

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SINDECANOS 1  
Y 2 POR EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL SNAIL EN  
LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER PROSTÁTICO.**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al  
grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en  
Bioquímica Clínica Aplicada y Memoria para optar al Título  
de Bioquímico por:**

***Valentina Paz Seguel Fernández***

**Director de Tesis: Dr. Héctor Contreras.**

**Santiago-CHILE**

**Julio 2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata**

**Valentina Paz Seguel Fernández**

**Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día**

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Héctor Contreras.**\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Carmen Romero.**\_\_\_\_\_

**Dra. Alfonso Paredes.**\_\_\_\_\_

**Dr. Raúl Valdevenito.**\_\_\_\_\_

*En los momentos de crisis, sólo la imaginación  
es más importante.*

*Albert Einstein.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al finalizar esta etapa me gustaría agradecer por el cariño, comprensión y apoyo brindado en todo momento por mi familia, amigos y compañeros. Estoy convencida que este es un triunfo compartido, ya que nada de esto hubiera sido posible sin ustedes.

En primer lugar agradezco a mis padres Fabiola y Fernando por su apoyo incondicional durante toda mi vida. Porque siempre han confiado en mí y en mis decisiones, pero que han sabido guiarme en los momentos complicados con paciencia y amor. Gracias a ustedes he podido lograr todo lo que he logrado. No sólo en el ámbito académico, si no que en todos los aspectos de mi vida ustedes son ejemplos a seguir. Me siento profundamente agradecida y orgullosa de tener los padres que tengo.

A mi amor Rodrigo por apoyarme, contenerme y escucharme siempre que tenía problemas o estaba demasiado cansada de estudiar o del trabajo en el laboratorio. Pero por sobre todo por compartir todas las alegrías y momentos felices disfrutando juntos. Sin tu ayuda, amor y comprensión jamás hubiera podido terminar esta tesis. Gracias por compartir esta felicidad conmigo. Te Amo.

A mi tía Verónica, por todo lo que me ha enseñado, por inculcarme desde pequeña a ser responsable y trabajadora. Por haber estado conmigo durante toda mi vida siendo como una segunda madre para mí, por toda su preocupación, pero lo más importante gracias por su inmenso cariño.

A toda mi familia, abuelos, tías y primos, que han estado siempre apoyándome, muchas veces sin entender bien lo que hacía, porque estaba tan ocupada o porque siempre estaba en el laboratorio, pero que siempre me impulsaron a seguir adelante. Espero siempre hacerlos sentir orgullosos.

A mis amigas, Valeria, Pía y María Paz, que supieron alegrarme y darme ánimo y energía para terminar esta tesis.

A Eduardo por su ayuda en los PCRs y buena onda en todo momento que lo necesite.

Al Laboratorio de Regulación Génica de la UNAB, por acogerme como si fuera una integrante más, por todos los momentos compartidos que hicieron que llegar a un lugar nuevo y a realizar una técnica desconocida fuera más fácil. Especialmente a Hugo, quién sin su ayuda hubiera sido imposible desarrollar mi tesis, por su paciencia al trabajar conmigo, ganas de enseñarme y por sobre todo por convertirse en un gran amigo.

A todos mis compañeros del LACyM, por hacer una etapa inolvidable mi periodo de tesis, por soportarme y hacerme reír siempre. En especial a Graciela y Rodrigo, los mejores compañeros de laboratorio que alguien podría haber tenido, por convertirse en dos grandes amigos, por todos los momentos de risas y alegrías que vivimos, por enseñarme todo lo que necesité, apoyarme y aconsejarme cuando las cosas no salían o cometía un error.

A los profesores, Dr. Enrique Castellón y también Dr. Héctor Contreras, tutor de esta tesis, que confió en mí para este proyecto, me dejó tomar mis propias decisiones y en los momentos más complicados me apoyo con su alegría y amistad.

Mis más sinceros agradecimientos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	Resumen.....	7
I.	Abstract.....	8
II.	Introducción	
	II.1. Anatomía y función de la glándula prostática.....	11
	II.2. Cáncer de próstata.....	12
	II.3. Transición epitelio mesenquimal.....	13
	II.4. Snail.....	15
	II.5. Moléculas de adhesión.....	19
	II.6. Sindecanos	19
	II.6.a.Sindecano 1.....	20
	II.6.b. Sindecano 2.....	21
	II.7. Posible regulación de Snail a Sindecanos 1 y 2.....	22
III.	Hipótesis.....	24
IV.	Objetivo general y específicos.....	24
V.	Materiales y Métodos.....	25
VI.	Resultados.....	31
VII.	Discusión.....	48
VIII.	Conclusión.....	52
IX.	Referencias.....	53

## ABREVIATURAS

IA	Área inmunorreactiva
CaP	Cáncer de próstata
cDNA	DNA complementario
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DOI	Densidad óptica integrada
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética
GSK3- $\beta$	Glicógeno sintasa kinasa-3 beta
H3/4	Histona 3/4
HDAC	Histona desacetilasa
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IgG	Inmunoglobulina G
HPB	Hiperplasia prostática benigna
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
mRNA	RNA mensajero
MACs	Moléculas de adhesión celular
NES	Señal de exporte nuclear
PBS	Buffer Fosfato Salino
PRC2	Complejo represivo polycomb 2
PSA	Antígeno prostático específico
RNA	Ácido ribonucleico

## I.-RESUMEN

Durante la progresión tumoral las células epiteliales malignas pierden su polaridad, disminuyen la adhesión celular, aumentan la motilidad y adquieren capacidad invasiva. Este proceso se conoce como transición epitelio mesenquimal (TEM). En el cáncer de próstata (CaP) la disminución en la expresión de e-cadherina, que es inhibida por el factor de transcripción snail, se acompaña de una serie de otros cambios que facilitan el fenotipo mesenquimal. Las moléculas de adhesión celular (MACs) sindecano 1 y sindecano 2 cambian sus patrones de expresión y localización celular en relación a la agresividad del tumor prostático. A través de un análisis *in silico*, se ha descrito que existen sitios putativos de unión para snail en las regiones promotoras de los genes de sindecano 1 y sindecano 2. El objetivo de esta tesis es demostrar que snail se une a regiones específicas de estos promotores reprimiendo su expresión en líneas celulares de CaP.

El presente trabajo se realizó utilizando líneas celulares comerciales de CaP de baja (LNCaP) y alta (PC3) capacidad tumorigénica. Se estudió la unión de snail a regiones promotoras de los genes de sindecano 1 y 2, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y retardo en la movilidad electroforética en ambas líneas celulares. Para determinar si snail participa en la regulación transcripcional de sindecano 1 y sindecano 2 se generó mediante infección con lentivirus una línea celular, LNCaP-Snail+, con sobreexpresión de snail mediante PCR en tiempo real e inmunofluorescencia, se determinaron los niveles mRNA y proteínas de snail, sindecano 1 y sindecano 2. Complementariamente se clonó el promotor de sindecano 1 para evaluar, mediante ensayos de gen reportero con actividad luciferasa, el efecto de la sobreexpresión de snail en la regulación génica de sindecano 1.

Los resultados obtenidos mediante ChIP en este estudio demuestran que existe una interacción de snail con las dos zonas más próximas al sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen de sindecano 1, pero que no existe interacción de snail con la región promotora de sindecano 2. Se confirmó que los niveles del

transcrito y proteína snail aumentan en la línea celular LNCaP-Snail+ en comparación con líneas controles. Al determinar el efecto de la sobreexpresión de snail no se observaron disminuciones en los niveles de mRNA y proteínas de las moléculas sindecano 1 y sindecano 2 cuando existía sobreexpresión de snail. El ensayo de gen reportero tampoco da cuenta de una represión en el promotor de los genes de sindecano 1 en la línea celular LNCaP-Snail+.

Es posible concluir que existe unión de snail con dos regiones sólo en el promotor de sindecano 1, pero no existe una disminución en la expresión de esta molécula de adhesión en la línea celular LNCaP-Snail+. En el modelo estudiado no existe una disminución en la expresión de sindecano 1 y sindecano 2 cuando se sobreexpresa snail. Se propone que snail participa en la regulación génica de sindecano 1 en conjunto con otros represores transcripcionales que aún no han sido estudiados.

## **I.-ABSTRACT**

During tumor progression epithelial cells lose their polarity, decrease their cell adhesion, increase their motility and acquire invasive capacity. This process is known as epithelial mesenchymal transition (EMT). In prostate cancer (PCa), the loss of e-cadherin, which is inhibited by the expression of snail, is accompanied by a number of other changes that facilitate the mesenchymal phenotype. The cellular adhesion molecules (CAMs) syndecan 1 and syndecan 2 change their patterns of expression and cellular localization in relation to prostate tumor aggressiveness. Through a *in silico* analysis, we have described putative snail binding sites in promoter regions of syndecan 1 and 2 genes. The aim of this thesis is to demonstrate that snail binds to specific regions of these promoters repressing their expression in PCa cell lines.

This work was performed using commercial PCa cell lines with low (LNCaP) and high (PC3) tumorigenic capacity. The snail binding to promoter regions of genes syndecan 1 and 2 was studied through chromatin immunoprecipitation (ChIP) and electrophoretic mobility shift assay in both cell lines. To determine whether snail participates in the transcriptional regulation of syndecan 1 and syndecan 2, a cell line (LNCaP-Snail+) with overexpression of snail was generated by infection with lentivirus, and through real time PCR and immunofluorescence, mRNA levels and protein snail, syndecan 1 and syndecan 2 were determined. Additionally promoter of syndecan 1 was cloned to evaluate, by reporter gene assays with luciferase activity, the effect of the overexpression of snail in gene regulation of syndecan 1.

The results obtained by ChIP in this study show that snail interacts with the two regions closer to the start site of transcription of the gene promoter syndecan 1, but no interaction of snail with the promoter region of syndecan 2. It was confirmed that the snail transcript and protein levels increase in LNCaP-Snail+ cell line compared to controls. The snail overexpression was not reduced syndecan 1 and syndecan 2 mRNA and protein levels. The reporter gene assay result also shows no repression in the promoter of the gene of syndecan 1 in the LNCaP-Snail+ cell line.

We conclude that there is snail binding with only two regions in the promoter of the syndecan 1 gene, but there is no decrease in the expression of this CAM in the LNCaP-Snail+ cell line. In this model study, snail was not involved in gene regulation of syndecan 1. It is proposed that snail is involved in gene regulation of syndecan 1 in conjunction with other repressor molecules that have not yet been studied.

## II.- INTRODUCCIÓN

### II.1. ANATOMÍA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA PROSTÁTICA:

La próstata es una glándula exocrina perteneciente al sistema reproductor masculino, está ubicada frente al recto, debajo de la vejiga y rodeando un segmento de la uretra. Su función principal es producir aproximadamente el 30% del líquido seminal, favoreciendo la motilidad y nutrición de los espermatozoides. Las principales patologías que pueden afectar a la glándula prostática son, prostatitis (infección a la próstata), hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer prostático (CaP)).

Anatómicamente se pueden distinguir 4 zonas: periférica o externa, central o transicional, periuretral y anterior (Figura 1.A). La mayoría de las HPB se desarrollan en la zona transicional, mientras que las lesiones cancerígenas con frecuencia se generan en la zona periférica de esta glándula. Histológicamente la próstata consta de acinos y ductos, de tamaño variable, alineados en una doble capa de células epiteliales, donde se encuentra la capa luminal que aporta los nutrientes y la capa de células basales que actúan como reserva para reemplazar a las células secretoras que desarrollan muerte celular<sup>1,2</sup>(Figura 1.B).

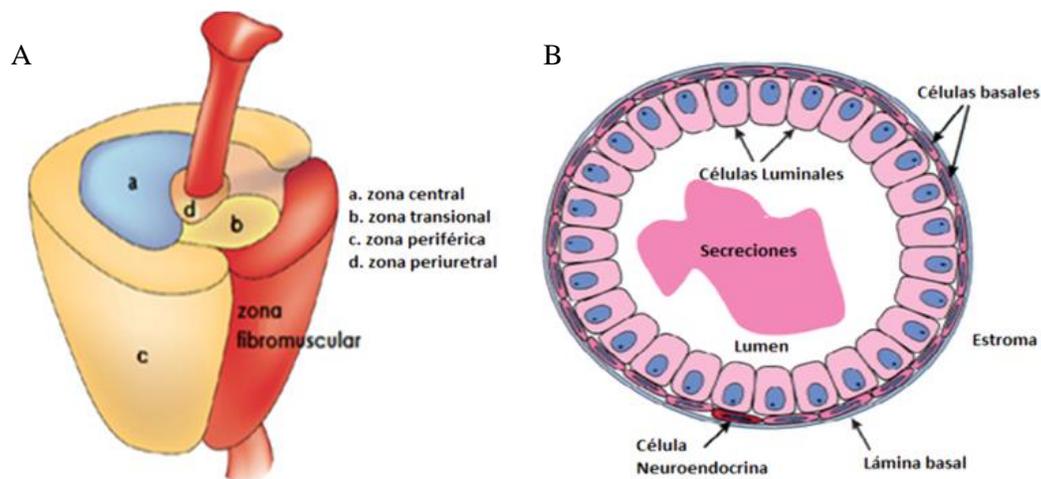


Figura 1: A) Estructura funcional de la próstata. (Figura adaptada de De Marzo et al. 2007). B) Esquematización del epitelio prostático (Abate y col. 2000)

## II.2. CÁNCER DE PRÓSTATA

El CaP es el segundo cáncer con mayor incidencia en el sexo masculino en el mundo<sup>1</sup> y la segunda causa de muerte por tumores malignos en pacientes de sexo masculino en nuestro país, se estima que 1.900 chilenos mueren al año por CaP<sup>3,4</sup>. La frecuencia de la enfermedad se incrementa con la edad, siendo más común después de los 50 años, y el pronóstico para el paciente es dependiente de la extensión y estadio del tumor. El principal problema con el diagnóstico es que en muchos casos no se presentan síntomas en un comienzo el tumor se pesquisa cuando ya es muy agresivo.

En general el CaP localizado presenta una progresión lenta, con un tiempo estimado de duplicación de 2 años. Sin embargo, su historia natural puede ser muy variable entre pacientes. En una gran proporción de los casos el carcinoma permanecerá confinado a la glándula prostática pero en algunos casos adquirirá la capacidad de producir metástasis, siendo ésta la mayor causa de muerte en pacientes con CaP<sup>5</sup>. El tejido más afectado por metástasis originadas de CaP es el hueso. Un 85 a 90% de los hombres que mueren por CaP presentan metástasis óseas<sup>6</sup>. A este respecto, la sobrevivencia a diez años es de 75% cuando la neoplasia está circunscrita a la glándula, de 55% en los casos que la lesión ha traspasado la cápsula y de 15% para los pacientes que tengan metástasis a distancia. Por lo tanto se hace indispensable buscar herramientas diagnósticas que permitan identificar los casos más propensos a generar metástasis con el fin de precisar el tratamiento y seguimiento para estos pacientes<sup>7</sup>. El método de detección tradicional es la exploración física de la glándula prostática, conocido como tacto rectal, donde se buscan alteraciones de volumen o irregularidades de forma y superficie. Este procedimiento no permite explorar la próstata completa, y se estima que un 25 -35% de los tumores queda sin pesquisar. Actualmente se utiliza también la detección del antígeno prostático específico (PSA) como método de screening, sin embargo en condiciones benignas como HPB el antígeno también eleva sus niveles. Actualmente el CaP se diagnostica usando ambas técnicas en conjunto y con confirmación mediante biopsia. Con esta estrategia se han logrado mejoras en el proceso de detección y diagnóstico temprano, sin embargo la

real eficacia de los marcadores de diagnóstico está en discusión y por lo tanto se han desarrollado múltiples estudios enfocados a la búsqueda de un marcador más específico<sup>8</sup>.

