



Universitat de Girona

GLICOSILACIÓ ABERRANT EN PROTEÏNES DE SECRECIÓ COM A MARCADORS TUMORALS

Glòria TABARÉS CARRERAS

ISBN: 84-688-6472-2

Dipòsit legal: Gi.394-2004

<http://hdl.handle.net/10803/7613>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA

***GLICOSILACIÓ ABERRANT EN
PROTEÏNES DE SECRECIÓ COM A
MARCADORS TUMORALS***

GLÒRIA TABARÉS CARRERAS

Girona, Desembre de 2003



Universitat de Girona

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA

GLICOSILACIÓ ABERRANT EN PROTEÏNES DE SECRECIÓ COM A MARCADORS TUMORALS

Memòria presentada per a l'obtenció del grau de Doctor.

Dins del Programa de Doctorat de Biotecnologia de l'Institut de Tecnologia
Agroalimentària, del Campus Agroalimentari de Girona, de l'Institut d'Ecologia
Aquàtica, del Departament de Biologia i del Departament EQATA, de la
Universitat de Girona.

GLÒRIA TABARÉS CARRERAS

Girona, Desembre de 2003

Els Drs. ROSA PERACAUULA MIRÓ i RAFAEL de LLORENS DURAN de l'Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular del Departament de Biologia de la Universitat de Girona

CERTIFIQUEN que:

El treball presentat en la memòria titulada 'Glicosilació aberrant en proteïnes de secreció com a marcadors tumorals' s'ha portat a terme al Laboratori ICS Girona de l'Hospital Universitari Dr. J. Trueta i a l'Àrea de Bioquímica i Biologia Molecular del Departament de Biologia de la Universitat de Girona.

El treball presentat en la memòria titulada 'Glicosilació aberrant en proteïnes de secreció com a marcadors tumorals' ha estat realitzat per Na Glòria Tabarés Carreras sota la seva direcció.

Dra. Rosa Peracaula Miró

Dr. Rafael de Llorens Duran

Girona, Desembre de 2003

Paciència f. Qualitat, virtut,
de qui sap suportar els mals amb
fortitud, sense plànyer-se'n;
virtut cristiana oposada a la ira.

| Qualitat de qui suporta amb
calma l'espera d'una cosa que
tarda, la durada d'un treball.

Diccionari de la Llengua Catalana
Institut d'Estudis Catalans

Girona, finals de Novembre de 2003

Benvolguts amics,

Com us podria agrair, després de tots aquests anys, tot el que heu fet per mi. Tota l'ajuda, el suport, la paciència, les rialles, els cafès,....tantes coses!

Sé'm fa molt difícil dir-ho només amb la paraula GRÀCIES (tot i posar-la en majúscules) i també em costa explicar-ho sense que sembli una carta trista. Així doncs, amb molta il·lusió començaré la llarga llista de gent que està inclosa en aquest enorme GRÀCIES:

Com ja deveu suposar, hi ha una colla de persones a qui he d'agrar especialment haver arribat a omplir totes aquestes pàgines, per començar, en David i la meva família, per la seva immensa paciència.

També a en Rafa i la Rosa per compartir amb mi els seus coneixements i haver-me guiat en aquest camí de la Ciència. Sense oblidar els bons moments gaudits amb el grup: En Rafa, la Rosa, la Marta, la Goretti, la Sílvia, la Laura i la Pilar. Què dir del suport mutu en els problemes amb les cèl·lules, els westerns i les bidis!

També m'agradaria donar les gràcies a la gent del Laboratori ICS Girona, especialment a la Núria i en Manel pel seus consells i la seva inestimable ajuda en la recollida dels sèrums. També dins de l'Hospital m'agradaria agrair la seva col·laboració en els diagnòstics al Dr. Bernadó, a la Dra. Fort i al Dr. Comet. Un gràcies especial a la Fundació, a Roche i a les persones que han fet possible que econòmicament pogués arribar fins aquí.

No m'agradaria oblidar-me de ningú, però, per sort, durant aquests anys he conegut moltíssimes persones, aquí i fora d'aquí. Per exemple, a Penzberg, he d'agrar fervorosament l'ajuda i el suport que em dona el Dr Hösel des d'allà i que em va donar quan jo vaig ser-hi, com també les bones estones amb els companys del laboratori, tot i l'esforç que havien de fer perquè jo no els entenia en alemany!

I aquí....aquí hi ha tanta gent a qui donar les gràcies, que no sé per on continuar....potser pels coffee-girls, no? M'han ajudat tant! Què dir de la Goretti, la Sílvia, la Laura, la Pilar, la Noemí, la Marta, la Noe, la Marga, la Gis, en Lluís, l'Anna J., en Xevi, en Pep, la Montse, l'Elena, la Judit, l'Anna P.,Segur que em deixo algú (cosa terrible, ho sé), però sé que li fareu extensives les gràcies gegants que us dono a tots.

I no oblidó a la 'penyita' de Blanes, pels divertits caps de setmana entre farmes i butis!

Ja acabo, només dir-vos altre cop GRÀCIES i fins ben aviat,

Gloria

**A la meva família
A en David**

I. ESQUEMA DE TESI DOCTORAL

GLICOSILACIÓ ABERRANT EN PROTEÏNES DE SECRECIÓ COM A MARCADORS TUMORALS

Abreviatures

Nomenclatura específica per anticossos

II. RESUM

III. INTRODUCCIÓ GENERAL

III.1. GLICOSILACIÓ

III.1.1. Glicosilació i càncer

III.2. Marcadors Tumoral

III.2.1. Definició i característiques

III.2.2. Exemples que existeixen i per a quina càncers i pq no funcionen

IV. OBJECTIUS

El desenvolupament d'un mètode diagnòstic específic i sensible per a detectar el càncer de pròstata i de pàncreas basat en l'estudi de les glicoproteïnes específiques secretades per aquests teixits. Especialment centrant-se en la diferent glicosilació que poden presentar aquestes proteïnes en situació normal i tumoral.

- Determinar les diferències en la glicosilació que presenta el PSA en situació normal i tumoral i utilitzar-ho com a possible marcador del càncer de pròstata.
- Determinar les diferències en la glicosilació que presenta l'RNase1 en situació normal i tumoral i utilitzar-ho com a possible marcador del càncer de pàncreas.

IV.1. capítol i: RNase

IV.1.1. Introducció (+objectius)

IV.1.1.1. Càncer de pàncreas

IV.1.1.2. Característiques proteiques i de sucres

- IV.1.1.3. Característiques de funció i situació*
- IV.1.1.4. Característiques de marcador tumoral*

IV.1.2. Material i mètodes

- IV.1.2.1. Material bàsic*
- IV.1.2.2. Purificació d'RNase1 de medi de cultiu de cèl·lules de càncer de pàncreas*
 - Cultiu cel·lular
 - Heparina
 - MonoS
 - Vydac
- IV.1.2.3. Caracterització de la proteïna al llarg de la purificació*
 - PAGE-SDS : tinció amb nitrat de plata
 - Western-blot
 - ELISA de quantificació
- IV.1.2.4. Caracterització glucídica de la glicoproteïna purificada*
 - ELISA directe de detecció per anticossos de l'RNase1
- IV.1.2.5. Caracterització glucídica les glicoproteïnes no purificades*
 - ELISA sandvitx per a la detecció d'RNase1 (de medis)
- IV.1.2.6. Anàlisi estadística, si cal, per corbes ROC.*

IV.1.3. Resultats i discussió (+conclusions)

IV.2. Capítol ii: PSA

IV.2.1. Introducció (+objectius)

- IV.2.1.1. Característiques proteiques i de sucres*
- IV.2.1.2. Característiques de funció i situació*
- IV.2.1.3. Característiques de marcador tumoral*

IV.2.2. Material i mètodes

- IV.2.2.1. Purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules de càncer de pròstata LNCaP*
 - Cultiu cel·lular
 - Cibacron-Blue
 - Gel-filtració P60
 - Fase reversa vydac C4
- IV.2.2.2. Purificació de PSA de sèrum de malalt de càncer de pròstata*
 - Tioflica
- IV.2.2.3. Caracterització de la proteïna al llarg de la purificació*
 - PAGE-SDS : tinció amb nitrat de plata
 - Western-blot
 - ELISA de quantificació
- IV.2.2.4. Caracterització glucídica de la glicoproteïna purificada*
 - ELISA directe de detecció per lectines del PSA
- IV.2.2.5. Caracterització glucídica les glicoproteïnes no purificades*
 - Immunoadsorció indirecta per a detecció per Western blot de PSA
 - Immunoadsorció indirecta per a detecció per ELISA de PSA
 - Marcatge dels anticossos
 - Trencament de la unió PSA-ACT
 - ELISA sandvitx inversa amb lectines per a detectar PSA
 - Electroforesi bidimensional per a detecció de PSA
 - Tractament amb neuraminidasa
 - GISA per a detecció de PSA

IV.2.3. Resultats i discussió (+conclusions)

V. DISCUSSIÓ GENERAL

- Purificació de PSA de medi de cèl·lules LNCaP i caracterització glucídica
- Resultats de glicosilació del PSA purificat de medi LNCaP i de plasma seminal.
- Resultats de glicosilació de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP i de plasma seminal sa.
- Resultats de glicosilació de sèrums de pacients control i de pacients de càncer de pròstata i d'hiperplàsia benigna de pròstata.
- Purificació d'RNase1 de medi de cèl·lules de càncer de pàncreas i caracterització glucídica.
- Resultats de glicosilació de l'RNase1 purificada i no purificada de medis de cultiu (comparar-ho amb resultats de glicosilació de RNase1 purificada de pàncreas (Sílvia)) i amb els resultats d'utilitzar la proteïna coma a marcador i no la glicosilació.
- **Discussió general** comparant les diferents tècniques de caracterització glucídica utilitzades i els resultats obtinguts en situació normal i tumoral i en sèrums i si pot utilitzar-se per al diagnòstic.

VI. CONCLUSIONS

VII. REFERÈNCIES

Agraïments

Annex d'articles

ABREVIATURES

I	Longitud d'ona	hK1	Kalitreïna humana 1 o pancreatorenal
AAA	Lectina d' <i>Aleuria aurantia</i>	hK2	Kalitreïna humana 2 o glandular
AAT	α 1-antitripsina	IATI	Inhibidor d'inter- α -tripsina
ACT	α 1-antiquimiotripsina	IdA	Àcid idurònic
AMG	α 2-macroglobulina	IGF-1	Factor de creixement similar a insulina
Ang	Angiogenina o RNasa 5	LEL	Lectina de <i>Lycopersicon esculentum</i>
ANOVA	Anàlisi de variàncies	Le ^y	Antigen glucídic Lewis ^y
AP	Fosfatasa alcalina	mA	Mil-liampers
AR	Receptor d'andrògens	MAA	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	Man	Manosa
Bi	Biotina	NANI	Sialidasa de <i>Streptococcus pneumoniae</i>
BMS	Suplement de medi basal	neo	Neoplàsia
BSA	Albúmina sèrica bovina	NeuAc, Sia	Àcid siàlic o àcid N-acetil neuramínic
CEA	Antigen carcinoembrionari	N-terminal	Aminoterminal
col.	Col-laboradors	PAGE	Gel d'electroforesi de poliàcrilamida
ConA	Lectina Concanavalina A	PAP	Fosfatasa àcida prostàtica
CPN	Sialidasa de <i>Clostridium perfringens</i>	PCa	Càncer de pròstata
DEAE	Dietilaminoetil	PCI	Inhibidor de proteïna C
DHT	Dihidrotestosterona	PEG	Poliètilenglicol
Dig	Digoxigenina	pl	Punt isoelèctric
DMEM	Medi de cultiu mínim d'Eagle modificat per Dulbecco	PIN	Neoplàsia intraepitelial
DRE	Tacte rectal digital	PNGasa F	N-glicosidasa F
DSL	Lectina de <i>Datura stramonium</i>	POA	Antigen oncofetal pancreàtic
DTT	Ditiotreitòl	POD	Peroxidasa
ECL	Lectina d' <i>Erythrina cristagalli</i>	poliC	Àcid policitidílic
ECP	Proteïna catiònica d'eosinòfil	poliU	Àcid poliuridílic
EDN	Neurotoxina derivada d'eosinòfil	proPSA	Forma proenzimàtica del PSA
EGF	Factor de creixement epidèrmic	PSA, hK3	Antigen prostàtic específic o kalitreïna humana 3
ELISA	Assaig d'immunoabsorció lligat a enzim	PSMA	Antigen prostàtic específic de membrana
FAP	Proteïna fetoacinar pancreàtica	RIA	Radioimmunoassaig
FBS	Sèrum fetal boví	RMN	Ressonància magnètica nuclear
FL	Fluoresceïna	RNasa	Ribonucleasa
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>	RPMI-1640	Medi de cultiu mínim per cèl·lules de mamífers
Fuc	Fucosa	SA	Estreptavidina
Gal	Galactosa	SA-POD	Estreptavidina unida a peroxidasa
GalNAc	N-acetilgalactosamina	SDS	Dodecilsulfat sòdic
GISA	Assaig d'immunoabsorció associat a activitat sialiltransferasa	sLe ^a	Antigen glucídic sialil-Lewis ^a

