

UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

“Marcadores de Transición Epitelio-Mesénquima en biopsias prostáticas de una cohorte de pacientes con diagnóstico de cáncer de Próstata e hiperplasia prostática, y su asociación con PSA preoperatorio, índice de Gleason, y estadio clínico del tumor.”

Seminario de Grado

Presentado en conformidad a los requisitos para obtener

El Grado Académico de

**“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología
Y Citodiagnóstico”**

Natalia Emelinda Pérez Barraza

Profesor Guía

Eva Madrid Aris

Profesor Co-Guía

Sebastián San Martín Henríquez

AGRADECIMIENTOS

Si bien es cierto que para lograr cualquier objetivo que uno se proponga es necesario esforzarse al máximo, hay una parte importante que no se puede dejar de mencionar y agradecer, como es el apoyo incondicional de aquellos que creen en ti. Esas personas que con su apoyo, amor y confianza te instan a seguir adelante, que con una palabra de apoyo no dejan que uno se rinda.

Cada persona cumple un objetivo en esta gran red de aliento como es la Dra. Eva Madrid, que con su disposición, apoyo incondicional y palabras incentivadoras me ayudaron a confiar en mis capacidades, dándome la oportunidad al incorporarme a su equipo de trabajo. Así también agradecer al Dr. Sebastián San Martín, por su orientación y por permitirme la integración al Laboratorio de Ciencias Morfológicas.

Al Tecnólogo Médico Juan Varas, por su ayuda permanente y consejos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

Al Tecnólogo Médico Claudio Córdova, por sus aportes en todo lo que respecta a la programación computacional.

A todo el equipo de trabajo Pía Poggie y Renato Casalino (Patólogos), como a Pedro acuña (Urólogo), y al estudiante de Medicina Sebastián Concha.

No olvidando a mis compañeros y amistades de laboratorio a Samuel, Maca, Nico y Maggie.

A mis hermanas Belén e Isabela que con sus bromas siempre lograron subir mi ánimo en aquellos momentos que en que lo necesitaba, además de brindarme su ayuda cuando fue necesario.

A mis padres que siempre me han guiado en el camino correcto, me han instado a que persiga mis sueños con ímpetu, que siempre confié y me crea capaz de alcanzar todo aquello que me proponga. Por último, agradecer a aquel que siempre ha guiado mis pasos.

Quizás me quedan muchos nombre el tintero pues, siempre recibí ayuda de cuando lo necesite, a todos aquellas personas que han estado conmigo solo resta decirles, GRACIAS.

Dedicado a mi familia...

RESUMEN

Introducción: El Cáncer de próstata (CaP) es el cáncer más frecuente y la sexta causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial. Uno de los procesos más asociados a la elevada mortalidad es la capacidad de generar metástasis a distancia, las que se asocian a la capacidad de las células de generar una transición epitelio-mesénquima (EMT), con pérdida de moléculas de adhesión como las cadherinas y aumento de moléculas relacionadas con la migración e invasividad como las metaloproteasas. La E-cadherina es una proteína epitelial, cuya pérdida representa un paso clave en la adquisición del fenotipo invasivo para el desarrollo y progresión de muchos cánceres. A su vez N-cadherina proteína mesenquimática, propicia el desarrollo del fenotipo migratorio celular. Por último, ADAM 12 una desintegrina y metaloproteinasa, ha sido recientemente vinculada al desarrollo y progresión de cáncer en una serie de tejidos. Dada la evidencia escasa de estos procesos en CaP, nuestro objetivo principal fue determinar la presencia de E-cadherina, N-cadherina y ADAM12 en muestras de tejidos prostáticos de una cohorte de pacientes con CaP e hiperplasia prostática (HP), y su asociación con variables clínico-patológicas

Métodos: Estudio observacional de 321 pacientes con cáncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática (HP). Se registraron los datos demográficos, clínicos, anatomopatológicos de toda la cohorte. Se realizó inmunohistoquímica para evaluar la presencia de E-cadherina, N-cadherina y ADAM 12 en las biopsias obtenidas por punción transrectal.

Resultados: E-cadherina presentó patrón de membrana en las células glandulares de la próstata, y su presencia fue significativamente inferior en las biopsias de CaP en relación a las biopsias de HP. N-cadherina presentó un patrón citoplasmático y ADAM 12 presentó un patrón mixto de membrana y citoplasmático en las células glandulares de la próstata, la presencia de ambas proteínas fue significativamente superior en las biopsias de CaP en relación a las biopsias de HP. Ninguno de los marcadores estudiados presentó asociación significativa con el PSA-preoperatorio, índice de Gleason, y grupos de riesgo de CaP.

Conclusión: La detección de las proteínas E-Cadherina, N-Cadherina y Adam 12 mediante la técnica inmunohistoquímica, podrían ser utilizados como marcadores diagnósticos del CaP.

Palabras clave

Transición epitelio mesénquima (EMT), Cáncer de próstata (CaP), Hiperplasia Prostática (HP), E-Cadherina, N-Cadherina, ADAM 12, Gleason, PSA (antígeno prostático específico)

ABSTRACT

Introduction: Prostate cancer (CaP) is the most prevalent cancer and the sixth cause of mortality among men worldwide. One of the processes responsible for the mortality in cancer is the metastasizing capacity of malignant cells, which is associated to the epithelial-mesenchymal transition process (EMT). EMT is a physiological process during embryogenesis, with loss of cell adhesion molecules such as cadherins, and increased expression of other molecules associated to invasive behaviour, such as matrix metalloproteinases (MMPs). E-cadherins are epithelial proteins which are lost during EMT, acquiring an invasive cell phenotype, which represents a clue step for development and progression in many cancers. At the same time, N-cadherin, a mesenchymal protein, is overexpressed in cancer, favouring the development of a migratory phenotype of malignant cells. Additionally, the disintegrin and metalloproteinase ADAM 12 has been recently described as being involved with the development and progression of some types of cancer.

. Given the limited evidence of these processes in CaP, our main objective was to determine the presence of E-cadherin, N-cadherin and ADAM12 in samples of prostate tissue from a cohort of patients with CaP and prostatic hyperplasia (HP), and its association with clinicopathological variables.

Methods: Observational prospective study conducted in a cohort of patients with prostate cancer (CaP) and prostatic hyperplasia (HP). We recorded all demographic, clinical and pathologic data of the participants and we assessed levels of E-cadherin, N cadherin and ADAM 12 in transrectal puncture biopsy samples, using immunohistochemical staining.

Results: E-cadherin showed a membrane pattern in prostate gland cells, and its presence was lower in CaP in comparison to HP. N-cadherin showed a cytoplasmatic pattern and ADAM-12 a mixed cytoplasmic and membrane pattern, and both proteins were significantly increased in CaP biopsies compared to HP. We found no significant association between these three biomarkers with PSA, Gleason score nor clinical risk stratification of CaP.

Conclusion: Immunodetection of E-Cadherin, N-Cadherin and Adam 12 proteins in prostatic gland cells might be utilized as diagnostic markers in CaP.

Keywords: Epithelial-mesenchymal transition EMT, prostatic cancer, prostatic hyperplasia, E-Cadherin, N-Cadherin, ADAM 12, Gleason , prostatic specific antigen (PSA).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción de la Próstata.	1
1.1.1. Zonas	2
1.2. Cáncer de Próstata.	4
1.2.1. Epidemiología	5
1.2.2. Factores de riesgo	6
1.2.3. Tamizaje	6
1.2.4. Estadificación cáncer de próstata	7
1.2.5. Clasificación de pacientes con CaP localizado según grupo de riesgo clínico	8
1.2.6. Tratamiento	9
1.3. Hiperplasia Prostática	13
1.4. Transición Epitelio-Mesénquima (EMT)	14
1.4.1. Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) como mecanismo fisiológico durante el desarrollo y como respuesta a la lesión	15
1.4.2. Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) como mecanismo patológico en Cáncer	17
1.4.2.1. <i>Transición Epitelio-Mesénquima (EMT), cáncer y cadherinas</i>	18
1.4.3. Cáncer y ADAM 12	20
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo General	23
2.1 Objetivos Específicos	23
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Tipo de estudio	24
3.2 Materiales	24
3.2.1 Población de estudio	24
3.2.2 Variables consideradas	25
3.2.3 Universo y la muestra	27
3.3 Métodos	27
3.3.1 Procedimiento de recolección de muestras y registro de los pacientes	27
3.3.2 Procedimientos experimental de tratamiento de las muestras	28
3.3.3 Procedimiento de captura fotográfica y análisis de imágenes	34
3.3.3.1 <i>Captura de imágenes</i>	34
3.3.3.2 <i>Análisis de imágenes</i>	34
3.3.3.3 <i>Análisis estadístico</i>	38

CAPÍTULO 4: RESULTADOS	39
4.1 Resultados inmunohistoquímica de E-cadherina en biopsias con CaP y biopsias con HP .	41
4.2 Resultados inmunohistoquímica de E-cadherina en relación con el PSA preoperatorio en CaP y HP .	42
4.3 Resultados inmunohistoquímica de E-cadherina en relación con el índice de Gleason .	43
4.4 Resultados inmunohistoquímica de E-cadherina en relación con los grupos de riesgo de CaP .	43
4.5 Resultados inmunohistoquímica de N-cadherina en biopsias con CaP y biopsias con HP .	45
4.6 Resultados inmunohistoquímica de N-cadherina en relación con el PSA preoperatorio en CaP y HP .	46
4.7 Resultados inmunohistoquímica de N-cadherina en relación con el índice de Gleason .	47
4.8 Resultados inmunohistoquímica de N-cadherina en relación con los grupos de riesgo de CaP .	47
4.9 Resultados inmunohistoquímica de ADAM 12 en biopsias con CaP y biopsias con HP .	48
4.10 Resultados inmunohistoquímica de ADAM 12 en relación con el PSA preoperatorio en CaP y HP .	50
4.11 Resultados inmunohistoquímica de ADAM 12 en relación con el índice de Gleason .	50
4.12 Resultados inmunohistoquímica de ADAM 12 en relación con los grupos de riesgo de CaP .	51
4.13 Resultados inmunohistoquímica de E-cadherina en relación con N-cadherina y ADAM 12 .	52
4.14 Hematoxilina-eosina en CaP e HP .	55
4.15 Inmunohistoquímica E-cadherina en CaP e HP .	59
4.16 Inmunohistoquímica N-cadherina en CaP e HP .	63
4.17 Inmunohistoquímica ADAM 12 en CaP e HP .	67
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	71
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS:	81
ANEXOS:	94

ANEXO A: Acta de aprobación comité Ético-Científico de la Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso	94
ANEXO B: Batería de Deshidratación, Aclaramiento e Impregnación de Biopsias fijadas en Fijadores acuosos	97
ANEXO C: Protocolo Hematoxilina Eosina (técnica de rutina)	98
ANEXO D: Protocolo de Inmunohistoquímica Anti-E-Cadherina	99
ANEXO E: Protocolo de Inmunohistoquímica Anti-N-Cadherina	101
ANEXO F: Protocolo de Inmunohistoquímica Anti-ADAM12	103

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Esquema que ilustra los tipos de glándulas presentes en la próstata.	2
FIGURA 1.2: Dibujo explicativo donde se realiza una comparación entre una próstata normal y una con Cáncer.	4
FIGURA 1.3: Evolución de la mortalidad por ciertos tumores malignos en hombres.	5
FIGURA 1.4: Sistema de Estratificación Cáncer de Próstata.	8
FIGURA 1.5: Directrices para el tratamiento primario de cáncer de próstata	11
FIGURA 1.6: Imagen donde se realiza una comparación entre una próstata normal y otra con hiperplasia.	13
FIGURA 1.7: Transición Epitelio-Mesénquima	15
FIGURA 1.8: Esquema de los marcadores epiteliales y mesenquimales..	17
FIGURA 1.9: Cambio de la expresión del tipo de cadherina de E-cadherina por N-cadherina	20
FIGURA 1.10: Estructura general de las ADAMS.	21
FIGURA 3.1: Cálculo del tamaño Muestral.	27
FIGURA 3.2: Programa computacional DP Controller.	35
FIGURA 3.3 Imagen obtenida con el software DP controller e imagen obtenida con el programa Image J.	36
FIGURA 3.4: Imagen obtenida por el programa al ajustar el umbral de colores e imagen del área total de epitelio.	36
FIGURA 3.5: Escala de Grises.	37

FIGURA 3.6: <i>Imagen obtenida al realizar el análisis con la escala de grises.</i>	37
FIGURA 3.7: <i>Imagen correspondiente al Excel (Score).</i>	37
FIGURA 4.1: <i>Hematoxilina y Eosina en CaP.</i>	56
FIGURA 4.2 : <i>Hematoxilina-Eosina en HP.</i>	58
FIGURA 4.3 : <i>Inmunohistoquímica de E-cadherina en CaP.</i>	60
FIGURA 4.4 : <i>Inmunohistoquímica de E-cadherina en HP.</i>	62
FIGURA 4.5 : <i>Inmunohistoquímica de N-cadherina en CaP.</i>	64
FIGURA 4.6 : <i>Inmunohistoquímica de N-cadherina en HP.</i>	66
FIGURA 4.7 : <i>Inmunohistoquímica de ADAM 12 en CaP.</i>	68
FIGURA 4.8 : <i>Inmunohistoquímica ADAM 12 en HP.</i>	70

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 3.1 <i>Estandarización de Anticuerpo Anti-E-Cadherina.</i>	30
TABLA 3.2 <i>Estandarización de Anticuerpo Anti-N-Cadherina..</i>	30
TABLA 3.3 <i>Estandarización de Anticuerpo Anti-ADAM 12.</i>	31
TABLA 3.4 <i>Listado y especificaciones de los anticuerpos primarios utilizados en el estudio.</i>	33
TABLA 4.1 <i>Características Basales de los pacientes estudiados.</i>	39
TABLA 4.2 <i>Características Basales de los pacientes según grupo de riesgo en CaP.</i>	40
TABLA 4.3 <i>IHQ para E-Cadherina según Escala de Grises en CaP y HP. (Gray value 8 bits).</i>	41
TABLA 4.4 <i>Índice de Correlación entre E-cadherina y PSA-preoperatorio.</i>	42
TABLA 4.5 <i>Índice de Correlación entre E-cadherina y índice de Gleason.</i>	43
TABLA 4.6 <i>IHQ para E-cadherina según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).</i>	44
TABLA 4.7 <i>IHQ para N-Cadherina según Escala de Grises en CaP y HP (Gray value 8 bits).</i>	45
TABLA 4.8 <i>Índice de Correlación entre N-cadherina y PSA-preoperatorio.</i>	46
TABLA 4.9 <i>Índice de Correlación entre N-cadherina y índice de</i>	47

<i>Gleason.</i>	
TABLA 4.10 <i>IHQ para N-cadherina según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).</i>	47
TABLA 4.11 <i>IHQ para ADAM 12 según Escala de Grises en CaP y HP (Gray value 8 bits).</i>	49
TABLA 4.12 <i>Índice de Correlación entre ADAM 12 y PSA-preoperatorio.</i>	50
TABLA 4.13 <i>Índice de Correlación entre ADAM 12 y índice de Gleason.</i>	50
TABLA 4.14 <i>IHQ para ADAM 12 según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).</i>	51
TABLA 4.15 <i>Razón del promedio de E-Cadherina/N-Cadherina según Escala de Grises en CaP y HP (Gray value 8 bits).</i>	53
TABLA 4.16 <i>Razón del promedio de E-cadherina/N-cadherina según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).</i>	53
TABLA 4.17 <i>Razón del promedio de E-Cadherina/Adam 12 según Escala de Grises para CaP y HP (Gray value 8 bits).</i>	54
TABLA 4.18 <i>Razón del promedio de E-cadherina/Adam 12 según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).</i>	54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 4.1 <i>Box-PLot, Presencia de E-Cadherina según Escala de Grises en CaP y HP (Gray value 8 bits.).</i>	42
GRÁFICO 4.2 <i>Box-PLot, Presencia de E-Cadherina según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits.).</i>	44
GRÁFICO 4.3 <i>Box-PLot, Presencia de N-Cadherina según Escala de Grises en CaP y HP (Gray value 8 bits.).</i>	46
GRÁFICO 4.4 <i>Box-Plot, Presencia de N-Cadherina según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).</i>	48
GRÁFICO 4.5 <i>Box-Plot, Presencia de ADAM 12 según Escala de Grises</i>	49

en CaP y HP (Gray value 8 bits).

GRAFICO 4.6 *Box-Plot, Presencia de ADAM 12 según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).*

52

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA PRÓSTATA

La Próstata es una glándula accesoria del aparato reproductor masculino, con forma y tamaño semejante a una nuez, que presenta una base que se encuentra relacionada con el cuello vesical, y un vértice que está en contacto con la cara superior del esfínter uretral (1).

Esta glándula está rodeada por una cápsula compuesta por tejido conectivo fibro-elástico y células musculares lisas, de la cual se originan tabiques que se extienden hacia el interior, subdividiéndola en lóbulos (2). Su parénquima está constituido por 30 a 50 glándulas túbulo-alveolares clasificadas en tres tipos: mucosas, submucosas y externas o principales (Figura 1.1).

Las glándulas de la próstata presentan un epitelio que varía de cúbico a cilíndrico simple e incluso puede tener regiones donde su epitelio es cilíndrico pseudoestratificado (3).

CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN

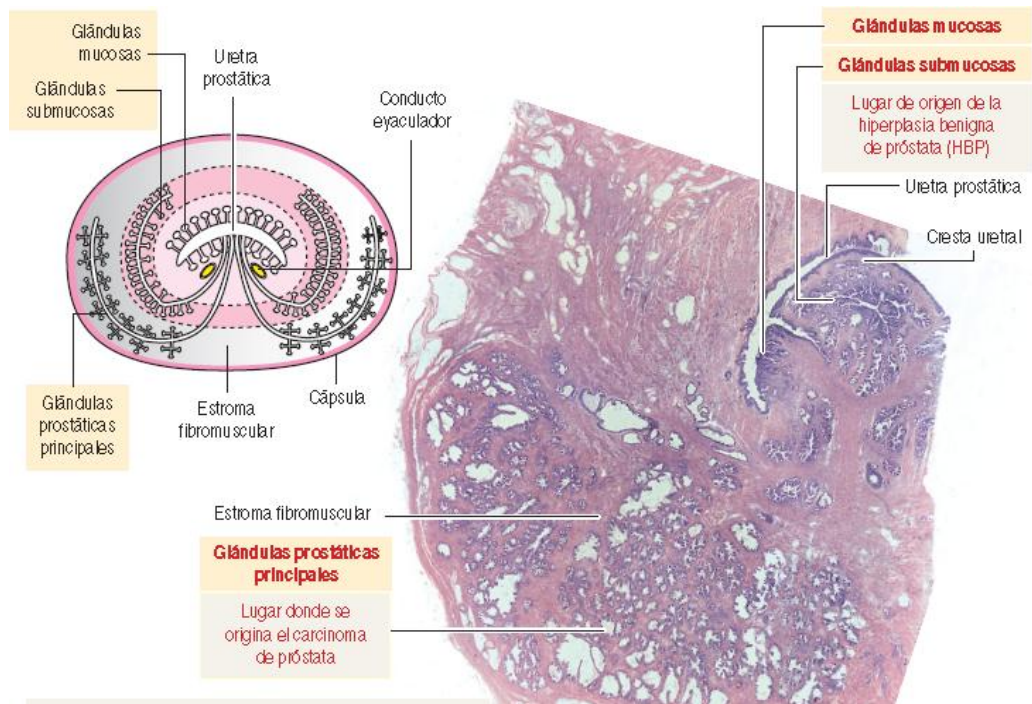


FIGURA. 1.1: Esquema que ilustra los tipos de glándulas presentes en la próstata.

Fuente: Gartner 2003 (2)

1.1.1 Zonas

La zona periférica constituye el 70% del tejido glandular prostático, asentándose en ella las glándulas principales. Es la zona más propensa a procesos inflamatorios y donde se da el mayor porcentaje de los carcinomas prostáticos, siendo importante en el tamizaje de esta patología por tratarse de una zona palpable al tacto rectal (4).

La zona central (zona de las glándulas submucosas) constituye el 25% del tejido glandular prostático, es una zona más resistente tanto a procesos inflamatorios como a carcinomas. Sus células presentan características morfológicamente distintas al resto de la glándula, existiendo núcleos más grandes, citoplasmas levemente basófilos y prominentes (4).

La zona transicional corresponde al tejido glandular ubicado allende a la uretra proximal y al esfínter (5). Presenta con mayor frecuencia la proliferación de células parenquimatosas, denominada hiperplasia prostática (6), y debido a su ubicación podría generar la obstrucción de la uretra prostática de forma parcial o total (4).

La zona periuretral contiene glándulas mucosas y submucosas. En etapas avanzadas de HP, existe una proliferación patológica predominantemente estromal, que junto con el crecimiento de la zona transicional, generan la compresión uretral prostática y con ello síntomas urinarios obstructivos (4).

La luz de la mayoría de las glándulas prostáticas presenta cuerpos amiláceos ricos en proteínas, de forma y tamaño variables, describiéndose como el producto de precipitaciones de material de secreción alrededor de fragmentos celulares. Cuando estos cuerpos se calcifican, se forman las concreciones prostáticas. En los cortes aparecen como cuerpos formados por laminillas concéntricas que en ocasiones tienen depósitos de calcio (4).

La próstata aporta el 15-30% del fluido seminal (7) siendo un líquido alcalino con la función de neutralizar el contenido ácido vaginal, aportar nutrientes, transportar espermatozoides y fluidificar el semen (3). Además de ello, la próstata sintetiza fosfatasa ácida específica, amilasa, fibrinolisisina, y el antígeno prostático específico (PSA), siendo ésta una proteína producida casi exclusivamente por las células epiteliales prostáticas (8), la cual ha sido utilizada desde el año 1987 (9) para observar la progresión del CaP. Posteriormente en 1994, fue aprobada como herramienta de diagnóstico precoz del CaP, junto con el examen digital del recto (10).

1.2 CÁNCER DE PRÓSTATA.

El cáncer de próstata (CaP) se origina en las glándulas prostáticas verdaderas ubicadas en la periferia prostática, por lo que su diseminación local se da a través de la cápsula antes que la infiltración central hacia la uretra. Dada su ubicación, el cáncer suele estar bien establecido antes que la persona presente síntomas, e inclusive manteniéndose latente en etapa de metástasis (11). La mayoría de los pacientes con CaP localizado fallece de causas no relacionadas con el mismo cáncer, sin nunca haber padecido incapacidad significativa producto de él (12). (Figura 1.2).

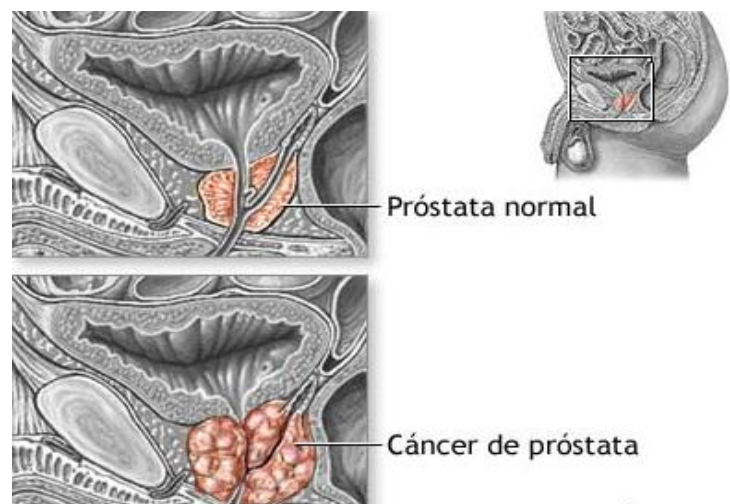
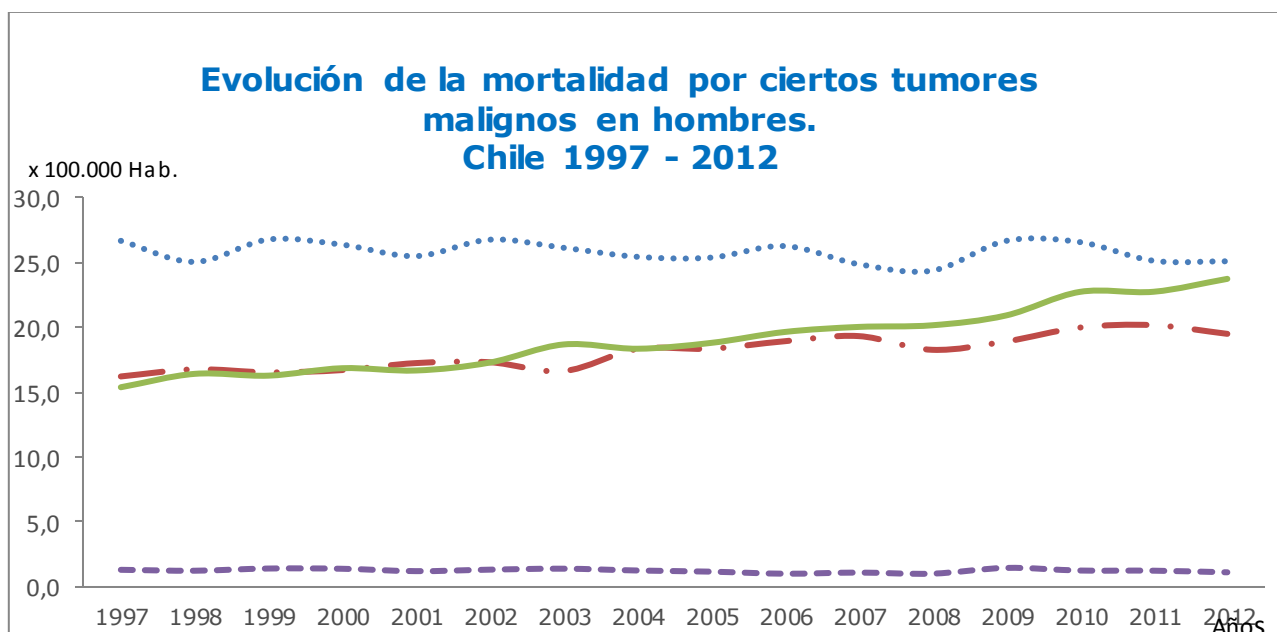


FIGURA 1.2: Dibujo explicativo donde se realiza una comparación entre una próstata normal y una con Cáncer. Fuente: A.D.A.M. Interactive anatomy 2013 (13).