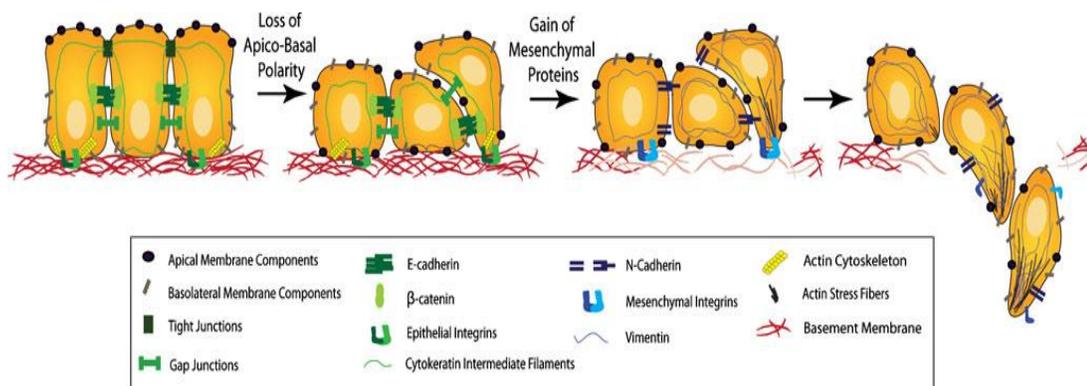
### **II.3. TRANSICIÓN EPITELIO – MESENQUIMAL**

La transición epitelio mesenquimal (TEM) es un proceso fisiológico altamente conservado en los mamíferos que permite a las células epiteliales adquirir características muy similares a las que poseen las células mesenquimales. Se presenta en etapas tempranas del desarrollo embrionario donde la formación de estructuras determinadas para el desarrollo de órganos depende del cambio entre los fenotipos epiteliales y mesenquimales de las células<sup>9</sup>. En los últimos años se ha relacionado la TEM con el aumento de movilidad e invasión que pueda tener una célula en la progresión tumoral, promoviendo la capacidad de generar metástasis<sup>10,11</sup>.

Las células epiteliales forman tejidos organizados donde existen capas de células contiguas mantenidas por estructuras de membrana como uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones gap. También tienen polarización apical-basal, organización polarizada del citoesqueleto y presencia de lámina basal. En condiciones normales las células epiteliales no migran, a pesar de presentar movilidad dentro de la capa epitelial<sup>12</sup>. Son moléculas marcadores de estas células: e-cadherina, desmoplaquina y citoqueratina. Las células mesenquimales por su parte forman tejidos menos organizados, que generalmente juegan un papel de soporte o de relleno. No poseen polaridad apical-basal, las adhesiones con las células vecinas son débiles y no están asociadas a una lámina basal, lo que les permite una mayor capacidad migratoria. Además, presentan expresión de moléculas de adhesión como n-cadherina, filamentos intermedios como vimentina y componentes de la matriz extracelular como fibronectina<sup>5,13</sup>.

Durante la TEM las células epiteliales pierden su polaridad apical-basal y adquieren un aspecto fusiforme. Las uniones intercelulares, que por lo general mantienen esta

polaridad, se pierden permitiendo que proteínas de la membrana apical se mezclen (Figura 2). El citoesqueleto de actina es reordenado y los filamentos intermedios de citoqueratinas son sustituidos por vimentina. Todo lo anterior resulta en una disminución de la adhesión célula-célula y célula-matriz; generando por tanto mayor movilidad celular e incremento en la capacidad invasiva. Es importante destacar que no siempre ocurren todos estos eventos durante la TEM, sin embargo la capacidad de migración e invasión se consideran características fundamentales de ella<sup>14</sup>.



**Figura 2:** Durante la TEM se pierde la polaridad apical-basal, y ocurre una expresión diferencial de moléculas de adhesión y del citoesqueleto celular, cambiando el fenotipo de las células epiteliales a un fenotipo mesenquimal. (Micalizzi y col., 2010)

Aun cuando no se ha logrado dilucidar completamente las bases moleculares de la TEM, se han descrito cambios en la expresión, localización y actividad de ciertas proteínas. Dentro de estos cambios podemos encontrar la disminución en expresión y localización en la membrana plasmática de algunas moléculas de adhesión, como e-cadherina, sindecano 1 y sindecano 2. Una característica primordial de la TEM es la disminución en la expresión de e-cadherina, esta molécula es uno de los principales componentes de las uniones adherentes que mantienen la interacción célula-célula, lo que le otorga la capacidad de actuar como gen supresor de tumores y la disminución de su expresión es suficiente para desencadenar una TEM<sup>15</sup>. El análisis sobre el promotor proximal a e-cadherina de ratón permite identificar cajas E (E-box), secuencias cortas de seis nucleótidos (5`-GACCTG-3`o 5`-GAGGTG-`3), a las cuales ciertos represores transcripcionales como los de la superfamilia snail (snail y

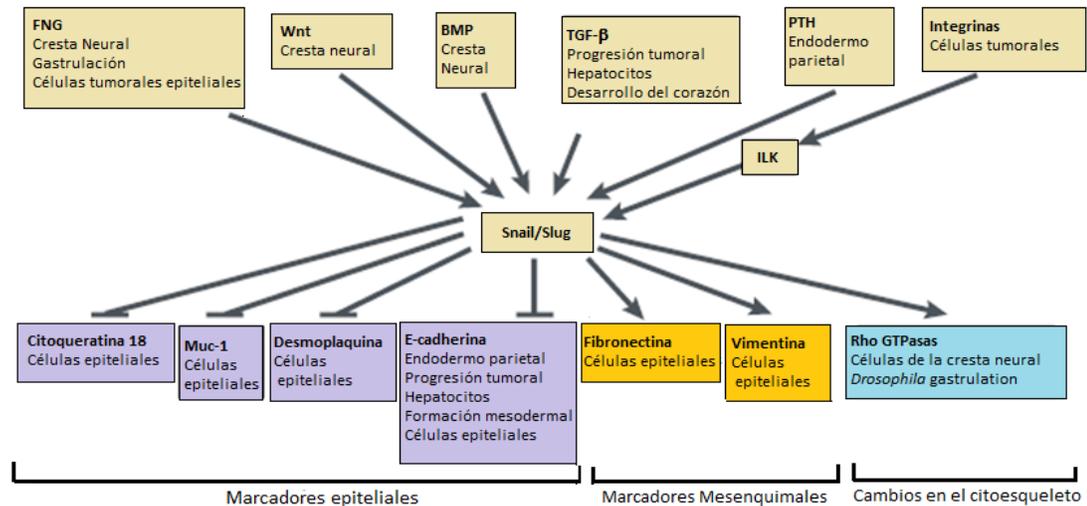
slug)<sup>13,16</sup>, zeb1 y zeb2 se unen y disminuyen la expresión de e-cadherina. Estos factores transcripcionales son responsables de iniciar y mantener el proceso de TEM<sup>17,18,19</sup>. La sobreexpresión de todos estos factores en células epiteliales no sólo resulta en la represión de e-cadherina sino en la reprogramación de la célula a un estado mesenquimal, ya que también reprimen otras moléculas de las uniones adherentes e inducen características mesenquimales de una manera coordinada<sup>20,21</sup>.

Todos los cambios morfológicos, funcionales y de expresión génica que ocurren durante la TEM promueven que la célula invada el estroma subyacente y desde ahí comience el proceso de migración y posterior metástasis<sup>10</sup>. Aunque en la actualidad se sabe que la TEM tiene un rol fundamental en los primeros pasos de la cascada metastásica<sup>22,23</sup>, durante muchos años fue difícil relacionarla con un mecanismo potencial en la progresión de un carcinoma. Principalmente porque las metástasis son muy similares histológicamente a los tumores primarios<sup>24</sup>, lo que puede interpretarse como una TEM reversible. En este proceso cuando la TEM comienza, se permitiría la migración y diseminación de células cancerosas hacia diferentes órganos, donde se activaría el proceso opuesto, la transición mesenquimal epitelial (TME), el cual les permitiría establecer colonias secundarias retomando la morfología epitelial, adquiriendo la capacidad de crecer y proliferar<sup>25</sup>.

#### **II.4. SNAIL**

La mayoría de las vías que regulan la TEM convergen en los factores transcripcionales de la superfamilia snail<sup>12</sup>(Figura 3). Todos los miembros de esta familia presentan una estructura conservada. Se componen de una región C-terminal que contiene de cuatro a seis dedos de zinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub><sup>26</sup>(dependiendo de la familia y especie), y una región N-terminal diferenciadora. El tercer y cuarto dedo de zinc muestra una secuencia consenso para todos los miembros de la superfamilia snail, según las secuencias del segundo y quinto dedo de zinc la superfamilia se puede dividir en dos grupos: snail y scratch<sup>27</sup>. A su vez, en los animales vertebrados, la familia snail se divide en dos subfamilias: snail 1 (snail) y snail 2 (slug)<sup>18</sup>. De los tres

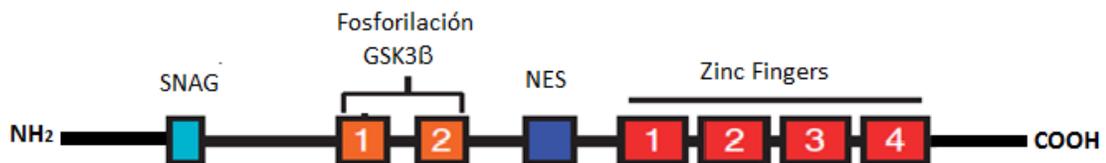
miembros en vertebrados, los funcionalmente similares *snail 1* y *snail 2* intervienen en la TEM. De hecho, todos los eventos relacionados con TEM que tienen lugar durante el desarrollo embrionario, en la fibrosis y el cáncer están asociados a la activación de estos genes<sup>20</sup>.



**Figura 3:** Los represores transcripcionales de la familia *snail* ocupan una posición central en el desarrollo de la TEM en condiciones fisiológicas y patológicas. Diferentes moléculas de señalización han sido implicadas en la activación de genes *snail*. Los factores de transcripción de la familia *snail* participan en la represión de los marcadores epiteliales (citoqueratina 18, muc-1, desmoplaquina y e-cadherina), y en el aumento de los niveles de proteína de marcadores mesenquimales (fibronectina y vimentina). (Adaptada de Nieto MA. 2009)

*Snail* fue el primer represor descrito de la superfamilia *snail*, caracterizado como un factor de transcripción esencial para la formación del mesodermo en *Drosophila*<sup>28</sup>. Se ha descrito que la ausencia de *snail* en embriones de ratón causa la muerte en estadios tempranos del desarrollo por no completarse la gastrulación a causa de una TEM deficiente<sup>29</sup>. *Snail* ha sido implicado en la inducción de los procesos de TEM, tanto en el desarrollo embrionario como en la progresión de tumores. *Snail* no sólo se expresa en biopsias de pacientes con diferentes carcinomas<sup>30,31</sup>, sino que además se expresa en células del estroma que forman parte del microambiente del tumor, surgiendo como un marcador diagnóstico temprano del fenotipo maligno y con proyección pronóstica<sup>32</sup>.

Snail es una proteína de 264 aminoácidos compuesta por dos dominios diferenciados que interactúan el uno con el otro (Figura 4). En el dominio C-terminal los dedos de zinc funcionan como dominios de reconocimiento y son capaces de unirse a secuencias específicas en el DNA<sup>33</sup>, como la secuencia palindrómica de reconocimiento de las E-box. Además de snail, existen otros factores de transcripción, como los del tipo HLH (Helix-Loop-Helix), que son capaces de unirse de la misma manera a dicha secuencia y con los cuales podría existir una eventual competencia<sup>34</sup>. En la región N-terminal se encuentra un dominio denominado SNAG (conservado en todos los genes snail de vertebrados), el cual es necesario para la función represora de snail. La región más conservada es la comprendida entre los aminoácidos 82-151, que permite la regulación post transcripcional de la proteína, donde se encuentra una señal de exporte nuclear (NES), precedida de una secuencia fosforilable rica en serinas<sup>35</sup>.



**Figura 4:** Esquema estructural de la proteína snail en mamíferos. La región N terminal comprende los aminoácidos 1-151 y contiene el dominio SNAG, el dominio NES, y una región rica en serinas donde se produce la fosforilación por GSK-3 $\beta$  y posterior reconocimiento para degradación proteosomal. En la región C-terminal se ubican los cuatro dedos de zinc que permiten la interacción con las regiones del DNA. (Adaptada de Peinado y col.2007)

Este factor transcripcional se encuentra en su forma activa cuando no se encuentra fosforilado (Figura 5). Dentro y fuera del núcleo snail puede ser fosforilado por GSK-3 $\beta$  en el dominio rico en serinas<sup>36</sup>, esto provoca un cambio en la conformación espacial de la proteína donde se expone la secuencia NES al transportador nuclear cmr1 que lo exporta del núcleo. En el citoplasma la ubiquitin ligasa  $\beta$ -Trcp reconoce la forma fosforilada de snail, provocando su ubiquitinización y posterior degradación vía proteosoma<sup>37</sup>. Se postula que mutaciones específicas en los sitios de fosforilación de snail podrían aumentar la vida media intranuclear de esta proteína, permitiendo así su unión a 3 cajas específicas del promotor del gen de e-cadherina, lo que actuaría

disminuyendo o causando una pérdida de expresión en relación a los niveles normales de e-cadherina y por lo tanto generando un cambio morfológico de las células, lo que permitiría la progresión del cambio fenotípico de epitelial a mesenquimal<sup>38</sup>.

Existe numerosa evidencia de que snail bloquea la expresión de e-cadherina mediante unión directa (reclutando complejos represores de las E-box en el promotor) e indirectamente ya que otros represores transcripcionales como zeb1 y zeb2 aumentan su expresión<sup>39</sup>. El dominio SNAG es capaz de reclutar a la molécula mSin3A, la cual a su vez interacciona con HDAC1 y HDAC2<sup>40</sup>, que disminuyen la acetilación de la H3 y la H4 en el promotor de e-cadherina. Otro mecanismo represor es la interacción del dominio SNAG con la proteína AJUBA<sup>41</sup> y el PRC2<sup>42</sup>, provocando la trimetilación de la K27 de la H3. Estos procesos generan una remodelación en la cromatina, dando lugar a la represión de e-cadherina<sup>43</sup>.

