u otros receptores, y también se les encuentra haciendo parte de la mayoría de membranas basales. Los cuatro proteoglicanos pericelulares son principalmente HSPGs e

incluyen perlecan, agrin, y colágenos XVIII and XV (Iozzo and Schaefer 2015).

Perlecan, también conocido como Heparán Sulfato Proteoglicano-2 (HSPG2) es un proteoglicano de alto peso molecular con una estructura modular que le sirve para cumplir sus muchas funciones en tejidos complejos (Farach-Carson, Warren et al. 2014). Perlecan está codificado por un gen de respuesta temprana inducido por TGF β y reprimido por Interferón- γ . La unión de perlecan a varios factores de crecimiento y morfógenos modula sus actividades y se ha encontrado que en varios tipos de cáncer, incluyendo el de próstata, la expresión de perlecan se encuentra desregulada (Iozzo and Cohen 1993; Cohen, Murdoch et al. 1994; Datta, Pierce et al. 2006). Su procesamiento por heparanasa y varias proteasas conlleva a la liberación de fragmentos que funcionan como factores pro-angiogénicos o anti-angiogénicos (Mongiat, Sweeney et al. 2003; Iozzo and Schaefer 2015). Uno de estos fragmentos funcionales, el dominio V C-terminal de perlecan ha sido denominado *Repellin*, el cual posee potente actividad anti-angiogénica y ha sido identificado como una proteína principal circulante con potencial utilidad como biomarcador sérico en cáncer (Adkins, Varnum et al. 2002; Chang, Kang et al. 2008).

El segundo miembro de esta clase de proteoglicanos es *agrin*, el cual posee una organización estructural de tipo multimodular homólogo al del perlecan, y se expresa como diferentes isoformas en diferentes tipos celulares (Bezakova and Ruegg 2003). Este proteoglicano cumple importantes funciones en el sistema nervioso central (Daniels 2012).

Proteoglicanos extracelulares

Los proteoglicanos extracelulares constituyen la clase más grande de estos compuestos, la cual abarca 25 genes diferentes. En esta clase se distinguen tres grupos: los hialectanos codificados por cuatro genes, los proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRPs) codificados por 18 genes, y la familia SPOCK que comprende tres proteoglicanos de heparán sulfato de unión al calcio, conocidos como testicanos (Iozzo and Schaefer 2015).

Los hialectanos *aggrecan*, *versican*, *neurocan*, y *brevican*, son componentes estructurales principales del cartílago, vasos sanguíneos, y sistema nervioso central, y se unen al hialurano formando complejos supramoleculares de alta viscosidad. Por su parte, los SLRPs tienen múltiples funciones, entre las que se cuenta su capacidad para participar en señalización a través de varios receptores, y muchos de estos proteoglicanos se han encontrado en la circulación y varios fluidos corporales.

Los hialectanos tienen una estructura con tres dominios: el dominio N-terminal que se une al hialurano, un dominio central que porta las cadenas laterales de GAG, y una región C-terminal que se une a lectinas (Iozzo 1998). Con frecuencia estos proteoglicanos actúan como puentes moleculares entre la superficie celular y la matriz extracelular (Iozzo and Schaefer 2015).

Los SLRP constituyen la familia más grande de proteoglicanos, en la que se cuentan 18 diferentes productos génicos y numerosas variantes alternativas y formas procesadas. Estos proteoglicanos cumplen funciones tanto estructurales como de señalización, especialmente en condiciones de remodelación tisular como las que ocurren durante el cáncer, diabetes, inflamación y aterosclerosis. Los proteoglicanos de este grupo interactúan con varios receptores tirosina quinasa (RTKs) y receptores tipo Toll, regulando procesos fundamentales como la migración y proliferación celular, inmunidad innata, apoptosis, autofagia y angiogénesis (Iozzo and Schaefer 2015).

El tercer grupo de proteoglicanos extracelulares está integrado por la familia SPOCK, cuyos miembros son primariamente HSPG, que tienen una estructura modular similar a la de perlecan y agrin, con cinco dominios. Aunque inicialmente se aislaron de testículo, se ha establecido que la expresión de estos proteoglicanos está restringida al sistema nervioso central (Iozzo and Schaefer 2015).

Otros proteoglicanos

Se conocen otros proteoglicanos que no se clasifican dentro de las cuatro clases descritas. Ellos incluyen Prg4/lubricin, endocan,

leprecan, collagenos IX y XII, bikunina y CD44. Estas moléculas han sido poco estudiadas y los reportes sobre sus funciones biológicas como proteoglicanos son escasos.

Lubricin es un proteoglicano secretado en las articulaciones sinoviales, el cual es de importancia para la integridad del cartílago, a los cuales les otorga lubricación previniendo daños a la superficie y preservando los condrocitos. El lubricin recombinante es un terapéutico potencial para pacientes con deficiencias en este proteoglicano en el contexto de trauma o artritis autoinmune (Jay and Waller 2014).

Endocan es un proteoglicano circulante descubierto recientemente (Lassalle, Molet et al. 1996), el cual tiene la propiedad de unirse a una gran variedad de moléculas bioactivas implicadas en vías de señalización y adhesión celular, lo que le permite participar en procesos de regulación de la proliferación, diferenciación, migración, y adhesión de diferentes tipos celulares en condiciones fisiológicas y patológicas (Kali and Shetty 2014).

Endocan está codificado por el gen ESM, localizado en el brazo largo del cromosoma 5, el cual contiene tres exones y dos intrones. Como otros miembros de la familia de los PGs, endocan tiene una proteína central a la cual se une una única cadena lateral de dermatán sulfato (DS) mediante enlace covalente a serina-137 durante las modificaciones postraduccionales (Sarrazin, Lyon et al. 2010). La proteína central de endocan tiene 165 amino ácidos, distribuidos en dos dominios, el N-terminal de 110 amino ácidos, el cual es rico en cisteína, y el dominio C-terminal de 55 amino ácidos, el cual carece de cisteínas. Endocan es principalmente una molécula secretada, cuya cadena de DS es corta, de solo 32 unidades de disacárido, que contiene alta proporción de unidades disacáridas sulfatadas (Sarrazin, Lyon et al. 2010).

Nuestro grupo de investigación encontró a través de un estudio de análisis transcripcional global con microarreglos de ADN, la sobreexpresión de este proteoglicano en líneas celulares metastásicas de cáncer de próstata derivadas de rata (Reyes, Tiwari et al. 2007). Estudios subsecuentes nos han permitido detectar la expresión transcripcional de endocan en líneas celulares humanas de cáncer de

próstata y el silenciamiento de su expresión causa una disminución marcada en las propiedades de migración de una línea altamente metastásica de cáncer de próstata, mientras que ensayos ELISA nos han llevado a identificar la presencia de este proteoglicano circulando a niveles elevados en la sangre de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata (*N.Reyes et al. 2015. Manuscrito en preparación*).

Por su parte, leprecan es un nuevo proteoglicano de la membrana basal, codificado por un gen ubicado en el cromosoma 1p31 humano, y al que se le ha identificado como un potencial supresor de tumores cuyas alteraciones genéticas pudieran relacionarlo con cánceres humanos ligados al cromosoma 1p31, una región frecuentemente delecionada en muchos cánceres (Wassenhove-McCarthy and McCarthy 1999; Kaul, Sugihara et al. 2000).

Los colágenos IX y XII son dos proteoglicanos homólogos, miembros de una familia única de proteínas colagenosas que despliegan patrones de expresión tisulares específicas (Gordon, Gerecke et al. 1987). Bikunina por otra parte es un pequeño proteoglicano de condroitín sulfato (CS) presente en la sangre, la cual conforma la cadena ligera de los miembros de la familia de inter-alfa-inhibidores, agentes anti-inflamatorios presentes en alta concentración en el plasma (Fries and Kaczmarczyk 2003).

CD44 es una molécula de adhesión de la superficie celular, la cual participa de interacciones célula-célula y célula-matriz. Genómicamente, el gen está conformado por 20 exones, de los cuáles los primeros cinco y los últimos cinco son constantes, mientras que los diez exones internos participan de procesos de corte y empalme alternativo que resulta en la generación de múltiples isoformas, algunas de las cuales son proteoglicanos de heparán sulfato, con el potencial de secuestrar quimiocinas y factores de crecimiento de unión a heparina (Naor, Sionov et al. 1997). CD44 es el principal receptor del ácido hialurónico, aunque también tiene otros ligandos importantes que hacen parte de la matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, laminina, y condroitín sulfato.

Muchos tipos de cáncer y sus metástasis expresan altos niveles de CD44, sugiriendo que este confiere una ventaja de crecimiento a las células neoplásicas, pudiendo representar un blanco terapéutico. La esperanza que se tiene es que la identificación de variantes de CD44 que se expresen en células cancerosas pero no en células normales conducirá al desarrollo de terapéuticos contra CD44 específicos contra el crecimiento neoplásico (Naor, Sionov et al. 1997).

Comentarios finales

En el presente capítulo se han descrito ampliamente los aspectos generales de la biología de los proteoglicanos, teniendo como intención dar una perspectiva general sobre la diversidad de este grupo de compuestos. Los tópicos descritos incluyeron una descripción de las principales familias de proteoglicanos, de cada uno de sus miembros respectivos, las características relativas a su expresión en diferentes tipos celulares y las implicaciones en condiciones patológicas, tales como la inflamación y el cáncer.

En el siguiente capítulo se describirán los aspectos generales y específicos de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP), se revisará la información disponible que soporta la asociación de estos compuestos con la inflamación y el cáncer. Finalmente se revisarán con más detalle las características de fibromodulina, un miembro de esta familia de proteoglicanos, el cual ha generado un particular interés al interior de nuestro grupo de investigación.

Referencias

- Adkins, J. N., S. M. Varnum, et al. (2002). "Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry." *Mol Cell Proteomics* 1(12): 947-955.
- Aref, S., T. Goda, et al. (2003). "Syndecan-1 in multiple myeloma: relationship to conventional prognostic factors." *Hematology* 8(4): 221-228.

- Banerjee, A. G., I. Bhattacharyya, et al. (2003). "Aberrant expression and localization of decorin in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma." *Cancer Res* 63(22): 7769-7776.
- Bayer-Garner, I. B., B. Dilday, et al. (2000). "Syndecan-1 expression is decreased with increasing aggressiveness of basal cell carcinoma." *Am J Dermatopathol* 22(2): 119-122.
- Beauvais, D. M. and A. C. Rapraeger (2004). "Syndecans in tumor cell adhesion and signaling." *Reprod Biol Endocrinol* 2: 3.
- Bezakova, G. and M. A. Ruegg (2003). "New insights into the roles of agrin." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(4): 295-308.
- Bhavanandan, V. P. and E. A. Davidson (1975). "Mucopolysaccharides associated with nuclei of cultured mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(6): 2032-2036.
- Biederbick, A., A. Licht, et al. (2003). "Serglycin proteoglycan is sorted into zymogen granules of rat pancreatic acinar cells." *Eur J Cell Biol* 82(1): 19-29.
- Brockstedt, U., K. Dobra, et al. (2002). "Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements." *Exp Cell Res* 274(2): 235-245.
- Busch, S. J., G. A. Martin, et al. (1992). "Trans-repressor activity of nuclear glycosaminoglycans on Fos and Jun/AP-1 oncoprotein-mediated transcription." *J Cell Biol* 116(1): 31-42.
- Cohen, I. R., A. D. Murdoch, et al. (1994). "Abnormal expression of perlecan proteoglycan in metastatic melanomas." *Cancer Res* 54(22): 5771-5774.
- Conejo, J. R., J. Kleeff, et al. (2000). "Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers." *Int J Cancer* 88(1): 12-20.

- Couchman, J. R., L. Chen, et al. (2001). "Syndecans and cell adhesion." *Int Rev Cytol* 207: 113-150.
- Couchman, J. R., C. M. Klass, et al. (1999). "Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan." *J Histochem Cytochem* 47(12): 1649C-1650.
- Chang, J. W., U. B. Kang, et al. (2008). "Identification of circulating endorepellin LG3 fragment: Potential use as a serological biomarker for breast cancer." *Proteomics Clin Appl* 2(1): 23-32.
- Chernousov, M. A. and D. J. Carey (1993). "N-syndecan (syndecan 3) from neonatal rat brain binds basic fibroblast growth factor." *J Biol Chem* 268(22): 16810-16814.
- Daniels, M. P. (2012). "The role of agrin in synaptic development, plasticity and signaling in the central nervous system." *Neurochem Int* 61(6): 848-853.
- Datta, S., M. Pierce, et al. (2006). "Perlecan signaling: helping hedgehog stimulate prostate cancer growth." *Int J Biochem Cell Biol* 38(11): 1855-1861.
- Dil, N. and A. G. Banerjee (2011). "A role for aberrantly expressed nuclear localized decorina in migration and invasion of dysplastic and malignant oral epithelial cells." *Head Neck Oncol* 3: 44.
- Farach-Carson, M. C., C. R. Warren, et al. (2014). "Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders." *Matrix Biol* 34: 64-79.
- Filmus, J. and S. B. Selleck (2001). "Glypicans: proteoglycans with a surprise." *J Clin Invest* 108(4): 497-501.
- Fries, E. and A. Kaczmarczyk (2003). "Inter-alpha-inhibitor, hyaluronan and inflammation." *Acta Biochim Pol* 50(3): 735-742.

- Gordon, M. K., D. R. Gerecke, et al. (1987). "Type XII collagen: distinct extracellular matrix component discovered by cDNA cloning." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(17): 6040-6044.
- Hsu, H. C., W. Cheng, et al. (1997). "Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution." *Cancer Res* 57(22): 5179-5184.
- lozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." *Annu Rev Biochem* 67: 609-652.
- lozzo, R. V. and I. Cohen (1993). "Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma." *Experientia* 49(5): 447-455.
- lozzo, R. V. and L. Schaefer (2015). "Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans." *Matrix Biol* 42: 11-55.
- Ishihara, M., N. S. Fedarko, et al. (1986). "Transport of heparan sulfate into the nuclei of hepatocytes." *J Biol Chem* 261(29): 13575-13580.
- Jay, G. D. and K. A. Waller (2014). "The biology of lubricin: near frictionless joint motion." *Matrix Biol* 39: 17-24.
- Kali, A. and K. S. Shetty (2014). "Endocan: a novel circulating proteoglycan." *Indian J Pharmacol* 46(6): 579-583.
- Kaul, S. C., T. Sugihara, et al. (2000). "Gros1, a potential growth suppressor on chromosome 1: its identity to basement membrane-associated proteoglycan, leprecan." *Oncogene* 19(32): 3576-3583.
- Kiviniemi, J., M. Kallajoki, et al. (2004). "Altered expression of syndecan-1 in prostate cancer." *APMIS* 112(2): 89-97.
- Kjellen, L. and U. Lindahl (1991). "Proteoglycans: structures and interactions." *Annu Rev Biochem* 60: 443-475.

- Kleeff, J., T. Ishiwata, et al. (1998). "The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer." *J Clin Invest* 102(9): 1662-1673.
- Kolset, S. O. and G. Pejler (2011). "Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells." *J Immunol* 187(10): 4927-4933.
- Kolset, S. O., K. Prydz, et al. (2004). "Intracellular proteoglycans." *Biochem J* 379(Pt 2): 217-227.
- Kolset, S. O. and H. Tveit (2008). "Serglycin--structure and biology." *Cell Mol Life Sci* 65(7-8): 1073-1085.
- Korpetinou, A., S. S. Skandalis, et al. (2013). "Serglycin is implicated in the promotion of aggressive phenotype of breast cancer cells." *PLoS One* 8(10): e78157.
- Lassalle, P., S. Molet, et al. (1996). "ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines." *J Biol Chem* 271(34): 20458-20464.
- Li, H. G., D. R. Xie, et al. (2005). "Clinicopathological significance of expression of paxillin, syndecan-1 and EMMPRIN in hepatocellular carcinoma." *World J Gastroenterol* 11(10): 1445-1451.
- Liang, Y., M. Haring, et al. (1997). "Glypican and biglycan in the nuclei of neurons and glioma cells: presence of functional nuclear localization signals and dynamic changes in glypican during the cell cycle." *J Cell Biol* 139(4): 851-864.
- Lin, H., R. Huber, et al. (1999). "Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines." *Cancer Res* 59(4): 807-810.
- Mikaelsson, E., A. Osterborg, et al. (2013). "Opticin, a small leucine-rich proteoglycan, is uniquely expressed and translocated to the nucleus of chronic lymphocytic leukemia cells." *Exp Hematol Oncol* 2(1): 23.

- Mongiati, M., S. M. Sweeney, et al. (2003). "Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan." *J Biol Chem* 278(6): 4238-4249.
- Naor, D., R. V. Sionov, et al. (1997). "CD44: structure, function, and association with the malignant process." *Adv Cancer Res* 71: 241-319.
- Park, P. W., O. Reizes, et al. (2000). "Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters." *J Biol Chem* 275(39): 29923-29926.
- Poon, G. M. and J. Garipey (2007). "Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells." *Biochem Soc Trans* 35(Pt 4): 788-793.
- Rapraeger, A., M. Jalkanen, et al. (1986). "Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells." *J Cell Biol* 103(6 Pt 2): 2683-2696.
- Reiland, J. and A. C. Rapraeger (1993). "Heparan sulfate proteoglycan and FGF receptor target basic FGF to different intracellular destinations." *J Cell Sci* 105 (Pt 4): 1085-1093.
- Reyes, I., R. Tiwari, et al. (2007). "DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines." *Biomedica* 27(2): 190-203.
- Rucci, N., A. Rufo, et al. (2009). "The glycosaminoglycan-binding domain of PRELP acts as a cell type-specific NF-kappaB inhibitor that impairs osteoclastogenesis." *J Cell Biol* 187(5): 669-683.
- Sanderson, R. D., Y. Yang, et al. (2004). "Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis." *Matrix Biol* 23(6): 341-352.

- Sandgren, S., F. Cheng, et al. (2002). "Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell-surface proteoglycans." *J Biol Chem* 277(41): 38877-38883.
- Sarrazin, S., M. Lyon, et al. (2010). "Characterization and binding activity of the chondroitin/dermatan sulfate chain from endocan, a soluble endothelial proteoglycan." *Glycobiology* 20(11): 1380-1388.
- Tsanou, E., E. Ioachim, et al. (2004). "Clinicopathological study of the expression of syndecan-1 in invasive breast carcinomas. correlation with extracellular matrix components." *J Exp Clin Cancer Res* 23(4): 641-650.
- Wassenhove-McCarthy, D. J. and K. J. McCarthy (1999). "Molecular characterization of a novel basement membrane-associated proteoglycan, leprecan." *J Biol Chem* 274(35): 25004-25017.
- Zellweger, T., C. Ninck, et al. (2003). "Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer." *Prostate* 55(1): 20-29.

Capítulo 2.

PROTEOGLICANOS PEQUEÑOS RICOS EN LEUCINA

Niradiz Reyes, PhD y Juan Rebollo, Biólogo

Resumen

Los proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRPs) comprenden una familia de proteoglicanos y glicoproteínas que abarcan cinco grupos diferentes cuya clasificación se basa en sus características funcionales y estructurales. Los miembros de esta familia de compuestos funcionan en la organización de la arquitectura tisular, al orientar y ordenar las fibrillas de colágeno de la matriz extracelular durante la ontogenia y reparación tisular. Diversos miembros han sido implicados en un número de procesos de regulación en la tumorigénesis, incluyendo el control del crecimiento celular y la supervivencia, la inducción de la apoptosis, la adhesión, y la invasión. Actualmente estos compuestos son reconocidos como moléculas claves de señalización con un repertorio cada vez más amplio de interacciones moleculares que afectan no solo a factores de crecimiento sino también a varios receptores involucrados en el control del crecimiento celular, morfogénesis e inmunidad. Especies de proteoglicanos individuales tienen funciones opuestas, por lo que cualquier cambio en el equilibrio de los proteoglicanos en un tejido puede promover o inhibir la progresión del tumor, al interactuar positiva o negativamente con factores de crecimiento, lo cual puede causar un impacto importante en la regulación del comportamiento celular.

El presente capítulo se enfoca en los nuevos avances conceptuales y funcionales de la biología de estos componentes con énfasis especial en su participación en procesos patológicos como la inflamación y el

cáncer. El capítulo describe además la asociación entre los miembros de este grupo de proteoglicanos, la inflamación y el cáncer. Finalmente, se revisa la nueva información referente a la expresión de algunos miembros de este grupo en diferentes tipos celulares, incluyendo la glándula prostática, y su potencial implicación en la carcinogénesis de la misma.

Aspectos generales

Esta es la familia más grande de proteoglicanos, la cual incluye 18 productos génicos distintos y numerosas variantes de corte y empalme y formas procesadas. Cuando se comparan con los otros proteoglicanos, los miembros de este grupo se caracterizan por poseer un núcleo proteico pequeño conservado, de entre 36 a 42 kDa, con una región central constituida por repeticiones ricas en leucina (*leucine-rich repeats, LRRs*), flanqueadas por grupos de cisteínas y sustituidos covalentemente con cadenas laterales de GAG (Iozzo 1998; R.V. Iozzo 2011; Iozzo and Schaefer 2015). El núcleo proteico participa de interacciones proteína-proteína.

Los 18 SLRP se clasifican a su vez en cinco clases, I a V, con base en los grupos de cisteínas al extremo N-terminal del núcleo proteico y de las repeticiones específicas de los SLRPs en el extremo C-terminal (“ear repeats”), su organización cromosomal y homologías a nivel proteico y genómico (Iozzo 1998; R.V. Iozzo 2011; Iozzo and Schaefer 2015). Las clases I-III corresponden a genes canónicos mientras que las clases IV y V corresponden a genes no-canónicos.

Después de ser sintetizados, estos proteoglicanos son secretados y depositados ubicuamente en la mayoría de las matrices extracelulares, y durante la etapa del desarrollo su expresión se aumenta a nivel de las membranas que envuelven los órganos principales, como las meninges, el pericardio, la pleura, el periosteo, el pericondrio, el perimesium y el endomesium, lo cual es sugestivo de que estos componentes de la matriz extracelular participan de los procesos que regulan el tamaño y forma de los órganos durante la etapa embrionaria (Scholzen, Solursh et al. 1994; Iozzo 1999; Zoeller, Pimtong et al. 2009; Iozzo and Karamanos 2010; Iozzo and Schaefer 2010).

En general, los SLRP son componentes de la matriz extracelular, biológicamente activos, los cuales cumplen funciones como la unión al colágeno, unión a receptores tirosina kinasas (RTK), receptores de la respuesta innata, y en sus formas solubles, miembros de este grupo modulan la actividad de diversas vías de señalización como la del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), proteína morfogenética del hueso (BMP-4) (Iozzo 1988), proteína-1 secretada inducida por Wnt-1 (WISP-1), factor de von Willebrand (VWF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) (Merline, Schaefer et al. 2009).

Algunos reportes señalan que miembros de los SLRP inhiben el crecimiento; estos SLRPs han sido considerados como proteínas matricelulares debido a su localización extracelular, efectos moduladores de la síntesis, ensamblaje y degradación de fibrillas, sin ser parte misma de la estructura de la fibrilla, regulación directa e indirecta de la comunicación célula-matriz influenciando diversos procesos biológicos como la inflamación, fibrosis, tumorigénesis, angiogénesis, coagulación y sanado de heridas.

A nivel clínico, fragmentos del núcleo proteico de algunos SLRP tienen utilidad como marcadores biológicos para varios desórdenes degenerativos del cartílago (Melrose, Fuller et al. 2008). Los miembros mejor caracterizados del grupo de SLRP son decorina, biglicano (proteoglicanos CS/DS clase I) y lumican (proteoglicano KS clase II). Cada vez surgen más evidencias que apoyan la participación de estas moléculas en la regulación de procesos tumorales como adhesión, migración, angiogénesis y metástasis.

Tabla 1
Clasificación, características estructurales, y localización cromosómica de los miembros de la familia de SLRPs.

SLRP (gen)	Tamaño del núcleo proteico (kDa)	Tipo de GAG	Ubicación genómica
Clase I			
ECM2	77		9
Asporina (ASPN)	42		9

Biglicano (BGN)	38	CS/DS	X
Decorinaa (DCN)	36	CS/DS	12
ECMX	64		X
Clase II			
Fibromodulinaa (FMOD)	42	KS	1
Lumicano (LUM)	38	KS	12
Osteomodulina (OMD)	42	KS	9
PRELP	44	KS	1
Qeratan (KERA)	38	KS	12
Clase III			
Osteoglicina (OGN)	35	KS	9
Epificano (EPYC)	36	CS/DS	12
Opticina (OPTC)	35–45		1
Clase IV			
Tsukushina (TKS)	40		11
Condroaderina (CHAD)	36	KS	17
Nictalopina (NYX)	50		X
Clase V			
Podocan (PODN)	70		1
Podocan-like protein 1 (PODNL1)	57		19

CS/DS: condroitin sulfato/dermatan sulfato, KS: queratan sulfato).

Estructura y función de los SLRPs

Los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs) son un grupo extenso de proteínas asociadas que participan en la organización de la matriz extracelular y tienen efectos importantes en el comportamiento celular. La Figura 2 muestra la organización molecular de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina. Miembros de esta familia comparten múltiples repeticiones de un motivo estructural rico en leucina (RRLs), flanqueado por regiones conservadas en cisteína en el núcleo proteico (McEwan, Scott et al. 2006). Varias clases o subfamilias de SLRPs han sido propuestas, con base en sus homologías, tanto a nivel genómico y de proteínas (Figura 3). En los seres humanos, 18 son los genes que codifican para SLRPs, estos se encuentran en siete cromosomas, con algunos genes agrupados en los cromosomas, lo que sugiere la duplicación para generar redundancia funcional durante la evolución (Chen and Birk 2011).

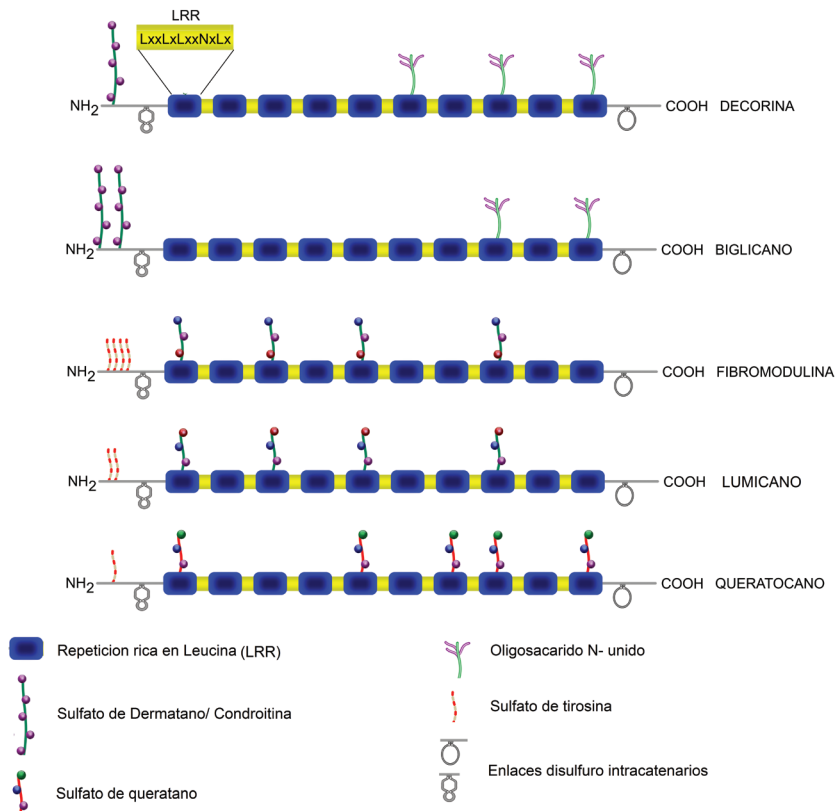


Figura 2. Organización molecular de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina

Organización estructural de algunos de los miembros representativos de cada una de las clases de proteoglicanos pequeños ricos en leucina. Decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano y queratocano tienen núcleos proteicos de tamaño similar, de 36, 38, 42, 37, y 37 kDa, respectivamente. Las proteínas centrales están representadas con enlaces disulfuro en los dominios N- y C- terminales, los cuales flanquean diez dominios con repeticiones ricas en leucina (LRR). Los LRR comprenden aproximadamente el 70% de cada proteína del núcleo, y cada uno está compuesto por la secuencia LXXLXLXXNXL, donde L representa leucina (o isoleucina), N representa asparagina generalmente, y X representa cualquier aminoácido. En el caso de

decorina o biglicano, una o dos cadenas de sulfato de dermatano/condroitina, respectivamente, se encuentran unidas en la región amino terminal. En el caso de fibromodulina, lumicano y queratocano, una a cinco cadenas de sulfato de queratano se encuentran entre los dominios LRR.

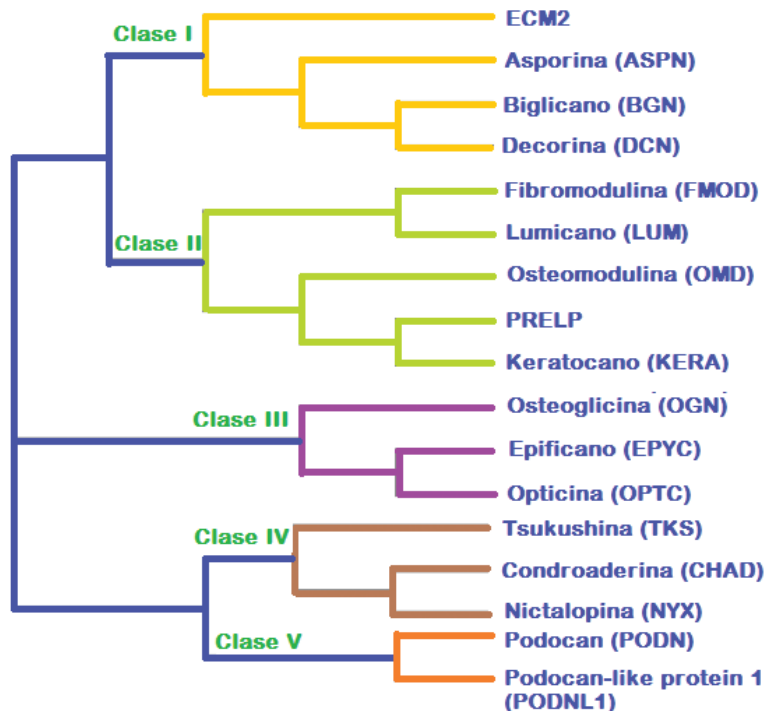


Figura 3. Árbol filogenético de la familia de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina

Árbol filogenético de los miembros de la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) en el humano. Se efectuó análisis filogenético en el que se muestra la presencia de cinco clases distintas y las relaciones entre los diferentes miembros de la familia de pequeños proteoglicanos. El dendrograma fue generado mediante alineamiento múltiple de las secuencias proteicas usando el programa *Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation* del Instituto Europeo de Bioinformática (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>) (Larkin, Blackshields et al. 2007).

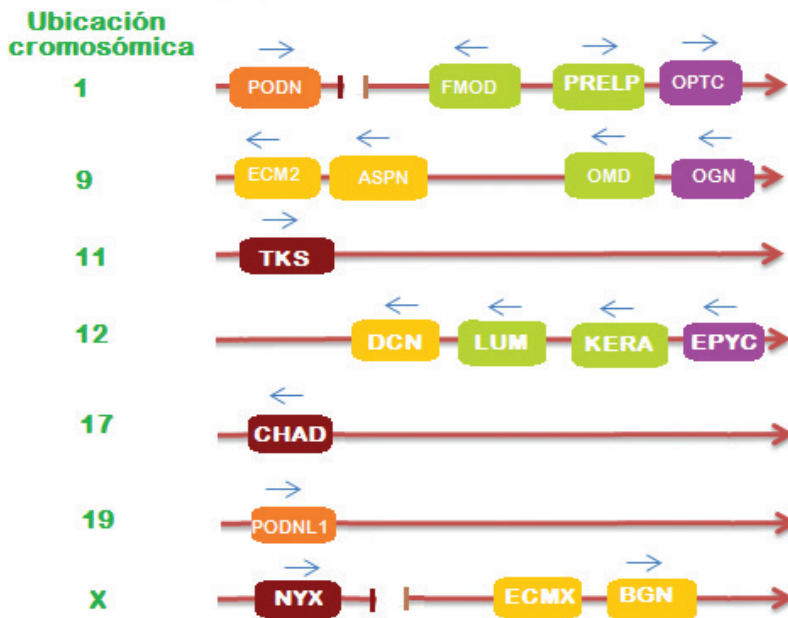


Figura 4. Organización cromosómica de varias clases de la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) en el humano

Miembros de las cinco clases se muestran en diferentes colores: amarillo (Clase I), verde (clase II), púrpura (clase III), café (clase IV), naranja (clase V). La disposición cromosómica de los diversos genes SLRP se muestra en una orientación telomérica (a la derecha). La dirección de la transcripción se indica por las flechas situadas por encima de las cajas de colores. La distancia horizontal entre los genes no está representada a escala.

A nivel de proteína, los SLRPs presentan un número variable de repeticiones en tándem ricas leucina (LRRs), que constituyen el principal dominio central. Los LRRs están compuestos generalmente por 20-29 residuos de longitud y contienen un motivo conservado de 11 residuos característico: LxxLxLxxNxLx, donde L indica leucina, que puede ser sustituida por isoleucina, valina y otros aminoácidos

hidrófobos, y x corresponde a cualquier aminoácido (Hocking, Shinomura et al. 1998). Este tipo de motivos en el dominio central forman una estructura solenoide curvada, con una cara convexa y una cóncava. La cara interna, cóncava, es una hoja β paralela, al cual cada LRR contribuye con una hebra β . La cara externa, convexa, está compuesta de arreglos de hélices α . Cada repetición coloca sus residuos hidrofóbicos consenso dentro del núcleo del solenoide mientras el resto de residuos se aleja de él (Kajava 1998). Los LRR en ambos lados son flanqueados por regiones conservadas de cisteína. En el extremo N-terminal, los SLRPs contienen un racimo de cuatro cisteínas con un espaciador interno de clase conservada. Este dominio en diversos SLRPs sufre modificaciones de forma variable para proporcionar funciones únicas a cada SLRP (McEwan, Scott et al. 2006). Entre los motivos conservados C-terminal rico en cisteína, un rasgo distintivo para los SRLPs canónicos de clase I, II y III es la repetición de oreja, la cual es la penúltima RRL más larga, que se extiende hacia fuera a partir de la cara convexa (Figura 2). Se ha propuesto que esta estructura mantiene la conformación del núcleo proteico e influencia la habilidad de unión a ligando (Chen and Birk 2011).

Los SLRPs son proteoglicanos que tienen un núcleo proteico y un número variable de cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs). Aunque las clases no canónicas IV y V no contienen ningún GAG, estas dos clases también se incluyen en esta familia. Los GAGs de SLRPs son procesados diferencialmente en el desarrollo y el envejecimiento, y son variables en cuanto a tamaño, número, sulfatación y epimerización en varios tejidos (Chen and Birk 2013). Los GAGs cumplen diversas funciones que incluyen la hidratación de la matriz extracelular; pueden unirse a citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, protegiéndolos de enzimas proteolíticas. Además, pueden actuar como receptores de proteasas y de inhibidores de proteasas y como reguladores de la migración celular (McEwan, Scott et al. 2006). Los SLRPs también son modificados por la N-glicosilación. Junto con los GAG O-ligados, estas modificaciones de polisacáridos afectan la estabilidad conformacional del núcleo proteico y de secreción (Seo, Hocking et al. 2005).

Se ha documentado que algunas proteínas SLRPs regulan la estructura de la matriz extracelular (ECM), afectan la adhesión celular a través de la interacción con integrinas, y controlan las actividades de efectores celulares potentes, tales como el factor de crecimiento transformante β . El arquetípico más caracterizado ha sido decorina, proteoglicano de la familia SLRP, el cual se encuentra presente en una variedad de tejidos conjuntivos, por lo general, decorando el colágeno fibrilar. Además, está involucrado en importantes funciones biológicas incluyendo la regulación del ensamble de colágeno fibrilar y la modulación de la adhesión celular.

Una función importante de los SLRPs es el ensamblaje de una matriz de colágeno adecuada, especializada. Los requisitos especiales sobre las fibrillas, y las diferentes etapas de la formación de fibrillas, requieren diferentes SLRPs, los cuales trabajan en concierto para ensamblar las fibras de colágeno en una matriz extracelular funcional. Los SLRPs podrían regular el entrecruzamiento entre dos moléculas de colágeno, ocultando algunos de los posibles residuos de lisina de reticulación presentes en cada monómero de colágeno. La matriz extracelular se compone principalmente de glicoproteínas, proteoglicanos y colágenos. Los diferentes miembros de SLRPs, con sus capacidades de unión multivalentes, regulan el ensamblaje de la matriz durante el desarrollo a distintos niveles, contribuyendo a la arquitectura del microambiente, y a la modulación tanto de la matriz extracelular como de las funciones celulares, causando un impacto en la función tisular. Estos componentes biológicos influyen en diferentes aspectos del comportamiento celular, incluyendo la diferenciación, apoptosis, proliferación y migración a través de múltiples medios.

SLRPs, inflamación, y cáncer

La inflamación es un proceso crucial en la defensa contra patógenos invasores, la cual es mediada por células del sistema inmune, principalmente neutrófilos, macrófagos, y células dendríticas, las cuáles reconocen estructuras microbianas conservadas conocidas como *Patrones moleculares asociados a patógenos* (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), a través de *Receptores de reconocimiento de patógenos* (Pathogen recognition receptors, PRRs)

(Takeuchi and Akira 2010). La inflamación también tiene lugar en casos de daño tisular en ausencia de patógenos microbianos, tales como trauma, daño químico, isquemia, entre otros. Enfermedades como aterosclerosis, tumorigénesis, infarto al miocardio, entre otras, están asociadas a inflamación no mediada por patógenos.