1.2.1 Epidemiología

El CaP ha superado al cáncer pulmonar como el cáncer más frecuente en hombres a nivel mundial (14) (15). Además, constituye la sexta causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo (16). A pesar de que su detección es cada vez más precoz a través de la masificación de la medición del PSA y técnicas de biopsia prostática (17), alcanzó en el año 2008 más de 899.000 nuevos casos y 258.000 nuevas muertes, esperándose al año 2030 un crecimiento de hasta 1,7 millones de nuevos casos y 499.000 nuevas muertes, debido principalmente al aumento de expectativa de vida (18)

En Chile el CaP es considerado como la segunda causa de muerte en la población masculina (12), su frecuencia va en aumento a partir de los 55 años (11), con una incidencia de entre 55 y 57/100.000 hombres, y una mortalidad en aumento de 15,4 a 23,7/100.000 hombres desde el año 1997 hasta el 2012 (Figura 1.3) (19), siendo una patología relevante como problema de salud pública (12).



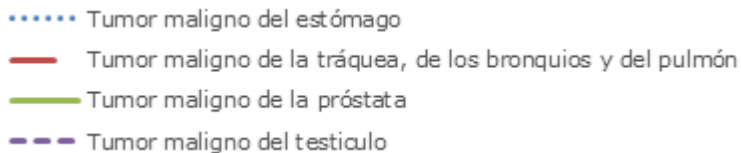


FIGURA.1.3: Evolución de la mortalidad por ciertos tumores malignos en hombres. Chile 1997-2012. Fuente: DEIS 2016 (19).

1.2.2 Factores de Riesgo

Aún no se conocen con exactitud la totalidad de los factores que determinan el riesgo de desarrollar CaP (8). No obstante, se destacan como importantes la edad del paciente, el grupo racial y la genética (20). Sin embargo, esta última da cuenta de sólo 10% de los casos (7). A su vez se plantean otros factores de riesgo para el desarrollo de CaP, tales como dietas ricas en grasas (21), el tabaco (22), enfermedades de transmisión sexual, infecciones virales y la actividad física (23), pero ninguno con asociación significativa demostrada (24).

1.2.3 Tamizaje

El tamizaje para cualquier tipo de patología tiene como finalidad aumentar la detección en individuos “sanos” (sin signos o síntomas de la enfermedad) a través de un test con alta sensibilidad. En el caso del tamizaje para CaP en personas sin factores de riesgo se recomienda iniciarlo desde los 40 años (25) a través de la realización del tacto rectal (TR) y la medición del PSA (26). Tras evaluación con los anteriores, se realiza la confirmación del diagnóstico de CaP a través de biopsia transrectal (27).

El TR es considerado un examen mal tolerado y rechazado por los pacientes (28). Este consiste en insertar en el recto un dedo cubierto por un guante lubricado, con el fin de palpar la superficie prostática en búsqueda de anomalías (29) tales como regiones

duras o asimétricas (26). La exactitud de esta prueba es operador-dependiente, ya que depende de la experiencia de quien la realiza (30).

El PSA es una glicoproteína codificada por un gen en el cromosoma 19, esta es producida por las células glandulares y ductales prostáticas, y secretada a los conductos glandulares, quedando confinada por encima de la lámina basal (28). La medición de su concentración en el plasma es \leq de 4.0 ng/ml en condiciones no patológicas, elevándose en caso de daño de la arquitectura glandular (inflamación, traumatismos, cáncer) o bien en pacientes añosos (27) o con HP (30). Sin embargo, se ha descubierto que hombres con concentraciones bajas de PSA en sangre aun así podrían tener CaP (31), y sólo un 25% de los hombres con PSA elevado a quienes se les realizó biopsia prostática tuvieron CaP, por lo que se ha definido al PSA como un marcador prostático más que un marcador de cáncer (32).

En conclusión, la sospecha de CaP puede plantearse frente a la elevación del PSA y/o TR anormal, debiendo confirmarse mediante biopsia prostática guiada por ecografía transrectal (26).

1.2.4 Estadificación del Cáncer de Próstata

La estadificación es el término que se utiliza para describir cuán lejos se ha propagado el cáncer (33). El sistema de estadificación más usado para el CaP es el TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC), en donde "T" permite describir la extensión local del tumor prostático (intracapsular o extracapsular) a través de cuatro categorías (T1-T4), "N" señala si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos, y por último "M" nos indica la presencia de metástasis a distancia, siendo columna y ganglios linfáticos distantes los lugares de diseminación más frecuentes (8) (Figura 1.4).

T: Tumor primario	N: Ganglios linfáticos regionales	M: Metástasis a distancia
Tx: No se puede evaluar el tumor primario.	Nx: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.	Mx: No se pueden evaluar las metástasis a distancia.
To: No hay evidencia del tumor primario.		
T1: tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas de imagen.		No: No se demuestran metástasis ganglionares regionales.
T1a: Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión menor o igual al 5% del tejido reseado.		
T1b: Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión mayor al 5% del tejido reseado.		
T1c: Tumor identificado mediante punción biopsica (por ejemplo a consecuencias de un PSA elevado).	M1: Metástasis a distancia.	
T2: Tumor limitado a la próstata.		
T2a: El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos.		
T2b: El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos.	Nx: Metástasis ganglios linfáticos regionales.	M1a: Ganglios linfáticos/ no regionales.
T2c: El tumor abarca ambos lóbulos.		
T3: Tumor se extiende a través de la cápsula prostática.		
T3a: Extensión extracapsular unilateral o bilateral.	M1b: Huesos.	
T3b: Tumor que invade las vesículas seminales.		
T4: Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared vesical.		M1c: Otras localización/es.

FIGURA.1.4: Sistema de Estadificación TNM Cáncer de Próstata. Fuente: Heidenreich 2010 (8).

1.2.5 Clasificación de pacientes con CaP localizado según grupo de Riesgo Clínico

Los estratos de riesgo del CaP localizado se determinan por medio de PSA, estadio TNM, y el score Gleason de la biopsia prostática, la que se fundamenta en la determinación del grado de diferenciación glandular tumoral, en donde se seleccionan 2 zonas de la muestra según mayor predominancia asignándole valores del 1 al 5 (desde el de menor a mayor diferenciación), siendo el score Gleason la sumatoria de los dos patrones predominantes de la muestra tumoral (34). Los pacientes que presentan CaP pueden ser clasificados en los siguientes grupos:

Riesgo bajo: corresponde a quienes presentan Gleason ≤ 6 , PSA, ≤ 10 ng/ml y estadio clínico T1c o T2a.

Riesgo Intermedio: Gleason 7 o PSA 10-20 ng/ml o estadio clínico T2b.

Riesgo Alto: Gleason >7 o PSA > 20 ng/ml o estadio clínico T2c.

1.2.6 Tratamiento

Previo a iniciar un tratamiento para el CaP, es necesario evaluar en el paciente la esperanza de vida (26), estado de salud general y de las funciones urinarias, sexuales e intestinales (35), posibles factores de riesgo para CaP, y las características tumorales (PSA, Gleason, estadio tumoral). En CaP se pueden plantear diversas alternativas de tratamiento, algunas de ellas complementarias entre sí.

1) Prostatectomía radical: consiste en la extracción de la glándula prostática, vesículas seminales y tejidos que rodean esta área (36). Si el cáncer es de alto grado o el tumor tuvo diseminación extraglandular, esta cirugía no garantiza la erradicación completa del CaP, persistiendo el riesgo de recurrencia (26).

2) Hormonoterapia: los andrógenos regulan el crecimiento de células prostáticas sin afectación de cáncer como la de las cancerígenas, al unirse a su receptor de andrógenos y activarlo (37), estimulando la expresión de genes específicos que facilitan su crecimiento (38). En etapas precoces del CaP, las células prostáticas afectadas necesitan concentraciones altas de andrógenos para crecer, definiéndose como “andrógeno-dependientes” (39), utilizándose para su tratamiento la terapia hormonal (29), la que consiste en la supresión androgénica mediante tratamiento farmacológico o quirúrgico (39). Sin embargo, tras cierto tiempo las células afectadas pueden crecer independientemente de los andrógenos (fase “andrógeno-independiente”), requiriéndose otras opciones terapéuticas, como la quimioterapia o prostatectomía (29).

3) Radioterapia externa: es una opción planteable en casos de que la prostatectomía radical esté contraindicada. En donde se utilizan rayos de alta energía para destruir las células cancerosas (40).

4) Braquiterapia intersticial (radioterapia interna): se encuentra basada en el principio de dispersión de la radiación, es un método alternativo a la prostatectomía radical y radioterapia externa, utilizándose semillas radioactivas de Yodo 125 implantadas en la próstata vía transperineal de forma ecoguiada (41).

Como regla general, la mayoría de las guías clínicas recomiendan el tratamiento en base a la estadificación del cáncer de Heidenreich 2010 (figura 1.5) en donde, la vigilancia activa (42), braquiterapia intersticial y la radioterapia externa son los tratamientos adecuados para los pacientes con CaP localizado de bajo riesgo (8). En pacientes con CaP localizado riesgo intermedio son planteables tanto la braquiterapia intersticial como la radioterapia externa (26). Por último, en CaP localizado de alto riesgo es recomendable el uso combinado de radioterapia y hormonoterapia (26).

Escenario	Tratamiento	Comentario
T1a	espera vigilante	El tratamiento estándar para el CaP con biopsia Gleason ≤ 7 y < 10 años la esperanza de vida. En los pacientes con > 10 años la esperanza de vida, nueva puesta en escena con ecografía transrectal y biopsia se recomienda (grado de recomendación B)
	prostatectomía radical	Opcional en pacientes más jóvenes con una esperanza de vida larga, especialmente para Gleason 8-10 (grado de recomendación B)
	radioterapia	Opcional en pacientes más jóvenes con una esperanza de vida larga, especialmente para Gleason 8-10. corre el riesgo de complicaciones más elevada después de la RTUP, especialmente para la radiación intersticial (grado de recomendación B)
	hormonal	No es una opción (grado de recomendación A)
	combinación	No es una opción (grado C de recomendación)
T1b-T2b	espera vigilante	Los pacientes asintomáticos con biopsia Gleason ≤ 7 y una esperanza de vida < 10 años. Los pacientes que no aceptan las complicaciones relacionadas con el tratamiento (grado de recomendación B)
	prostatectomía radical	El tratamiento estándar para los pacientes con una esperanza de vida > 10 años que acepten las complicaciones relacionadas con el tratamiento (grado de recomendación A)
	radioterapia	Los pacientes con una esperanza de vida > 10 años que acepten las complicaciones relacionadas con el tratamiento. Los pacientes con contraindicaciones para la cirugía. No apta para pacientes con una esperanza de vida de 5-10 años y la puntuación de Gleason 8-10 (terapia de combinación se recomienda; véase más adelante) (grado de recomendación B)
	hormonal	Los pacientes sintomáticos que necesitan la paliación de los síntomas y que son aptos para el tratamiento curativo (grado de recomendación C).
		Puros anti-andrógenos se asocian con peores resultados en comparación con la espera vigilante y no se recomiendan (grado de recomendación A)
	combinación	NHT + prostatectomía radical: sin beneficio demostrado (grado de recomendación A)
		NHT + radioterapia: un mejor control local. No hay beneficio en la supervivencia probada (grado de recomendación B)
Hormonal (2-3 años) + radioterapia: mejor que la radioterapia sola para los tumores pobremente diferenciados (grado de recomendación A)		

T3-T4	espera vigilante	Opción en pacientes asintomáticos con T3, la biopsia Gleason ≤ 7 , y una esperanza de vida <10 años (grado de recomendación C)
	prostatectomía radical	Opcional para pacientes seleccionados con limitada $\leq T3a$, Gleason ≤ 8 , PSA <20 ng / ml, y una esperanza de vida > 10 años (grado de recomendación C)
	radioterapia	T3 con una esperanza de vida $> 5-10$ años. Aumento de la dosis > 70 Gy parece ser de beneficio. Si esto no está disponible, una combinación con la terapia hormonal podría ser recomendada (véase más adelante) (grado de recomendación A)
	hormonal	Los pacientes sintomáticos, extensa T3-T4, alto nivel de PSA (> 25 ng / ml), los pacientes no aptos. Mejor que la espera vigilante (grado de recomendación A)
	combinación	Radioterapia+tratamiento hormonal parece mejor que la quimioterapia sola (grado de recomendación A) NHT+prostatectomía radical: ningún beneficio comprobado (grado de recomendación B)
N +, M0	espera vigilante	Los pacientes asintomáticos. Decidida por el paciente. Puede tener una influencia negativa sobre la supervivencia (grado de recomendación C)
	prostatectomía radical	Sin opción estándar (grado de recomendación C)
	radioterapia	Sin opción estándar (grado de recomendación C)
	hormonal	La terapia estándar (grado de recomendación A)
	combinación	Sin opción estándar. Decidida por el paciente (grado de recomendación B)
M +	espera vigilante	Sin opción estándar. Puede dar lugar a una peor supervivencia / más complicaciones que con la terapia hormonal inmediata (grado de recomendación B)
	prostatectomía radical	No es una opción (grado C de recomendación)
	radioterapia	No es una opción (dada para la curación) (grado de recomendación C)
	hormonal	La terapia estándar. Los pacientes sintomáticos no se debe negar el tratamiento (grado de recomendación A)
	combinación	No es una opción (grado C de recomendación)

FIGURA.1.5: Directrices para el tratamiento primario de cáncer de próstata. Fuente: Heidenreich 2010 (8)

1.3 HIPERPLASIA PROSTÁTICA

La hiperplasia prostática (HP) corresponde al crecimiento prostático benigno de carácter nodular de las glándulas periuretrales (Figura 1.6). En ciertos casos el crecimiento es rápido y provoca síntomas casi de inmediato, mientras que en otros es paulatino (11).

Es una patología frecuente en varones, estando presente en el 25% de los varones entre los 40-49 años, 50% entre los 51-61 años, 80% entre los 70-79 años (43), y cerca del 90% en los mayores de 80 años (44). La manifestación clínica más frecuente es la presencia de síntomas urinarios obstructivos a raíz de la compresión de la uretra prostática. El factor de riesgo más asociado para su desarrollo es la edad (45). No obstante, la causa es de origen desconocido, pero se cree que es secundaria a alteraciones provocadas por la pérdida del equilibrio entre andrógenos y estrógenos (11).

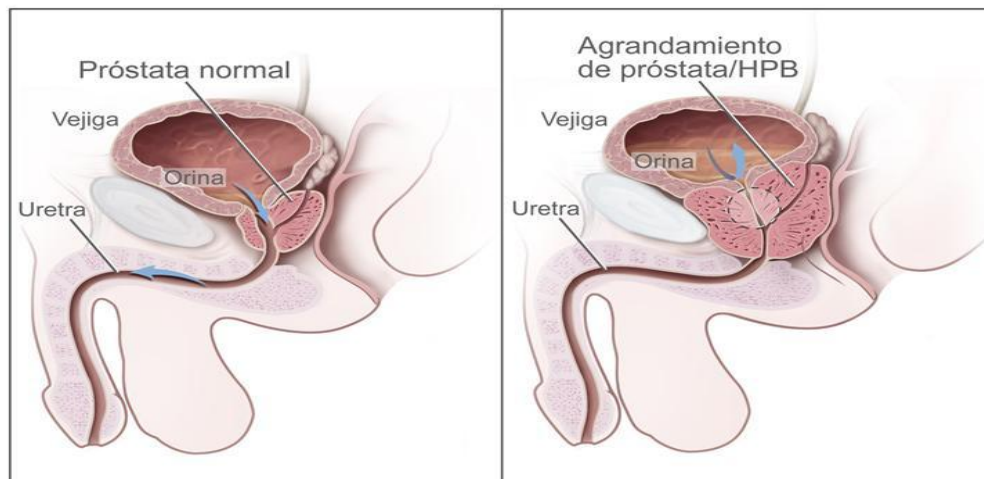


FIGURA 1.6 Imagen donde se realiza una comparación entre una próstata normal y otra con hiperplasia. Fuente: A.D.A.M. Interactive anatomy 2013 (13).

1.4 TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (EMT)

Las células epiteliales conforman láminas u hojas, es decir “capas” de células estrechamente relacionadas entre sí por estructuras de unión especializadas (46), organizadas con una polaridad funcional determinada (2), permaneciendo separadas de los tejidos adyacentes por una lámina basal. Por el contrario, las células mesenquimales se organizan libremente en una matriz extracelular (46), son móviles, sin polaridad funcional, presentan múltiples funciones en la reparación de los tejidos y la cicatrización de las heridas (47).

Se le denomina Transición Epitelio –Mesénquima (EMT) al programa celular fisiológico (48) donde células epiteliales sufren cambios morfológicos (49) (figura 1.7) implicando la pérdida de la unión célula–célula y la reorganización del citoesqueleto de actina (50), convirtiéndolas fenotípicamente en células mesenquimales, móviles e invasoras (51).

La EMT desempeña un papel crucial del desarrollo en la vida intrauterina en la diferenciación de los tejidos y órganos (52). Esta fue reconocida por primera vez como una característica fisiológica en la embriogénesis y la reparación de los tejidos, pero también en procesos patológicos como la invasión y la metástasis tumoral (48), por ejemplo, en CaP (53).

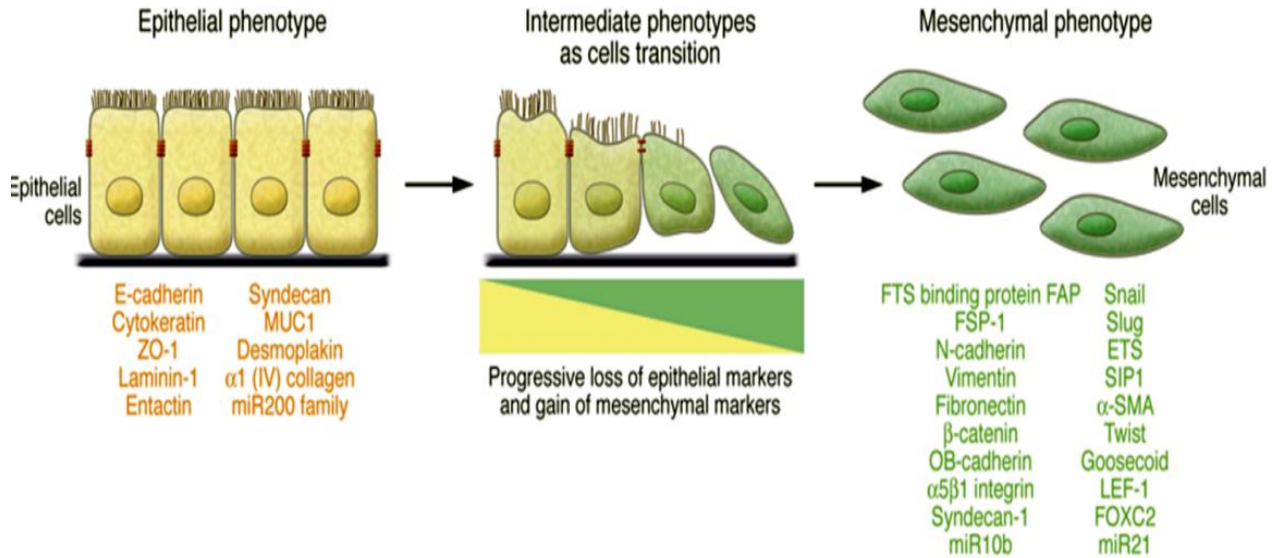


FIGURA. 1.7: La célula epitelial polarizada interacciona con una membrana basal a través de su cara basal, experimentando una serie de cambios bioquímicos que le permiten asumir un fenotipo mesénquimal: mayor capacidad migratoria e invasiva y una mayor producción de componentes extracelulares (46) Fuente: Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis (Yang, J. and R.A. Weinberg, 2008).

1.4.1 Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) como mecanismo fisiológico durante el desarrollo y como respuesta a la lesión.

La EMT es necesaria en el desarrollo embrionario (54) para la diferenciación de las células especializadas, y la adquisición de la compleja estructura tridimensional de los órganos internos (51).

Durante la implantación del embrión, la masa celular interna se reorganiza formando un epitelio (epiblasto) y una segunda capa (hipoblasto). El epiblasto sufre un plegamiento interno formando la cavidad amniótica, mientras que el hipoblasto da lugar al revestimiento endodérmico del saco vitelino. El mesodermo extraembrionario parece

formarse por una transformación temprana de las células endodérmicas parietales y de las células que migran por la línea primitiva (55).

Al inicio de la tercera semana de gestación, el embrión entra en el periodo de gastrulación, es aquí donde se origina la línea primitiva en el epiblasto, ubicada en el extremo caudal del embrión en fase de disco bilaminar. Las células que migran a través de la línea primitiva forman el mesodermo y el endodermo, mientras que el epiblasto restante se convierte en el ectodermo (56).

A medida que atraviesan la línea primitiva, las futuras células mesodérmicas del epiblasto muestran un cambio en su morfología: pérdida de la adherencia celular y de su polaridad, y redistribución de sus organelos (57), generando la transición desde células epiblasticas epiteliales a células en botella y luego mesenquimáticas. La migración de estas últimas es facilitada por moléculas de la matriz extracelular como ácido hialurónico y fibronectina (57). Este mismo proceso ocurre en la formación de la cresta neural, paladar secundario y la formación de las válvulas cardíacas (56).

Como respuesta fisiológica ante la lesión, la EMT juega un rol fundamental durante la cicatrización de heridas (58). Los queratinocitos ubicados en el borde de la herida recapitulan parte del proceso de EMT, adquiriendo un fenotipo intermedio conocido como “estado metaestable”, permitiendo a estas moverse manteniendo contactos débiles en vez de emigrar como células individuales. La expresión de Snail2, factor de transcripción represor de la E-cadherina, (59) en los queratinocitos del frente migratorio influye en este estado, por lo que su inactivación o sobreexpresión pueden comprometer o acelerar la cicatrización; de este modo el organismo puede reactivar el programa de EMT como una estrategia para recuperar la homeostasis del tejido (51).

1.4.2 Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) como mecanismo patológico en Cáncer.

El proceso de EMT implica la pérdida de marcadores epiteliales (60) y la sobreexpresión de marcadores moleculares mesenquimales (figura 1.8) tales como la vimentina, fibronectina, y N-cadherina (50), siendo todas ellas de vital importancia en la progresión del cáncer y metástasis (61). En la progresión tumoral, la EMT permite que las células puedan adquirir la capacidad de infiltrarse en los tejidos circundantes (62) para realizar su posterior diferenciación durante el desarrollo y la iniciación de la metástasis (51) en sitios distantes (63).

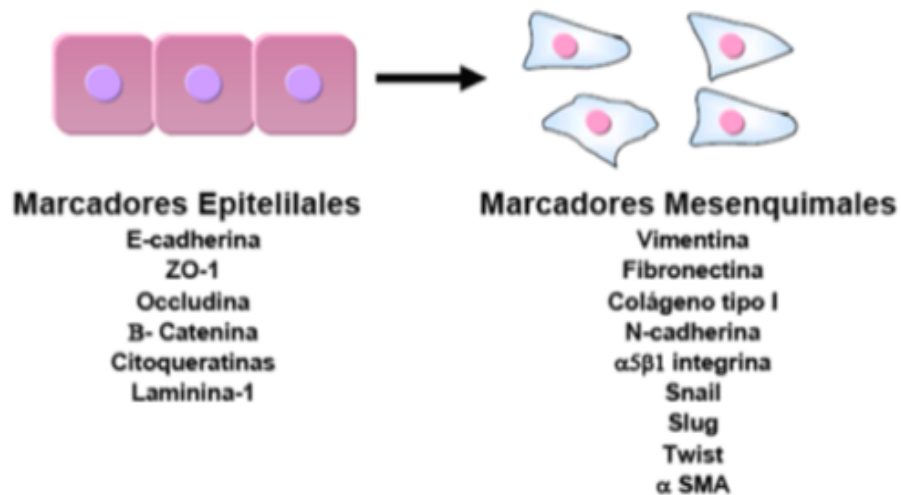


FIGURA 1.8: Esquema de los marcadores epiteliales y mesenquimales. Fuente: Sahai 2002 (64).

Se cree que las células tumorales experimentan una transición inversa, es decir, desde mesenquimales a epiteliales (MET) con el objetivo de formar tejidos epiteliales secundarios provenientes del tumor primario (47).

La mayoría de los cánceres humanos se originan a partir de células epiteliales (54). El término EMT sólo se aplica a los cánceres originados en tejidos epiteliales, llamados carcinomas, los cuales representan el 90% de los tumores humanos (65) incluyendo tumor de pulmón, colon, mama, páncreas, vejiga, ovario, riñón, y próstata (58).

1.4.2.1 Transición Epitelio-Mesénquima (EMT), Cáncer y Cadherinas.

Las Cadherinas son las principales moléculas de adhesión celular. Estas glicoproteínas (66) de adhesión son dependientes de calcio y desempeñan un papel importante en la separación de los tipos celulares y organización de los diferentes tejidos durante el desarrollo embrionario (67), manteniendo la estructura, organización, y la integridad de los tejidos epiteliales adultos (68). Su estructura consta de un segmento extracelular relativamente grande que contiene cuatro dominios y un segmento único transmembrana, así como un dominio citoplasmático único (69). Las cadherinas se unen entre sí por interacciones homotípicas con las células vecinas creando uniones adherentes (70), y a su vez interactúan con la célula a través de un complejo de proteínas citosólicas llamadas colectivamente cateninas (71), las cuales se unen en el citoesqueleto de actina de la célula (72). Se cree que los cambios en la composición del complejo Cadherina-Catenina alterara la función de unión de las cadherinas, disminuyendo la actividad de éstas (73).

La E-cadherina es una glicoproteína codificada por el gen CDH1 (74), esta se expresa en todas las células embrionarias tempranas de los mamíferos. Luego de ello, su expresión sólo se encuentra en las células epiteliales. Estas glicoproteínas se localizan en la membrana celular basolateral, como parte estructural de desmosomas y zonas adherentes (70), siendo responsables de mantenerlas unidas y proporcionando resistencia mecánica al tejido (67). La pérdida funcional de la E-cadherina en las células epiteliales es considerada una característica principal de la EMT (52), subyaciendo una base molecular compleja que implica múltiples vías interconectadas (62), que regulan negativamente su expresión (75), significando que tanto su ausencia o disminución se considera un sello distintivo de malignidad (76) en una variedad de cánceres (77), por ejemplo, de cabeza-, cuello (78), mama, pulmón, piel, páncreas, cuello uterino, endometrial, nasofaríngeo y cánceres gástricos (73).