Glc	Glucosa	sLe^x	Antigen glucídic sialil-Lewis ^x
GlcA	Àcid glucorònic	SNA	Lectina de <i>Sambucus nigra</i>
GlcNAc	N-acetilglucosamina	ST	Sialiltransferasa
GnRH	Hormona alliberadora de gonadotropines	STL	Lectina de <i>Solanum tuberosum</i>
GPI	Glicofosfolípid	T	Testosterona
H2	Antigen glucídic H2	Xyl	Xilosa

NOMENCLATURA D'ANTICOSSOS

AcM<Dig>R-1.71.256-IgG-Bi	Anticòs monoclonal de ratolí contra digoxigenina, marcat amb biotina
AcM<Htipus2>R-Ole19	Anticòs monoclonal de ratolí contra l'antigen glucídic Htipus2
AcM<Le ^y >R	Anticòs monoclonal de ratolí contra l'antigen glucídic Le ^y
AcM<PSA>R-M30-Fab-Bi	Part Fab de l'anticòs monoclonal de ratolí contra PSA lliure, marcat amb biotina
AcM<PSA>R-M30-Fab-Dig	Part Fab de l'anticòs monoclonal de ratolí contra PSA lliure, marcat amb digoxigenina
AcM<PSA>R-M30-Fab-Dig-Bi	Part Fab de l'anticòs monoclonal de ratolí contra PSA lliure, marcat amb digoxigenina i biotina
AcM<PSA>R-M36-Fab-Bi	Part Fab de l'anticòs monoclonal de ratolí contra PSA total, marcat amb biotina
AcM<PSA>R-M36-Fab-Dig	Part Fab de l'anticòs monoclonal de ratolí contra PSA total, marcat amb digoxigenina
AcM<PSA>R-M36-Fab-Dig-Bi	Part Fab de l'anticòs monoclonal de ratolí contra PSA total, marcat amb digoxigenina i biotina
AcM<PSA>R-M66-POD	Anticòs monoclonal de ratolí contra PSA, marcat amb peroxidasa
AcM<sLe ^a >R	Anticòs monoclonal de ratolí contra l'antigen glucídic sLe ^a
AcM<sLe ^x >R-CSLEX1	Anticòs monoclonal de ratolí contra l'antigen glucídic sLe ^x
AcP<Dig>Ov-Fab-POD	Part Fab de l'anticòs policlonal d'ovella contra digoxigenina, marcada amb peroxidasa
AcP<FL>Ov-Fab-POD	Part Fab de l'anticòs policlonal d'ovella contra fluoresceïna, marcada amb peroxidasa
AcP<IgGconill>Ca-POD	Anticòs policlonal de cabra contra IgG de conill, marcat amb l'enzim peroxidasa
AcP<IgGratolí>Ca-POD	Anticòs policlonal de cabra contra IgG de ratolí, marcat amb peroxidasa
AcP<IgYgallina>A-POD	Anticòs policlonal d'ase contra IgY de gallina, marcat amb peroxidasa
AcP<PSA>C	Anticòs policlonal de conill contra PSA
AcP<RNasa1>C	Anticòs policlonal de conill contra RNasa1
AcP<RNasa1>G	Anticòs policlonal de gallina contra RNasa1

ÍNDEX

ÍNDIX	1
RESUMS	7
1. RESUM.....	9
2. RESUMEN.....	11
3. SUMMARY.....	13
INTRODUCCIÓ GENERAL	15
1. GLICOSILACIÓ	17
1.1. Els glicoconjugats.....	17
1.2. Els monosa càrids.....	19
1.3. Biosíntesi de N-glicans.....	21
1.3.1. Classificació i diversitat dels N-glicans.....	23
1.4. Molècules que reconeixen sucres: les lectines.....	24
2. EL CÀNCER	25
2.1. Incidència del càncer.....	27
2.2. Els marcadors tumorals.....	29
3. GLICOSILACIÓ ABERRANT EN CÀNCER.....	31
OBJECTIUS	37
CAPÍTOL I: LA RIBONUCLEASA PANCREÀTICA HUMANA (RNasa 1)	43
1. INTRODUCCIÓ.....	45
1.1. El càncer de pàncreas.....	45
1.2. Marcadors tumorals de l'adenocarcinoma pancreàtic.....	49
1.3. Les ribonucleases.....	50
1.3.1. Característiques generals.....	50
2. OBJECTIUS.....	61
3. MATERIAL I MÈTODES.....	63
3.1. Material bàsic.....	63
3.2. Producció i purificació d'anticossos policlonals de gallina contra la RNasa 1	64
3.3. ELISA sandvitx de quantificació de RNasa 1.....	67
3.4. Obtenció i tractament de les mostres de sèrum humà.....	68
3.5. Caracterització glucídica de la RNasa 1.....	69
3.5.1. ELISA sandvitx per a detecció de glicosilació de la RNasa 1	69
3.6. Caracterització glucídica de la superfície cel·lular.....	70
3.6.1. ELISA sobre cèl·lules fixades.....	70
3.7. Purificació de RNasa 1 de medi de cultiu de cèl·lules de càncer de pàncreas humà.....	71
3.7.1. Cultiu de cèl·lules i acumulació de medi.....	71
3.7.2. Concentració del medi de cultiu.....	72
3.7.3. Cromatografia d'afinitat a Heparina.....	73
3.7.4. Cromatografia d'intercanvi catiònic.....	74
3.7.5. Cromatografia de fase reversa.....	74

3.8. Caracterització i quantificació de la RNasa 1 durant la purificació.....	75
3.8.1. Gel d'electroforesi de detecció d'activitat ribonucleolítica: zimograma.....	75
3.8.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants amb SDS: tinció amb nitrat de plata	76
3.9. Determinació de la quantitat de proteïna total.....	77
3.9.1. Mètode de Bradford.....	77
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	79
4.1. Determinació de la concentració de RNasa 1 en sèrum.....	79
4.1.1. Producció i purificació d'anticossos policlonals de gallina contra la Ribonucleasa 1.....	79
4.1.2. Detecció de RNasa 1 en sèrum per ELISA sandvitx.....	80
4.2. Caracterització glucídica de la RNasa 1.....	85
4.2.1. Anàlisi de la glicosilació de la RNasa 1.....	86
4.3. Anàlisi de la glicosilació de la superfície cel·lular.....	89
4.4. Purificació de RNasa 1 de medis de cultiu d'adenocarci-noma pancreàtic.....	91

CAPÍTOL II: L'ANTIGEN PROSTÀTIC ESPECÍFIC (PSA)101

1. INTRODUCCIÓ.....	103
1.1. La glàndula prostàtica.....	103
1.2. Anomalies prostàtiques.....	104
1.2.1. La hiperplàsia benigna de pròstata (BPH).....	104
1.2.2. La neoplàsia prostàtica intraepitelial (PIN).....	105
1.2.3. El càncer de pròstata.....	107
1.3. L'antigen prostàtic específic (PSA).....	113
1.3.1. Característiques generals.....	114
1.3.2. El PSA com a glicoproteïna.....	121
1.3.3. L'antigen prostàtic específic com a marcador tumoral.....	124
1.3.4. Aproximacions per a la millora de la utilització del PSA com a marcador tumoral.....	126
1.3.5. Altres molècules com a marcadors del càncer de pròstata.....	128
2. OBJECTIUS.....	133
3. MATERIAL I MÈTODES.....	135
3.1. Material bàsic.....	135
3.2. Caracterització glucídica del PSA.....	135
3.2.1. Immunoabsorció indirecta seguida de detecció per transferència tipus western.....	135
3.2.2. Transferència tipus Western.....	136
3.2.3. Immunoabsorció indirecta de doble marcatge seguida de detecció per ELISA.....	138
3.2.4. Trencament del complex PSA-ACT.....	140
3.2.5. ELISA inversa de captura per lectines de PSA immunoprecipitat.....	141
3.2.6. ELISA directe amb detecció per lectines.....	142
3.2.7. Assaig immunològic associat a l'activitat sialiltransferasa (GISA).....	143
3.3. Caracterització glucídica de la superfície cel·lular.....	144
3.3.1. Per ELISA de cèl·lules fixades.....	144
3.4. Determinació i quantificació del PSA durant la purificació.....	145
3.4.1. ELISA sandvitx de detecció de PSA:.....	145
3.4.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants amb SDS: tinció amb nitrat de plata.....	146
3.5. Purificació del PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic.....	146
3.5.1. Cultiu de cèl·lules LNCaP i acumulació de medi:.....	146
3.5.2. Cromatografia d'afinitat amb cibacron-blue:.....	147

3.5.3. Cromatografia de gel-filtració P60:.....	149
3.5.4. Cromatografia de fase reversa per a HPLC:.....	149
3.6. Obtenció i tractament de les mostres de sèrum humà.....	150
3.7. Purificació de PSA de sèrum humà.....	151
3.7.1. Cromatografia d'adsorció tiofíllica.....	151
3.7.2. Cromatografia d'afinitat amb cibacron-blue.....	152
3.7.3. Cromatografia d'afinitat amb proteïna A.....	152
3.7.4. Cromatografia d'afinitat amb heparina.....	153
3.7.5. Immunoadsorció indirecta.....	154
3.7.6. Detecció en gel de poliacrilamida tenyit amb blau de Coomassie.....	154
3.7.7. Electroforesi bidimensional amb detecció immunològica.....	155
3.7.8. Digestió glicolítica del PSA.....	156
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	159
4.1. Purificació i caracterització glucídica del PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic.....	159
4.1.1. Condicions de cultiu.....	160
4.1.2. Purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP.....	162
4.1.3. Caracterització del PSA purificat per seqüenciació N-terminal.....	167
4.1.4. Caracterització glucídica del PSA purificat, comparada amb el PSA purificat de plasma seminal.....	168
4.2. Desenvolupament de mètodes per a la caracterització glucídica del PSA de fluids biològics, sense purificació prèvia.....	173
4.2.1. Caracterització glucídica del PSA amb mètodes immunològics.....	173
4.2.2. Caracterització glucídica del PSA per activitat sialiltransferasa.....	181
4.3. Electroforesi bidimensional amb detecció per transferència tipus western.....	188
4.4. Purificació i caracterització glucídica del PSA de sèrum d'un pacient de càncer de pròstata.....	197
4.4.1. Purificació de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica.....	198
4.4.2. Caracterització glucídica del PSA purificat de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica.....	208
4.5. Anàlisi de la glicosilació de la superfície cel·lular.....	210
DISCUSSIÓ GENERAL.....	217
CONCLUSIONS.....	229
BIBLIOGRAFIA.....	235

RESUMS

1. RESUM

Als països desenvolupats, una de cada cinc persones morirà a causa del càncer. S'ha descrit que les cèl·lules canceroses presenten modificacions en els glicans presents a la superfície cel·lular i aquesta glicosilació anòmala podria reflectir-se en les glicoproteïnes de secreció. Per aquest motiu es planteja l'estudi de la glicosilació de dues proteïnes de secreció en situació normal i tumoral: la ribonucleasa pancreàtica humana (RNasa 1) i l'antigen prostàtic específic (PSA).