La matriz extracelular se encuentra en prácticamente todos los tejidos, sirviendo como un gran reservorio de compuestos secuestrados en ella, algunos de los cuales, bajo condiciones de estrés o daño tisular, son liberados como moléculas endógenas capaces de actuar como *Patrones moleculares asociados a daño* (Damage-associated molecular patterns, DAMPs). La investigación reciente en este tema ha encontrado que varios miembros de la familia de SLRPs, específicamente decorina y biglicano, pueden actuar como potentes DAMPs luego de su liberación proteolítica desde la matriz extracelular, interactuando con varios receptores implicados en la activación de la inflamación, tales como los receptores tipo Toll, receptores de TGF- β , y NLRs (NOD like receptors)(Babelova, Moreth et al. 2009; Merline, Moreth et al. 2011).

Biglicano y decorina son los dos SLRPs mas estudiados, los cuales pertenecen a la clase I canónica y se encuentran sustituidos con una o dos cadenas de condroitin/dermatán sulfato. El hallazgo de que estos dos componentes de la matriz extracelular actúan como moléculas señalizadoras ha abierto nuevas puertas a la investigación, para tratar de entender como estos compuestos regulan procesos biológicos tan importantes como la diferenciación, proliferación, migración y apoptosis. Por ejemplo, decorina es capaz de unirse a cuatro diferentes receptores tirosina quinasas (RTKs), incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Iozzo, Moscatello et al. 1999), receptor del factor de crecimiento parecido a insulina-1 (IGFR-1) (Schonherr, Sunderkotter et al. 2005), Met (Goldoni, Humphries et al. 2009), y el receptor del factor de crecimiento endotelial-2 (VEGFR2) (Khan, Girish et al. 2011), lo cual lo capacita para impactar procesos de fibrogénesis, crecimiento tumoral, y diseminación metastásica (Goldoni and Iozzo 2008).

Ya que solo en sus formas solubles intactas biglicano y decorina son capaces de disparar la señalización proinflamatoria, surgen los

interrogantes de por qué, cuándo y por cuál razón estos proteoglicanos entran a la circulación. Es evidente que se requiere más investigación dirigida a determinar si los niveles circulantes de algunos de los miembros de esta interesante familia de proteoglicanos puedan ser de utilidad como biomarcadores de enfermedades inflamatorias (Moreth, Iozzo et al. 2012; Schaefer and Iozzo 2012).

A este respecto, investigaciones en curso en nuestro grupo de investigación están dirigidas a determinar la asociación entre los niveles circulantes de fibromodulina, otro de los miembros de esta familia de proteoglicanos, y la enfermedad prostática benigna o maligna (Bettín, Reyes et al. 2016; Reyes, Benedetti et al. 2016).

En general, no se puede hablar de un papel definido de los SLRP en el cáncer debido a que especies individuales de proteoglicanos parecen tener papeles opuestos en la regulación del crecimiento celular, la adhesión, la migración y la apoptosis. Por lo tanto es conveniente definir el rol biológico de cada SLRP por separado.

Fibromodulina: un pequeño proteoglicano rico en leucina

Fibromodulina es un miembro de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (*small leucine rich proteoglycans, SLRPs*), el cual se encuentra codificado por el gen FMOD que se localiza en el cromosoma 1q32 (Antonsson, Heinegard et al. 1993; Sztrolovics, Chen et al. 1994). Este proteoglicano es importante para la organización de la matriz extracelular y la reparación tisular en múltiples órganos (Ameje, Aria et al. 2002). Las proteínas centrales de los SLRPs tienen un dominio central que contiene 6-10 repeticiones ricas en leucina (*leucine-rich repeats, LRR*), delimitados por regiones N-terminal y C-terminal con residuos conservados de Cys (Iozzo, Pillarisetti et al. 1997). En el caso de fibromodulina, la proteína central tiene una cadena de queratan sulfato unido covalentemente a N (N-linked) (Lauder, Huckerby et al. 1997). (Figura 5).

La principal función descrita para fibromodulina es la regulación de la formación de las fibrillas de colágeno (Chakravarti 2002); sin embargo, recientemente se han descrito funciones adicionales para

este proteoglicano, incluyendo la regulación de la angiogénesis (Jian, Zheng et al. 2013; Adini, Ghosh et al. 2014), asociación con el fenotipo metastásico de líneas celulares cancerosas (Reyes, Tiwari et al. 2007), reprogramación de fibroblastos humanos en células multi-potenciales (Zheng, Jian et al. 2012), modulación de la actividad de TGF- β (Zheng, Lee et al. 2014) y procesos inflamatorios a través de la activación de la vía clásica del complemento (Sjoberg, Onnerfjord et al. 2005). Otros estudios lo han identificado como un nuevo antígeno tumoral en leucemia, linfoma y leiomioma (Levens, Luo et al. 2005; Mayr, Bund et al. 2005; Mikaelsson, Danesh-Manesh et al. 2005; Hassan, Samy et al. 2011).

Aunque fibromodulina ha sido descrito como un proteoglicano secretado, el cual es un componente importante de la matriz extracelular en tejidos conectivos, el conocimiento acerca de su expresión en otros tejidos o tipos celulares es limitado.

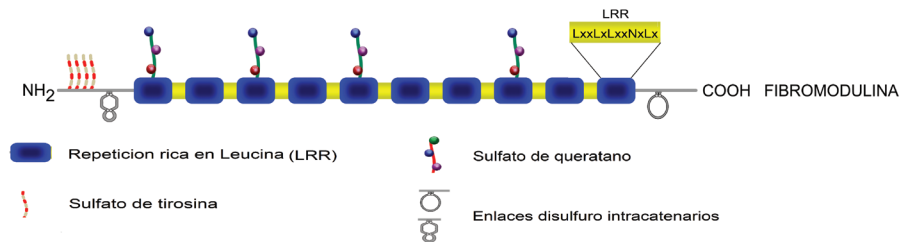


Figura 5. Organización estructural de fibromodulina

Fibromodulina es una proteína de 42 kDa con tres dominios estructurales. El dominio N-terminal tiene cuatro residuos de cisteína, los cuales participan en enlaces disulfuro intracatenarios. El dominio central contiene residuos de leucina en posiciones conservadas. El dominio C-terminal contiene dos residuos de cisteína, los cuales forman un enlace disulfuro intracatenario. Fibromodulina contiene de una a cuatro cadenas de sulfato de queratano entre los dominios LRR.

Recientemente, mediante análisis transcriptómico con microarreglos de ADN, nuestro grupo de investigación identificó la expresión de este proteoglicano a nivel transcripcional en líneas celulares cancerosas de

próstata de rata (Reyes, Tiwari et al. 2007). Otros trabajos recientes han reportado la expresión de fibromodulina en queratinocitos en cultivo y en epidermis humana (Vélez-Delvalle, Marsch-Moreno et al. 2008), dando evidencia que este proteoglicano tiene localización intracelular en este tipo celular (Vélez-Delvalle, Marsch-Moreno et al. 2008). La expresión epitelial y localización intracelular de fibromodulina es un nuevo hallazgo que sugiere nuevas funciones biológicas potenciales para esta familia de proteoglicanos.

Actualmente, no hay información acerca de si la proteína fibromodulina es expresada por líneas celulares prostáticas humanas en cultivo o si está presente en tejido humano prostático normal, benigno, o maligno. Nuestro grupo reportó la expresión transcripcional de fibromodulina usando PCR cuantitativa en tiempo real, y a nivel proteico usando inmunocitoquímica e inmunohistoquímica con un anticuerpo específico, en líneas celulares prostáticas y tejido prostático, respectivamente (Reyes et al. 2016.). Además, reportamos la expresión diferencial de fibromodulina entre diferentes líneas celulares prostáticas y en especímenes de tejido prostático obtenidos de pacientes con cáncer o enfermedad benigna.

Es claro que se necesitan estudios adicionales para determinar la significancia biológica y clínica de la expresión de fibromodulina en la próstata y si este proteoglicano de la familia de SLRP tiene una función importante en la biología del cáncer o si puede servir como un biomarcador para el cáncer de próstata. A este respecto, nos encontramos evaluando los niveles séricos de fibromodulina mediante un ensayo ELISA específico, en pacientes diagnosticados con cáncer en comparación con pacientes diagnosticados con hiperplasia prostática benigna. Los estudios preliminares muestran que los niveles séricos de fibromodulina están significativamente elevados en el grupo de pacientes con cáncer. A este respecto, estudios en curso en nuestro grupo de investigación están dirigidas a determinar la asociación entre los niveles circulantes de fibromodulina, otro de los miembros de esta familia de proteoglicanos, y la enfermedad prostática benigna o maligna (N. Reyes et al. 2016. *Manuscrito en preparación*).

Decorina: un supresor de tumores

Decorina representa el miembro prototípico de la familia de SLRPs mejor estudiado, y es un constituyente importante de la matriz extracelular, contiene una única cadena de glicosaminoglicano (GAG) compuesto de sulfato de dermatan o de condroitina, y 12 repeticiones ricas en leucina que comprenden el núcleo de la proteína.

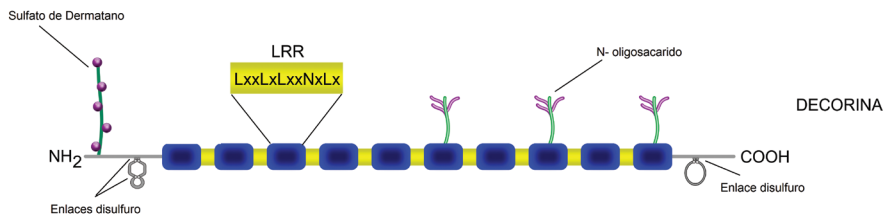


Figura 6. Organización estructural de decorina.

Decorina tiene una proteína central de 36 kDa, la cual tiene unida en su dominio N-terminal una cadena de glicosaminoglicano (GAG) de sulfato de dermatano/condroitina. El dominio N-terminal tiene cuatro residuos de cisteína, los cuales participan en enlaces disulfuro intracatenarios. El dominio C-terminal contiene dos residuos de cisteína, los cuales forman un enlace disulfuro intracatenario. La proteína central se encuentra además glicosilada con varios oligosacáridos pequeños en varios de sus dominios LRR.

Decorina es un proteoglicano del estroma sintetizado principalmente por los fibroblastos, células endoteliales vasculares y células musculares lisas. Inicialmente se caracterizó por su alta afinidad por las fibras de colágeno y por actuar en la fibroblatogénesis del mismo (Keene, San Antonio et al. 2000). Sin embargo, actualmente es conocido por su habilidad para unirse a factores de crecimiento y actuar como un supresor de tumores soluble.

Uno de los primeros estudios que indagó sobre la función biológica de decorina en cáncer fue llevado a cabo por Iozzo, Chakrani et al, en 1999, quienes demostraron que la expresión ectópica de decorina en células transformadas resultaba en la detención del crecimiento y

en la inhabilidad para generar tumores en ratones desnudos. En un estudio subsecuente, los mismos autores revelaron el mecanismo por el cual decorina induce el efecto cito-estático en las células tumorales: Una molécula exógena de decorina activa el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y desencadena una cascada de señalización que conduce a la fosforilación de la proteína activada por mitógeno (MAP) quinasa, la inducción de p21, y la supresión del crecimiento. Decorina interactúa de forma directa con el receptor de EGF. La unión de decorina induce la dimerización del receptor de EGF y la fosforilación rápida y sostenida de la MAP quinasa en células escamosas de carcinoma. En un sistema libre de células se demostró que decorina induce la auto-fosforilación del EGFR purificado mediante la activación de la tirosina quinasa del receptor y también puede actuar como un sustrato para la quinasa del receptor de EGF *per se*. Mediante el uso de ensayos de unión de radioligando se demostró que decorina tanto soluble como inmovilizado se unen al ectodominio del receptor EGF o al receptor de EGF purificado. La unión está mediada por el núcleo de la proteína y tiene una afinidad relativamente baja (K_d de aproximadamente 87 nM)(Iozzo, Moscatello et al. 1999). Por lo tanto, decorina se debe considerar como un nuevo ligando biológico para el receptor de EGF, una interacción que podría regular el crecimiento celular durante la remodelación y el crecimiento del cáncer.

Además del EGFR, decorina puede interactuar con otros factores de crecimiento, (Goldoni, Humphries et al. 2009) incluyendo Met, el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), al cual se une directamente y con alta afinidad ($K(d) = \text{aprox } 1.5 \text{ nM}$), induciendo la activación temporal del receptor, el reclutamiento de la ligasa de ubiquitina E3c-Cbl, y la rápida degradación intracelular del receptor. Además, decorina suprime los niveles intracelulares de β -catenina, un efector clave de Met, e inhibe el crecimiento y migración celular. Por lo tanto, mediante la unión a múltiples receptores tirosina quinasa, decorina puede reducir el desarrollo y progresión de tumores primarios (Goldoni, Humphries et al. 2009).

Por otro lado, aunque varios estudios han apoyado la función supresora de tumores de decorina en otros tipos de cáncer, respecto al de próstata ha habido poca evidencia de un papel tan importante para esta

molécula. Hasta la fecha, solo un estudio ha informado de la expresión de decorina en neoplasia intra-epitelial prostática de alto grado (PIN) pero no en cáncer de próstata propiamente dicho (Banerjee, Liu et al. 2003). En ese informe, la expresión del estroma de la próstata también fue alta en las muestras de HPB, pero disminuyó con la progresión del cáncer de próstata.

En un estudio reciente, (Hu, Sun et al. 2009) implementaron un modelo animal de cáncer de próstata, basado en ratones con delección del supresor de tumor Pten (Pten^{P-/-}) específica de la próstata, para demostrar que la liberación sistémica de decorina inhibe la progresión del tumor mediante el bloqueo de la proliferación celular y las vías de supervivencia. Además, en líneas celulares de cáncer de próstata mostraron que decorina inhibe específicamente la fosforilación de EGFR y del receptor de andrógenos (AR) y el entrecruzamiento entre estas vías (Figura 7). Lo cual previene la translocación nuclear del AR e inhibe la producción del antígeno específico de la próstata. Además, la vía de supervivencia del fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)/Akt es suprimida, lo que conduce a la apoptosis tumoral. Estos hallazgos resaltan la efectividad de decorina en la presencia de un riesgo genético de cáncer e implica a decorina como un nuevo agente potencial para la terapia contra el cáncer de próstata dirigida hacia la vía EGFR/AR-PI3K-Akt (Hu, Sun et al. 2009).

Además del desarrollo y la progresión tumoral decorina también tiene un efecto en la angiogénesis, la cual es un paso clave en la progresión tumoral maligna. Sin embargo, este papel aun es controversial ya que, algunos estudios indican un papel pro-angiogénico tal como el potenciamiento de la migración celular endotelial mediante el aumento de la interacción de $\alpha 2\beta 1$ integrina con colágeno tipo I (Fiedler, Schonherr et al. 2008). Específicamente, decorina media la adhesión mediante la unión a $\alpha 2\beta 1$ integrina y la promoción de la interacción integrina-colágeno. No obstante, un estudio reciente ha demostrado con claridad la unión inhibitoria de alta afinidad de decorina al receptor 2 del VEGF (VEGFR2) (Khan, Girish et al. 2011). Además, mediante la unión de factor de crecimiento transformante β (TGF β), decorina interactúa con TGF β , previene su unión al receptor, y por lo tanto juega un papel significativo en la progresión tumoral y la angiogénesis (Baghy, Iozzo et al. 2012).

Biglicano: implicación en cáncer

Biglicano está estructuralmente relacionado con decorina pero porta dos cadenas de glicosaminoglicanos en vez de una (Figura 7). Además, parece tener una participación muy limitada en la progresión del cáncer y no posee las propiedades antiproliferativas de decorina (Edwards 2012). La liberación sistemática de biglicano no tiene un impacto detectable sobre el desarrollo del cáncer de próstata en estudios con ratones *Pten*^{-/-}, y tampoco es capaz de inhibir la señalización por EGFR o AR en líneas celulares de cáncer de próstata (Hu, Sun et al. 2009). Sin embargo, en cáncer de vejiga, biglicano parece tener una función parecida a decorina. Estudios recientes realizados en biopsias de pacientes con cáncer de vejiga con diferentes estadios tumorales han analizado la expresión de biglicano en estudios de seguimiento clínico a largo plazo (10 años) (Niedworok, Rock et al. 2013). Curiosamente, el aumento de la expresión de ARNm de biglicano se asoció con etapas tumorales más tardías y la invasividad al músculo. Además, el bloqueo *in vitro* de biglicano endógeno en células humanas de carcinoma urotelial (células J82) aumentó la proliferación celular, mientras que la adición de biglicano recombinante y la sobreexpresión de biglicano inhibió la proliferación de las células tumorales. Los autores también transplantaron células J82 (después de suprimir BGN) en ratones desnudos, lo cual resultó en un aumento significativo del crecimiento de tumores en los xenoinjertos subcutáneos. En general estos hallazgos sugieren que la alta expresión de biglicano está asociada con una reducción en proliferación celular tumoral. Además, el análisis de Kaplan-Meier reveló mayor supervivencia a los 10 años en los pacientes con alta expresión de biglicano en biopsias tumorales

De manera contradictoria, en cáncer gástrico biglicano parece tener un papel oncogénico más que de supresor tumoral. En estudios reportados se encontró que la expresión de BGN era significativamente mayor en tejidos de cáncer gástrico y estaba asociada con metástasis en los ganglios linfáticos, la profundidad de la invasión del tumor y el estadio tumoral (Hu, Duan et al. 2014). Así mismo, (Wang, Li et al. 2011), analizaron la expresión de BGN a nivel de ARNm y proteína en 69 cánceres gástricos y tejido no tumoral adyacente, mediante qRT-PCR y western blot, y encontraron que biglicano estaba sobrerregulado

tanto a nivel transcripcional como traduccional. La sobreexpresión de BGN estuvo fuertemente asociada con la metástasis de los ganglios linfáticos, la clasificación del tumor (T), la clasificación de la metástasis (M), y la invasión vascular. Además, los pacientes con tumores positivos para biglicano tuvieron una mayor tasa de recurrencia de la enfermedad y una menor supervivencia que los pacientes con tumores negativos para biglicano después de la cirugía radical. El análisis multivariado reveló que la expresión de biglicano es un indicador de pronóstico independiente de la supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico. Los datos del presente estudio demuestran que la expresión elevada de biglicano puede jugar un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer gástrico.

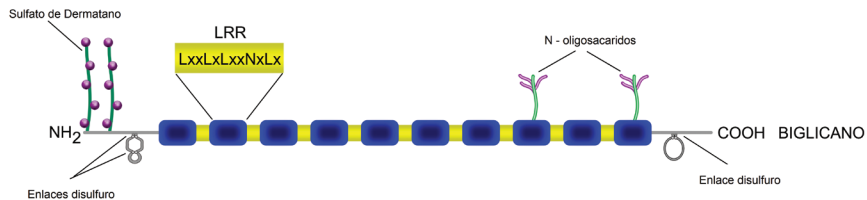


Figura 7. Organización estructural de biglicano.

Biglicano es un proteoglicano pequeño con una proteína central de 38 kDa aproximadamente, la cual tiene unidas en su dominio N-terminal dos cadenas del glicosaminoglicano dermatano/condroitina sulfato. El dominio N-terminal tiene cuatro residuos de cisteína, los cuales participan en enlaces disulfuro intracatenarios. El dominio C-terminal contiene dos residuos de cisteína, los cuales forman un enlace disulfuro intracatenario. La proteína central se encuentra además glicosilada con varios oligosacáridos pequeños en varios de sus dominios LRR.

Lumicano: inhibidor de la migración celular

Lumicano es un SLRP que lleva glicosaminoglicanos KS y ha sido mejor estudiado como un regulador de la fibrillogénesis de colágeno en la córnea (Chakravarti, Magnuson et al. 1998; Kao and Liu 2002). Está presente en este tejido en forma de proteoglicano asociado a keratan sulfato, con un núcleo proteico de 38kDa (Figura 8). LUM está

presente en numerosas matrices extracelulares de diferentes tejidos, tales como músculo, cartílago y córnea.

Los reportes sobre el papel de lumican en el cáncer son contradictorios, con la sobreexpresión asociado con un aumento en la malignidad del cáncer de mama, (Leygue, Snell et al. 1998) cáncer de pulmón (Matsuda, Yamamoto et al. 2008) y cáncer pancreático (Ishiwata, Cho et al. 2007), pero con niveles de expresión reducidos asociados con progresión de melanoma (Brezillon, Venteo et al. 2007). Además, la expresión forzada de lumican en células de melanoma ha demostrado aumentar la adhesión mediada por integrina $\beta 1$ (D'Onofrio, Brezillon et al. 2008) y reduce el potencial metastásico de celular (Brezillon, Zeltz et al. 2009).

Zeltz, Brezillon et al., en 2010 demostraron que lumican evita la progresión del melanoma mediante la inhibición de la migración celular mediante la unión a $\alpha 2\beta 1$ integrina. Células de melanoma A375 fueron transfectadas con ARNsi dirigido contra la subunidad $\alpha 2$ de la integrina. En comparación con las células control A375, el efecto anti-migratorio de lumican fue abolido en células A375 transfectadas. Por otra parte, lumican inhibió la migración quimiotáctica de las células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas de forma estable con la subunidad de integrina $\alpha 2$ (CHO-A2), pero no la de las células CHO de tipo salvaje.

Otros informes indican un papel de lumican en la apoptosis inducida por Fas-FasL (Vij, Roberts et al. 2004) y en la creación de un gradiente químico para la migración de neutrófilos (Lee, Bowrin et al. 2009). Aunque existen similitudes en la señalización entre lumican y decorina, la expresión diferencial de estos dos SLRPs se informó en cáncer de mama (Leygue, Snell et al. 2000). En próstata humana, perfiles de expresión génica revelaron una sobrerregulación de lumican en la HPB en comparación con la próstata normal (Luo, Dunn et al. 2002). Sin embargo, en ensayos de inmunohistoquímica, la tinción de la proteína lumican en el estroma de tejido prostático maligno y no maligno es débil (Cohen, Holland et al. 2000). Disminución de la inmunotinción para KS glicosaminoglicanos de lumican acompañó la pérdida de orgánulos secretorios en adenocarcinoma de próstata (Cohen, Holland

et al. 2000). El papel de lumican en los procesos de secreción de la próstata no se entiende, pero se puede especular que podría ser similar a la de Serglycin en el empaquetamiento de productos de secreción bioactivos tales como proteasas, poliaminas y quimiocinas. En un estudio sobre la actividad antitumoral de lumican en cáncer de próstata, (Coulson-Thomas, Coulson-Thomas et al. 2013), mediante PCR en tiempo real e inmunotinción, observaron la sobrerregulación de este SLRP en los tumores primarios analizados.

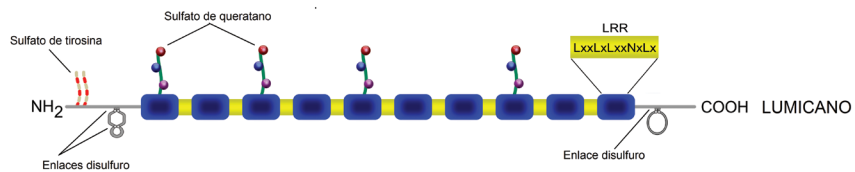


Figura 8. Organización estructural de lumicano.

Dominios estructurales de lumicano. La proteína central de lumicano se esquematiza con el dominio N-terminal, el dominio central con repeticiones ricas en leucina (LRR), y el dominio C-terminal. El dominio N-terminal porta residuos de cisteína y sulfato de tirosina, y el dominio central está compuesto de diez LRR que contienen cuatro sitios de N-glicosilación para cadenas del glicosaminoglicano sulfato de queratano, mientras que el dominio C-terminal contiene dos residuos conservados de cisteína que forman enlaces disulfuro.

El aumento en la expresión de LUM fue observado en el estroma reactivo que rodea los tumores primarios con deposición fibrótica alrededor de las glándulas acinares. Los estudios *in vitro* demostraron que lumican inhibe tanto la migración como la invasión de células de cáncer de próstata aisladas del ganglio linfático, hueso y cerebro. Además, las células cultivadas en presencia de lumican presentaron una disminución en la formación de proyecciones celulares (Figura 11). Estos hallazgos sugieren que las moléculas de lumican presentes en el estroma reactivo que rodea los tumores primarios de próstata juega un papel restrictivo en la progresión del cáncer.

Por otro lado, Brezillon, Pietraszek et al. (2013) demostraron que lumican ejerce propiedades angiostáticas mediante la regulación negativa de la actividad proteolítica asociada con las membranas de células endoteliales, en particular metaloproteinasas de matriz MMP-14 y MMP-9.

A través de una visión global, lumicano parece ser un potente inhibidor de la progresión tumoral más que de la tumorigénesis. Sin embargo, los proteoglicanos sufren cambios progresivos en el ambiente del tumor, de manera que la complejidad y la diversidad de la estructura de proteoglicanos pueden ser responsables de una variedad de funciones que regulan el comportamiento celular.

A través de su núcleo proteico y sus cadenas de glicosaminoglicanos, los proteoglicanos pueden interactuar con factores de crecimiento y quimiocinas. Estas interacciones afectan la señalización celular, la motilidad, la adhesión, el crecimiento, y la apoptosis.

Comentarios finales

Los SLRP son componentes de la matriz extracelular, biológicamente activos, que recientemente han demostrado tener funciones importantes en las interacciones entre células y entre células y matriz extracelular. Los SLRPs constituyen una red de regulación de señales, en su mayoría extracelulares, que se desarrollan corriente arriba de varias cascadas de señalización que afectan la fosforilación intracelular y modulan diferentes vías que incluyen aquellas conducidas por miembros de la súper familia de la proteína morfogenética ósea/factor de crecimiento transformante β y receptores tirosina quinasa tales como el factor de crecimiento tipo insulina y los receptores tipo Toll (Schaefer and Iozzo 2008). Estudios recientes muestran que el tejido prostático humano normal expresa un conjunto específico de proteoglicanos, incluyendo SLRP como decorina, lumican y biglicano, los cuales se localizan tanto en las células epiteliales como en el estroma. En diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de próstata, ocurren cambios progresivos en la expresión de proteoglicanos tanto en el tejido epitelial como en el estroma. Según las investigaciones recientes, tanto las células cancerosas como el microambiente tumoral cooperan para llevar a

cabo la transformación maligna. Un papel importante en este proceso de transformación se le atribuye a los componentes moleculares presentes en ambos sitios, tales como los proteoglicanos, considerados en la actualidad como efectores moleculares claves de la superficie celular y el microambiente pericelular. Entre los proteoglicanos mejor estudiados en el cáncer de próstata se encuentran versican, decorina y perlecan, sindecan-1 y betaglicano. Por su parte, lumican, presente en el estroma reactivo que rodea los tumores primarios de próstata, juega un papel restrictivo en la progresión del cáncer. En el próximo capítulo se revisarán los aspectos generales de la glándula prostática, sus enfermedades más comunes, y finalmente, la información actual sobre la expresión de proteoglicanos en tejido prostático normal y canceroso.

Referencias

- Adini, I., K. Ghosh, et al. (2014). "Melanocyte-secreted fibromodulina promotes an angiogenic microenvironment." *J Clin Invest* 124(1): 425-436.
- Ameye, L., D. Aria, et al. (2002). "Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulina-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis." *FASEB J* 16(7): 673-680.
- Antonsson, P., D. Heinegard, et al. (1993). "Structure and deduced amino acid sequence of the human fibromodulina gene." *Biochim Biophys Acta* 1174(2): 204-206.
- Babelova, A., K. Moreth, et al. (2009). "Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors." *J Biol Chem* 284(36): 24035-24048.
- Baghy, K., R. V. Iozzo, et al. (2012). "Decorina-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis." *J Histochem Cytochem* 60(4): 262-268.
- Banerjee, A. G., J. Liu, et al. (2003). "Expression of biomarkers modulating prostate cancer angiogenesis: differential expression of annexin II in prostate carcinomas from India and USA." *Mol Cancer* 2: 34.

- Bettín, A., I. Reyes, et al. (2016). "Gene expression profiling of prostate cancer associated genes identifies fibromodulin as potential novel biomarker for prostate cancer." *Int. J. Biol. Markers*. 31(2):e153-e162.
- Brezillon, S., K. Pietraszek, et al. (2013). "Lumican effects in the control of tumour progression and their links with metalloproteinases and integrins." *FEBS J* 280(10): 2369-2381.
- Brezillon, S., L. Venteo, et al. (2007). "Expression of lumican, a small leucine-rich proteoglycan with antitumour activity, in human malignant melanoma." *Clin Exp Dermatol* 32(4): 405-416.
- Brezillon, S., C. Zeltz, et al. (2009). "Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis." *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4: 15-22.
- Cohen, R. J., J. W. Holland, et al. (2000). "Identification of the glycosaminoglycan keratan sulfate in the prostatic secretory cell." *Prostate* 44(3): 204-209.
- Coulson-Thomas, V. J., Y. M. Coulson-Thomas, et al. (2013). "Lumican expression, localization and antitumor activity in prostate cancer." *Exp Cell Res* 319(7): 967-981.
- Chakravarti, S. (2002). "Functions of lumican and fibromodulina: lessons from knockout mice." *Glycoconj J* 19(4-5): 287-293.
- Chakravarti, S., T. Magnuson, et al. (1998). "Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican." *J Cell Biol* 141(5): 1277-1286.
- Chen, S. and D. E. Birk (2011). "Focus on molecules: decorina." *Exp Eye Res* 92(6): 444-445.
- Chen, S. and D. E. Birk (2013). "The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly." *FEBS J* 280(10): 2120-2137.
- D'Onofrio, M. F., S. Brezillon, et al. (2008). "Identification of beta1

- integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican." *Biochem Biophys Res Commun* 365(2): 266-272.
- Edwards, I. J. (2012). "Proteoglycans in prostate cancer." *Nat Rev Urol* 9(4): 196-206.
- Fiedler, L. R., E. Schonherr, et al. (2008). "Decorina regulates endothelial cell motility on collagen I through activation of insulin-like growth factor I receptor and modulation of alpha2beta1 integrin activity." *J Biol Chem* 283(25): 17406-17415.
- Goldoni, S., A. Humphries, et al. (2009). "Decorina is a novel antagonistic ligand of the Met receptor." *J Cell Biol* 185(4): 743-754.
- Goldoni, S. and R. V. Iozzo (2008). "Tumor microenvironment: Modulation by decorina and related molecules harboring leucine-rich tandem motifs." *Int J Cancer* 123(11): 2473-2479.
- Hassan, D. A., R. M. Samy, et al. (2011). "Study of fibromodulin gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *J Egypt Natl Canc Inst* 23(1): 11-15.
- Hocking, A. M., T. Shinomura, et al. (1998). "Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix." *Matrix Biol* 17(1): 1-19.
- Hu, L., Y. T. Duan, et al. (2014). "Biglycan enhances gastric cancer invasion by activating FAK signaling pathway." *Oncotarget* 5(7): 1885-1896.
- Hu, Y., H. Sun, et al. (2009). "Decorina suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways." *Neoplasia* 11(10): 1042-1053.
- Iozzo, R. V. (1988). "Proteoglycans and neoplasia." *Cancer Metastasis Rev* 7(1): 39-50.
- Iozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." *Annu Rev Biochem* 67: 609-652.

- lozzo, R. V. (1999). "The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins." *J Biol Chem* 274(27): 18843-18846.
- lozzo, R. V., F. Chakrani, et al. (1999). "Cooperative action of germ-line mutations in decorina and p53 accelerates lymphoma tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 3092-3097.
- lozzo, R. V. and N. Karamanos (2010). "Proteoglycans in health and disease: emerging concepts and future directions." *FEBS J* 277(19): 3863.
- lozzo, R. V., D. K. Moscatello, et al. (1999). "Decorina is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor." *J Biol Chem* 274(8): 4489-4492.
- lozzo, R. V., J. Pillarisetti, et al. (1997). "Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. Transcriptional activation by transforming growth factor-beta via a nuclear factor 1-binding element." *J Biol Chem* 272(8): 5219-5228.
- lozzo, R. V. and L. Schaefer (2010). "Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans." *FEBS J* 277(19): 3864-3875.
- lozzo, R. V. and L. Schaefer (2015). "Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans." *Matrix Biol* 42: 11-55.
- Ishiwata, T., K. Cho, et al. (2007). "Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer." *Oncol Rep* 18(3): 537-543.
- Jian, J., Z. Zheng, et al. (2013). "Fibromodulina promoted in vitro and in vivo angiogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* 436(3): 530-535.
- Kajava, A. V. (1998). "Structural diversity of leucine-rich repeat proteins." *J Mol Biol* 277(3): 519-527.

- Kao, W. W. and C. Y. Liu (2002). "Roles of lumican and keratocan on corneal transparency." *Glycoconj J* 19(4-5): 275-285.
- Keene, D. R., J. D. San Antonio, et al. (2000). "Decorina binds near the C terminus of type I collagen." *J Biol Chem* 275(29): 21801-21804.
- Khan, G. A., G. V. Girish, et al. (2011). "Decorina is a novel VEGFR-2-binding antagonist for the human extravillous trophoblast." *Mol Endocrinol* 25(8): 1431-1443.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Lauder, R. M., T. N. Huckerby, et al. (1997). "The structure of the keratan sulphate chains attached to fibromodulina from human articular cartilage." *Glycoconj J* 14(5): 651-660.
- Lee, S., K. Bowrin, et al. (2009). "Extracellular matrix lumican deposited on the surface of neutrophils promotes migration by binding to beta2 integrin." *J Biol Chem* 284(35): 23662-23669.
- Levens, E., X. Luo, et al. (2005). "Fibromodulina is expressed in leiomyoma and myometrium and regulated by gonadotropin-releasing hormone analogue therapy and TGF-beta through Smad and MAPK-mediated signalling." *Mol Hum Reprod* 11(7): 489-494.
- Leygue, E., L. Snell, et al. (1998). "Expression of lumican in human breast carcinoma." *Cancer Res* 58(7): 1348-1352.
- Leygue, E., L. Snell, et al. (2000). "Lumican and decorina are differentially expressed in human breast carcinoma." *J Pathol* 192(3): 313-320.
- Luo, J., T. Dunn, et al. (2002). "Gene expression signature of benign prostatic hyperplasia revealed by cDNA microarray analysis." *Prostate* 51(3): 189-200.

- Matsuda, Y., T. Yamamoto, et al. (2008). "Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma." *Int J Oncol* 33(6): 1177-1185.
- Mayr, C., D. Bund, et al. (2005). "Fibromodulina as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes." *Blood* 105(4): 1566-1573.
- McEwan, P. A., P. G. Scott, et al. (2006). "Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans." *J Struct Biol* 155(2): 294-305.
- Melrose, J., E. S. Fuller, et al. (2008). "Fragmentation of decorina, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues." *Arthritis Res Ther* 10(4): R79.
- Merline, R., K. Moreth, et al. (2011). "Signaling by the matrix proteoglycan decorina controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21." *Sci Signal* 4(199): ra75.
- Merline, R., R. M. Schaefer, et al. (2009). "The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs)." *J Cell Commun Signal* 3(3-4): 323-335.
- Mikaelsson, E., A. H. Danesh-Manesh, et al. (2005). "Fibromodulina, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma." *Blood* 105(12): 4828-4835.
- Moreth, K., R. V. Iozzo, et al. (2012). "Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation." *Cell Cycle* 11(11): 2084-2091.
- Niedworok, C., K. Rock, et al. (2013). "Inhibitory role of the small leucine-rich proteoglycan biglycan in bladder cancer." *PLoS One* 8(11): e80084.

- R.V. Iozzo, S. G., A. Berendsen, M.F. Young (2011). Small leucine-rich proteoglycans. *Extracellular matrix: an overview*. R. P. M. (Ed.), Springer: 197-231.
- Reyes, I., R. Tiwari, et al. (2007). "DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines." *Biomedica* 27(2): 190-203.
- Reyes, N., I. Benedetti, et al. (2016). "The small leucine rich proteoglycan fibromodulina is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue." *Cancer Biomark.* 16(2016)191-202.
- Schaefer, L. and R. V. Iozzo (2008). "Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction." *J Biol Chem* 283(31): 21305-21309.
- Schaefer, L. and R. V. Iozzo (2012). "Small leucine-rich proteoglycans, at the crossroad of cancer growth and inflammation." *Curr Opin Genet Dev* 22(1): 56-57.
- Scholzen, T., M. Solursh, et al. (1994). "The murine decorina. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and tissue differentiation." *J Biol Chem* 269(45): 28270-28281.
- Schönherr, E., C. Sunderkotter, et al. (2005). "Decorina, a novel player in the insulin-like growth factor system." *J Biol Chem* 280(16): 15767-15772.
- Seo, N. S., A. M. Hocking, et al. (2005). "Decorina core protein secretion is regulated by N-linked oligosaccharide and glycosaminoglycan additions." *J Biol Chem* 280(52): 42774-42784.
- Sjöberg, A., P. Önerfjord, et al. (2005). "The extracellular matrix and inflammation: fibromodulina activates the classical pathway of complement by directly binding C1q." *J Biol Chem* 280(37): 32301-32308.

- Sztrolovics, R., X. N. Chen, et al. (1994). "Localization of the human fibromodulina gene (FMOD) to chromosome 1q32 and completion of the cDNA sequence." *Genomics* 23(3): 715-717.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* 140(6): 805-820.
- Velez-Delvalle, C., M. Marsch-Moreno, et al. (2008). "Fibromodulina gene is expressed in human epidermal keratinocytes in culture and in human epidermis in vivo." *Biochem Biophys Res Commun* 371(3): 420-424.
- Vij, N., L. Roberts, et al. (2004). "Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea." *Exp Eye Res* 78(5): 957-971.
- Wang, B., G. X. Li, et al. (2011). "Biglycan expression correlates with aggressiveness and poor prognosis of gastric cancer." *Exp Biol Med (Maywood)* 236(11): 1247-1253.
- Zeltz, C., S. Brezillon, et al. (2010). "Lumican inhibits cell migration through alpha2beta1 integrin." *Exp Cell Res* 316(17): 2922-2931.
- Zheng, Z., J. Jian, et al. (2012). "Reprogramming of human fibroblasts into multipotent cells with a single ECM proteoglycan, fibromodulina." *Biomaterials* 33(24): 5821-5831.
- Zheng, Z., K. S. Lee, et al. (2014). "Fibromodulina-deficiency alters temporospatial expression patterns of transforming growth factor-beta ligands and receptors during adult mouse skin wound healing." *PLoS One* 9(3): e90817.
- Zoeller, J. J., W. Pimpong, et al. (2009). "A central role for decorina during vertebrate convergent extension." *J Biol Chem* 284(17): 11728-11737.