La pérdida de E-cadherina desempeña papeles importantes en fenotipos malignos, incluyendo la adhesión celular, diferenciación celular y la estructura celular, ya que su

expresión implica la inactivación de la EMT, sugiriéndola como una fuerte señal de supresión tumoral (68) en el desarrollo del cáncer.

La N-cadherina es una cadherina altamente expresada en miocardiocitos (3), células mesenquimales (75) y células constituyentes de estructuras del sistema nervioso central jugando un papel importante en la mediación de señales neuronales (79). A su vez, se le ha atribuido un rol crucial en la progresión de procesos cancerígenos (80), ya que en diversas células cancerosas su expresión aberrante se correlaciona con la inducción de la motilidad celular y la invasividad (67), siendo ejemplos la migración celular en las células de cáncer de mama (51), melanoma, cáncer gástrico, y carcinoma escamoso de la piel (81).

El cambio (“switch”) de cadherinas, se refiere al desplazamiento de la expresión de E-cadherina a la expresión aberrante de N-cadherina (Figura 1.9). Esta sustitución promueve la progresión metastásica del cáncer mediante la potenciación del fenotipo invasivo de las células tumorales (82).

Se ha demostrado que la expresión de N-cadherina durante la EMT es inducida por TGF β 1 a través de la vía de señalización GTPasa RhoA, a su vez Twist-1 (factor de transcripción), regula la expresión de E-cadherina (53), y aumenta la expresión de genes mesenquimales (67).

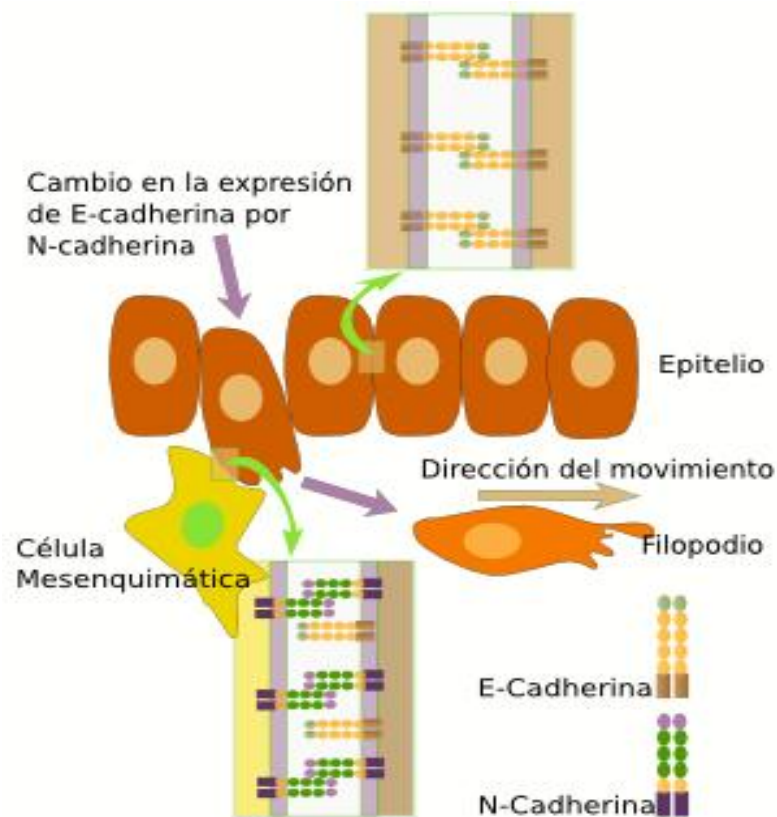


FIGURA 1.9: El switch de cadherinas desde E-cadherina a N-cadherina en las células tumorales, provoca que las células pierdan afinidad por sus vecinas y emigren, siendo el caso de las células tumorales. Fuente: Cadherin switching 2008 (83).

1.4.3 Cáncer y ADAM12

La familia ADAM se identificó por primera vez en 1997 (84). Estas corresponden a un conjunto de proteínas transmembrana pertenecientes a la súperfamilia de proteasas dependientes de Zinc (85). Presentan un dominio intracelular (3) y otro extracelular, este último formado por varias porciones, contemplando un dominio desintegrina y uno metaloproteasa. En donde el dominio desintegrina se une a las integrinas e impide la unión celular a la laminina, fibronectina, y otras proteínas de la matriz extracelular.

Mientras que el dominio metaloproteasa degrada los componentes de la matriz permitiendo la migración celular (Figura 1.10).

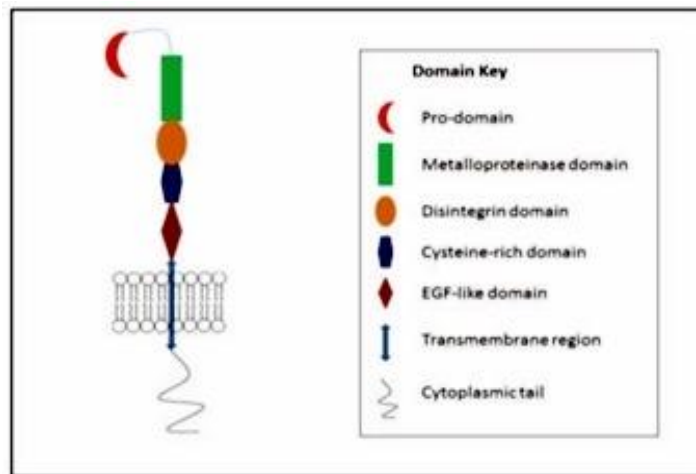


FIGURA 1.10: Estructura general de las ADAMs. Fuente: Nyren-Erickson 2013 (86).

Estas moléculas están involucradas en diversos eventos biológicos tales como la adhesión y fusión celular, el desprendimiento de proteínas de membrana (87) y la proteólisis. Muchas especies de ADAM se expresan en tumores malignos (88), tales como ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17, ADAM19, ADAMTS1, ADAMTS4 y ADAMTS5.

ADAM12 (también llamada meltrina- α) es una desintegrina y metaloproteasa catalíticamente activa (89) capaz de degradar distintos componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos, permitiéndole participar en procesos angiogénicos (90). Su expresión se da a bajos niveles en diversos tejidos, como el muscular y adiposo (91), pero se incrementa notablemente en el tejido placentario, a pesar de su alto nivel de expresión su importancia en el desarrollo de la placenta queda por esclarecer, aunque podría estar relacionado con el fenotipo invasivo del trofoblasto (91). Por otra parte, su presencia ha sido asociada con el desarrollo y la progresión de una serie de enfermedades tales como la artritis (92), hipertrofia cardíaca, fibrosis hepática (93) y en numerosos cánceres humanos, incluyendo hígado, vejiga, pulmón (94), estómago, colón (95) y carcinoma de mama, en este último con rol diagnóstico y pronóstico (91). No obstante, a la fecha no

existen reportes que demuestren su asociación con el desarrollo y progresión del CaP (96).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de E-cadherina, N cadherina, y ADAM 12, como marcadores de EMT en biopsias prostáticas de una cohorte de pacientes con diagnóstico de CaP e HP, y asociar esta presencia con PSA, Gleason, y el estadio clínico del tumor.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia y la distribución de E-cadherina, N-cadherina y ADAM12 en biopsias prostáticas de una cohorte de pacientes con diagnósticos de Cáncer de próstata e hiperplasia prostática.

Determinar la asociación entre la presencia y variación de E-cadherina con los niveles de PSA, índice de Gleason, los grupos de riesgo clínico en pacientes con CaP, y su proporción en relación a N-cadherina y ADAM-12.

Determinar la asociación entre la presencia y variación de N -cadherina con los niveles de PSA, índice de Gleason y los grupos de riesgo clínico en paciente con CaP.

Determinar la asociación entre la presencia y variación de ADAM12 con los niveles de PSA, índice de Gleason y los grupos de riesgo clínico en pacientes con CaP.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional y analítico de cohorte prospectivo diseñado para determinar la presencia de diversos factores moleculares de progresión tumoral y su asociación con la presencia de CaP y su agresividad. El estudio se realizó en la Corporación Nacional del Cáncer CONAC, y el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Población de estudio:

Todos los pacientes (n=355) derivados desde los servicios de atención primaria a la Corporación Nacional del Cáncer de Valparaíso (CONAC) por sospecha clínica de CaP entre los años 2008 y 2014. Los pacientes fueron atendidos por un urólogo y fueron ingresados al estudio previo consentimiento informado. Por cada paciente se obtuvieron 18 muestras prostáticas cilíndricas transrectal ecoguiadas con aguja 16 Gauge, extrayendo 3 muestras en cada sextante de la glándula, clasificándose según el score Gleason 2014 y realizándose tomografía computarizada de abdomen y pelvis sin contraste para obtención de estadio TNM en aquellos en que se obtuvo resultado de CaP en la biopsia. Además se les realizó una ecografía prostática vía transabdominal o transrectal para la obtención del VP. Los pacientes se dividieron en aquellos que tuvieron biopsia positiva para CaP (cohorte expuesta) y aquellos cuya biopsia fue HP (cohorte control o no expuesta).

Para la selección de los pacientes se realizaron los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

- ✓ Pacientes derivados desde la atención primaria a la Corporación Nacional del Cáncer de Valparaíso por sospecha de CaP entre los años 2008- 2014, y que aceptaron participar en el estudio.

Criterios de exclusión:

- ✓ No estar dispuesto y/o capacitado para firmar el formulario de consentimiento informado
- ✓ Haber recibido tratamiento hormonal o radioterapia a causa de neoplasia urogenital.
- ✓ Haber sufrido resecciones quirúrgicas prostáticas.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético-científico de la Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso con Acta de Aprobación 8 de agosto 2007 y 26 de febrero 2015. (Ver ANEXO A)

3.2.2 Variables Consideradas:

1. Edad del paciente (variable cuantitativa continua): Guía en la aparición del CaP en el paciente y en la progresión cronológica de éste (años).

2. PSA (variable cuantitativa continua): Corresponde a una medición cuantitativa del antígeno prostático sérico, donde la unidad de medida es ng/ml. Un resultado mayor a 4.0 ng/ml es considerado anormal. Se usará este dato para establecer asociaciones con el diagnóstico.

3. TR (variable cualitativa ordinal): Corresponde a un examen operador-dependiente realizado por un urólogo investigador de este estudio, quien clasificó los resultados del TR en: normal (con subcategorías grado I, II, III, IV), sospechoso, y categórico.

4. Diagnóstico Histopatológico/Biopsia (variable cualitativa nominal): La biopsia prequirúrgica prostática transrectal ecoguiada es el elemento diagnóstico del CaP, todas fueron realizadas por el mismo urólogo, tomando 16 muestras durante la punción en donde fueron enviadas a patología y analizadas por un anatomopatólogo, quien determinó su diagnóstico (CaP o HP). Clasificándose los CaP según índice de Gleason.

5. Índice de Gleason (variable cualitativa ordinal): Se fundamenta en la determinación del grado de diferenciación glandular tumoral, existiendo 5 patrones (1 al 5, desde el de menor a mayor diferenciación), siendo el score Gleason la sumatoria de los dos patrones predominantes de la muestra tumoral.

6. Volumen prostático (variable cuantitativa continua): Corresponde a la medición del volumen prostático a través de ecografía prostática vía transabdominal o transrectal.

7. Estadio TNM (variable cualitativa ordinal): Se utiliza para describir cuán lejos se ha propagado el cáncer de próstata, en donde "T" permite describir la extensión local del tumor prostático (intracapsular o extracapsular), "N" señala si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos, y por último "M" nos indica la presencia de metástasis a distancia.

8. Grupo de riesgo en CaP (variable cualitativa ordinal): Se determinan por medio de PSA, estadio TNM, y el score Gleason de la biopsia prostática. Clasificando a los pacientes en riesgo bajo, medio o alto.

9. Presencia de E-cadherina, N-cadherina y ADAM 12 a través de una prueba inmunohistoquímica (Variable cuantitativa continua): Corresponde a una prueba de laboratorio basada en la utilización de un anticuerpo específico, anteriormente marcado a través de un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible. Esta prueba fue realizada en las muestras de biopsia prostática, con el objetivo de cuantificar la presencia de las proteínas estudiadas.

3.2.3 Universo y la Muestra

Tamaño Muestral Mínimo y Muestreo: En base a literatura previa se estimó un tamaño muestral mínimo de 206 biopsias prostáticas (103 por la cohorte con CaP y 103 por la cohorte control), con una variabilidad esperada del 20% para la presencia de ADAM12, un nivel alfa de 5% y un 80% de potencia estadística. No se aplicó muestreo, ya que se incorporaron todos los pacientes de la cohorte que aceptaron participar.

```
. sampsi 0.5 0.3, alpha(.05) power(.80)

Estimated sample size for two-sample comparison of proportions

Test Ho: p1 = p2, where p1 is the proportion in population 1
              and p2 is the proportion in population 2

Assumptions:

      alpha = 0.0500 (two-sided)
      power = 0.8000
      p1 = 0.5000
      p2 = 0.3000
      n2/n1 = 1.00

Estimated required sample sizes:

      n1 = 103
      n2 = 103
```

FIGURA 3.1: Cálculo del tamaño Muestral.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Procedimiento de recolección de muestras y registros de datos.

Los pacientes participantes de la investigación firmaron un consentimiento informado donde aceptaban ser incorporados al estudio. Los datos recolectados fueron edad, la cuantificación del PSA, resultado de biopsia prostática (CaP o HP), resultado del TR,

volumen prostático, TNM y grupo de riesgo para CaP, los que fueron tabulados en una planilla Excel en Office 2010, utilizando el RUT de los pacientes para codificar sus datos en números específicos y así mantener la privacidad de estos. Además, se codificaron las muestras para mantener enmascarado el análisis de imágenes. Se realizó un doble chequeo de los datos con el etiquetado de cada muestra biopsiada, la planilla de recolección de datos en CONAC, y en casos de dudas se consultaron las historias clínicas respectivas.

3.3.2. Procedimiento experimental de tratamiento de las muestras

Las biopsias prostáticas provenientes del CONAC (Centro Nacional de Cáncer), fueron fijadas en formalina 10%, según el protocolo del patólogo perteneciente a estos centros.

Posteriormente fueron deshidratadas en una batería de alcoholes ascendentes a partir de alcohol etílico 50% hasta llegar al alcohol absoluto (99,9%). A continuación fueron diafanizadas en xilol y luego incluidas en parafina (Thermo Scientific®) a una temperatura de 60°C. (Ver ANEXO B).

Los tacos de parafina, se cortaron en un micrótopo (Leicot) con grosor de 5 µm. Luego fueron adheridos a los portaobjetos previamente tratados con xilane, 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma-Aldrich) y secados a 60°C en la estufa (Merck) por 1 hora.

De cada taco de parafina se seleccionaron cortes para realizar la técnica de rutina Hematoxilina-Eosina con el fin de observar la histología del tejido. Para identificar la presencia de los marcadores en estudio se utilizó la técnica inmunohistoquímica Anti-ADAM12 (Santa Cruz Biotechnology), Anti-E-Cadherina (Santa Cruz Biotechnology), Anti-N-Cadherina (Santa Cruz Biotechnology).

La técnica de rutina Hematoxilina-Eosina permite distinguir entre los componentes tisulares ácidos y básicos. La hematoxilina es una base que otorga un tinte azulado preferencialmente a los componentes aniónicos, mientras que la eosina es un ácido que otorga una coloración rosada a los componentes catiónicos de la célula y tejidos. Esta coloración permite la tinción de los componentes tisulares por medio de enlaces electrostáticos con los radicales ionizados presentes en los tejidos (97). Para esta técnica los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una batería de xiloles (10 minutos) y alcoholes (10 minutos) de graduación descendente, para terminar en agua destilada (10 minutos). A continuación se realizó la tinción nuclear con hematoxilina de Harris (20 segundos) y su viraje en agua corriente (5 minutos). Nuevamente se dio un lavado en agua destilada y una inmersión en alcohol 95% para continuar con la tinción con eosina alcohólica (7 segundos). Por último, se continuó con la deshidratación en una batería de alcoholes ascendentes (2 minutos), y aclaramiento en xiloles (5 minutos) para finalmente cubrir las placas con medio de montaje hidrófobo Entellán (Merck). (ANEXO C)

Posteriormente se realizó la estandarización de la técnica inmunohistoquímica para cada uno de los anticuerpos. Esta técnica es un inmunoensayo que posee como fundamento la detección de un antígeno de interés presente en algún tejido en particular, mediante una reacción antígeno-anticuerpo (98). Para su estandarización se evaluaron los anticuerpos a estudiar en distintas diluciones, desde 1:50 hasta 1:2000, y bajo dos condiciones en forma paralelas, con recuperación y sin recuperación antigénica. Asignando un valor a cada resultado obtenido, este valor se basó en la dilución más alta del anticuerpo, que resulta en una máxima coloración específica con el mínimo fondo (98). Los valores establecidos fueron: 0, no existió marca del anticuerpo; +1, mala (la coloración no es específica, observándose mucho fondo dificultando visualizar con claridad la marca del anticuerpo); +2, regular (coloración poco específica, se observa fondo dificultando visualizar la marca del anticuerpo); y +3, buena (coloración específica con el mínimo fondo).

En el anticuerpo anti-E-cadherina (Santa Cruz Biotechnology®) se determinó la dilución (1:500) con recuperación antigénica (destacado en amarillo en la Tabla 3.1).

TABLA 3.1 Estandarización de Anticuerpo Anti-E-Cadherina.

Dilución Anticuerpo Anti-E-Cadherina en PBS-Tween	Sin Recuperación	Con Recuperación
1:50	+1	+2
1:100	0	+2
1:250	0	+2
1:500	0	+3
1:1000	0	+2
1:2000	0	+1

El anticuerpo anti-N-cadherina (Santa Cruz Biotechnology®) se determinó la dilución (1:50) con recuperación antigénica (destacado en amarillo en la Tabla 3.2).

TABLA 3.2 Estandarización de Anticuerpo Anti-N-Cadherina.

Dilución Anticuerpo Anti-N-Cadherina en PBS-Tween	Sin Recuperación	Con Recuperación
1:50	0	+3
1:100	0	+2
1:250	0	+1
1:500	0	0
1:1000	0	0
1:2000	0	0

El anticuerpo anti-ADAM12 (Santa Cruz Biotechnology®) se determinó la dilución (1:50) con recuperación antigénica (destacado en amarillo en la Tabla 3.3).

TABLA 3.3 Estandarización de Anticuerpo Anti-ADAM 12.

Dilución Anticuerpo Anti-ADAM12 en PBS-Tween 20	Sin Recuperación	Con Recuperación
1:50	0	+3
1:100	0	+2
1:250	0	+2
1:500	0	+1
1:1000	0	+1
1:2000	0	+1

Tras la estandarización de los anticuerpos se procedió a realizar las tinciones inmunohistoquímicas. Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una batería de xiloles y alcoholes de graduación descendente respectivamente (10 minutos) para terminar en agua destilada (10 minutos). Luego se realizó la recuperación antigénica, la cual corresponde a la recuperación de la inmunoreactividad de los antígenos enmascarados por el proceso de fijación de la muestra (98), en este caso se precalentó una vaporera (Oster) y un vaso coplin con buffer citrato a pH 6.0 durante 15 minutos a una temperatura de ~95°C. Alcanzada la temperatura, se dejaron las muestras por 15 minutos en el vaso coplin al interior de la vaporera. Tras reposar 15 minutos a temperatura ambiente en la solución tampón, se realizaron 3 lavados en Tampón Fosfato Salino (PBS) 0,1 M ajustado a un pH de 7,24 de 5 minutos cada uno.

A objeto de evitar que la peroxidasa existente en el tejido reaccionara dando lugar a la inmunoreactividad de fondo o incluso a resultados falsamente positivos, se procedió a bloquear la peroxidasa endógena al sumergir las muestras en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente, se aplicaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Con el objetivo de evitar tinciones inespecíficas, se aplicaron dos soluciones de bloqueo; Cas-Block (Invitrogen), y una solución de suero normal (Sigma) de cabra o conejo (especie definida en cada procedimiento inmunohistoquímico) al 5% en PBS-

Tween 20 (Winkler), el cual tiene como finalidad bloquear todos los sitios que pudieran reaccionar con el anticuerpo secundario, evitando al igual que con el bloqueo de la peroxidasa endógena, inmunoreactividad de fondo o falsos positivos. Ambos bloqueos de sitios inespecíficos fueron aplicados por un lapso de 30 minutos a una temperatura de 25°C; encontrándose las muestras en una cámara húmeda. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente en PBS/Tween20 0,3% toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Como control negativo, en el segundo corte de cada portaobjeto se aplicó una solución de PBS 0,1 M en vez de la solución del anticuerpo primario.

Al día siguiente, con el objetivo de eliminar el exceso de anticuerpo primario a los cortes, se le realizaron 3 lavados con PBS 0,1 M por 5 minutos cada uno. Posteriormente, se aplicó el anticuerpo secundario. Para la inmunohistoquímica anti-ADAM 12 y anti-E-cadherina se utilizó un anticuerpo secundario (dilución 1:500) anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado con Peroxidasa de Rábano picante (HRP), y para la inmunohistoquímica anti-N-cadherina se utilizó un anticuerpo secundario (dilución 1:50) anti-IgG de cabra hecho en conejo conjugado con HRP (Zymed). Incubándose por un lapso de 60 minutos a 25°C en cámara húmeda. Luego de esto se realizaron 3 lavados con PBS 0,1 M por 5 minutos cada uno y así eliminar el exceso de anticuerpo secundario. A continuación se prosiguió a revelar los cortes con el complejo Sustrato Cromógeno Nova-Red (Vector), en donde el cromógeno utilizado fue AEC (amino etil carbaxol). Para impedir que la solución cromogénica continuará reaccionando los cortes fueron lavados en un baño de agua destilada (5 minutos), enseguida se realizó una tinción de contraste nuclear con Hematoxilina de Harris (10 segundos), con su respectivo viraje en agua corriente (5 minutos), Posteriormente se realizaron los procedimientos de deshidratación y aclaramiento en una batería de alcoholes de graduación ascendente (dipping) y xiloles (5 y 10 minutos) respectivamente. Finalmente las placas fueron montadas en un medio Hidrófobo (Merck), y observadas en un microscopio óptico Olympus CX21. (Ver ANEXO D, E y F).

TABLA 3.4 Listado y especificaciones de los anticuerpos primarios utilizados en el estudio.

Anticuerpo, Empresa y Código	Especificidad	Isotipo	Dilución de Trabajo	Recuperación Antigénica	Anticuerpo Secundario
ADAM12 , Santa Cruz Biotechnology (sc-25579), policlonal.	Proteína ADAM12 de ratón, rata y humano. Presenta afinidad por los aminoácidos 700-909 de ADAM 12 de origen humano.	IgG conejo	1:50	Sí	IgG de cabra anti-conejo HRP (1:500) (Zymed)
E-Cadherin , Santa Cruz Biotechnology (sc-7870), policlonal.	Proteína E-Cadherina de ratón, rata y humano. Presenta afinidad por los aminoácidos 600-707 del dominio extracelular de E-cadherina de origen humano.	IgG conejo	1:500	Sí	IgG de cabra anti-conejo HRP (1:500) (Zymed)
N-Cadherin , Santa Cruz Biotechnology (sc-31030), policlonal.	Proteína N-cadherina de ratón, rata y humano. Presenta afinidad por el dominio	IgG cabra	1:50	Sí	IgG de conejo anti-cabra HRP (1:50) (zymed)

	citoplasmático C-terminal de N- cadherina de origen humano.				
--	--	--	--	--	--

Para los anticuerpos E-Cadherina y N-Cadherina, se utilizaron cortes de embrión humano como control positivo, ya que estudios anteriores han demostrado su participación en el proceso de transición epitelio mesénquima (99). Para el anticuerpo ADAM 12, se utilizó como control positivo cortes de placenta humana, donde su presencia se ha involucrado en el fenotipo invasivo del trofoblasto (91). Como control negativo se procedió a realizar el mismo protocolo omitiendo el anticuerpo primario en las inmunohistoquímicas respectivas. (FIGURA 4.9)

Cada protocolo de procedimiento inmunohistoquímico fue estandarizado y aplicado en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

3.3.3. Procedimiento de captura fotográfica y análisis de imágenes

3.3.3.1 Captura de imágenes

Luego de realizar las inmunohistoquímicas se prosiguió a desarrollar la captura fotográfica donde se obtuvieron 5 microfotografías de los campos más representativos de CaP e HP por cada muestra, a través del microscopio de fondo claro (OLYMPUS IX81 Invertido), con cámara digital incorporada (Olympus DP71). El Software DP controller (FIGURA 3.2), permitió la realización de capturas fotográficas de las próstatas según el grupo correspondiente (Hiperplasia Prostática o Cáncer), con un aumento de 40X y 100X.

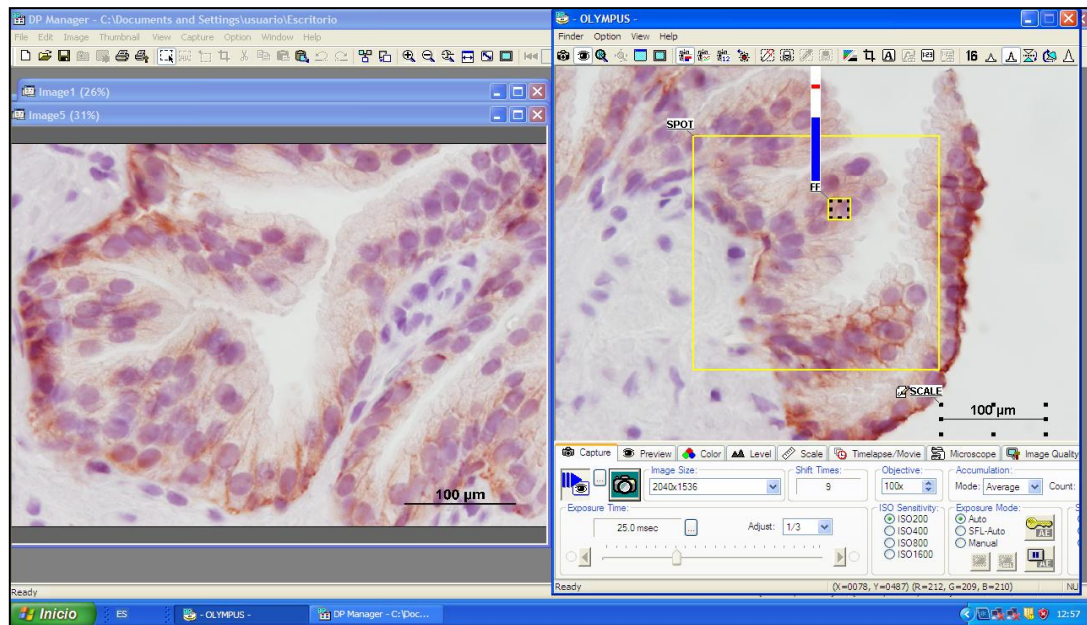


FIGURA 3.2: Programa computacional DP Controller.