La RNasa 1 és una glicoproteïna secretada majoritàriament pel pàncreas. S'ha desenvolupat un mètode immunològic per a detectar els nivells de RNasa 1 en sèrum. Malgrat la millora de la sensibilitat, respecte d'estudis anteriors, no s'han observat diferències significatives entre la concentració de RNasa 1 en sèrum de pacients control sans, afectats de neoplàsia pancreàtica, de pancreatitis o d'altres patologies.

L'estudi de les estructures glucídiques de la RNasa 1, mitjançant assaigs immunològics, permet observar diferències importants en la glicosilació entre la situació normal i tumoral: Els antígens sialilats sLe^x i sLe^a només apareixen en la RNasa 1 de medi de cultiu de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 i MDAPanc-3 i l'antigen fucosilat Le^y només apareix en la RNasa 1 de pàncreas de donant.

S'ha purificat la RNasa 1 secretada per la línia MDAPanc-3, cosa que ha permès seqüenciar-ne les estructures glucídiques i comparar-les amb les de la RNasa 1 purificada del medi de les cèl·lules Capan-1 i de pàncreas de donant, corroborant els resultats abans esmentats.

L'antigen prostàtic específic (PSA) és una glicoproteïna secretada principalment per la pròstata. Els seus nivells sèrics s'utilitzen actualment com a marcador del càncer de pròstata, però la seva especificitat no permet diferenciar clarament una situació benigna d'una maligna.

La purificació i caracterització glucídica del PSA secretat per les cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP mostren diferències molt clares amb la glicosilació que presenta el PSA purificat de plasma seminal de donant.

Principalment, el PSA present en situació tumoral, purificat de les cèl·lules de carcinoma prostàtic, no conté àcid siàlic, però presenta nivells més alts de fucosilació que el PSA en situació normal. El PSA purificat de plasma seminal de donant sí que conté àcid siàlic. Aquests resultats s'han obtingut mitjançant assaigs immunològics amb detecció per lectines i s'han corroborat per seqüenciació glucídica.

D'acord amb les estructures glucídiques que millor dferencien el PSA de situació normal i tumoral, s'ha portat a terme la caracterització glucídica de mostres biològiques que contenen PSA. S'han desenvolupat diferents assaigs immunològics de detecció per lectines o associats a l'activitat sialiltransferasa, amb un enriquiment previ en PSA per immunoabsorció indirecta o cromatografia per interacció tiofílica.

Els resultats dels diferents assaigs permeten concloure que el PSA del sèrum de pacients de neoplàsia prostàtica presenten un contingut en àcid siàlic similar al del plasma seminal de donant, encara que són lleugerament menys sialilats. Aquests resultats s'adiuen amb els determinats sobre mostres de PSA purificat.

La separació del PSA per electroforesi bidimensional mostra diverses formes amb pl àcid en el PSA de plasma seminal, explicades per la presència d'àcid siàlic. Es detecten formes de pl més bàsic que el teòric per al PSA en el secretat per les cèl·lules LNCaP, que correspon a formes pPSA. Al sèrum de pacients de neoplàsia prostàtica s'hi observen formes sialilades.

Les proteïnes de secreció, RNasa 1 i PSA, es troben alterades a nivell glucídic en situació tumoral, cosa que podria ser d'utilitat per a finalitats diagnòstiques.

2. RESUMEN

En los países desarrollados una de cada cinco personas morirá a causa del cáncer. Las células cancerosas presentan modificaciones en los glicanos presentes en la superficie celular y esta glicosilación anómala podría reflejarse en las glicoproteínas de secreción. Por este motivo se plantea el estudio de la glicosilación de dos proteínas de secreción en situación normal y tumoral: la ribonucleasa pancreática humana (RNasa 1) y el antígeno prostático específico (PSA).

La RNasa 1 es una glicoproteína secretada mayoritariamente por el páncreas. A pesar del establecimiento de un método inmunológico más sensible, respecto de los descritos anteriormente, para la detección de los niveles séricos de esta glicoproteína, no se han observado diferencias significativas entre la concentración de RNasa 1 en sueros de pacientes control sanos, afectados de neoplasia pancreática, de pancreatitis o de otras patologías.

El estudio de las estructuras glucídicas de la RNasa 1, mediante ensayos inmunológicos, permite observar diferencias importantes en la glicosilación entre la situación normal y tumoral: Los antígenos sialilados sLe^x y sLe^a solamente aparecen en la RNasa 1 de medio de cultivo de células de adenocarcinoma pancreático Capan-1 y MDAPanc-3 y el antígeno fucosilado Le^y sólo en RNasa 1 de páncreas de donante.

Se ha purificado la RNasa 1 secretada por la línea MDAPanc-3, lo que ha permitido secuenciar sus estructuras glucídicas y compararlas con las de la RNasa 1 purificada del medio de las células Capan-1 y de páncreas de donante, corroborando los resultados antes mencionados.

El PSA es una glicoproteína secretada principalmente por la próstata. Sus niveles séricos se utilizan actualmente como marcador del cáncer de próstata, pero su especificidad no permite diferenciar claramente una situación benigna de una maligna.

La purificación y caracterización glucídica del PSA secretado por las células de carcinoma prostático LNCaP muestran diferencias muy claras con la glicosilación que presenta el PSA purificado de plasma seminal.

Principalmente, el PSA presente en situación tumoral, purificado del medio de cultivo de células de carcinoma prostático, no contiene ácido siálico, pero presenta niveles más altos de fucosilación que el PSA en situación normal. El PSA purificado de plasma seminal de donante sí presenta ácido siálico. Estos resultados se han obtenido mediante ensayos inmunológicos con detección por lectinas y se han corroborado por secuenciación glucídica.

De acuerdo con las estructuras glucídicas que mejor diferencian el PSA de situación normal y tumoral, se ha llevado a cabo la caracterización glucídica de muestras biológicas que contienen PSA. Se han desarrollado diversos ensayos inmunológicos de detección por lectinas o asociados a actividad sialiltransferasa, con un enriquecimiento previo en PSA por inmunoadsorción indirecta o cromatografía por interacción tiofílica.

Los resultados de los diferentes ensayos concluyen que el PSA del suero de pacientes de neoplasia prostática presenta un contenido en ácido siálico similar al del plasma seminal de donante, aunque se encuentran ligeramente menos sialilados. Estos resultados concuerdan con los determinados sobre muestras de PSA purificado.

La separación del PSA por electroforesis bidimensional muestra varias formas de pI ácido en el PSA de plasma seminal, explicadas por la presencia de ácido siálico. Se observan formas de pI más básico que el teórico para el PSA, secretado por las células LNCaP, que corresponde a formas pPSA. En el suero de pacientes de neoplasia prostática se encuentran formas sialiladas.

Las proteínas de secreción, RNasa 1 y PSA, se encuentran alteradas a nivel glucídico en situación tumoral, cosa que podría ser de utilidad para fines diagnósticos.

3. SUMMARY

Roughly one person in five, in the developed countries of the world, will die of cancer. Cancer cells show modified glycans in their plasma membranes and this anomalous glycosylation could be reflected in secreted proteins. For this reason, the main objective is to study the glycosylation of two secreted proteins in normal and tumour situation: human pancreatic ribonuclease 1 (RNase 1) and prostate specific antigen (PSA).

Human pancreatic ribonuclease 1 (RNase 1) is a glycoprotein mainly secreted by the pancreas. An immunological method has been developed to detect the RNase 1 levels in serum. But, there are no significant differences observed in RNase 1 serum concentration in healthy control patients and patients affected of pancreatic cancer, pancreatitis and other pathologies.

To study the glycan structures of RNase 1, different immunoassays have been used. Important differences have been observed in the glycosylation between RNase 1 from healthy pancreas and from cell culture medium of pancreatic adenocarcinoma cell lines, Capan-1 and MDAPanc-3. The sialylated antigens sLe^x and sLe^a appear only in tumour RNase 1 and the fucosylated Le^y only in normal situation.

RNase 1 has been purified from MDAPanc-3 cell culture media. This has allowed its glycans sequencing, and the confirmation of the glycan differences, in comparison with RNase 1 purified from Capan-1 cell medium and healthy pancreas.

Prostate specific antigen (PSA) is a glycoprotein secreted mainly by the prostate. PSA serum levels are used at present as a marker for prostate cancer, but its specificity does not allow the differentiation between benign and malign situations.

Purification and characterization of PSA glycans secreted by the prostate carcinoma cell line LNCaP show clear differences with the glycosylation of PSA purified from seminal plasma.

PSA purified from tumour situation, secreted by the prostate carcinoma cell line LNCaP, does not contain sialic acid, but shows higher levels of fucosylation than PSA from normal situation. PSA in seminal plasma from a healthy donor has sialic acid. These results have been obtained developing different immunological assays with lectin detection and glycan sequencing has corroborated them.

Glycan characterization of PSA from different biological fluids, without previous purification, has been done by immunological assays with lectin detection and by determination of sialyltransferase activity.

The results of these different assays conclude that PSA from serum of a prostate cancer patient show a similar sialic acid content than PSA from seminal plasma, but less sialylated. These results agree with those determined with purified PSA samples.

By two-dimensional electrophoresis, seminal plasma PSA shows different spots at acid pI, what could be explained by the presence of sialic acid. PSA from LNCaP cell medium does not show any form at acid pI, but there are different spots at basic pI that correspond to proPSA isoforms. PSA from serum of prostate cancer patients shows sialylated forms.

RNase 1 and PSA are aberrantly glycosylated in tumour situation what could be useful for diagnosis purposes.

INTRODUCCIÓ GENERAL

1. GLICOSILACIÓ

3.1. Els glicoconjugats

Els glicoconjugats són presents a tots els organismes vius, des de bacteris a plantes superiors i animals. Moltes de les molècules naturals amb activitat biològica són glicoconjugats.

Els glicoconjugats són compostos on una o més subunitats monosacàrides o oligosacàrides (el glicó) es troben unides covalentment a una part no carbohidrat (l'aglicó). Els glicoconjugats més comuns trobats en cèl·lules eucariotes es defineixen d'acord amb el tipus d'unió del nucli oligosacàrid (glicà) a l'aglicó (proteïna o lípid); (fig. 1).

La biosíntesi, l'estabilitat, l'acció i la renovació d'aquestes molècules en els organismes vius està influenciada pels glicans que porten units (Varki i col., 1999).

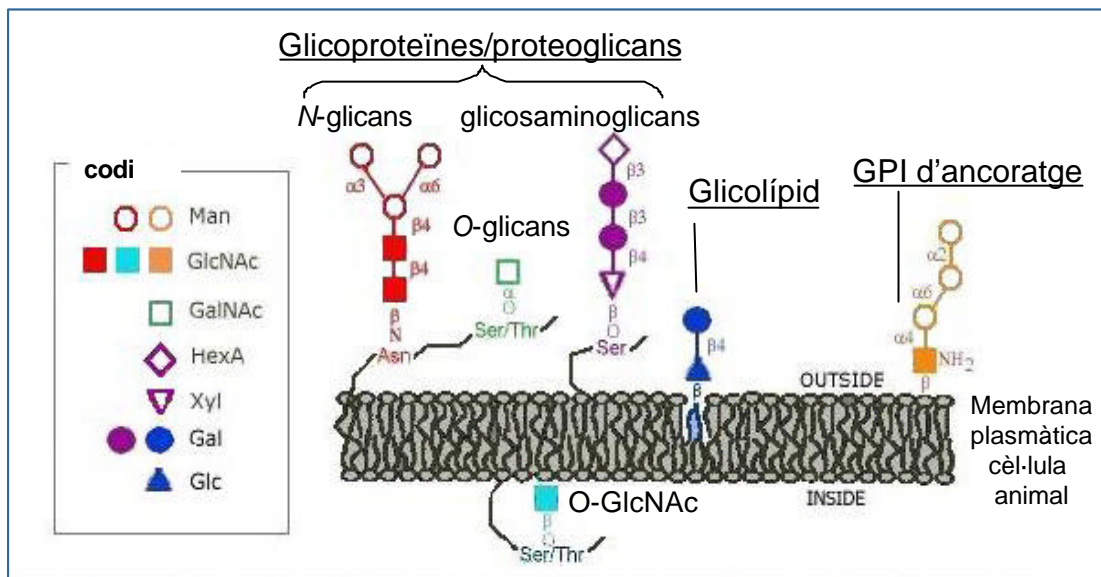


Figura 1: Principals tipus dels glicoconjugats més comuns en animals (GPI: glicofosfolípid). Extret i modificat de Varki i col. (1999).