Capítulo 3.

LA GLÁNDULA PROSTÁTICA

Enfermedades más comunes de la próstata

Niradiz Reyes, PhD y Marlon Charris, MSc

Resumen

La próstata es una glándula presente en los machos de todas las especies de mamíferos estudiadas. El crecimiento de esta glándula, el mantenimiento de su tamaño, y sus funciones secretoras, son regulados por los niveles hormonales séricos de testosterona. Durante el transcurso de la vida, esta glándula se desarrolla en respuesta a la regulación endocrina, pasando por una rápida fase de crecimiento en la pubertad, luego manteniendo estable su tamaño, y finalmente, en algunos casos, inicia un crecimiento anormal con la edad, que puede conducir al desarrollo de enfermedad, ya sea benigna o maligna (Partin 1997).

La hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP) son las enfermedades más comunes de la glándula prostática, las cuales representan una carga significativa para el paciente y para los sistemas de cuidado en salud de muchos países del mundo. Ambas son enfermedades crónicas con una larga evolución, caracterizadas por lesiones precursoras y de lenta progresión (Guess 2013). El CaP continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad relacionada con cáncer en hombres, siendo el segundo en frecuencia en este género a nivel mundial, y el primero en los países desarrollados (Jemal *et al.* 2011). En Colombia, según cifras del Instituto Nacional de Cancerología, se presentaron en promedio 8000 casos anuales en el periodo de 2002-2006 (Cancerología 2008) y ocupó el primer lugar entre los casos nuevos de cáncer en hombres durante el año 2010 (Cancerología 2010). Sin embargo, a pesar de ser un problema

importante de salud, son muchos los vacíos que existen en el conocimiento de su etiología y patogénesis.

Es preciso aclarar que cuando se habla de CaP, por analogía se refiere al adenocarcinoma prostático, originado en las células epiteliales de los conductos y acinos prostáticos, de los cuales, la mayoría de casos corresponden al adenocarcinoma de tipo acinar usual (Humphrey 2012) pues en la próstata además se presentan con una frecuencia muchísimo menor otros tipos de neoplasias originadas en los demás tejidos que la conforman, los cuales son denominados usualmente en forma específica.

Aspectos generales

La próstata es una glándula presente en los machos de todas las especies de mamíferos estudiadas. El crecimiento de esta glándula, el mantenimiento de su tamaño, y sus funciones secretoras, son regulados por los niveles hormonales séricos de testosterona. Dentro de la próstata, la testosterona es convertida por la acción enzimática de la 5α -reductasa a dihidrotestosterona (DHT), la cual es un andrógeno más activo. Además de los andrógenos, otras hormonas tales como estrógenos y esteroides adrenales producen diferentes efectos sobre la próstata dependiendo del estado del desarrollo (vida fetal, periodo neonatal, pubertad, adultez, y envejecimiento). Durante la vida fetal, la próstata es altamente sensible a estrógenos, mostrado por el hecho que a los cinco meses de gestación, se desarrolla una extensa metaplasia de células escamosas que alcanza un máximo a las 36 semanas. Después del nacimiento, este crecimiento celular escamoso disminuye y a los tres meses de edad la próstata ha reducido su tamaño. Durante el transcurso de la vida, la próstata se desarrolla en respuesta a la regulación endocrina, pasando por una rápida fase de crecimiento en la pubertad, luego manteniendo estable su tamaño, y finalmente, en algunos casos, inicia un crecimiento anormal con la edad, que puede conducir al desarrollo de enfermedad, ya sea benigna o maligna (Partin 1997).

La hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata son las enfermedades más comunes de la glándula prostática, las cuales representan una carga significativa para el paciente y para los

sistemas de cuidado en salud de muchos países del mundo. Ambas son enfermedades crónicas con una larga evolución, caracterizadas por lesiones precursoras y de lenta progresión (Guess 2013).

Mientras la patogénesis de ambas enfermedades no es del todo bien comprendida, se cree que ambas son de etiología multifactorial, siendo los principales factores de riesgo la inflamación crónica, disrupción metabólica, influencias hormonales y variantes genéticas. A pesar de esas características comunes, la HPB y el CaP exhiben importantes diferencias histológicas.

La HPB es definida como un agrandamiento benigno de la glándula prostática (Roehrborn 2008). Aunque la manifestación clínica de la enfermedad consiste en un perfil de síntomas caracterizado como síntomas del tracto urinario bajo (*Lower urinary tract symptoms, LUTS*), la enfermedad incluye una proliferación benigna tanto de los compartimentos epiteliales como estromales (Roehrborn 2008). La prevalencia se incrementa desde un 25% en hombres entre los 40 a 49 años de edad, a más del 80% en hombres entre 70 a 79 años de edad (Berry *et al.* 1984). Estudios recientes han asociado alteraciones complejas implicadas en procesos inflamatorios crónicos y de reparación de heridas con la etiología de la enfermedad (Schauer *et al.* 2011).

Por su parte, con 13 millones de casos nuevos alrededor del mundo cada año, el CaP es un serio problema de salud pública. Este cáncer es común en hombres mayores de 50 años y es la sexta causa de muerte relacionada con cáncer en hombres de todo el mundo. Así como otros cánceres, el de próstata es multifactorial, con factores de riesgo no modificables como la herencia, la etnicidad y la localización geográfica, pero con factores de riesgo modificables como la dieta (Adjakly *et al.* 2015). Aunque los estudios moleculares, experimentales, y datos clínicos sugieren que la inflamación puede contribuir o promover la carcinogénesis de la próstata, el enlace etiológico no ha sido establecido plenamente (Thapa *et al.* 2015).

Los factores de riesgo más consistentemente involucrados en su desarrollo son: edad avanzada, historia familiar y grupo étnico, específicamente raza negra (Gurel *et al.* 2008; Jemal *et al.* 2011).

Algunos factores ambientales también han sido incluidos entre los que se destacan la influencia de la dieta y la obesidad (Benedettini *et al.* 2008). Dentro de estos, el factor de riesgo aislado más significativo es la edad avanzada, cerca de dos tercios de los casos de CaP son diagnosticados en mayores de 60 años y es muy raro antes de los 40 años (Society 2012). Sin embargo, aunque su ocurrencia está estrechamente relacionada con el aumento de la edad, se ha postulado que no es simplemente producto del envejecimiento, sino probablemente el resultado de la interacción de muchos factores ambientales, fisiológicos, moleculares y hereditarios cuyos efectos son exacerbados por dicho envejecimiento (De Marzo *et al.* 2007; De Marzo *et al.* 2007; Shen *et al.* 2010).

La influencia de los factores ambientales ha sido demostrada por diversos estudios que muestran tasas de incidencia y mortalidad por CaP mucho más bajas en poblaciones del este y sudeste asiático comparadas con las de países occidentales (Sfanos *et al.* 2012), aumento rápido en las cifras de incidencia en estas poblaciones tras su migración a Occidente (Shen *et al.* 2010), además de un mayor riesgo de CaP en estas poblaciones en las generaciones posteriores a dicha migración (Nelson *et al.* 2003).

Uno de los factores ambientales más estudiados recientemente es el desarrollo de inflamación crónica en la próstata, asociada a procesos infecciosos, factores hormonales y dietéticos (Sfanos *et al.* 2012), estos últimos en particular han sido documentados como factores de riesgo importantes entre los cuales algunos componentes de los alimentos pueden tener un efecto promotor, mientras que otros con un potente efecto antioxidante, como la vitamina E, el licopeno y otros carotenoides, parecen tener un efecto protector, lo que apoya el papel importante que el estrés oxidativo asociado a la inflamación podría jugar dentro de la carcinogénesis prostática (Nelson *et al.* 2003; Gurel *et al.* 2008) (De Marzo *et al.* 2003).

Hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata

La hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata son dos condiciones clínicas consideradas enfermedades crónicas con

aparición temprana y de progresión lenta (Sciarra *et al.* 2007). La HPB es una de las enfermedades proliferativas más frecuente que afectan a varones de edad madura y avanzada (Kirby 2000; De Nunzio *et al.* 2011), mientras que el CaP es uno de los cánceres más comunes en varones adultos y representa la sexta causa de muerte por cáncer en hombres alrededor del mundo (Campos Rodriguez *et al.* 2002; Ferlay *et al.* 2014).

La HPB y el CaP no poseen unas relaciones genéticas y moleculares claras lo que por tanto se considera que ambas condiciones presentan vías patogénicas diferentes (Alcaraz *et al.* 2009). Durante el desarrollo de CaP e HPB, ocurren interacciones entre el epitelio y el estroma, los cuales resultan en la formación de un estroma reactivo (Tuxhorn *et al.* 2002). Las dos enfermedades se originan en diferentes áreas de la próstata: la HPB se forma en la zona transicional y en la zona central de la glándula, mientras que el CaP proviene de la zona periférica. El HPB comienza como una hiperplasia micronodular simple, que evoluciona a un nódulo macroscópico que posteriormente se traslada a una entidad clínica. Similarmente, el CaP se desarrolla a través de modificaciones precancerosas tempranas y tardías (Sciarra *et al.* 2007). Solo en el 20% de los casos ambas patologías coexisten en la misma zona (McNeal 1988).

Las dos enfermedades presentan rasgos como crecimiento dependiente de hormonas y respuesta a terapia antiandrógenos. Además, factores de riesgo tales como inflamación prostática y disrupción metabólica juegan papeles claves en el desarrollo de ambas enfermedades. Apesar de estas características en común, HPB y CaP exhiben importantes diferencias en términos de histología y localización. Aunque estudios epidemiológicos a gran escala han mostrado que hombres con HPB tienen un riesgo incrementado de CaP, permanece poco claro si la asociación refleja una relación causal, mostrando factores de riesgo o mecanismos fisiopatológicos, o detección de sesgo en el análisis estadístico (Hsing *et al.* 2007).

La HPB es una enfermedad que afecta a más del 50% de hombres de más de 60 años de edad, y es causa de millones de dólares en gastos de cuidado de la salud para el tratamiento de síntomas del

tracto urinario inferior y la obstrucción urinaria (Bechis *et al.* 2014). Esta condición es definida como una proliferación del músculo liso y de células epiteliales en la zona de transición de la próstata, causando su agrandamiento (Priest *et al.* 2012).

La glándula prostática humana está compuesta de epitelio secretor organizado en acinos glandulares dentro de un estroma fibromuscular compuesto principalmente de músculo liso. El compartimento estromal también contiene fibroblastos, vasos, nervios y componentes del sistema inmune. De una forma interactiva, cada uno de esos componentes estromales y epiteliales probablemente se encuentran involucrados en la génesis y evolución de la HPB. Los mecanismos específicos que regulan el alargamiento, así como los cambios patológicos que conducen al fenotipo HPB, son esencialmente desconocidos. Sin embargo, es claro que ocurren varias alteraciones complejas que involucran procesos inflamatorios crónicos y de reparación de heridas (McNeal 1990; Price *et al.* 1990).

Hasta el presente, no hay consenso de la etiología de HPB. Varios factores han sido propuestos como la alteración de la función urodinámica debido al incremento de la angulación uretral prostática (Cho *et al.* 2008). Algunos han identificado eventos moleculares potenciales como el elevado estrés oxidativo (Gradini *et al.* 1999; Aryal *et al.* 2007), el daño isquémico debido a disfunción vascular (Berger *et al.* 2005), la pérdida de reguladores negativos que controlan el ciclo celular (Cordon-Cardo *et al.* 1998) o cambios en los niveles hormonales relacionados con la edad (Hulka *et al.* 1987; Chatterjee 2003). Sin embargo, la mayoría de las causas etiológicas señaladas apuntan hacia una inflamación prostática como iniciador de HPB (Lee *et al.* 2004; Untergasser *et al.* 2005; Kramer *et al.* 2006; Kramer *et al.* 2007; Nickel 2008; Sciarra *et al.* 2008).

La HPB puede ser considerada como un fenotipo reactivo en respuesta a una alteración fundamental en la homeostasis de tejido asociada con el envejecimiento, niveles alterados de hormonas e inflamación crónica. Diversos estudios han mostrado expresión alterada de citocinas y quimiocinas con focos de HPB y respuesta estromal local en HPB (Penna *et al.* 2007; Macoska *et al.* 2008; Schauer *et al.* 2008).

Dentro de la próstata normal de un adulto joven, en el área periglandular se encuentra una baja cantidad de linfocitos T, macrófagos, y linfocitos B (Theyer *et al.* 1992; Dozmorov *et al.* 2009). También existen agregados linfoides en el estroma fibromuscular, compuesto por folículos de linfocitos B, rodeados de linfocitos T (Steiner *et al.* 2003). Los productos de secreción prostática normal son inmunogénicos debido a su actividad proteolítica.

La inflamación prostática crónica, es una condición común en la próstata humana, la cual puede ser iniciada por varios estímulos conocidos y desconocidos que determinaría el estatus proinflamatorio en el microambiente prostático. La inflamación de la próstata puede ser originada por la expresión de una condición localizada (por ejemplo enfermedades de transmisión sexual) o como parte de enfermedad sistémica o crónica, tal como la obesidad y síndrome metabólico.

La destrucción del epitelio intraglandular (disparado por agentes infecciosos) incrementa la exposición de tejido conectivo a esos productos proteolíticos (Steiner *et al.* 2003; Kramer *et al.* 2007). Entre los agentes microbianos más frecuentes que infectan a la próstata tenemos *Neisseria gonorrhoea*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, bacterias Gram negativas (especialmente *E. coli*), y varios virus, incluyendo el del papiloma humano, el del herpes simple, y citomegalovirus. Adicionalmente, el sistema inmune prostático es expuesto tanto a antígenos como a autoantígenos infecciosos.

Las células de la reacción inflamatoria liberan ciertos tipos de mediadores, incluyendo quimiocinas (CXCL5 y CXCL8) y factores de crecimiento, los cuales modulan la respuesta inmune sistémica o localizada; por lo tanto, esos mediadores inflamatorios también actúan como estimuladores antigénicos en las células de la próstata, influenciando el crecimiento y/o apoptosis de las células epiteliales y del estroma (Palapattu *et al.* 2005; De Nunzio *et al.* 2013). La inflamación crónica causa hipoxia local, lo que conduce a la liberación de ROS y óxido nítrico (NO). El estrés oxidativo dispara los niveles de ácido araquidónico, que por medio de las ciclo-oxigenasas son convertidas a prostaglandinas, los cuales juegan un papel importante

en la regulación de la proliferación celular (Ficarra *et al.* 2013). Adicionalmente, la hipoxia dispara la liberación de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que estimula la neovascularización y la diferenciación de fibroblastos, los cuales son factores promotores de la HPB o del CaP (Sciarra *et al.* 2007).

El cáncer de próstata

El CaP es el cáncer no cutáneo más frecuente en varones en Estados Unidos y es el segundo cáncer más frecuente después del cáncer de pulmón en hombres alrededor del mundo. En términos de mortalidad, este cáncer ocupa el segundo lugar en los Estados Unidos y es la sexta causa de muerte por cáncer a nivel mundial. Cada año mueren aproximadamente 30.000 hombres en los Estados Unidos y más de 250.000 alrededor del mundo (Cáncer 2008; Howlader *et al.* 2013). Datos recientes de supervivencia relativos en los Estados Unidos indican que aproximadamente 1 en 11 (9%) pacientes con CaP fallecerán de la enfermedad en un periodo de 15 años después del diagnóstico (Siegel *et al.* 2012).

En las últimas tres décadas ha habido un aumento en la incidencia de CaP. Hasta cierto punto, esto puede ser explicado por la introducción de la medida de los niveles del antígeno prostático específico (PSA), por el desarrollo de imágenes diagnósticas y por la mejora en sistemas de información demográfica. El aumento de la esperanza de vida y la tendencia a aplicar bajos cortes para PSA en suero aumentará aún más el número de hombres diagnosticados con CaP (Max *et al.* 2002).

Hay tres factores de riesgo no modificables para el cáncer de próstata: edad, raza e historia familiar. Además, existen factores modificables o de comportamiento que han sido asociados con el riesgo de padecer de este cáncer. Aunque no haya sido establecido firmemente, factores como la actividad física y el consumo frecuente de tomates y otros vegetales han sido establecidos como protectores. Por el contrario, la ingesta de productos lácteos y carnes rojas puede incrementar el riesgo a contraer este cáncer (Leitzmann *et al.* 2012).

El CaP es una patología fuertemente asociada a la edad, lo que hace de esta el principal factor de riesgo descrito, ya que el 75% de los diagnósticos son realizados en hombres mayores de 65 años (Dunn *et al.* 2011). Por esto, se ha planteado que cambios inherentes o adquiridos en el metabolismo celular y que ocurren con el transcurrir del tiempo puedan influir en el desarrollo de esta neoplasia (Khandrika *et al.* 2009). Otros factores se han visto relacionados con el desarrollo del CaP, tales como la dieta, la historia familiar, raza, carcinógenos ambientales, entre otros (Reyes *et al.* 2002; Khandrika *et al.* 2009; Dunn *et al.* 2011).

Una de las hipótesis en cuanto a la carcinogénesis de esta enfermedad plantea que es iniciada y mantenida por células madres cancerígenas de la próstata, las cuales presentan una serie de cambios genéticos y epigenéticos que le permiten sobrevivir de manera ventajosa permitiendo la formación del cáncer (Maitland *et al.* 2008). Dentro de los aspectos que han sido asociados a la carcinogénesis se encuentran las hormonas, el que la próstata sea una glándula andrógena dependiente y que el CaP presente cierta dependencia androgénica es la base para asumir un rol causal de las hormonas androgénicas en su carcinogénesis (Bosland *et al.* 2011). La mayoría de información relacionada y que soporta tal papel de las hormonas androgénicas proviene de modelos murinos, pero la evidencia en humanos es poca (Bosland *et al.* 2011).

Por otro lado, existe evidencia que implica a los estrógenos en el rol que media la testosterona en la carcinogénesis de la próstata. Mediante modelos murinos, ya sea con sobreexpresión o con “*knockout*” para la enzima aromatasa, se determinó que en estos animales no se desarrollaba el CaP. Los ratones “*knockout*” no producen estrógeno y presentan altos niveles circulantes de testosterona y sus próstatas se agrandan pero no desarrollan cáncer, mientras que en los ratones que sobreexpresan aromatasa, la producción de estrógenos está elevada y los niveles de testosterona están disminuidos notablemente, pero no desarrollan lesiones prostáticas neoplásicas o preneoplásicas. Por su parte, cuando ratas NBL reciben tratamiento combinado de estradiol más testosterona, la incidencia de CaP sube de 40% (solo con andrógeno) a entre 90 y 100%. Estas observaciones sugieren

firmemente que ambas hormonas son necesarias para el desarrollo de CaP (Bosland *et al.* 2011).

Más allá del papel permisivo de las hormonas sexuales, la fisiopatología de HPB y de CaP permanecen básicamente desconocidos. Aunque la edad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de ambas condiciones, varios factores juegan un papel importante (ejemplos: mediadores inflamatorios, hormonas, factores dietarios, genes inflamatorios, y estrés oxidativo), por lo tanto no existe un consenso de la causa primaria.

Metástasis del cáncer de próstata

La principal causa de mortalidad en pacientes con cáncer es el desarrollo de metástasis, siendo este el proceso que le permite a la célula cancerígena diseminarse en el cuerpo, estableciendo nuevas colonias en órganos distantes al sitio de origen (Bacac *et al.* 2008). Ciertos tumores sólidos presentan patrones de diseminación preferencial a algunos órganos, dicho patrón ha sido llamado metástasis órgano-específica, dentro de estos, se destacan: el cáncer de mama, el de próstata, colorectal, y de pulmón (Chiang *et al.* 2008). En el caso particular del CaP, el principal sitio de metástasis es el sistema óseo. El desarrollo de lesiones metastásicas en este sitio altera la homeostasis del hueso conllevando en este caso a la formación de lesiones osteoblásticas (Chiang *et al.* 2008). Por lo general, las metástasis óseas suelen ser refractarias al tratamiento, por ende las opciones terapéuticas se limitan a disminuir la carga de la morbilidad y paliar las complicaciones (Vicent *et al.* 2006).

A pesar del progreso en el diagnóstico y tratamiento, la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata siguen siendo las dos patologías prostáticas de mayor prevalencia en el adulto mayor. Aunque los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades son complejos, y sus patogénesis no son bien comprendidas, se ha reportado que ambas son de etiología multifactorial, con incidencia y prevalencia influenciadas por la edad y el balance de hormonas, además, han sido asociadas con inflamación prostática crónica (Elkahwaji 2013).

Expresión de proteoglicanos en tejido prostático normal y cáncer de próstata

Los proteoglicanos se encuentran expresados sobre la superficie celular y la matriz extracelular de todas las células y tejidos de mamíferos, cumpliendo funciones importantes en las interacciones celulares y entre las células y la matriz extracelular, así como también en vías de señalización celular (Iozzo *et al.* 2015). Cada vez se le reconocen más funciones a este grupo de compuestos biológicos, los cuales a través de sus interacciones con proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, y quimiocinas, tienen la capacidad de afectar la señalización celular, motilidad, adhesión, proliferación celular, y apoptosis (Edwards 2012).

Actualmente es poca la información publicada sobre la expresión de diferentes proteoglicanos y sus implicaciones en el cáncer de próstata. Estudios recientes muestran que el tejido prostático humano normal expresa un conjunto específico de proteoglicanos, los cuales se localizan tanto en las células epiteliales como en el estroma, reportándose que las células epiteliales expresan principalmente sindecan-1 y glipican-1, mientras que el estroma tisular expresa principalmente versican, decorina, y lumican (Suhovskih *et al.* 2013). Por su parte, en el tejido con hiperplasia prostática benigna, el patrón de expresión de proteoglicanos fue muy similar al del tejido prostático normal. En contraste, al comparar el tejido prostático normal con el canceroso, se encontró que en el microambiente tumoral ocurren cambios progresivos en la expresión de proteoglicanos, tanto en las células epiteliales como en el estroma (Suhovskih *et al.* 2013), aunque aún se desconocen las implicaciones patológicas que esto acarrea (Edwards 2012; Suhovskih *et al.* 2013). Específicamente se reportó expresión disminuida de los proteoglicanos decorina y lumican en el estroma, expresión aumentada y su relocalización en el estroma tumoral de sindecan-1 y glipican-1, así como la aparición de proteoglicanos adicionales como agregan y NG2. Cabe resaltar que los investigadores encontraron patrones altamente individuales para la expresión de proteoglicanos en los tumores prostáticos, los cuales presentaban varias combinaciones de proteoglicanos expresados así como variaciones en sus niveles de expresión (Suhovskih *et al.* 2013).

Los proteoglicanos que más se han estudiado en el cáncer de próstata son versican -un hialectano que regula la adhesión celular y la migración- y los proteoglicanos pequeños ricos en leucina -decorina, biglicano y lumican- los cuales son importantes en cascadas de señalización celular y organización tisular. A algunos de los proteoglicanos se les atribuyen acciones inhibitoras en el cáncer de próstata, como decorina (Hu *et al.* 2009) y lumican (Coulson-Thomas *et al.* 2013), mientras que a otros como perlecan se les considera promotores tumorales (Datta *et al.* 2006). La elevada expresión de perlecan en líneas celulares de cáncer de próstata y tejido prostático correlaciona con una rápida proliferación celular y un alto grado Gleason, respectivamente; en tanto que la inhibición de su expresión en líneas celulares disminuye la proliferación celular (Datta *et al.* 2006). Otros como sindecan-1 y biglicano que tienen actividad inhibitora de la proliferación celular, pudieran facilitar la progresión en el cáncer de próstata temprano (Edwards 2012; Shimada *et al.* 2013).

En los tumores prostáticos los cambios en la expresión de proteoglicanos son complejos, observándose una tendencia hacia la disminución de los niveles de decorina y lumican, un aumento general de la expresión de sindecano-1 y glipicano-1 en el estroma del tumor junto con su desaparición en las células epiteliales tumorales, y expresión de agrecan y NG2 en algunos tumores prostáticos (Suhovskih *et al.* 2013). Un aspecto importante es que los cambios celulares y la actividad enzimática en el desarrollo tumoral pueden alterar la composición y estructura de los proteoglicanos, causando modificaciones en sus funciones, lo cual puede ser aprovechado por las células cancerosas para su propia supervivencia, proliferación y diseminación.

Comentarios finales

La hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata conforman dos condiciones clínicas altamente prevalentes en la población masculina humana, que se caracterizan por ser crónicas con aparición temprana y de progresión lenta (Sciarra *et al.* 2007). La carcinogénesis de la próstata es un proceso complejo en el que ocurre el cambio de glándulas benignas hasta carcinoma invasor, pasando por lesiones premalignas. Actualmente, la neoplasia intraepitelial prostática (PIN)

es considerada la lesión precursora de CaP de acuerdo con todas las evidencias disponibles (Bostwick *et al.* 2012; Klink *et al.* 2012). Hasta la fecha no existe claridad sobre si el epitelio prostático normal directamente origina PIN o hay otra lesión intermedia involucrada, o si PIN da origen directamente a CaP o igualmente hay otro intermediario. También existe la posibilidad que tanto PIN como CaP podrían originarse de otras lesiones, entre las que se ha propuesto la atrofia focal como potencial lesión precursora (Montironi *et al.* 2007) (De Marzo *et al.* 2001). La atrofia prostática focal usualmente asociada con inflamación, se ha denominado atrofia inflamatoria proliferativa (PIA). En el siguiente capítulo se revisarán los conceptos sobre esta lesión y su posible participación como lesión precursora de PIN y CaP.

Referencias

- Adjakly, M., M. Ngollo, A. Dagdemir, et al. (2015). Prostate cancer: The main risk and protective factors—Epigenetic modifications. *Annales d'endocrinologie*, Elsevier.
- Alcaraz, A., P. Hammerer, A. Tubaro, et al. (2009). "Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review." *European urology* 55(4): 864-875.
- Aryal, M., A. Pandeya, B. Das, et al. (2007). "Oxidative stress in patients with benign prostate hyperplasia." *Journal of Nepal Medical Association* 46(167).
- Bacac, M. and I. Stamenkovic (2008). "Metastatic cancer cell." *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.* 3: 221-247.
- Bechis, S. K., A. G. Otsetov, R. Ge, et al. (2014). "Personalized medicine for the management of benign prostatic hyperplasia." *The Journal of urology* 192(1): 16-23.
- Benedettini, E., P. Nguyen and M. Loda (2008). "The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations." *Diagnostic histopathology* 14(5): 195-201.

- Berger, A. P., M. Deibl, N. Leonhartsberger, et al. (2005). "Vascular damage as a risk factor for benign prostatic hyperplasia and erectile dysfunction." *BJU international* 96(7): 1073-1078.
- Berry, S. J., D. S. Coffey, P. C. Walsh, et al. (1984). "The development of human benign prostatic hyperplasia with age." *The Journal of urology* 132(3): 474-479.
- Bosland, M. C. and A. M. Mahmoud (2011). "Hormones and prostate carcinogenesis: Androgens and estrogens." *Journal of carcinogenesis* 10(1): 33.
- Bostwick, D. G. and L. Cheng (2012). "Precursors of prostate cancer." *Histopathology* 60(1): 4-27.
- Campos Rodríguez, F., F. Muñoz Lucena, S. Umbria Domínguez, et al. (2002). "[Trends in the incidence of tuberculosis in the area of Seville-South (Spain) during the 1990s]." *Arch Bronconeumol* 38(5): 214-220.
- Cancerología, I. N. d. (2008). *El cáncer en cifras, Incidencia estimada según departamentos de Colombia, 2002-2006*. Bogotá, Instituto Nacional de Cancerología.
- Cancerología, I. N. d. (2010). *El cáncer en cifras, Distribución de casos nuevos de cáncer por sexo, según localización primaria, INC, Colombia, 2010*. Bogotá, Instituto Nacional de Cancerología.
- Cordon-Cardo, C., A. Koff, M. Drobnjak, et al. (1998). "Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma." *Journal of the National Cancer Institute* 90(17): 1284-1291.
- Coulson-Thomas, V. J., Y. M. Coulson-Thomas, T. F. Gesteira, et al. (2013). "Lumican expression, localization and antitumor activity in prostate cancer." *Exp Cell Res* 319(7): 967-981.

- Chatterjee, B. (2003). "The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer." *Molecular and cellular biochemistry* 253(1-2): 89-101.
- Chiang, A. C. and J. Massagué (2008). "Molecular basis of metastasis." *New England Journal of Medicine* 359(26): 2814-2823.
- Cho, K. S., J. Kim, Y. D. Choi, et al. (2008). "The overlooked cause of benign prostatic hyperplasia: prostatic urethral angulation." *Medical hypotheses* 70(3): 532-535.
- Datta, M. W., A. M. Hernandez, M. J. Schlicht, et al. (2006). "Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth via the Sonic Hedgehog pathway." *Mol Cancer* 5: 9.
- Datta, S., M. Pierce and M. W. Datta (2006). "Perlecan signaling: helping hedgehog stimulate prostate cancer growth." *Int J Biochem Cell Biol* 38(11): 1855-1861.
- De Marzo, A. M., A. K. Meeker, S. Zha, et al. (2003). "Human prostate cancer precursors and pathobiology." *Urology* 62(5 Suppl 1): 55-62.
- De Marzo, A. M., Y. Nakai and W. G. Nelson (2007). "Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis." *Urologic oncology* 25(5): 398-400.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, S. Sutcliffe, et al. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." *Nature reviews. Cancer* 7(4): 256-269.
- De Marzo, A. M., M. J. Putzi and W. G. Nelson (2001). "New concepts in the pathology of prostatic epithelial carcinogenesis." *Urology* 57(4 Suppl 1): 103-114.
- De Nunzio, C., S. Albisinni, M. Gacci, et al. (2013). "The role of inflammation in the progression of benign prostatic hyperplasia." *Current Bladder Dysfunction Reports* 8(2): 142-149.

- De Nunzio, C., G. Kramer, M. Marberger, et al. (2011). "The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation." *European urology* 60(1): 106-117.
- Dozmorov, M. G., R. E. Hurst, D. J. Culkin, et al. (2009). "Unique patterns of molecular profiling between human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells." *Prostate* 69(10): 1077-1090.
- Dunn, M. W. and M. W. Kazer (2011). *Prostate cancer overview. Seminars in oncology nursing*, Elsevier.
- Edwards, I. J. (2012). "Proteoglycans in prostate cancer." *Nat Rev Urol* 9(4): 196-206.
- Elkahwaji, J. E. (2013). "The role of inflammatory mediators in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer." *Research and reports in urology* 5: 1.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, M. Ervik, et al. (2014). "GLOBOCAN 2012 v1. 0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013." Visit: <http://globocan.iarc.fr>.
- Ficarra, V., S. Sekulovic, F. Zattoni, et al. (2013). "Why and how to evaluate chronic prostatic inflammation." *European Urology Supplements* 12(5): 110-115.
- Gradini, R., M. Realacci, A. Ginepri, et al. (1999). "Nitric oxide synthases in normal and benign hyperplastic human prostate: immunohistochemistry and molecular biology." *The Journal of pathology* 189(2): 224-229.
- Guess, H. A. (2013). "Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." *Epidemiologic reviews* 23(1): 152-158.
- Gurel, B., T. Iwata, C. M. Koh, et al. (2008). "Molecular alterations in prostate cancer as diagnostic, prognostic, and therapeutic targets." *Advances in anatomic pathology* 15(6): 319-331.

- Howlader, N., A. Noone, M. Krapcho, et al. (2013). SEER cancer statistics review, 1975–2010. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2013.[based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER website, April 3].
- Hsing, A. W., L. C. Sakoda and S. C. Chua (2007). "Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer." *The American journal of clinical nutrition* 86(3): 843S-857S.
- Hu, Y., H. Sun, R. T. Owens, et al. (2009). "Decorina suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways." *Neoplasia* 11(10): 1042-1053.
- Hulka, B. S., H. Checkoway, J. E. Hammond, et al. (1987). "Serum hormone levels among patients with prostatic carcinoma or benign prostatic hyperplasia and clinic controls." *The Prostate* 11(2): 171-182.
- Humphrey, P. A. (2012). "Histological variants of prostatic carcinoma and their significance." *Histopathology* 60(1): 59-74.
- Iozzo, R. V. and L. Schaefer (2015). "Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans." *Matrix Biol* 42: 11-55.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, et al. (2011). "Global cancer statistics." *CA: a cancer journal for clinicians* 61(2): 69-90.
- Khandrika, L., B. Kumar, S. Koul, et al. (2009). "Oxidative stress in prostate cancer." *Cancer letters* 282(2): 125-136.
- Kirby, R. S. (2000). "The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade?" *Urology* 56(5): 3-6.
- Klink, J. C., R. Miocinovic, C. Magi Galluzzi, et al. (2012). "High-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Korean journal of urology* 53(5): 297-303.

- Kramer, G. and M. Marberger (2006). "Could inflammation be a key component in the progression of benign prostatic hyperplasia?" *Current opinion in urology* 16(1): 25-29.
- Kramer, G., D. Mitteregger and M. Marberger (2007). "Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease?" *European urology* 51(5): 1202-1216.
- Lee, K. L. and D. M. Peehl (2004). "Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia." *The Journal of urology* 172(5): 1784-1791.
- Leitzmann, M. F. and S. Rohrmann (2012). "Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates." *Clinical epidemiology* 4: 1.
- Macoska, J. A., L. A. Begley, R. L. Dunn, et al. (2008). "Pilot and feasibility study of serum chemokines as markers to distinguish prostatic disease in men with low total serum PSA." *The Prostate* 68(4): 442-452.
- Maitland, N. J. and A. T. Collins (2008). "Prostate cancer stem cells: a new target for therapy." *Journal of clinical oncology* 26(17): 2862-2870.
- Max, W., D. P. Rice, H. Y. Sung, et al. (2002). "The economic burden of prostate cancer, California, 1998." *Cancer* 94(11): 2906-2913.
- McNeal, J. (1990). "Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology." *The Urologic clinics of North America* 17(3): 477-486.
- McNeal, J. E. (1988). "Normal histology of the prostate." *The American journal of surgical pathology* 12(8): 619-633.
- Montironi, R., R. Mazzucchelli, A. López-Beltrán, et al. (2007). "Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate." *Nature clinical practice. Urology* 4(6): 321-332.

- Nelson, W. G., A. M. De Marzo and W. B. Isaacs (2003). "Prostate cancer." *The New England journal of medicine* 349(4): 366-381.
- Nickel, J. C. (2008). "Inflammation and benign prostatic hyperplasia." *Urologic Clinics of North America* 35(1): 109-115.
- Palapattu, G. S., S. Sutcliffe, P. J. Bastian, et al. (2005). "Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights." *Carcinogenesis* 26(7): 1170-1181.
- Partin, A. W., and Coffey, D.S., (1997). *The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles.* . Philadelphia, Saunders, W.B. .
- Penna, G., N. Mondaini, S. Amuchastegui, et al. (2007). "Seminal plasma cytokines and chemokines in prostate inflammation: interleukin 8 as a predictive biomarker in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and benign prostatic hyperplasia." *European urology* 51(2): 524-533.
- Price, H., J. E. McNeal and T. A. Stamey (1990). "Evolving patterns of tissue composition in benign prostatic hyperplasia as a function of specimen size." *Human pathology* 21(6): 578-585.
- Priest, R., M. Garzotto and J. Kaufman (2012). "Benign prostatic hyperplasia: a brief overview of pathogenesis, diagnosis, and therapy." *Techniques in vascular and interventional radiology* 15(4): 261-264.
- Reyes, N., M. Iatropoulos, A. Mittelman, et al. (2002). "Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the ACI rat prostate." *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2: S37-42.
- Roehrborn, C. (2008). "Pathology of benign prostatic hyperplasia." *International journal of impotence research* 20: S11-S18.
- Sciarra, A., F. Di Silverio, S. Salciccia, et al. (2007). "Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link?" *European urology* 52(4): 964-972.

- Sciarra, A., G. Mariotti, S. Saliccia, et al. (2008). "Prostate growth and inflammation." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 108(3): 254-260.
- Schauer, I. G., S. J. Ressler, J. A. Tuxhorn, et al. (2008). "Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia." *Urology* 72(1): 205-213.
- Schauer, I. G. and D. R. Rowley (2011). "The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia." *Differentiation* 82(4): 200-210.
- Sfanos, K. S. and A. M. De Marzo (2012). "Prostate cancer and inflammation: the evidence." *Histopathology* 60(1): 199-215.
- Shen, M. M. and C. Abate-Shen (2010). "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." *Genes & development* 24(18): 1967-2000.
- Shimada, K., S. Anai, T. Fujii, et al. (2013). "Syndecan-1 (CD138) contributes to prostate cancer progression by stabilizing tumour-initiating cells." *J Pathol* 231(4): 495-504.
- Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2012). "Cancer statistics, 2012." *CA: a cancer journal for clinicians* 62(1): 10-29.
- Society, A. C. (2012). *Prostate Cancer, the key statistics about prostate cancer*, American Cancer Society.
- Steiner, G. E., U. Stix, A. Handisurya, et al. (2003). "Cytokine expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue." *Laboratory investigation* 83(8): 1131-1146.
- Suhovskih, A. V., L. A. Mostovich, I. S. Kunin, et al. (2013). "Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer." *ISRN Oncol* 2013: 680136.