3.3.3.2 Análisis de imágenes

Finalizada la captura de imágenes, se utilizó el programa *Image J versión 2014 (32Bits)* del National Institutes of Health (Estados Unidos). El análisis de las glándulas prostáticas se realizó determinando la presencia de los distintos anticuerpos a través del análisis de la escala de grises y la proporción de epitelio marcado.

Primeramente se ajustó el tamaño de las imágenes a 1500-1130 Pixeles. Luego se realizó la selección del epitelio, donde se debió ajustar el umbral de colores. El criterio de eliminación fue descartar lo menos intenso y saturado, arrojando como resultado una imagen donde se observa el epitelio y la exclusión del estroma (Figura 3.3).

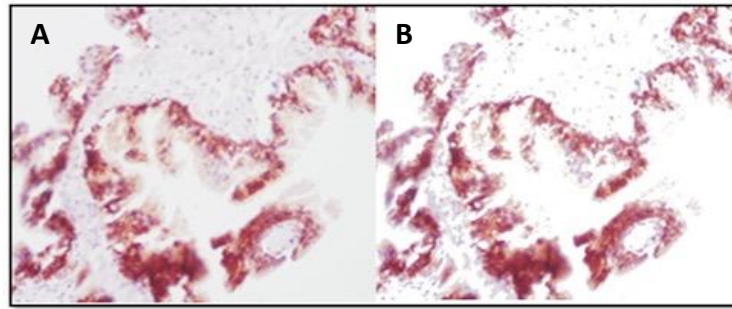


FIGURA 3.3: La imagen A corresponde a una microfotografía obtenida con el software DP controller, mientras que la imagen B corresponde a la obtenida con el programa Image J, (al eliminar lo menos intenso y saturado), logrando una imagen que contiene solo el epitelio.

Posteriormente con la imagen obtenida correspondiente a cada inmunohistoquímica (ADAM 12, E-Cadherina y N-cadherina), se analizó el área de marca ajustando el umbral de colores. Se consideró como marca el color rojizo, y se prosiguió a pegar en una nueva imagen (Figura 3.4). Los resultados obtenidos son tabulados por el mismo programa en una planilla Excel. (Figura 3.4)

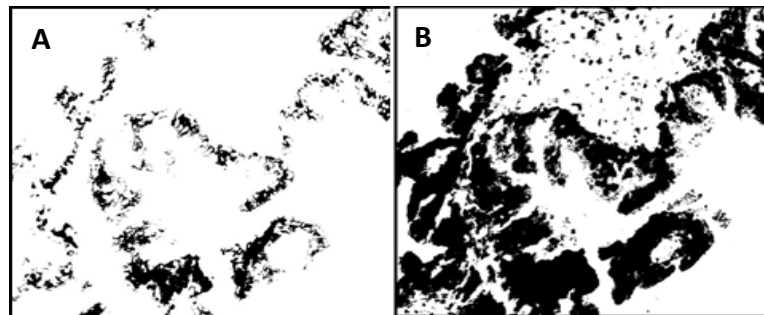


Figura 3.4: La imagen A corresponde al área de marca obtenida por el programa al ajustar el umbral de colores, mientras que la imagen B corresponde al área total de epitelio.

Finalmente se realizó el análisis de escala de grises (Figura 3.5), en formato 8 Bits (0-255), para cada inmunohistoquímica (ADAM 12, E-Cadherina y N-Cadherina), obteniendo como resultado el Score (Gray value 8 bits)

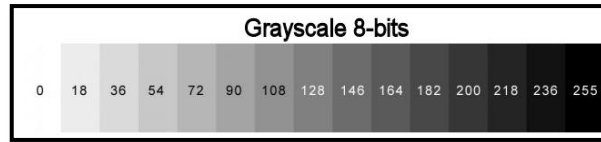


FIGURA 3.5: *Escala de Grises: Empleada en la imagen digital en la que el valor de cada pixel posee un valor equivalente a una graduación de grises. Las imágenes representadas de este tipo están compuestas de sombras de grises, con 255 niveles de grises desde 0 (blanco) a 255 (negro).*

Por último, se delimitó el área de la marca (Figura 3.6), se hizo análisis de intensidad Pixel por Pixel y se promedió la marca total (Figura 3.7).

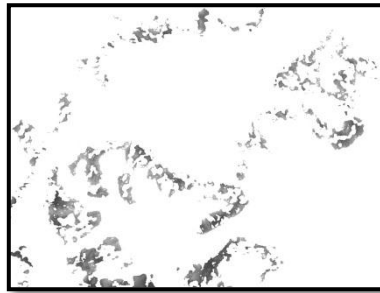


FIGURA 3.6: *Corresponde a la imagen obtenida al realizar el análisis con la escala de grises*

A screenshot of an Excel spreadsheet window titled 'Score'. The spreadsheet shows a table with 5 rows of data. The columns are labeled A, B, and C. The data is as follows:

	A	B	C
1		Mean	
2	1	136.613	
3	2	131.503	
4	3	138.401	
5	4	125.806	
6	5	143.308	

FIGURA 3.7 *La imagen corresponde al Excel arrojado por el programa (Score.)*

Los datos individuales de las 5 fotografías obtenidas de cada paciente y la planilla que entrega el programa (por imagen), se tabularon en una planilla Excel en donde para evitar errores se realizó un doble chequeo de estos.

Se programó en lenguaje C-Image, en un código de automatización para analizar 5 imágenes por ciclo.

3.3.3.3 *Análisis estadístico*

1) Para el análisis estadístico se utilizaron los siguientes programas:

- Microsoft Office Excel para el armado de la base de datos.
- Stata 12 (Statacorp, Texas, USA) para el análisis estadístico.

Se usaron los siguientes tests:

- Prueba de la probabilidad exacta de Fisher .
- Prueba t de Student.

2) Para el análisis descriptivo se usaron medias, desviaciones standard y proporciones. Cuando la distribución de los datos no lo permitía (no Gaussiana) se usaron medianas y rangos intercuartílicos.

El análisis de la asociación entre las variables clínico patológicas cuantitativas (proporción de células marcadas, Antígeno prostático) y el diagnóstico de CaP o HP se hizo mediante una prueba t de Student para muestras independientes cuando se comparaban dos grupos, y prueba de ANOVA para tres o más grupos. Para comparar variables cualitativas se utilizó prueba exacta de Fisher. Se trabajó con un nivel de significación alfa $<0,05$.

Para el cálculo de tamaño muestral y para el análisis de datos se utilizó el programa Stata 12.0 (Statacorp, Texas, USA).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Se reclutaron durante los 7 años de seguimiento 355 pacientes, de los cuales 321 fueron incluidos en la base final, debido a que 34 presentaban datos faltantes en las variables edad, PSA-preoperatorio, TR, VP, y diagnóstico. De la muestra total, 158 pacientes resultaron ser positivos para CaP y 163 fueron HP, estos últimos fueron considerados como la cohorte normal sin cáncer.

La distribución de las características demográficas basales de la cohorte se muestra en la TABLA 4.1. En donde se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CaP y HP en cuanto a las variables edad, volumen prostático (VP), PSA-preoperatorio y TR. La media aritmética del volumen prostático fue mayor en el grupo HP que en CaP, mientras que la media de PSA-preoperatorio fue mayor en CaP que en HP.

TABLA 4.1 Características Basales clínicas demográficas de los pacientes estudiados CaP e HP.

Características Basales	HP n: 163		CaP n: 158		P-Value
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Edad	66,30	8,20	64,6	7,90	0,0098
PSA	8,90	7,40	26,6	7,80	0,0020
VP	38,00	20,90	29,0	18,20	0,0001
TR:	Nº	%	Nº	%	
Categorico	1	0,62	2	1,30	

Sospechoso	36	22,36	79	50,0	<0,0010
Normal	119	76,90	75	47,5	

Dentro del grupo CaP, las variables edad, PSA-preoperatorio y VP fueron contrastadas según el Grupo de Riesgo para CaP, expuesto en la TABLA 4.2. En donde se observa que el promedio de edad de los pacientes con bajo riesgo ($\bar{x} = 60,60$), fue menor respecto a los de riesgo mediano ($\bar{x} = 65,20$) o alto ($\bar{x} = 66,91$). Sin embargo, entre los pacientes que presentaban un riesgo mediano o alto el promedio de la edad no fue significativo. Al observar el promedio del PSA-prequirúrgico en los distintos grupos, este tuvo diferencias significativas en el grupo de alto grado ($\bar{x} = 89,31$), respecto a los grupos de bajo ($\bar{x} = 8,56$) y mediano grado ($\bar{x} = 9,67$). Por último, existieron diferencias significativas de VP entre los tres grupos de riesgo.

TABLA 4.2 Características Basales clínicas demográficas de los pacientes con CaP según grupo de riesgo.

Características Basales	Bajo Grado n: 33		Mediano Grado n:91		Alto Grado n: 34		P-Value
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Edad	60,60	8,10	65,20	7,44	66,91	7,59	0,0021
PSA	8,56	12,43	9,67	5,49	89,31	140,81	0,0000
VP	31,00	18,45	26,67	15,68	38,31	22,49	0,0008

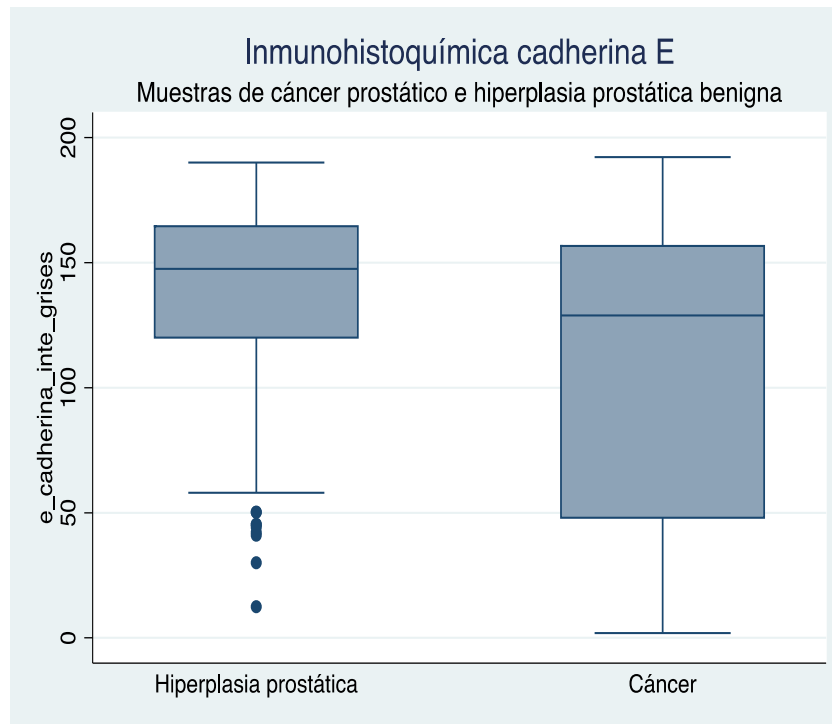
4.1 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE E-CADHERINA EN BIOPSIAS CON CaP Y BIOPSIAS CON HP.

La presencia de E-cadherina mediante la técnica inmunohistoquímica se encontró en la totalidad de las muestras prostáticas. Al realizar la comparación entre los dos grupos, se encontró una diferencia significativa entre los grupos con HP y CaP (TABLA 4.3), existiendo mayor presencia de esta proteína en las biopsias con HP (GRAFICO 4.1). La distribución de la inmunomarcación de E-cadherina se encontró en el dominio basolateral del epitelio de las glándulas prostáticas (FIGURA 4.3 y 4.4).

TABLA 4.3 IHQ para E-Cadherina según Escala de Grises en CaP e HP (Gray value 8 bits)

Inmunohistoquímica (IHQ)	HP n: 163		CaP n: 158		P-Value
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
E-Cadherina	139,90	36,50	106,90	59,50	0,0000

GRÁFICO 4.1 *Box-PLot, Presencia de E-Cadherina según Escala de Grises en CaP e HP (Gray value 8 bits).*



4.2 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE E-CADHERINA EN BIOPSIAS DE CaP e HP EN RELACIÓN CON EL PSA-PREOPERATORIO.

No se encontró correlación significativa entre la presencia de E-Cadherina en CaP e HP, con el PSA pre-operatorio de los pacientes (TABLA 4.4)

TABLA 4.4 *Índice de Correlación entre E-cadherina y PSA-preoperatorio en CaP e HP.*

Correlación	Índice Correlación	P-Value
Correlación E-Cadherina/PSA-Preoperatorio	< 0,10	No significativo

4.3 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE E-CADHERINA EN BIOPSIAS DE CaP EN RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE GLEASON.

No se encontró correlación significativa entre la presencia de E-cadherina en CaP, y el Índice de Gleason (TABLA 4.5)

TABLA 4.5 Índice de Correlación entre E-cadherina y índice de Gleason en el grupo CaP.

Correlación	Índice Correlación	P-Value
Correlación E-Cadherina/ índice de Gleason	0,117	No significativo

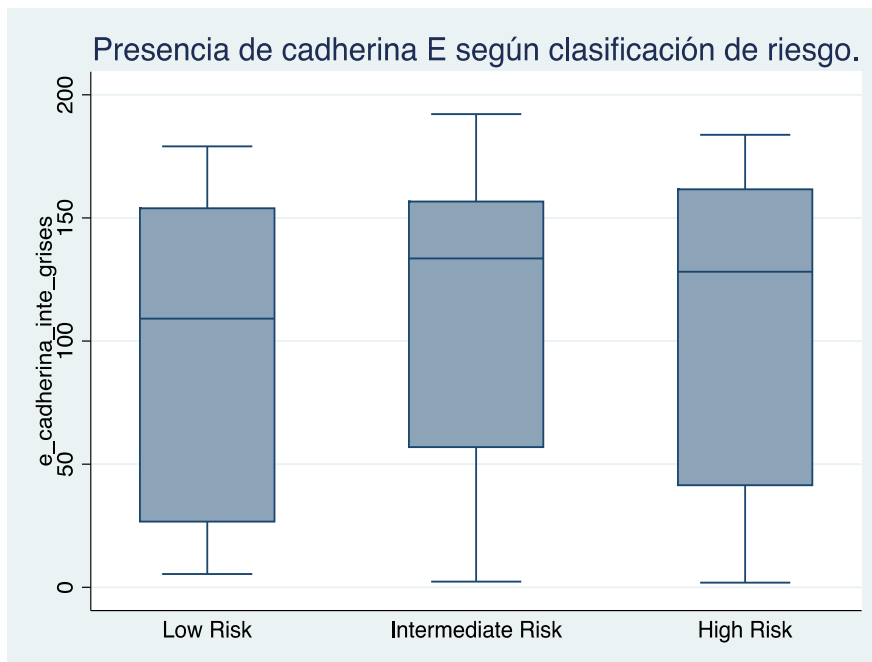
4.4 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE E-CADHERINA EN RELACIÓN CON LOS GRUPOS DE RIESGO DE CaP.

Al comparar los grupos de los pacientes con CaP clasificados según grupo de riesgo, no se encontraron diferencias significativas de la presencia de E-cadherina entre los tres grupos ($P = 0,3916$) (TABLA 4.6). Sin embargo, la presencia de E-cadherina fue menor en el grupo de bajo grado respecto a los de grado mediano o alto (GRÁFICO 4.2).

TABLA 4.6 IHQ para E-Cadherina según Escala de Grises en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).

Inmunohistoquímica (IHQ)	Bajo Grado		Mediano Grado		Alto Grado		P-Value
	n: 33		n: 91		n: 34		
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
E-Cadherina	94,45	63,94	110,44	58,05	107,78	59,21	0,3916

GRÁFICO 4.2 Box-PLot, Presencia de E-Cadherina según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).



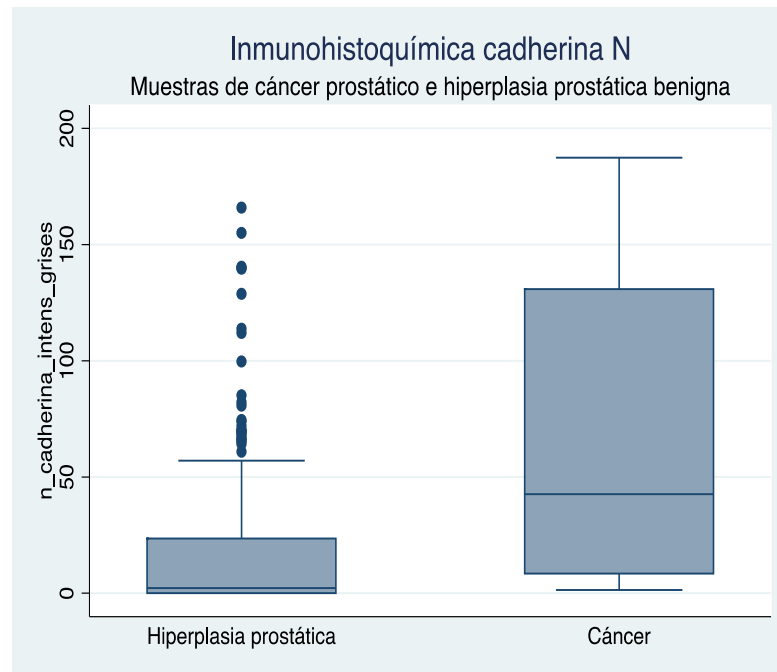
4.5 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE N-CADHERINA EN BIOPSIAS CON CaP e HP.

La presencia de N-cadherina mediante la técnica inmunohistoquímica estuvo presente en sólo 89 de 163 muestras HP (54,60%), mientras que en las biopsias de CaP su presencia fue absoluta, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos ($P = 0,0000$) (TABLA 4.7), y mayor presencia de ella en el grupo CaP (GRÁFICO 4.3). La distribución de la inmunomarcación de N-cadherina se encontró en el citoplasma de las células glandulares (FIGURA 4.5 y 4.6).

TABLA 4.7 IHQ para N-Cadherina según Escala de Grises en Cáncer de Próstata e Hiperplasia Prostática (Gray value 8 bits)

Inmunohistoquímica (IHQ)	HP n: 163		CaP n: 158		P-Value
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
N-Cadherina	21,20	36,10	64,00	62,00	0,0000

GRAFICO 4.3 *Box-PLot, Presencia de N-Cadherina según Escala de Grises en CaP e HP (Gray value 8 bits).*



4.6 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE N-CADHERINA EN BIOPSIAS DE CaP e HP, EN RELACIÓN CON EL PSA PREOPERATORIO.

No se encontró correlación significativa entre la presencia de N-Cadherina en CaP e HP, con el PSA pre-operatorio de los pacientes (TABLA 4.8).

TABLA 4.8 Índice de Correlación entre N-cadherina y PSA-preoperatorio en CaP e HP.

Correlación	Índice Correlación	P-Value
Correlación N-Cadherina/PSA Preoperatorio	< 0,0975	No significativo

4.7 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE N-CADHERINA EN BIOPSIAS DE CaP e HP, EN RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE GLEASON.

No se encontró correlación significativa entre la presencia de N-Cadherina en el grupo CaP , con el índice de Gleason (TABLA 4.9).

TABLA 4.9 Índice de Correlación entre N-cadherina y Gleason en el grupo CaP.

Correlación	Índice Correlación	P-Value
Correlación N-Cadherina/ Índice de Gleason	< 0,03	No significativo

4.8 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE N-CADHERINA EN RELACIÓN CON LOS GRUPOS DE RIESGO DE CaP.

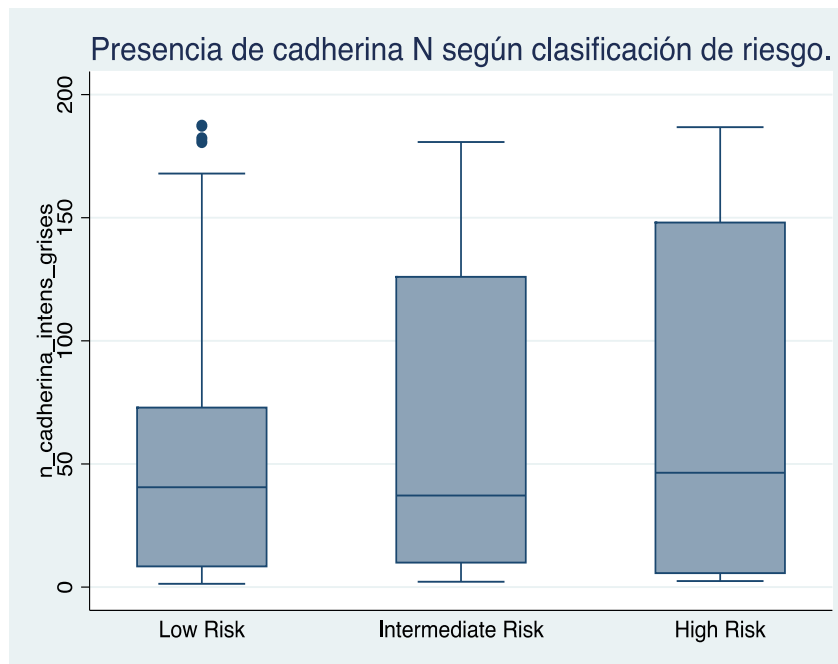
Al comparar a los pacientes con CaP clasificados según grupo de riesgo, éstos no evidenciaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de N-cadherina ($P = 0,6551$) (TABLA 4.10). Sin embargo, el promedio de la presencia de N-cadherina fue directamente proporcional al grupo de riesgo (GRÁFICO 4.4.)

TABLA 4.10 IHQ para E-Cadherina según Escala de Grises en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).

Imunohistoquímica (IHQ)	Bajo Grado n: 33	Mediano Grado n: 91	Alto Grado n: 34	P-Value

	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
N-Cadherina	57,96	62,46	62,13	59,71	71,76	66,58	0,6551

GRAFICO 4.4 Box-Plot, Presencia de N-Cadherina según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).



4.9 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE ADAM 12 EN BIOPSIAS CON CaP e HP.

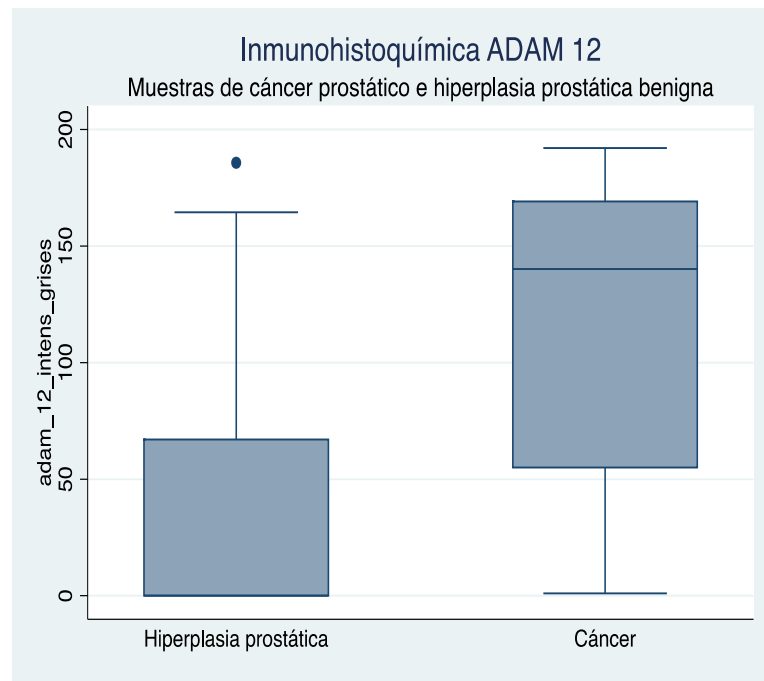
La presencia de Adam 12 mediante la técnica inmunohistoquímica estuvo presente en sólo 70 de 163 muestras HP (42,94%), mientras que en las biopsias de CaP su presencia fue absoluta, existiendo diferencias significativas entre ambos grupos ($P = 0,0000$) (TABLA 4.11), y mayor presencia de ella en el grupo CaP. (GRÁFICO 4.5). La

distribución de la inmunomarcación de ADAM12 fue mixta encontrándose tanto en el citoplasma como en las membranas de las células glandulares (FIGURA 4.7 y 4.8).

Tabla 4.11 IHQ para ADAM 12 Escala de Grises en CaP e HP (Gray value 8 bits).

Inmunohistoquímica (IHQ)	HP n: 163		CaP n: 158		P-Value
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
ADAM 12	35,50	49,50	113,60	66,30	0,0000

GRAFICO 4.5 Box-PLot, Presencia de ADAM 12 según Escala de Grises en CaP e HP (Gray value 8 bits).



4.10 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE ADAM12 EN BIOPSIAS DE CaP e HP, EN RELACIÓN CON EL PSA PREOPERATORIO.

No se encontró correlación significativa entre la presencia de ADAM 12 en CaP e HP, con el PSA pre-operatorio de los pacientes (TABLA 4.12).

TABLA 4.12 Índice de Correlación entre ADAM 12 y PSA-preoperatorio en CaP e HP.

Correlación	Índice Correlación	P-Value
Correlación ADAM 12/PSA-Preoperatorio	0,10	No significativo

4.11 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE ADAM12 EN BIOPSIAS DE CaP e HP, EN RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE GLEASON.

No se encontró correlación significativa entre la presencia de ADAM 12 en el grupo CaP, con el índice de Gleason (TABLA 4.13).