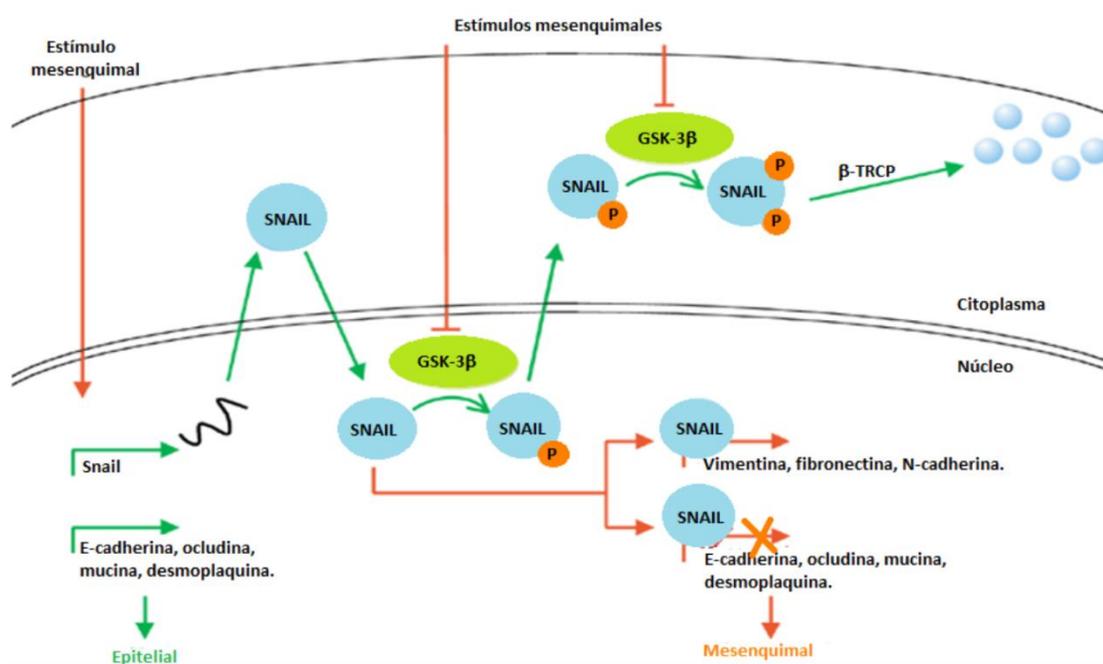


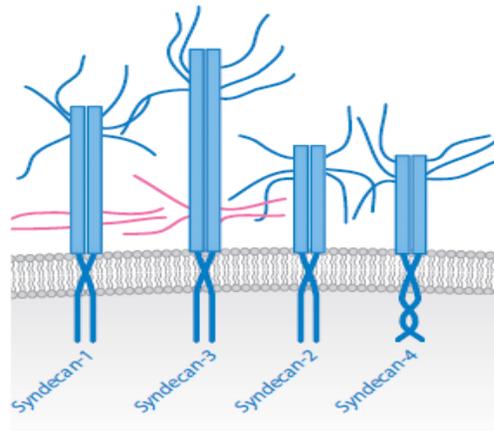
Figura 5: Regulación post transcripcional de snail. La proteína snail es fosforilada por GSK-3b, exportada fuera del núcleo, reconocida por b-TRCP y degradada vía proteosoma. Cuando existe un estímulo que promueve el fenotipo mesenquimal snail es capaz de reprimir la expresión de marcadores epiteliales. (Schlessinger y Hall, 2004)

## **II.5. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN**

Las moléculas de adhesión celular (MAC) son proteínas localizadas en la superficie de la membrana plasmática que están involucradas en la unión célula-célula, unión célula-matriz, en la adhesión celular y en el reconocimiento de señales. También se ha descrito que participan en procesos inflamatorios, cicatrización de heridas y en la progresión tumoral. Dentro de las MAC podemos encontrar cinco familias: cadherinas, proteoglicanos, inmunoglobulinas, integrinas y selectinas<sup>44</sup>.

## **II.6. SINDECANOS**

Los sindecanos son proteínas de transmembrana pertenecientes a la familia de proteoglicanos, tienen gran importancia en la adhesión y señalización celular. Su principal característica son sus cadenas de heparánulfato, las cuales les confieren la propiedad de unir proteínas extracelulares, ya sean plasmáticas, como la antitrombina 1, o de matriz extracelular, como la fibronectina. También son capaces de formar complejos de señalización, con los factores de crecimiento y morfogénicos<sup>45</sup>. Basados en su homología sindecano 1 y 3 forman una subfamilia, mientras que sindecano 2 y 4 forman otra<sup>46</sup> (Figura 6). En todos los sindecanos, es posible identificar tres dominios proteicos: el extracelular, asociado a elementos de la matriz y que presenta alta variabilidad genética, donde están las cadenas de glicosaminoglicanos tanto de heparánulfato como de condroinsulfato. El segmento yuxtamembranal del dominio extracelular de reconocimiento para el corte proteolítico genera un segmento anclado a la membrana y un ectodominio soluble. Existe también un dominio transmembrana, altamente conservado y que fija la proteína a la membrana plasmática. Finalmente un dominio citoplasmático, que cumple la función de activar vías de señalización intracelular<sup>47</sup>.



**Figura 6:** Sindecanos pertenecientes a la familia de proteoglicanos agrupados en subfamilias, Sindecano 1 y Sindecano 3 que presentan cadenas de heparán sulfato (azul) y condroitín sulfato (rosado) forman una subfamilia, mientras que sindecano 2 y sindecano 4 conforman otra. (Couchman, J.R. 2010)

### II.6.a. Sindecano 1

Este proteoglicano posee 310 aminoácidos. Se expresa tempranamente durante el desarrollo embrionario y es fundamental en la morfogénesis. Se localiza en la superficie basolateral de las células epiteliales y participa principalmente en la adhesión de éstas, mediante su interacción con el citoesqueleto de actina, y en el proceso de señalización a partir de factores de crecimiento<sup>48</sup>.

En la transformación maligna, se ha asociado la expresión de sindecano 1 con la mantención de la morfología epitelial y la inhibición de la invasividad. Por otro lado, una disminución o represión en la expresión de esta molécula puede ser considerada un evento temprano que contribuye a la progresión tumoral, por ejemplo en carcinoma hepatocelular y colorrectal de alto grado los niveles de sindecano1 disminuyen considerablemente<sup>49,50</sup>. Una disminución en la expresión se asocia con la adquisición de un fenotipo mesenquimal por parte de células epiteliales, como se demostró al transfectar células epiteliales con mRNA antisentido para sindecano 1 y lograr activar el proceso de TEM<sup>51</sup>. En lesiones pre-malignas de mucosa oral y cérvix uterino se ha encontrado una expresión disminuida de sindecano1 y la disminución de

su expresión se correlaciona con una menor supervivencia para los pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello, pulmón, laringe y mieloma múltiple<sup>52,53</sup>.

### **II.6.b. Sindecano 2**

Este proteoglicano participa en la señalización por TGF- $\beta$ , mediante unión proteína-proteína y también interactúa con el citoesqueleto de actina, lo que le permite modular de forma directa la respuesta a factores de crecimiento en relación a la migración celular<sup>54</sup>. En su dominio transmembrana, presenta un sitio de corte proteolítico, que al ser reconocido y cortado genera un ectodominio capaz de interactuar con la matriz extracelular. Este último estaría involucrado en la inhibición de la expresión de algunas metaloproteinasas, lo que podría permitir la mantención de la morfología normal epitelial. Como las metaloproteinasas son enzimas proteolíticas, pueden romper los enlaces del ectodominio de sindecano 2 y un aumento en la actividad de estas enzimas generaría una alteración celular en la membrana que favorecería la TEM, la angiogénesis y por lo tanto la metástasis del cáncer. Esto podría indicar un valor pronóstico de sindecano 2 en la progresión de algunos carcinomas<sup>55</sup>. En CaP, sindecano 2 también cumpliría un rol fundamental, ya que en análisis inmunohistoquímicos de tejidos obtenidos a partir de prostatectomías parciales, se reportó que la expresión de sindecano 2 se relaciona estrechamente con la agresividad del tumor y que su expresión disminuye a medida que el tumor se hace menos diferenciado<sup>50,51</sup>.

Recientemente se ha descrito la participación de sindecano 1 y sindecano 2 en ciertas condiciones patológicas como la carcinogénesis, la invasión tumoral y la formación de metástasis. Estudios realizados en nuestro laboratorio han relacionado las variaciones en la expresión y localización celular de estos proteoglicanos con tumores prostáticos más agresivos<sup>56</sup> y también con la potencial capacidad pronóstica que puedan tener estas moléculas<sup>57</sup>. Además, se ha logrado demostrar que el patrón de expresión de sindecano 1 y sindecano 2, tiene un valor pronóstico en la generación de recidiva bioquímica en pacientes con CaP clínicamente localizados. De acuerdo a los

antecedentes expuestos, sindecano 1 y sindecano 2 participan en los proceso de TEM y por tanto en la progresión tumoral en el cáncer de próstata<sup>58</sup>.

## II.7.REGULACIÓN SOBRE LA EXPRESIÓN DE SINDECANO 1 Y 2 POR SNAIL

Investigaciones recientes en nuestro laboratorio han demostrado que existe una mayor expresión de snail en biopsias de pacientes con CaP más agresivos. Lo mismo ocurre en líneas celulares con mayor potencial tumorigénico, como PC3, respecto de células con baja capacidad tumorigénica como LNCaP<sup>59</sup>. También se evidenció la localización de este factor por microscopía confocal, donde en la línea celular LNCaP se observó una localización homogénea tanto en el núcleo como en el citoplasma de estas células, pero en células PC3 la localización de snail fue principalmente nuclear (Figura 7). Con respecto a sindecanos, se observó que en muestras de CaP de estadios más avanzados, se va perdiendo la localización en la membrana de sindecano 1 y va adoptando una localización principalmente citoplasmática, de baja intensidad. Mientras que sindecano 2 muestra un cambio progresivo de su localización, ya que a medida aumenta la agresividad tumoral, la localización se vuelve principalmente citoplasma-núcleo, lo que es de gran importancia, ya que estaría evidenciando la presencia de esta proteína o parte de ella en el núcleo celular, pudiendo participar de algún proceso que aún no se ha descrito<sup>60</sup>.

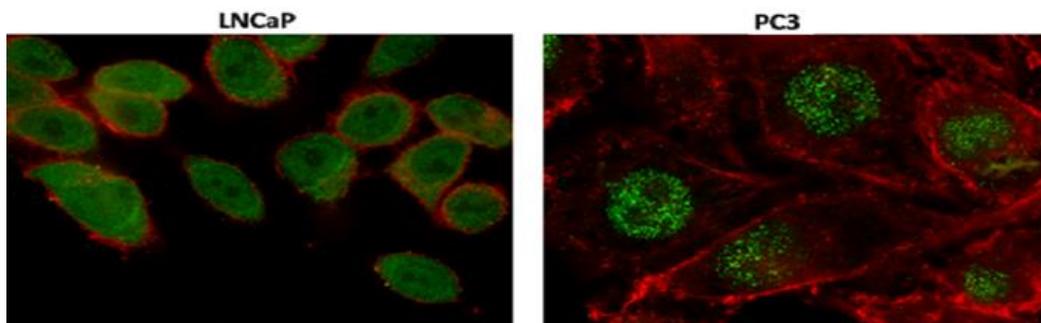
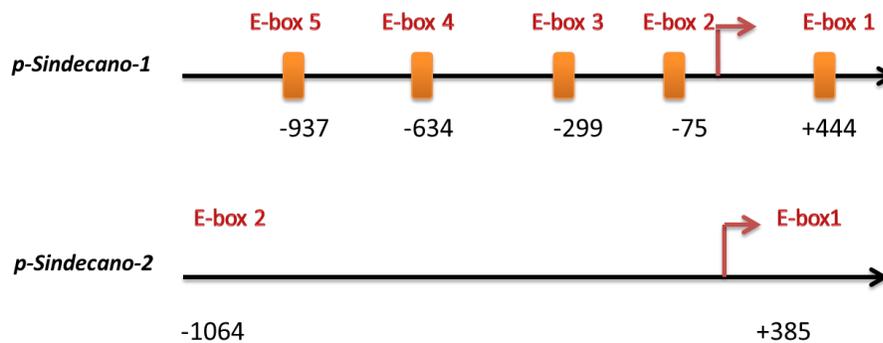


Figura 7: Expresión de snail (verde) en líneas celulares. En LNCaP existe una localización homogénea tanto en el núcleo como en el citoplasma, mientras que en PC3 la localización de snail es nuclear. (Poblete, C. 2011)

La regulación génica, tanto, traduccional como post-traduccional, de los sindecanos no está bien dilucidada. Recientemente se logró realizar una caracterización completa de los promotores de sindecano 1 y 2 humanos o murino. En esta caracterización se encontraron algunas secuencias E-box tanto en el promotor de sindecano 1 como en el promotor de sindecano 2<sup>61</sup>, teniendo en cuenta que las E-box son aquellas secuencias a las que snail se une en el promotor del gen *de-cadherina* para reprimir su expresión, es posible entonces que snail también se una a las regiones promotoras de los genes desindecano 1 y 2, reprimiendo los niveles de transcrito. A través un análisis bioinformático *in silico* realizado en nuestro laboratorio se pudo comprobar la presencia de sitios putativos donde podría unirse snail en las regiones promotoras de los genes de sindecano 1 y de sindecano 2. Se analizó una secuencia de 3,1 Kb, que incluye 2,5 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, más la región 5 UTR de ambos genes (NC\_000002.11 y NC\_000008.10 respectivamente) mediante siete diferentes programas (MatInspector, TFsearch, Tess, Consite, Match, P-Match, Patch). Cinco de estos programas predijeron sitios de unión de snail a los promotores en cuestión, y se consideraron los sitios que fueron identificados por 2 o más programas. Se encontraron 10 sitios posibles de unión al promotor de sindecano 1 y cuatro sitios para el promotor desindecano 2. Basándose en los datos mencionados anteriormente, se propone que la expresión de sindecano 1 y 2 puede estar reprimida por la unión del factor snail a regiones proximales al sitio de inicio de la transcripción de los promotores de estos proteoglicanos (Figura 8), y que este podría ser un mecanismo por el cual disminuye la expresión de estos sindecanos durante la TEM.



**Figura 8:** Representación esquemática de las cajas E-box analizadas en el promotor de sindecano 1 y sindecano 2

### **III. HIPÓTESIS**

El factor transcripcional snail se une a regiones específicas de los promotores de los genes de sindecano 1 y sindecano 2, disminuyendo su expresión en líneas celulares de cáncer prostático.

#### **IV.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la interacción específica de snail con las regiones promotoras de los genes de sindecano 1 y sindecano 2 y su efecto en la expresión de estas moléculas, *in vitro*, en líneas celulares de cáncer prostático LNCaP y PC3.

#### **IV.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1.-Determinar, por ensayo de inmunoprecipitación de cromatina y ensayos de movilidad electroforética, la localización del sitio de unión de snail a las regiones promotoras del gen de sindecano 1 y sindecano 2, *in vitro*, en líneas celulares de cáncer prostático LNCaP y PC3.

2.- Determinar, mediante PCR en tiempo real e inmunofluorescencia, los niveles de mRNA y proteínas de snail, en la línea celular LNCaP-Snail+

3.- Determinar, mediante PCR en tiempo real, inmunofluorescencia, y ensayo de gen reportero, el efecto de la sobreexpresión de snail en la expresión de sindecano 1 y sindecano 2, *in vitro*, en la línea celular LNCaP-Snail+.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular

Las células fueron cultivadas en medio DMEM/F-12 suplementado con FBS al 10%, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Las líneas celulares que se utilizaron fueron adquiridas en ATCC (American Type Culture Collection)

-LNCaP: Establecida a partir de tejido proveniente de un nódulo linfático metastizado de un carcinoma prostático de un hombre caucásico de 50 años. Presentan morfología epitelial con un crecimiento adherente modulado por DHT, como células aisladas o débilmente agrupadas. Son de baja tumorigenicidad y expresan receptores para andrógenos. ATCC, Cat. CRL-1740

- PC3: Proveniente de una metástasis ósea de adenocarcinoma prostático en un hombre caucásico de 62 años. Su crecimiento es adherente y presentan morfología epitelial. Son de elevada tumorigenicidad y su crecimiento es independiente de testosterona y no expresan receptores para andrógenos. ATCC, Cat. CRL-1435

### Plásmidos y lentivirus

El constructo que contiene el promotor de sindecano 1 fusionado con el gen de *luciferasa* fue obtenido en el laboratorio, mediante clonación de 1,3 kb de la región promotora de sindecano1 en el vector PGL3 basic (Promega). Los Lentivirus p-lenti/EF1a-snail/RSV-RFP-Puro y p-lenti/EF1a-null/RSV-RFP-Puro son partículas comerciales construidas por Gen Target Inc.