- Thapa, D. and R. Ghosh (2015). "Chronic inflammatory mediators enhance prostate cancer development and progression." *Biochemical pharmacology*.
- Theyer, G., G. Kramer, I. Assmann, et al. (1992). "Phenotypic characterization of infiltrating leukocytes in benign prostatic hyperplasia." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 66(1): 96-107.
- Tuxhorn, J. A., G. E. Ayala, M. J. Smith, et al. (2002). "Reactive stroma in human prostate cancer induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling." *Clinical Cancer Research* 8(9): 2912-2923.
- Untergasser, G., S. Madersbacher and P. Berger (2005). "Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling." *Experimental gerontology* 40(3): 121-128.
- Vicent, S., D. Luis-Ravelo, I. Antón, et al. (2006). *Las metástasis óseas del cáncer. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, SciELO Espana.*

Capítulo 4.

ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA: Lesión precursora potencial del adenocarcinoma prostático

Inés Benedetti, MD y Niradiz Reyes, PhD

Resumen

La Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) es considerada actualmente como la única lesión precursora de cáncer de próstata (CaP), sin embargo, hace varios años se ha sospechado que las lesiones atróficas podrían también estar involucradas en su carcinogénesis. En 1999 De Marzo propuso el término Atrofia Inflamatoria Proliferativa (PIA) para denominar una lesión localizada en la zona periférica de la glándula, con células epiteliales altamente proliferativas, frecuentemente acompañada de inflamación, que ha sido postulada como posible lesión precursora de PIN y CaP. Diversos grupos han observado PIA en asociación topográfica y transición morfológica con PIN y CaP; además, se han reportado alteraciones genéticas, somáticas y moleculares en PIA similares a las observadas en PIN y CaP por lo que ha sido postulada como posible lesión precursora de ambas. Sin embargo, este planteamiento es controversial, pues varios estudios no han encontrado pruebas suficientes para sustentar esta postulación. Las alteraciones moleculares descritas en PIA apoyan el origen de estas lesiones en un contexto de estrés oxidativo, posiblemente originado por las células inflamatorias circundantes, que induce en algunas células epiteliales la expresión de genes de defensa contra el daño oxidativo del genoma, mientras que aquellas que fallan en expresar estos genes se tornan vulnerables a oxidantes y electrófilos, lo que las hace propensas a desarrollar alteraciones genéticas que favorecerían su transformación en células de PIN y CaP. Esto, sumado a la asociación morfológica PIA-PIN/CaP, apuntaría hacia una relación

causal entre estas lesiones, existiendo evidencias epidemiológicas, patológicas y moleculares que indican que el estrés oxidativo asociado a inflamación crónica es quizá el evento de iniciación más relevante de la carcinogénesis prostática.

Aspectos generales

Aunque la ocurrencia de CaP está estrechamente relacionada con la edad, su inicio y progresión están influenciados por la interacción de múltiples factores ambientales, fisiológicos, moleculares y hereditarios cuyos efectos son exacerbados por el envejecimiento (Reyes, Reyes et al. 2005; De Marzo, Nakai et al. 2007; De Marzo, Platz et al. 2007; Shen and Abate-Shen 2010). Entre los factores ambientales involucrados, uno de los más estudiados es el desarrollo de inflamación crónica en la próstata, asociada a procesos infecciosos, factores hormonales y dietéticos (Reyes, Iatropoulos et al. 2002; Reyes, Reyes et al. 2005; Sfanos and De Marzo 2012). Estos últimos en particular han sido documentados como factores de riesgo importantes entre los cuales algunos alimentos pueden tener un efecto promotor, mientras que otros con un potente efecto antioxidante parecen tener un efecto protector, lo que apoya el papel importante que el estrés oxidativo asociado a la inflamación podría jugar dentro de la carcinogénesis prostática (De Marzo, Meeker et al. 2003; Nelson, De Marzo et al. 2003; Reyes, Reyes et al. 2005; Gurel, Iwata et al. 2008; De Nunzio, Kramer et al. 2011).

La carcinogénesis es un proceso complejo que involucra muchos cambios, y en el caso particular del CaP comprende el cambio de glándulas benignas hasta carcinoma invasor, pasando por lesiones premalignas (Vis and Van Der Kwast 2001). Actualmente, la Neoplasia Intraepitelial Prostática es considerada la lesión precursora del CaP (Bostwick and Cheng 2012; Klink, Miocinovic et al. 2012), fundamentada en varios aspectos: mayor frecuencia de PIN en próstatas con CaP, asociación topográfica con CaP, transición frecuente entre PIN y focos de CaP, semejanza citológica, alteraciones moleculares compartidas e índices similares de proliferación y apoptosis entre PIN y CaP (Bostwick, Liu et al. 2004). Estos cambios en el genotipo y el fenotipo en las células de PIN son intermedios entre las células epiteliales

benignas y las del CaP e indican deterioro en la diferenciación y en el control regulador celular (Bostwick and Cheng 2012). Clínicamente su importancia radica en que un diagnóstico de PIN se asocia con un riesgo aumentado de CaP en una biopsia posterior, riesgo que actualmente se describe en un 24% y sigue siendo mayor que el observado en los casos con biopsias iniciales con diagnóstico benigno (Klink, Miocinovic et al. 2012).

Se ha documentado que la mayoría de los casos de cáncer prostático se desarrollan en la zona periférica de la glándula, con frecuencia se asocian con PIN, y además los diferentes patrones de atrofia prostática son mucho más prevalentes en esta zona (De Marzo, Platz et al. 2007). Al respecto, se han descrito dos tipos de atrofia prostática: atrofia difusa y atrofia focal. La primera es de tipo hormonal, producto de la disminución o bloqueo total de los niveles circulantes de andrógenos, compromete toda la glándula en forma uniforme y presenta características histológicas específicas como son una capa de células basales prominente subyacente a una capa de células lumbales cuboidales (De Marzo, Platz et al. 2006). En contraste, la atrofia focal no está relacionada con descenso en el nivel de andrógenos, se presenta como focos aislados de glándulas atróficas rodeadas por glándulas de apariencia habitual, con frecuencia se localiza en la zona periférica y rara vez en la zona central de la próstata (De Marzo, Marchi et al. 1999; Putzi and De Marzo 2000; De Marzo, Platz et al. 2006; Billis 2010). Es reconocida microscópicamente a menor aumento como focos de glándulas de aspecto hiper Cromático, el epitelio está compuesto de dos capas de células: basales y lumbales, aunque puede ser difícil discriminar las células basales en los cortes teñidos con H&E, por lo que demostrar su presencia puede requerir de inmunotinción con citoqueratinas (CK) específicas de células basales (Amín, Tamboli et al. 1999). También se ha descrito que en la mayoría de los casos, la atrofia prostática focal contiene infiltrado inflamatorio crónico, lo que llevó a McNeal a denominarla “atrofia postinflamatoria” y a proponer que probablemente represente un remanente de procesos inflamatorios crónicos severos (McNeal 1997; De Marzo, Platz et al. 2006).

Hasta la fecha no existe claridad sobre si el epitelio prostático normal directamente origina PIN o hay otra lesión intermedia involucrada,

o si PIN da origen directamente a un CaP o igualmente hay otro intermediario. También existe la posibilidad que tanto PIN como CaP podrían originarse de otras lesiones, entre las que se ha propuesto la atrofia focal como potencial lesión precursora (De Marzo, Putzi et al. 2001; Montironi, Mazzucchelli et al. 2007). Los resultados de estudios que han evaluado estas lesiones desde el punto de vista morfológico, inmunohistoquímico, genético y molecular han aportado algunas evidencias preliminares en favor de su relación causal con el CaP, especialmente debido a que pueden ser altamente proliferativas comparadas con el epitelio normal (De Marzo, Marchi et al. 1999; Putzi and De Marzo 2000; Shah, Mucci et al. 2001; Wang, Bergh et al. 2009), mientras que otros las consideran procesos benignos que no conducen a CaP (Billis 1998; Anton, Kattan et al. 1999; Billis and Magna 2003), lo que indica que existe todavía mucha controversia en este aspecto.

Histopatología del adenocarcinoma prostático

La próstata es un órgano compuesto de tres zonas glandulares y una región no glandular el estroma fibromuscular anterior, estrechamente unidas dentro de una cápsula fibromuscular; la zona glandular está formada por la zona central, la zona de transición, y la zona periférica que corresponde aproximadamente al 65% del tejido glandular (Fine and Reuter 2012). Estas zonas tienen diferente histología y origen embriológico y dan lugar a distintas entidades patológicas (Laczko, Hudson et al. 2005) .

Histológicamente es una glándula túbulo-alveolar compleja, compuesta por un parénquima epitelial incluido dentro de un estroma de tejido conectivo. El parénquima está organizado en glándulas formadas por conductos que se ramifican desde la uretra y terminan en acinos secretores (Humphrey 2007). El epitelio luminal está separado del estroma por una capa de células basales estrechamente unidas por uniones intercelulares y moléculas de adhesión, y por una membrana basal compuesta por colágeno, laminina y otras moléculas que rodean y unen las células basales de manera que estas y la membrana basal regulan la comunicación y el intercambio de moléculas entre el epitelio y el estroma subyacente (Man, Zhao et al. 2006).

En el epitelio de los acinos prostáticos, dispuesto en las dos capas descritas, se distinguen tres tipos celulares diferenciados, que varían en su localización, morfología y características fenotípicas: células basales, lumbinales secretoras y neuroendocrinas. Las células lumbinales se considera que se derivan de la diferenciación de las células basales, formando una capa continua de células columnares polarizadas; son las células maduras que llevan a cabo las funciones de la próstata al ser estimuladas por andrógenos, producen secreción proteica, expresan altos niveles de PSA, receptor de andrógenos, CK8 y CK18. Las células basales se localizan debajo de las lumbinales, expresan p63, Bcl-2, receptor de factor de crecimiento epidérmico, citoqueratinas de alto peso molecular: CK5 y CK14, con bajos niveles de expresión de receptor de andrógenos, CK8 y CK18, en ellas se encuentra cerca del 70% de la actividad de proliferación celular del epitelio prostático (van Leenders, Gage et al. 2003; Shen and Abate-Shen 2010). Las células neuroendocrinas son escasas, expresan marcadores endocrinos como sinaptofisina y cromogranina A, y no expresan receptor de andrógenos (Shen and Abate-Shen 2010) (McNeal 1997).

El adenocarcinoma prostático se origina de este epitelio. Las células del CaP y de PIN, a pesar de poseer características fenotípicas de células lumbinales secretoras, también presentan el patrón de proliferación de las células basales: capacidad de replicación del ADN, inmortalidad y expresión de telomerasa, mostrando por tanto que estas características parecidas a células madre (stem cell-like) se han trasladado del compartimento basal del epitelio al compartimento luminal, fenómeno que ha sido denominado: "Infidelidad topográfica de proliferación" (TIP) (De Marzo, Nelson et al. 1998). Además se ha encontrado en las células tumorales una subpoblación que presenta un patrón intermedio. Estos hechos junto con los patrones de expresión de citoqueratinas han llevado a proponer que el tipo celular blanco de la transformación neoplásica es un tipo celular intermedio o transitoriamente proliferante, con características morfológicas y de expresión de genes tanto de células basales como de células lumbinales secretoras (Verhagen, Ramaekers et al. 1992; De Marzo, Marchi et al. 1999; De Marzo, Putzi et al. 2001).

El diagnóstico del CaP se establece con el estudio histopatológico como "*Gold standard*" (Berney and Cheng 2012). Los criterios de

diagnósticos mayores incluyen: patrón de crecimiento infiltrativo con glándulas pequeñas malignas extendiéndose entre otras grandes y complejas, ausencia de células basales y atipia nuclear con nucléolos agrandados. Mientras que los criterios menores incluyen: mucina intraluminal basófila, secreción amorfa eosinófila, figuras de mitosis, cristaloides intraluminales, áreas de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) adyacente, citoplasma anfofilico e hiper cromasia nuclear (Humphrey 2007; Epstein 2012). Característicamente en el CaP las células basales están ausentes, lo que se demuestra por ausencia de tinción con IHQ para marcadores de células basales: p63 y 34BE12, mientras que las células tumorales presentan tinción positiva para el marcador AMACR (Humphrey 2007).

Igualmente, el estudio histopatológico es el “*Gold standard*” para evaluar la agresividad del CaP a través del sistema de graduación de Gleason utilizado universalmente como un componente fundamental del informe de patología de estos casos (Berney and Cheng 2012). Este sistema de evaluación se basa en el patrón arquitectural histológico de las células tumorales del CaP, en cortes teñidos con H&E. Se usan cinco patrones básicos (numerados de 1 a 5) para generar una suma histológica, obtenida de los dos patrones dominantes, que puede oscilar entre 2 y 10 (Humphrey 2004). Numerosos estudios han confirmado su valor, ha sido clasificado como factor pronóstico de categoría 1 por el Colegio Americano de Patólogos, y además ha sido correlacionado con falla bioquímica, desarrollo de metástasis, supervivencia postratamiento y supervivencia en general (Delahunt, Miller et al. 2012).

Por otro lado, la mayoría de los CaP se desarrollan en la zona periférica de la glándula, un número mucho menor en la zona de transición y casi ninguno en la zona central. Los casos de adenocarcinoma en la zona periférica con frecuencia se asocian con una lesión precursora: Neoplasia Intraepitelial Prostática, además los diferentes patrones de atrofia prostática son mucho más prevalentes en la zona periférica. La razón de la predilección zonal del CaP sigue siendo un asunto no resuelto, junto con la alta selectividad de esta neoplasia por este órgano comparado con los otros órganos del sistema genitourinario masculino (De Marzo, Platz et al. 2007).

Lesiones precursoras del adenocarcinoma prostático

La carcinogénesis es un proceso complejo que involucra muchos cambios, en el caso del CaP describe el cambio de glándulas benignas hasta carcinoma invasor, pasando por lesiones premalignas. Para que una lesión de la próstata sea considerada como tal debe cumplir una serie de condiciones: existir una relación epidemiológica, la lesión precursora debe estar presente en edades más tempranas que el cáncer y con características morfológicas similares, debe localizarse cercana a su presunto equivalente maligno y la prueba definitiva es la evidencia clínica de progresión a enfermedad invasiva (Vis and Van Der Kwast 2001).

Actualmente, la Neoplasia Intraepitelial Prostática es considerada la lesión precursora de CaP de acuerdo con todas las evidencias disponibles (Bostwick and Cheng 2012; Klink, Miocinovic et al. 2012) esta postulación se fundamenta en varios aspectos: mayor frecuencia de PIN en próstatas con carcinoma, asociación topográfica con carcinoma (Eminaga, Hinkelammert et al. 2013), transición frecuente entre PIN y focos de CaP, semejanza citológica y alteraciones moleculares compartidas entre PIN y CaP (Bostwick, Liu et al. 2004). PIN representa el estadio final preinvasivo de una cadena de proliferaciones celulares a nivel del epitelio de los acinos y conductos prostáticos. Tradicionalmente fue clasificada como PIN de bajo y alto grado, sin embargo, recientemente en razón de la poca reproducibilidad y limitada utilidad clínica del PIN de bajo grado, el término PIN se ha homologado a la lesión de alto grado (Bostwick and Cheng 2012).

Se caracteriza por proliferación de las células epiteliales de los conductos y acinos, disponiéndose en diversos patrones histológicos de crecimiento producto de hiperplasia de las células lumbales, con cambios citológicos como aumento del tamaño nuclear y nucleolar que imitan los del CaP (Bostwick, Liu et al. 2004). Es fenotípicamente similar al CaP, se encuentra en zonas contiguas con él y ambos tienen índices similares de proliferación y apoptosis. Estos cambios en el genotipo y el fenotipo en las células de PIN son intermedios entre las células epiteliales benignas y las del CaP e indican deterioro en la diferenciación y en el control regulador celular (Bostwick and Cheng

2012). Clínicamente su importancia radica en que un diagnóstico de PIN se asocia con riesgo aumentado de CaP en una biopsia posterior, riesgo que anteriormente era considerado muy alto y actualmente se describe en un 24%, pero a pesar de su disminución, sigue siendo mayor que el observado en los casos con biopsias iniciales con diagnóstico benigno (Klink, Miocinovic et al. 2012).

Atrofia inflamatoria prostática

Desde mediados del siglo pasado se planteó como hipótesis que la atrofia de la glándula prostática y la subsecuente proliferación de su epitelio representaba la lesión inicial del CaP (Franks 1954; Liavag 1968; Shah, Mucci et al. 2001), sin embargo, esta relación causal aún sigue siendo controvertida (Bostwick and Cheng 2012). Aunque la atrofia en general es considerada un fenómeno regresivo, la atrofia focal prostática, a diferencia de la atrofia difusa asociada con actividad hormonal, presenta una baja tasa apoptótica similar a la de las glándulas no atróficas y un alto índice de proliferación celular, evidenciado inicialmente por Ruska y col. (Ruska, Sauvageot et al. 1998) por aumento de tinción inmunohistoquímica con el marcador de proliferación celular Ki-67 en las células epiteliales, y confirmado en estudios posteriores como los realizados por De Marzo y col. (De Marzo, Marchi et al. 1999; Shah, Mucci et al. 2001), donde se plantea que no parece ser el resultado de un proceso activo de involución, sino una lesión regenerativa en respuesta a eventos conducentes a pérdida celular.

Como resultado de la caracterización inmunohistoquímica y morfológica de la atrofia focal prostática, De Marzo y col. proponen el término "Atrofia Inflamatoria Proliferativa" (PIA), en razón de su frecuente asociación con inflamación y su alto índice proliferativo, describiéndola como focos de atrofia focal cuya morfología es de atrofia simple o hiperplasia post-atrónica, con glándulas revestidas por doble capa celular, asociadas con células inflamatorias en el componente epitelial y estromal en los que, además del aumento de tinción para marcadores de proliferación celular, se observó aumento de tinción para GSTP1 y Bcl2, y disminución de tinción para el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27^{Kip1}, planteando que esta lesión se produce dentro del

ambiente de estrés oxidativo generado por la inflamación (De Marzo, Marchi et al. 1999).

La observación que muchas de las células proliferativas parecen tener un fenotipo de células secretoras o luminales inmaduras, similar al de la células de PIN y CaP, sumada al cambio en la fidelidad topográfica de proliferación observada en PIA, a la alta prevalencia de PIA, PIN y CaP en la zona periférica de la próstata y a la observación de focos de PIA fusionados con PIN dentro de la misma glándula, llevó a De Marzo y col. a postular que PIA podría representar una lesión precursora de PIN y por tanto de CaP (Figura 9) (De Marzo, Marchi et al. 1999; Nelson, De Marzo et al. 2003).

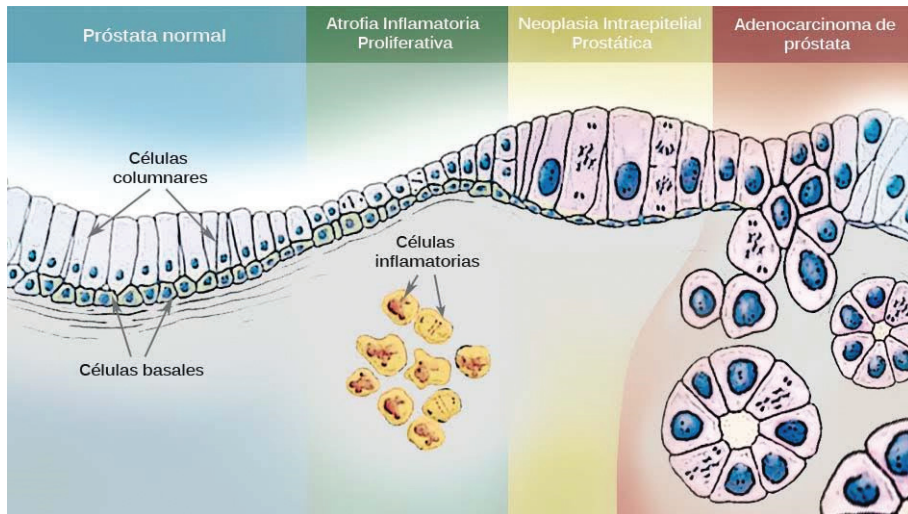


Figura 9. PIA como precursor de PIN y CaP.

Tomado de: I. Benedetti, and N. Reyes (2014). "Proliferative Inflammatory Atrophy: Potential Precursor Lesion for Prostatic Adenocarcinoma." *Rev.cienc.biomed.* 5(1): 88-99.

Caracterización morfológica de PIA

En contraste con el tejido prostático normal, en PIA el epitelio no forma proyecciones papilares abundantes y las células luminales tienen escaso citoplasma y núcleo central pequeño, redondeado a ovoide con nucléolo no evidente o levemente agrandado; además el

estroma periglandular usualmente presenta un infiltrado inflamatorio mononuclear compuesto por linfocitos, macrófagos y plasmocitos que también puede encontrarse dentro del epitelio y las luces glandulares (van Leenders, Gage et al. 2003).

Además de estos cambios morfológicos, a diferencia de lo que ocurre en el epitelio normal, y al igual de lo que ocurre en PIN, muchas de las células proliferantes en PIA se encuentran en el compartimento luminal, lo que corresponde a un cambio en la fidelidad topográfica de proliferación (De Marzo, Nelson et al. 1998), otro de los hallazgos inicialmente considerados como evidencia para plantear su posible participación como lesión precursora de PIN, junto con el parecido fenotípico encontrado entre las células de PIA y las de PIN y CaP (De Marzo, Marchi et al. 1999) (Figuras 2 y 3).

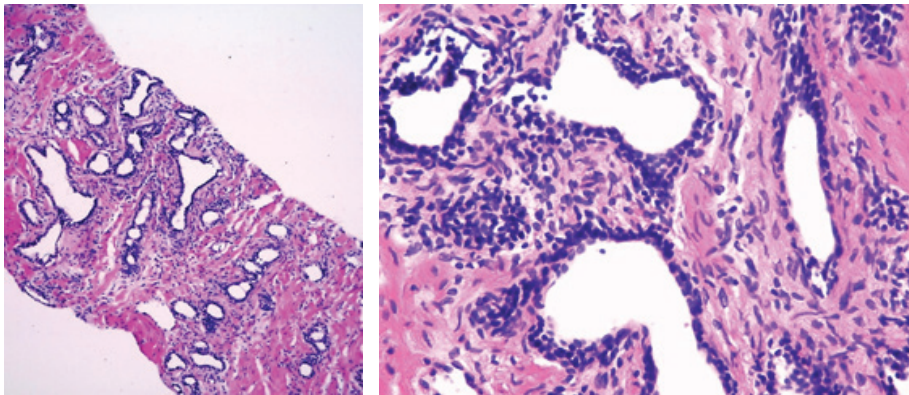


Figura 10. Morfología de la PIA.

(A): Atrofia simple, acinos con apariencia basofílica (HE 100X). (B) Dos capas de células luminales cuboidales (HE 400X).

Dicho parecido fenotípico se sustenta en el hallazgo en las células atróficas fusionadas con focos de PIN y con CaP del fenotipo característico del epitelio en las lesiones de PIA, descrito como intermedio entre células basales y células luminales, expresión de CK5/CK8, c-MET, GSTP1, COX-2, C/EBP β , siendo en este caso CK5 y GSTP1 los marcadores más intensamente expresados (van Leenders, Gage et al. 2003; Wang, Bergh et al. 2009). En las células de PIA se ha

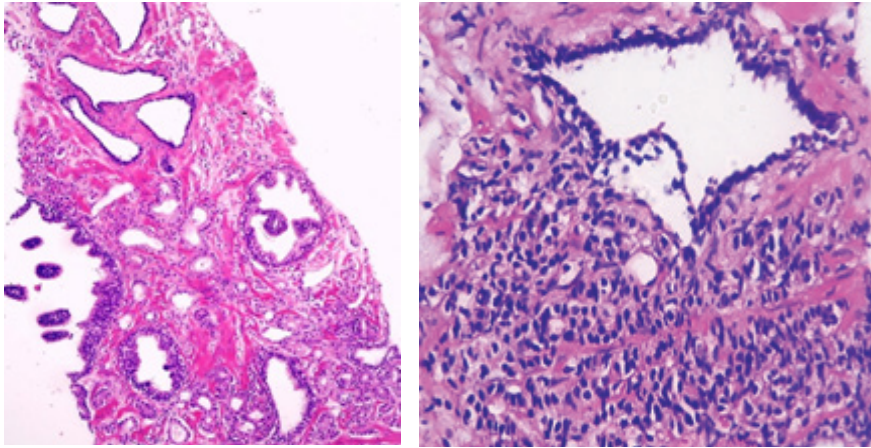


Figura 11. PIA en transición con PIN y adenocarcinoma. (A) Menor aumento de foco de PIA en vecindad de glándulas con PIN de alto grado y adenocarcinoma. Flechas: PIA. Cabezas de flechas: PIN (H&E, 100X). (B) Mediano aumento de glándula de PIA en vecindad de adenocarcinoma. Flechas: PIA. Cabezas de flechas: adenocarcinoma (H&E, 400X).

documentado además una actividad proliferativa aumentada revelada por aumento del índice de tinción con el marcador de proliferación celular Ki-67 tanto en las células basales como en las luminales, lo cual puede corresponder a una respuesta a la liberación local de factores de crecimiento desencadenada por daño y pérdida de células epiteliales (Ruska, Sauvageot et al. 1998; De Marzo, Marchi et al. 1999; Wang, Bergh et al. 2009), y subregulación del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina $p27^{kip1}$ en las células luminales comparadas con las del epitelio no atrófico (De Marzo, Marchi et al. 1999).

También existe evidencia que las células luminales atróficas tienen un fenotipo intermedio, muchas expresan Bcl-2 y casi todas expresan altos niveles de CK8/CK18; muchas también expresan niveles de bajo a moderado de receptor de andrógenos y PSA lo que indica una diferenciación parcial hacia células luminales secretoras. Así mismo, muchas de estas células también expresan marcadores de células basales definidos por positividad a CK5 o anticuerpo 34BE12 que reconoce CK1, CK5, CK10 y CK14. Sin embargo, la ausencia de expresión de CK14 y p63 en las células luminales de PIA demuestra que no son simplemente células basales (van Leenders, Gage et al. 2003).

La evidencia inicial de la posible participación de PIA como lesión precursora de CaP se fundamentó, entre otros hallazgos, en la alta prevalencia de ambas lesiones en la zona periférica y baja prevalencia en la zona central de la próstata, además de la asociación topográfica, descrita inicialmente al estudiar lesiones de PIA escogidas aleatoriamente, en el 34.5% de las cuales se observó fusión con zonas de PIN en la misma glándula (De Marzo, Marchi et al. 1999). Es así como se ha descrito que comúnmente la atrofia se observa fusionada con PIN sugiriendo que algunas lesiones de PIN se originan directamente de la atrofia, y con menos frecuencia se ha observado fusionada con pequeños focos de CaP (Liavag 1968; Nakayama, Bennett et al. 2003).

Varios estudios morfológicos realizados en especímenes de prostatectomía de pacientes con CaP, han encontrado evidencia de una transición directa entre PIA y PIN de alto grado, y entre PIA y CaP, en ambos casos adyacentes a zonas de inflamación crónica. En uno de ellos se reportó que el 17% (Wang, Bergh et al. 2009), y en otro el 42.5% (Putzi and De Marzo 2000) de los focos de PIN encontrados en especímenes de prostatectomía presentan una transición con PIA. Por ejemplo Wang y col. reportaron transición entre PIA y CaP en el 28% de los casos (Wang, Bergh et al. 2009), mientras que Putzi y col. no encontraron fusión con PIA en ninguno de los focos de carcinoma, pero el 30.4% de ellos se localizó en zonas adyacentes a PIA (Putzi and De Marzo 2000). Por su parte Nakayama y col. describieron un 25% de lesiones PIA directamente fusionadas con PIN y dos pequeños focos de CaP fusionados con PIA entre sus casos, y plantean que dichas evidencias morfológicas son indicadoras de que estas células atróficas pueden desarrollar cambios estructurales y atípicos nucleares que preceden en forma directa el desarrollo de PIN o CaP (Nakayama, Bennett et al. 2003).

En otro estudio, Shah y col. identificaron hiperplasia postatrófica (un subtipo de PIA) en el 78% de los especímenes de prostatectomía estudiados, adyacente a carcinoma en 28% de los focos encontrados. Este tipo de atrofia se asocia frecuentemente con focos de CaP y también puede encontrarse en forma aislada, además tiene un índice de proliferación mayor que el de la atrofia simple, lo cual es acorde con su aspecto histológico diferente (Shah, Mucci et al. 2001).

Putzi y col. también describieron que el porcentaje de focos de CaP adyacentes o cercanos a PIA encontrados en su estudio, es mayor al porcentaje de focos de carcinoma adyacente o cercano a PIN (Putzi and De Marzo 2000). Hallazgo similar al descrito por Tomas y col. quienes compararon la frecuencia de PIA entre especímenes de prostatectomía con CaP y con HPB, encontrando que PIA fue significativamente mas frecuente en los casos de CaP mientras que los casos de HPB se asociaron con tipos no inflamatorios de atrofia, denominados atrofia proliferativa (PA) (Tomas, Kruslin et al. 2007).

El hecho de encontrar estas lesiones frecuentemente fusionadas favorece la hipótesis de una lesión precursora, sin embargo, no permite excluir que sean eventos aleatorios dada la alta frecuencia observada de PIA (Putzi and De Marzo 2000). PIA ha sido encontrada con mayor frecuencia en próstatas con CaP que en próstatas con HPB, sin embargo debe tenerse en cuenta que los cortes de tejido con HPB suelen corresponder a la zona transicional de la próstata, por lo que esto podría ser el reflejo de diferente prevalencia de atrofia en diversas zonas de la glándula. Además PIA se encuentra con frecuencia en la zona periférica de la próstata con y sin CaP, sin relación con la edad, el *Puntaje* de Gleason y el TNM (Tomas, Kruslin et al. 2007). De otra parte, se ha reportado mayor número de focos atróficos en pacientes de edad avanzada (Billis 1998; Di Silverio, Gentile et al. 2003).

En varios estudios se ha descrito la atrofia simple como el tipo más común de PIA (De Marzo, Marchi et al. 1999; Postma, Schroder et al. 2005; Tomas, Kruslin et al. 2007), mientras que la hiperplasia post-atrónica ha sido observada con igual frecuencia en casos con CaP y sin CaP (Tomas, Kruslin et al. 2007), y en algunos casos este tipo de atrofia se describe como una lesión común, presente en cerca de un tercio de los especímenes de prostatectomía, pero sin asociación con CaP (Anton, Kattan et al. 1999). Todos estos hallazgos documentan la frecuente transición morfológica entre PIA y PIN, y presencia de focos de CaP en la vecindad de PIA, y, aunque no son una prueba definitiva que PIA da origen directamente a PIN o CaP, si son consistentes con esta hipótesis en la que varios grupos de investigadores trabajan para contribuir a su demostración.

Alteraciones cromosómicas y moleculares en PIA

Varios estudios han demostrado que las células de PIA pueden contener aberraciones cromosómicas similares a las descritas en las células de PIN y CaP, algunas de las cuales son marcadores característicos de estas últimas (Perletti, Montanari et al. 2010). Por ejemplo, en estudios realizados a través de FISH, se encontró que las células de PIA presentan aumento de señales centroméricas del cromosoma 8 (Shah, Mucci et al. 2001; Yildiz-Sezer, Verdorfer et al. 2006), por pérdida de 8p (Macoska, Trybus et al. 2000; Yildiz-Sezer, Verdorfer et al. 2006) y ganancia de 8q24 (Yildiz-Sezer, Verdorfer et al. 2006; Perletti, Montanari et al. 2010). Sin embargo, no se han encontrado evidencias para alteraciones clonales indicadoras de ganancia de región centromérica del cromosoma 8, pérdida de 8p o ganancia de 8q24 en PIA, por lo que estas mutaciones y alteraciones cromosómicas no clonales pueden indicar daño genómico y/o el inicio de inestabilidad genómica (De Marzo, Platz et al. 2007).

Del mismo modo, un estudio en el que se compararon los cambios en el cromosoma 8 entre tejido sano y tumoral en especímenes de prostatectomía a través de FISH, reportó que el grupo de tejidos clasificados como “normales” (benignos, hiperplásico y atrófico) no fue genéticamente idéntico, encontrando que en el tejido atrófico el porcentaje de núcleos con pérdida de 8p concurrente con ganancia de 8c fue significativamente más alto; esta alteración fue encontrada en un porcentaje aún mayor en los tejidos con CaP, los cuales además presentaron altos porcentajes de núcleos con pérdida de 8p con diferencias significativas con el grupo de tejidos “normales” (Macoska, Trybus et al. 2000).

Adicionalmente, en el estudio realizado por Shah y col. un tipo de PIA, la hiperplasia postatrófica, tuvo un incremento significativo en el porcentaje de núcleos con más de tres señales de fluorescencia con FISH para 8c en comparación con atrofia simple y PIN, superado solo por el CaP. También se describe aumento en el porcentaje de núcleos con trisomía para 8c en PIA, PIN de alto grado y CaP en comparación con el tejido prostático benigno, aunque esta última diferencia no fue significativa lo que se atribuyó al bajo número de casos estudiados. Estos hallazgos

demuestran una fuerte asociación entre hiperplasia postatrófica y CaP (Shah, Mucci et al. 2001; De Marzo, Meeker et al. 2003).

Las aberraciones genéticas específicas en el cromosoma 8 se han descrito en el CaP avanzado, como la pérdida de 8p concurrente con ganancia de centrómero 8 o de secuencias 8q, dichas aberraciones también han sido asociadas al pronóstico del CaP; es así como la pérdida de 8p se encuentra con mayor frecuencia en CaP mal diferenciados, la ganancia de 8c se ha descrito como una alteración molecular común en PIA y PIN (Bethel, Faith et al. 2006), asociada a mal pronóstico en el CaP (Shah, Mucci et al. 2001). La pérdida de 8p22 parece ser un evento temprano y la ganancia de 8q24 un evento tardío en la carcinogénesis prostática (Yildiz-Sezer, Verdorfer et al. 2006).

En otros estudios como el de Yildiz-Sezer y col. PIA y PIN presentaron altos porcentajes de pérdida de 8p22, significativamente más altos que el epitelio normal (Yildiz-Sezer, Verdorfer et al. 2006). En esta región se encuentra el gen candidato a supresor de tumor de CaP, LPL, que participa en el metabolismo de las lipoproteínas y al que algunos han relacionado con el papel de la dieta rica en grasas en la carcinogénesis prostática; además se encuentra el gen de susceptibilidad para CaP, MSR1, encontrado mutado en familias con CaP hereditario (Yildiz-Sezer, Verdorfer et al. 2006). Por su parte, la ganancia de 8q24 conlleva amplificación del oncogen *c-MYC*. Este gen codifica la proteína *c-MYC*, un factor de transcripción que participa en la inmortalización de las células epiteliales humanas, y en una serie de procesos como progresión del ciclo celular, metabolismo, biogénesis de ribosomas, síntesis proteica y función mitocondrial (Gurel, Iwata et al. 2008). *c-MYC* se ha encontrado sobreexpresado en varios tipos de tumor, en cultivos de células de epitelio prostático ha llevado a inmortalización celular, y se cree que podría brindar una “ventaja proliferativa” a las células que les permite crecer en condiciones desfavorables (Yildiz-Sezer, Verdorfer et al. 2006). Su activación es una alteración somática temprana en la carcinogénesis prostática y un gran número de estudios ha mostrado su sobreexpresión en la mayoría de casos de CaP a nivel del ARNm (80% a 90%) (Koh, Bieberich et al. 2010) mientras que en otro se ha descrito tinción nuclear fuerte en la mayoría de CaP y PIN (Gurel, Iwata et al. 2008; Gurel, Iwata et al. 2008).

Al comparar la frecuencia de estas mutaciones entre tejido prostático normal, PIA, PIN y CaP, tanto en PIA como en PIN se ha detectado un porcentaje alto de pérdida de 8p22, el cual es mucho más alto en PIN y CaP, con diferencias significativas con el epitelio normal. En cambio la ganancia de 8q24 se presentó con menor frecuencia que la pérdida de 8p22, sin diferencias significativas entre PIA y PIN, lo que lleva a asumir que esta amplificación de c-MYC se inicia desde el epitelio atrófico y confirma la presencia de aberraciones cromosómicas en PIA similares a las detectadas en PIN y CaP. Además, demuestra inestabilidad genética en las células de PIA, que puede aumentar la susceptibilidad de las glándulas atróficas en regeneración y con proliferación celular a ser dañadas y desarrollar transformación neoplásica (Yildiz-Sezer, Verdorfer et al. 2006) .

Adicionalmente, otro gen sobreexpresado en PIA es el supresor de tumor p53, localizado en el brazo corto del cromosoma 17, consta de 11 exones y 10 intrones y codifica una proteína de 393 aminoácidos. Este gen se ha observado sobreexpresado en PIA en comparación con el epitelio normal (Tsujimoto, Takayama et al. 2002; Wang, Bergh et al. 2009), siendo este hallazgo infrecuente en CaP y casi nunca descrito en PIN, por lo que se considera que dicha sobreexpresión en PIA puede ser desencadenada por el daño oxidativo asociado a la inflamación (Perletti, Montanari et al. 2010). También se han encontrado mutaciones de p53 asociadas a la hiperplasia postatrófica que pueden conducir a transformación neoplásica por alteración de su actividad supresora de tumor. En un estudio realizado en Japón, Tsujimoto y col. encontraron mutaciones en el gen p53 en la hiperplasia postatrófica, identificadas en las células microdisecadas, con una frecuencia del 5.3% de los casos, similar a la descrita en PIN, sin encontrarse en el epitelio de apariencia normal (Tsujimoto, Takayama et al. 2002; De Marzo, Meeker et al. 2003; Wang, Bergh et al. 2009).