TABLA 4.13 Índice de Correlación entre Adam 12 y índice de Gleason en el grupo CaP.

Correlación	Índice Correlación	P-Value
Correlación ADAM 12/ índice de Gleason	0,048	No significativo

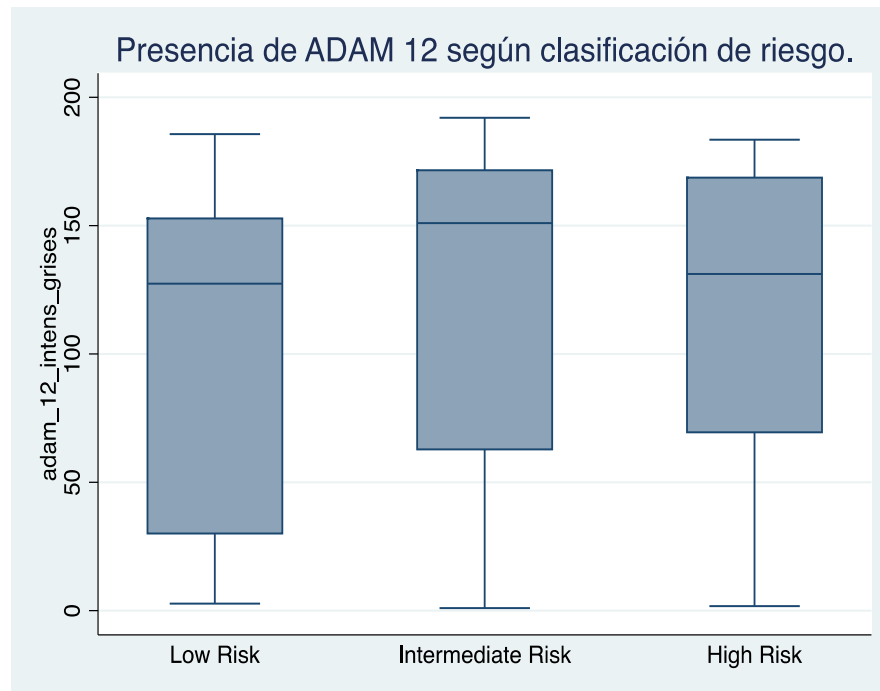
4.12 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE ADAM 12 EN RELACIÓN CON LOS GRUPOS DE RIESGO DE CaP.

Al comparar a los pacientes con CaP clasificados según grupo de riesgo, éstos no evidenciaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de ADAM 12 ($P = 0,2340$) (TABLA 4.14). Sin embargo, existió tendencia a que ésta fuese menor en CaP de riesgo bajo y mayor en el grupo de riesgo mediano (GRÁFICO 4.6).

TABLA 4.14 IHQ para ADAM 12 según Escala de Grises en pacientes con Cáncer de Próstata según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).

Inmunohistoquímica (IHQ)	Bajo Grado n: 33		Mediano Grado n: 91		Alto Grado n: 34		P-Value
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	
Adam 12	97,07	65,90	118,30	63,75	115,25	58,62	0,2340

GRÁFICO 4.6 Box-Plot, Presencia de ADAM 12 según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).



4.13 RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICA DE E-CADHERINA EN RELACIÓN CON N-CADHERINA Y ADAM 12 EN BIOPSIAS DE CaP e HP.

Al analizar la razón del promedio de E-cadherina y N-cadherina en CaP y HP en relación a la inmunomarcación. Se obtuvo que la razón del promedio fue mayor en las HP que en CaP (TABLA 4.15).

TABLA 4.15: Razón del promedio de E-Cadherina/ N-Cadherina según Escala de Grises en pacientes con CaP y HP (Gray value 8 bits).

Inmunohistoquímica (IHQ)	HP n: 163 \bar{x}	CaP n: 158 \bar{x}
Razón del promedio E-Cadherina/N-Cadherina	6,66	1,67

Al realizar la razón del promedio de E-cadherina/N-cadherina en pacientes con CaP según grupo de riesgo, en relación a la inmunomarcación, se obtuvo que los pacientes de riesgo bajo y mediano presentaron una mayor razón del promedio de E-cadherina y N-cadherina respecto al grupo de riesgo Alto (TABLA 4.16).

TABLA 4.16 Razón del promedio de E-Cadherina/ N-Cadherina según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).

Inmunohistoquímica (IHQ)	Bajo Grado n: 33 \bar{x}	Mediano Grado n: 91 \bar{x}	Alto Grado n: 34 \bar{x}
Razón del promedio E-Cadherina/N-Cadherina	1,62	1,77	1,50

Al analizar la razón del promedio de E-cadherina y ADAM 12 en CaP y HP en relación a la inmunomarcación. Se obtuvo que la razón del promedio fue mayor en las HP que en CaP (TABLA 4.17).

TABLA 4.17 Razón del promedio de E-Cadherina/ ADAM 12 según Escala de Grises en pacientes con CaP y HP (Gray value 8 bits).

Inmunohistoquímica (IHQ)	HP n: 163 \bar{x}	CaP n: 158 \bar{x}
Razón del promedio E-Cadherina/ADAM 12	3,94	0,94

Al realizar la razón del promedio de E-cadherina/ADAM 12 en pacientes con CaP según grupo de riesgo, en relación a la inmunomarcación, se obtuvo que los pacientes de riesgo bajo tuvieron una mayor razón del promedio de E-cadherina/ADAM12 respecto a los de riesgo mediano y alto, la que fue igual en estos últimos (TABLA 4.18).

TABLA 4.18 Razón del promedio de E-Cadherina/ ADAM 12 según Escala de Grises, en pacientes con CaP según grupo de riesgo (Gray value 8 bits).

Inmunohistoquímica (IHQ)	Bajo Grado n: 33 \bar{x}	Mediano Grado n: 91 \bar{x}	Alto Grado n: 34 \bar{x}
Razón del promedio E-Cadherina/ADAM 12	0,97	0,93	0,93

4.14 HEMATOXILINA-EOSINA EN CaP e HP.

Tanto las muestras de CaP como las de HP fueron teñidas con la técnica de rutina (Hematoxilina-Eosina).

Cáncer de Próstata, Hematoxilina-Eosina.

La figura 4.1 corresponde a CaP en donde se observa disminución en el tamaño de las glándulas, cambios del epitelio de cilíndrico pseudoestratificado a cubico simple, núcleos hipercromáticos y más grandes perdiendo la relación núcleo/citoplasma. Además presencia de nucléolos irregulares.

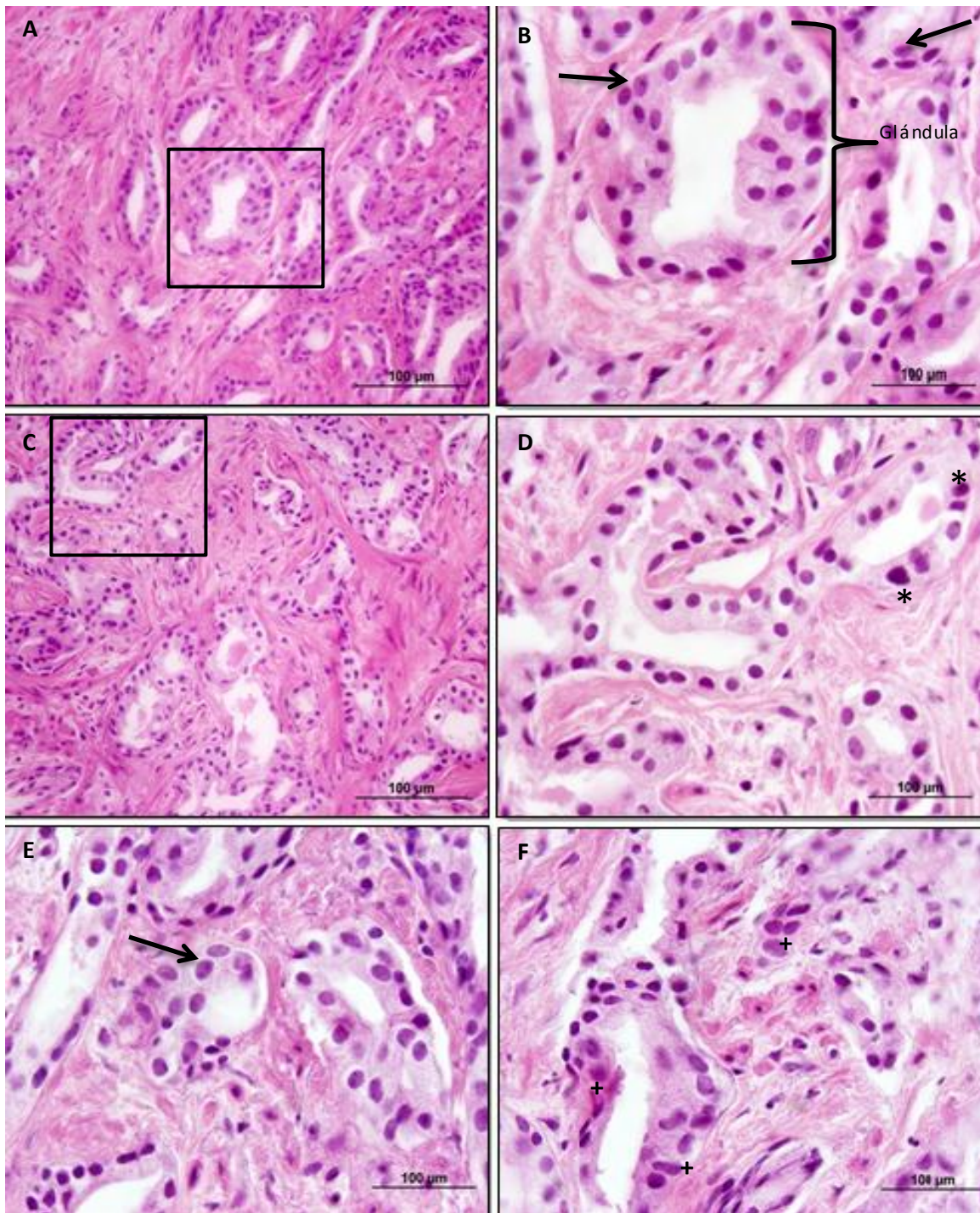


FIGURA 4.1 : Hematoxilina y Eosina en CaP **(A)** y **(C)** son microfotografías representativas de CaP en aumento de 40x, el resto de las microfotografías se encuentran en aumento 100x. Se observa parte del estroma de las glándulas prostáticas en CaP, siendo de menor tamaño respecto a las de HP. **(B)** se evidencia la transformación del epitelio de cilíndrico a cúbico simple; en **(D)**, **(E)** y **(F)** el epitelio es cúbico simple. Además, se observan núcleos más hiper cromáticos (*), aumentados de tamaño (+) y presencia de nucléolos irregulares (flechas).

Hiperplasia prostática (HP), Hematoxilina-Eosina.

La figura 4.2 corresponde a HP en donde se observa un crecimiento excesivo de los elementos del estroma, tales como crecimiento del músculo liso y del tejido fibroso, además de la proliferación y crecimiento glandular con epitelio cilíndrico, cúbico o pseudoestratificado.

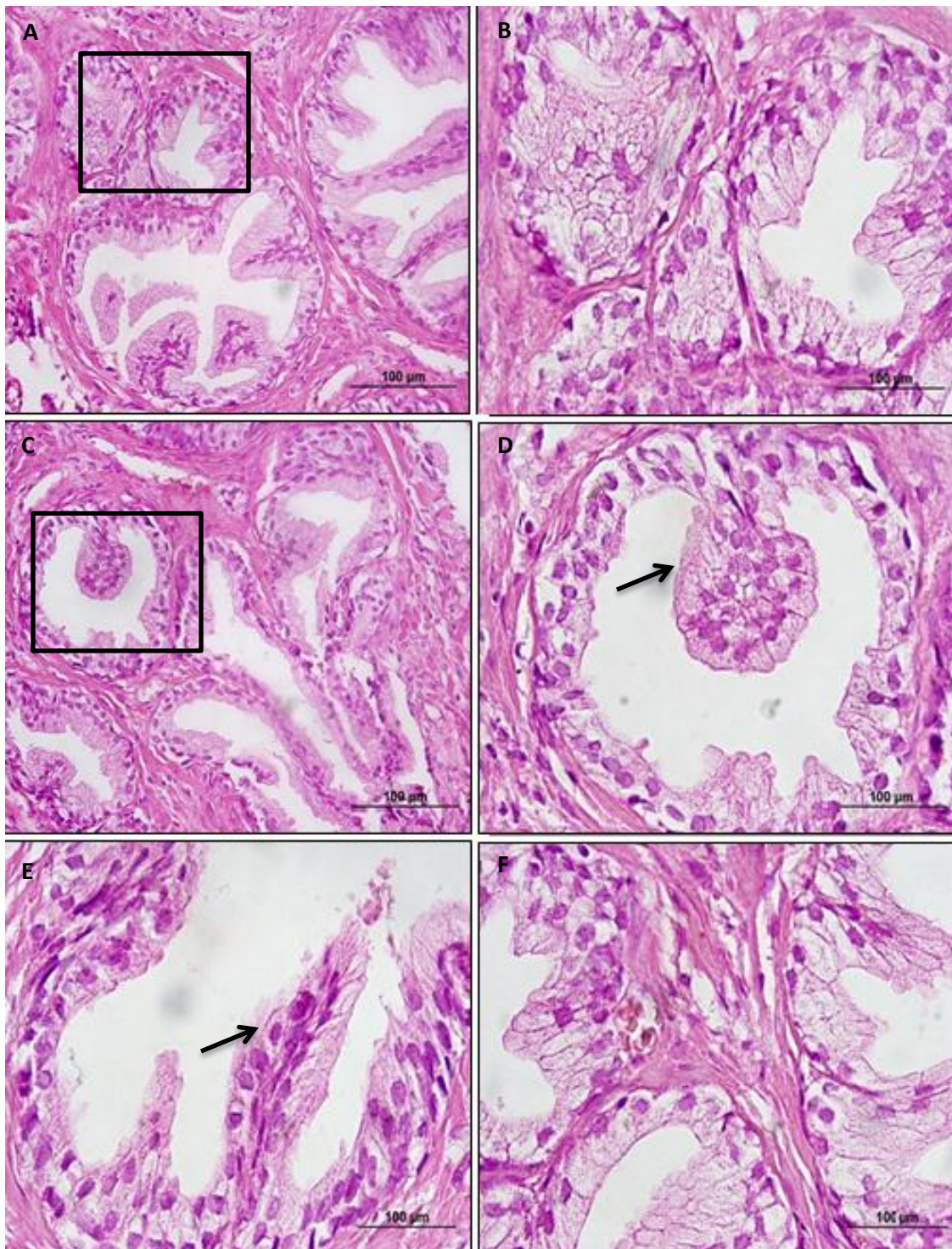


FIGURA 4.2 : Hematoxilia-Eosina en HP. A y C son microfotografías de HP en un aumento de 40x. B,D,E y F son microfotografías representativas de HP en aumento de 100x .(A) y (C) Se evidencia parte del estroma de las glándulas prostáticas, las cuales presentan variados tamaños.(B), (D), (E) y (F) Bajo mayor aumento se observa con detalle el epitelio glandular en donde se observa un epitelio cilíndrico-cúbico simple. Además de la presencia de pliegues (flechas).

4.15 INMUNOHISTOQUÍMICA E-CADHERINA EN CaP e HP.

Las muestras de CaP como las de HP fueron evaluadas por el anticuerpo anti-E-cadherina, en donde todas las muestras evaluadas por dicho anticuerpo presentaron inmunomarcación positiva.

E-cadherina en CaP

En la figura 4.3 se observa la presencia de E-cadherina en CaP la cual no se encontró de manera uniforme en el dominio basolateral de las células del epitelio glandular, y presentó un patrón de marcaje de membrana de color rojizo.

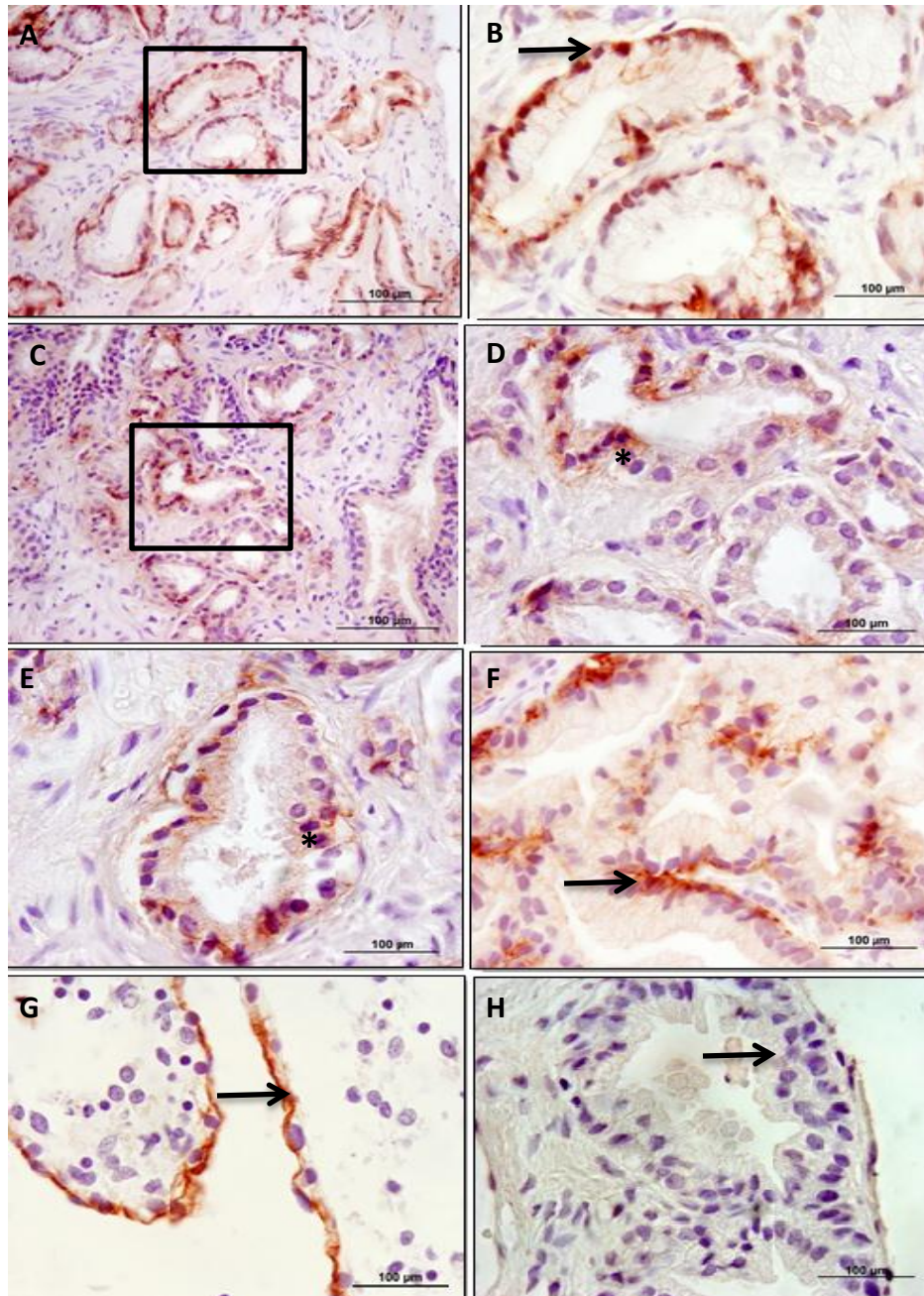


FIGURA 4.3 : Inmunohistoquímica de E-cadherina en CaP. A y C son microfotografías representativas de CaP en un aumento de 40x. B,D, E y F son microfotografías de CaP en aumento de 100x. (A) y (C) A menor aumento es posible distinguir con claridad el estroma y las glándulas prostáticas, donde se puede observar que la inmunomarcación de E-cadherina solo se encontró en el epitelio glandular (B), (D), (E) y (F) Bajo mayor aumento se puede ver con detalle las glándulas prostáticas, dando énfasis a la inmunomarcación de E-cadherina en el dominio basolateral (flechas) de las células que forman el epitelio de las glándulas, existiendo heterogeneidad en ella (*) ya que no todas las células fueron marcadas con el anticuerpo (flecha).(G) Corresponde al control positivo externo de E-cadherina en el epitelio de la piel de un embrión humano 18 semanas de gestación, en aumento de 100x (flecha) y (H) Corresponde al control negativo interno de E-cadherina en el epitelio prostático (flecha), en aumento de 40x.

E-cadherina en hiperplasia prostática (HP)

En la figura 4.4 se observa la presencia de E-cadherina en HP esta se encontró de forma homogénea en el dominio basolateral del epitelio de las glándulas prostáticas, presentando un patrón de marcaje de membrana de color rojizo intenso.

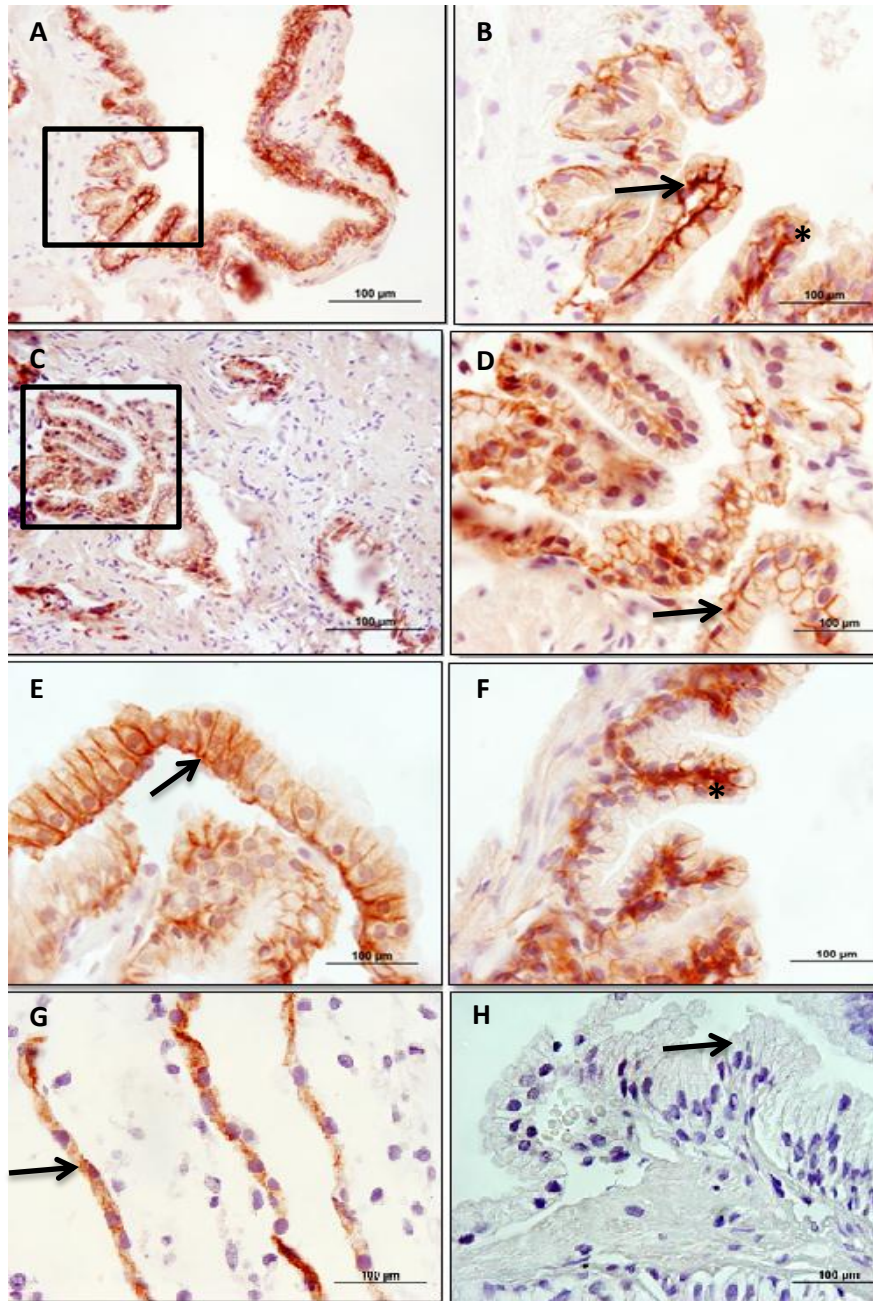


FIGURA 4.4 : Inmunohistoquímica de E-cadherina en HP. A y C son microfotografías representativas de HP en un aumento de 40x. B, D, E y F son microfotografías de HP en aumento de 100x. **(A)** Es posible observar parte del estroma junto con las glándulas prostáticas, donde se puede distinguir con claridad que la inmunomarcación de E-cadherina solo se encontró en el epitelio glandular. **(B)** Bajo mayor aumento es posible observar el epitelio con detalle (*) dando énfasis a la inmunomarcación en el dominio basolateral de las células que forman el tejido epitelial (flechas) **(C)** Se distinguen con facilidad las glándulas del estroma reconociendo el sitio de marcación de E-cadherina. **(D), (E) y (F)** Se evidencia con claridad el patrón de marcaje de membrana de E-cadherina (flechas) y su uniformidad en el dominio basolateral de las células que forman el epitelio (*). **(G)** Corresponde al control positivo externo de E-cadherina en el epitelio de la piel de un embrión humano 18 semanas de gestación, en aumento de 100x (flecha) y **(H)** Corresponde al control negativo interno de E-cadherina en el epitelio prostático (flecha), en aumento de 40x.

4.16 INMUNOHISTOQUÍMICA N-CADHERINA EN CaP e HP.

La totalidad de las muestras fueron evaluadas con el anticuerpo anti-N-cadherina, existiendo inmunomarcación en la totalidad de las biopsias con CaP y en sólo 89 de las 163 (54,60%) de las HP.

N-cadherina en CaP

En la figura 4.5 se observa la presencia de N-cadherina en CaP esta se encontró en las glándulas prostáticas, donde la marcación no fue uniforme, ya que no todas las células del epitelio glandular fueron marcadas con la misma intensidad. Además presentó un patrón de marcaje citoplasmático de color rojizo intenso.