Els glicoconjugats que es troben als sistemes biològics presenten només alguns tipus de monosacàrids, formant part dels glicans, amb un nombre limitat de combinacions. Tanmateix, aquests monosacàrids poden generar moltes variacions possibles i estructures diferents no sempre lineals, que augmenten molt la complexitat dels glicans. Els nucleòtids o els aminoàcids, en canvi, generen sempre polímers lineals i la complexitat que poden presentar és menor, en aquest sentit.

Una glicoproteïna és un glicoconjugat en el qual la proteïna porta una o més cadenes oligosacàrides unides covalentment a l'estructura polipeptídica, normalment per unions de tipus *N*- o *O*-.

Un *N*-glicà és un oligosacàrid amb unió covalent tipus *N* sobre un residu d'asparagina (Asn) d'una cadena polipeptídica que conté la seqüència peptídica consens: Asn-X-Ser/Thr (on X és qualsevol aminoàcid excepte Pro). Els *N*-glicans comparteixen una regió nucli pentasacàrida i es poden classificar en tres tipus principals: tipus ric en manoses, tipus complex i tipus híbrid (fig. 2).

Un *O*-glicà és un oligosacàrid amb unió tipus *O*-(Ser/Thr). Normalment, està unit al polipèptid via N-acetilgalactosamina (GalNAc), a un residu de serina o treonina i presenta una varietat important de classes de nucli (*core*) diferent.

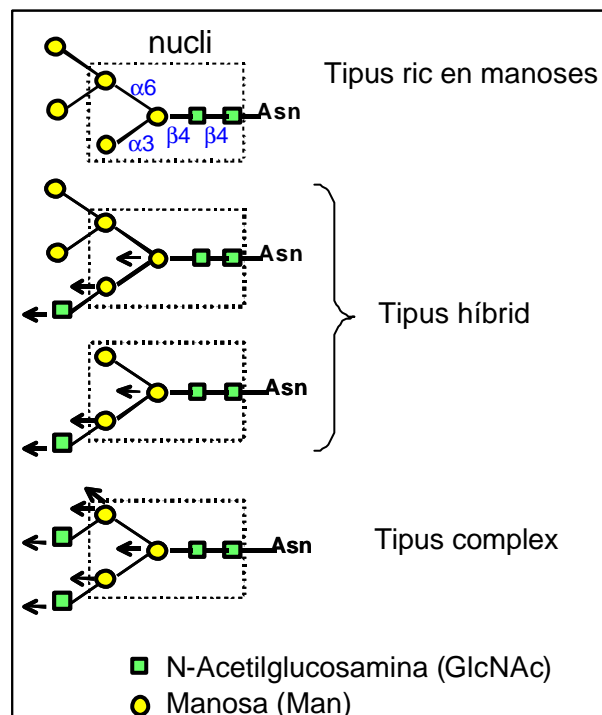


Figura 2: Classificació d'estructures del tipus *N*-glicans a eucariotes. Extret de Fukuda i Kobata (1993).

Un ancoratge del tipus glicofosfolipid és una unió tipus glicà entre un fosfatidilinositol i una fosfoetanolamina unida per un enllaç amida al terminal carboxil d'una proteïna. Aquesta estructura constitueix l'únic ancoratge per a proteïnes a la bicapa lipídica de les membranes cel·lulars (Varki i col., 1999).

Les estructures glucídiques unides a lípids de la membrana cel·lular constitueixen els glicolípids.

La funció biològica dels glicans no està clara, però se n'han suggerit dues de principals: la primera seria una funció estructural i moduladora, i l'altra seria una funció de reconeixement per part d'altres molècules (normalment receptors cel·lulars o lectines). Aquesta segona funció pot donar-se de manera endògena o reconèixer agents exògens, funcionant com a receptors de patògens o toxines.

3.2. Els monosacàrids

Els glicans o carbohidrats es defineixen com a polihidroxialdehids o polihidroxiacetones, o com a compostos més llargs que poden ser hidrolitzats a aquestes subunitats. Un monosacàrid és un carbohidrat que no pot ser hidrolitzat a una unitat més simple.

Els monosacàrids més comuns trobats en els oligosacàrids d'animals superiors són els següents (les corresponents estructures es poden observar a la figura 3):

- Àcids siàlics: Família de sucres àcids de nou carbonis, anomenats genèricament com a Sia. El més comú d'aquesta família és l'àcid N-acetilneuramínic (anomenat Neu5Ac o NeuNAc o NeuAc o NANA).
- Hexoses: Sucres neutres de sis carbonis, que inclouen la glucosa (Glc), la galactosa (Gal) i la manosa (Man).
- Hexosamines: Hexoses amb un grup amino a la posició 2, que poden presentar-se lliures o, més comunament, N-acetilades: N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc).
- Deoxihexoses: Sucres neutres de sis carbonis sense el grup hidroxil a la posició 6, anomenats fucoses (Fuc).
- Pentoses: Sucres de cinc carbonis, xilosa (Xyl).
- Àcids urònics: Hexoses amb un carboxilat carregat negativament a la posició 6, àcid glucorònic (GlcA) i àcid idurònic (IdA).

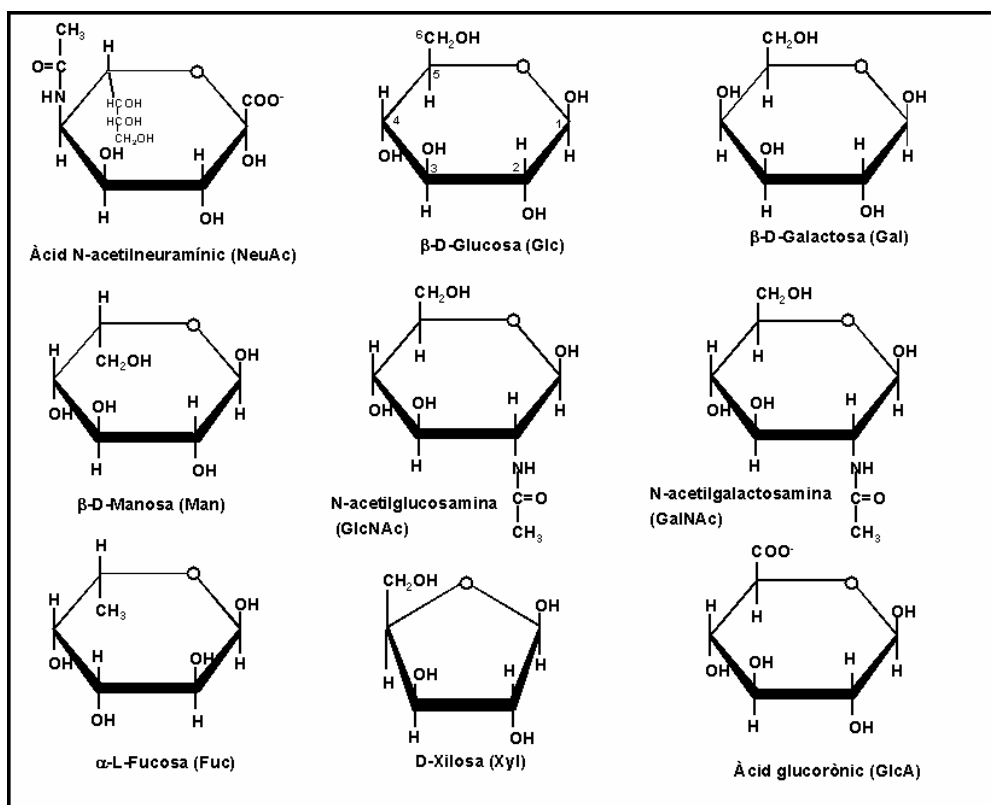


Figura 3: Estructures dels monosacàrids més comuns trobats en animals superiors (projeccions de Haworth). La numeració utilitzada pels carbonis s'indica a l'estructura de la β -D-glucosa.

En plantes, animals inferiors i bacteris apareixen d'altres monosacàrids. També existeix una àmplia varietat de modificacions dels monosacàrids que augmenten la seva diversitat a la natura i serveixen, freqüentment, per a realitzar funcions biològiques determinades. Així, els grups hidroxil de diferents monosacàrids poden presentar fosforilacions, sulfatacions, metilacions, *O*-acetilacions o altres acilacions. Els grups amino presents poden romandre lliures o esdevenir *N*-acetilats o *N*-sulfatats (Varki i col., 1999).

Els monosacàrids poden formar enllaços glicosídics α o β amb qualsevol de les diferents posicions d'un altre monosacàrid en una cadena o amb un altre tipus de molècula. L'enllaç glicosídic implica la unió d'un monosacàrid a un altre, normalment, via el grup hidroxil del centre anomèric. Aquest enllaç pot ser α o β , depenent de la relació espacial entre el grup hidroxil del carboni anomèric i el grup hidroxil del carboni 5. Per a il·lustrar aquest enllaç glicosídic, es mostra a la figura 4 el

disacàrid N-acetilactosamina (LacNAc), format per la unió per enllaç β 1-4 entre Gal i GlcNAc, molt comú en diferents tipus de glicans.

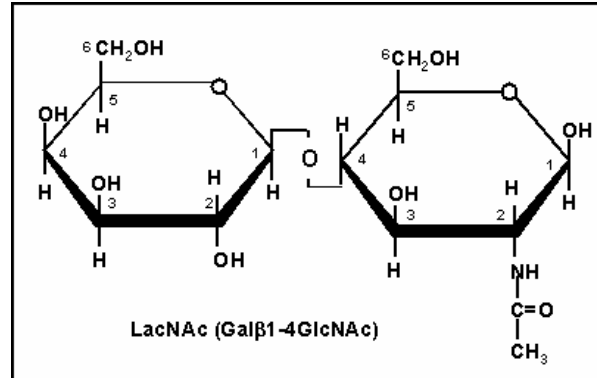


Figura 4: Disacàrid N-acetilactosamina (LacNAc). Unió β 1-4 entre Gal i GlcNAc.

3.3. Biosíntesi de N-glicans

La biosíntesi dels glicoconjugats requereix la conversió dels monosacàrids a sucres activats per la unió de nucleòtids monofosfat o difosfat. Aquests sucres activats transferiran els monosacàrids a diferents acceptors mitjançant glicosiltransferases específiques.

Moltes proteïnes de secreció estan glicosilades, es a dir, són glicoproteïnes. Aquestes són complexos que inclouen proteïnes estructurals, molècules actives biològicament o lligands d'adhesió cel·lular (Brockhausen i col., 1998). El present treball se centrarà en l'estudi dels N-glicans de glicoproteïnes, d'aquí que s'esmenti breument la seva biosíntesi.

Com es pot observar a la figura 5, el primer pas en la síntesi d'N-glicans és la formació d'un precursor oligosacàrid de 14 residus unit a un lípid de membrana en el reticle endoplàsmic rugós (ER). Aquest oligosacàrid es forma sobre un lípid portador, el dolicol (Dol). El primer sucre activat s'uneix al dolicol per un enllaç pirofosfat d'elevada energia. Després s'hi uniran els monosacàrids activats UDP-GlcNAc i GDP-Man per a formar el precursor $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, a la cara citosòlica del reticle endoplàsmic rugós. La síntesi continua a la cara luminal després d'un intercanvi a través de la membrana mitjançant un mecanisme de *flip-flop*. En aquest punt, quatre residus de Man i tres de Glc s'uneixen, formant l'oligosacàrid precursor de 14 residus $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$.