Diversos estudios han demostrado que muchas vías moleculares involucradas en el CaP también se encuentran alteradas en PIA. Por ejemplo, se ha detectado que los tres genes supresores de tumores NKX3.1, CDKN1B y PTEN, que normalmente se encuentran altamente expresados en tejido prostático sano y disminuidos o ausentes en PIN y CaP, se encuentran subregulados en las lesiones de atrofia focal y

se ha observado que su sobreexpresión forzada causa disminución del crecimiento en líneas celulares de CaP (De Marzo, Marchi et al. 1999; van Leenders, Gage et al. 2003; Bethel, Faith et al. 2006). El gen homeobox NKX3.1 es un gen específico de la próstata regulado por andrógenos, encontrado inicialmente en epitelio prostático benigno y neoplásico, involucrado en el desarrollo prostático (Gurel, Iwata et al. 2008; Kristiansen 2012). Este gen también participa en la disminución del daño oxidativo del genoma por su capacidad de activar la expresión de genes involucrados en la eliminación de los radicales libres (Gurel, Iwata et al. 2008). NKX3.1 funciona como supresor de tumor por su efecto inhibitorio en la proliferación celular, se localiza en el cromosoma 8p21.2, dentro de una región con LOH en un alto porcentaje de PIN y CaP que puede llegar hasta el 85% de los casos, además con evidencia de regulación epigenética, tal vez mediada por metilación del promotor (Bethel, Faith et al. 2006; Shen and Abate-Shen 2010). La descripción de que se encuentra disminuido en casi todos los CaP y ausente en tumores avanzados ha llevado a plantear que la expresión de NKX3.1 es seleccionada para la reducción pero no para la pérdida durante la progresión del CaP (Gurel, Iwata et al. 2008; Shen and Abate-Shen 2010). La expresión de NKX3.1 se ha encontrado muy disminuida en PIN y PIA comparados con el epitelio prostático normal (Gurel, Iwata et al. 2008). En el estudio realizado por Bethel y col. se observó una marcada disminución, tanto en intensidad como en área, de tinción inmunohistoquímica para NKX3.1 en PIA, esta expresión disminuida puede contribuir al daño oxidativo observado en estas lesiones, por control de la expresión de enzimas antioxidantes que llevan a aumento del daño oxidativo del ADN (Bethel, Faith et al. 2006).

Por su parte el gen CDKN1B codifica p27^{Kip1}, un inhibidor de los complejos de quinasas dependientes de ciclina cuya activación resulta en un bloqueo de la progresión del ciclo celular, del que se han descrito niveles generalmente disminuidos en PIN y CaP en comparación con el epitelio prostático normal. El análisis de su expresión disminuida junto con la caracterización de citoqueratinas en un subgrupo de células del epitelio prostático llevó a postular la existencia de las llamadas células intermedias en este epitelio, que presentan un fenotipo intermedio entre células madre en la capa basal y células maduras en la capa luminal, cuya expresión disminuida de p27^{Kip1} se correlaciona con su

capacidad potencialmente proliferativa en presencia de un estímulo apropiado, y está implicada en la fase inicial del desarrollo de CaP (De Marzo, Meeker et al. 1998).

Por su parte, el gen PTEN está localizado en la región cromosómica 10q23, que frecuentemente presenta pérdida alélica en CaP, desarrolla pérdida de número de copias como un evento temprano en la carcinogénesis prostática y se correlaciona con progresión a enfermedad agresiva. Usualmente presenta reducción o ausencia de expresión en CaP, aunque se ha reportado mantenimiento de niveles bajos de expresión, asociada en dichos casos con tumores de naturaleza indolente, similar a la haploinsuficiencia observada en NKX3.1 y p27^{Kip1} (Shen and Abate-Shen 2010).

El producto de este gen, la proteína PTEN, es responsable de la defosforilación e inactivación de PIP3, un segundo mensajero producido posteriormente a la activación de la quinasa de PIP3 en respuesta a la unión de varios receptores de factores de crecimiento. PIP3 es requerido para la activación de la quinasa de proteína AKT, que resulta en la inhibición de la apoptosis. Se han observado delecciones homocigotas y mutaciones en un subgrupo de CaP y la pérdida de su expresión se relaciona con puntaje de Gleason de alto grado y enfermedad avanzada (Gurel, Iwata et al. 2008). De modo que a través de AKT, la proteína PTEN lleva a la inactivación de p27^{Kip1} por su fosforilación y retención citoplasmática; además el gen PTEN puede cooperar con NKX3.1 y CDKN1b en el aumento de la frecuencia y extensión de PIN y posiblemente de CaP temprano (Gurel, Iwata et al. 2008).

También se ha descrito en PIA la sobreexpresión de la proteína supresora de apoptosis Bcl-2, evidenciada por aumento en su tinción inmunohistoquímica en las células luminales, a diferencia del patrón observado en el epitelio normal, en el que dicha tinción se observa aumentada solamente en la capa de células basales (De Marzo, Marchi et al. 1999; Wang, Bergh et al. 2004; Wang, Bergh et al. 2007). Bcl-2 ha sido observada en PIN y CaP, su sobreexpresión se ha asociado a inflamación crónica, y se ha sugerido que puede ser inducida por COX2 en líneas celulares de CaP (Wang, Bergh et al. 2004). La extensión

de la expresión de Bcl-2 en PIA se correlacionó con el tipo de lesión presentándose niveles más altos en las lesiones que contienen hiperplasia postatrófica. Estos hallazgos explican los bajos niveles de apoptosis observados en estas lesiones y favorecen el concepto de PIA como una lesión regenerativa (De Marzo, Marchi et al. 1999).

Otros productos de genes que se encuentran aumentados en PIA son los inducidos en respuesta al estrés oxidativo o por señales asociadas con activación y proliferación celular incluyendo GSTP1, GSTA1, COX2 y p16 (De Marzo, Marchi et al. 1999; Parsons, Nelson et al. 2001). El gen *GSTP1* es considerado un guardián del genoma, codifica glutatión-S-transferasa π (GSTP1), una enzima inducible que pertenece a las glutatión-transferasas, las cuales tienen un papel importante en la detoxificación intracelular de electrófilos reactivos y productos del estrés oxidativo, catalizando su conjugación a glutatión, de esta manera protegen a las células del daño al ADN provocado por el estrés oxidativo al inactivar químicamente estos compuestos y evitar la formación de aductos de ADN (Parsons, Nelson et al. 2001; Gurel, Iwata et al. 2008). GSTP1 es expresada normalmente en la capa de células basales y está ausente en la mayoría de las células luminales secretoras no atróficas del epitelio prostático (De Marzo, Marchi et al. 1999; Nakayama, Bennett et al. 2003; Wang, Bergh et al. 2009). En contraste, se ha observado que todas las lesiones de PIA presentan expresión aumentada de GSTP1 en la mayoría de las células luminales, con un rango de expresión evidenciado por tinción individual de glándulas rodeadas por células negativas, y asociado con el tipo de lesión siendo más elevado en los casos de hiperplasia postatrófica (De Marzo, Marchi et al. 1999; Nakayama, Bennett et al. 2003; Wang, Bergh et al. 2009).

Este patrón de expresión de GSTP1 en PIA sugiere una respuesta celular de protección ante el posible daño al ADN producido por el estrés oxidativo asociado al componente inflamatorio descrito en estas lesiones. Sin embargo, al no encontrarse en la totalidad de las células se ha planteado que aquellas que no la expresan están expuestas al daño oxidativo y por tanto propensas a desarrollar alteraciones genéticas y transformación neoplásica (De Marzo, Marchi et al. 1999; van Leenders, Gage et al. 2003). La razón de esta negatividad

en algunas células de PIA podría ser la presencia de un patrón de hipermetilación del promotor de *GSTP1* similar al encontrado en CaP y PIN, demostrado en varios estudios donde se ha descrito en aproximadamente el 70% de los casos de PIN y más del 90% de CaP (De Marzo, Marchi et al. 1999; Nakayama, Bennett et al. 2003; Bastian, Yegnasubramanian et al. 2004), siendo este el gen afectado por hipermetilación más estudiado dentro de la carcinogénesis prostática (Benedettini, Nguyen et al. 2008; Nelson, De Marzo et al. 2009). La pérdida de función de *GSTP1* en un porcentaje de células de PIA, considerada precursor de CaP, y en un alto porcentaje de PIN, indica que dicha alteración se produce en una fase temprana de la carcinogénesis prostática, resultando en pérdida de la protección que la enzima confiere contra las especies químicas reactivas y facilitando la activación de aminas heterocíclicas carcinógenas, presentes en las carnes sobreasadas, lo que constituye una explicación de la relación entre factores ambientales como el consumo de dietas ricas en grasas animales y carnes sobreasadas con el riesgo de desarrollar CaP (Nelson, De Marzo et al. 2003; Nelson, De Marzo et al. 2009).

Aunque hasta ahora no es claro el mecanismo que desencadena la metilación *de novo* del promotor de *GSTP1*, se ha considerado que procesos inflamatorios crónicos o recurrentes pueden participar en este silenciamiento epigenético, similar al observado en varios casos de carcinogénesis epitelial cuya forma de aparición sigue siendo una pregunta sin resolver (Nelson, De Marzo et al. 2009). La inducción demostrada de *GSTP1* en PIA en respuesta al estrés oxidativo ha llevado a plantear la posibilidad que otras glutatión-transferasas pudiesen igualmente ser inducidas en estas lesiones, como *GSTA1* de la cual solo se tenían datos sugestivos de una baja expresión en tejido prostático normal, sin claridad de su distribución en los diferentes compartimentos celulares o datos comparativos entre tejido prostático normal y PIA, PIN o CaP, lo que llevó a estudiar su expresión en estos diferentes tipos de tejidos (Parsons, Nelson et al. 2001), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de *GSTA1* en PIA y la detectada en PIN y CaP que fueron negativas en la gran mayoría de los casos. Esto constituye un soporte adicional a la teoría que las células de PIA están respondiendo a un alto estrés oxidativo localizado (Parsons, Nelson et al. 2001).

Al igual que GSTP1 y GSTA1, COX2 se ha encontrado sobrerregulada en las células epiteliales de PIA, hallazgos consistentes con el concepto de respuesta a estrés tisular aumentado en estas lesiones. COX2 se ha encontrado sobrerregulada en células transformadas y tumores malignos, lo que se ha asociado a inducción de carcinogénesis a través de la promoción de angiogénesis, aumento de motilidad celular e incremento en la resistencia a la apoptosis (Zha, Gage et al. 2001; Sfanos and De Marzo 2012). Como resultado de la sobreexpresión de COX2 aumenta la resistencia a la apoptosis y su actividad catalítica resulta en producción de radicales libres potencialmente dañinos al ADN, ambos mecanismos contribuyen al daño genómico y la transformación celular, y son compatibles con el papel potencial de la inflamación en la carcinogénesis prostática y la posibilidad de reducción del riesgo de CaP con el uso regular de NSAIDs (Zha, Gage et al. 2001; De Marzo, Meeker et al. 2003).

La sobrerregulación de COX2 en las células epiteliales lumbinales de glándulas adyacentes a infiltrado inflamatorio y células de PIA está relacionada con la inflamación crónica probablemente en respuesta a señales provenientes de dichas células inflamatorias. Además los datos inmunohistoquímicos muestran en estas células COX2 positivas un fenotipo diferente al de las células lumbinales, representado por una alta tasa de proliferación y sobreexpresión de Bcl-2, lo que se asocia con disminución de la apoptosis (Wang, Bergh et al. 2004). Estos hallazgos llevaron a sugerir que la expresión de COX2 en respuesta a la inflamación, puede contribuir al proceso de carcinogénesis prostática a través de su sobrerregulación en PIA, teniendo un papel limitado en CaP establecido (Zha, Gage et al. 2001), y por tanto el efecto de disminución de CaP propuesto para los NSAIDs podría estar relacionado con la modulación de los niveles elevados de COX2 en PIA y en macrófagos, o con una vía independiente de COX2 (De Marzo, Meeker et al. 2003; Zha, Yegnasubramanian et al. 2004).

Una confirmación adicional de que las células de PIA están sometidas a estrés y desarrollan regeneración tisular, es su expresión aumentada de la proteína c-MET, involucrada en procesos de reparación y motilidad celular (De Marzo, Platz et al. 2007). Dichos procesos biológicos conllevan funciones de proliferación, migración y diferenciación

celular, generalmente asociadas con el rol postulado para las células intermedias del epitelio prostático, por tanto, su sobreexpresión en las células epiteliales de PIA está acorde con la denominación de estas lesiones como regenerativas y sirve de soporte a su postulación como células blanco de la transformación neoplásica en la próstata (van Leenders, Gage et al. 2003).

Otro gen que se ha descrito sobrerregulado en más del 80% de casos de CaP y en PIN es p16/CDKN2, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina que se une e inactiva las ciclinas CDK4 y CDK6 al impedir la unión de estas a la ciclina D, llevando a hipofosforilación de la proteína Rb y detención del ciclo celular en la fase G1 (Ortega, Malumbres et al. 2002). La razón de esta sobreexpresión no es clara pero se cree que es posible que involucre alteraciones en la unión de proteínas que lo regulan (Faith, Han et al. 2005). En relación con esto, en el estudio realizado por Faith y col. la expresión de p16 fue poco frecuente en el epitelio de las glándulas prostáticas normales, comparada con la expresión aumentada que tiene en las glándulas atróficas en las que se observó tinción en las células luminales, aunque dicha tinción fue heterogénea dentro de un acino o entre varios acinos, de manera que imita la expresión observada en PIN y CaP. Es posible que el incremento de la proteína p16 en PIA represente una respuesta celular dirigida a mantener la homeostasis en respuesta a señales proliferativas y al estrés oxidativo asociado a PIA evidenciado por su expresión aumentada de GSTP1, GSTA y COX2 (Faith, Han et al. 2005; Perletti, Montanari et al. 2010).

PIA: Lesión precursora de PIN y/o cáncer de próstata? La evidencia en contra

A pesar de las evidencias anteriormente descritas existe controversia en relación con la postulación de PIA como lesión precursora de PIN o CaP. Diversos estudios (Billis 1998; Billis and Magna 2003; Billis, Freitas et al. 2007; Billis 2010) han demostrado que la atrofia focal prostática es un hallazgo común en los especímenes de próstata, planteándose que la inflamación es un fenómeno secundario a la atrofia. Estos estudios no han encontrado la asociación topográfica entre PIA y PIN o CaP descrita por otros autores. Además, en la Conferencia de Consenso

de Cáncer de Próstata realizada en Estocolmo se enfatizó que dicha relación entre atrofia y CaP no ha sido probada (Wang, Bergh et al. 2009).

Es así como en dos diferentes estudios realizados por Billis y col. en los que se examinaron especímenes de próstatas de autopsias de pacientes mayores de 40 años, no se encontró relación estadística ni topográfica entre la presencia de atrofia y PIN o CaP, solo hubo asociación con la edad y con arteriosclerosis por lo cual se postuló que la isquemia secundaria a esta podría ser un factor importante en la etiopatogenia de la atrofia (Billis 1998; Billis and Magna 2003). En ambos se describen alta frecuencia de atrofia con inflamación en los especímenes estudiados en autopsias (85% y 66%) (Billis 1998; Billis and Magna 2003), sin diferencia significativa entre atrofia sin inflamación y con inflamación, en relación con la presencia de PIN o CaP (Billis and Magna 2003).

Igualmente, en un estudio en biopsias de pacientes con CaP, en los cilindros con tumor se encontró mayor frecuencia de atrofia sin inflamación que de PIA (Billis, Freitas et al. 2007; Billis 2010), y en el realizado en cuadrantes de tejido de especímenes de prostatectomía no se encontró relación topográfica entre PIA y PIN o CaP, manifestado por distancias mayores de cinco milímetros entre los focos de PIA y los de PIN o CaP y mayor frecuencia de cuadrantes, mostrando solo PIA en comparación con los que mostraban PIA con PIN y/o CaP (Brasil, Favaro et al. 2011).

Otros estudios como el de Anton y col. reportó hiperplasia postatráfica en un tercio de los especímenes de prostatectomía estudiados, sin asociación con la presencia de CaP, ni relación entre este tipo de atrofia y el riesgo de CaP o relación topográfica con focos de CaP (Anton, Kattan et al. 1999). Igualmente en el estudio de Bakshi y col. en el que se estudiaron 79 biopsias de próstata, los grupos sin ninguna anormalidad, con atrofia simple o hiperplasia postatráfica no mostraron diferencias significativas en la frecuencia con la que presentaron un diagnóstico posterior de CaP, concluyendo que los subtipos de atrofia no están asociados con aumento significativo del riesgo de diagnóstico de CaP en una biopsia posterior (Billis and Magna 2003). Así mismo,

Asimakopoulos y col. no encontraron correlación significativa entre la presencia de PIA/PA o ausencia de atrofia en la biopsia inicial negativa y el diagnóstico posterior de CaP tras un seguimiento corto (promedio de 3.7 meses) (Asimakopoulos, Miano et al. 2011). Este riesgo de presentar CaP en una biopsia posterior fue evaluado también por Postma y col. quienes no encontraron una asociación significativa entre atrofia y diagnóstico posterior de PIN o CaP, ni los diferentes subtipos de atrofia ni su extensión en los cilindros de la biopsia inicial estuvieron asociados con aumento en incidencia de CaP en tamizajes posteriores. Igual que en los estudios descritos, también este reportó un alto porcentaje de incidencia de atrofia, correspondiente al 94% de las biopsias (Postma, Schroder et al. 2005).

Por tanto, persiste la duda con relación a si la atrofia prostática por si misma está implicada en la carcinogénesis o si el evento clave es el proceso inflamatorio que conlleva a atrofia, PIN y CaP. La inflamación puede producir daño tisular y atrofia, u otros agentes nocivos, como la isquemia pueden llevar a atrofia directamente y desencadenar un proceso inflamatorio en forma secundaria. El hallazgo de ausencia de inflamación en la atrofia parcial, al postular que esta sería la etapa inicial del *continuum* de atrofia prostática, junto con la alta frecuencia de PIA en próstatas con y sin CaP, llevó a algunos autores a establecer la hipótesis que la inflamación en la atrofia focal parece ser un proceso secundario (Tomas, Kruslin et al. 2007; Billis 2010; Brasil, Favaro et al. 2011).

Comentarios finales

La atrofia prostática focal usualmente asociada con inflamación, denominada PIA, que se observa con frecuencia en regiones extensas de la zona periférica de la próstata, ha sido postulada como posible lesión precursora de PIN y/o CaP, en un modelo donde el epitelio de las glándulas en PIA puede progresar a PIN y posteriormente a CaP. Las glándulas que forman estas lesiones de PIA están revestidas por células epiteliales atróficas con un alto índice de proliferación y bajo índice apoptótico, probablemente como una respuesta regenerativa ante el daño tisular generado por agentes lesivos de tipo infeccioso, químico como la exposición a carcinógenos de la dieta, o físico como los

desencadenados por eventos de isquemia local, que generan procesos inflamatorios y liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Por tanto, las células epiteliales de PIA, que expresan proteínas como c-MET, vinculadas con reparación y motilidad celular, como un soporte adicional de su participación en estos procesos regenerativos, están sometidas a estrés oxidativo, evidenciado por su alta expresión de GSTP1, GSTA1 y Cox2, lo que puede llevar a inestabilidad genética y en consecuencia a mayor riesgo de mutaciones, como por ejemplo el incremento de señales centroméricas del cromosoma 8, pérdida del cromosoma 8p y ganancia del cromosoma 8q24, observados en PIA y encontrados con frecuencia en PIN y CaP.

Estas lesiones se han observado fusionadas, con evidencia directa de transición morfológica entre PIA y PIN, y entre PIA y CaP. Aunque esta asociación topográfica por sí sola no es una prueba definitiva, es consistente con el modelo propuesto en el que PIA puede progresar a PIN y/o CaP. Además PIA presenta cambios de expresión génica iguales a los descritos en PIN y CaP, como la disminución de expresión de NKX3.1 y p27^{kpi1}. Sin embargo, existe controversia en relación con la postulación de PIA como posible lesión precursora de PIN y/o CaP. Es así que su alta frecuencia en especímenes de próstata sin CaP, la baja o nula asociación topográfica entre PIA y PIN o CaP observada por algunos investigadores, la ausencia de asociación entre PIA y el riesgo de CaP en biopsias subsecuentes, ha llevado a varios autores a negar esta hipótesis.

A pesar de la controversia en relación con el papel de la atrofia, existen evidencias epidemiológicas, patológicas y moleculares que indican que el estrés oxidativo asociado a la inflamación crónica es probablemente el evento de iniciación más relevante de la carcinogénesis prostática. A este respecto, el análisis molecular de líneas celulares con diferentes fenotipos ofrece un instrumento valioso para identificar genes asociados a la iniciación y a la progresión del cáncer de próstata. Por ejemplo, las líneas de cáncer de próstata de rata, Dunning G y Mat LyLu, originadas del mismo tumor parental Dunning R-3327, exhiben muchas características observadas durante la progresión del cáncer de próstata humana, incluyendo la respuesta a andrógenos y

propiedades metastásicas diferenciales. Por lo tanto, nuestro grupo realizó el análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de estas dos líneas celulares con la finalidad de determinar sus diferencias en expresión génica y como estas diferencias se asocian a los fenotipos cancerosos de dichas líneas (Reyes, Tiwari et al. 2007), lo cual se describe en el siguiente capítulo.

Referencias

- Amin, M. B., P. Tamboli, et al. (1999). "Postatrophic hyperplasia of the prostate gland: a detailed analysis of its morphology in needle biopsy specimens." *The American journal of surgical pathology* 23(8): 925-931.
- Antón, R. C., M. W. Kattan, et al. (1999). "Postatrophic hyperplasia of the prostate: lack of association with prostate cancer." *The American journal of surgical pathology* 23(8): 932-936.
- Asimakopoulos, A. D., R. Miano, et al. (2011). "Significance of focal proliferative atrophy lesions in prostate biopsy cores that test negative for prostate carcinoma." *Urologic oncology* 29(6): 690-697.
- Bastian, P. J., S. Yegnasubramanian, et al. (2004). "Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation." *European urology* 46(6): 698-708.
- Benedettini, E., P. Nguyen, et al. (2008). "The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations." *Diagnostic histopathology* 14(5): 195-201.
- Berney, D. and L. Cheng (2012). "Prostate cancer: towards the standardization and synthesis of morphology, genetics, and prognosis." *Histopathology* 60(1): 1-3.
- Bethel, C. R., D. Faith, et al. (2006). "Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion." *Cancer research* 66(22): 10683-10690.

- Billis, A. (1998). "Prostatic atrophy: an autopsy study of a histologic mimic of adenocarcinoma." *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11(1): 47-54.
- Billis, A. (2010). "Prostatic atrophy. Clinicopathological significance." *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 36(4): 401-409.
- Billis, A., L. L. Freitas, et al. (2007). "Inflammatory atrophy on prostate needle biopsies: is there topographic relationship to cancer?" *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology* 33(3): 355-360; discussion 361-353.
- Billis, A. and L. A. Magna (2003). "Inflammatory atrophy of the prostate. Prevalence and significance." *Archives of pathology & laboratory medicine* 127(7): 840-844.
- Bostwick, D. G. and L. Cheng (2012). "Precursors of prostate cancer." *Histopathology* 60(1): 4-27.
- Bostwick, D. G., L. Liu, et al. (2004). "High-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Reviews in urology* 6(4): 171-179.
- Brasil, A. A., W. J. Favaro, et al. (2011). "Atrophy in specimens of radical prostatectomy: is there topographic relation to high-grade prostatic intraepithelial neoplasia or cancer?" *International urology and nephrology* 43(2): 397-403.
- De Marzo, A. M., V. L. Marchi, et al. (1999). "Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis." *The American journal of pathology* 155(6): 1985-1992.
- De Marzo, A. M., A. K. Meeker, et al. (1998). "Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells." *The American journal of pathology* 153(3): 911-919.

- De Marzo, A. M., A. K. Meeker, et al. (2003). "Human prostate cancer precursors and pathobiology." *Urology* 62(5 Suppl 1): 55-62.
- De Marzo, A. M., Y. Nakai, et al. (2007). "Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis." *Urologic oncology* 25(5): 398-400.
- De Marzo, A. M., W. G. Nelson, et al. (1998). "Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells." *The Journal of urology* 160(6 Pt 2): 2381-2392.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2006). "A working group classification of focal prostate atrophy lesions." *The American journal of surgical pathology* 30(10): 1281-1291.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." *Nature reviews. Cancer* 7(4): 256-269.
- De Marzo, A. M., M. J. Putzi, et al. (2001). "New concepts in the pathology of prostatic epithelial carcinogenesis." *Urology* 57(4 Suppl 1): 103-114.
- De Nunzio, C., G. Kramer, et al. (2011). "The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation." *European urology* 60(1): 106-117.
- Delahunt, B., R. J. Miller, et al. (2012). "Gleason grading: past, present and future." *Histopathology* 60(1): 75-86.
- Di Silverio, F., V. Gentile, et al. (2003). "Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis." *European urology* 43(2): 164-175.
- Eminaga, O., R. Hinkelammert, et al. (2013). "High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN) and topographical distribution in 1,374 prostatectomy specimens: Existence of HGPIN near prostate cancer." *The Prostate* 73(10): 1115-1122.

- Epstein, J. I. (2012). "Diagnosis of limited adenocarcinoma of the prostate." *Histopathology* 60(1): 28-40.
- Faith, D., S. Han, et al. (2005). "p16 Is upregulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate." *The Prostate* 65(1): 73-82.
- Fine, S. W. and V. E. Reuter (2012). "Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer." *Histopathology* 60(1): 142-152.
- Franks, L. M. (1954). "Atrophy and hyperplasia in the prostate proper." *The Journal of pathology and bacteriology* 68(2): 617-621.
- Gurel, B., T. Iwata, et al. (2008). "Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis." *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 21(9): 1156-1167.
- Gurel, B., T. Iwata, et al. (2008). "Molecular alterations in prostate cancer as diagnostic, prognostic, and therapeutic targets." *Advances in anatomic pathology* 15(6): 319-331.
- Humphrey, P. A. (2004). "Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate." *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 17(3): 292-306.
- Humphrey, P. A. (2007). "Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue." *Journal of clinical pathology* 60(1): 35-42.
- Klink, J. C., R. Miocinovic, et al. (2012). "High-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Korean journal of urology* 53(5): 297-303.
- Koh, C. M., C. J. Bieberich, et al. (2010). "MYC and Prostate Cancer." *Genes & cancer* 1(6): 617-628.
- Kristiansen, G. (2012). "Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer." *Histopathology* 60(1): 125-141.

- Laczko, I., D. L. Hudson, et al. (2005). "Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics." *The Prostate* 62(3): 260-266.
- Liavag, I. (1968). "The localization of prostatic carcinoma. An autopsy study." *Scandinavian journal of urology and nephrology* 2(2): 65-71.
- Macoska, J. A., T. M. Trybus, et al. (2000). "8p22 loss concurrent with 8c gain is associated with poor outcome in prostate cancer." *Urology* 55(5): 776-782.
- Man, Y. G., C. Zhao, et al. (2006). "A subset of prostate basal cells lacks the expression of corresponding phenotypic markers." *Pathology, research and practice* 202(9): 651-662.
- McNeal, J. E. (1997). *Prostate. Histology for pathologists*. e. Sternberg SS. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers. 2nd ed.: 997-1017.
- McNeal, J. E. (1997). *Prostate*.:Sternberg SS, ed. *Histology for Pathologists*. Philadelphia, Lippincott-Raven: 997-1017.
- Montironi, R., R. Mazzucchelli, et al. (2007). "Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate." *Nature clinical practice. Urology* 4(6): 321-332.
- Nakayama, M., C. J. Bennett, et al. (2003). "Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection." *The American journal of pathology* 163(3): 923-933.
- Nelson, W. G., A. M. De Marzo, et al. (2003). "Prostate cancer." *The New England journal of medicine* 349(4): 366-381.
- Nelson, W. G., A. M. De Marzo, et al. (2009). "Epigenetic alterations in human prostate cancers." *Endocrinology* 150(9): 3991-4002.

- Ortega, S., M. Malumbres, et al. (2002). "Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer." *Biochimica et biophysica acta* 1602(1): 73-87.
- Parsons, J. K., C. P. Nelson, et al. (2001). "GSTA1 expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human prostate tissue." *The Prostate* 49(1): 30-37.
- Perletti, G., E. Montanari, et al. (2010). "Inflammation, prostatitis, proliferative inflammatory atrophy: 'Fertile ground' for prostate cancer development?" *Molecular medicine reports* 3(1): 3-12.
- Postma, R., F. H. Schroder, et al. (2005). "Atrophy in prostate needle biopsy cores and its relationship to prostate cancer incidence in screened men." *Urology* 65(4): 745-749.
- Putzi, M. J. and A. M. De Marzo (2000). "Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia." *Urology* 56(5): 828-832.
- Reyes, I., N. Reyes, et al. (2005). "Aging-associated changes in gene expression in the ACI rat prostate: Implications for carcinogenesis." *Prostate* 63(2): 169-186.
- Reyes, N., M. Iatropoulos, et al. (2002). "Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the ACI rat prostate." *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2: S37-42.
- Ruska, K. M., J. Sauvageot, et al. (1998). "Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy." *The American journal of surgical pathology* 22(9): 1073-1077.
- Sfanos, K. S. and A. M. De Marzo (2012). "Prostate cancer and inflammation: the evidence." *Histopathology* 60(1): 199-215.
- Shah, R., N. R. Mucci, et al. (2001). "Postatrophic hyperplasia of the prostate gland: neoplastic precursor or innocent bystander?" *The American journal of pathology* 158(5): 1767-1773.

- Shen, M. M. and C. Abate-Shen (2010). "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." *Genes & development* 24(18): 1967-2000.
- Tomas, D., B. Kruslin, et al. (2007). "Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma." *European urology* 51(1): 98-103; discussion 103-104.
- Tsujimoto, Y., H. Takayama, et al. (2002). "Postatrophic hyperplasia of the prostate in Japan: histologic and immunohistochemical features and p53 gene mutation analysis." *The Prostate* 52(4): 279-287.
- van Leenders, G. J., W. R. Gage, et al. (2003). "Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy." *The American journal of pathology* 162(5): 1529-1537.
- Verhagen, A. P., F. C. Ramaekers, et al. (1992). "Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer." *Cancer research* 52(22): 6182-6187.
- Vis, A. N. and T. H. Van Der Kwast (2001). "Prostatic intraepithelial neoplasia and putative precursor lesions of prostate cancer: a clinical perspective." *BJU international* 88(2): 147-157.
- Wang, W., A. Bergh, et al. (2004). "Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium." *The Prostate* 61(1): 60-72.
- Wang, W., A. Bergh, et al. (2007). "Increased expression of CCAAT/enhancer-binding protein beta in proliferative inflammatory atrophy of the prostate: relation with the expression of COX-2, the androgen receptor, and presence of focal chronic inflammation." *The Prostate* 67(11): 1238-1246.
- Wang, W., A. Bergh, et al. (2009). "Morphological transition of proliferative inflammatory atrophy to high-grade intraepithelial

neoplasia and cancer in human prostate." *The Prostate* 69(13): 1378-1386.

Yildiz-Sezer, S., I. Verdorfer, et al. (2006). "Assessment of aberrations on chromosome 8 in prostatic atrophy." *BJU international* 98(1): 184-188.

Zha, S., W. R. Gage, et al. (2001). "Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma." *Cancer research* 61(24): 8617-8623.

Zha, S., V. Yegnasubramanian, et al. (2004). "Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective." *Cancer letters* 215(1): 1-20.

SECCIÓN II

RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

Capítulo 5.

ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO GLOBAL DE LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS

Identificación de proteoglicanos diferencialmente expresados

Niradiz Reyes, PhD

Resumen

Los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la progresión del cáncer de próstata hacia un fenotipo metastásico no son bien entendidos. La progresión del cáncer de próstata localizado hacia un estado metastásico parece estar regulado por múltiples señales oncogénicas en las células epiteliales y por cambios en la interacción estroma-epitelio. Estas incluyen las vías de señalización Hedgehog y Wnt (Karhadkar, Bova et al. 2004; Yang, Chen et al. 2006) así como la sobreexpresión de varios factores de crecimiento y sus receptores, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento parecido a insulina-1 (IGF-1) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)(Hellawell and Brewster 2002).

El fenotipo clínicamente agresivo distintivo del fenotipo metastásico (Poste and Fidler 1980) ha sido estudiado al nivel de la expresión génica (Dhanasekaran, Barrette et al. 2001; LaTulippe, Satagopan et al. 2002; Reyes, Iatropoulos et al. 2002), encontrándose patrones alterados de la expresión de genes asociados con señales de transducción, remodelación de la matriz extracelular, motilidad, regulación del ciclo celular, y la estructura celular. El análisis molecular de líneas celulares con diferentes potenciales metastásicos ofrece un instrumento valioso para identificar genes asociados al fenotipo metastásico. Las líneas de cáncer de próstata de rata, Dunning G y Mat LyLu, originadas del

mismo tumor parental Dunning R-3327, exhiben muchas características observadas durante la progresión del cáncer de próstata humana, incluyendo la respuesta a andrógenos y propiedades metastásicas diferenciales.

Por lo tanto, nuestro grupo realizó el análisis comparativo de los perfiles de expresión génica de estas dos líneas celulares con la finalidad de aumentar el entendimiento del proceso metastásico del cáncer de próstata (Reyes, Tiwari et al. 2007).

Metodología

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares MAT-LyLu y Dunning G, las cuales fueron derivadas originalmente del mismo tumor parental, Dunning R-3327, de ratas Copenhagen (Dunning 1963). La línea Dunning G corresponde a células tumorigénicas pobremente diferenciadas, andrógeno-dependientes, obtenidas en el laboratorio de Dunning después de varios pases *in vitro* del tumor original; mientras que la línea MAT-LyLu (Metastatic At-Lymph Node and Lung) fue desarrollada y caracterizada por Isaacs et al (Isaacs, Yu et. al. 1981) en la Facultad de Medicina de la Universidad Johns Hopkins, después de varios pases seriales del tumor original, en las que se obtuvo el tumor Dunning R3327-AT, de rápido crecimiento y andrógeno insensible. Las líneas Dunning G y Mat LyLu exhiben muchas características observadas durante la progresión del cáncer de próstata humana, incluyendo la respuesta a andrógenos y propiedades metastásicas diferenciales.

Análisis transcriptómico con micromatrices de ADN

Se utilizaron micromatrices de Affymetrix (GeneChip Rat Genome U34A array) para realizar el análisis transcriptómico global de las líneas celulares Dunning G y MAT-LyLu, con diferentes propiedades metastásicas. Los datos transcriptómicos fueron analizados en el contexto de vías y grupos funcionales, y se utilizó reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para validación de un grupo de genes seleccionados.

Validación de la expresión por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se validaron varios genes seleccionados mediante qRT-PCR, utilizando los mismos RNAs individuales usados en los ensayos con micromatrices para así validar la especificidad de la técnica (Rajeevan, Ranamukhaarachchi et al. 2001). La cuantificación relativa de la expresión se determinó mediante el método comparativo CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$), normalizando los niveles de expresión a los de los genes constitutivos β -Actina y HPRT-1. Los ensayos para qPCR se realizaron en triplicado para cada muestra. Se utilizaron genes específicos para los genes de interés diseñados con el programa *Primer3* y sintetizados por IDT technologies. Entre los genes validados se incluyeron los proteoglicanos ESM-1 (Endothelial specific molecule 1/Endocan), BGN (biglicano), fibromodulina, y decorina. La significancia estadística de las diferencias en expresión génica se determinó por la prueba T de Student.

Resultados

Se encontró expresión alterada (sobreexpresión y subexpresión) de 107 genes; específicamente se detectó sobreexpresión de 48 genes y expresión disminuida de 59 genes en la línea MAT-LyLu comparado con la línea Dunning G. Los genes fueron agrupados en categorías funcionales, tales como interacción epitelial-matriz extracelular, motilidad celular, proliferación celular, y transportadores, entre otros. Muchos de estos genes no han sido asociados previamente a la metástasis del cáncer de próstata. La categoría que presentó el mayor número de genes diferencialmente expresados fue la de matriz extracelular, con un 20% del total de los genes diferencialmente expresados.

La Figura 12 muestra la agrupación jerárquica de 20 de los genes encontrados con mayor nivel de expresión diferencial en las líneas celulares estudiadas. Los genes más relevantes de este grupo fueron seleccionados para su evaluación en líneas celulares humanas de cáncer de próstata.

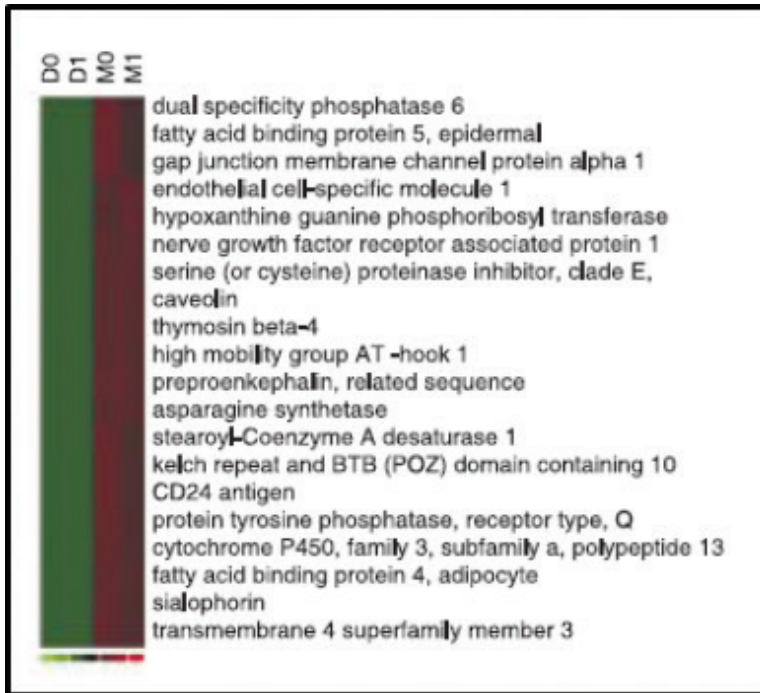


Figura 12. Agrupación jerárquica de genes sobre-expresados.

Genes sobreexpresados (color rojo) en MAT-LyLu (MLL). La figura representativa del agrupamiento jerárquico fue generada automáticamente con el programa dChip v1.3 (www.dchip.org) usando el parámetro de correlación de Pearson. Se muestran los 20 genes que mostraron mayor sobreexpresión en MLL.