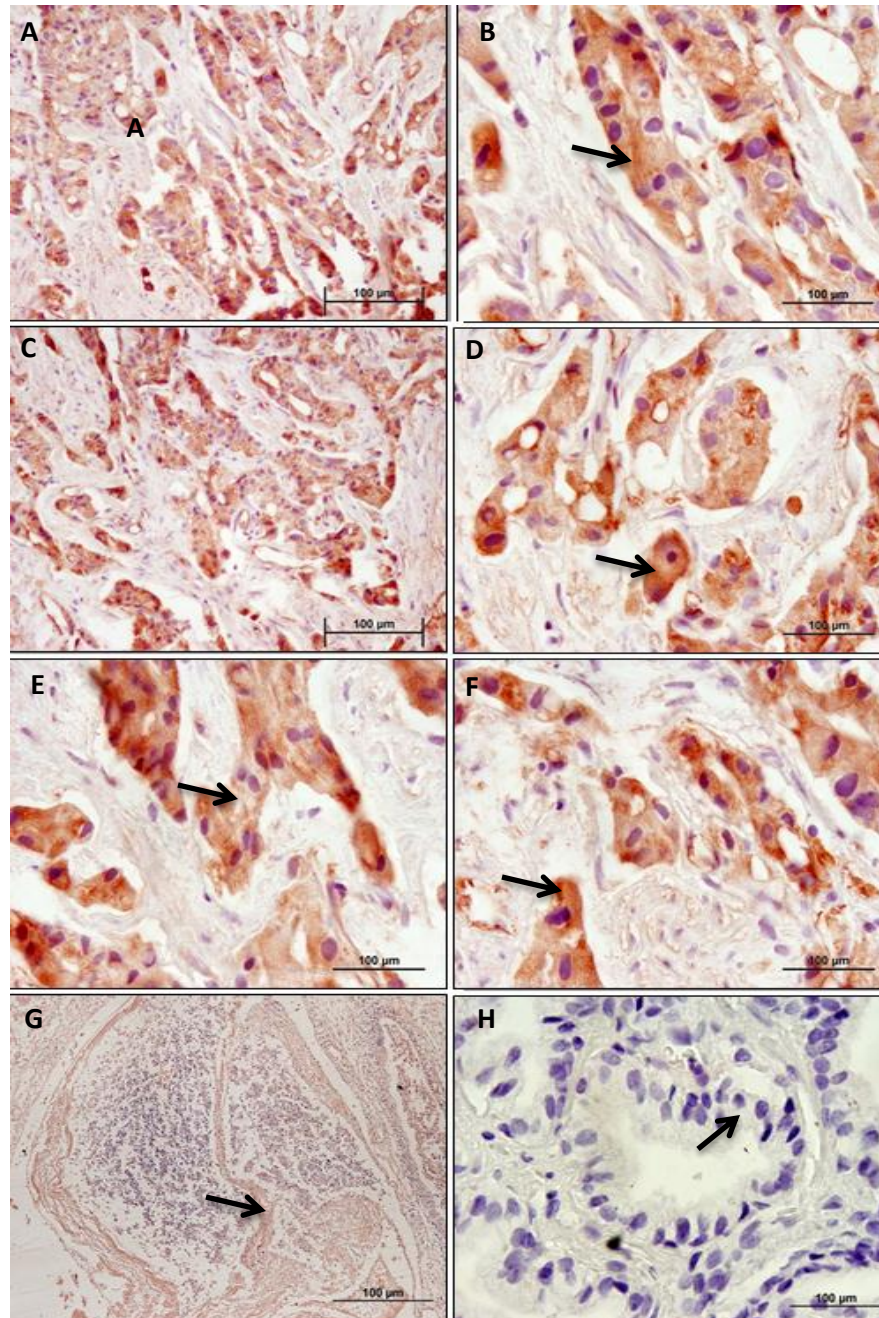


FIGURA 4.5 : *Inmunohistoquímica de N-cadherina en CaP. A y C son microfotografías de CaP en un aumento de 40x. B, D, E y F son microfotografías representativas de CaP en aumento de 100x (A) y (C) A menor aumento se observa el estroma como las glándulas prostáticas, donde se observa una importante marcación de N-cadherina en el epitelio glandular. (B) Bajo mayor aumento se observa detalladamente la inmunomarcación de N-cadherina, presentando un patrón citoplasmático (flecha). (D), (E) y (F) Se observa la inmunomarcación de N-cadherina, la cual no fue homogénea, ya que no en todas las células presentaron una marcación uniforme, ni la misma intensidad (flechas). (G) Corresponde al control positivo externo de N-cadherina en las células musculares (corazón) de embrión humano de 18 semanas de gestación, en aumento de 40x. (H) Corresponde al control negativo interno de N-cadherina en el epitelio prostático (flecha), en aumento de 100x.*

N-cadherina en HP.

En la figura 4.6 se observa la inmunomarcación para N-cadherina en las muestras con HP, la cual se presentó en 89 muestras (54,65%) del total de biopsias con HP. Esta inmunomarcación se encontró de manera muy tenue en las glándulas prostáticas.

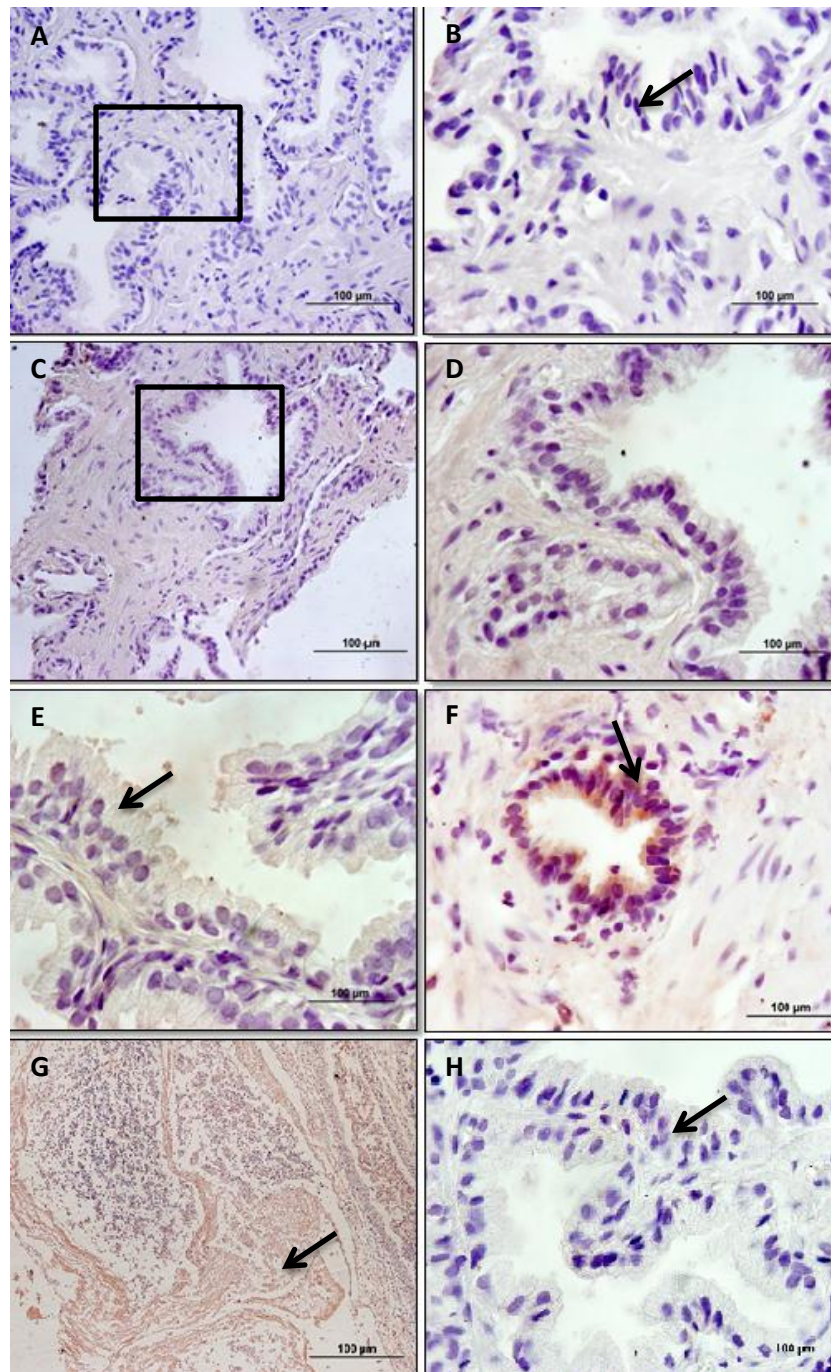


FIGURA 4.6 : *Inmunohistoquímica de N-cadherina en HP. A,C y E son microfotografías de HP en un aumento de 40x. B,D y F son microfotografías representativas de HP en aumento de 100x. (A), (C) y (E) A menor aumento se identifica con claridad el estroma de las células prostáticas, donde no se observa inmunomarcación de N-cadherina.(B),(D) Bajo mayor aumenta se observa con claridad el epitelio de las glándulas prostáticas, donde se puede ver que no existe inmunomarcación de la células del epitelio glandular (flechas).(F) Se observa la tenue inmunomarcación (flecha) obtenida en las 89 muestras con HP. (G) Corresponde al control positivo externo de N-cadherina en las células musculares (corazón) de embrión humano de 18 semanas de gestación, en aumento de 40x. (H) Corresponde al control negativo interno de N-cadherina en el epitelio prostático (flecha), en aumento de 100x.*

4.17 INMUNOHISTOQUÍMICA ADAM 12 EN CaP e HP.

La totalidad de las muestras fueron evaluadas con el anticuerpo anti-ADAM12, existiendo inmunomarcación en la totalidad del grupo CaP, pero sólo en 70 de las 163 (42,94%) biopsias con HP.

ADAM 12 en CaP

En la figura 4.7 se observa la presencia de ADAM 12 en CaP se encontró de manera uniforme en la mayoría de las células del epitelio glandular y parte del estroma. Presentó un patrón de marcaje citoplasmático y de membrana de color rojizo intenso.

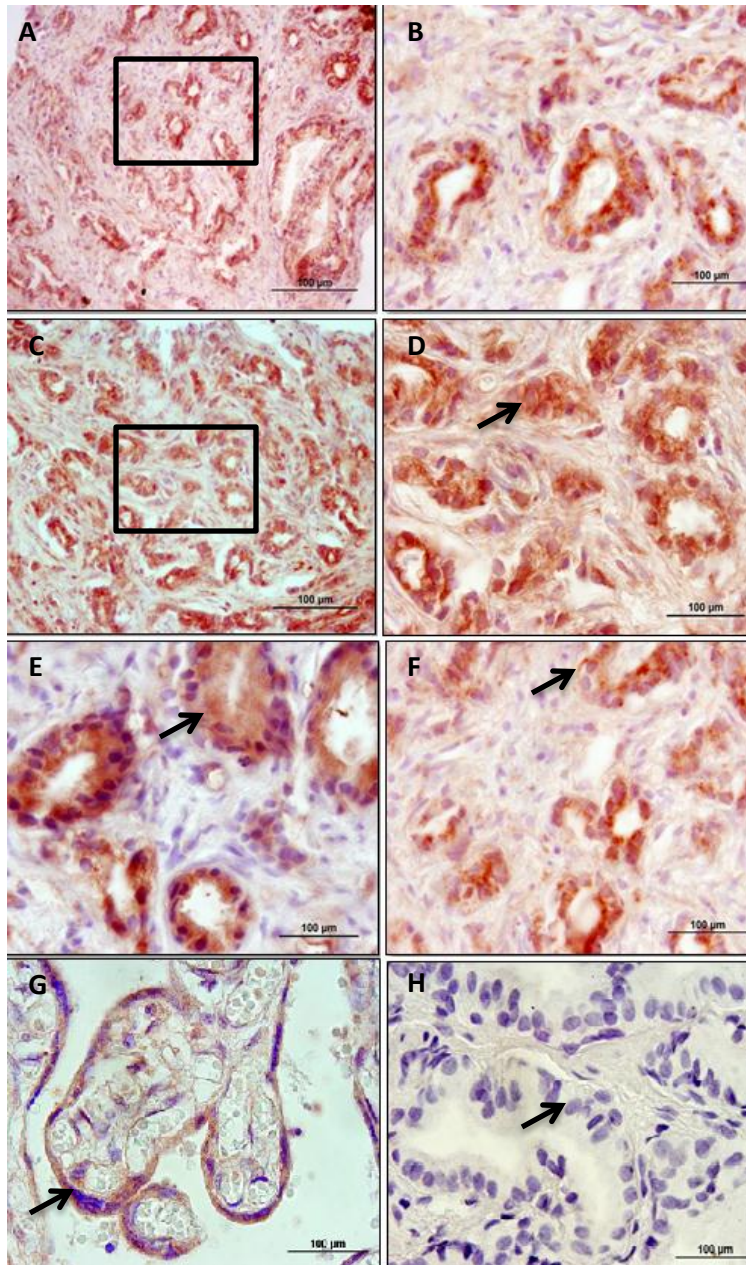


FIGURA 4.7 : Inmunohistoquímica de ADAM12 en CaP. A y C son microfotografías representativas de CaP en un aumento de 40x. B,D, E y F son microfotografías de CaP en aumento de 100x. **(A)** y **(C)** Nos permite distinguir claramente el estroma de las glándulas prostáticas, permitiendo observar una importante marcación de ADAM 12 en el epitelio glandular y parte del estroma. **(B)**, **(D)** y **(E)** Bajo mayor aumento se observa con detalle la inmunomarcación de ADAM 12 en el epitelio glandular y parte del estroma. Además de reconocer el patrón de marcaje citoplasmático y de membrana (flechas). **(F)** A mayor aumento se observa la inmunomarcación en la mayoría de las células del epitelio junto con el estroma (menor intensidad), excepto en algunas donde la marcación no fue homogénea, ni con la misma intensidad (flecha) **(G)** Corresponde al control positivo externo de ADAM12 en el sincitiotrofoblasto de una placenta humana de término (flecha), en aumento de 100x. **(H)** Corresponde al control negativo interno de ADAM12 en el epitelio prostático (flecha), en aumento de 100x.

ADAM 12 en HP

La figura 4.8 corresponde a la presencia de ADAM 12 en (HP) esta se encontró de manera muy tenue en el epitelio de las glándulas prostáticas, presentando un patrón de marcaje citoplasmático de color rojizo.

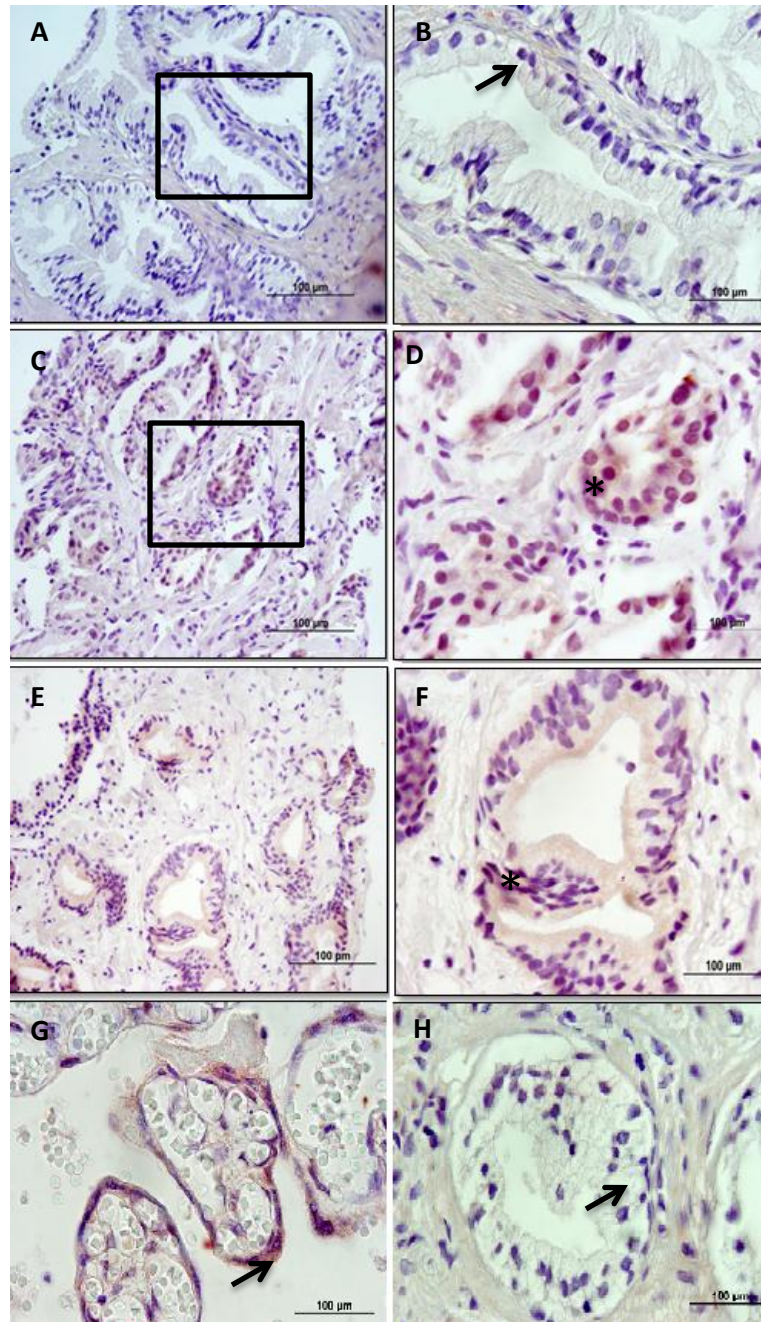


FIGURA 4.8 : Inmunohistoquímica ADAM12 en HP. A, C y E son microfotografías representativas de HP en un aumento de 40x. B, D y F son microfotografías de HP en aumento de 100x (A), (C) y (E) Nos permite distinguir claramente el estroma de las glándulas prostáticas, donde se observa que en (A) no existió inmunomarcación de ADAM 12 en las glándulas prostáticas, mientras que en (C) y (E) la inmunomarcación de ADAM 12 en las glándulas fue muy suave. (B), (D) y (F) Bajo mayor aumento se observa el epitelio glandular prostático (B), no existiendo inmunomarcación en las células del epitelio glandular (flecha), a diferencia de (D) y (F) en donde se encontró una tenue marcación de patrón citoplasmático en las células epiteliales (*). (G) Corresponde al control positivo externo de ADAM12 en el sincitiotrofoblasto de una placenta humana de término (flecha), en aumento de 100x. (H) Corresponde al control negativo interno de ADAM12 en el epitelio prostático (flecha), en aumento de 10

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

En este estudio fue posible determinar presencia de E-cadherina, N-cadherina y Adam 12 como marcadores de Transición Epitelio Mesénquima tanto en las biopsias de CaP como en las biospias de HP. Por otro lado, esta presencia no se asoció a los niveles de PSA-preoperatorio, el índice de Gleason y los grupos de la estratificación de riesgo clínico en el caso de los pacientes con CaP.

En nuestro estudio el marcador epitelial E-cadherina presentó un patrón de inmunomarcación de membrana. Existe fuerte evidencia que la expresión de E-cadherina disminuye de gran manera en células tumorales con baja diferenciación, tales como cáncer de mama (81), cáncer gástrico (100), cáncer hepático (101), y cáncer rectal (102). Sin embargo, en CaP esto aún no se establece con seguridad. En nuestro trabajo se encontró presencia de E-cadherina tanto en las biopsias con CaP como las HP. No obstante, la intensidad de la marca se dio principalmente en HP, lo cual es coincidente con reportes previos (103),(104),(77),(81),(105),(106),(107); este fenómeno podría ser explicado por la metilación aberrante del promotor de E-cadherina o su silenciamiento (108) tras la activación del programa EMT en las muestras con CaP, siendo TWIST1 uno de los factores principales que inducen la ocurrencia de este proceso (109), participando como factor de transcripción predominante en la represión de E-cadherina (110). Sin embargo, los resultado no son del todo concluyentes, dado que existen estudios que obtuvieron niveles similares de E-cadherina en muestras de tejido prostático sano y CaP (106), (111).

Al analizar la relación entre PSA-prequirúrgico y la presencia de E-cadherina no se encontró asociación en HP ni en CaP, lo que es concordante con lo reportado por de Marzo et. al. (112). No obstante, existen estudios previos donde encontraron asociación significativa entre ellas (105) e incluso al categorizar el PSA en niveles >20 y ≤ 20 (81). Cabe destacar que el PSA es un método que se utiliza en el screening para el CaP, pero que no es específico para esta enfermedad, ya que se puede encontrar en elevadas cantidades séricas cada vez que existen procesos de injuria en la arquitectura

prostática (inflamación, infección, trauma, procedimientos invasivos) elevando las concentraciones séricas de PSA (9).

En esta investigación no fue posible encontrar asociación significativa entre los niveles de E-cadherina en el tejido y el índice de Gleason, lo que es concordante con lo obtenido por estudios anteriores (113), (106). Tales hallazgos podrían explicarse debido a que las células epiteliales malignizadas continúan expresando, pero en menor grado e intensidad, las citoqueratinas y E-cadherinas características del estado epitelial (58), conservándolas inmóviles y con la capacidad para formar láminas de células contiguas (114). Sin embargo, estudios previos han reportado correlación negativa entre la presencia de E-cadherina y el estadio Gleason en CaP localizado (107), incluso al ser categorizados tanto en Gleason >6 y Gleason ≤ 6 (115) como en bien diferenciados (Gleason 2-4), moderadamente diferenciados (Gleason 5-7) y pobremente diferenciados (Gleason 8-10)(81). Esta tendencia se mantiene inclusive en muestras metastásicas de CaP, (116), por lo que algunos autores han sugerido que la expresión de E-cadherina en CaP tendría una correlación positiva con el pronóstico del paciente (66). Mientras que otros autores demostraron que puede existir re-expresión de E-cadherina en CaP en estado avanzado (106, 112, 117, 118), basados en la teoría que E-cadherina tendría una doble función en la progresión tumoral, disminuyendo su presencia en las células malignas y luego pudiendo re-expresarse en células tumorales que han migrado, promoviendo nuevamente el crecimiento tumoral y la supervivencia a distancia en las metástasis (119). Hasta la fecha no ha sido posible dilucidar claramente el mecanismo responsable de tal re-expresión (77), proponiéndose una “des-represión” de la expresión de E-cadherina (120), (121) o un mecanismo post-traducciona l como la estabilización de la E-cadherina en la membrana (77), reorganizándose los complejos de adhesión celular epitelial y suprimiéndose la proliferación celular, perdiendo las células tumorales su fenotipo mesenquimal (122), (123). Más aún, al clasificar el grupo CaP en sus tres estadios de riesgo clínico, ninguno de ellos tuvo asociación con la presencia de E-cadherina.

En definitiva, se mantiene la incertidumbre sobre si E-cadherina cumple un rol en la progresión del fenotipo metastásico y si pudiese ser factor pronóstico para el desarrollo

del potencial invasivo en CaP (124), (116), en vistas de plantear a la proteína E-cadherina como un elemento que interfiere en el proceso de metástasis en cáncer (54).

Por otra parte, N-cadherina, marcador mesenquimático, presentó un patrón de inmunomarcación citoplasmático, discrepando con un estudio en el que el marcaje se describió también de membrana (125). La presencia de esta proteína fue mínima en las biopsias con HP, mientras la totalidad de las muestras con cáncer de próstata presentaron marcaje evidente en el citoplasma de sus células epiteliales. Este resultado contrasta con dos reportes que informaron solo 5% de positividad en adenocarcinomas prostáticos (126), o su ausencia total en muestras de CaP (127). Sin embargo, en líneas celulares de cáncer de próstata existe una alta expresión de N-cadherina (128). Esta discrepancia podría estar relacionada con múltiples factores incluyendo la especificidad del anticuerpo utilizado en cada estudio y la antigenicidad variable de los tejidos.

La N-cadherina es una glicoproteína (101) que se encuentra ausente en la mayoría de los epitelios normales, pero si se encuentra presente en los tejidos tumorales (129), tales como mama, melanomas y CaP (125) jugando un papel fundamental en la motilidad de las células tumorales epiteliales (130), favoreciendo la metástasis distante en lugar de la progresión local (125). Se ha demostrado que la sobreexpresión de N-cadherina en el carcinoma de mama, páncreas (131) y esófago (70) se correlaciona con su potencial de invasividad (131). En la EMT una característica distintiva es el switch de las cadherinas la que en la embriogénesis juega un papel crítico particularmente en los procesos morfogénéticos (132). Este evento se ha reconocido como de gran importancia en la progresión de las metástasis por permitir la invasividad de las células tumorales (133). La pérdida de E-cadherina con el aumento de la expresión de N-cadherina es el acontecimiento más notable que se produce en células tumorales de origen epitelial (125), como lo ha descrito un estudio de líneas celulares de CaP, en donde informó que la regulación positiva de la expresión de N-cadherina podría facilitar la metástasis (128), lo cual no significa que la E-cadherina será reemplazada por N-cadherina, sino que a medida que la E-cadherina se reduce, la expresión de N-cadherina aumenta mientras las células realizan el proceso de EMT (134). Se sabe que

la regulación de la expresión de N-cadherina se encuentra controlada por el factor de transcripción TWIST 1, que se une a un elemento Cis caja E, situado en el primer intrón del gen de la N-cadherina humana, y con ello iniciando la transcripción de la proteína. Por ende, cualquier alteración de la expresión de TWIST 1 disminuiría la expresión de la N-cadherina e inhibiría la migración celular (135).

Un resultado no esperado de nuestro trabajo fue encontrar biopsias de HP que resultaron tener inmunomarcación positiva para N-cadherina (no estadísticamente significativo), lo que se contradice con los resultados esperados en donde se pretendía que el total de las biopsias con HP fueran negativas para la inmunomarcación de N-cadherina. Sin embargo, un estudio realizado con el suero de pacientes que presentaban CaP encontró la presencia de esta proteína tanto en el suero de los pacientes sanos como en los con CaP, aunque la concentración de N-cadherina soluble fue mayor en los pacientes con CaP (101). Por último, se ha descrito que esta glicoproteína puede estar presente en diversos tipos celulares incluyendo las neuronas, células del miocardio, y mesenquimales, participando en la activación de los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) (125). Es posible que la presencia de N-cadherina en las biopsias de HP estuviera relacionada con la activación de los receptores de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), los cuales son fundamentales para el crecimiento prostático, especialmente en HP (44). Por otra parte, no puede descartarse que tales muestras de HP con presencia de N-cadherina tuviesen pequeños focos cancerígenos no detectados en los cortes habituales.