## **Infección celular**

Para establecer una línea celular consobreexpresión ectópica de snail, se infectaron células LNCaP con el lentivirus p-lenti/EF1a-snail/RSV-RFP-Puro/ y p-lenti/EF1a-null/RSV-RFP-Puro/ generando las líneas celulares LNCaP Snail+ y LNCaP null respectivamente. Las células infectadas fueron seleccionadas mediante resistencia a puomicina y posteriormente separadas por sorting celular. Luego se midieron los niveles de mRNA y proteínas de snail, mediante PCR en tiempo real e inmunocitoquímica respectivamente.

## **Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina**

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 85% se realizó un cross-link con formaldehído 1% por 30 minutos, posteriormente las células se centrifugaron a 1800 rpm por 5 minutos y el pellet fue resuspendido en buffer de lisis. Con un vástago se fragmentaron las membranas plasmáticas y luego por centrifugación se obtuvieron los núcleos. Para fragmentar el DNA las muestras fueron sonicadas por un total de 160 segundos. Para inmunoprecipitar se utilizó 25 ug de cada muestra sonicada. Las muestras (menos el input) se preaclararon con IgG (Santa Cruz) y proteína A/G agarosa (Santa Cruz) por 2 horas y luego se centrifugaron a 3000 rpm. Al sobrenadante se le agregó 4-8 ug de anticuerpo correspondiente y se dejó incubando toda la noche. Posteriormente se agregó proteína A/G agarosa, se lavó y se revirtió el cross-link. El DNA fue recuperado usando el protocolo de extracción con fenol/cloroformo<sup>62</sup> y las secuencias inmunoprecipitadas se analizaron por PCR en tiempo real.

**Tabla1:** Especificaciones de los anticuerpos utilizados en ChIP.

Anticuerpo	Marca	Procedencia	ug utilizados
Snail	Abcam	Rabbit Policlonal	8 ug
H3	Abcam	Rabbit Policlonal	4ug
IgG	Milipore	Rabbit Policlonal	8ug

**Tabla 2:** Especificaciones de los partidores utilizados en ChIP.

Región analizada	
-1159/-718: Contiene E-box 5 del promotor desindecano 1	Fw 5'-ACCATCCATCACTCAGGCAC -3'
	Rev 5'-TGGACTCTCCTCCACCTTCC -3'
-652/-550: Contiene E-box 4 del promotor desindecano 1	Fw 5'- ACGCCATCTTTGGTCTCAGG-3'
	Rev 5'- AGAGCAAAGGGGAAGAACCG-3'
323/-239: Contiene E-box 3 del promotor de sindecano 1	Fw 5'-GGATCTCGAAGGAGCAGCAA-3'
	Rev 5'-CGTTCTTCCTGCACTCCACA -3'
-178/-29: Contiene E-box 2 del promotor desindecano 1	Fw 5'- GGGGTGTGTCTGTGTGTGTT -3'
	Rev 5'-TGCAGCGCCCTCTGGG3'
+388/+492: Contiene E-box 1 del promotor de sindecano 1	Fw 5'- TGCTCGATGCTCTCTTGGG-3'
	Rev 5'-CGGAGAGGAATCCGGCAGTA -3'
-986/-1120: Contiene E-box 2 del promotor de sindecano 2	Fw 5'-AGGCTCACA ACTCTTATACGG-3'
	Rev 5'-ATTCTGCTCCTGGAATGCC-3'
+320/+443: Contiene E-box 1 del promotor de sindecano 2	Fw 5'- GCTCAGAGAGCAGCCTTCC-3'
	Rev 5'-CGCATATTCCCCAGGGACC-3'

### **Ensayo de movilidad electroforética (EMSA):**

La proteína recombinante de snail, los extractos nucleares, y las reacciones de control se incubaron por 20 minutos con las sondas marcadas (tabla 3) con biotina en el extremo 5' utilizando el kit LightShift EMSA optimización (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida no denaturante al 5% en TBE seguido por transferencia a una membrana de biodina B (Pierce), la cual inmediatamente después se expuso por 60 segundos en una cámara UV para realizar el cross-link. La membrana se bloqueó por 15 minutos, se reveló de acuerdo a las instrucciones del fabricante y la quimioluminiscencia se determinó mediante Hyperfilm ECL (Amershan Pharmacia, UK)

**Tabla 3:** Especificaciones de las sondas utilizadas en EMSA.

Nombre	Secuencia
SD1E1: Contiene E-box 1 del promotor de sindecano 1	5'-CAGCCCTCGCCTGGGACAGCG-3' 5'-GTCGGGAGCGGACCCTGTCGC-3'
SD1E1*: Contiene E-box 1 mutada del promotor de sindecano 1	5'-CAGCCCTTTTTTTTGGACAGCG-3' 5'-GTCGGGAAAAAACCTGTCGC-3'
SD1E2: Contiene E-box 2 del promotor de sindecano 1	5'-TCCTGCGCACCTGGAGCGCGC-3' 5'-AGGACGCGTGGACCTCGCGCG-3'
SD1E2*: Contiene E-box 2 del promotor de sindecano 1	5'-TCCTGCGTTTTTTTGAGCGCGC-3' 5'-AGGACGCAAAAAACTCGCGCG-3'

### **PCR en tiempo real**

Una vez que las células alcanzaron el 80% de confluencia fueron lisadas con TriZol (Gibco) y se realizó la extracción de RNA de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego, se determinó la concentración y pureza del RNA mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm. La calidad del RNA extraído fue verificada a través de una electroforesis en gel de agarosa-formaldehído. Se sintetizaron los correspondientes cDNA a partir de 1µg de RNA con el kit AffinityScript qRT-PCR (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Se realizó la amplificación de los cDNAs con el kit Brilliant II SYBR Green (Agilent) según las instrucciones del fabricante.

**Tabla 4:** Especificaciones de lospartidores utilizados

mRNA analizado	
Snail	Fw 5'-CCAGTGCCTCGACCACTATG-3'
	Rev 5'-CTGCTGGAAGGTAAACTCTGGA-3'
Sindecano 1	Fw 5'- CTGACCTTCACACTCCCCAC-3'
	Rev 5'- AAAGGTGAAGTCCTGCTCCC-3'
Sindecano 2	Fw 5'-ACCCAGCCGAAGAGGATACA -3'
	Rev 5'-CAGCAATGACAGCTGCTAGG -3'
Vimentina	Fw 5'-GCCCTTGACATTGAGATTGCCA -3'
	Rev 5'-TCAACCAGAGGGAGTGAATCCA -3'
GAPDH	Fw 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'
	Rev 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA -3'

### Inmunocitoquímica

Las células se cultivaron en portaobjetos y cuando se obtuvo una confluencia del 85% se fijaron usando una solución de PBS, sacarosa y paraformaldehído. Para permeabilizarlas se utilizó Tritón 0,1%. Luego, las células se bloquearon usando una solución salina de PBS, glicina y BSA 0,1%. Las células fueron incubadas por 2 horas a 37°C en el anticuerpo primario correspondiente y para amplificar la señal, se incubó con anticuerpos secundarios marcados con fluoresceína (FITC) por 1 hora a 37°C. Se aplicó DAPI (USB Corporation) por 5 minutos a 37°C para realizar tinción del núcleo. Las muestras ya teñidas se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia DAKO S-3023. Éstas se mantuvieron siempre protegidas de luz y mantenidas a 4°C hasta su observación al microscopio de fluorescencia Leica DM 2500 y mediante el software Leica Application Suite versión 3.6.0 se procedió a tomar las imágenes con la cámara Leica DFC 42. Todas las muestras se analizaron utilizando el software ImageJ para cuantificar el área inmunorreactiva (IA) en  $\mu\text{m}^2$  y la densidad óptica integrada (DOI), que permite un análisis densitométrico cuantitativa de las áreas específicas<sup>63</sup>.

**Tabla 5:** Especificaciones de los anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Marca	Procedencia	Dilución
Snail	Abcam	Goat Policlonal	1:100
Sindecano1	Santa cruz	Rabbit Policlonal	1:100
E-cadherina	BD Transduction	Mouse Monoclonal	1:100

### **Ensayo de Gen reportero**

El plasmido PGL3 Sindecano1-lux se co-transfectó junto con el plasmido PGL3 renilla mediante el uso de lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en las células que sobreexpresan snail. La actividad de luciferasa se midió 48 horas después usando el kit dual de ensayo de luciferasa (Promega) en el espectrofotómetro para microplacas Biotek. Los datos se presentan como la actividad de luciferasa relativa (actividad de luciferasa normalizada a la actividad renilla como control de transfección)

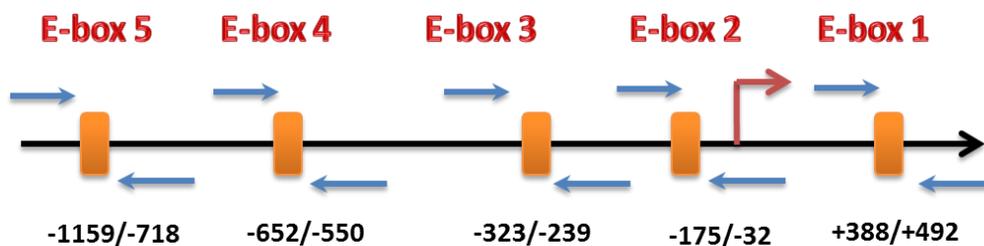
**Análisis estadísticos:** La evaluación estadística de los datos obtenidos se realizó utilizando t student para los ensayos de ChIP y usando test ANOVA. Además se, utilizó como test secundario el test deDunnett para el análisis de PCR en tiempo real. Considerando estadísticamente significativos aquellos ensayos que tengan  $P < 0.05$

## V1.- RESULTADOS

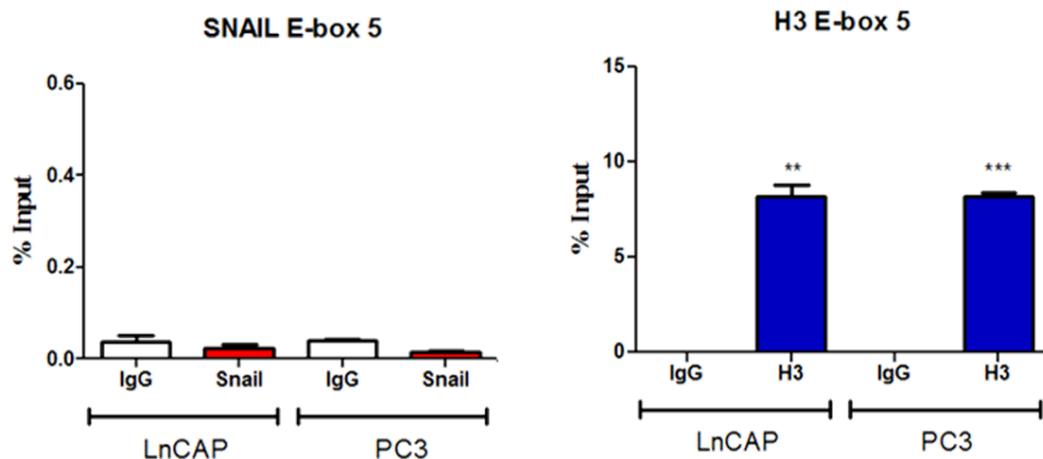
**Objetivo 1:** Determinar, por ensayo de inmunoprecipitación de cromatina y ensayos de movilidad electroforética, la localización del sitio de unión de snail a las regiones promotoras del gen de sindecano 1 y sindecano 2, *in vitro*, en líneas celulares de cáncer prostático LNCaP y PC3.

### Ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)

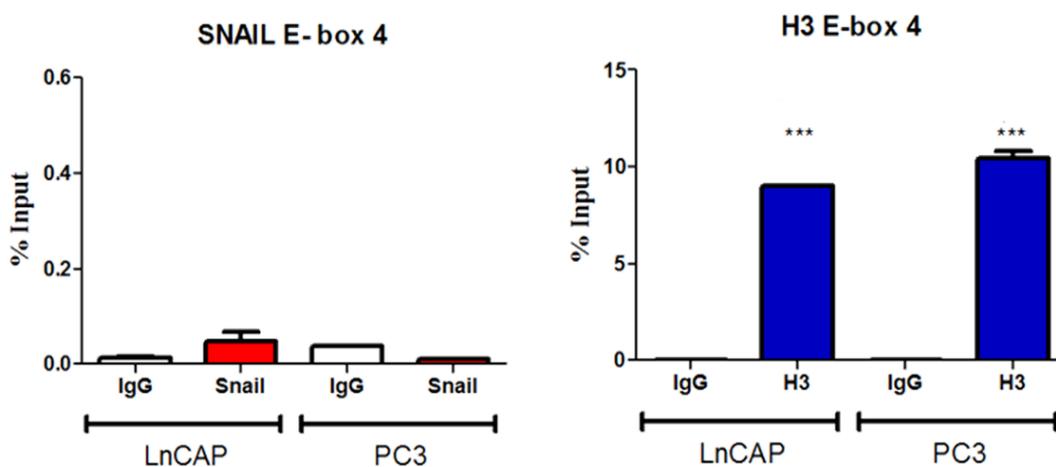
Para determinar si snail interacciona con las zonas del promotor de sindecano 1 y sindecano 2, donde se ha estudiado existen E-box, se realizaron ensayos de ChIP. En este estudio se analizaron solamente las cajas E-box río abajo del -1100 en ambos promotores (Figura 8). Los valores de inmunoprecipitación de snail e H3 en cada región de los promotores de los genes de sindecano 1 (Figura 9) y sindecano 2 (Figura 15) fueron comparados contra el control negativo IgG. En ambas líneas celulares de forma independiente se analizaron sólo las regiones correspondientes a -1159/ -718 (Figura 10), -652/ -550 (Figura 11), -323/ -239 (Figura 12), -175/ -32 (Figura 13) y +388/ +492 (Figura 14) de promotor de sindecano 1. Mientras que en el promotor de sindecano 2 se analizaron las regiones correspondientes a -1200/-955 (Figura 16) y +332/+606 (Figura 17).



**Figura 9:** Representación esquemática de las regiones analizadas por ChIP de la variante 1 de la región promotora de sindecano 1.



**Figura 10:** Cuantificación del enriquecimiento del factor transcripcional snail (rojo) y del control positivo H3(azul) sobre el control negativo IgG (blanco) mediante PCR en tiempo real de la región correspondiente al -1159/ -718 de promotor de sindecano 1. Las barras representan el promedio +/- el error estándar del promedio del triplicado técnico de un experimento. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente pero sólo se muestra uno de ellos. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de las varianzas \*\*\*, $p < 0,001$ ; \*\*, $p < 0,01$ ; \*, $p < 0,05$ .