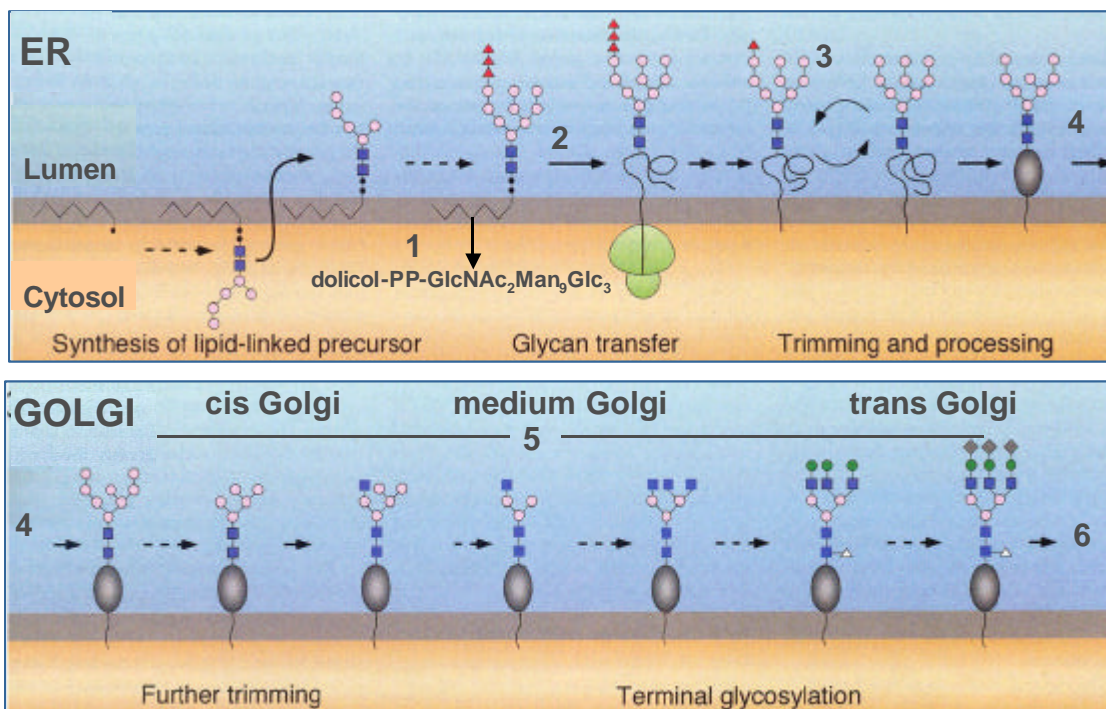


Figura 5: Esquema del procés de síntesi dels N-glicans. [ER: reticle endoplàsmic; () GlcNAc, (●) Man, (?) Glc, (●) Gal, (◆) Sial i (?) Fuc]. Extret de Varki i col. (1999).

A eucariotes, un complex proteic de la membrana del reticle endoplàsmic transfereix el precursor glucídic activat als residus d'asparagina de proteïnes en procés de síntesi. Aquest complex proteic s'anomena oligosacariiltransferasa (OST). S'utilitza l'energia de l'enllaç fosfat per a activar la transferència de l'oligosacàrid precursor a una asparagina consens d'un polipèptid en síntesi al lumen del reticle endoplàsmic rugós (Alberts i col., 2002).

A partir d'aquest punt es porta a terme el processament de les estructures oligosacàrides. Aquest comença al reticle endoplàsmic rugós amb l'alliberament de les glucoses de l'oligosacàrid transferit a la proteïna, per l'acció de dues glucosidases. L'alliberament dels residus de Glc està associat als mecanismes de plegament proteic i contribueix al temps de retenció d'una glicoproteïna al reticle endoplàsmic.

La proteïna es plega i se'n poden modificar les estructures glucídiques per l'acció d'una sèrie de manosidases. La proteïna sintetitzada pot adquirir una estructura oligomanosa, essent del tipus ric en manoses. Pot continuar el seu processament a l'aparell de Golgi, on una sèrie de glicosidases i glicosiltransferases poden anar

modificant les cadenes oligosacàrides fins a obtenir estructures del tipus híbrid o del tipus complex (figs. 2 i 5); (Varki i col., 1999; Opdenakker i col., 1993).

3.3.1. *Classificació i diversitat dels N-glicans*

Les cadenes *N*-glucídiques de tipus híbrid o complex presenten sovint la unió entre Gal i GlcNAc amb enllaços del tipus β 1-3 o β 1-4, que generen estructures de tipus 1 i 2, respectivament. Aquestes estructures són un substrat que accepta múltiples modificacions, que inclouen l'addició de Fuc i NeuAc, donant lloc a antígens tipus Lewis (figura 6). Aquestes estructures estan generades per l'acció de diferents glicosiltransferases específiques responsables de la glicosilació terminal de les cadenes de carbohidrats dels diferents glicoconjugats (Kim i Varki, 1999; Fukuda i Kobata, 1993).

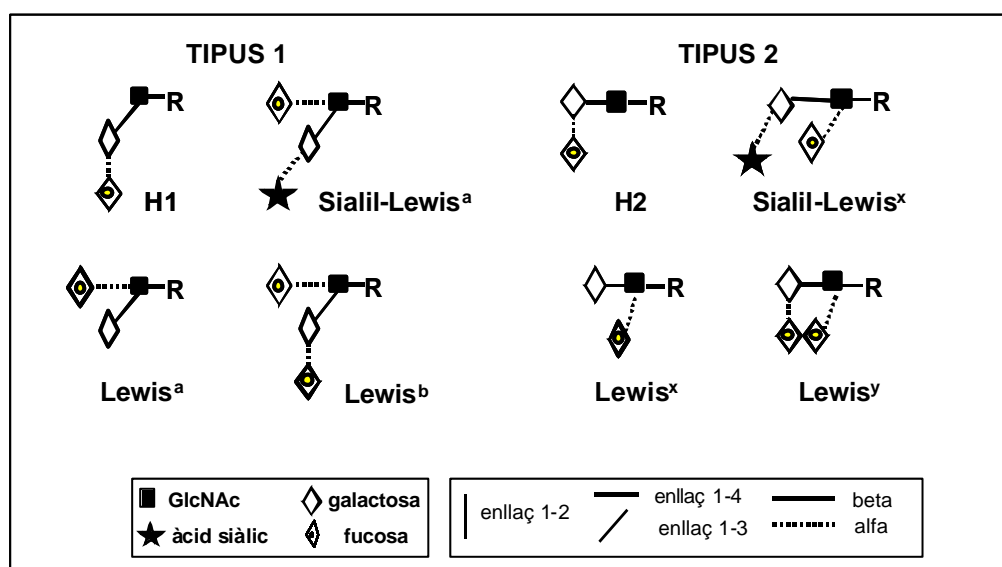


Figura 6: Estructures glucídiques del grup Lewis, tipus 1 i 2.

3.4. Molècules que reconeixen sucres: les lectines

Les lectines són proteïnes o glicoproteïnes que s'uneixen als carbohidrats sense modificar-los. Són presents en animals, plantes i microorganismes.

En el present treball s'utilitzen lectines procedents de plantes, concretament les llistades a la taula 1.

La majoria de plantes contenen una o més proteïnes d'unió a sucres del tipus lectina. Tot i que la funció que hi desenvolupen encara s'estudia, es coneix que moltes són multivalents i són capaces d'aglutinar cèl·lules. Donat que les lectines es diferencien en el tipus d'estructura glucídica que reconeixen amb una determinada afinitat, són útils en la caracterització dels glicoconjugats (Rhodes i Milton, 1993; Fukuda i Kobata, 1993; Kim i Varki, 1999).

Nom	Origen	Especificitat
AAA	<i>Aleuria aurantia</i>	L-Fuc α \pm GlcNAc
DSL	<i>Datura stramonium</i>	Gal β (1-4)GlcNAc β (1-6) Man o Gal β (1-4)GlcNAc β (1-2) Man
ECL	<i>Erythrina cristagelli</i>	Gal β (1-4)GlcNAc o Gal β (1-4)GalNAc
LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3) _n Gal β (1-4)GlcNAc
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	Sia(α 2-3)Gal β (1-4)Glc o Sia(α 2-3)Gal β (1-4)GlcNAc
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Sia(α 2-6)Gal o Sia(α 2-6)GlcNAc o Sia(α 2-6)GalNAc
STL	<i>Solanum tuberosum</i>	GlcNAc

Taula 1: Lectines utilitzades en el present treball. S'hi indica el nom de l'espècie vegetal de la que provenen i les estructures glucídiques que reconeixen. Extret de Rhodes i Milton (1998) i Fukuda i Kobata (1993).

2. EL CÀNCER

El càncer és una malaltia caracteritzada pel creixement excessiu i descontrolat de cèl·lules que envaeixen i malmeten teixits i òrgans, podent provocar la mort de l'individu. És una patologia d'origen clonal perquè està provocada per la propagació d'una sola cèl·lula. Així, un tumor apareix degut a la descoordinació entre els processos de proliferació i diferenciació, que es troben estrictament regulats en situació normal (Cross i Dexter, 1991) (fig. 7).

Les cèl·lules canceroses estan definides per dues propietats d'herència cel·lular: es reproduïxen malgrat les restriccions normals del teixit, i envaeixen i colonitzen zones reservades normalment per a d'altres cèl·lules (Alberts i col., 1994).

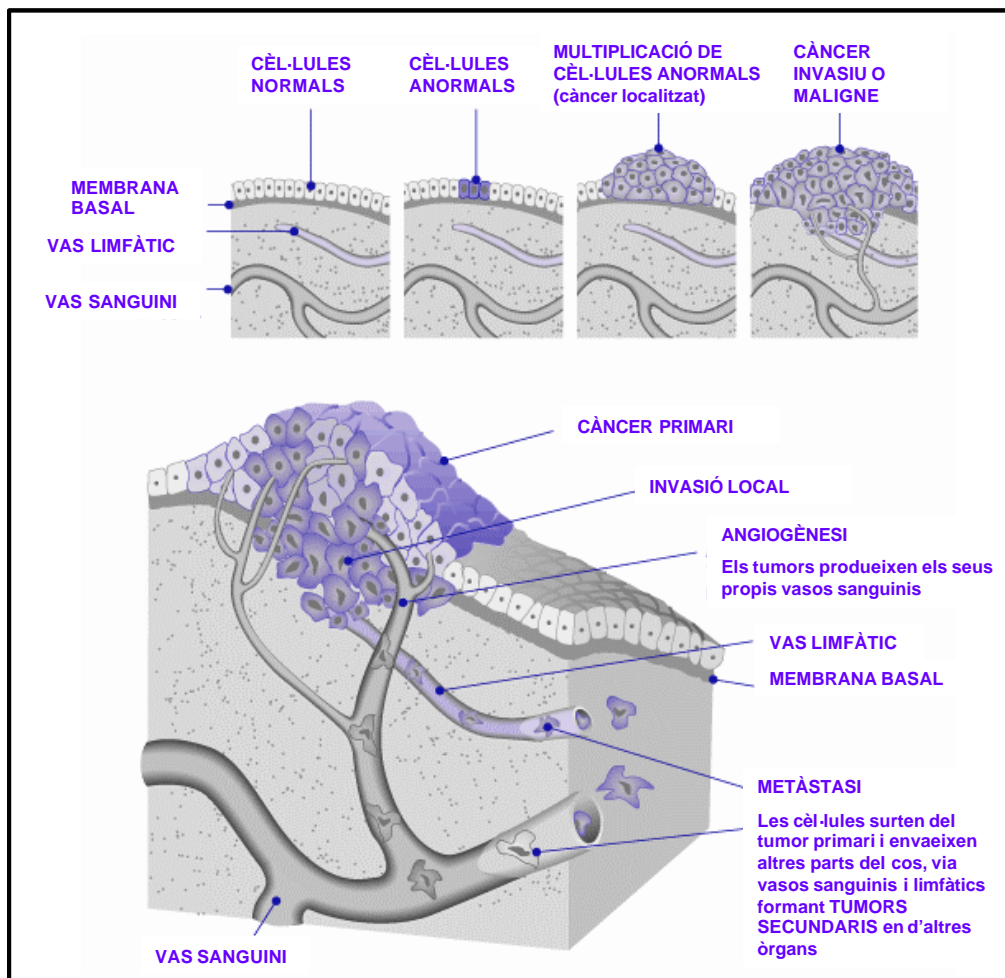


Figura 7: Esquema del procés cancerós a partir d'una cèl·lula normal. Extret i modificat de www.susnmart.com.au.