Al analizar la relación entre PSA y la presencia de N-cadherina no se encontró asociación tanto en HP ni CaP, lo cual concuerda con un trabajo realizado el 2006 (125). Por otro lado, un estudio realizado con el suero de los pacientes que presentaban CaP, logró encontrar correlación entre la presencia de N-cadherina y el PSA (101). La no correlación del PSA y la presencia de la proteína serían justificadas con que el PSA está más vinculado con el volumen del tejido prostático que con CaP (136).

En esta investigación no fue posible encontrar asociación significativa entre la presencia de N-cadherina y el índice de Gleason, al igual que otros autores (126). un estudio que categorizó el score Gleason en 3 grupos; Gleason (5-6), 7, y (8-10), tampoco logró encontrar una correlación significativa entre N-cadherina y el índice de Gleason, en donde N-cadherina se expresó en un 7% de los casos con Gleason (5-6), 65% de los casos con Gleason (7), y 57% de los casos con Gleason (8-10). Sin embargo, al analizar los patrones de Gleason individuales (patrón primario y secundario) descubrieron que solo el 34% de los patrones de Gleason 3 expresaban N-cadherina, mientras que el 62% de los patrones de Gleason 4, y 50% de los patrones de Gleason 5 expresaban N-cadherina, demostrando que la presencia de esta proteína cambia a medida que aumenta el patrón de Gleason, proponiendo por primera vez a N-cadherina como un biomarcador útil para CaP agresivo (125). A su vez otro estudio encontró una asociación significativa entre la presencia de N-cadherina y la puntuación de Gleason al categorizar al Gleason 7 en (3+4) o (4+3) encontrando asociación significativa entre la presencia de N-cadherina y el índice de Gleason 7 (4+3) (125). Al comparar los grupos de los pacientes con CaP clasificados según grupo de riesgo y la presencia de N-cadherina no se encontró diferencia significativa entre los tres grupos.

Por último, en lo que nos concierne, este es el primer estudio que analiza la presencia del marcador metaloproteasa-desintegrina ADAM 12 en tejido prostático, ya que hasta el momento solo se había buscado la presencia de esta proteína en fluidos, tales como el suero y la orina de pacientes con CaP (96). Por esta razón, los siguientes resultados podrían constituir un precedente de futuros estudios al respecto.

La presencia de ADAM 12 se encontró en la totalidad de las biopsias que presentaban CaP y en un porcentaje mínimo de biopsias con HP. En donde obtuvo un patrón de inmunomarcación mixto, citoplasmático y de membrana. Esta proteína transmembrana está compuesta por un dominio metaloproteasa-desintegrina y una región rica en cisteína (137), desempeña funciones en la adhesión celular, reestructuración de la matriz durante la diferenciación celular, y funciones de regulación en los tejidos sanos (138), tales como placenta (91), en donde promueve la migración celular y la invasión de varias líneas celulares (91). La expresión de ADAM12 es baja

en la mayoría de los tejidos normales tales como cartílago, hueso, tejido muscular, hígado, y cerebro (86). En varios tipos de cáncer humanos (94) es posible encontrar expresión aumentada de muchas especies de ADAM, incluyendo ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17, ADAM19, ADAM28, ADAMTS1, ADAMTS4 y ADAMTS5 (88). Además ha sido asociada a diversas patologías tales como fibrogénesis hepática, hipertrofia cardíaca y asma (86). En varios tipos de tumores como cáncer de pulmón, mama (94), hígado, estómago, y colón (90) se ha detectado aumento de la expresión de Adam 8, 12, 15 y 28. Asimismo el aumento de la expresión de ADAM 12 también ha sido detectado en cáncer de vejiga (86), y pulmonar de células pequeñas (139), y no células pequeñas (89).

Un estudio llevado a cabo por Elif Bilgin et al. (96), determinó la expresión de ADAM12 en sangre y orina de pacientes con diagnóstico de CaP (n=66) y controles sanos (n=14), de los cuales 40 tuvieron enfermedad en estadio local, 20 en fase localmente avanzada y 6 en fase metastásica, encontrándose mayor expresión de ADAM12 en suero y orina de los pacientes con CaP localizado y localmente avanzado, sin demostrar diferencias en la expresión del biomarcador entre los diferentes estadios de CaP, proponiendo la determinación de ADAM12 urinario en conjunto con PSA como marcadores de seguimiento del tratamiento y metástasis en CaP debido a su buena correlación, difiriendo de los resultados de nuestro estudio, los que no encontraron asociación entre la presencia de ADAM12 y el PSA-prequirúrgico tanto en el grupo CaP como en HP (96). Por otro lado, en modelo animal se demostró que ADAM 12 es esencial para el desarrollo y la progresión del CaP (87). Otro estudio encontró que la detección urinaria de ADAM 12 en cáncer de mama es predictivo de la presencia y la etapa de la enfermedad (140). Un trabajo midió la expresión de los niveles de ADAM 12 en la orina y el suero de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) v/s controles sanos dando una expresión significativamente mayor de la proteína en SCLC que en los controles sanos. Además en los tejidos de SCLC el 72,67% de un total de 150 muestras expresó ADAM 12. Por último, modelos animales con metástasis de SCLC exhibieron una mayor expresión de la proteína, por lo que consideraron a

ADAM 12 como un posible factor pronóstico independiente y marcador diagnóstico implicado en la proliferación, invasión y metástasis de aquel cáncer (139).

En esta investigación no fue posible encontrar asociación significativa entre la presencia de Adam 12 y el índice de Gleason. Si bien con Adam 12 actualmente no existen estudios en que se haya asociado este marcador con biopsias de CaP, lo cual es probable que sea debido a las limitaciones que presenta el índice de Gleason. Cabe destacar que esta puntuación depende del nivel de experiencia del patólogo, por ende presenta poca objetividad ya por ser un método muy observador-dependiente (141), susceptible de que se cometan errores en la interpretación. Por otra parte, nuestro trabajo no evidenció asociación entre la presencia de ADAM12 y los diferentes grupos de riesgo clínico, no existiendo literatura en la actualidad que describan estas variables clínico-patológicas en biopsias prostáticas.

Al estudiar la razón E-cadherina/N-cadherina en CaP y HP en relación a la inmunomarcación, se obtuvo que la razón entre las proteínas fue mayor en HP a diferencia de CaP. Como ya se ha descrito E-cadherina es un marcador epitelial que continua expresándose, pero en menor grado en los tumores primarios (77). Por otro lado, N-cadherina corresponde a un marcador mesenquimático, que se expresa normalmente en tejido nervioso (125). La disminución de la razón del promedio en E-cadherina/N-cadherina en CaP estaría vinculada a la activación del programa EMT, el cual se considera un requisito previo para la adquisición de un fenotipo migratorio e invasivo de las células tumorales (75) provocando una disminución de la expresión de E-cadherina y elevación de la N-cadherina (66).

Al estudiar la razón E-cadherina/ADAM 12 en CaP y HP en relación a la inmunomarcación según la escala de grises, se obtuvo que fue mayor en HP a diferencia de CaP donde existió una disminución de este. Esto estaría asociado a que E-cadherina si bien se continúa expresando en las células tumorales su presencia es menor en comparación con HP. Por otro lado, Adam 12 es una proteína multi-dominio que regula la proliferación celular promoviendo la movilidad de las células tumorales (95), por lo que se infiere lógico el aumento de su presencia en el CaP.

Respecto a las fortalezas de este estudio, se destaca el haber reclutado los pacientes recién diagnosticados. Por esa razón todos los datos y muestras se recolectaron prospectivamente y no han sufrido modificaciones propias del tratamiento. Por otra parte, se destaca el desarrollo multidisciplinario de este proyecto integrando el trabajo constante de médicos clínicos, patólogos, tecnólogos médicos y metodólogos, que permitió integrar sus datos clínicos, de imágenes, de laboratorio y asistenciales de manera permanente. Asimismo el haber reclutado los pacientes prospectivamente nos permitirá en un futuro analizar los datos de supervivencia y asociarlos con la presencia de los marcadores estudiados. No menos importante, durante el desarrollo de este proyecto fue posible reclutar un tamaño muestral importante, permitiendo el análisis de variables con potencia estadística suficiente que sustenten los resultados y los hagan fiables. Por otro lado, las técnicas de laboratorio fueron ejecutadas por el mismo equipo, con el mismo anticuerpo (origen, código) y técnica para todas las muestras, por lo que el análisis de resultados ha sido confiable y con el mismo patrón.

Como debilidades de esta investigación se plantea la desventaja de que la técnica de laboratorio empleada sólo nos permitió observar la presencia de las proteínas estudiadas, no logrando saber realmente como se modifica la expresión de dichos marcadores. Por lo que como complemento a este estudio se sugiere realizar técnicas de biología molecular como CISH (Hibridación in situ cromogénica) puesto que es similar a la IHQ y el costo es notablemente menor en comparación con otras técnicas de hibridación in situ como FISH, permitiéndonos conocer no solo la presencia o acumulación de estas proteínas en las células prostáticas como fue en el caso de esta investigación sino también su expresión.

La importancia de este trabajo fue lograr reconocer posibles Biomarcadores tumorales presentes en la EMT que permitan ser utilizados como test diagnósticos en la detección temprana de CaP, ya que la pérdida de la adhesión y aumento de la motilidad celular son fenómenos necesarios para la invasión de las células tumorales (142). Los resultados obtenidos en este estudio nos sugieren un rol importante de estas dos cadherinas clásicas, y la desintegrina y metaloproteasa Adam 12 como inductores del programa EMT (96). Esta información puede contribuir a esclarecer de manera más

exacta la participación de estas moléculas en el CaP, y el rol que juega su aumento o disminución en relación a la agresividad de los procesos malignos. Además de permitir aportar más información a los pacientes que ya presentan CaP, ayudando en la detección de metástasis, podría además sugerir a estos marcadores como una prueba adicional en la determinación de este riesgo desde el tumor primario de próstata. Además estos resultados servirán de apoyo para que el médico tratante pueda establecer un pronóstico más adecuado, y a la vez brindar al paciente el tratamiento más apropiado según su requerimiento. Idealmente, todos estos elementos podrían conducir a una disminución de las tasas de mortalidad de esta importante patología que afecta a la población masculina globalmente.

Como complemento de esta investigación se propone realizar estudios posteriores mediante técnicas de biología molecular que permitan determinar la expresión de las proteínas E-cadherina, N-cadherina y ADAM 12 al momento del diagnóstico del CaP y mantener seguimiento a largo plazo de la cohorte de pacientes midiendo PSA-postquirúrgico a los 12, 24 y 36 meses, con el fin de buscar una posible asociación entre la expresión de los biomarcadores tumorales y el pronóstico del CaP. Por último, proponemos la realización de un modelo de EMT en líneas celulares tumorales silenciando el mRNA de los diferentes biomarcadores en cuestión, para así reconocer si éstas dependen entre sí, independiente o asociadas a otras proteínas no aún conocidas, para poder desempeñar su rol en la progresión del fenotipo migratorio celular en CaP.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIÓN

- ✓ La proteína E-cadherina presentó un patrón de membrana en las células glandulares prostáticas, con menor presencia en la cohorte CaP respecto a la de HP. En tanto, N-cadherina evidenció un patrón citoplasmático en las células glandulares de la próstata, siendo su presencia mayor en biopsias de CaP. La desintegrina metaloproteasa ADAM12, presentó un patrón mixto, citoplasmático y de membrana, y su presencia fue mayor en biopsias de pacientes con CaP.
- ✓ No existió asociación entre la presencia de E-cadherina con los niveles de PSA-preoperatorio, índice de Gleason, y los grupos de riesgo de CaP. Sin embargo, existió una relación significativa entre la razón E-cadherina/N-Cadherina y la razón E-cadherina/ADAM12, y el diagnóstico de cáncer o hiperplasia.
- ✓ No existió correlación entre la presencia de N-cadherina con los niveles de PSA-preoperatorio, índice de Gleason, y los grupos de riesgo de CaP.
- ✓ No existió correlación entre la presencia de ADAM12 con los niveles de PSA-preoperatorio, índice de Gleason, y los grupos de riesgo de CaP.
- ✓ La detección de los biomarcadores E-Cadherina, N-Cadherina y ADAM12 mediante la técnica inmunohistoquímica, podrían ser utilizados como marcadores pronósticos del CaP.

REFERENCIAS

1. Keith L. Moore AFD. Anatomía con orientación clínica. 5ta Edición ed. Buenos Aires.Argentina: Médica Panamericana S.A.; 2007. 1205 p.
2. Leslie P. Gartner JLH. Atlas a color de Histología 5ta ed. Buenos Aires.Argentina: Médica Panamericana; 2003. 450 p.
3. Kierszenbaum AL. Histología y Biología Celular. 2da ed. Barcelona.España: Elsevier; 2008.
4. Michael H.Ross WP. Histología. Barcelona.España: Médica Panamericana S.A.; 2007. 974 p.
5. JohnE. Mcneal RK, FuadS. Freiha , DavidG. Bostwick , EliseA. Redwine , ThomasA. Stamey. Patterns of Progression in Prostate Cancer. The Lancet. 1986;327(8472):60-3.
6. M.-C. Franz PA, M. Bürzle, Y. Suzuki, M.R. Freeman, M. A. Hediger. Zinc transporters in prostate cancer. Mol Aspects Med. 2013;34(0):735-41.
7. Eguino AIF, Belén Fernández Sánchez, Graciela García Alvarez. Cáncer de Próstata: Una Guía práctica. Asociación Española Contra el Cáncer [Internet]. 2014; 1:[123 p.].
8. A.Heidenreich MB, S.Joniau, M.D Mason,V.Matveev, N. Mottet, H-P. Schmid, T.H. Van der Kwast, T. Wiegel, F. Zattoni. Guía Clínica sobre el cáncer de Próstata. European Association of Urology [Internet]. 2010.
9. R. Prensner MAR, John T. Wei, Arul M. Chinnaiyan. Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. Sci Transl Med. 2012;4(127):127rv3.
10. Dan Leibovici PES, Piyush K. Agarwal, Shi-Ming Tu, Curtis A. Pettaway, Kate Hitzhusen, Randall E. Millikan, Louis L. Pisters. Prostate Cancer Progression in the Presence of Undetectable or Low Serum Prostate-Specific Antigen Level. CANCER 2007;109(2):198-204.
11. Stevens A. JL. Anatomía Patológica 2da ed. Madrid.España: Harcout; 2001. 652 p.
12. Minsal. Guía Clínica:Próstata en Personas mayores de 15 años.2010; 1:[44 p.].
13. A.D.A.M. Interactive anatomy 2013.

14. Rebecca L. Siegel KDM, Ahmedin Jemal. Cancer Statistics, 2015. CA CANCER J CLIN 2015;65:5-29.
15. James L. Mohler AJA, Robert R. Bahnson, Anthony Victor D'Amico, Brian J. Davis, James A. Eastham, Charles A. Enke, Thomas A. Farrington Celestia S. Higo, Eric M. Horwitz, Michael Hurwitz, Christopher J. Kane, Mark H. Kawachi, Michael Kuettel, Richard J. Lee, Joshua J. Meeks, David F. Penson, Elizabeth R. Plimack, Julio M. Pow-Sang, David Raben, Sylvia Richey, Mack Roach Stan Rosenfeld Edward Schaeffer, Ted A. Skolarus, Eric J. Small, Guru Sonpavde, Sandy Srinivas, Seth A. Strome, Jonathan Tward, Dorothy A. Shead, Deborah A. Freedman-Cass. Prostate Cancer, Version 1.2016 Featured Updates to the NCCN Guidelines. Journal of the National Comprehensive Cancer N. 2016;14(1):19-30.
16. Ferlay J SH, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency For Research on Cancer [Internet]. 2012; 2(1).
17. Kim TH. Pathological upgrading and upstaging of patients eligible for active surveillance according to currently used protocols. Int J Urol. 2013;21:377-81.
18. Ferlay J SH, Bray F GLOBOCAN 2008 : Cancer incidence and mortality worldwide. International Agency For Research on Cancer [Internet]. 2010; 10.
19. DEIS. DEIS: DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICAS E INFORMACIONES DE SALUD.: Chile; 2016.
20. Gann PH. Risk Factors for Prostate Cancer. Rev Urol. 2002;4(suppl 5):S3-S10.
21. Masko M, EHA, Stephen J. Freedland. The Relationship Between Nutrition and Prostate Cancer: Is More Always Better? EUROPEAN UROLOGY. 2013;63:821-2. Epub November 15, 2012.
22. Lora A. Plaskon DFP, Thomas L. Vaughan. Cigarette Smoking and Risk of Prostate Cancer in Middle-Aged Men. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12(7):604-9.
23. Giovannucci E. Medical History and Etiology of Prostate Cancer. Epidemiol Rev. 2001;23(1):159-62.
24. Myon Bae Z-ML, Myung-Hee Shin, Dong-Hyun Kim, MooSong Lee, Yoon-Ok Ahn. Cigarette Smoking and Prostate Cancer Risk: Negative Results of the Seoul Male Cancer Cohort Study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013;14(8):4467-9.
25. Eric A. Klein M. What's new in prostate cancer screening and prevention? Cleveland Clinic Journal Of Medicine 2009;76(8):439-45.

26. Thompson I MDC, James Brantley Thrasher, M.D. Co-Chair, Gunnar Aus, M.D., Arthur L-Burnett, Edith D. Canby-Hagino, Michael S. Cookson, Anthony V. D Amico, Roger R. Dmochowski, David T. Eton, Jeffrey D. Forman, S. Larry Goldenberg, Javier Hernandez, Celestia S. Higano, Stephen R. Kraus, Judd W. Moul, Catherine M. Tangen. Prostate Cancer, Guideline for the Management of Clinically Localized Prostate Cancer: 2007 Update. American Urological Association Education and Research, Inc [Internet]. 2007.
27. R Ceballos Blanco APdIR, M Pineda López, L Calvo Bretón Evaluación de Tecnologías para la Salud: Tamizaje para la detección de cáncer de próstata en población asintomática empleando antígeno prostático específico y tacto rectal Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud [Internet]. 2009:[40 p.].
28. Brito CT. Tamizaje o Screening in Cáncer de Próstata. Boletín Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile 1998;27:94-6.
29. National Cancer Institute FactSheet. National Cancer Institute at the national institutes of health [Internet]. 2012.
30. Torkko GJMaKC. Natural History of Prostate Cancer—Epidemiologic Considerations. The Journal 2001;23(1):14-8.
31. Thompson IM PD, Goodman PJ. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. New England Journal of Medicine. 2004;350:2239-46.
32. Michael J. Barry MD. Prostate-Specific–Antigen Testing for Early Diagnosis of Prostate Cancer. New England Journal of Medicine 2001;344:1373-7.
33. Española RA. Diccionario de lengua española. 23 ed. Madrid. España 2014.
34. D.F. G. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. . The Journal of Urology. 1977;9:273-9.
35. D'Amico M, PhD; Richard Whittington, MD; S. Bruce Malkowicz, MD; Delray Schultz, PhD; Kenneth Blank, MD; Gregory A. Broderick, MD; John E. Tomaszewski, MD; Andrew A. Renshaw, MD; Irving Kaplan, MD; Clair J. Beard, MD; Alan Wein, MD. Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. The Journal of the American Medical Association. 1998;280(11):969-74.
36. Oliveira Reis ADS, Wagner Eduardo Matheus, Fernandes Denardi, Rafael Mamprim Stopiglia, Maurício Moreira da Silva, Ubirajara Ferreira. Cáncer de próstata: práctica clínica basada en la evidencia. Mi SciELO. 2009;33(4).
37. Charles E Massie AL, Antonio Ramos-Montoya, Joan Boren, Rory Stark, Ladan Fazli,, Anne Warren HS, Basetti Madhu, Naomi Sharma, Helene Bon, Vinny Zecchini,

DonnaMichelle, Smith GD, Nik Matthews, Michelle Osborne, James Hadfield, Stewart, MacArthur BA, Scott Lyons, Kevin M Brindle, John Griffiths, Martin E Gleave, Paul S, Rennie DEN, Ian G Mills. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *The EMBO Journal*. *The EMBO Journal*;30(13):2719-33.

38. Petra Haag JB, Georg Bartsch, Helmut Klocker, Iris E. Eder. Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2005;96(3-4):251-8.

39. Denis LJ GK. Endocrine treatment in prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2004;92(4):287-95.

40. Forman JD OS, Zinreich ES, Lee DJ, Wharam MD. Carcinoma of the prostate in the elderly: the therapeutic ratio of definitive radiotherapy. *J Urol* 1986;136(6):1238-41.

41. Dres. Miguel López CS. Programa de Actualización Continua y a Distancia en Urología. Sociedad Argentina de Urologia [Internet]. 2002:[10 p.].

42. Scardino PT. The Gordon Wilson Lecture Natural History and Treatment of Early Stage Prostate Cancer. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2000;121:201-41.

43. Aruna V. Sarma PD, Jhon T. Wei Benign Prostatic Hyperplasia and Lower Urinary Tract Symptoms *The New England Journal of Medicine*. 2012(367):248-57. Epub July 25, 2012.

44. Maya R. Rodríguez-López IBB-C, Senia Bermúdez-Velásquez. Patologías benignas de la próstata: prostatitis e hiperplasia benigna. *Revista Biomedica*. 2007;18:47-59.

45. Berry SJ CD, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *The American Journal of Pathology*. 1984;132(3):474-9.

46. Jing Yang RAW. Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*. 2008;14(6):818-29.

47. Settleman ASyJ. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010;29(34):4741-51.

48. Sendurai A. Mani WG, Mai-Jing Liao⁹, Elinor Ng. Eaton, Ayyakkannu Ayyanan, Alicia Y. Zhou, Mary Brooks, Ferenc Reinhard, Cheng Cheng Zhang, Michail Shipitsin, Lauren L. Campbell, Kornelia Polyak, Cathrin Brisken, Jing Yang, Robert A. Weinber. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. 2008;133:704-15.

49. Sleeman JPTaJP. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Molecular Cell Biology*. 2006;7:131-42.
50. Dejuan Konga ZW, Sarah H. Sarkara, Yiwei Lia, Sanjeev Banerjeea, Allen Saliganana, Hyeong-Reh Choi Kima, Michael L. Chera,b, and Fazlul H. Sarkara. Platelet-Derived Growth Factor-D Overexpression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition of PC3 Prostate Cancer Cells. *Stem Cells*. 2008;26(6):1425-35.
51. Thiery JP. Epithelial–Mesenchymal Transitions in Tumour Progression. Nature Publishing Group. 2002;2:442-54.
52. Jean Paul Thiery HA, Ruby Y.J. Huang and M. Angela Nieto. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
53. Pooja G. Talati LG, Elyse M. Ellsworth, Melanie A. Gironde, Marco Trerotola, David T. Hoang,* Benjamin Leiby,, Dagvadorj A. Jak2-Stat5a/b Signaling Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem-Like Cell Properties in Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology*. 2015;185(9):2505-22 Epub september 2015.
54. Damla Büyüktunçer SA, Kürflat Özdilli. E-cadherin molecular mechanism in prostate cancer. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2003;2:57-64.
55. M.Carlson B. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 4ta ed. Barcelona, España Elsevier; 2009. 541 p.
56. Keith L. Moore TVNP. *Embriología clínica*. 8va ed. Barcelona, España Elsevier España; 2008.
57. Honor Hugo MLA, Tony Blick , Mitchell G. Lawrence ,Judith A. clements , Elizabeth D. Williams , Erick W. Thompson. Epithelial–Mesenchymal and Mesenchymal–Epithelial Transitions in Carcinoma Progression. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):374–83.
58. Xin Ye RAW. Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends in Cell Biology*. 2015;XX(x).
59. Eduard Batlle ES, Clara Francí, David Domínguez, Mercè Monfar, Josep Baulida. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*. 2000;2:84-9.
60. Rustgi PSMaAK. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biology & Therapy* 2010;10(3):219-22.
61. Pasquier NA-K, Haya Al Thani,Arash Rafii. Epithelial to Mesenchymal Transition in a Clinical Perspective. *Journal of Oncology*. 2015:10. Epub 14 january.

62. Xia Liu FY, Lin Shi, Zhe-Hai Li, Nian-Rong Luo, Yong-Feng Jia¹. Roles of Signaling Pathways in the Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16 (15):6201-6
63. Dejuan Kong YL, Zhiwei Wang and Fazlul H. Sarkar. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers*. 2011;3(1):716-29.
64. Sahai M. *Cancer Biology & Therapy*. 2002;2:133-42.
65. Savagner† MWKaP. Epithelial-Mesenchymal Transition A Cancer Researcher's Conceptual Friend and Foe. *The American Journal of Pathology*. 2009;174(5):1588-93.
66. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(23):7003-11. Epub 2007/12/07.
67. Suresh P.K. NL. Role of Cadherin Switching in EMT and Prostate Cancer Metastasis-A topic *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;6(3).
68. Yogesh Chand Rajwar NJ, Gouri Bhatia, Neha Sikka, Balram Garg, Esha Walia. Expression and Significance of Cadherins and Its Subtypes in Development and Progression of Oral Cancers: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2015;9(5):5-7.
69. Harvey Lodish AB, Paul Matsudaira, Chis A. Kaiser, Matthew P. Scott, S.Lawrence Zipursky, James Darnell. *Biología Celular y Molecular*. 5ta ed. Buenos Aires.Argentina: Médica Panamericana; 2005. 973 p.
70. JLee SD, Raghu Kalluri, and Erik W. Thompson. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*. 2006;172(7):973–81.
71. Iddil H. Bekirov VN, Alexandra Svoronos, George W. Huntley, and Deanna L.Benson. Cadherin-8 and N-cadherin Differentially Regulate Pre- and Postsynaptic Development of the Hippocampal Mossy Fiber Pathway. *Hippocampus*. 2008;18(4):349-63.
72. Borghia MS, Olga G. Shcherbakovac, William I. Weisd, Beth L. Pruittb, W. James Nelsona, and Alexander R. Duncnc. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell–cell contacts upon externally applied stretch. *PNAS*. 2012;109(31):12568-73.
73. Steinberg RAFaMS. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biology* 2004;48:397-409.