**Figura 11:** Cuantificación del enriquecimiento del factor transcripcional snail (rojo) y del control positivo H3(azul) sobre el control negativo IgG (blanco) mediante PCR en tiempo real de la región correspondiente al -652/ -550del promotor de sindecano 1. Las barras representan el promedio +/- el error estándar del promedio del triplicado técnico de un experimento. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente pero sólo se muestra uno de ellos. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de las varianzas \*\*\*, $p < 0,001$ ; \*\*, $p < 0,01$ ; \*, $p < 0,05$

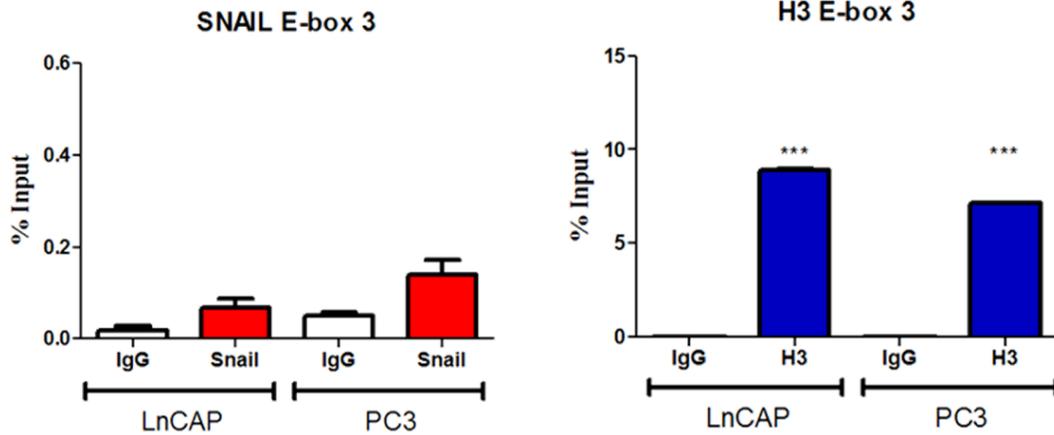


Figura 12: Cuantificación del enriquecimiento del factor transcripcional snail (rojo) y del control positivo H3 (azul) sobre el control negativo IgG (blanco) mediante PCR en tiempo real de la región correspondiente al -323/ -239 del promotor de sindecano 1. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio del triplicado técnico de un experimento. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente pero sólo se muestra uno de ellos. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de las varianzas \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$

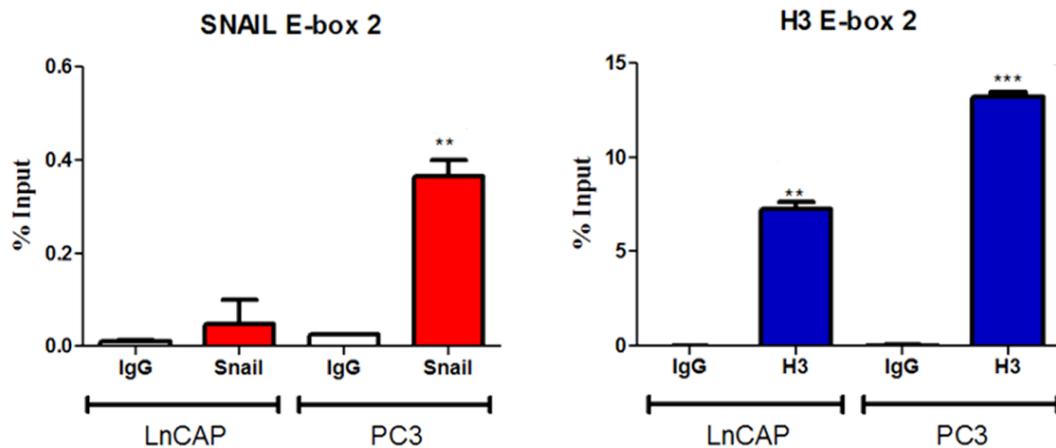
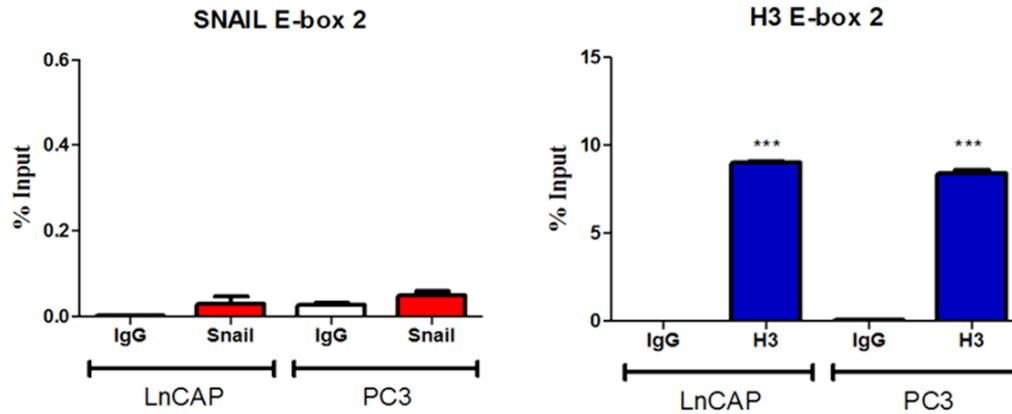
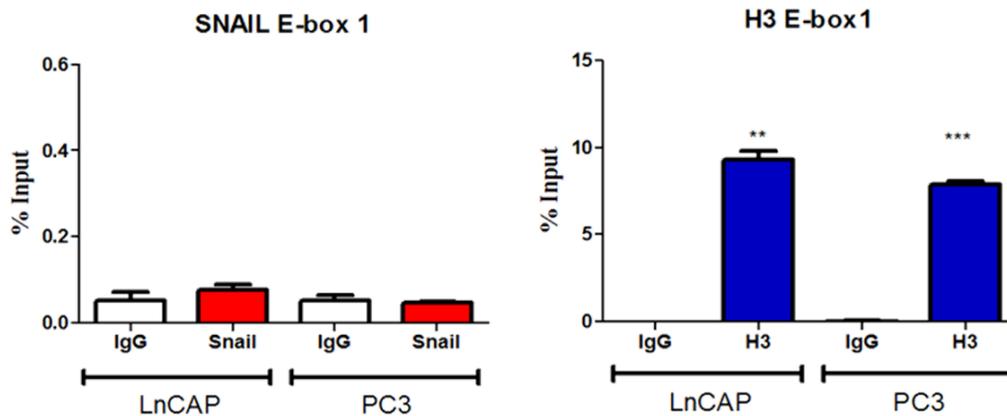


Figura 13: Cuantificación del enriquecimiento del factor transcripcional snail (rojo) y del control positivo H3 (azul) sobre el control negativo IgG (blanco) mediante PCR en tiempo real de la región correspondiente al -175/ -32 del promotor de sindecano 1. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio del triplicado técnico de un experimento. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente pero sólo se muestra uno de ellos. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de las varianzas \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .





**Figura 16:** Cuantificación del enriquecimiento del factor transcripcional snail (rojo) y del control positivo H3 (azul) sobre el control negativo IgG (blanco) mediante PCR en tiempo real en la región correspondiente al -1200/-955 del promotor de sindecano 2. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio del triplicado técnico de un experimento. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente pero sólo se muestra uno de ellos. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de las varianzas \*\*\*, $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .



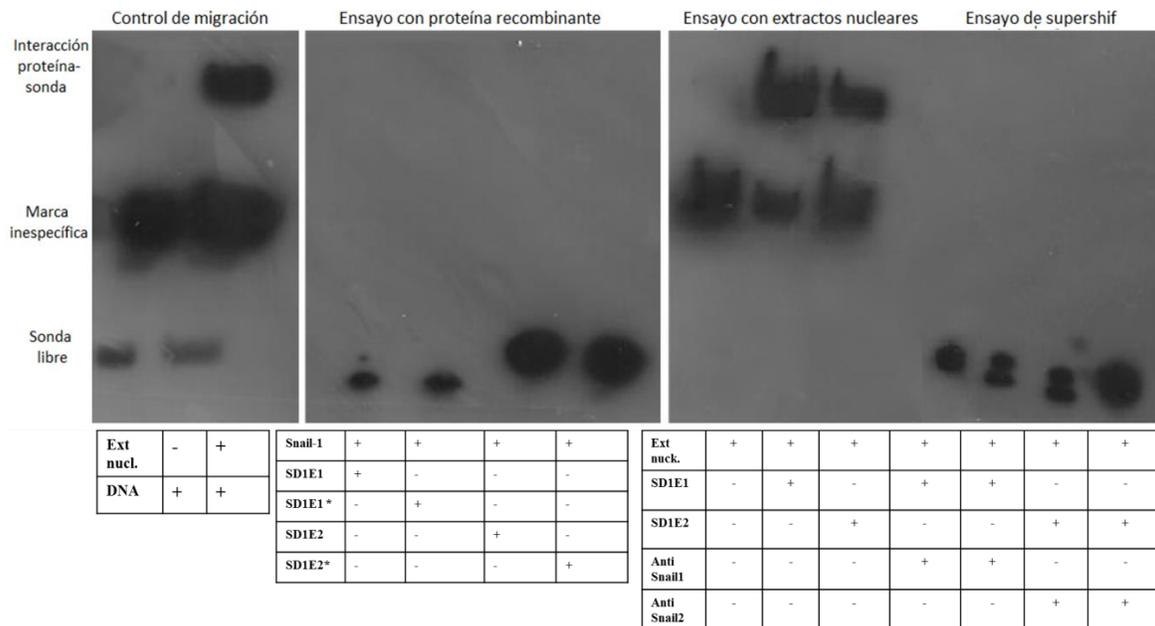
**Figura 17:** Cuantificación del enriquecimiento del factor transcripcional snail (rojo) y del control positivo H3 (azul) sobre el control negativo IgG (blanco) mediante PCR en tiempo real en la región correspondiente al 332/606 del promotor de sindecano 2. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio del triplicado técnico de un experimento. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente pero sólo se muestra uno de ellos. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de las varianzas \*\*\*, $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .

Estos resultados muestran que existe una interacción de snail con dos zonas del promotor del gen desindecano 1 en la línea celular PC3, las que comprenden desde -175/ -32, donde se ubica la E-box 2, y +388/ +492, donde se ubica la E-box 1. En la línea celular LNCaP en cambio no se observan niveles de enriquecimiento en la inmunoprecipitación que puedan indicar interacción de snail con las regiones promotoras del gen desindecano 1.

#### Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)

Con el propósito de corroborar que el factor de transcripción snail se une específicamente a las E-box presentes en las regiones del promotor del gen desindecano 1 sugeridas por los resultados obtenidos por ChIP, se realizó un ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA). Para ello se obtuvieron sondas comerciales marcadas con biotina en el extremo 5' que contenían las cajas E-box presentes en las regiones enriquecidas, y se ocupó una proteína recombinante comercial de snail (Figura 18.A).

En el ensayo realizado se asume que la proteína recombinante de snail es capaz de unirse a la sonda de DNA sin requerir co-reguladores o estructuras secundarias de la cromatina. Para superar la primera limitación del ensayo, se realizó un EMSA con extractos nucleares (Figura 18.B). En el ensayo con proteína recombinante se utilizó la isoforma 1 de la proteína snail ya que está descrito que esta variante es la que se une con mayor afinidad al DNA y también la que participa en la regulación génica de otras moléculas, como por ejemplo e-cadherina. Para descartar la posibilidad de que el análisis por ChIP describiera la interacción de snail 2 se realizaron también ensayos de supershift con anticuerpos capaces de diferenciar entre ambas isoformas.



**Figura 18:** A) Ensayo de movilidad electroforética. En los carriles de la derecha se observan los controles de migración que provee el kit con el que se realizó el ensayo. En los carriles de la izquierda están los ensayos realizados con proteína recombinante snail con las sondas SD1E1, SD1E1\*, SD1E2 y SD1E2\*(ver metodología). B) Ensayo de movilidad electroforética. En los carriles de la derecha se observa la interacción de los extractos nucleares con las sondas SD1E1, SD1E2 Mientras que en los carriles de la izquierda se muestran los ensayos de supershift con los anticuerpos anti-snail 1 y anti-snail 2.

Estos resultados sugieren que la unión de snail al DNA no es independiente de otros factores, pues al hacer reaccionar solo la proteína recombinante con la sonda no encontramos retardo en la movilidad en el gel. Si bien el ensayo muestra interacción de los extractos de proteínas nucleares con ambas sondas, esto sólo nos indica que dentro del núcleo hay proteínas que se unen a estas regiones. En el supershift no vemos desplazamiento de las bandas puesto que los anticuerpos que diferencian entre snail 1 y 2 interactúan con el mismo dominio de la proteína que se une al DNA.

No es posible dilucidar mediante este ensayo si snail 1 se une a las cajas E-box presentes en el promotor del gen de sindecano 1. Sin embargo el análisis por ChIP es una aproximación más certera a lo que ocurre en la célula y no a un ensayo *in vitro* como el EMSA. Los resultados del ensayo de ChIP sí demuestran interacción de snail con las regiones promotoras del gen desindecano 1 y por lo tanto es necesario determinar si esta interacción ejerce una regulación transcripcional.

## Objetivo 2:

### 2.- Determinar, mediante PCR en tiempo real e inmunofluorescencia, los niveles de mRNA y proteínas de snail, en la línea celular LNCaP-Snail+

Una vez generada la línea celular con sobreexpresión estable de snail mediante infección de las células LNCaP con el lentivirus p-lenti/EF1a-snail/RSV-RFP-Puro/ y p-lenti/EF1a-null/RSV-RFP-Puro/ se generaron las líneas celulares LNCaP-Snail+ y LNCaP-null respectivamente. Las células infectadas fueron seleccionadas mediante resistencia a puromicina(Figura 19) y posteriormente separadas por sorting celular (Figura 20 y 21)

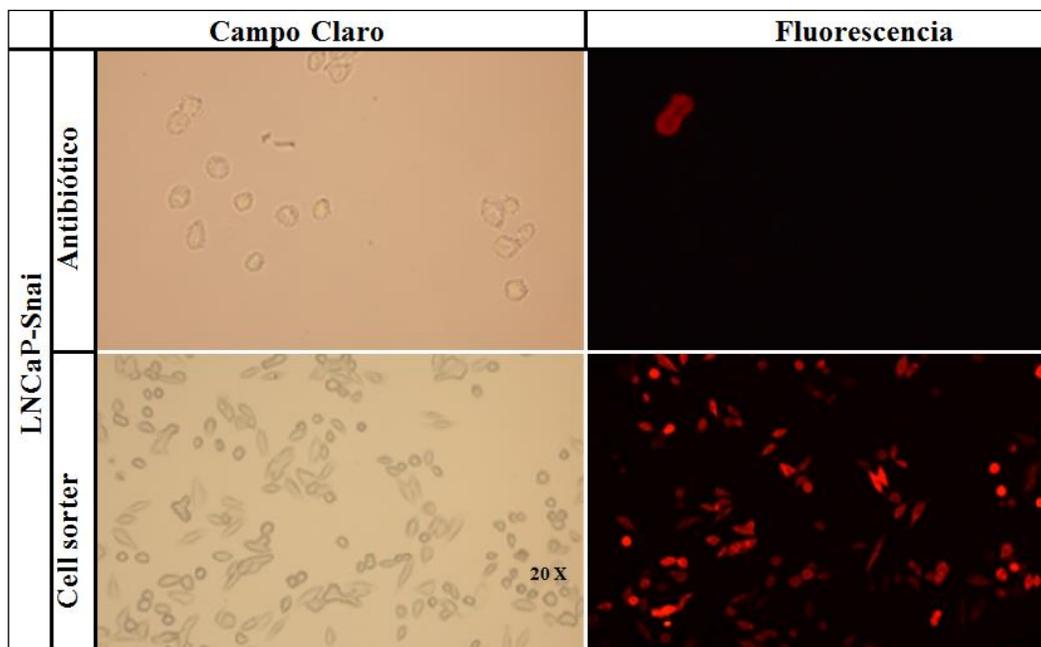


Figura 19:Microfotografías en campo claro y de inmunofluorescencia de las células infectadas y positivas para RFP seleccionadas con antibiótico puromicina y posteriormente por sorting celular.