La cèl·lula que ha patit una mutació serà una *cèl·lula anormal*, però si no prolifera més que les cèl·lules veïnes normals, no produirà cap mal significatiu. Si la seva proliferació està fora de control, es produirà un *tumor primari* o *neoplasma* –una massa de cèl·lules anormals creixent inexorablement. Quan les cèl·lules neoplàstiques romanen agrupades en una massa única, es diu que el tumor és *benigne* i, generalment, pot aconseguir-se una curació completa per resecció quirúrgica. En canvi, un tumor es considera *maligne*, si les seves cèl·lules tenen la capacitat d'envair el teixit circumdant. Aquesta capacitat invasora implica, normalment, l'habilitat d'alliberar-se del teixit, entrar al torrent sanguini o als vasos limfàtics i poder formar *tumors secundaris* o *metàstasi* en altres teixits del cos. La capacitat d'envair pot donar-se, també, per la síntesi de nous vasos sanguinis promoguda per factors de creixement

sintetitzats pel mateix tumor, procés que s'anomena *angiogènesi*. Quan més àmpliament es produeixin metàstasi, més difícil serà d'eradicar el càncer (Alberts i col., 1994).

3.5. Incidència del càncer

El Programa Europa Contra el Càncer ha aconseguit disminuir el nombre de morts per càncer estimades per a l'any 2000, amb un seguit de mesures preventives. Això ha fet que aquest nombre només augmentés un 11% entre 1985 i 2000, en el context d'Europa. Tanmateix, en el cas concret d'Espanya, tradicionalment amb una incidència de càncer baixa (188 casos/100000 hab.), el nombre de morts per càncer entre 1985 i 2000 ha augmentat un 41% (Boyle i col., 2003), essent la taxa de mortalitat l'any 2000 de 128 casos/100000 hab. (dades extretes de la base de dades 'Globocan 2000').

Aquests autors suggereixen que la causa d'aquest augment és la manca de lluita contra el tabaquisme i l'endarreriment en la implantació de programes de detecció precoç del càncer a Espanya.

Pel que fa a la província de Girona, la taxa d'incidència de càncer per sexes és de 94 casos cada 100000 dones i de 130 casos cada 100000 homes. A la figura 8 es mostra la distribució espacial de la taxa d'incidència de càncer en dones i homes a les diferents poblacions gironines, on s'hi observen lleugeres diferències de distribució dependent del sexe.

Les taxes d'incidència i de mortalitat són diferents dependent del tipus de càncer. Si es prenen les dades estadístiques del 'Cancer Statistics, 2003', preses a la població del Estats Units durant l'any 2000 i estimant els nombres per a l'any 2003, s'observa que: Pel que fa al càncer de pàncreas, el nombre de casos detectats i el nombre de morts són iguals (20 morts/100000 hab.), essent el càncer que ocupa el quart lloc en nombre de morts. Pel que fa al càncer de pròstata, és el que presenta un nombre de casos superior en homes (amb una taxa d'incidència de 138 casos/100000hab.), juntament amb el càncer de mama, en dones, comparant-lo amb la resta de tipus de càncer. Tanmateix, pel que fa al nombre de morts, el càncer de pròstata ocupa el

cinquè lloc (18 morts/100000hab.), darrera del càncer de pulmó, còlon, mama i pàncreas (Jemal i col., 2003).

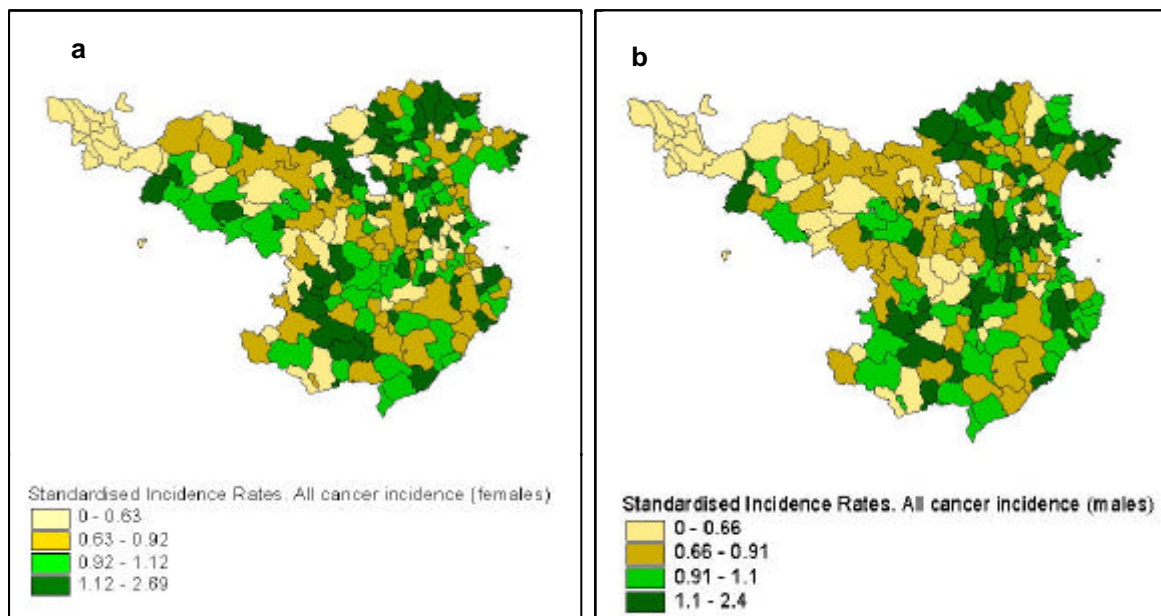


Figura 8: Distribució espacial de la incidència de càncer total a la província de Girona per poblacions; a) en dones i b) en homes. Gentilesa del Dr. M. Sáez de la Universitat de Girona.

Per a disminuir la mortalitat causada pel càncer hi ha tres estratègies: a) disminuir la taxa d'incidència de la malaltia, que comporta el coneixement profund de l'etiologia del procés cancerós per a cada tipus de càncer en concret; b) la detecció precoç del càncer, desenvolupant i millorant les tècniques de diagnosi i seguiment del càncer, així com el desenvolupament i millora de marcadors tumorals més sensibles i específics; i c) la millora en els tractaments existents, tant en les tècniques quirúrgiques i de radiació, com en el desenvolupament de noves teràpies (Brawer, 1999).

3.6. Els marcadors tumorals

Es poden considerar marcadors tumorals totes aquelles substàncies produïdes per les cèl·lules neoplàstiques, o induïdes per l'organisme afectat per la presència d'un tumor maligne. La mesura de la seva concentració en sèrum o en d'altres fluids

biològics, o la detecció de la seva presència a teixit, reflecteixen el creixement o l'activitat del tumor (Molina i col., 1997).

Hi ha quatre possibles aplicacions dels marcadors tumorals amb valor clínic: el diagnòstic, el pronòstic, el seguiment de la malaltia i de la resposta a la teràpia, i la detecció de les possibles recaigudes (Lamerz, 1999).

La valoració de la validesa d'un marcador tumoral es determina per la seva sensibilitat i especificitat. Es defineix especificitat com la freqüència de pacients amb diagnòstic negatiu respecte de tots els pacients no afectats per la malaltia. I es defineix sensibilitat com la freqüència de pacients diagnosticats de la malaltia respecte de tots els pacients afectats (fig. 9). L'especificitat i la sensibilitat varien en sentit invers, és a dir, si s'observa un augment en el nombre de casos detectats, cosa que representa un augment de la sensibilitat, generalment això implica una pèrdua d'especificitat.

		Càncer	
		Present	Absent
Examen	Positiu	a + +	b fals positiu
	Negatiu	c fals negatiu	d - -

$$\text{Sensibilitat} = \frac{a}{a + c} \qquad \text{Especificitat} = \frac{d}{d + b}$$

Figura 9: Esquema de les definicions i càlculs de l'especificitat i la sensibilitat. Extret de Sceautes (1981).

Els marcadors tumorals produïts pel tumor es divideixen en:

Antígens oncofetsals, són proteïnes expressades normalment en teixits i fluids biològics durant el període embrionari, de les que se'n reprimeix l'expressió després del naixement. Aquesta expressió, però, es reinicia en presència d'un tumor maligne. Entre aquests destaquen l'antigen carcinoembrionari (CEA) i l' α -fetoproteïna (AFP).

Antígens oncoplacentalis, són proteïnes sintetitzades per la placenta en situació normal. Dins d'aquest grup hi ha la fracció β de la hormona gonadotrofina coriònica β HGC i diferents proteïnes placentàries.

Antigens tissulars, se'n consideren aquells antigens procedents de teixit, la presència dels quals a la circulació sanguínia, obeeix a situacions patològiques. Dins d'aquest grup s'hi poden incloure, entre d'altres, l'antigen prostàtic específic (PSA), la fosfatasa àcida prostàtica (PAP) o la calcitonina (CT).

Antigens mucínics i glicoproteïnes, les mucines són complexos macromoleculars formats per mucoproteïnes o glicolípidis com el CA15.3, el CA125, el CA19.9 o el CA 27.29 (que ha substituït recentment al CA15.3 en la detecció del càncer de mama) (Perkins i col., 2003). Tot i que cap d'ells no presenta una estricta especificitat tissular, són útils en la determinació del pronòstic i l'estudi de la biologia dels tumors (Orntoft i Vestergaard, 1999).

Les glicoproteïnes tumorals abocades a sang o d'altres fluids biològics normalment s'originen a les cèl·lules tumorals i reflecteixen la seva glicosilació alterada. Tanmateix, moltes d'aquestes estructures no són específiques de tumor.

Citoqueratines, cada teixit epitelial presenta una combinació de citoqueratines determinada, que es manté inclús després de la transformació maligna. Algunes de les utilitzades en clínica són el TPA (antigen polipeptídic tissular) o el TPS (antigen polipeptídic tissular específic), tot i que aquests marcadors presenten una important variació entre subjectes (Orntoft i Vestergaard, 1999).

Hormones ectòpiques, són produïdes per alguns tumors però no reconeixen els òrgans sobre els que actuarien normalment.

Oncoproteïnes, proteïnes codificades per un oncogen que es poden detectar a nivell tissular.

Enzims, s'hi inclouen enzims normalment presents a sèrum o d'altres fluids biològics, amb certa especificitat tissular. La seva activitat augmenta de forma significativa com a reflexe de determinats aspectes relacionats amb la presència d'un tumor maligne. Ho serien, per exemple, la lactatdeshidrogenasa (LDH) o les sialiltransferases.

També s'hi poden incloure enzims, els nivells sèrics dels quals, es veuen augmentats en situació tumoral, com el PSA, la PAP o la ribonucleasa pancreàtica (RNasa 1).

Dins del grup de marcadors tumorals induïts per l'organisme afectat, s'inclouen les substàncies produïdes totalment o parcial per l'hoste com a resposta a la presència

d'un tumor, com citoquines, β 2-microglobulina, ferritina o proteïnes de fase aguda (Molina i col., 2000).

3. GLICOSILACIÓ ABERRANT EN CÀNCER

La glicosilació alterada és una característica de les cèl·lules tumorals i es presenta a la superfície cel·lular d'aquestes, com a part de les glicoproteïnes i glicolípid ancorats a la membrana cel·lular. Alguns tipus d'aquestes estructures glucídiques són marcadors de la progressió tumoral (Orntoft i Vestergaard, 1999). Alhora, la glicosilació anòmala pot afectar a les activitats biològiques de les glicoproteïnes (Fukuda i Kobata, 1993).