74. Hwajin Son AM. Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion. *Toxicol Res.* 2010; 26(4):245-52. Epub November 14.
75. Deep G, Gangar SC, Agarwal C, Agarwal R. Role of E-cadherin in antimigratory and antiinvasive efficacy of silibinin in prostate cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4(8):1222-32. Epub 2011/05/07.
76. Christofori UCaG. Cell Adhesion and Signalling by Cadherins and Ig-CAMS in Cancer Nature Publishing Group. 2004;4:118-32.
77. Bae KM, Parker NN, Dai Y, Vieweg J, Siemann DW. E-cadherin plasticity in prostate cancer stem cell invasion. *Am J Cancer Res.* 2011;1(1):71-84. Epub 2011/10/05.
78. ZhiGang Zhao JG, YaNan Sun , LinLi Tian , JianGuang Lu , Ming Liu , YaShuang Zhao. Is E-cadherin immunoeexpression a prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)? A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology.* 2012;48:761-7. Epub 27 March
79. Raunak Basua MRT, Megan E Williamsa. The classic cadherins in synaptic specificity. *Cell Adhesion & Migration.* 2015;9(3):193-201.
80. Xiaoju Zhang GL, Yi Kang, Zhaogang Dong, Qiyu Qian1, Xitao Ma. N-Cadherin Expression Is Associated with Acquisition of EMT Phenotype and with Enhanced Invasion in Erlotinib- Resistant Lung Cancer Cell Lines. *Plos One.* 2013;8(3):57692.
81. Liu GL, Yang HJ, Liu T, Lin YZ. Expression and significance of E-cadherin, N-cadherin, transforming growth factor-beta1 and Twist in prostate cancer. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(1):76-82. Epub 2014/01/15.
82. Ke Li XW, Wei He, Na Lin and Qing-Xia Fan. Expression of N-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma and silencing expression of N-cadherin using RNA interference on invasiveness of EC9706 cells. *Chinese Journal of Cancer* 2009;28(1):8-13.
83. Wheelock MJ SY, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *The journal of cell sciences* 2008;121:727-35.
84. Liu EALaC-J. The role of ADAMTSs in arthritis. *Protein Cell.* 2015;1(1):33-47.
85. Courtneidge DFSaSA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *GENES & DEVELOPMENT.* 2014;17:7-30.
86. Nyren-Erickson JMJ, D. K. Srivastava, and Sanku Mallik. A Disintegrin and Metalloproteinase-12 (ADAM12): Function, Roles in Disease Progression, and Clinical Implications. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(10):4445-55.

87. L Peduto VR, A Sehara-Fujisawa, DR Shaffer, HI Scher and CP Blobel. ADAM12 is highly expressed in carcinoma-associated stroma and is required for mouse prostate tumor progression. *Oncogene* 2006;25:5462-6.
88. Okada S MaY. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci J.* 2007;98(5):621-8.
89. Rocks N, Estrella C, Paulissen G, Quesada-Calvo F, Gilles C, Gueders MM, et al. The metalloproteinase ADAM-12 regulates bronchial epithelial cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif.* 2008;41(6):988-1001. Epub 2008/12/02.
90. Shao S, Li Z, Gao W, Yu G, Liu D, Pan F. ADAM-12 as a diagnostic marker for the proliferation, migration and invasion in patients with small cell lung cancer. *Plos One.* 2014;9(1):e85936. Epub 2014/01/28.
91. M. Aghababaei SP, K. Irvine, A.G. Beristain. A disintegrin and metalloproteinase 12 (ADAM12) localizes to invasive trophoblast, promotes cell invasion and directs column outgrowth in early placental development. *Molecular Human Reproduction.* 2014;20(3):235-49.
92. Jianlu Wei BR, Tanghong Jia, Chuanju Liu. ADAMTS-12: A Multifaced Metalloproteinase in Arthritis and Inflammation. *Mediators of Inflammation.* 2014;2014(649718):12.
93. Nyren-Erickson MB, Mihir Raval, Jessica Totzauer, SM, Neville Alberto. Urinary concentrations of ADAM 12 from breast cancer patients pre- and post-surgery vs. cancer-free controls: a clinical study for biomarker validation *Journal of Negative Results in BioMedicine* 2014;13(5):8. Epub 1 April.
94. Fröhlich CN, Reidar Albrechtsen. ADAM12 Produced by Tumor Cells Rather than Stromal Cells Accelerates Breast Tumor Progression. *Mol Cancer Research* 2011;9:1449-61.
95. Shuhong Shao ZL, Wei Gao, Guohua Yu, Dexiang Liu, Fang Pan. ADAM-12 as a Diagnostic Marker for the Proliferation, Migration and Invasion in Patients with Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE.* 2014;9(1):85936.
96. Bilgin Dogru E DY, Akşit E, Ural F, Yasasever V. EMMPRIN y ADAM12 en la próstata cáncer: resultados preliminares de un estudio prospectivo. *Tumor Biol.* 2014;35(11):11647-53.
97. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: theory and practice.* 3a ed. London 1998. Thomas Boenisch RHS, Marc Key, A.J. Farnilo, Rosannw Welcher, Richard Harvey, Karen Atwood. *Métodos Inmunohistoquímicos de Coloración.* 3 era ed. Caracas, Venezuela: Dako corporation; 2002. 66 p.

99. Gheldof GB. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2013;116:317–36.
100. Malcolm D. Mason a GDb, Wen G. Jiang. Cell adhesion molecules and adhesion abnormalities in prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002;41(1):11–28.
101. Lara Derycke ODW, Veronique Stove, Barbara Vanhoecke, Joris Delanghe, Herman Depypere and Marc Bracke. Soluble N-cadherin in human biological fluids. *Int J Cancer*. 2006;119(12):2895-900.
102. Marvin T. Nieman RSP, Keith R. Johnson, and Margaret J. Wheelock. N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of their E-Cadherin Expression. *The Journal of Cell Biology*. 1999;147(3):631-43.
103. Fonseca-Alves CE, Rodrigues MM, de Moura VM, Rogatto SR, Laufer-Amorim R. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. *Microsc Res Tech*. 2013;76(12):1250-6. Epub 2013/09/14.
104. Steven M. DeLuca JG, Eric Cochran, Eileen Simak, Jennifer Blitz, Michele Mattiacci-Paessler, Karen Knudsen, Mindy George-Weinstein. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Promotes a Switch from E- to N-Cadherin in Chick Embryo Epiblast Cells. *Experimental Cell Research*. 1999;251:3-15.
105. Alison G. Barber MC-M, Dennis M. Bonal, Angela J. Jia, Benjamin A. Rybicki, Angela M. Christiano, Carlos Cordon-Cardo. PI3K/AKT pathway regulates E-cadherin and Desmoglein 2 in aggressive prostate cancer. *Cancer Medicine*.4(8):1258-71.
106. Mark A. Rubin Nrm, Jay Figurski, Alice Fecko, Kenneth J. Pienta, Mark I. Day. E-Cadherin Expression in Prostate Cancer: A Broad Survey Using High-Density Tissue Microarray Technology. *HUM PATHOL*. 2001;32:690-7.
107. Rainy Umbas JAS, Tilly W. Aalders, Bob S. Carter, Herbert F. M. Karthaus, H. Ewout Schaafsma, Frans M. J. Debruyne, William B. Isaacs. Expression of the Cellular Adhesion Molecule E-Cadherin Is Reduced or Absent in High-Grade Prostate Cancer. *CANCER RESEARCH* 1992;52:5104-9.
108. Yogesh Chand Rajwar NJ, Gouri Bhatia, Neha Sikk , Balram Garg, Es ha Walia. Expression and Significance of Cadherins and Its Subtypes in Development and Progression of Oral Cancers: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015;9(5):ZE05-ZE7
109. Thiery JP. Epithelial–Mesenchymal Transitions In Tumour Progression. *Nature*. 2002;2:442-54.

110. Jing Yang SAM, Joana Liu Donaher, Sridhar Ramaswamy, Raphael A. Itzykson, Christophe Come, Pierre Savagner, Andrea Richardson. Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell*. 2004;117:927-39.
111. Michael D Slater CL, Angus Gidley-Baird, Julian A Barden. Markers for the development of early prostate cancer. *Journal of Pathology*. 2003;199:368-77.
112. Angelo M. de Marzo Bk, Kirk Chan-Tack, and Jonathan I. Epstein. E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. *Urology* 1999;53:707-13.
113. Christer Busch Tah, Christoph Wagener, Bjo" Rn O" Brink. Down-Regulation of CEACAM1 in Human Prostate Cancer: Correlation With Loss of Cell Polarity, Increased Proliferation Rate, and Gleason Grade 3 to 4 Transition. Elsevier Science. 2002:290-8.
114. Campbell M. Grant NK. Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Translational Andrology and Urology*. 2013;2(3):203-11.
115. Jaggi M, Johansson SL, Baker JJ, Smith LM, Galich A, Balaji KC. Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer. *Urol Oncol*. 2005;23(6):402-6. Epub 2005/11/23.
116. Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, et al. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res*. 1992;52(18):5104-9. Epub 1992/09/15.
117. Eduard Batlle ES, Clara Francí, David Domínguez, Mercè Monfar, Josep Baulida, Antonio García de Herreros. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *NATURE CELL BIOLOGY*. 2000;2:84-96.
118. Victoria Bolós HP, Mirna A. Pérez-Moreno, Mario F. Fraga, Manel Esteller, Amparo Cano. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of Cell Science* 2003;116:499-511.
119. Osisami M, Keller ET. SPDEF: a molecular switch for E-cadherin expression that promotes prostate cancer metastasis. *Asian J Androl*. 2013;15(5):584-5. Epub 2013/05/28.
120. Yvonne L Chao CRS, Alan Wells. RBerseeachst carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular Cancer* 2010;9:179.
121. Eduardo F. Fariasa KP, Boris Leibovitcha, Janice Murtagha, Manuel Boix Chornetb, Tino Schenkb, Arthur Zelentb, and Samuel Waxmana,. Interference with Sin3

function induces epigenetic reprogramming and differentiation in breast cancer cells. PNAS. 2010;107 (26):11811–6.

122. Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, Bussemakers MJ, et al. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* 2000;60(13):3650-4. Epub 2000/07/26.

123. Philip L. Leopolda JV, Hongjun Wanga. A comparison of epithelial-to-mesenchymal transition and re-epithelialization. *Seminars in Cancer Biology* 2012;22:471-83.

124. Ramsey A. Foty Mss. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biol.* 2004;48:397-409.

125. Jaggi M, Nazemi T, Abrahams NA, Baker JJ, Galich A, Smith LM, et al. N-cadherin switching occurs in high Gleason grade prostate cancer. *Prostate.* 2006;66(2):193-9. Epub 2005/09/21.

126. Bhaskar V.S. Kallakury CES, BS, Jeffrey S. Ross. Co-Downregulation of Cell Adhesion Proteins - and -Catenins, p120CTN, E-Cadherin, and CD44 in Prostatic Adenocarcinomas. *HUM PATHOL* 2001;32:849-55.

127. Peralta Soler GDH, Karen A. Knudsen, Francis X. McBrearty, Edina Grujic, Hernando Salazar, Aaron C. Han, Albert A. Keshgegian. Expression of P-Cadherin Identifies Prostate- Specific-Antigen-Negative Cells in Epithelial Tissues of Male Sexual Accessory Organs and in Prostatic Carcinomas Implications. *American Journal of Pathology.* 1997;151(2):471-8.

128. Nhan L. Tran RBN, Anne E. Cress,† and Ronald L. Heimark. N-Cadherin Expression in Human Prostate Carcinoma Cell Lines. *American Journal of Pathology.* 1999;155(3):787-98.

129. Hanan Mohamed Abd ElMoneim INMZ. Expression of e-cadherin, n-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. . *CLINICAL SCIENCE.* 2011;66(10):176-17715.

130. Jae-Beom Kim SI, Young J. Kim, Ryan S. Prudoff, Kristin M. Sass, Margaret J. Wheelock, Keith R. Johnson. N-Cadherin Extracellular Repeat 4 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transition and Increased Motility. *The Journal of Cell Biology.* 2000;151(6):1193-205.

131. Sanae Nakajima RD, Eiji Toyoda, Shoichiro Tsuji, Michihiko Wada, Masayuki Koizumi, Sidhartha S. Tulachan, Daisuke Ito, Kazuhiro Kami, Tomohiko Mori, Yoshiya Kawaguchi, Koji Fujimoto, Ryo Hosotani, Masayuki Imamura. N-Cadherin Expression

and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2004;10:4125-33.

132. Tarin D. The Fallacy of Epithelial Mesenchymal Transition in Neoplasia. *Cancer Res*. 2005;65:5996-6001.

133. James Hulit KS, Su Chung, Rinat Keren, Georgia Agiostratidou, Weisong Shan, Xinyuan Dong, Terence M. Williams, Michael P. Lisanti, Karen Knudsen, Rachel B. Hazan. N-Cadherin Signaling Potentiates Mammary Tumor Metastasis via Enhanced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Cancer Res*. 2007;67(7):3106-16.

134. Grégoire F. Le Bras KJT, Claudia D. Andl. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adhesion & Migration* 2012;6(4):365-73.

135. NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, Heimark RL. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res*. 2006;66(7):3365-9. Epub 2006/04/06.

136. Stamey Mc, John E. Mcneal, Rosalie Nolley, Marci Hemenez, Joshua Downs. the prostate specific antigen era in the united states is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? . *The journal of urology*. 2004;172:1297-301.

137. Roy R, Wewer UM, Zurakowski D, Pories SE, Moses MA. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. *J Biol Chem*. 2004;279(49):51323-30. Epub 2004/09/24.

138. Nyren-Erickson EK, Bouton M, Raval M, Totzauer J, Mallik S, Alberto N. Urinary concentrations of ADAM 12 from breast cancer patients pre- and post-surgery vs. cancer-free controls: a clinical study for biomarker validation. *J Negat Results Biomed*. 2014;13:5. Epub 2014/04/03.

139. Shuhong Shao ZL, Wei Gao, Guohua Yu, Dexiang Liu, Fang Pan. ADAM-12 as a Diagnostic Marker for the Proliferation, Migration and Invasion in Patients with Small Cell Lung Cancer. *Plos One*. 2014;9(1):e85936.

140. Roopali Roy JY, and Marsha A. Moses. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5287-97.

141. Nelson Gianni de Lima DdFGS, Ernani Luis Rhodenl. Importance of prostate-specific antigen (PSA) as a predictive factor for concordance between the Gleason scores of prostate biopsies and RADICAL prostatectomy specimens. *CLINICS*. 2013;68(6):820-4. Epub February 19.

142. Nalla AK, Estes N, Patel J, Rao JS. N-cadherin mediates angiogenesis by regulating monocyte chemoattractant protein-1 expression via PI3K/Akt signaling in prostate cancer cells. *Exp Cell Res.* 2011;317(17):2512-21. Epub 2011/08/23.

ANEXOS

ANEXO A

Acta de aprobación comité Ético-Científico de la Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso (8 de agosto 2007 y 26 de febrero 2015)



ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA N°24
BE015-2014

El Comité Institucional de Bioética de la Investigación con Seres Humanos de la Universidad de Valparaíso entre el 24 y 28 de Enero de 2015 somete a revisión virtual de todos sus miembros, la carta de respuesta con fecha 23 de Enero, a las observaciones previas del Comité por parte de la investigadora, **Eva Madrid Aris**, adscrita a la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso por el proyecto denominado **“MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS ASOCIADAS A AGRESIVIDAD Y SUPERVIVENCIA EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA”**

- I. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los siguientes antecedentes:
 - a. Protocolo de Investigación
 - b. Formulario de Consentimiento Informado participantes (original 2007)
 - c. Acta aprobación Comité ética Facultad de Medicina 2007 al proyecto original
 - d. Invitación a incorporar estudio en grupo internacional
 - e. Carta respuesta de la investigadora a observaciones del Comité del 18 de diciembre 2014

- II. En la valoración bioética del proyecto, se consideraron los siguientes aspectos vinculados con:
 - a. Valor de la investigación: El estudio aporta al conocimiento científico.
 - b. Validez científica: Antecedentes del problema de Investigación suficientes. Respuesta a sugerencias del Comité son satisfactorias
 - c. Balance Riesgos y Beneficios: No aplica, ya que trabaja con muestras y datos.
 - d. Selección Justa de sujetos: No aplica, ya que trabaja con muestras y datos.
 - e. Consentimiento Informado: Se revisa el CI que fue aprobado por Comité de ética de la Facultad de Medicina UV el 2007: en ese momento las personas sometidas a biopsia prostática en la CONAC firmaron un CI para dicho procedimiento, que incluía la autorización para utilizar tejidos para investigación (sin precisar tipo de estudio ni delimitar temporalidad). En ese contexto consideramos que se cumplió con las

exigencias éticas vigentes al 2007, a pesar de no ser un CI específico para la presente investigación.

Nota: Se sugiere modificar el CI a los casos que se recluten prospectivamente, ajustándolos a la normativa actual. Asimismo, en el CI revisado los pacientes autorizaron la utilización de la biopsia prostática por punción y eso fue lo que autorizó el Comité de Ética de Facultad de Medicina el 2007, por lo que la investigación debiese limitarse a este material, al menos en los casos reclutados hasta ahora.

- f. Respeto por los sujetos: Se cumple
- g. Conflicto de Interés: No existen conflictos de interés.

III. Ante la inexistencia de aspectos inadecuados desde el punto de vista metodológico y bioético, revisados de acuerdo a los postulados de la Declaración de Helsinki, las Pautas Éticas para la Investigación Biomédica en Seres Humanos vigentes (CIOMS, 2002) y Guía de Buenas Prácticas Clínicas, se **APRUEBA**, por un plazo de un año, el protocolo de investigación identificado en esta acta, con las salvedades incorporadas en punto e.

IV. Firma el acta en representación del Comité



M. Liliana Contreras Alarcón
Presidenta

Valparaíso, 26 de Febrero de 2015

ANEXO B

Batería de Deshidratación, Aclaramiento e Impregnación de Biopsias fijadas en Fijadores acuosos (Formalina, Paraformaldehido, etc).

1) Deshidratación:

- Alcohol 50% 30 minutos
- Alcohol 70% 30 minutos
- Alcohol 80% 30 minutos
- Alcohol 95% I 30 minutos
- Alcohol 95% II 30 minutos
- Alcohol 100% I 30 minutos
- Alcohol 100% II 30 minutos
- Alcohol 100% III 30 minutos

2) Aclaramiento:

- Xilol I 15 minutos
- Xilol II 15 minutos
- Xilol III 15 minutos

3) Impregnación:

- Parafina I 30 minutos
- Parafina II 30 minutos
- Parafina III 30 minutos

4) Inclusión en Parafina Leica EG 1110

ANEXO C

Protocolo Hematoxilina Eosina (técnica de rutina)

1) Desparafinación:

- Xilol I 10 minutos
- Xilol II 10 minutos
- Xilol III 10 minutos

2) Hidratación:

- Alcohol 100% I 5 minutos
- Alcohol 100% II 5 minutos
- Alcohol 100% III 5 minutos
- Alcohol 95% I 5 minutos
- Alcohol 95% II 5 minutos
- Alcohol 70% 5 minutos
- Agua destilada 5 minutos

3) Coloración :

- Hematoxilina de Harris 30 segundos
- Viraje agua corriente 10 minutos
- Alcohol 95% 5 minutos
- Eosina Alcohólica 4 segundos

4) Deshidratación:

- Alcohol 100% I 5 minutos
- Alcohol 100% II 5 minutos
- Alcohol/ Xilol 5 minutos

5) Aclaramiento:

- Xilol I 5 minutos
- Xilol II 5 minutos
- Xilol III 5 minutos

Montaje: Medio hidrofóbico

ANEXO D

Protocolo de Inmunohistoquímica Anti-E-Cadherina

Anticuerpo: anti-E-Cadherina (H-108) Santa Cruz sc-7870
Origen: Anticuerpo policlonal de conejo

1) Desparafinación:

- Xilol I (10 minutos)
- Xilol II (10 minutos)
- Xilol III (10 minutos)

2) Rehidratación:

- Alcohol 100% I (10 minutos)
- Alcohol 100% II (10 minutos)
- Alcohol 95% (10 minutos)
- Alcohol 70% (10 minutos)

3) Lavado en agua destilada durante 10 minutos.

4) **Recuperación antigénica** con buffer citrato PH 6.0 (vaporera), durante 15 minutos.

5) 3 cambios en PBS (0,1M), 5 minutos cada uno.

6) **Bloqueo de peroxidasa endógena** con H₂O₂ (30%) al 3% en PBS (0,1M). Utilizar agitador orbital a 25°C, durante 30 minutos.

7) 3 cambios en PBS, 5 minutos cada uno.

8) Bloqueo de sitios inespecíficos:

- Aplicar **Cas – block** durante 30 minutos a 25°C.
- Incubación con **suero normal (cabra)** durante 30 minutos a 25°C.

9) Incubación del anticuerpo primario:

- Anti – E-Cadherina **diluido 1:500** en PBS/Tween 20 durante la noche a 4°C.

10) 3 cambios en PBS, 5 minutos cada uno.

11) Incubación del anticuerpo secundario:

- Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, **diluido 1:500** en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.

12) 3 cambios en PBS, 5 minutos cada uno.

13) Revelado cromogénico con NovaRed – Kit, durante 2:30 minutos

Agua destilada	1	2	3	H ₂ O ₂
2,5 mL	75 µL	50 µL	50 µL	50 µL

14) Lavar en agua destilada durante 5 minutos.

15) Contraste nuclear:

- Teñir brevemente con Hematoxilina de Harris (dipping)
- Virar Hematoxilina en agua corriente durante 5 minutos.

16) Deshidratación:

- Alcohol 95% (dipping)
- Alcohol 100% I (dipping)
- Alcohol 100% II (dipping)
- Alcohol/Xilol (dipping)

17) Aclaramiento:

- Xilol I (5 minutos)
- Xilol II (5 minutos)

18) Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO E

Protocolo inmunohistoquímica anti-N-Cadherina

Anticuerpo: anti-N-Cadherina (K-20) Santa Cruz sc-31030
Origen: Anticuerpo policlonal de cabra

1) Desparafinación:

- Xilol I (10 minutos)
- Xilol II (10 minutos)
- Xilol III (10 minutos)

2) Rehidratación:

- Alcohol 100% I (10 minutos)
- Alcohol 100% II (10 minutos)
- Alcohol 95% (10 minutos)
- Alcohol 70% (10 minutos)

3) Lavado en agua destilada durante 10 minutos.

4) **Recuperación antigénica** con buffer citrato PH 6.0 (vaporera), durante 15 minutos.

5) 3 cambios en PBS (0,1M), 5 minutos cada uno.

6) **Bloqueo de peroxidasa endógena** con H₂O₂ (30%) al 3% en PBS (0,1M). Utilizar agitador orbital a 25°C, durante 30 minutos.

7) 3 cambios en PBS (0,1M), 5 minutos cada uno.

8) Bloqueo de sitios inespecíficos:

- Aplicar **Cas – block** durante 30 minutos a 25°C.
- Incubación con **suero normal (conejo)** durante 30 minutos a 25°C.

9) Incubación del anticuerpo primario:

- Anti – N-Cadherina **diluido 1:50** en PBS/Tween 20 durante la noche a 4°C.

10) 3 cambios en PBS (0,1M), 5 min cada uno.

11) Incubación del anticuerpo secundario:

- Anti-IgG de cabra, hecho en conejo, conjugado con HRP, **diluido 1:50** en PBS (0,1M), durante 1 hora a temperatura ambiente.

12) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

13) Revelado cromogénico con NovaRed – Kit, durante 3 minutos

Agua destilada	1	2	3	H ₂ O ₂
2,5 mL	75 µL	50 µL	50 L	51 L

14) Lavar en agua destilada durante 5 min.

15) Contraste nuclear:

- Teñir brevemente con Hematoxilina de Harris (dipping)
- Virar Hematoxilina en agua corriente durante 5 minutos.

16) Deshidratación:

- Alcohol 95% (dipping)
- Alcohol 100% I (dipping)
- Alcohol 100% II (dipping)
- Alcohol/Xilol (dipping)

17) Aclaramiento:

- Xilol I (5 minutos)
- Xilol II (5 minutos)

18) Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO F

Protocolo inmunohistoquímica anti-ADAM 12

Anticuerpo: anti-ADAM 12 (H-210) Santa Cruz sc-25579
Origen: Anticuerpo policlonal de conejo

2) Desparafinación:

- Xilol I (10 minutos)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

3) Rehidratación:

- Alcohol 100% I (10 minutos)
- Alcohol 100% II (10 minutos)
- Alcohol 95% (10 minutos)
- Alcohol 70% (10 minutos)

4) Lavado en agua destilada durante 10 minutos.

5) **Recuperación antigénica** con buffer citrato PH 6.0 (Vaporera), durante 15 minutos.

6) 3 cambios en PBS (0,1 M), 5 minutos cada uno.

7) **Bloqueo de peroxidasa endógena** con H₂O₂ (30%) al 3% en PBS (0,1 M). Utilizar agitador orbital a 25°C, durante 30 minutos.

8) 3 cambios en PBS (0,1M), 5 minutos cada uno.

9) Bloqueo de sitios inespecíficos:

- Aplicar **Cas – block** durante 30 minutos a 25°C.
- Incubación con **suero normal (cabra)** durante 30 minutos a 25°C.

10) Incubación del anticuerpo primario:

- Anti – ADAM12 **diluido 1:50** en PBS/Tween 20 durante la noche a 4° C.
-

11) 3 cambios en PBS (0,1M), 5 minutos cada uno.

12) Incubación del anticuerpo secundario:

- Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, **diluido 1:500** en PBS (0,1M), durante 1 hora a 25°C.

13) 3 cambios en PBS (0,1m), 5 minutos cada uno.

14) Revelado cromogénico con NovaRed – Kit, durante 2 minutos.

Agua destilada	1	2	3	H ₂ O ₂
2,5 mL	75 µL	50 µL	50 µL	50 µL

15) Lavar en agua destilada durante 5 minutos.

16) Contraste nuclear:

- Teñir brevemente con Hematoxilina de Harris (dipping).
- Virar Hematoxilina en agua corriente durante 5 minutos.

17) Deshidratación:

- Alcohol 95% (dipping)
- Alcohol 100% I (dipping)
- Alcohol 100% II (dipping)
- Alcohol/Xilol (dipping)

18) Aclaramiento:

- Xilol I (5 minutos)
- Xilol II (5 minutos)

19) Cubrir con medio de montaje hidrófobo.