Patrón de separación de las células LNCaP WT mediante sorting celular

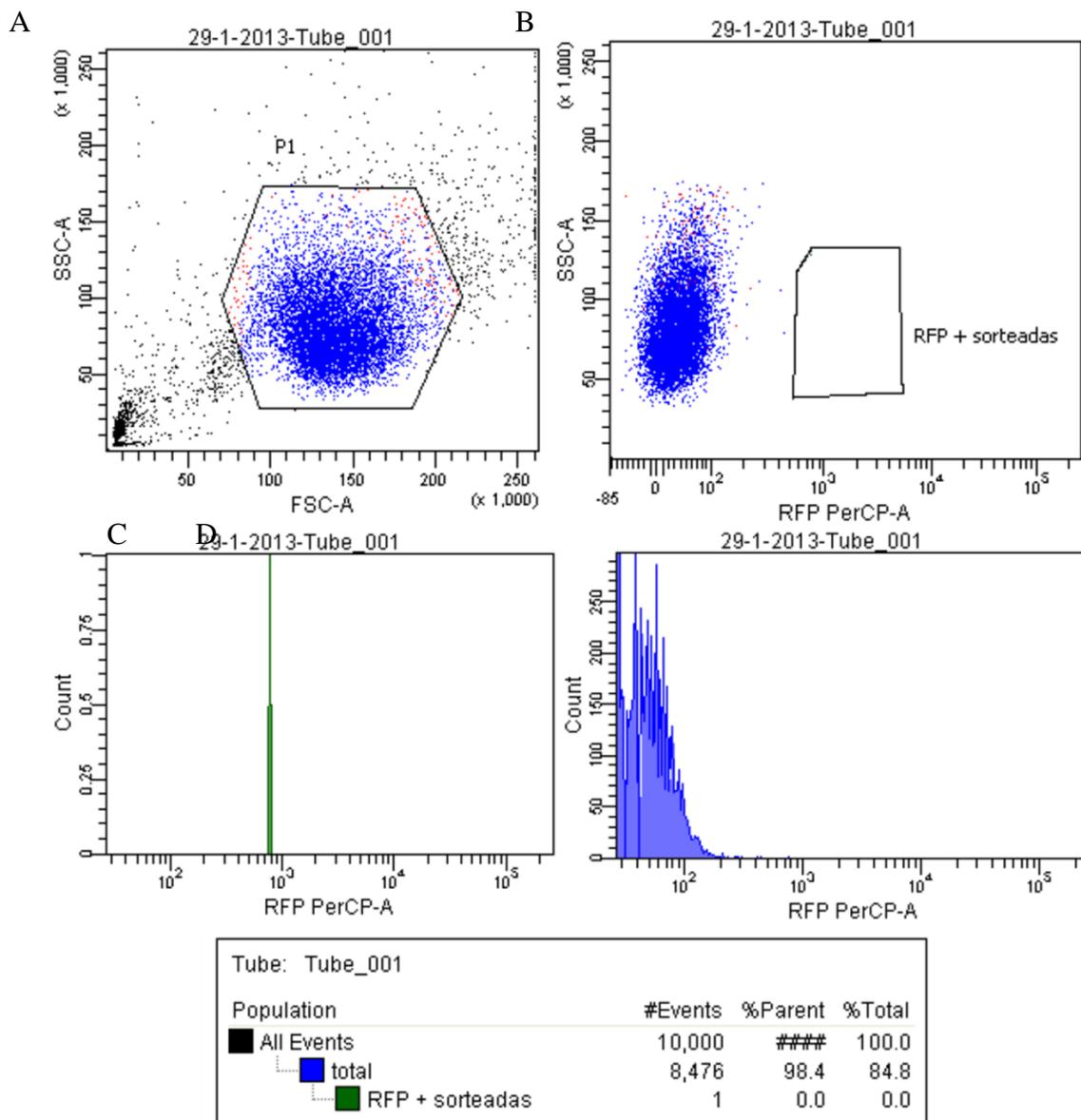
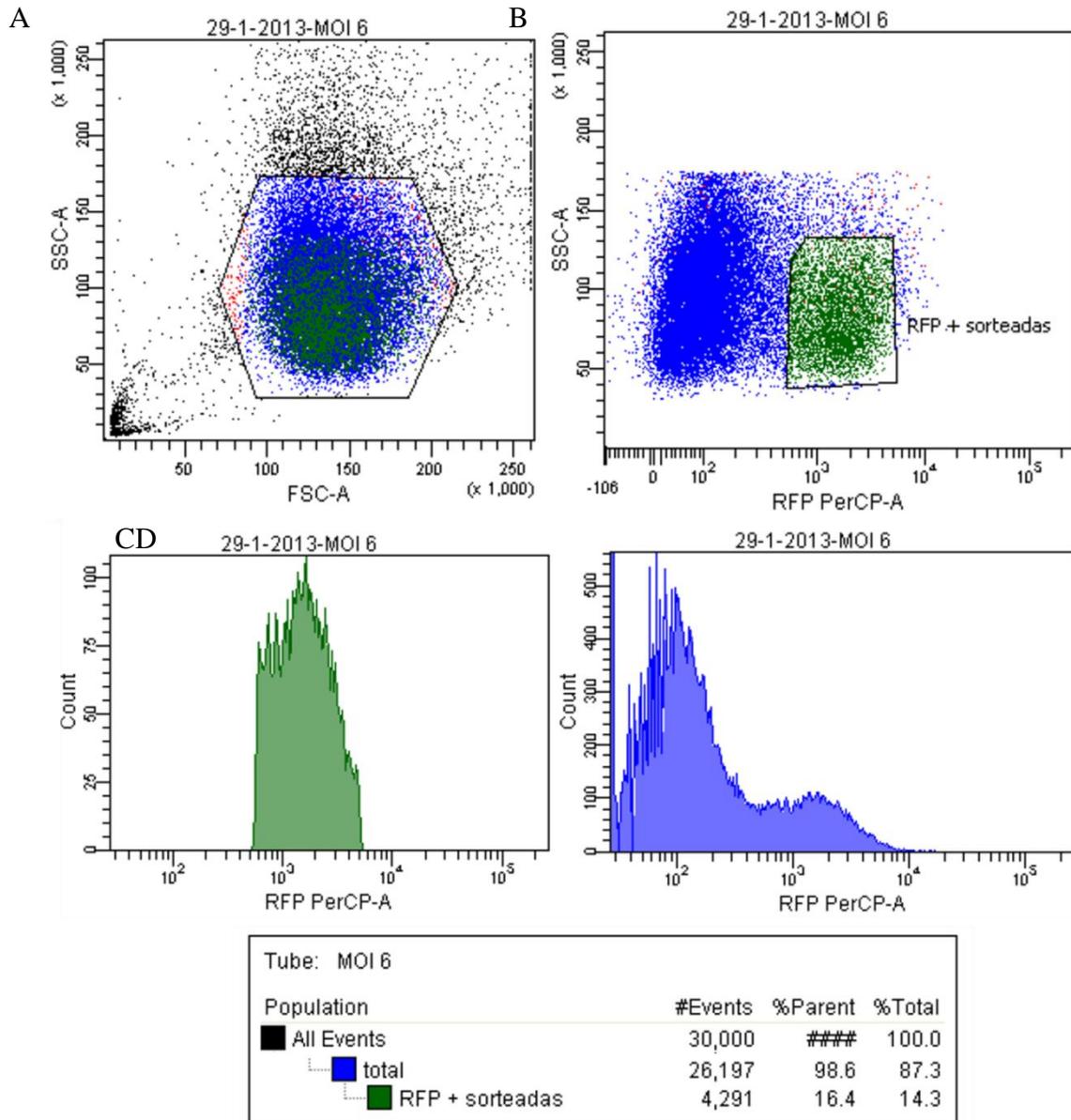


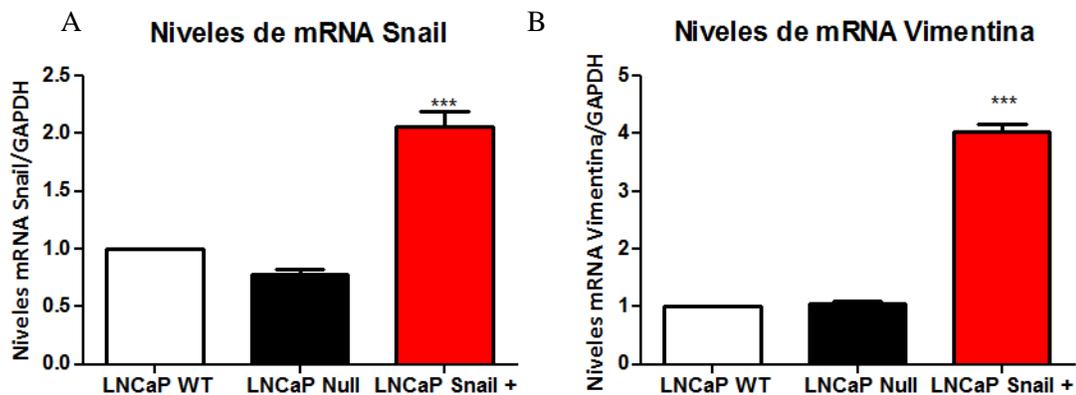
Figura 20: Patrón de separación de células LNCaP mediante sorting celular. A. Patrón de separación de las células LNCaP por tamaño y granularidad celular. B. Patrón de separación de las células LNCaP RFP-(azul) y RFP+ (verde). C. Gráfico del número de células LNCaP RFP+ (verde). D. Gráfico del número de células RFP- (Azul).

Patrón de separación de las células LNCaP WT mediante sorting celular



**Figura 21:** Patrón de separación de células LNCaP infectadas y que generaron posteriormente las líneas celulares LNCaP-Snail+ y LNCaP- Null. A. Patrón de separación de las células LNCaP infectadas por tamaño y granularidad celular. B. Patrón de separación de las células LNCaP infectadas RFP-(azul) y RFP+ (verde). C. Gráfico del número de células LNCaP infectadas RFP+ (verde). D. Gráfico del número de células LNCaP infectadas RFP- (Azul).

A las células separadas previamente se les determinó el perfil de transcripción de mRNA de snail, mediante PCR en tiempo real, comparadas contra la línea original, LNCaP WT, y el control negativo de infección, LNCaP-null (Figura 22).



**Figura 22:** A) Cuantificación de los niveles de mRNA de snail normalizados por los niveles de mRNA de GAPDH y B) Cuantificación de los niveles de mRNA de snail normalizados por los niveles de mRNA de GAPDH en las líneas celulares LNCaP wild-type, LNCaP null y LNCaP Snail+. Las barras representan el promedio +/- el error estándar del promedio de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de varianzas \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$

Nuestros resultados confirman que los niveles del transcrito de snail aumentan de manera significativa en la nueva línea celular cuando se compara con ambas líneas controles, indicando que la infección fue exitosa ya que existen más copias de mRNA de snail. Como respuesta compensatoria al aumento de snail las células sobreexpresan vimentina y al medir los niveles de mRNA de esta molécula en las células LNCaP-snail+ observamos que existe un aumento en su expresión transcripcional.

Con el fin de determinar la funcionalidad de la sobreexpresión de snail, se realizaron inmunofluorescencias contra snail para comprobar su presencia en el núcleo (Figura 23) y contra e-cadherina para verificar si existe una disminución en los niveles proteicos de esta última (Figura 24).

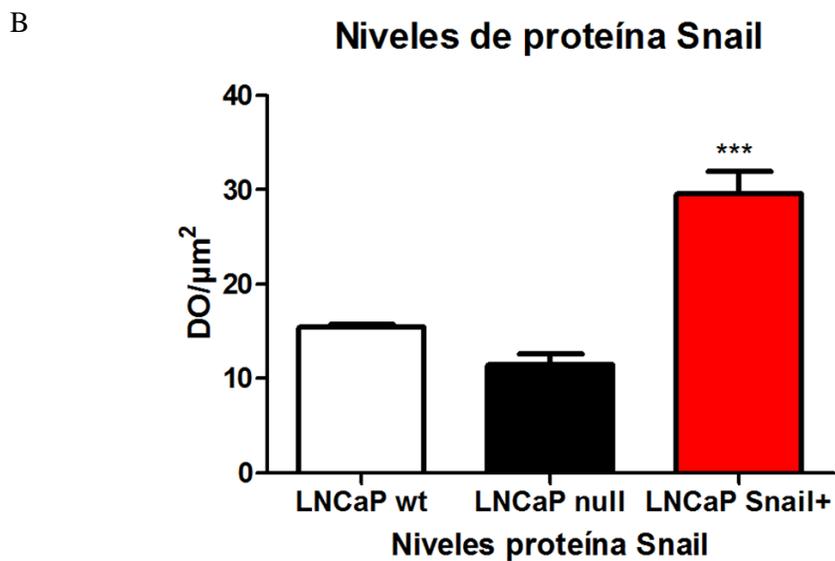
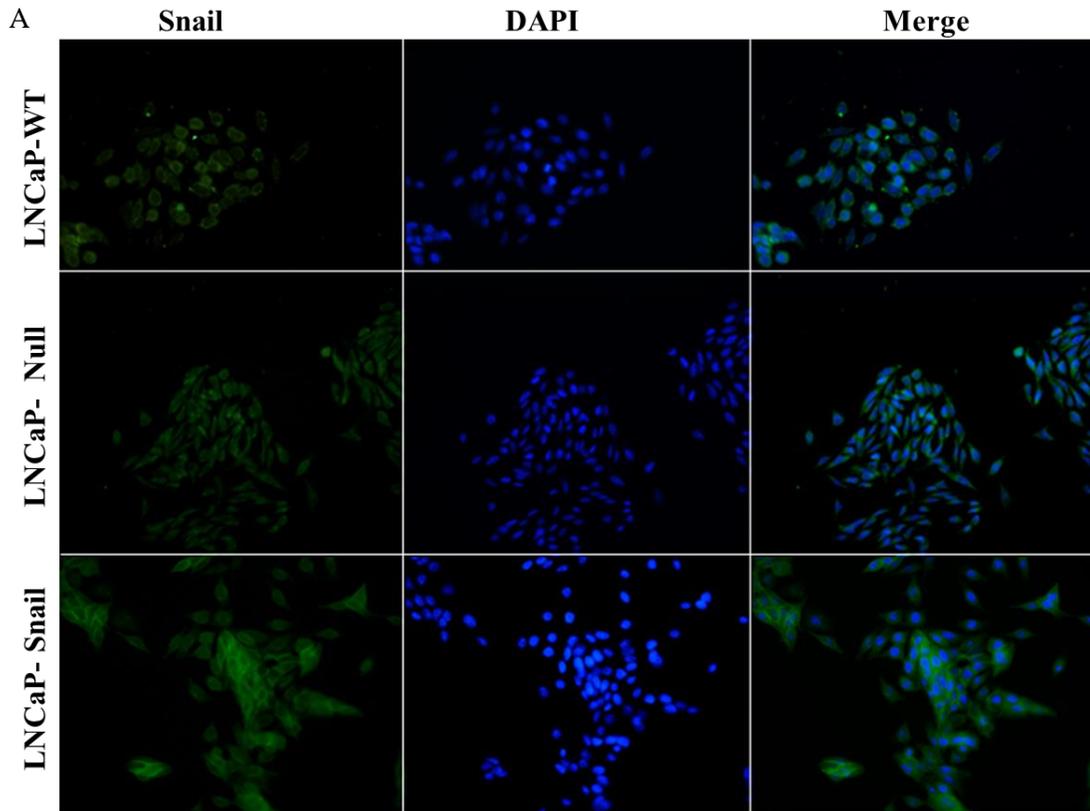
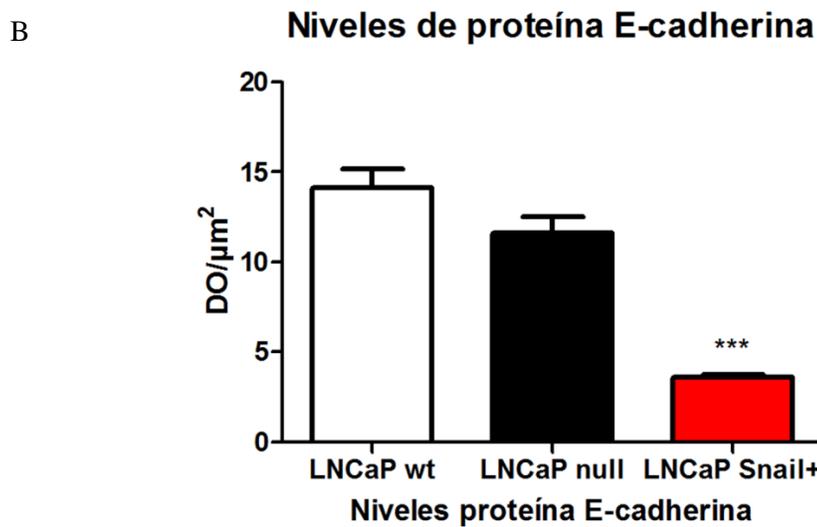
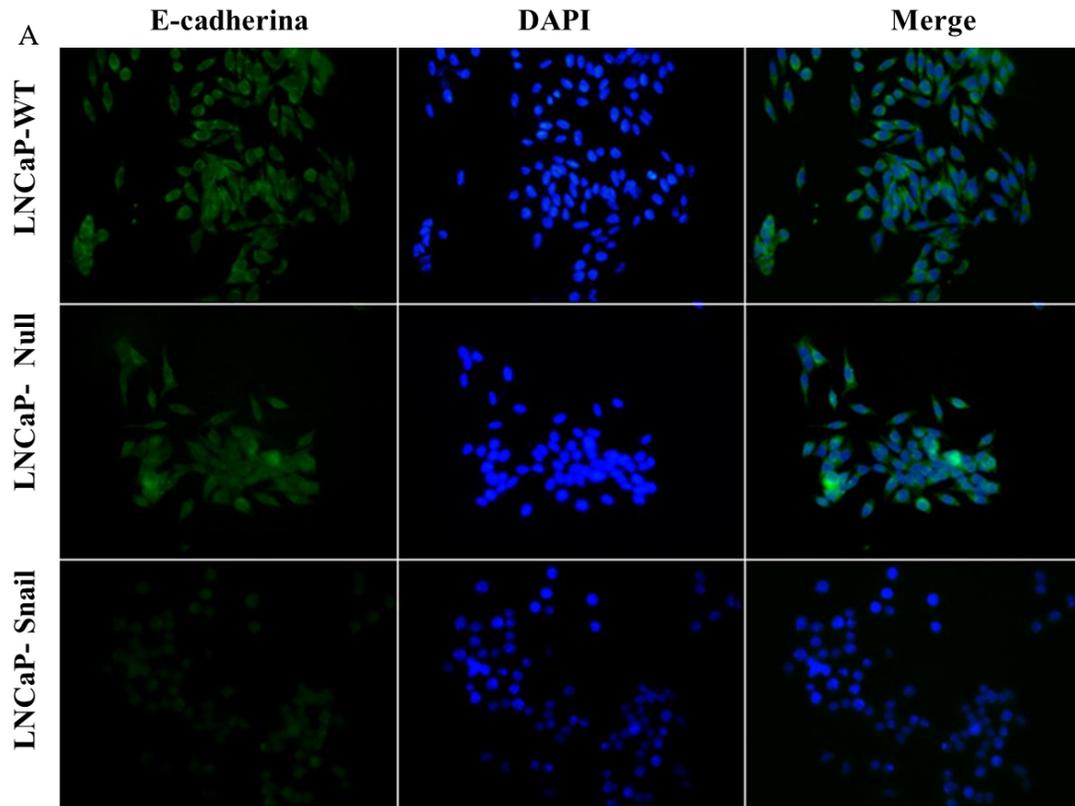