De manera similar a les cèl·lules normals durant l'embriogènesi, les cèl·lules tumorals pateixen una activació i un creixement ràpid, s'adhereixen a d'altres tipus cel·lulars i a la matriu extracel·lular i envaeixen teixits. El desenvolupament embrionari a vertebrats està acompanyat de canvis a les estructures glucídiques. No es estrany, doncs, que canvis en la glicosilació siguin una característica típica de la transformació maligna i la progressió tumoral.

Aquests canvis poden ser pèrdues d'expressió o expressió excessiva de determinades estructures, l'aparició d'estructures incompletes o trencades, l'acumulació de precursors i, més rarament, l'aparició de noves estructures (Kim i Varki, 1999).

Alguns dels canvis soferts per les cèl·lules tumorals són, per exemple, a) l'augment de les ramificacions β 1-6 dels *N*-glicans per sobre-expressió de GlcNAc transferasa V; i b) l'augment de la presència d'àcid siàlic a la superfície de les cèl·lules de tumors d'animals, el que redueix la unió de les cèl·lules tumorals metastàsiques a la fibronectina i al col·làgen tipus IV de la matriu extracel·lular, afavorint l'augment del potencial metastàtic (Orntoft i Vestergaard, 1999; Brockhausen i col., 1998). També s'han descrit diferents modificacions d'aquestes molècules d'àcid siàlic, pròpies de situacions tumorals, com l'O-acetilació en posició 9.

Aquest augment de la sialilació de la superfície de les cèl·lules tumorals és deguda a un increment de l'activitat sialiltransferasa o la presència de més ramificacions dels *N*-glicans que porten a un augment dels terminals que poden ser sialilats. Aquests

àcids siàlics participen en diferents funcions, entre les quals la unió a selectines (Brockhausen i col., 1998).

A més, s'observen canvis significatius als proteoglicans de l'estroma al voltant dels tumors, cosa que suggereix que aquestes alteracions permetrien el creixement del tumor, així com la progressió i invasió.

Als carcinomes també s'hi detecta la sobre-expressió de mucines que, per la pèrdua de la topologia de la cèl·lula, apareixen a l'espai extracel·lular i als fluids corporals, quan haurien de trobar-se al lumen dels òrgans (Kim i Varki, 1999; Orntoft i Vestergaard, 1999).

Alhora, s'ha descrit que la pèrdua de l'expressió normal del grup sanguini AB, acompanyada de l'augment d'expressió de les estructures H i Le^y s'associa a un mal pronòstic en molts carcinomes (Kim i Varki, 1999).

Estudis immunohistoquímics han mostrat que les estructures Le^x i Le^a poden estar sobre-expressades en carcinomes, sobre *N*- i *O*-glicans. A més, els glicans sLe^x i sLe^a s'han identificat com a antígens tumorals, l'expressió dels quals, es relaciona amb la progressió del tumor, el potencial metastàtic i un mal pronòstic. Les cèl·lules tumorals que presentin antígens Lewis sialilats tindran un avantatge selectiu ja que aquests actuen com a lligands de selectines (Kim i Varki, 1999).

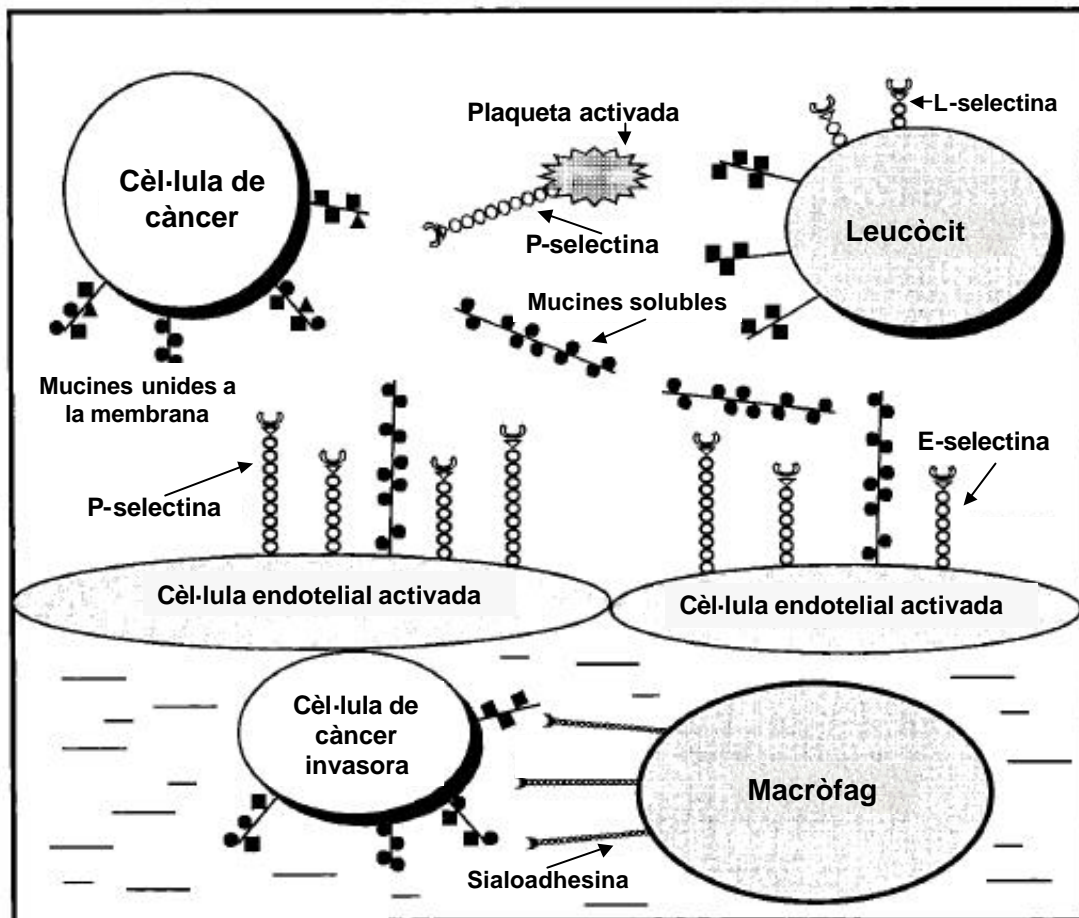


Figura 10: Esquema de les diferents interaccions entre estructures glucídiques i molècules d'adhesió involucrades en la metastasi de les cèl·lules tumorals (◊) sLe^x, (●) sLe^a i (?) altres estructures glucídiques. Extret i modificat de Orntoft i Vestergaard (1999).

Les estructures del tipus Lewis formen lligands amb les selectines de la família de les lectines endògenes. Les selectines són molècules d'adhesió cel·lular expressades per cèl·lules endotelials activades. Les E, P i L-selectines reconeixen glicans sulfatats i sialilats, que estan presents a les cèl·lules endotelials activades, plaquetes i leucòcits, amb diferent afinitat. Quan aquestes selectines s'expressen, són capaces de reconèixer leucòcits (*homing*) durant la resposta immunitària i, probablement, de reconèixer també les cèl·lules tumorals que han arribat al torrent sanguini (Orntoft i Vestergaard, 1999). Això comporta que les cèl·lules tumorals podran metastatitzar (fig. 10).

Amb els antecedents esmentats sobre la glicosilació aberrant descrita en situació tumoral i el fet que les cèl·lules tumorals secreten glicoproteïnes, que es troben a sèrum, es planteja la possibilitat que la glicosilació d'aquestes proteïnes pugui trobar-se també alterada.

Per aquest motiu s'estudia la glicosilació de dues proteïnes de secreció per tal de determinar si existeixen diferències, a nivell glucídic, quan aquestes han estat secretades en situació normal i tumoral.

OBJECTIUS

S'estudia la glicosilació de dues glicoproteïnes de secreció per tal de caracteritzar-les i determinar si existeixen diferències entre la situació normal i tumoral. Aquestes glicoproteïnes són, la ribonucleasa pancreàtica humana (RNasa 1), secretada majoritàriament pel pàncreas i l'antigen prostàtic específic (PSA), secretat majoritàriament per la pròstata.

- L'estudi de la ribonucleasa pancreàtica humana (RNasa 1) s'ha centrat en dos objectius concrets:
 1. Establir un mètode de quantificació dels nivells proteics de RNasa 1:
 - 1.1. Comparar els nivells sèrics de RNasa 1 en pacients control, afectats de neoplàsia pancreàtica, de pancreatitis o d'altres patologies, per tal d'avaluar el seu potencial diagnòstic.
 2. Analitzar les estructures glucídiques de la RNasa 1 procedent de pàncreas de donant sa i de medi de cultiu de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic.
 - 2.1. Establint una metodologia per analitzar i determinar les diferències glucídiques a partir d'aquestes mostres, sense purificació prèvia de la RNasa 1.
 - 2.2. Establint un procés de purificació de la RNasa 1, per a caracteritzar-ne les estructures glucídiques.

- L'estudi de l'antigen prostàtic específic (PSA) s'ha centrat en dos objectius específics:
 3. Purificar i caracteritzar de les estructures glucídiques del PSA:
 - 3.1. De medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic i de plasma seminal de donant sa.
 - 3.2. De sèrum d'un pacient afectat de neoplàsia prostàtica.
 4. Desenvolupar mètodes de detecció de la glicosilació del PSA en diferents fluids biològics, sense purificació prèvia:
 - 4.1. Plasma seminal de donant sa, medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic i de sèrum de pacients afectats de neoplàsia prostàtica.

Cadascuna d'aquestes proteïnes es tracta en un capítol diferent del present treball, exposant una introducció i uns mètodes específics, abans de la presentació i discussió dels resultats obtinguts. Posteriorment, es desenvolupa una discussió general d'ambdós capítols amb les conseqüents conclusions.

CAPÍTOL I:
LA RIBONUCLEASA PANCREÀTICA
HUMANA (RNasa 1)

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El càncer de pàncreas

El pàncreas es troba situat a la zona superior de la cavitat abdominal, en una posició retroperitoneal. És una glàndula d'aspecte lobular que es divideix en tres regions: cap, cos i cua, i consta de dues unitats funcionals independents: l'endocrina i l'exocrina.

Les cèl·lules dels illots de Langerhans són les responsables de la secreció endocrina i es troben distribuïdes per tot l'òrgan, secretant els seus productes directament a sang. El sistema acinar-ductal és el responsable de la secreció exocrina cap a l'aparell digestiu, ja que dins dels acins s'hi acumulen grànuls de zimogen –que són magatzems d'enzims digestius– (Bockman, 1993) (fig. I.1).

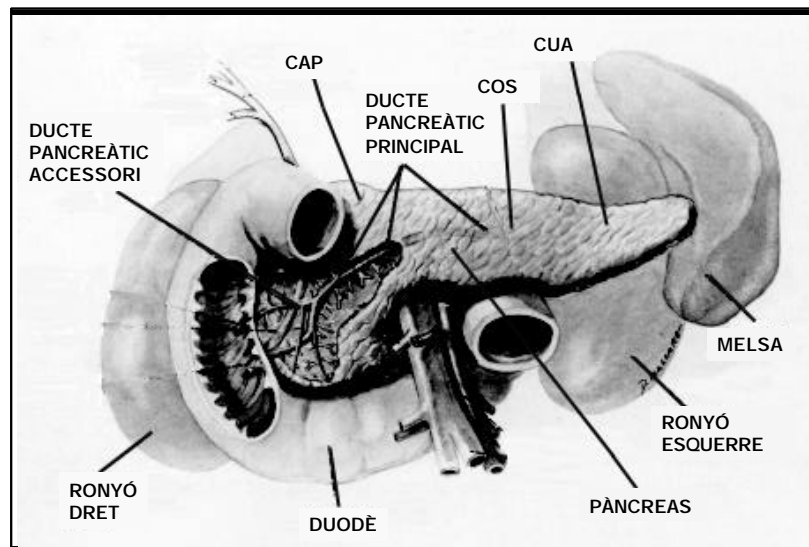


Figura I.1: Esquema d'un pàncreas humà amb indicació de les seves vies ductals i dels òrgans més propers. Adaptat de Bockman (1993).