Los genes relevantes al fenotipo metastásico, y encontrados con expresión alterada, fueron: ESM-1 (endotelial specific molecule-1/endocan), antígeno CD24, biglicano (BGN), serpine2, fibromodulina, macrophage stimulating 1, alpha-2-macroglobulin, glicoproteína-38, decorina, molécula de adhesión vascular-1, clusterin, y elastina. Todos estos genes pueden ser agrupados en la categoría de Matriz Extracelular de Gene Ontology; varios de ellos codifican proteínas de proteoglicanos (PG) tales como: ESM-1, BGN, fibromodulina, y decorina, los cuales son componentes principales de la Matriz Extracelular que mantienen la integridad de la estructura tisular.

Entre estos componentes de la Matriz Extracelular identificados como diferencialmente expresados en este análisis transcriptómico, los genes codificantes de pequeños proteoglicanos: ESM-1 (Endocan), BGN (Biglicano), y Fmod (Fibromodulina), no han sido asociados previamente a la metástasis del cáncer de próstata. Estos tienen el potencial de ser desarrollados como biomarcadores de utilidad en el manejo de esta enfermedad.

Se requieren estudios adicionales realizados en la contraparte humana, para determinar la participación de estos genes, o de sus productos, en el cáncer de próstata y definir su utilidad como biomarcadores de esta enfermedad.

Discusión

La expresión diferencial encontrada en este estudio a nivel de genes de la matriz extracelular puede ser un reflejo de las alteraciones que ocurren durante el proceso metastásico, tales como alteraciones en la matriz extracelular, neo-vascularización, cambios en la estructura celular y aumento de la motilidad (Poste and Fidler 1980). La sobreexpresión de ESM-1 en el tejido tumoral puede constituir un factor de pronóstico negativo y un marcador de metástasis para pacientes con cáncer de próstata, como se ha sugerido en el cáncer de mama (Lipoldova, Svobodova et al. 2002), cáncer renal (Amatschek, Koenig et al. 2004), y cáncer de pulmón (Burton-Wurster, Liu et al. 2003). Nuestros resultados han sido los primeros en vincular ESM-1 y fibromodulina, dos miembros de la familia de los proteoglicanos, con el cáncer metastásico de la próstata.

Fibromodulina, BGN y decorina, son genes que codifican las proteínas centrales de proteoglicanos que son miembros de la familia de Proteoglicanos Pequeños Ricos en Leucina (Small Leucine Rich Proteoglycans, SLRP). Estos proteoglicanos funcionan, bajo condiciones fisiológicas y patofisiológicas, como reguladores de la organización de la matriz extracelular, la adhesión celular, la migración y regulación de la actividad del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β) (Hildebrand, Romaris et al. 1994; Burton-Wurster, Liu et al. 2003).

Fibromodulina es un pequeño proteoglicano rico en leucina, importante para la organización de la matriz extracelular y esencial para la reparación tisular en múltiples órganos. Se ha descrito que la principal función de este proteoglicano es la regulación de la formación de fibrillas de colágeno (fibrillogénesis). Sin embargo, investigaciones recientes han descrito nuevas funciones de fibromodulina, incluyendo regulación de la angiogénesis, reprogramación de fibroblastos humanos en células pluripotenciales, modulación de la actividad de TGF- β , procesos inflamatorios, y asociación con fenotipos metastásicos. Adicionalmente, fibromodulina ha sido identificado como un nuevo antígeno asociado a tumores en leucemia, linfoma y leiomioma.

Respecto a endocan, este corresponde a un nuevo proteoglicano de dermatán sulfato, soluble, derivado del endotelio (Lassalle, Molet et al. 1996). Endocan tiene la propiedad de unirse a un amplio rango de moléculas bioactivas que participan de vías de señalización celular y adhesión, y de esta manera participa en regulación de la proliferación, diferenciación, migración, y adhesión de diferentes tipos celulares, tanto en procesos homeostáticos como patológicos. Se ha mostrado que la elevación de los niveles tisulares o séricos de endocan es un reflejo de la activación endotelial y la neovascularización (del Toro, Prahst et al. 2010; Sarrazin, Lyon et al. 2010), los cuales son procesos primordiales asociados con la inflamación y progresión tumoral. Debido a esto, endocan ha sido propuesto como biomarcador sanguíneo y tisular para diversos tipos de cáncer y como biomarcador de inflamación, mostrando resultados prometedores (Grigoriu, Depontieu et al. 2006; Scherpereel, Depontieu et al. 2006; Kali and Shetty 2014).

Nuestro análisis transcriptómico nos permitió identificar a este proteoglicano particular, sobreexpresado en una línea celular de cáncer de próstata de rata altamente metastásica (Reyes, Iatropoulos et al. 2002). Estudios posteriores realizados por nuestro grupo de investigación, permitió demostrar que este proteoglicano también se encuentra altamente expresado en PC-3, una línea celular humana de cáncer de próstata altamente metastásica, y además lo identificamos a altos niveles en el suero de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata en etapas avanzadas (Bettín, Reyes et al. 2015).

Conclusiones

Nuestro grupo ha identificado diversos genes con expresión alterada, asociados al fenotipo metastásico del cáncer de próstata. La subsiguiente validación de estos genes en tejido prostático humano pudiera revelar su utilidad como marcadores biológicos para esta enfermedad. Algunos de estos genes pudieran tener potencial utilidad para el diagnóstico temprano de la recurrencia o de la metástasis o como blancos terapéuticos de esta enfermedad.

La extrapolación de los resultados obtenidos a partir de este trabajo al contexto de la enfermedad en el humano, requiere de la realización de estudios adicionales con muestras humanas y una caracterización clínica detallada de los respectivos pacientes para que se puedan hacer las correlaciones clínicas apropiadas.

No obstante, la identificación de genes diferencialmente expresados en estas dos líneas celulares de origen animal, a través de un aproximamiento transcriptómico global, como lo es, el de análisis de expresión génica con micromatrices de ADN, es el paso lógico inicial en la búsqueda de biomarcadores de utilidad en la enfermedad humana.

Nuestros estudios apuntan a que los proteoglicanos, especialmente los de la familia de SLRP, participan de forma importante en los procesos asociados al cáncer de próstata. Estudios adicionales nos han permitido identificar la expresión diferencial del SLRP fibromodulina en muestras de tejido y de suero de pacientes diagnosticados con hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata, las cuales representan las dos enfermedades prostáticas más comunes en el hombre, las cuales acarrear un alto costo socioeconómico, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Por otra parte, estudios que hemos realizado a nivel de líneas celulares humanas de próstata, han evidenciado que endocan está implicado directamente en las propiedades migratorias e invasivas de líneas cancerosas de próstata con alta capacidad metastásica, por lo cual pudiera representar un blanco terapéutico para esta enfermedad.

Estudios en marcha en nuestro grupo, muestran que fibromodulina y endocan, dos proteoglicanos pequeños, representan nuevos biomarcadores con potencial utilidad en el cáncer de próstata.

Referencias

Amatschek, S., U. Koenig, et al. (2004). "Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes." *Cancer Res* 64(3): 844-856.

Burton-Wurster, N., W. Liu, et al. (2003). "TGF beta 1 and biglycan, decorina, and fibromodulina metabolism in canine cartilage." *Osteoarthritis Cartilage* 11(3): 167-176.

Del Toro, R., C. Prahst, et al. (2010). "Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes." *Blood* 116(19): 4025-4033.

Dhanasekaran, S. M., T. R. Barrette, et al. (2001). "Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer." *Nature* 412(6849): 822-826.

Dunning, W. (1963). "Prostate cancer in the rat. ." *Natl Cancer Inst Monogr.* 12: 351-369.

Grigoriu, B. D., F. Depontieu, et al. (2006). "Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res* 12(15): 4575-4582.

Hellawell, G. O. and S. F. Brewster (2002). "Growth factors and their receptors in prostate cancer." *BJU Int* 89(3): 230-240.

Hildebrand, A., M. Romaris, et al. (1994). "Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorina and fibromodulina with transforming growth factor beta." *Biochem J* 302 (Pt 2): 527-534.

Isaacs, J. T., G. W. Yu, et al. (1981). "The characterization of a newly identified, highly metastatic variety of Dunning R 3327 rat prostatic

- adenocarcinoma system: the MAT LyLu tumor." *Invest Urol* 19(1): 20-23.
- Kali, A. and K. S. Shetty (2014). "Endocan: a novel circulating proteoglycan." *Indian J Pharmacol* 46(6): 579-583.
- Karhadkar, S. S., G. S. Bova, et al. (2004). "Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis." *Nature* 431(7009): 707-712.
- Lassalle, P., S. Molet, et al. (1996). "ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines." *J Biol Chem* 271(34): 20458-20464.
- LaTulippe, E., J. Satagopan, et al. (2002). "Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease." *Cancer Res* 62(15): 4499-4506.
- Lipoldova, M., M. Svobodova, et al. (2002). "Mouse genetic model for clinical and immunological heterogeneity of leishmaniasis." *Immunogenetics* 54(3): 174-183.
- Poste, G. and I. J. Fidler (1980). "The pathogenesis of cancer metastasis." *Nature* 283(5743): 139-146.
- Rajeevan, M. S., D. G. Ranamukhaarachchi, et al. (2001). "Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies." *Methods* 25(4): 443-451.
- Bettín, A., Reyes, I., and Reyes, N. (2015). "Gene expression profiling of prostate cancer-associated genes identifies fibromodulin as potential novel biomarker for prostate cancer." *Int J Biol Markers*. doi: 10.5301/ijbm.5000184
- Reyes, I., R. Tiwari, et al. (2007). "DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines." *Biomedica* 27(2): 190-203.

- Reyes, N., M. Iatropoulos, et al. (2002). "Microarray analysis of diet-induced alterations in gene expression in the ACI rat prostate." *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2: S37-42.
- Sarrazin, S., M. Lyon, et al. (2010). "Characterization and binding activity of the chondroitin/dermatan sulfate chain from endocan, a soluble endothelial proteoglycan." *Glycobiology* 20(11): 1380-1388.
- Scherpereel, A., F. Depontieu, et al. (2006). "Endocan, a new endothelial marker in human sepsis." *Crit Care Med* 34(2): 532-537.
- Yang, X., M. W. Chen, et al. (2006). "Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells." *Oncogene* 25(24): 3436-3444.

Capítulo 6.

ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE UN PANEL DE MARCADORES

Identificación de los proteoglicanos fibromodulina y endocan como biomarcadores potenciales en cáncer de próstata

Niradiz Reyes y Alfonso Bettín.

Resumen

Nuestro grupo ha desarrollado un ensayo basado en PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar los perfiles de expresión de un panel de genes que fueron identificados previamente en nuestra línea de investigación en Biomarcadores de Cáncer (Reyes, Tiwari et al. 2007). Este panel diseñado por nosotros consiste de 18 genes candidatos a biomarcadores del cáncer de próstata, el cual hemos evaluado en un grupo de tres líneas celulares humanas de origen prostático, PC-3 y LNCaP, las cuales poseen fenotipo canceroso agresivo y moderado, respectivamente, y PWR-1E, la cual es la línea celular de referencia, no-tumorigénica.

Los genes evaluados con el panel de biomarcadores son: CAV1, CD24, ESM-1, FMOD, CXXC5, F2RL1, KBTBD10, CD81, SPN, TMSB4X, PSA, A2M, FOXQ1, SERPINE2, DCN, CLU, PENK, y TSPAN8. Todos estos genes han demostrado participar en procesos relacionados con cáncer, migración, invasión, angiogénesis, y/o adhesión celular, pero no han sido catalogados como biomarcadores específicos del cáncer de próstata. Entre los genes identificados, el gen que codifica el proteoglicano FMOD fue adicionalmente evaluado en muestras clínicas, encontrándose diferencialmente expresado entre el tejido prostático benigno y el tejido prostático canceroso. Se requiere la validación posterior de FMOD en una población más grande para determinar con mayor precisión la utilidad de este gen como biomarcador del cáncer de próstata.

Aspectos generales

El impacto del cáncer de próstata en la población humana se debe en parte a la falta de métodos eficientes para el diagnóstico temprano y el pronóstico de la enfermedad (Oon, Pennington et al. 2011). El único biomarcador actualmente en uso en el cáncer de próstata es el Antígeno Prostático Específico (PSA), el cual ha presentado muchos inconvenientes que disminuyen notablemente su utilidad. Por esta razón, resulta prioritario que se desarrollen nuevos y mejores biomarcadores que mejoren el diagnóstico, la predicción del comportamiento clínico, y/o el tratamiento de esta enfermedad (Sardana, Dowell et al. 2008).

Nuestro grupo ha desarrollado un ensayo basado en PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar los perfiles de expresión de un panel de genes que fueron identificados previamente en nuestra línea de investigación en Biomarcadores de Cáncer (Reyes, Tiwari et al. 2007). Este panel diseñado por nosotros consiste de 18 genes candidatos a biomarcadores del cáncer de próstata, el cual hemos evaluado en un grupo de tres líneas celulares humanas de origen prostático, PC-3 y LNCaP, las cuales poseen fenotipo canceroso agresivo y moderado, respectivamente, y PWR-1E, la cual es la línea celular de referencia, no-tumorigénica. Los genes evaluados en el panel de biomarcadores son: CAV1, CD24, ESM-1, FMOD, CXXC5, F2RL1, KBTBD10, CD81, SPN, TMSB4X, PSA, A2M, FOXQ1, SERPINE2, DCN, CLU, PENK, y TSPAN8. Todos estos genes han demostrado participar en procesos relacionados con cáncer, migración, invasión, angiogénesis, y/o adhesión celular, pero no han sido catalogados como biomarcadores específicos del cáncer de próstata.

DESARROLLO DE UN PANEL DE BIOMARCADORES

En el campo de la investigación en biomarcadores, la determinación de los perfiles de expresión transcripcionales de genes blancos involucrados en vías biológicas complejas, captan gran interés y representan un paso inicial común en la detección e identificación de biomarcadores apropiados (Lohmann, Herold et al. 2013). De otra parte, es de amplia aceptación que la tecnología de transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real es altamente

específica y sensible para la medición de la expresión de transcritos, siendo superior a la tecnología de micromatrices de ADN, aunque presenta la limitación de que el número de genes evaluados al tiempo es limitado (Linton, Hey et al. 2008; Reinholz, Eckel-Passow et al. 2010; Sadi, Wang et al. 2011).

Por lo tanto, el abordaje más frecuente en el campo del descubrimiento de nuevos biomarcadores ha sido la realización inicial de análisis transcriptómicos globales con micromatrices de ADN, seguidos por la validación de resultados por transcripción inversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (Quackenbush 2006; Gu, Wei et al. 2009; Yan, Li et al. 2012). Siguiendo este delineamiento, nuestro grupo de investigación inicialmente realizó el análisis transcriptómico global de dos líneas celulares derivadas de la próstata de rata, las cuales presentan diferencias en sus propiedades metastásicas (Reyes, Tiwari et al. 2007). Este estudio nos permitió identificar un grupo de genes asociados al fenotipo metastásico del cáncer de próstata en un modelo animal *in vitro*.

En los siguientes capítulos determinamos los perfiles transcripcionales de un panel de 18 genes candidatos a biomarcadores relevantes, los cuales no son actualmente considerados como tales en cáncer de próstata, pero están implicados en procesos relacionados con cáncer, como los de regulación del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, adhesión celular, regulación de la matriz extracelular, motilidad celular, y vías de señalización mediadas por citocinas, factores de crecimiento y hormonas.

La expresión de este panel seleccionado de genes fue evaluado mediante RT-qPCR en las líneas celulares LNCaP (fenotipo canceroso de baja agresividad), PC-3 (fenotipo cancerosos altamente agresivo), y PWR-1E (fenotipo no-tumorigénico) usadas como control de referencia de la expresión.

Los resultados encontrados nos llevaron a seguir estudiando en más profundidad uno de los genes diferencialmente expresados, el gen que codifica la proteína central del proteoglicano fibromodulina (FMOD), un proteoglicano pequeño rico en leucina. Validamos la expresión de

este proteoglicano en un panel de cDNA comercial preparado a partir de muestras clínicas de pacientes diagnosticados con enfermedad prostática benigna o maligna, usando PCR cuantitativa en tiempo real. Además, verificamos que las líneas cancerosas de la próstata utilizadas ciertamente estuvieran expresando el transcrito de FMOD, para lo cual empleamos PCR convencional para amplificar un fragmento grande del gen utilizando cebadores específicos, y luego secuenciando en ambas direcciones el producto amplificado y comparando la secuencia de ADN con la secuencia oficial de FMOD depositada en el GenBank. Se utilizó para esto el producto obtenido de las células PCS-201-012, como control positivo, correspondientes a fibroblastos de piel humana normal. El estudio molecular nos permitió confirmar que el transcrito del gen FMOD se encuentra diferencialmente expresado en líneas celulares cancerosas comparadas con una línea no tumorigénica, y en muestras clínicas de pacientes diagnosticados con enfermedad benigna o con cáncer de próstata. Se requiere la validación subsiguiente del transcrito de FMOD en una población masculina mayor para determinar su utilidad potencial como biomarcador del cáncer de próstata. Ya que FMOD codifica un proteoglicano secretado, la evaluación adicional de sus niveles séricos en pacientes con cáncer de próstata y pacientes con enfermedad prostática benigna es requerida.

Metodología

Líneas celulares

Para este estudio empleamos las siguientes líneas celulares de origen humano obtenidas de ATCC (Manassas, VA): LNCaP Clone FGC (ATCC® CRL-1740), sensible a andrógenos, de adenocarcinoma de próstata, metastásica a nódulos linfáticos; PC-3 (ATCC® CRL-1435) derivada de una metástasis ósea de cáncer de próstata, insensible a andrógenos; PWR-1E (CRL-11611) no-tumorigénicas, de epitelio prostático; y PCS-201-012 correspondientes a fibroblastos primarios de piel normal adulta. El mantenimiento rutinario de las células en el laboratorio se hizo a 37°C, 5% CO₂ en atmosfera húmeda, usando como medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen; Carlsbad, CA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco/Invitrogen) y 1% penicilina-estreptomicina (Gibco/Invitrogen) para las células

LNCaP; F-12K modificado (ATCC) con 10% FBS y 1% penicilina-estreptomicina para las células PC-3; medio de queratinocitos libre de suero (Life Technologies) suplementado con 50 ug/mL de extracto pituitario bovino, 5% L-glutamina, y 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico para las células PWR-1E; y DMEM suplementado con 10% FBS para las células PCS-201-012. Las células se cultivaron en monocapas en frascos de cultivo T25 y se pasaron una a dos veces por semana. Para todos los experimentos las células se cosecharon a bajo número de pases.

El panel incluyó los siguientes 21 genes: Molécula específica de células endoteliales-1 (ESM-1/Endocan), inhibidor de peptidasa Serpin-2 (SERPINE2), clusterin (CLU), biglicano (BGN), alfa-2-macroglobulina (A2M), proencefalina (PENK), fibromodulina (FMOD), molécula CD81 (CD81), decorina (DCN), tetraspanina 8 (TSPAN8), Kelch repeat/BTB (POZ) domain containing-10 (KBTBD10), factor de coagulación II (trombina) receptor-like 1 (F2RL1), timosina beta 4 (TMSB4X), sinucleína gamma (SNCG), CXXC finger protein 5 (CXXC5), forkhead box Q1 (FOXQ1), podoplanina (PDPN), y sialoforin (SPN). Se incluyeron los genes previamente establecidos como asociados a metástasis: molécula CD24 y Caveolina-1 (CAV1), y el actual biomarcador para el diagnóstico del cáncer de próstata, Antígeno Prostático Específico/PSA (KLK3), para efectos de validación y comparación. Los genes constitutivos hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa-1 (HPRT1) y β -Actina (ACTB) se incluyeron para normalización de la expresión génica.

Extracción de ARN total y síntesis de cADN

El ARN total se aisló con trizol (TRI-Reagent, Ambion) de cada una de las líneas celulares cuando se encontraban a 80% de confluencia. La concentración y pureza del ARN total se determinó por espectrofotometría a 260/280 nm usando nanodrop™ (Thermo Scientific). ARN total, 1 μ g, se sometió a transcripción inversa para sintetizar cADN de primera cadena, en 20 μ L de reacción usando el estuche QuantiTect Reverse Transcriptase (QIAGEN).

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se diseñaron cebadores específicos para cada gen a evaluar usando el programa Primer-BLAST y las secuencias depositadas en GeneBank, sintetizados por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany), y arreglados en platos de PCR, en triplicados. Las reacciones de PCR se efectuaron para cada gen en cada muestra en triplicado usando el estuche QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN) en un termociclador StepOne (Applied Biosystems), con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de amplificación.

PCR convencional y secuenciación de un fragmento del gen FMOD

Se realizó PCR convencional con cebadores diseñados para amplificar una secuencia de 864 pb entre el primero y segundo exón del gen FMOD. La amplificación se realizó con el estuche GoTaq PCR máster mix y los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 2%, luego se purificaron usando el estuche QIAprep Spin MI 3 Kit (Qiagen, Valencia, CA) y se secuenciaron en ambas direcciones (Genewiz Technical Services, South Plainfield, NJ) usando cebadores específicos para FMOD. Los datos de la secuenciación se compararon con las secuencias publicadas del gen FMOD depositadas en la base de datos GeneBank, usando el programa BLASTN 2.2.

Panel de cADN de muestras clínicas de próstata (Tissue qRT-PCR Arrays)

Para analizar los niveles transcripcionales de fibromodulina en muestras clínicas, se utilizaron paneles comerciales de cDNA arreglados en platos de PCR listos para usar (TissueScan® qPCR Array, Origene Technologies Inc., Rockville, MD, USA). Los paneles incluyeron cDNA obtenido de 39 pacientes diferentes clasificados en dos estados de enfermedad y tejidos normales (10-cáncer, 23-hiperplasia prostática benigna, y 6-normal). TissueScan® qPCR Arrays son paneles normalizadas de cDNA preparados a partir de tejidos tumorales y benignos humanos verificados por patólogos. Los

cDNAs están certificados que provienen de tejidos de alta calidad y utilizados con el consentimiento informado de los pacientes. Después de la suspensión de los cDNAs liofilizados, se efectuó qRT-PCR para analizar la expresión transcripcional del proteoglicano fibromodulina y del antígeno prostático específico en el panel de cDNAs. La expresión fue normalizada al gen constitutivo β -Actina, cuyos cebadores son incluidos en el panel.

Análisis de la expresión génica

Los niveles transcripcionales de cada gen se determinaron con el programa Sequence Detection System 2.1 (Applied Biosystems). La cuantificación de la expresión relativa de cada gen se realizó con el método comparativo C_T ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Para los experimentos con líneas celulares, los niveles de expresión se normalizaron con los de los genes constitutivos HPRT1 β -Actin. Para los paneles de cDNA, los niveles se normalizaron con los de β -actin. Se adquirieron curvas de fusión para todas las muestras para verificar la especificidad de la amplificación.

Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias en expresión génica para cada gen de interés entre cada una de las líneas celulares evaluadas y la línea control de referencia no tumorigénica, se analizaron por ANOVA de dos factores (two way ANOVA) usando el nivel de expresión y el tipo celular como factores y empleando la corrección de Bonferroni. Los resultados se presentan como media \pm SEM.

Todas las observaciones se derivan de al menos tres experimentos independientes. Un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Para los experimentos realizados con el panel de cDNA, las diferencias en expresión de los genes entre el grupo de Cáncer y el grupo Benigno o el grupo Normal se determinaron con la prueba no paramétrica de "mann whitney". Los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con el programa Graphpad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Resultados

Perfil de expresión de candidatos a biomarcadores del cáncer de próstata

Se utilizaron cebadores específicos para los ensayos de expresión por PCR cuantitativa en tiempo real (Tabla 2). En general, los resultados de PCR cuantitativo mostraron que las líneas celulares prostáticas con diferentes fenotipos cancerosos presentan diferentes perfiles de expresión para el grupo de genes evaluados (Tabla 3). CAV1, ESM-1, CD81, CD24, CXXC5, FMOD, KBTBD10, y F2RL1 se encontraron sobreexpresados en las células PC-3 mientras que SERPINE2, DCN, KLK3/PSA y A2M se encontraron subexpresados. Las células LNCaP sobre-expresaron los genes CD81, FMOD, CXXC5, A2M, KBTBD10, y KLK3/PSA, mientras que TMSB4X, SERPINE2, ESM-1, SPN, y DCN estuvieron subexpresados en este tipo celular (Tabla 3).

En detalle, se encontró que los transcritos de los genes CAV1 y ESM-1 estuvieron altamente expresados en la línea celular agresiva PC-3, pero no se detectaron en la línea de baja agresividad LNCaP, mientras que A2M y KLK3 tuvieron altos niveles de expresión en LNCaP pero fueron indetectables en las células PC-3. En ambos tipos celulares, los transcritos de CD81, CXXC5, KBTBD10, y FMOD se encontraron sobre-expresados (Figura 1A), mientras que los transcritos de SERPINE2 y DCN se encontraron sub-expresados (Figura 1B). Las células PC-3 mostraron sobre-expresión de CAV1, ESM-1, CD81, CD24, CXXC5, FMOD, KBTBD10, y F2RL1; mientras que las células LNCaP tuvieron sobre-expresión de KLK3/PSA, CD81, FMOD, CXXC5, A2M, y KBTBD10.

Los genes CAV1, ESM-1, CD24 y F2RL1 se encontraron sobreexpresados solamente en PC-3 mientras que KLK3/PSA y A2M se encontraron sobre-expresados exclusivamente en LNCaP. Los transcritos de los genes CLU, BGN, y SNCG no mostraron expresión diferencial entre las tres líneas estudiadas. A su vez, los transcritos de los genes PENK, TSPAN8 y PDPN no se detectaron en ninguna de las tres líneas celulares evaluadas. KLK3/PSA, el biomarcador de uso en el tamizaje del CaP también fue evaluado encontrándosele

altamente expresado en las células LNCaP e indetectable en las PC-3. Este hallazgo ha sido reportado con anterioridad muchas veces, lo cual le da validez a nuestros resultados de expresión génica en las líneas estudiadas (Yang, Loda et al. 1998; Takahashi, Hoshi et al. 1999; Dozmorov, Hurst et al. 2009).

Tabla 2.
Secuencias de los cebadores para ensayos de PCR

SÍMBOLO OFICIAL DEL GEN	Cebador (FORWARD/REVERSE)	Tamaño del amplicón (BP)	SÍMBOLO OFICIAL DEL GEN	Cebador (FORWARD/REVERSE)	Tamaño del amplicón (BP)
Para RT-qPCR:					
HPRT1	GACCAGTCAACAGGGGACAT	132	TSPAN8	CCACAGGGGAAAGTGAAAAA	160
	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG			CTTTGGCATGGTCTCTGCTT	
ACTB	AGAAAATCTGGCACCACACC	142	KBTBD10	TGCACTGGCTGAGCAGATTCCC	152
	GGGGTGTGAAGGTCTCAA			CCTGGCTGAAGGCAGAGGTGGA	
ESM-1	CAACCAGAAAACCCCTGAAG	151	CD24	GCCAGTCTCTTCGTGGTCTC	142
	TGTTTCTATGCCCGAGAAC			CCTGTTTTCTTCCTGCCACAT	
SERPINE2	TGCGGCTTTTCAGAAGAAAT	150	F2RL1	ATTCTGCCCTGAACATCAC	140
	CCCCAAAATAACGCTTGCTA			AGCACATAGGCAGAGGCTGT	
CLU	GCAAGACTGCTCAGCAAC	153	TMSB4X	TTGAACAGGAGAAGCAAGCA	160
	TCAGGCAGGGCTTACTCT			AGGGGCAGCACAGTCATTTA	
BGN	GGACTCTGTACACCCACCT	159	SNCG	TGTGGTGAGCAGCGTCAACACT	162
	AGCTCGGAGATGTCGTTGTT			TTGGATGCCTCACCCCTCTGTT	
A2M	CTCTGGGTCACTGCTCAACA	158	CAV1	GAGCTGAGCGAGAAGCAAGT	152
	CTGTCTCCAGGCTGACTCC			CAAATGCCGTCAAAACTGTG	
PENK	GCTGTCCAAACCAGAGCTTC	159	CXXC5	GGTGACAAAAGCAACCCTA	140
	TCTGGCTCCATGGGATAAAG			TCAGCATCTCTGTGGACTGC	
FMOD	ACCGTCCCCGATAGCTACTT	145	FOXQ1	TGCTATTGACCGATGCTTCA	154
	GCAGCTGGTTGTAGGAGAGG			GCCCAAGGAGACCACAGTTA	
CD81	TGACCACCTCAGTGCTCAAG	157	PDPN	AGCTCTGCTCTTCGTTTTGG	149
	ATCATGATCACAGCGACCAC			TTCCTGGAGTCACCACATCA	
DCN	GCTCTCTACATCCGATTGCT	128	SPN	GCAACCAGTCATCTGCTGTTC	107
	GTCCTTTCAGGCTAGCTGCATC			CTGGTCTACTGGAGGTTTTCTG	
KLK3	GGAGAGTGACATGTGCTGGA	151	Para PCR convencional:		864
	CTTGGCTCACAGCCTTCTCT		FMOD	TTTATAGCGTCAGGCGGACC TCCAGAGCATTGTTGGGGAC	

*Los cebadores fueron diseñados con Primer-BLAST usando secuencias de la base de datos GenBank y sintetizados por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Para los ensayos de RT-qPCR los cebadores fueron arreglados en platos de PCR en triplicados.

Tabla 3.
Datos de expresión para los genes analizados por PCR
cuantitativa

Grupo funcional/ genes individuales	Símbolo oficial	Fold change				(C _{Tmean})		
		LNCaP	p value	PC-3	P value	PWR-1E	LNCaP	PC-3
Extracellular/ECM								
Endothelial cell-specific molecule 1	<i>ESM-1</i>	ND		645.7	0.0001	37.4	40.5	30.3
CD24 molecule	<i>CD24</i>	-1.13	0.06	29.27	0.015	30.1	30.16	26.7
Fibromodulina	<i>FMOD</i>	29.8	0.0002	7.91	0.0243	36.0	29.8	34.55
Alpha-2-macroglobulin	<i>A2M</i>	16.29	0.0001	ND	0.0001	34.83	31.08	37.64
Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2	<i>SERPINE2</i>	-86.15	0.0001	-27.81	0.0002	29.1	35.34	35.14
Decorina	<i>DCN</i>	-3.368	0.026	-2.27	0.05	32.83	34.51	33.05
Clusterin	<i>CLU</i>	1.22	0.07	-1.45	0.05	22.8	22.6	23.3
Biglycan	<i>BGN</i>	-1.35	0.05	-1.1	0.07	31.7	32.3	32.1
Cell motility								
Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing10	<i>KBTBD10</i>	4.58	0.021	5.57	0.05	31.97	29.6	30.9
Defense response								
Syalophorin	<i>SPN</i>	-8.48	0.0001	1.35	0.0001	34.87	36.68	35.5
Proenkephalin	<i>PENK</i>	ND		ND		30.9	43	41
Development								
thymosin beta 4, X-linked	<i>TMSB4X</i>	-70.0	0.001	1.46	0.001	19.7	24.7	20.7
synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	<i>SNCG</i>	-1.3	0.05	-1.43	0.05	29.5	29.73	29.79
Regulation of cell cycle/ proliferation								
Caveolin 1, 22kDa	<i>CAV1</i>	ND		521	0.014	31.6	37.8	24.1
CD81 molecule	<i>CD81</i>	120	0.025	120	0.005	30.8	23.7	25.3
Transcription Regulation / DNA-binding								
CXXC finger protein 5	<i>CXXC5</i>	13.2	0.001	6.75	0.014	28.6	24.75	27.3
Forkhead box Q1	<i>FOXQ1</i>	-286.8	0.0001	-3.46	0.024	34.7	41.7	36.9
Receptor activity								
Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	<i>F2RL1</i>	1.17	0.0002	5.3	0.0002	23.9	23.4	22.5
Others								
Tetraspanin 8	<i>TSPAN8</i>	ND		ND		41	41	42
Podoplanin	<i>PDPN</i>	ND		ND		40	43	42
Kallikrein-3/Prostate Specific Antigen	<i>KLK3/PSA</i>	4440	0.0001	ND	0.0001	34.3	15.7	37.8

El signo negativo indica genes que estuvieron subexpresados.

ND: no detectado

Los niveles de expresión transcripcional de FMOD y PSA en líneas celulares en cultivo fueron determinados en un ensayo individual. Los niveles transcripcionales de las células LNCaP y PC-3 fueron comparados con los niveles de la línea celular no-tumorigénica PWR-1E, confirmándose para estos dos genes los resultados obtenidos con el panel de biomarcadores. Se incluyó además como referencia para la expresión de fibromodulina a la línea PCS-201-012 correspondiente a una línea ATCC primaria de fibroblastos de piel humana normal, adulta.

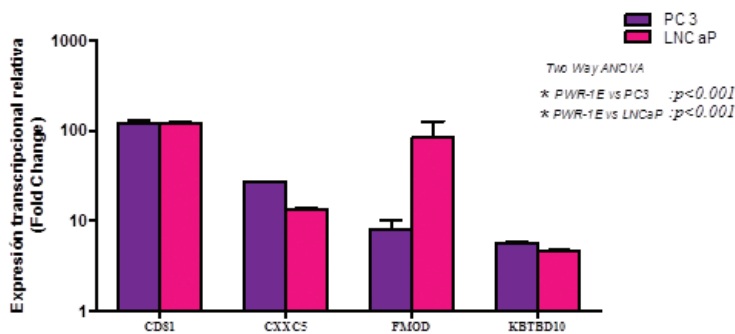
Tabla 4.
Expresión transcripcional de FMOD y PSA en líneas celulares en cultivo.

Los niveles transcripcionales de las células LNCaP, PC3, y PCS-20-012 fueron comparados con los niveles de la línea celular no-tumorigénica PWR-1E. Cambios de expresión positivos (fold change) indican sobre-expresión de transcritos en LNCaP o PC3.