Figura 23: A. Microfotografías de inmunofluorescencia indicando la localización del factor de transcripción snail, en las líneas celulares LNCaP wt, LNCaP null y LNCaP Snail+, además se muestra las imágenes de las regiones ricas en A-T del DNA y la superposición con la marca del factor. B. Gráfico de intensidad (DO/ μm<sup>2</sup>) del nivel de proteína snail en las líneas celulares LNCaP wt, LNCaP null y LNCaP Snail+. Las barras representan el promedio +/- el error estándar del promedio de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de varianzas \*\*\*, p < 0,001; \*\*, p < 0,01; \*, p < 0,05.



**Figura 24:** A. Microfotografías de inmunofluorescencia indicando la localización de e-cadherina, en las líneas celulares LNCaP Wild type, LNCaP null y LNCaP Snail+, además se muestra las imágenes de las regiones ricas en A-T del DNA y la superposición con la marca del factor. B. Gráfico de intensidad (DO/ μm<sup>2</sup>) del nivel de proteína e-cadherina en las líneas celulares LNCaP wt, LNCaP null y LNCaP Snail+. Las barras representan el promedio +/- el error estándar del promedio de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de varianzas \*\*\*,p<0,001; \*\*,p<0,01; \*p<0,05

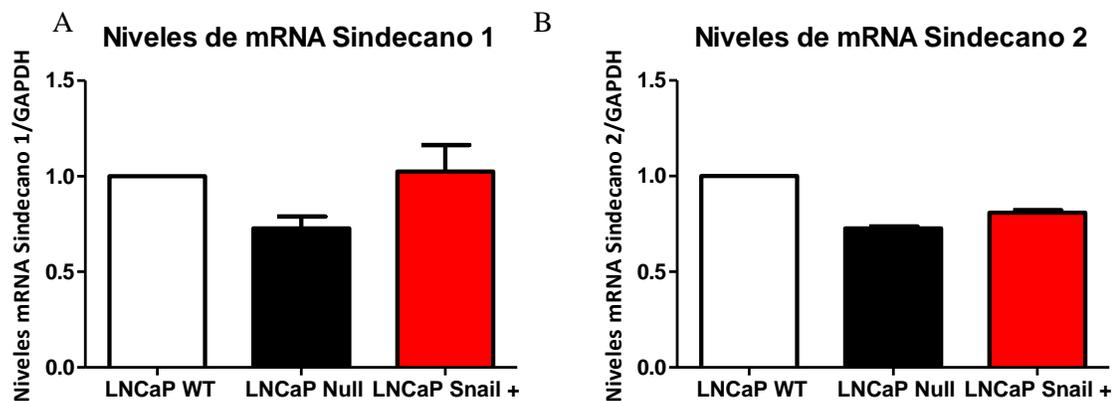
La nueva línea celular LNCaP-Snail+ tiene mayores niveles de mRNA y proteína snail que LNCaP wild type y LNCaP null. En las inmunocitoquímicas fluorescentes también se observa que cuando snail está sobreexpresado los niveles proteicos de la proteína E-cadherina disminuyen. Esto se complementa con lo obtenido mediante PCR en tiempo real, donde como medida compensatoria al aumento de snail, los niveles de mRNA de vimentina aumentan, tal como ocurre durante la TEM, tanto en el desarrollo embrionario como en la progresión tumoral.

Como las células LNCaP-Snail+ presentan una sobreexpresión del represor transcripcional y este es funcional, es posible entonces determinar si ejerce una acción regulatoria sobre las regiones promotoras de los genes de sindecano 1 y sindecano 2

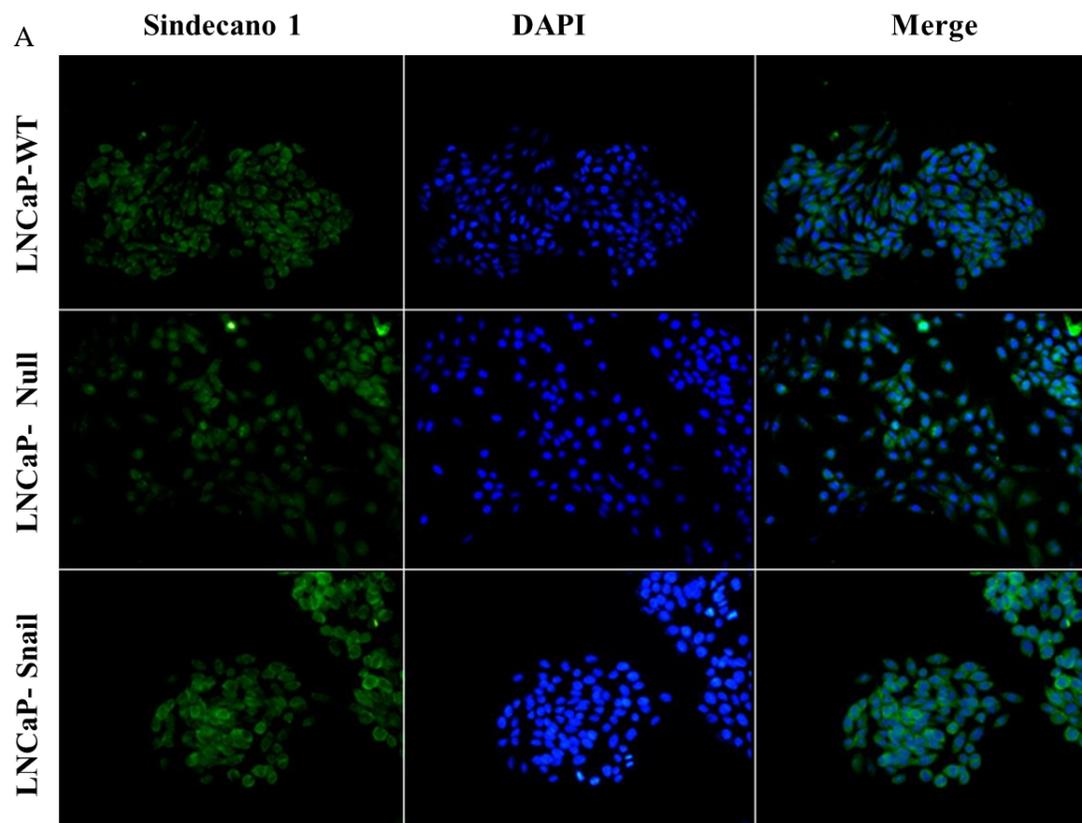
### **Objetivo 3:**

**Determinar, mediante PCR en tiempo real, inmunocitoquímica, y ensayo de gen reportero, el efecto de la sobreexpresión de Snail en la expresión de Sindecano 1 y Sindecano 2, *in vitro*, en la línea LNCaP Snail+.**

Aun cuando en el objetivo 1 se demuestra que Snail sólo podría regular directamente Sindecano 1, mediante PCR en tiempo real se midieron los niveles de mRNA tanto de Sindecano 1 como de Sindecano 2 (Figura 25), este último como control de una molécula que no debería cambiar sus patrones de expresión en las células infectadas. A través de inmunofluorescencia se midieron los niveles de proteína de Sindecano 1 (Figura 26) en las líneas celulares y de forma complementaria se realizaron ensayos de gen reportero (Figura 27) para estudiar la posible regulación de Sindecano 1 mediante el represor transcripcional Snail.



**Figura 25:** Cuantificación de los niveles de mRNA de A. sindecano 1 y B. sindecano 2, normalizados por los niveles de mRNA de GAPDH en las líneas celulares LNCaP wild-type, LNCaP null y LNCaP Snail+. Las barras representan el promedio +/- el error estándar del promedio de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de varianzas.



B

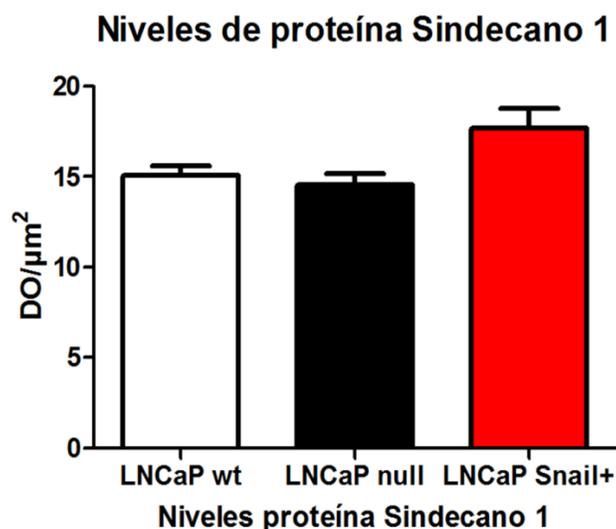


Figura 26: A) Microfotografías de inmunofluorescencia indicando la localización de sindecano 1, en las líneas celulares LNCaP Wild type, LNCaP null y LNCaP Snail+, además se muestra las imágenes de las regiones ricas en A-T del DNA y la superposición con la marca del factor. B. Gráfico de intensidad ( $\text{DO}/\mu\text{m}^2$ ) del nivel de proteína sindecano 1 en las líneas celulares LNCaP wt, LNCaP null y LNCaP Snail+. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de varianzas.

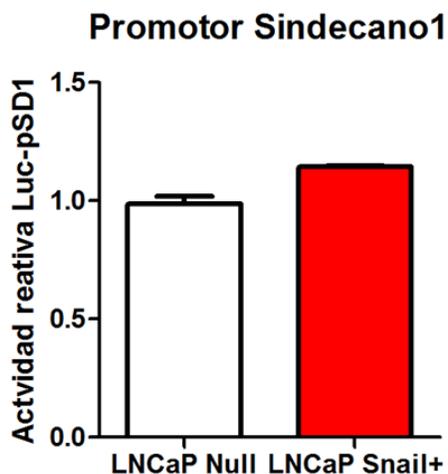


Figura 27: Cuantificación de la actividad relativa del promotor sindecano1-luciferasa normalizada por la actividad renilla en las líneas celulares LNCaP wild-type, LNCaP null y LNCaP Snail+. Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas por el análisis de varianzas.

Estos resultados sugieren que sólo la sobreexpresión de snail en la línea celular LNCaP no es suficiente para generar una represión directa en la expresión de sindecano 1, ni una regulación indirecta sobre sindecano 2. La regulación de sindecano 1 durante la TEM no está en la actualidad bien dilucidada, y puede tener diferencias significativas con la regulación de e-cadherina, como podrían ser la necesidad de contar con co-represores del promotor del gen de sindecano 1.

## VII. DISCUSIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo después de las enfermedades cardiovasculares. La búsqueda exhaustiva de nuevos marcadores tumorales que sean relevantes para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de diversas patologías es cada vez más necesaria. En el CaP se ha incorporado la detección del PSA como método de screening en la población general, y en la actualidad es el único marcador utilizado en la clínica para detectar un tipo de cáncer. Pero los niveles de PSA también tienden a ser elevados en hombres mayores de 50 y en patologías benignas de la próstata como HPB<sup>64</sup>.

En el CaP se ha demostrado que es importante en el momento de realizar una biopsia, contar con un marcador que permita generar un pronóstico sobre la posible capacidad del tumor para generar una metástasis y así precisar el tratamiento. En nuestro laboratorio se ha trabajado en la búsqueda de un posible marcador de pronóstico y así se comenzaron a estudiar las moléculas de adhesión sindecano 1 y sindecano 2<sup>57</sup>. En otros carcinomas se ha identificado que la pérdida en la expresión de estos proteoglicanos se correlaciona con el aumento en la migración y capacidad de generar metástasis<sup>55</sup>. En biopsias de pacientes con CaP se observa una disminución de la localización en membrana de ambas moléculas y por esto se han planteado sindecano 1 y 2 como posibles marcadores de mal pronóstico de la enfermedad<sup>58</sup>. Pero aun cuando podamos determinar que un paciente con CaP tiene mayores probabilidades de generar metástasis, es necesario entender el mecanismo que origina esta capacidad invasiva para a futuro generar una terapia capaz de revertir la progresión de la enfermedad. Si bien el represor transcripcional snail no es un posible marcador tumoral por su corta vida media, es importante dilucidar el papel exacto de snail en la progresión de este carcinoma, para contrarrestar sus efectos y determinar si es una molécula diana para una terapia.