Línea celular	Ct Promedio (DE) de genes blanco y constitutivos				Fold change			
	FMOD	PSA	β -Actina	HPRT	FMOD	<i>p</i>	PSA value*	<i>p</i>
PWR-1E	36,0 (\pm 1,0)	34,3(\pm 0,48)	16,6 (\pm 0,01)	22,56 (\pm 0,036)	1.0	-	1.0	-
PC-3	34,5 (\pm 0,38)	36,8(\pm 0,19)	18,3 (\pm 0,08)	23,74 (\pm 1,38)	4.2	*0.0002	-2,1	*0.001
LNCaP	29,8 (\pm 0,16)	15,7(\pm 0,12)	16,0 (\pm 0,08)	22,9 (\pm 0,052)	26.6	*0.0001	>10,000	*0.0001
PCS-201-012	28,05 (\pm 0,12)	ND	15,8 (\pm 0,18)	22,3 (\pm 0,003)	59.5	*0.0001	ND	-

*valor *p* de prueba *t* (dos colas) para muestras en triplicados. ND: no detectado DE: desviación estándar

Genes sobre-expresados en líneas celulares de cáncer de próstata
(relativo a la línea no-tumorigénica)



Genes Sub-expresados en líneas celulares de cáncer de próstata
(relativo a la línea no tumorigénica)

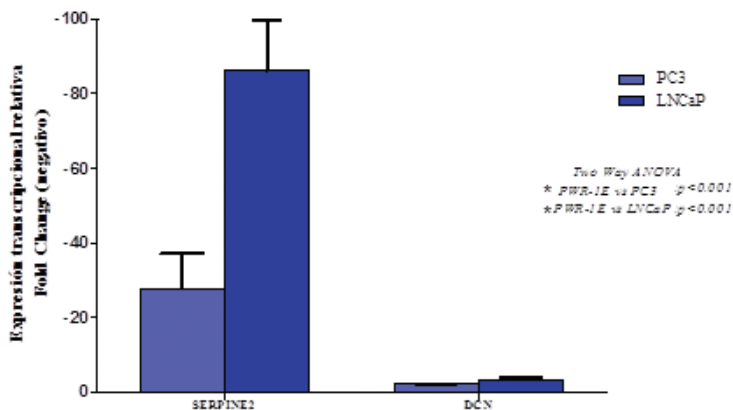


Figura 13. Genes diferencialmente expresados en líneas celulares de cáncer de próstata. Un total de cuatro transcritos génicos se encontraron sobreexpresados (A) y dos transcritos génicos se encontraron subexpresados (B) en las líneas celulares de cáncer de próstata, comparadas con la línea no-tumorigénica PWR-1E. La significancia estadística de las diferencias en expresión génica entre cada una de las líneas prostáticas cancerosas y la línea no-tumorigénica fue determinada mediante ANOVA de dos factores, usando el nivel de expresión y el tipo celular como factores y empleando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Los resultados se expresan como promedios \pm SEM. Se utilizó el programa GraphPad Prism. Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

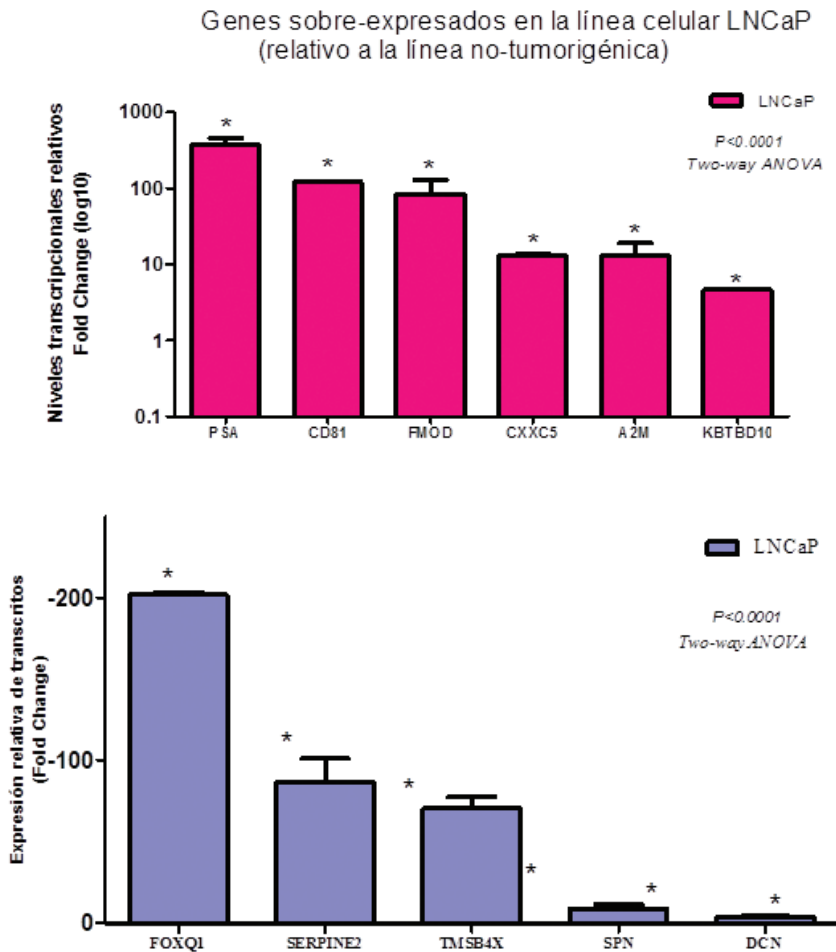


Figura 14. Niveles transcripcionales en células LNCaP relativo a las células no-tumorigénicas PWR-1E. A. Genes sobreexpresados. PSA, CD81, FMOD, CXXC5, A2M, y KBTBD10 se encontraron sobre-expresados en células LNCaP. **B. Genes subexpresados.** FOXQ1, SERPINE2, TMSB4X, SPN y DCN fueron encontrados sub-expresados en la línea LNCaP. Los resultados se expresan como promedios \pm SEM. Se utilizó el programa GraphPad Prism. Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

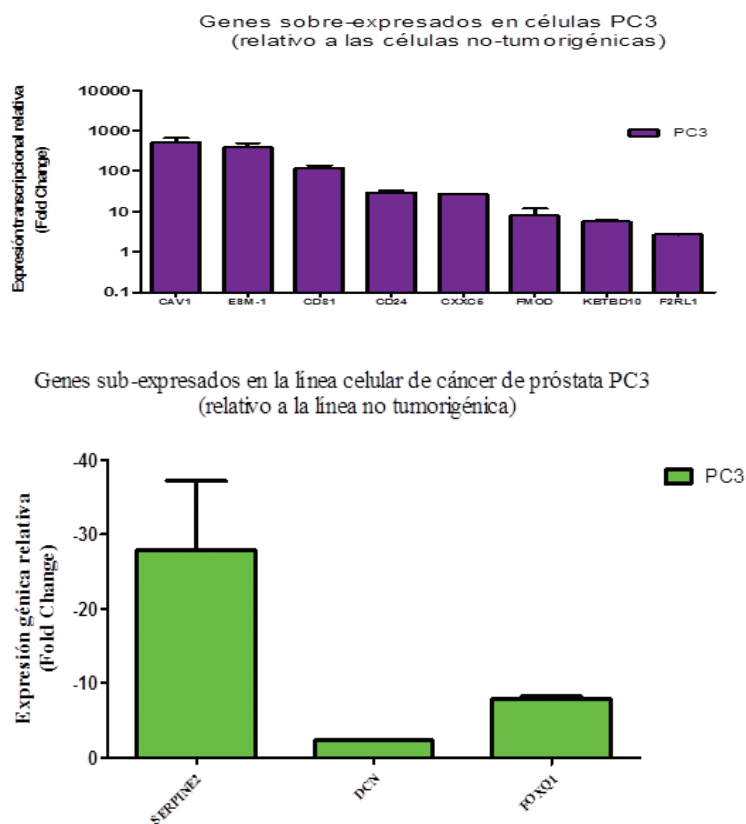


Figura 15. Niveles transcripcionales en células PC-3 relativo a las células no-tumorigénicas PWR-1E. A. Genes sobreexpresados. CAV1, ESM-1, CD81, CD24, CXXC5, FMOD, KBTBD10, y F2RL1 se encontraron sobre-expresados en células PC-3. **B. Genes subexpresados.** SERPINE2, DCN, y FOXQ1, fueron encontrados sub-expresados en la línea PC-3. Los resultados se expresan como promedios \pm SEM. Se utilizó el programa GraphPad Prism. Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Los niveles transcripcionales relativos se calcularon usando el método comparativo C_T ($2^{-\Delta\Delta CT}$) y los niveles de expresión de cada gen en cada muestra se normalizaron a los niveles de expresión de los genes constitutivos HPRT1 y β -Actina. Todos los experimentos se llevaron a cabo en triplicados y se adquirieron curvas de fusión para verificar la especificidad de la amplificación. La significancia estadística de las diferencias en expresión génica entre cada una de las líneas prostáticas cancerosas y la línea no-tumorigénica fue determinada

mediante ANOVA de dos factores, usando el nivel de expresión y el tipo celular como factores y empleando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Los resultados se expresan como promedios \pm SEM. Se utilizó el programa GraphPad Prism. Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Expresión transcripcional de fibromodulina en cDNA de muestras clínicas de tejido prostático

Uno de los genes encontrados diferencialmente expresados en las líneas celulares de próstata fue FMOD, el cual codifica la proteína central del proteoglicano fibromodulina. Este gen fue seleccionado para evaluar su expresión a nivel de muestras clínicas de tejido prostático, para lo cual se utilizó un panel comercial de cDNA de muestras clínicas (TissueScan™ Prostate Cancer qRT-PCR Array/HPRT101; Origene Technologies), comprendido por 39 muestras distribuidas así: 6-normal, 23-hiperplasia prostática benigna, y 7-cánceres. Se identificó una diferencia significativa en los niveles de expresión entre el tejido normal y el canceroso ($p = 0.0363$) y entre el tejido de hiperplasia prostática benigna y el tejido canceroso ($p = 0.0480$) (Figura 4A). El análisis del transcrito de PSA en el mismo panel de cDNA permitió determinar que los niveles de expresión de PSA fueron significativamente más elevados en el grupo de muestras con cáncer de próstata que en el grupo de muestras benignas ($P = 0.0280$) y entre el tejido de hiperplasia prostática benigna y el tejido canceroso ($p = 0.0134$) (Figura 4B).

Secuenciación de un fragmento de DNA de fibromodulina

Para verificar que las líneas de cáncer prostático efectivamente estuvieran expresando el transcrito del gen FMOD, se efectuó PCR convencional usando cDNA obtenido de cada una de las líneas LNCaP y PC-3 en cultivo, y cebadores diseñados para amplificar un fragmento de 864 pb entre el primer y segundo exón del gen FMOD. Como control positivo para la reacción de PCR se usó la línea PCS-201-012 de fibroblasto de piel normal, ya que está bien establecido que los fibroblastos de la piel expresan el gen FMOD (Sztrolovics, Rimoin et al. 1994). El análisis BLAST de la secuencia de DNA amplificada a partir del cDNA, tanto de las líneas cancerosas como de

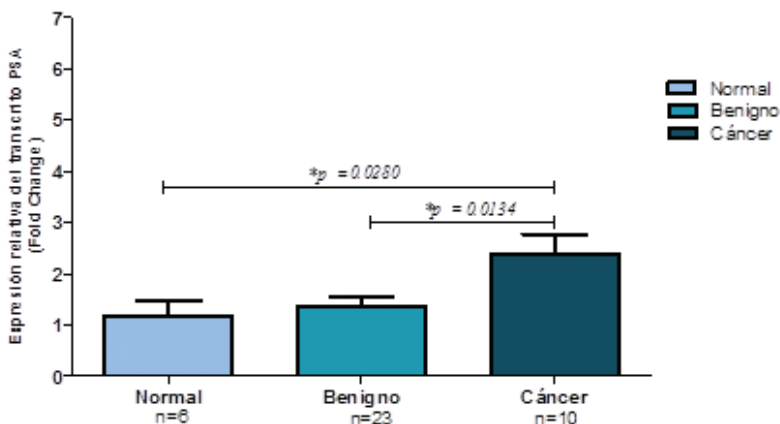
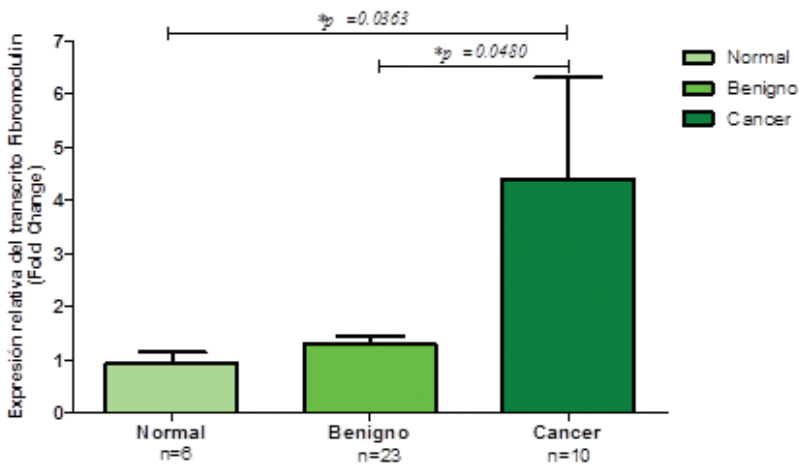


Figura 16. Expresión relativa de transcritos para Fmod y PSA en un panel comercial de cDNA derivado de 39 pacientes. Los niveles de expresión de fibromodulina se evaluaron en un panel de cDNA de muestras clínicas de tejido prostático (panel comercial TissueScan™ Prostate Cancer qRT-PCR Array/HPRT101; Origene Technologies), comprendido por 39 muestras distribuidas así: 6-normal, 23-hiperplasia prostática benigna, y 7-cánceres. Se identificó una diferencia significativa en los niveles de expresión entre el tejido normal y el canceroso ($p=0.0363$) y entre el tejido de hiperplasia prostática benigna y el tejido canceroso ($p = 0.0480$) (Figura 4A). El análisis del transcrito de PSA en el mismo panel de cDNA permitió determinar que los niveles de expresión de PSA fueron significativamente más elevados en el grupo de muestras con cáncer de próstata que en el grupo de muestras benignas ($P=0.0280$) y entre el tejido de hiperplasia prostática benigna y el tejido canceroso ($p = 0.0134$) (Figura 4B).

la línea de fibroblastos, mostró coincidencia total con la secuencia de cDNA publicada para la variante-1 del transcrito de FMOD (GenBank referencia NM_002023), confirmando de esta manera que el transcrito de FMOD es efectivamente expresado por las líneas celulares de cáncer de próstata en cultivo LNCaP y PC-3.

Discusión

Los mecanismos exactos por los cuales el cáncer de próstata progresa desde un estado andrógeno dependiente hasta un fenotipo metastásico no están claramente entendidos, y esto sigue siendo un tema activo de la investigación en cáncer de próstata. La progresión de esta enfermedad ha sido ampliamente estudiada *in vitro* con la ayuda de líneas celulares establecidas, como LNCaP y PC-3. Se considera que LNCaP representa las etapas tempranas del desarrollo del cáncer de próstata ya que su crecimiento es sensible a los andrógenos (Zimmerman, Dozmorov et al. 2004), mientras que las células PC-3 se considera que representan la enfermedad en etapa avanzada ya que su origen es a partir de una metástasis ósea y su crecimiento es insensible a los andrógenos (Kaighn, Narayan et al. 1979).

La línea celular LNCaP originalmente se aisló de una metástasis a ganglio linfático de un adenocarcinoma prostático, y retuvo numerosas propiedades de las células epiteliales de próstata como p53 tipo silvestre, dependencia de andrógenos y expresión de una variedad de marcadores específicos de próstata, las cuáles son características propias de las etapas relativamente tempranas de la progresión del cáncer de próstata (Dozmorov, Hurst et al. 2009). Las células PC-3, por otra parte han adquirido un fenotipo más agresivo que es altamente angiogénico, insensible a andrógenos, característico de la etapa metastásica (Dozmorov, Hurst et al. 2009).

En el estudio que describimos aquí, hemos validado a nivel transcripcional, en un modelo *in vitro* de líneas celulares prostáticas de origen humano, algunos de los genes que previamente encontramos asociados al fenotipo metastásico del cáncer de próstata en un modelo animal *in vitro* (Reyes, Tiwari et al. 2007). Entre los genes relevantes al fenotipo metastásico del cáncer de próstata seleccionados para

este estudio están: *FMOD*, *ESM-1*, *DCN*, *A2M*, *KBTBD10*, *CD81*, *CD24* y *CAV-1*. Algunos de ellos codifican proteoglicanos pequeños ricos en leucina (*FMOD*, *ESM-1* y *DCN*), los cuales son componentes principales de la matriz extracelular requeridos en la homeostasis tisular (Schaefer and Schaefer 2010).

Uno de los genes que no han sido previamente asociados al cáncer de próstata metastásico, el cual encontramos altamente sobreexpresado en la línea PC-3 fue *ESM-1*, también conocido como endocan, el cual codifica un proteoglicano pequeño secretado, capaz de regular la adhesión de células cancerosas circulantes a la vasculatura endotelial, un proceso esencial para la invasión. Además, endocan puede interactuar con diversos factores de crecimiento angiogénicos regulando sus actividades y estimulando sus propiedades metastásicas (Scherpereel, Gentina et al. 2003; Sarrazin, Adam et al. 2006). Por lo tanto, endocan representa un marcador de interés para evaluar en asociación con el pronóstico de la enfermedad como ha sido reportado en carcinoma hepatocelular (Huang, Tao et al. 2009). También pudiera representar un parámetro potencial para el monitoreo de la respuesta del tumor a la terapia antiangiogénica como ha sido observado en cáncer renal (Leroy, Aubert et al. 2010).

Un proteoglicano que se encontró subexpresado en las líneas cancerosas de próstata fue decorina, un miembro de la familia de SLRPs. Se ha reportado previamente, en muchos tipos de cáncer, que la expresión alterada de uno o más proteoglicanos de esta familia, tales como fibromodulina, decorina, biglicano, entre otros, constituye un parámetro relevante para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Garusi, Rossi et al. 2012). Para decorina (*DCN*), su función como molécula antiproliferativa ha sido observada en el cáncer de próstata (Hu, Sun et al. 2009), donde induce un mecanismo de represión tumoral a través de la sub-regulación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), lo que conlleva a la activación de la caspasa-3 y subsecuente apoptosis (Seidler, Goldoni et al. 2006). Además se ha demostrado que la expresión de decorina, así como la de otros proteoglicanos, como biglicano, está frecuentemente reprimida en células cancerosas, existiendo una correlación inversa entre el crecimiento canceroso y la expresión de SLRPs (Schaefer and Iozzo 2012).

Por otra parte, en este trabajo estamos reportando la expresión significativamente aumentada de otro SLRP, fibromodulina, el cual encontramos elevado en las líneas cancerosas LNCaP y PC-3. Se ha mostrado recientemente que fibromodulina y otros miembros de la familia SLRP no solo están implicados en la formación de fibrillas de colágeno y la adhesión celular, sino que también contribuyen a la modulación de factores de transcripción, supresión del crecimiento tumoral y prevención de la apoptosis (Lee and Schiemann 2011; Garusi, Rossi et al. 2012). Fibromodulina ha sido implicado previamente en cáncer, ya que se le encontró altamente sobreexpresado en leucemia linfocítica crónica de células B (CLL-B) (Mayr, Bund et al. 2005; Mikaelsson, Danesh-Manesh et al. 2005; El-Hamid Hassan, Mohamed Samy et al. 2011). Sin embargo, este proteoglicano no ha sido previamente asociado a la patogénesis del cáncer de próstata u otros tumores sólidos (Edwards 2012).

Conclusiones

Nuestro grupo ha reportado previamente la sobreexpresión de transcritos de FMOD en células de cáncer de próstata de rata (Reyes, Tiwari et al. 2007), y en este estudio hemos avaluado su expresión en líneas prostáticas de origen humano y en muestras clínicas de cáncer de próstata (Tabla 4; Figura 1A). Los resultados que hemos obtenido en muestras clínicas humanas, nos muestran que FMOD alberga el potencial de discriminar entre tejido normal o benigno y cáncer de próstata (Figura 1A). Estos resultados resaltan la importancia de continuar la validación de FMOD al nivel de proteína tanto en muestras de tejidos como en otro tipo de muestras clínicas, tales como suero u orina de pacientes, para definir su valor real como biomarcador de diagnóstico temprano o como blanco terapéutico del cáncer de próstata.

Actualmente, la información sobre la expresión del proteoglicano fibromodulina y su participación en la patogénesis del cáncer de próstata es escasa. Se necesita más investigación para clarificar el papel biológico y las implicaciones clínicas de la expresión aumentada de fibromodulina en el cáncer de próstata, y así determinar si potencial como biomarcador de esta enfermedad. Nuestros resultados

favorecen el empleo de líneas celulares como modelos de utilidad para la identificación y evaluación de marcadores potenciales y para el estudio de los efectos biológicos de la expresión diferencial de genes en un modelo controlado y fácilmente manipulable en condiciones *in vitro*. Resulta evidente que se requieren estudios adicionales para determinar la significancia de la expresión transcripcional de fibromodulina y otros proteoglicanos, como endocan y decorina, en células epiteliales de cáncer de próstata y en muestras clínicas de pacientes, para determinar si estos compuestos tienen una participación importante en la carcinogénesis de la próstata o si pueden servir como biomarcadores de utilidad en el manejo de esta enfermedad.

Referencias

- Dozmorov, M. G., R. E. Hurst, et al. (2009). "Unique patterns of molecular profiling between human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells." *Prostate* 69(10): 1077-1090.
- Edwards, I. J. (2012). "Proteoglycans in prostate cancer." *Nat Rev Urol* 9(4): 196-206.
- El-Hamid Hassan, D. A., R. Mohamed Samy, et al. (2011). "Study of fibromodulina gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *J Egypt Natl Canc Inst* 23(1): 11-15.
- Garusi, E., S. Rossi, et al. (2012). "Antithetic roles of proteoglycans in cancer." *Cell Mol Life Sci* 69(4): 553-579.
- Gu, J., Y. L. Wei, et al. (2009). "Identification of RGS1 as a candidate biomarker for undifferentiated spondylarthritis by genome-wide expression profiling and real-time polymerase chain reaction." *Arthritis Rheum* 60(11): 3269-3279.
- Hu, Y., H. Sun, et al. (2009). "Decorina suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways." *Neoplasia* 11(10): 1042-1053.

- Huang, G. W., Y. M. Tao, et al. (2009). "Endocan expression correlated with poor survival in human hepatocellular carcinoma." *Dig Dis Sci* 54(2): 389-394.
- Kaighn, M. E., K. S. Narayan, et al. (1979). "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)." *Invest Urol* 17(1): 16-23.
- Lee, Y. H. and W. P. Schiemann (2011). "Fibromodulina suppresses nuclear factor-kappaB activity by inducing the delayed degradation of IKBA via a JNK-dependent pathway coupled to fibroblast apoptosis." *J Biol Chem* 286(8): 6414-6422.
- Leroy, X., S. Aubert, et al. (2010). "Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma." *Histopathology* 56(2): 180-187.
- Linton, K. M., Y. Hey, et al. (2008). "Acquisition of biologically relevant gene expression data by Affymetrix microarray analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tumours." *Br J Cancer* 98(8): 1403-1414.
- Lohmann, S., A. Herold, et al. (2013). "Gene expression analysis in biomarker research and early drug development using function tested reverse transcription quantitative real-time PCR assays." *Methods* 59(1): 10-19.
- Mayr, C., D. Bund, et al. (2005). "Fibromodulina as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes." *Blood* 105(4): 1566-1573.
- Mikaelsson, E., A. H. Danesh-Manesh, et al. (2005). "Fibromodulina, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma." *Blood* 105(12): 4828-4835.

- Oon, S. F., S. R. Pennington, et al. (2011). "Biomarker research in prostate cancer-towards utility, not futility." *Nat Rev Urol* 8(3): 131-138.
- Quackenbush, J. (2006). "Computational approaches to analysis of DNA microarray data." *Yearb Med Inform*: 91-103.
- Reinholz, M. M., J. E. Eckel-Passow, et al. (2010). "Expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded primary breast tumors using cancer-specific and whole genome gene panels on the DASL(R) platform." *BMC Med Genomics* 3: 60.
- Reyes, I., R. Tiwari, et al. (2007). "DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines." *Biomedica* 27(2): 190-203.
- Sadi, A. M., D. Y. Wang, et al. (2011). "Clinical relevance of DNA microarray analyses using archival formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer specimens." *BMC Cancer* 11: 253:251-213.
- Sardana, G., B. Dowell, et al. (2008). "Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer." *Clin Chem* 54(12): 1951-1960.
- Sarrazin, S., E. Adam, et al. (2006). "Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy." *Biochim Biophys Acta* 1765(1): 25-37.
- Schaefer, L. and R. V. Iozzo (2012). "Small leucine-rich proteoglycans, at the crossroad of cancer growth and inflammation." *Curr Opin Genet Dev* 22(1): 56-57.
- Schaefer, L. and R. M. Schaefer (2010). "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules." *Cell Tissue Res* 339(1): 237-246.
- Scherpereel, A., T. Gentina, et al. (2003). "Overexpression of endocan induces tumor formation." *Cancer Res* 63(18): 6084-6089.

- Seidler, D. G., S. Goldoni, et al. (2006). "Decorina protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation." *J Biol Chem* 281(36): 26408-26418.
- Sztrolovics, R., D. L. Rimoin, et al. (1994). "Single-strand conformation polymorphism analysis of human decorina, biglycan and fibromodulina cDNAs." *Matrix Biol* 14(4): 307-312.
- Takahashi, T., S. Hoshi, et al. (1999). "The study of PSA gene expression on urogenital cell lines." *Int J Urol* 6(10): 526-531.
- Yan, Z., J. Li, et al. (2012). "Identification of candidate colon cancer biomarkers by applying a random forest approach on microarray data." *Oncol Rep* 28(3): 1036-1042.
- Yang, M., M. Loda, et al. (1998). "Identification of genes expressed differentially by LNCaP or PC-3 prostate cancer cell lines." *Cancer Res* 58(16): 3732-3735.
- Zimmerman, R. A., I. Dozmorov, et al. (2004). "5alpha-Androstane-3alpha,17beta-diol activates pathway that resembles the epidermal growth factor responsive pathways in stimulating human prostate cancer LNCaP cell proliferation." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7(4): 364-374.

Capítulo 7.

EXPRESIÓN DE FIBROMODULINA EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Niveles transcripcionales y proteicos de fibromodulina en líneas celulares y tejido prostático humano

Niradiz Reyes, Inés Benedetti, Alfonso Bettín, Juan Rebollo.

Resumen

Fibromodulina es un pequeño proteoglicano rico en leucina (SLRP), importante para la organización de la matriz extracelular y esencial para la reparación tisular en múltiples órganos. La principal función de este proteoglicano es la regulación de las fibras de colágeno. Sin embargo, recientemente se han descrito nuevos roles para fibromodulina, incluyendo regulación de la angiogénesis, reprogramación de fibroblastos humanos en células pluripotenciales, modulación de la actividad de factores de crecimiento como TGF- β , participación en procesos inflamatorios y asociación con fenotipos metastásicos. Adicionalmente, fibromodulina ha sido identificado como un nuevo antígeno tumoral en leucemia, linfoma, y leiomioma. Sin embargo, la información sobre su expresión en la próstata es escasa.

Aquí estamos reportando la expresión de fibromodulina en líneas celulares de próstata humana y en tejido prostático de pacientes con cáncer de próstata y enfermedad prostática benigna. Ensayos de inmunotinción y PCR cuantitativo en las líneas celulares demuestran cantidades significativamente mayores de fibromodulina en las líneas cancerosas, en comparación con líneas no tumorales. En forma semejante, se encontró que el tejido canceroso expresó niveles significativamente más elevados de fibromodulina intracelular comparado con tejido benigno pareado de los mismos pacientes, y con tejido de pacientes con solo enfermedad prostática benigna.

Aspectos generales

Fibromodulina es un integrante de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (*small leucine rich protoglycans, SLRPs*), con funciones importantes en los procesos de organización de la matriz extracelular y en la reparación tisular en múltiples órganos (Ameye, Aria et al. 2002). La principal función descrita para este proteoglicano es la regulación de la fibrillogénesis de colágeno (Chakravarti 2002). Sin embargo, recientemente se han descrito funciones adicionales para este pequeño proteoglicano, entre las que se incluyen regulación de la angiogenesis (Jian, Zheng et al. 2013; Adini, Ghosh et al. 2014), asociación con el fenotipo metastásico de líneas celulares (Reyes, Tiwari et al. 2007), reprogramación de fibroblastos humanos en células multipotenciales (Zheng, Jian et al. 2012), modulación de la actividad de TGF- β (Zheng, Lee et al. 2014) y procesos inflamatorios a través de la activación de la vía clásica del complemento (Sjoberg, Onnerfjord et al. 2005). Otros estudios también lo han identificado como un nuevo antígeno asociado a tumores en leucemia, linfoma, y leiomioma (Levens, Luo et al. 2005; Mayr, Bund et al. 2005; Mikaelsson, Danesh-Manesh et al. 2005; Hassan, Samy et al. 2011).

Aunque fibromodulina ha sido descrito como un proteoglicano secretado con funciones importantes en la matriz celular en tejidos conectivos, se desconocen sus patrones de expresión en otros tipos celulares. Recientemente, a través de un estudio de análisis de expresión génica, detectamos la expresión de este proteoglicano en células cancerosas prostáticas de rata mantenidas en cultivo (Reyes, Tiwari et al. 2007). Otros trabajos han reportado su expresión a nivel proteico en queratinocitos en cultivo y en epidermis humana (Vélez-Delvalle, Marsch-Moreno et al. 2008), suministrando evidencia que este proteoglicano tiene localización intracelular en este tipo celular.

La expresión epitelial y localización intracelular de fibromodulina es un hallazgo reciente que sugiere funciones biológicas potenciales para esta familia de proteoglicanos. Actualmente se desconoce si fibromodulina, como proteína de la matriz extracelular, se encuentra expresado por líneas prostáticas en cultivo, o si está presente en el tejido prostático humano normal, benigno, o maligno.

Nuestra investigación a nivel molecular nos ha permitido identificar la expresión diferencial de este proteoglicano en líneas celulares de próstata y tejido prostático benigno y maligno (*Reyes, N et al. observaciones no publicadas, manuscrito en preparación*). Lo que se conoce sobre su expresión en la próstata, en estos momentos, es muy limitado. Por lo tanto, a través de este trabajo pretendemos aumentar el conocimiento sobre la expresión de este pequeño proteoglicano en la próstata y sus implicaciones en las enfermedades de la misma.

Metodología

La expresión de fibromodulina fue analizada en líneas celulares humanas de la próstata, fibroblastos, y en tejido prostático humano benigno y maligno, mediante el uso de técnicas de PCR cuantitativo en tiempo real, inmunocitoquímica, e inmunohistoquímica. Además, se realizó la secuenciación de un fragmento de DNA amplificado a partir de cDNA obtenido de las líneas celulares estudiadas, utilizando para ello cebadores específicos para el gen FMOD que codifica a fibromodulina.

Consentimiento informado

Los especímenes utilizados en este trabajo se obtuvieron con la aprobación del Comité de Ética institucional, y con el consentimiento informado de los pacientes, los cuales habían sido programados ya sea para procedimientos diagnósticos mediante biopsia transrectal de aguja guiada por ultrasonido o para prostatectomía, en el Hospital Universitario del Caribe en la ciudad de Cartagena de Indias.

Líneas celulares humanas en cultivo in vitro

Se compraron a la ATCC las células de origen humano: LNCaP Clone FGC cells (CRL-1740) correspondientes a adenocarcinoma prostático metastásico, PC-3 (CRL-1435) derivadas de metástasis ósea, PWR-1E (CRL-11611) no tumorigénicas de epitelio prostático, y PCS-201-012 correspondientes a fibroblastos de piel de adulto normal. Las células LNCaP fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI1640 (Gibco/Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco/

Invitrogen) y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco/Invitrogen). Las células PC-3 fueron mantenidas en medio F-12K modificado (ATCC) suplementado con 10% FBS y 1% penicilina-estreptomicina. Las células PWR-1E fueron mantenidas en medio de queratinocitos libre de suero (Life Technologies) suplementado con 50 µg/mL de extracto pituitario bovino, 5% de L-glutamina, y 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico. Las células PCS-201-012 fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% FBS. Todas las líneas celulares, PC-3, PWR-1E, LNCaP, y PCS-201-012 fueron cultivadas en presencia de una atmósfera húmeda con 5% CO₂ a 37 °C y pasadas una a dos veces por semana. Las células se cultivaron como monocapas en frascos de cultivo T-25. Para este estudio, las células se usaron a bajo número de pases: LNCaP de 23 a 26 pases, PC-3 de 28 a 31 pases, PWR-1E de 19 a 25 pases, y PCS-201-012 de 8 a 12 pases.

Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

El RNA total fue aislado de las células LNCaP, PC-3, PWR-1E, and PCS-201-012 cuando estas alcanzaron un 80% de confluencia en los cultivos, utilizando el reactivo TRI-Reagent (Ambion) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La pureza y concentración del RNA total se determinó por espectrofotometría con Nanodrop™ (Thermo Scientific) usando la razón de absorbancias 260/280. 1 µg de RNA total se sometió a transcripción inversa obteniéndose cDNA de primera cadena en un volumen de reacción de 20 µL, utilizando el estuche QuantiTect Reverse Transcriptase (QIAGEN).

RT-PCR y PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

Los cebadores usados fueron diseñados con el programa *Primer3* (Whitehead Institute for Biomedical Research) y sintetizados por IDT technologies (Tabla 1). Para la PCR cuantitativa los cebadores fueron específicos para FMOD y los genes constitutivos β-actina y HPRT(hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1). Para los ensayos de PCR convencional, los cebadores fueron diseñados para amplificar un fragmento de 864 bp entre el primer y segundo exón del gen FMOD.

Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador StepOne (Applied Biosystems), utilizando SYBR Green I. Para cada ensayo, las mezclas de reacción se prepararon sobre hielo, e incluyeron 1.5 µL cDNA, 10 µL QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2X) (QIAGEN), 1 µL de cada uno de los cebadores correspondientes a 0.25 µM, y se agregó agua purificada para un volumen final de 20 µL. Las condiciones de ciclos incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 15 min (HotStarTaq DNA Polymerase activation), seguido de 45 ciclos a 94 °C por 15 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. La expresión relativa de mRNA de fibromodulina se calculó con el programa Sequence Detection System 2.1 (Applied Biosystems), usando el método comparativo C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) y los niveles de expresión para cada muestra fueron normalizados a los niveles de expresión de los genes constitutivos HPRT1 y β -Actina. Todos los experimentos se realizaron en triplicados para todas las muestras y se adquirieron curvas de fusión para verificación de la especificidad de la amplificación. La significancia estadística de las diferencias en expresión génica entre la línea celular prostática no tumorigénica y cada una de las líneas prostáticas cancerosas y la línea de fibroblastos se calculó con la prueba T de Student usando el programa GraphPad Prism (IBM, USA). Un $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Tabla 5.
Secuencias de los cebadores para la amplificación por PCR de FMOD

	SÍMBOLO DEL GEN	SECUENCIA DEL CEBADOR	TAMAÑO DE AMPLICON (Pb)
Para qPCR	HPRT1	GACCAGTCAACAGGGGACAT	132
		CCTGACCAAGGAAAGCAAAG	
	ACTB	AGAAAATCTGGCACCACACC	142
		GGGGTGTGAAGGTCTCAA	
	FMOD	ACCGTCCCCGATAGCTACTT	145
		GCAGCTGGTTGTAGGAGAGG	
Para PCR convencional	FMOD	TTTATAGCGTCAGGCGGACC	864
		TCCAGAGCATTGTTGGGGAC	

Ensayos de PCR convencional y secuenciación

Para la PCR convencional se utilizó el reactivo GoTaq PCR máster mix y los productos de la amplificación se separaron en gel de agarosa al 2%, y se purificaron usando el estuche QIAprep Spin MI 3 Kit (Qiagen, Valencia, CA). El fragmento de DNA purificado se sometió a secuenciación en ambas direcciones (Genewiz Technical Services, South Plainfield, NJ) utilizando cebadores específicos para el gen FMOD. Los datos de la secuenciación fueron comparados con las secuencias publicadas del gen FMOD usando el programa BLASTN 2.2.

Niveles transcripcionales de fibromodulina en especímenes de tejido prostático

Especímenes de biopsias de tejido prostático obtenido de pacientes se colocaron de inmediato en RNeasy Lysis Buffer (Life Technologies) en la sala de operación y se almacenaron a -80°C hasta su utilización en ensayos de extracción de RNA total. Un total de 48 muestras de tejido prostático, integradas por 20 biopsias de tejido hiperplásico benigno y 28 biopsias de tejido prostático canceroso, fueron sometidas a extracción de RNA total con el reactivo TRI-Reagent (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA total se determinó por espectrometría a 260/280 nm usando Nanodrop™ (Thermo Scientific). 1 μg de RNA total se sometió a transcripción inversa para obtener cDNA de primera cadena en un volumen de reacción de 20 μL usando el estuche QuantiTect Reverse Transcriptase (QIAGEN). Los niveles relativos de mRNA de fibromodulina se calcularon con el programa Sequence Detection System 2.1 (Applied Biosystems), usando el método comparativo $C_T (2^{-\Delta\Delta C_T})$ y los niveles de expresión de cada muestra fueron normalizados a los niveles de expresión de los genes constitutivos HPRT1 y β -Actina. Los ensayos de PCR se realizaron en triplicados para todas las muestras y se adquirieron curvas de fusión para verificar la especificidad de la amplificación. La significancia estadística de las diferencias en expresión génica entre los grupos de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y Cáncer de Próstata (CaP) se determinó usando una prueba T no pareada con corrección de Welch, mediante el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Un $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Inmunocitoquímica de líneas celulares y análisis de imágenes

Se colocaron las células a una concentración de 1×10^4 células/ml en platos de petri con fondo de vidrio (FluoroDish™, World Precision Instruments, Inc), en medio de cultivo apropiado, hasta alcanzar una confluencia de ~70%, momento en el cual los platos fueron lavados dos veces con PBS y las células fijadas en 4% para-formaldehído/PBS por 10 min, y lavados tres veces con PBS. Las células se permeabilizaron con PBS suplementado 0.5% Tween 20 por 10 min, y se lavaron tres veces con PBS-T (PBS con 0.1% Tween 20) por cinco minutos cada vez. Los sitios de unión no específicos se trataron con buffer de bloqueo (1% BSA in PBS-T) por una hora a temperatura ambiente. Se agregó anticuerpo primario PA5-26250 (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA) IgG de conejo, policlonal, dirigido contra fibromulín humano a una dilución de 1:100 en UltraClean Diluent (Thermo Scientific) y se incubó a 4° C por 18 horas.

Los platos fueron luego lavados por cinco minutos tres veces con PBS-T, incubados con UltraVision ONE HRP Polymer (Lab Vision, Thermo Scientific) por 30 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, la unión del anticuerpo fue detectada con DAB Plus Chromogen® (3-3'-diamino-benzidine) (UltraVision ONE Detection System® Kit, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Células usadas como controles negativos se trataron de la misma manera y condiciones, pero se incubaron en ausencia de anticuerpo primario. Los núcleos fueron contra teñidos con hematoxilina (Sigma-Aldrich), deshidratados, y montados. La intensidad de la tinción se evaluó a magnificación final de 100x y 400x en un microscopio Eclipse 400 conectado a una cámara DS-Fi1 (Nikon, Japan). La evaluación de la tinción fue realizada por un patólogo que desconocía el tipo celular presente en cada portaobjetos. La intensidad de la tinción se calificó usando el programa NIS-Elements-3.0® en las categorías *fuerte*, *moderado*, *débil*, o *ausente*.

Inmunohistoquímica de muestras de tejido prostático de pacientes

La expresión de fibromodulina se detectó por inmunohistoquímica en secciones seriadas en FFPE obtenidas de especímenes de

prostatectomías de 42 pacientes, los cuales firmaron el debido consentimiento informado en el que aceptaban que se usaran sus tejidos para investigación. Secciones de 4- μ m de tejido prostático en parafina se desparafinaron en xylol y se rehidrataron en alcohol de acuerdo a procedimientos estandarizados. Luego se sometieron a vapor por 30 min en buffer de citrato 10 mM (pH 6.0) para desenmascarar los epitopes, se incubaron con anticuerpo primario PA5-26250 (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA) IgG de conejo, policlonal, dirigido contra fibromulin humano a una dilución de 1:100 en UltraClean Diluent (Thermo Scientific) por tres horas a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se agregó UltraVision ONE HRP Polymer (Lab Vision, Thermo Scientific) por 30 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, la unión del anticuerpo fue detectada con DAB Plus Chromogen® (3-3'-diamino-benzidine) (Ultravision ONE Detection System® Kit, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Como controles negativos se usaron muestras de tejido tratadas de la misma manera pero incubadas en ausencia del anticuerpo primario. Todos los tejidos colocados en los portaobjetos fueron contra teñidos con hematoxilina (Sigma-Aldrich), deshidratados, y montados.