Los resultados obtenidos mediante ChIP dan cuenta de la interacción de snail con la región promotora del gen de sindecano 1 sólo en las células PC3. En la línea celular LNCaP en cambio no se observan niveles de enriquecimiento en la inmunoprecipitación que puedan indicar interacción de snail con la región promotora del gen de sindecano 1. Esto concuerda con los resultados previos a esta investigación, puesto que los niveles de proteína snail en LNCaP son más bajos que en PC3 y no se localizan en el núcleo<sup>59</sup>. Entonces es lógico plantear que snail en las células LNCaP no logra interactuar con el DNA, ya que su ubicación es uniforme y no se concentra en el núcleo, como si ocurre en las células PC3. Durante la tumorigénesis, es posible que se generen mutaciones tanto en el promotor de sindecano 1 como en el transcrito de snail, lo que podría cambiar sitios de fosforilación en snail, o generar un promotor menos activo. Como no se ha secuenciado el promotor de sindecano 1 en ambas líneas para compararlas, no es posible afirmar que sean iguales. Si se realizará una investigación al respecto esperaríamos que se obtuvieran regiones con diferencias significativas en ambos modelos de trabajo.

En la región promotora del gen de sindecano 2 no se observan niveles de enriquecimiento en la inmunoprecipitación de snail sobre el control negativo IgG en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Estos resultados se explican mediante el estudio de sindecano 2 en biopsias de pacientes con CaP, donde si bien se ve claramente una disminución en la localización de este proteoglicano en la membrana celular, no se observa un cambio en los niveles de proteína totales en la célula<sup>60</sup>. Es posible que los niveles proteicos de sindecano 2 se regulen mediante mecanismos post-traduccionales y no en el proceso de transcripción. Si así fuese, es necesario indagar en el papel que cumple sindecano 2 durante la progresión tumoral.

De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el análisis de ChIP se esperaba que al sobre expresar snail, este fuera capaz de reprimir la expresión transcripcional de sindecano 1 y no cambiar el patrón de expresión de sindecano 2. Cuando se realizó el estudio, los resultados arrojaron que ni la expresión de sindecano 1 ni la de sindecano 2 se ven alteradas por la sobreexpresión de snail, pero que si disminuyen los niveles

de proteínas-cadherina. Existe entonces la posibilidad que snail simplemente no participe en la regulación génica directa de sindecano 1. Pero en las regiones que comprenden la E-box 1 y 2 del promotor del gen desindecano 1 (donde existe enriquecimiento de snail) también se observa un aumento en el enriquecimiento de H3 lo que pudiese indicar un promotor reprimido. Si es que existe un aumento en los niveles de enriquecimiento de H3, esto conlleva un aumento en el número de nucleosomas, mayor compactación de la cromatina y por consiguiente la represión transcripcional en esta zona<sup>65</sup>. Snail es capaz de reclutar HDAC<sup>40</sup>, que desacetilan la H3 e H4, y otros elementos de regulación, como AJUBA<sup>41</sup> y el PRC2<sup>43</sup>, que metilan las histonas en K27. Todo esto genera que los nucleosomas se compacten y la cromatina pase de un estado de heterocromatina a eucromatina y así se pueda reprimir la expresión de diferentes moléculas como e-cadherina<sup>67</sup>. Entonces si la cromatina se estuviera compactando en el promotor del gen desindecano 1, por efecto de la interacción con snail, por qué al sobre expresar esta molécula no vemos una disminución en la expresión de sindecano 1. Es necesario entonces plantear que existen diferencias significativas en los mecanismos de regulación transcripcional de e-cadherina y sindecano 1.

La regulación de la expresión transcripcional y traduccional de sindecano 1 no está completamente dilucidada durante la TEM y no se puede asumir que se desarrolla de igual manera que la de e-cadherina, ya que el promotor de sindecano 1 presenta diferencias considerables con otros promotores donde se ha estudiado la regulación transcripcional de snail. Las E-box 1 y 2 presentes en la región promotora de sindecano 1 son más distantes entre sí que las que se ubican en el promotor de e-cadherina. La distancia entre las E-box permite que la represión del promotor sea mantenida por factores como zeb 1 y zeb2, ya que estas moléculas interactúan con ambas cajas a la vez mediante la formación de estructuras secundarias que se forman en el promotor de e-cadherina<sup>39</sup>. Como entre las E-box 1 y 2 del promotor de sindecano 1 la distancia es mayor a lo que se describe en el promotor de e-cadherina, es posible que solamente la sobreexpresión de snail en un modelo celular no sea capaz de disminuir la expresión de sindecano 1, ya que sería necesaria la presencia

de otras moléculas que generen una estructura secundaria en el DNA, o de un complejo de represión diferente al de zeb 1 y zeb 2.

Para afirmar que snail no sólo se une a las regiones promotoras de sindecano 1 sino que también reprime su expresión es posible utilizar un miRNA para snail en las células PC3, que muestran altos niveles de proteína snail. De esto se esperaría que las células con snail silenciado aumentan sus niveles de mRNA y proteínas de sindecano 1, si esto no ocurriera es posible que snail no participe como factor principal en la regulación génica de sindecano 1 o que simplemente no ejerza ningún rol en esta. Como la investigación sobre la regulación transcripcional de sindecano 1 en el CaP no ha sido anteriormente estudiada y este es un trabajo pionero, es necesario en próximas investigaciones abarcar todas las estrategias experimentales para proponer un modelo final acerca del papel que tiene snail en la regulación de sindecano 1.

Futuros estudios deberían dilucidar también qué moléculas actúan como co-represores del promotor del gen desindecano 1 junto con snail, y mediante qué dominio interactúan con snail en caso de que existiera interacción entre ambos. La presente investigación representa un inicio en el estudio de la regulación génica de sindecano 1, donde se demuestra la interacción de snail con el promotor de este proteoglicano, pero no fue posible dilucidar el mecanismo completo de represión por parte de snail, que claramente es diferente al de otras moléculas de adhesión como e-cadherina. Es importante entender el proceso de regulación transcripcional y epigenética que ocurre en el cáncer prostático pues esto nos llevará en un futuro a desarrollar terapias para prevenir metástasis del tumor y por tanto a aumentar la sobrevivencia de los pacientes.

## **VI. CONCLUSIÓN**

1. De acuerdo a los resultados obtenidos por los ensayos de ChIP, el represor transcripcional snail interacciona con dos de las cinco regiones analizadas en el promotor del gen de sindecano 1.

2. No existe una disminución en la expresión de sindecano 1 ni de sindecano 2 en la línea celular LNCaP-snail+ que tiene mayores niveles de proteína snail

Se propone que snail puede participar en la regulación génica de sindecano 1 en conjunto con otros represores transcripcionales que aún no han sido estudiados.

## VII. REFERENCIAS

---

<sup>1</sup> De Marzo A.M, Platz E.A, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake C.G, Nakai Y, Isaacs W. B, Nelson W. G. (2007) Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7:256-69.

<sup>2</sup>Instituto Nacional del Cáncer EE.UU. Sitio web: <http://www.cancer.gov/espanol>

<sup>3</sup> Serie de defunciones por tumores malignos, según sexo. Chile 2000-2010. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.

<sup>4</sup> Corporación Chilena contra en cáncer de próstata. Sitio Web: <http://www.miprostata.cl>

<sup>5</sup>Gotzmann, J; Mikula, M; Eger, A; Schulte-Hermann, R; Foisner, R; Beug, H; Mikulits, W. (2004). Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res.* 566: 9-20.

<sup>6</sup>Pinski, J; Dorff, TB. (2005). Prostate cancer metastases to bone: pathophysiology, pain management, and the promise of targeted therapy. *Eur J Cancer.* 41: 932-940.

<sup>7</sup> Baechler R .(2001) Prostate neoplasm prevalence in Talca, VII Region of Chile. *Rev Med Chil.* 129: 1305-10

<sup>8</sup> Van der Poel HG. (2007) Molecular markers in the diagnostics of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 61:104-39

<sup>9</sup> Kalluri R. (2009) EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 119: 1417-9.

<sup>10</sup> Douglas S. Micalizzi, Susan M. Farabaugh ,Heide L. Ford. (2010) Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15:117–134

<sup>11</sup> Lopez-Novoa JM, Nieto MA. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med.* 1:303–14.

<sup>12</sup> Thiery JP, Sleeman JP. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-142.

<sup>13</sup>Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thomson E.W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology* 172: 973-981.

<sup>14</sup>Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.* 119(6): 1438-49.

<sup>15</sup> Thiery JP. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2:442-454

- 
- <sup>16</sup> Quinn D, Henshall S, Sutherland R. (2005). Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 41: 858-887.
- <sup>17</sup> Peinado H, Portillo F, Cano A. (2004) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 48:365-375.
- <sup>18</sup> Nieto MA (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:155-166.
- <sup>19</sup> Peña C, García J.M, García V, Silva J. (2006). The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int. J. Cancer* 119: 2098 -2104
- <sup>20</sup> Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 116:499-511
- <sup>21</sup> Barrallo- Gimeno A, Nieto MA. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in the development and cancer. *Development* 132:3152-3161
- <sup>22</sup> Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, et al. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 68: 937-945.
- <sup>23</sup> Gavert N, Ben-Ze'ev A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumor. *Trends Mol. Med.* 14:199-209.
- <sup>24</sup> Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. (2005). The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 65:5996-6000
- <sup>25</sup> Fidler T, Kripke ML. (1977) Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197:893-895.
- <sup>26</sup> Manzanares M, Locascio A, Nieto MA. (2001). The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoa evolution. *Trends Genet* 17:178-181.
- <sup>27</sup> Barrallo-Gimeno A. Nieto MA. (2009) Evolutionary history of the Snail/Scratch superfamily. *Trends Genet*; 25(6): 248-52
- <sup>28</sup> Alberga A, Boulay JL, Kenpe E, Dennefeld C, Haenlin M. (1991). The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111: 983-992
- <sup>29</sup> Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien- Grille S, Guaita- Esteruelas S, Peiro S, Baulida J, Franci C, Dedhar S, Larue L, Garcia de Herreros A. (2004) Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene* 23: 7345-7354.

- 
- <sup>30</sup> Rosivatz E, Becker KF, Kremmer E, Schott C, Blechschmidt K, Hofler H, Sarbia M. (2006) Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Virchows Arch* 448: 277-287.
- <sup>31</sup> Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K, Aishima S, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. (2006) Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 9: 2656-2664
- <sup>32</sup> Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gómez S, Rodriguez R, Escriva M, Monserrat-Sentis B, BaroT, Garrido M. (2006) Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 25:5134-5144
- <sup>33</sup> Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139: 871-90.
- <sup>34</sup> Peinado H, Olmeda D, Cano A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature Reviews Cancer* 7: 415-428
- <sup>35</sup> Grimes HL, Chan TO, Zweidler-McKay PA, Tong B, Tschlis PN. (1996). The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 16:6263-6272.
- <sup>36</sup> Karni Schlessinger; Alan Hall. (2004). GSK-3 $\beta$  sets Snail's pace. *Nature Cell Biology* 6, 913 - 915
- <sup>37</sup> Dominguez, D, Montserrat-Sentis B, Virgos-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Franci C, Garcia de Herreros A. (2003) Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* 23:5078–5089.
- <sup>38</sup> Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. (2004) Dual regulation of Snail by GSK-3 $\beta$ -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 6:931-940.
- <sup>39</sup> Behrens J, Lowrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W. (1991) The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11495-11499
- <sup>40</sup> Von Burstin J, Eser S, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, Von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P. (2009). E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* 137: 361-271.
- <sup>41</sup> Hou Z, Peng H, Ayyanathan K, Yan KP, Langer EM, Longmore GD, Rausher FJ. (2008) The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 28:3198-3207.

- 
- <sup>42</sup> Herranz N, Pasini D, Diaz VM, Franci C, Gutierrez A, Dave N, Escriva M, Hernandez-Muñoz I, Di Croce L, Helin K. (2008) Polycomb complex 2 required for E-cadherin repression by the Snail transcription factor. *Mol Cell Biol* 28:4771-4781
- <sup>43</sup> Ara T, Deyama Y, Yoshimura Y, Higashino F, Shindoh M, Matsumoto A, Fukada H. (2000) Membrane type 1-matrix metalloproteinase expression is regulated by E-cadherin through the suppression of mitogen-activated protein kinase cascade. *Cancer Lett* 157:115-121.
- <sup>44</sup> Bussemakers M.J, Schalken JA, (1996). The role of cell adhesion molecules and proteases in tumor invasion and metastasis. *World J Urol*, 14: 151-6.
- <sup>45</sup> Beuvals BM, Rapraeger AC. (2004). Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod. Biol. Endocrinol* 7:2-3.
- <sup>46</sup> Couchman JR. (2010). Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 26:89-114.
- <sup>47</sup> Couchman JR. (2003). Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(12): 926-37.
- <sup>48</sup> Tkachenko EJ, Rhodes M, Simons M. (2005). Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res*. 96(5): 488-500.
- <sup>49</sup> Kiviniemi J, Kallajoki M, Kujala I, Matikainen M, Alanen K, Jalkanen M. (2004). Altered expression of syndecan-1 in prostate cancer. *APMIS*; 112: 89-97
- <sup>50</sup> Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner R, Rosenthal A, et al. (2004) Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours. *Eur J Cancer*; 40: 1373-82.
- <sup>51</sup> Couchman JR, Chen L, Woods A. (2010). Syndecans and cell adhesion. *Int Rev Cytol*. 207: 113-50
- <sup>52</sup> Shariat SF, Svatek RS, Kabbani W, Walz J, Lotan Y, Karakiewicz PI, Roehrborn CG. (2008.) Prognostic value of syndecan 1 expression in patients treated with radical prostatectomy. *BJU Int*. 101(2): 232-7
- <sup>53</sup> Brimo F, Vollmer RT, Friszt M, Corcos J, Bismar TA. (2010). Syndecan 1 expression in prostate cancer and its value as biomarker for disease progression. *BJU Int*. 106(3): 418-23
- <sup>54</sup> Essner JJ, Chen E, Ekker SC. (2006). Syndecan 2. *Int. J. Biochem Cell Biol*; 38(2):152-156.
- <sup>55</sup> Han I, Park H, Oh E. (2004). New insights into syndecan-2 expression and tumorigenic activity in colon carcinoma cells, *J Mol Histology* 35: 319–326.
- <sup>56</sup> Contreras HR, Ledezma R, Vergara J, Cifuentes F, Barra C, Gallegos I. (2009). The expression of Syndecan-1 and 2 is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer. *Urol Oncol*; 28:534-40

- 
- <sup>57</sup> Contreras HR. (2010). Syndecans in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Rev Med Chil.* 138: 95-101
- <sup>58</sup> Ledezma R, Gallegos I, Fullá J, Huidobro C, Castellón E, Contreras HR. (2011). Shift of expression pattern of syndecan 1 and 2 predicts biochemical recurrence in prostate cancer. *Asian J Androl.*13:476-80.
- <sup>59</sup> Fulla J. (2011) Expresión de snail 1 en la transformación maligna del cáncer de próstata. Tesis Programa de magister en Ciencias Médicas con Mención en Biología de la Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- <sup>60</sup> Poblete C. (2011). Marcadores de Transición Epitelio-Mesenquimal en Cáncer de Próstata. Tesis de Escuela de Tecnología Médica, Mención Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- <sup>61</sup> Nackaerts K, Verbeken E, Deneffe G, Vanderschueren B, Demedts M, David G (1997) Heparan sulfate proteoglycan expression in human lung-cancer cells. *Int J Cancer* 74:335-345.
- <sup>62</sup> Chomczynski P, Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156–159
- <sup>63</sup> Ruifrok AC, Johnston DA. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 2001, 23:291-9
- <sup>64</sup> Roobol MJ, Carlsson SV.(2013) Risk stratification in prostate cancer screening. *Nat Rev Urol.* 10:38-48.
- <sup>65</sup> Bártoová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S.(2008). Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem.* 56:711-21.

---