Análisis de imágenes

Las imágenes de las muestras teñidas se capturaron a una magnificación final de 100x y 400x usando un microscopio Eclipse 400 conectado a una cámara DS-Fi1 (Nikon, Japan). La intensidad de la inmunotinción fue evaluada en las regiones con tumor y en el tejido benigno asociado por un patólogo, utilizando el programa NIS-Elements-3.01 (Nikon, Japan), aplicando el H-Score. Para esto, se escogieron al azar 10 campos a una magnificación de 100x y a la intensidad de la tinción en las células epiteliales lumbinales benignas y en las células tumorales se le asignó un puntaje de 0, 1, 2, o 3, correspondiente a negativo, débil, intermedio, y fuerte, respectivamente. Se contabilizó el número total de células en cada campo y el número de células teñidas en cada categoría de intensidad. El porcentaje promedio positivo se calculó aplicándose la siguiente fórmula: $H\text{-score} = (\% \text{ de células teñidas en la categoría de intensidad } 1 \times 1) + (\% \text{ de células teñidas en la categoría de intensidad } 2 \times 2) + (\% \text{ de células teñidas en la categoría de intensidad } 3 \times 3)$. Los valores de H-score se compararon entre ambos grupos

mediante prueba T de Student usando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Resultados

Reportamos la expresión de fibromodulina en las líneas derivadas de tejido prostático humano, fibroblastos de la piel, y tejido prostático canceroso y benigno. Se encontró expresión diferencial entre las líneas celulares prostáticas con diferentes fenotipos cancerosos, tanto a nivel de transcritos como a nivel de proteínas. La expresión de fibromodulina en las líneas celulares fue significativamente mayor en las líneas con fenotipo cancerosos que en la línea no tumorigénica, tanto a nivel de RNA mensajero como de proteína. Adicionalmente, el tejido canceroso de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata expresó niveles significativamente mayores de fibromodulina intracelular que el tejido benigno de pacientes diagnosticados con hiperplasia prostática.

Niveles transcripcionales de fibromodulina en líneas celulares humanas de cáncer de próstata

Los niveles transcripcionales de fibromodulina se determinaron normalizando los datos a la expresión de los genes constitutivos β -actina y HPRT, usando el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se detectaron niveles de expresión diferenciales de fibromodulina en las tres líneas celulares prostáticas y en la línea celular de fibroblastos primarios de piel normal. Los niveles transcripcionales de fibromodulina fueron más elevados en la línea fibroblástica PCS-201-012, seguido de LNCaP y PC3, en comparación con la línea no tumorigénica PWR-1E usada como línea control de referencia. Los datos encontrados proveen evidencia que las líneas celulares de cáncer de próstata expresan niveles transcripcionales diferenciales de fibromodulina (Tabla 6; Figura 1).

Tabla 6.

Perfil de expresión transcripcional de fibromodulina en líneas celulares en cultivo. Los niveles transcripcionales de fibromodulina en las líneas celulares PC3, LNCaP, y PCS-201-012 fueron comparados con los niveles de la línea celular no tumorigénica PWR-1E. Los cambios positivos (“fold change”) en la expresión indican sobreexpresión de transcritos en las células PC3, LNCaP, o PCS-201-012.

Línea celular	Ct Promedio (DE)			“Fold Change”	
	FMOD	β -Actin	HPRT	FMOD	p
PWR-1E	36,0 (\pm 1,0)	16,6 (\pm 0,01)	22,56 (\pm 0,036)	1.0	-
PC3	34,5 (\pm 0,38)	18,3 (\pm 0,08)	23,74 (\pm 1,38)	4.2	*0.0002
LNCaP	29,8 (\pm 0,16)	16,0 (\pm 0,08)	22,9 (\pm 0,052)	26.6	*0.0001
PCS-201-012	28,05 (\pm 0,12)	15,8 (\pm 0,18)	22,3 (\pm 0,003)	59.5	*0.0001

*Valor p de prueba t (dos colas) para muestras en triplicados.

ND: no detectado DE: desviación estándar

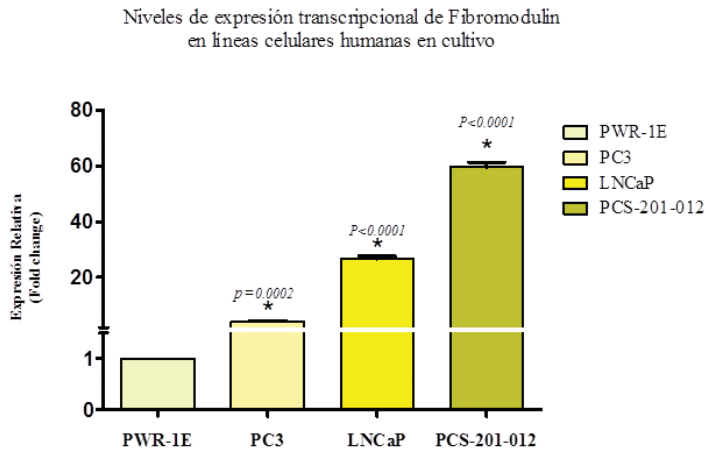


Figura 17. Niveles de expresión transcripcional de fibromodulina en líneas celulares en cultivo.

Los niveles transcripcionales de fibromodulina fueron más altos en la línea celular de fibroblastos PCS-201-012, seguido de LNCaP y PC3, comparado con la línea no tumorigénica PWR-1E. Los niveles relativos de expresión transcripcional de fibromodulina se calcularon usando el método comparativo C_T ($2^{-\Delta\Delta CT}$) y los niveles de expresión para cada muestra se normalizaron con los niveles de expresión de los genes constitutivos HPRT1 (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase-1) y β -Actina. Todos los experimentos fueron realizados en triplicados para todas las muestras y se adquirieron curvas de fusión para verificación de la especificidad de la amplificación. La significancia estadística de las diferencias en expresión génica entre la línea prostática no tumorigénica y cada una de las líneas prostáticas cancerosas y la línea fibroblástica se calculó con la prueba T usando el programa GraphPad Prism. Un valor $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. El error estándar de la media (SEM) se muestra mediante barras de error.

Expresión del núcleo proteico de fibromodulina en líneas celulares humanas

La expresión de fibromodulina se estudió al nivel de proteína mediante inmunocitoquímica en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC-3, y en la línea epitelial prostática no tumorigénica PWR1-E. Como control positivo de la expresión de fibromodulina se utilizó la línea PCS-201-012 correspondiente a fibroblastos primarios de piel normal. La tinción inmunocitoquímica reveló diferencias en la expresión de fibromodulina entre las dos líneas cancerosas LNCaP y PC3, comparadas con la línea no tumorigénica PWR-1E (Figura 2). Mientras que las células PWR-1E mostraron tinción citoplasmática ausente a débil, las células LNCaP presentaron una fuerte tinción citoplasmática y las células PC3 tuvieron un nivel intermedio de expresión evidenciada por una intensidad de moderada a fuerte. La línea fibroblástica PCS-201-012 se usó como control positivo, observándose que estas células presentaron una fuerte intensidad de la tinción similar a la observada en las células LNCaP. Los resultados indicaron que la tinción de fibromodulina fue significativamente más fuerte en las líneas cancerosas prostáticas comparadas con la línea no-tumorigénica.

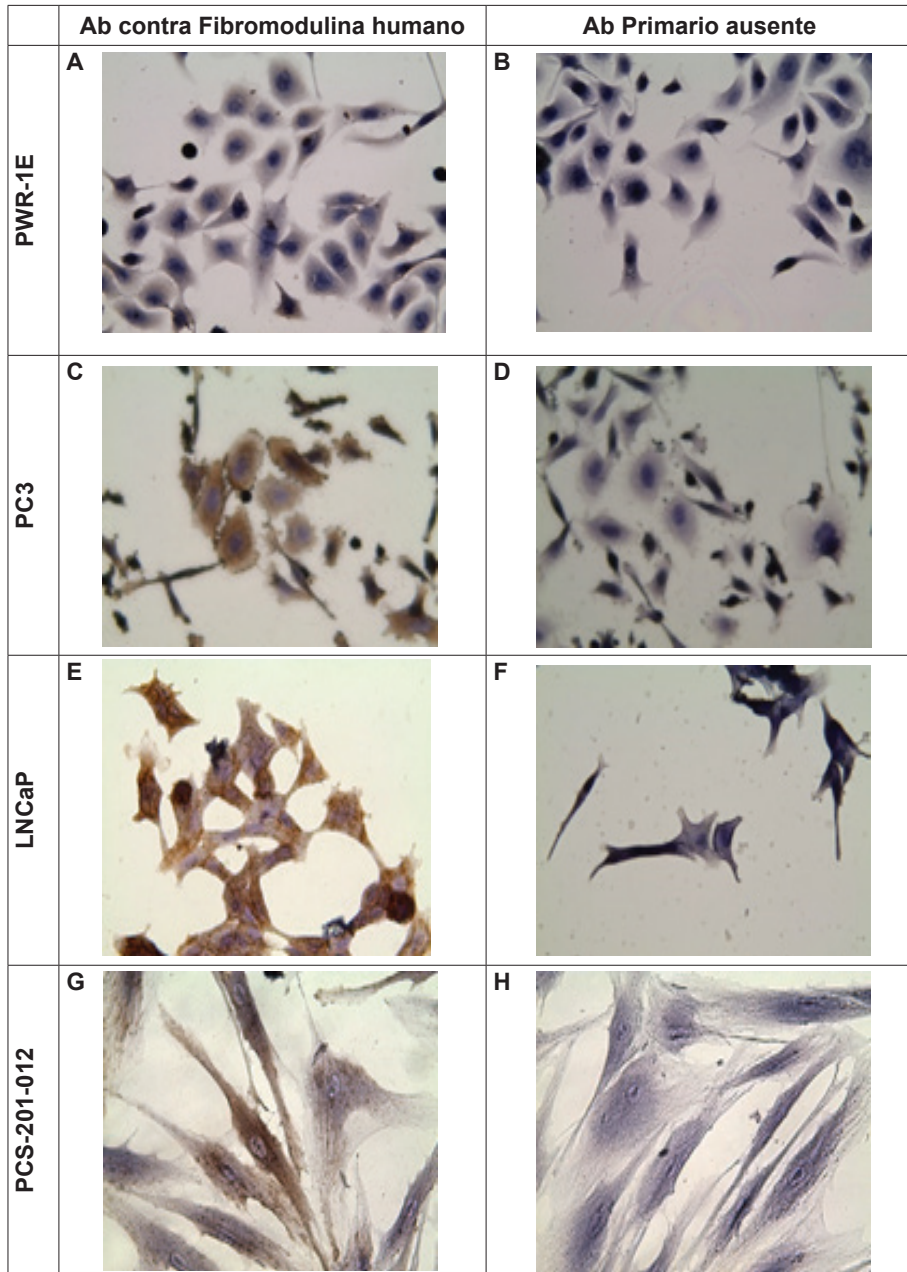


Figura 18. Expresión del núcleo proteico central de fibromodulina en líneas celulares prostáticas y fibroblastos. Los niveles de proteína fueron evaluados mediante

inmunoquímica. Las células fueron incubadas con anticuerpo de conejo dirigido contra fibromodulina humano seguido por incubación con el respectivo anticuerpo secundario. La detección fue efectuada con el sistema HRP Polymer/DAB Plus Chromogen. Células PWR-1E con débil tinción citoplasmática (A). Células PC3 con tinción citoplasmática moderada a fuerte (C). Células LNCaP con fuerte tinción citoplasmática (E). Células PCS-201-012 con fuerte tinción citoplasmática (G). Células teñidas en ausencia de anticuerpo primario se usaron como controles negativos para cada línea celular : PWR-1E (B); PC3 (D); LNCaP (F); PCS-201-012 (H). Magnificación: 400x. Coloración parda: DAB. Coloración azul: contra-tinción de hematoxilina.

Niveles transcripcionales de fibromodulina en tejido prostático tumoral y en hiperplasia prostática benigna

Para evaluar la expresión de fibromodulina en tejidos prostáticos malignos vs. benignos, se llevó a cabo PCR cuantitativa en tiempo real en biopsias de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata (CaP) o con hiperplasia prostática benigna (HPB). Cuando los pacientes fueron agrupados en las categorías CaP y HPB, los niveles de expresión de fibromodulina estuvieron significativamente más elevados en el grupo CaP que en el grupo HPB (Tabla 3; Figura 3) ($p = 0.0282$; prueba *t* no pareada con corrección de Welch). Por lo tanto, los niveles transcripcionales de fibromodulina estuvieron diferencialmente expresados entre los pacientes con CaP y HPB.

Tabla 7.

Perfil de expresión transcripcional de fibromodulina en biopsias de tejido prostático. Niveles transcripcionales en especímenes de biopsias obtenidas de pacientes con HPB y CaP, utilizando el método comparativo CT. Cambios de expresión (“fold change”) positivos indican sobreexpresión de transcritos de fibromodulina relativo a los niveles de los genes constitutivos en cada grupo de pacientes. Cada muestra se analizó por triplicado.

Grupo de pacientes	Ct Promedio (DE)			Fold change (Promedio)	
	FMOD	β -Actin	HPRT	FMOD	<i>p</i>
BPH (<i>n</i> =20)	28,7 (\pm 2,3)	24,6 (\pm 2,9)	35,3 (\pm 3,1)	2,9	*0.0282
PCa (<i>n</i> =28)	25,9 (\pm 2,5)	22,3 (\pm 2,1)	32,6 (\pm 2,2)	5,09	

*Valor *p* de prueba *t* no pareada con corrección de Welch (una cola) para múltiples mediciones.

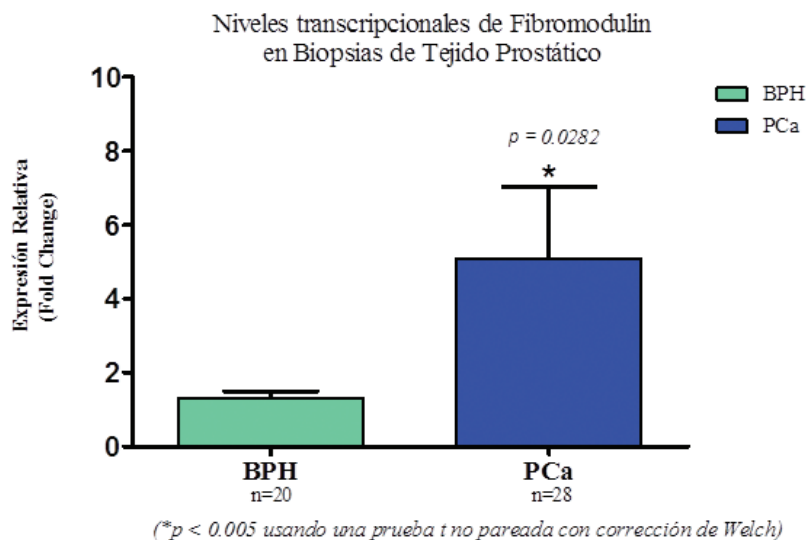
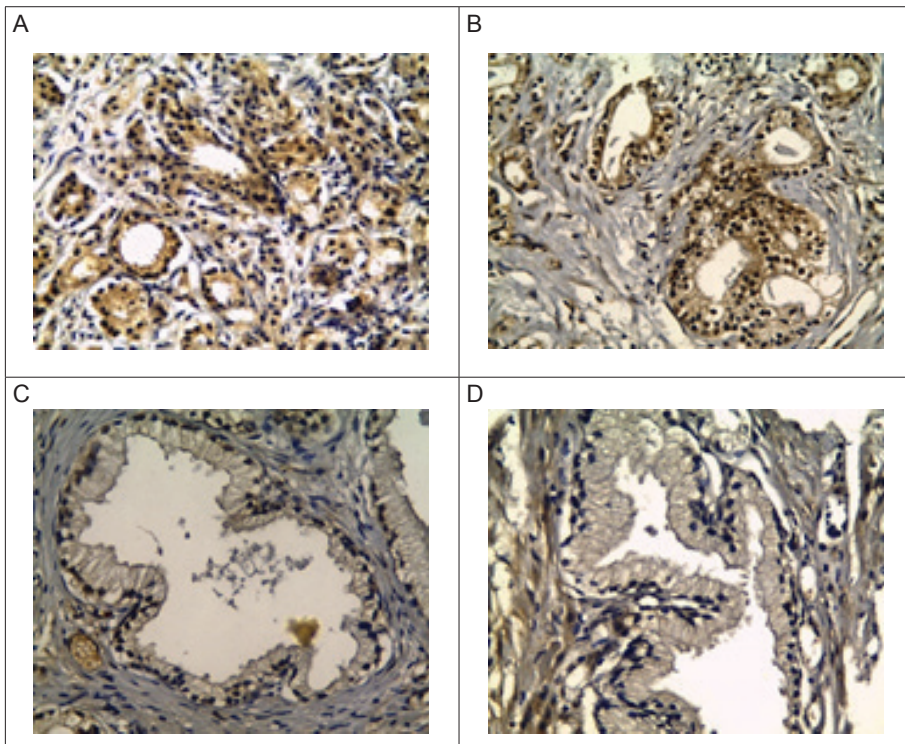


Figura 19. Perfil de expresión transcripcional de fibromodulina en biopsias de tejido prostático. Los niveles transcripcionales de fibromodulina en especímenes de biopsias obtenidas de pacientes diagnosticados con HPB (n=20) o CaP (n=28) se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el método comparativo CT. Cambios de expresión (“fold change”) positivos indican sobreexpresión de transcritos de fibromodulina relativo a los niveles de los genes constitutivos en cada grupo de pacientes. Cada muestra se analizó por triplicado.

Expresión del núcleo proteico central de fibromodulina en muestras de tejido prostático

Para analizar la expresión y localización del núcleo proteico de fibromodulina *in situ*, secciones de tejido prostático canceroso y benigno fueron sometidos a inmunotinción con un anticuerpo primario específico para fibromodulina (Figura 4). La determinación de la intensidad y extensión de la tinción se efectuó en especímenes de prostatectomía de 42 pacientes, usando el H-score. En este grupo de pacientes, el valor H-score medio para las células epiteliales luminales benignas fue de 66.9 y de 136.1 para las células epiteliales tumorales ($p < 0.0001$), lo cual indica que la expresión de fibromodulina en las células de adenocarcinoma estuvo significativamente aumentada en comparación con la expresión de las células epiteliales luminales (Figura 5). El análisis de la inmunotinción dentro de las muestras

individuales de los pacientes mostró que fibromulin se expresó a niveles más altos en las células epiteliales cancerosas que en el estroma prostático circundante (Figura 4A,B). Interesantemente, la tinción de fibromodulina en el tejido canceroso prostático se observó tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células epiteliales (Figura 4A,B). También, dentro del mismo espécimen tisular, la tinción de fibromodulina fue más fuerte en los acinos malignos que en los acinos benignos adyacentes (Figura 4 E,F). Comparando la expresión de fibromodulina entre pacientes con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna, la expresión de fibromodulina fue más alta en muestras de tejido de pacientes con cáncer de próstata (Figura 4A,B) comparado con muestras de pacientes con enfermedad benigna (Figura 4C,D). De forma interesante, fibromodulina también se encontró en *córpora amilácea* de glándulas benignas (Figura 4G). Estas son secreciones luminales presentes comúnmente en acinos prostáticos benignos.



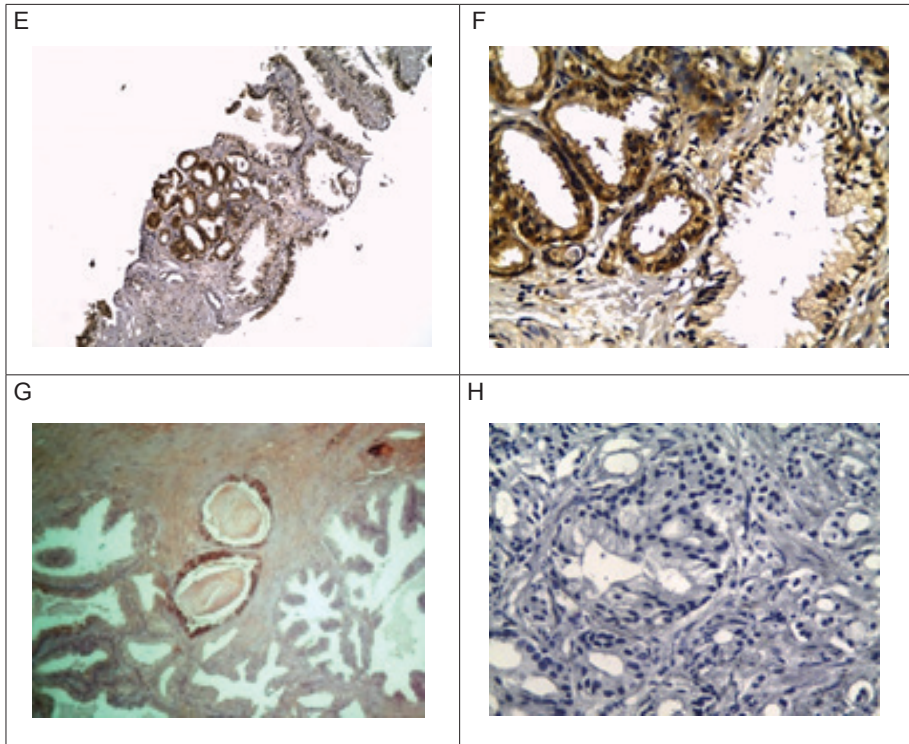


Figura 20. Expresión de proteína fibromodulina en biopsias de tejido prostático. Biopsias de tejido prostático humano fijadas en formalina, embebidas en parafina, se tiñeron con anticuerpo primario de conejo (PA5-26250) dirigido contra fibromodulina humano, usando el sistema HRP Polymer/DAB Plus Chromogen; los núcleos se contra-tiñeron con hematoxilina. Tinción citoplasmática (A) y citoplasmática y nuclear (B) positiva en células epiteliales cancerosas en un espécimen tisular de un paciente diagnosticado con cáncer de próstata Gleason 6 (400x). Débil tinción citoplasmática (C y D) en células epiteliales en un espécimen tisular de un paciente diagnosticado con hiperplasia prostática benigna. Acinos malignos con fuerte tinción, adyacentes a un acino benigno con tinción débil, en un espécimen tisular de un paciente diagnosticado con cáncer de próstata Gleason 6 (100x). Magnificación 400x (F) de un área en la sección E. Tinción de fibromodulina en glándulas benignas conteniendo *córpora amilácea* (G) de un paciente diagnosticado con adenocarcinoma prostático (100x). Control negativo (H) en ausencia de anticuerpo primario.

La intensidad de la inmunotinción fue evaluada en las regiones tumorales y benignas usando el programa NIS-Elements-3.01 (Nikon, Japón). El promedio del valor H-score para células epiteliales luminales benignas fue de 66.9 y 136.1 para células epiteliales tumorales ($p < 0.0001$), indicativo de expresión significativamente aumentada en las

Tinción IHQ en células epiteliales benignas y tumorales

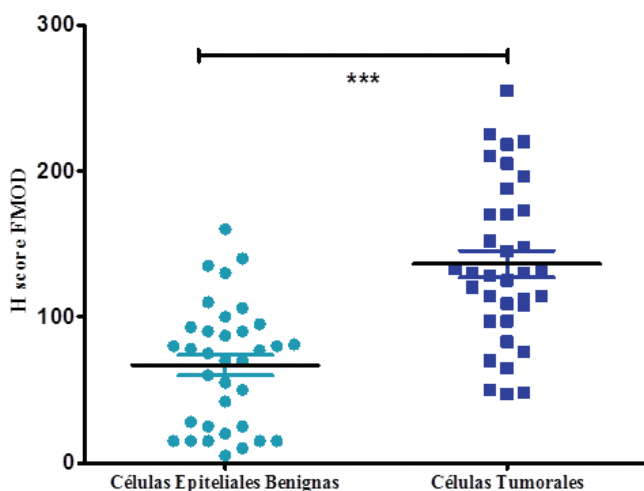


Figura 21. Fibromodulina H-scoring en tejidos prostáticos cancerosos y benignos.

células de adenocarcinoma, comparado con el de las células epiteliales lumbinales. Los valores de H-score se compararon entre ambos grupos con la prueba t usando el programa GraphPad Prism.

Discusión

Fibromodulina es un pequeño proteoglicano rico en leucina, importante para la organización de la matriz extracelular y esencial para la reparación tisular en múltiples órganos. En el presente trabajo realizamos la evaluación inmunocitoquímica de la expresión proteica de fibromodulina en líneas celulares prostáticas. Encontramos que este proteoglicano estuvo ausente o débilmente expresado en las células PWR-1E, expresado moderadamente o fuerte en casi todas las células PC3, y fuertemente expresado en las células LNCaP (Figura 2). La expresión de fibromodulina estuvo claramente restringida al citoplasma de las líneas celulares prostáticas evaluadas mediante inmunocitoquímica.

Por su parte, la evaluación inmunohistoquímica de las biopsias prostáticas demostró que fibromodulina se localizó principalmente

en las células epiteliales y en menor grado en el estroma (Figura 4). Además, la expresión de fibromodulina fue significativamente más fuerte en los acinos cancerosos que en los acinos benignos adyacentes tanto de pacientes con cáncer como de pacientes con HPB (Figura 5).

Actualmente, datos sobre la expresión del proteoglicano fibromodulina y su participación en cáncer de próstata es limitado. Los hallazgos clave de este estudio constituyen un punto de partida para estudios adicionales dirigidos a esclarecer la función biológica y las implicaciones clínicas de la expresión de fibromodulina en cáncer de próstata. Nuestra observación que la expresión intracelular de este proteoglicano en células epiteliales cancerosa de la próstata es más elevada que en el estroma tumoral es de particular significancia, y es consistente con la observación que en los tumores de próstata ocurren cambios complejos en la expresión de proteoglicanos, con una tendencia hacia la expresión aumentada, desplazada desde el estroma tumoral hacia las células epiteliales (Suhovskih, Mostovich et al. 2013).

Un hallazgo interesante de este estudio es la presencia de fibromodulina en el núcleo de células epiteliales tumorales de pacientes con adenocarcinoma prostático, algo que no ha sido reportado previamente, en nuestro conocimiento. Durante la última década, se ha mostrado que diferentes proteoglicanos pueden también estar presentes en el núcleo de diferentes tipos de células tumorales y de fibroblastos tumorales (Richardson, Trinkaus-Randall et al. 2001; Brockstedt, Dobra et al. 2002). Se ha demostrado que estos proteoglicanos se translocan desde otros compartimentos celulares, y no han sido encontrados expresados constitutivamente dentro del núcleo celular (Kovalszky, Hjerpe et al. 2014). La localización nuclear también ha sido observada para algunos SLRPs, incluyendo PRELP, biglicano, decorina, y opticin, lo que ha llevado a proponerse que ellos participan en diferentes procesos nucleares (Liang, Haring et al. 1997; Banerjee, Bhattacharyya et al. 2003; Rucci, Rufo et al. 2009; Mikaelsson, Osterborg et al. 2013). Diversas variantes de decorina han sido encontradas en el citoplasma y en el núcleo de biopsias de cáncer oral humano y en líneas celulares (Banerjee, Bhattacharyya et al. 2003), determinándose que una de las variantes correspondió al núcleo proteico de decorina sin modificaciones

postraduccionales, lo que llevó a sugerir que decorina intranuclear pudiera estar participando en la migración e invasión de las células malignas (Dil and Banerjee 2011).

La presencia de *córpora amilácea* dentro de glándulas benignas con fuerte tinción para fibromodulina es un hallazgo intrigante en el presente estudio. Estos cuerpos de inclusión han sido encontrados en otros tejidos además de la próstata, tales como cerebro, pulmón, ovario, y útero (Rocken, Linke et al. 1996; Hoyaux, Decaestecker et al. 2000; Shintaku 2005). El desarrollo de *córpora amilácea* en la próstata se considera como una fuente de inflamación prostática crónica, ya que estos cuerpos son frecuentemente encontrados cerca de epitelio prostático dañado y de infiltrados inflamatorios focales (Drachenberg and Papadimitriou 1996). Un estudio reciente dirigido a determinar la composición de la *córpora amilácea* en la próstata reportó que las proteínas S100A8 y S100A9 fueron los principales componentes de estos cuerpos de inclusión. Estas dos proteínas han sido asociadas con varias condiciones inflamatorias y tipos de cáncer (Yanamandra, Alexeyev et al. 2009).

Se ha propuesto que la *córpora amilácea* en la próstata corresponde a un subproducto de la secreción de gránulos secretorios prostáticos (*prostatic secretory granules, PSG*), los cuales representan la unidad secretoria básica de la glándula prostática, que contienen muchas de sus proteasas exocrinas (Cohen, Holland et al. 2000). Estudios previos ha reportado la presencia de un proteoglicano de queratan sulfato en la *córpora amilácea* de la próstata (Cohen, Holland et al. 2000; Holland, Meehan et al. 2004). Estudios más recientes muestran que la composición de la *córpora amilácea* de la próstata es compleja, y se ha encontrado muchas proteínas inflamatorias agudas como componentes de la matriz orgánica de estos corpúsculos de inclusión (Sfanos, Wilson et al. 2009). En este trabajo encontramos que un anticuerpo específico para el núcleo proteico de fibromodulina, un proteoglicano de queratán sulfato, causó una fuerte tinción del epitelio prostático, y también causó la tinción de la *córpora amilácea* dentro de acinos prostáticos benignos. Es claro que se requiere de estudios más detallados para confirmar que fibromodulina es un componente estructural de la *córpora amilácea*, y para determinar cuáles son las potenciales implicaciones biológicas asociadas.

Conclusiones

El proteoglicano fibromodulina exhibe expresión diferencial en líneas de cáncer de próstata comparadas con líneas no tumorigénicas y en tejido canceroso comparado con tejido prostático benigno. Se requieren estudios adicionales para determinar la relevancia biológica y clínica de la expresión de fibromodulina en la próstata y si este proteoglicano tiene participación en la carcinogénesis de la próstata y/o en procesos inflamatorios relacionados con el cáncer de próstata.

Los resultados de este estudio evidencian, por primera vez, que el tejido prostático benigno y maligno así como las líneas celulares cancerosas de próstata expresan de forma diferencial el proteoglicano pequeño rico en leucina fibromodulina.

Adicionalmente, la correlación de la expresión aumentada de fibromodulina, tanto a nivel transcripcional como del núcleo proteico central, en células epiteliales cancerosas versus normal/benignas, tanto de líneas celulares como de muestras de pacientes sugiere que las líneas celulares prostáticas pueden ser usadas como modelos útiles para el estudio de los efectos biológicos de la expresión de fibromodulina en un sistema *in vitro* controlado y fácilmente manipulable. Queda por determinar si fibromodulina tiene el potencial de discriminar entre el cáncer de próstata y la enfermedad prostática benigna, y servir así de biomarcador para el cáncer de próstata. Se requieren estudios adicionales para determinar la significancia de la expresión de fibromodulina en células epiteliales de cáncer de próstata y si este proteoglicano cumple alguna función en la carcinogénesis de la próstata o en procesos inflamatorios relacionados con el cáncer de próstata. La localización intracitoplasmática e intranuclear de fibromodulina, identificada en este estudio, justifica investigaciones adicionales. Todavía hay mucho por aprender acerca de la biología de este SLRP y su participación en procesos patológicos complejos, tales como fibrosis, inflamación, y cáncer. Los retos futuros incluyen la elucidación de los eventos de señalización y vías particulares a través de las cuáles fibromodulina ejerce sus acciones biológicas específicas.

Referencias

- Adini, I., K. Ghosh, et al. (2014). "Melanocyte-secreted fibromodulina promotes an angiogenic microenvironment." *J Clin Invest* 124(1): 425-436.
- Ameye, L., D. Aria, et al. (2002). "Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulina-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis." *FASEB J* 16(7): 673-680.
- Banerjee, A. G., I. Bhattacharyya, et al. (2003). "Aberrant expression and localization of decorina in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma." *Cancer Res* 63(22): 7769-7776.
- Brockstedt, U., K. Dobra, et al. (2002). "Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements." *Exp Cell Res* 274(2): 235-245.
- Cohen, R. J., J. W. Holland, et al. (2000). "Identification of the glycosaminoglycan keratan sulfate in the prostatic secretory cell." *Prostate* 44(3): 204-209.
- Chakravarti, S. (2002). "Functions of lumican and fibromodulina: lessons from knockout mice." *Glycoconj J* 19(4-5): 287-293.
- Dil, N. and A. G. Banerjee (2011). "A role for aberrantly expressed nuclear localized decorina in migration and invasion of dysplastic and malignant oral epithelial cells." *Head Neck Oncol* 3: 44.
- Drachenberg, C. B. and J. C. Papadimitriou (1996). "Prostatic corpora amylacea and crystalloids: similarities and differences on ultrastructural and histochemical studies." *J Submicrosc Cytol Pathol* 28(2): 141-150.
- Hassan, D. A., R. M. Samy, et al. (2011). "Study of fibromodulina gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *J Egypt Natl Canc Inst* 23(1): 11-15.

- Holland, J. W., K. L. Meehan, et al. (2004). "Purification of the keratan sulfate proteoglycan expressed in prostatic secretory cells and its identification as lumican." *Prostate* 59(3): 252-259.
- Hoyaux, D., C. Decaestecker, et al. (2000). "S100 proteins in Corpora amyloacea from normal human brain." *Brain Res* 867(1-2): 280-288.
- Jian, J., Z. Zheng, et al. (2013). "Fibromodulina promoted in vitro and in vivo angiogenesis." *Biochem Biophys Res Commun* 436(3): 530-535.
- Kovalszky, I., A. Hjerpe, et al. (2014). "Nuclear translocation of heparan sulfate proteoglycans and their functional significance." *Biochim Biophys Acta* 1840(8): 2491-2497.
- Levens, E., X. Luo, et al. (2005). "Fibromodulina is expressed in leiomyoma and myometrium and regulated by gonadotropin-releasing hormone analogue therapy and TGF-beta through Smad and MAPK-mediated signalling." *Mol Hum Reprod* 11(7): 489-494.
- Liang, Y., M. Haring, et al. (1997). "Glypican and biglycan in the nuclei of neurons and glioma cells: presence of functional nuclear localization signals and dynamic changes in glypican during the cell cycle." *J Cell Biol* 139(4): 851-864.
- Mayr, C., D. Bund, et al. (2005). "Fibromodulina as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes." *Blood* 105(4): 1566-1573.
- Mikaelsson, E., A. H. Danesh-Manesh, et al. (2005). "Fibromodulina, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma." *Blood* 105(12): 4828-4835.
- Mikaelsson, E., A. Osterborg, et al. (2013). "Opticin, a small leucine-rich proteoglycan, is uniquely expressed and translocated to the nucleus of chronic lymphocytic leukemia cells." *Exp Hematol Oncol* 2(1): 23.

- Reyes, I., R. Tiwari, et al. (2007). "DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines." *Biomedica* 27(2): 190-203.
- Richardson, T. P., V. Trinkaus-Randall, et al. (2001). "Regulation of heparan sulfate proteoglycan nuclear localization by fibronectin." *J Cell Sci* 114(Pt 9): 1613-1623.
- Rocken, C., R. P. Linke, et al. (1996). "Corpora amylacea in the lung, prostate and uterus. A comparative and immunohistochemical study." *Pathol Res Pract* 192(10): 998-1006.
- Rucci, N., A. Rufo, et al. (2009). "The glycosaminoglycan-binding domain of PRELP acts as a cell type-specific NF-kappaB inhibitor that impairs osteoclastogenesis." *J Cell Biol* 187(5): 669-683.
- Sfanos, K. S., B. A. Wilson, et al. (2009). "Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amylacea and calculi in men with prostate cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9): 3443-3448.
- Shintaku, M. (2005). "Corpora amylacea in a mature cystic teratoma of the ovary." *Neuropathology* 25(2): 175-176.
- Sjoberg, A., P. Onnerfjord, et al. (2005). "The extracellular matrix and inflammation: fibromodulina activates the classical pathway of complement by directly binding C1q." *J Biol Chem* 280(37): 32301-32308.
- Suhovskih, A. V., L. A. Mostovich, et al. (2013). "Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer." *ISRN Oncol* 2013: 680136.
- Vélez-Delvalle, C., M. Marsch-Moreno, et al. (2008). "Fibromodulina gene is expressed in human epidermal keratinocytes in culture and in human epidermis in vivo." *Biochem Biophys Res Commun* 371(3): 420-424.

Yanamandra, K., O. Alexeyev, et al. (2009). "Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate." *PLoS One* 4(5): e5562.

Zheng, Z., J. Jian, et al. (2012). "Reprogramming of human fibroblasts into multipotent cells with a single ECM proteoglycan, fibromodulina." *Biomaterials* 33(24): 5821-5831.

Zheng, Z., K. S. Lee, et al. (2014). "Fibromodulina-deficiency alters temporospatial expression patterns of transforming growth factor-beta ligands and receptors during adult mouse skin wound healing." *PLoS One* 9(3): e90817.

Agradecimientos

*Al Departamento Administrativo de Ciencia y Tecnología - Colciencias
Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la Salud
y a la Universidad de Cartagena
por la financiación del
proyecto #10745921483
Contrato #462-2008
del cual derivó esta
publicación.*

La impresión de este libro se realizó en papel bond blanco 75 grs. para páginas interiores y propalcote de 300 grs para la portada con plastificado mate. Con un tiraje de 200 ejemplares. El libro *Expresión de proteoglicanos en la próstata: Biomarcadores potenciales con implicaciones patológicas* de la autora Niradiz Reyes, hace parte de la tercera convocatoria para la publicación de libros de la colección de investigación Gabriel García Márquez. El diseño y diagramación se realizó en Alpha Editores y se terminó de imprimir en el año 2016, en la empresa Alpha Editores, en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia.

La investigación en el campo de los proteoglicanos está expandiéndose continuamente a medida que se descubren nuevas funciones para los diferentes miembros de este grupo de moléculas bioactivas. De gran interés es el descubrimiento de la ubicación intracelular de algunos proteoglicanos, lo cual ha sido objeto de investigación reciente.

En el presente libro se describen los experimentos y resultados desarrollados por el Grupo de Investigación Genética y Biología Molecular de la Universidad de Cartagena, los cuales han conducido a identificar la implicación en cáncer de próstata de miembros de este grupo biológico de componentes de matriz extracelular conocidos como proteoglicanos, especialmente los de la familia de Pequeños Proteoglicanos Ricos en Leucina.

También se revisa la literatura científica alrededor del cáncer de próstata, la próstata misma, los proteoglicanos y su implicación en el desarrollo y progresión del cáncer, con especial énfasis en el de próstata.



Universidad de
Cartagena
Fundada en 1827



ISBN: 978-958-8736-92-1



9 789588 736921