El càncer de pàncreas és un tumor poc freqüent entre els tumors de presentació infradiafragmàtica (García Sáenz, 1999). Malgrat això, és un dels tumors amb pitjor pronòstic, perquè té una taxa d'incidència virtualment idèntica a la taxa de mortalitat. Així, la supervivència als dos anys del diagnòstic és del 10% (McKenna i Eatock, 2003). Té una incidència més important als països desenvolupats, on representa la quarta causa de mort per càncer, amb un 5%, i suposa el 2% de tots els casos nous de càncer (Greenlee i col., 2001). La mortalitat a Espanya ha crescut linealment, passant

d'una taxa estandarditzada de 3.29/100000 habitants l'any 1965, a una de 6.91/100000 habitants l'any 1989, cosa que indica un increment del 115% per a ambdós sexes conjuntament (Corella i col., 1994). Aquest important augment es deu tant a la manca de dades diagnòstiques fiables d'èpoques passades, com a factors ambientals i genètics (Warshaw i Fernández-Del Castillo, 1992).

A Europa, s'observa una incidència superior al sexe masculí (Czernichow i col., 1985), coincidint amb les dades del Butlletí Epidemiològic Setmanal del Ministeri de Sanitat i Consum del 1994, que indica que, a Espanya, el nombre de morts per càncer de pàncreas va ser de 1633 dones i 1817 homes. Aquesta malaltia és rara abans dels 45 anys, però la seva taxa d'aparició augmenta ràpidament a partir d'aquesta edat. Així, el 80% dels casos es dona en persones entre 60 i 80 anys (Lillemoe i col., 2000).

El Registre de càncer de Girona entre 1994 i 1997 presenta unes taxes d'incidència, en homes, del 5.6% d'entre tots els càncers, i en dones, del 3.7%. Durant aquest període, a Girona, s'han produït 163 morts per càncer de pàncreas, cosa que suposa el 3% de la mortalitat per càncer en homes i el 4% en dones.

Estudis epidemiològics proposen possibles factors de risc com: els greixos de la dieta, el consum de cafè i alcohol, i determinades ocupacions relacionades amb exposicions a derivats del petroli. Tanmateix, l'únic factor pel que s'ha establert una relació directa amb la incidència d'aquesta patologia és el consum de tabac. Alguns autors indiquen possibles relacions entre el desenvolupament de càncer de pàncreas i d'altres malalties, com la pancreatitis crònica, la *diabetes melitus* apareguda poc temps abans del diagnòstic del càncer, o l'úlcera pèptica (Warshaw i Fernández-Del Castillo, 1992).

Les alteracions genètiques són importants en el desenvolupament del càncer de pàncreas i existeixen algunes patologies d'origen genètic que s'associen amb un augment de la taxa d'incidència d'aquesta patologia (Lillemoe i col., 2000).

Aproximadament el 75% de les patologies pancreàtiques malignes s'originen al pàncreas exocrí i són histològicament classificades com a adenocarcinomes. La majoria de carcinomes pancreàtics tenen l'origen al sistema ductal i estan associats a reaccions desmoplàsiques, pancreatitis i fibrosis. El 65% dels càncers pancreàtics ductals es presenten a la zona proximal (al cap) i s'inclouen al grup de patologies

malignes periampulars que cursen amb obstrucció i icterícia i que presenten un diagnòstic més precoç. Els càncers de pàncreas localitzats al cos i la cua suposen un 15% dels carcinomes ductals i se solen diagnosticar en estadis més avançats perquè no presenten símptomes específics.

Histològicament, s'observen lesions en els ductes pancreàtics que podrien ser precursors del carcinoma ductal. Aquestes lesions als ductes presenten canvis genètics com els observats en els adenocarcinomes ductals, principalment mutacions puntuals al codó 12 de *k-ras* i als gens supressors de tumors p16 i p53. Així, p53 es troba inactiu en un 75% dels carcinomes pancreàtics, p16 en un 80% dels càncers de pàncreas i l'oncogen *k-ras* s'ha trobat mutat en un 80-100% dels càncers de pàncreas. Per aquest motiu, *k-ras* seria un candidat potencial al desenvolupament d'estudis moleculars sobre poblacions per al càncer de pàncreas (Lillemoe i col., 2000).

Els primers símptomes del càncer de pàncreas inclouen l'anorèxia, la pèrdua de pes, dolors abdominals i nàusees. Malauradament, aquests símptomes són poc específics i això porta a que el diagnòstic es retardi. Els símptomes específics, com l'obstrucció del tracte biliar que portarà a la icterícia, apareixen més tard.

Aquells pacients que presentin aquesta simptomatologia són sotmesos a un diagnòstic més acurat per ultrasons o per tomografia computeritzada. Això confirma l'obstrucció, demostra la presència d'una massa pancreàtica i pot detectar metàstasi a fetge o invasions vasculars locals (Lillemoe i col., 2000).

Quan s'arriba a diagnosticar, en el 85% dels casos el tumor ja s'ha estès per tot l'òrgan, perquè l'adenocarcinoma pancreàtic sol envair la zona perineural per dins i al llarg de la glàndula. El flux limfàtic sol portar ràpidament cèl·lules metastàsiques a nòduls limfàtics llunyans. D'altres metàstasi que se solen presentar són les que es donen a fetge (fins a un 80% de tots els casos), a peritoneu (fins a un 60%), a pulmó (entre el 50-70%) i a pleura (un 25%), degut a la rica vascularització limfàtica i venosa del pàncreas (Lillemoe i col., 2000).

Aquest tipus de tumor sol ser resistent a la quimio i radioteràpia. L'ús de la radioteràpia és adequat a l'hora de pal·liar el dolor i l'obstrucció, i comporta un lleuger augment de la supervivència als pacients sotmesos a intervenció quirúrgica. En canvi, la quimioteràpia té un valor pal·liatiu i d'augment de la supervivència

escassos. L'únic tractament potencialment curatiu del càncer de pàncreas és la resectió quirúrgica en els primers estadis de la malaltia (abans que es presentin metàstasi detectables). Malgrat tot, d'aquesta manera només s'ha obtingut un discret increment de la supervivència a llarg termini (García Sáenz, 1999).

Malauradament no s'avança gaire en l'estudi de teràpies per al càncer de pàncreas a causa de la dificultat de detecció i de l'agressivitat d'aquest tumor, que comporten que la majoria dels pacients amb càncer de pàncreas moriran d'aquesta malaltia (Lillemoe i col., 2000).

En els darrers anys ha aparegut un tractament quimioterapèutic per al càncer de pàncreas, la gemcitabina, que és un anàleg de deoxicidina que inhibeix la replicació i reparació del DNA. Aquest compost ofereix alguns beneficis simptomàtics al pacient i un lleuger augment de la supervivència en pacients que presenten la malaltia localment avançada o que presenten metàstasi, però només és aplicable a una petita població de pacients afectats de càncer de pàncreas que presenten unes característiques determinades (McKenna i Eatock, 2003).

1.2. Marcadors tumorals de l'adenocarcinoma pancreàtic

Al llarg dels anys s'han provat diferents tipus de marcadors tumorals de l'adenocarcinoma pancreàtic, però encara no se n'ha trobat cap de prou específic i sensible. Per exemple, s'han assajat com a marcadors: enzims pancreàtics (tripsina, ribonucleasa, desoxiribonucleasa, elastasa 1, fosfolipasa A2), inhibidors de proteases (α 2-macroglobulina, inhibidors de tripsina), antígens de grup sanguini o altres marcadors glicoproteics (CA125, CEA, CA19.9, CA195), antígens oncofetsals (antigen oncofetal pancreàtic (POA), proteïna fetoacinar pancreàtica (FAP)), entre d'altres (lactoferrina, ferritina), (Lamerz, 1999).

Actualment s'utilitzen clínicament, per a la detecció i seguiment de l'adenocarcinoma de pàncreas, els nivells en sèrum d'antigen carcinoembrionari (CEA) i d'antigen glucídic CA19.9. També s'estan realitzant alguns estudis clínics per a testar el marcador CA195 i sembla que presenta una sensibilitat superior a la del CEA i que és relativament específic per al càncer de pàncreas (Andicoechea i col., 1999). El CEA té una sensibilitat molt baixa i es troba en nivells alts en moltes altres situacions, benignes i malignes, que redueixen molt el seu valor diagnòstic i de

seguiment dels pacients afectes de neoplàsia pancreàtica. El CA19.9 tampoc no és específic per a aquesta patologia, perquè se'n troben nivells elevats en d'altres càncers gastrointestinals, com el de còlon o el de ducte biliar. A més, els nivells de CA19.9, freqüentment són normals en estadis primerencs de la malaltia i, per tant, no pot considerar-se un marcador útil per a fer un test general a molts pacients. Malgrat tot, permet distingir situacions benignes de malignes, i els nivells baixen després d'extirpar totalment el tumor, per la qual cosa és útil per al pronòstic i seguiment de la malaltia (Warshaw i Fernández-Del Castillo, 1992). El CA19.9 i el CA195 presenten una sensibilitat molt similar. De fet, a nivell estructural són molt semblants: el CA19.9 s'ha identificat com un derivat sialilat del grup sanguini Le^a, i l'epítot del CA195 és una glicoproteïna del tipus mucina amb una estructura similar a la del Le^a i a la del Le^a sialilat (Andicoechea i col., 1999).

Un estudi recent, que compara els diferents marcadors sèrics utilitzats en la detecció i seguiment de l'adenocarcinoma pancreàtic, ha determinat que, actualment, els millors resultats per a la detecció i seguiment d'aquesta neoplàsia, quant a sensibilitat i especificitat, es troben en combinar els marcadors glucídics CA19.9 o CA195 amb la proteïna enzimàtica elastasa 1 (Audisio i col., 1996) o amb el CEA, per utilitzar-lo com a complement en carcinomes digestius (Molina i col., 2000). D'altres autors també han demostrat millores en la sensibilitat del CA19.9, per a la detecció del càncer de pàncreas respecte de la pancreatitis, si es combina amb d'altres marcadors tumorals (com el CYFRA21.1 i el CA15.3), comparades amb la utilització del CA19.9 únicament (Halm i col., 2000).

Tenint en compte el mal pronòstic de la malaltia, seria molt útil trobar un marcador sèric específic d'aquest tipus de carcinoma que permetés un diagnòstic precoç i un seguiment de l'evolució d'aquesta patologia.

1.3. Les ribonucleases

1.3.1. Característiques generals

Dins la cèl·lula acinar pancreàtica s'hi sintetitzen molts productes proteics, majoritàriament proenzims i enzims. Aquestes proteïnes de secreció s'inclouen al reticle endoplàsmic i són portades a l'aparell de Golgi. En el seu desplaçament a través d'aquests orgànuls, algunes d'aquestes proteïnes són convertides en

glicoproteïnes per acció d'un grup d'enzims anomenats genèricament *glicosiltransferases*. Moltes d'aquestes glicoproteïnes són destinades a la secreció i, des de l'aparell de Golgi, són transportades en vesícules, que s'uneixen formant vacuoles de condensació i que adoptaran gradualment l'aspecte dels grànuls de zimogen (Fawcett, 2000). Entre aquestes glicoproteïnes es troba la ribonucleasa pancreàtica o RNasa 1.

Les ribonucleases són enzims que catalitzen la degradació dels àcids nucleics i es troben àmpliament distribuïts en tots els éssers vius, ja que la seva funció és indispensable per al desenvolupament dels organismes (Beintema i col., 1988).

Dins de la superfamília de la ribonucleasa A bovina, s'han descrit fins a 8 ribonucleases humanes que presenten una homologia significativa entre les seves seqüències aminoacídiques (fig. I.2) (Zhou i Strydom, 1993; Seno i col., 1995). Prenent com a referència la manera d'actuar de la ribonucleasa A –molt més estudiada perquè se'n disposa en grans quantitats– es pot dir que els membres d'aquesta superfamília són endonucleases que degraden el RNA de manera específica per pirimidines, per l'extrem 3' de l'enllaç fosfodiéster escindit, amb una catàlisi àcid-base general que té lloc gràcies a dues histidines del centre actiu (Roberts i col., 1969).

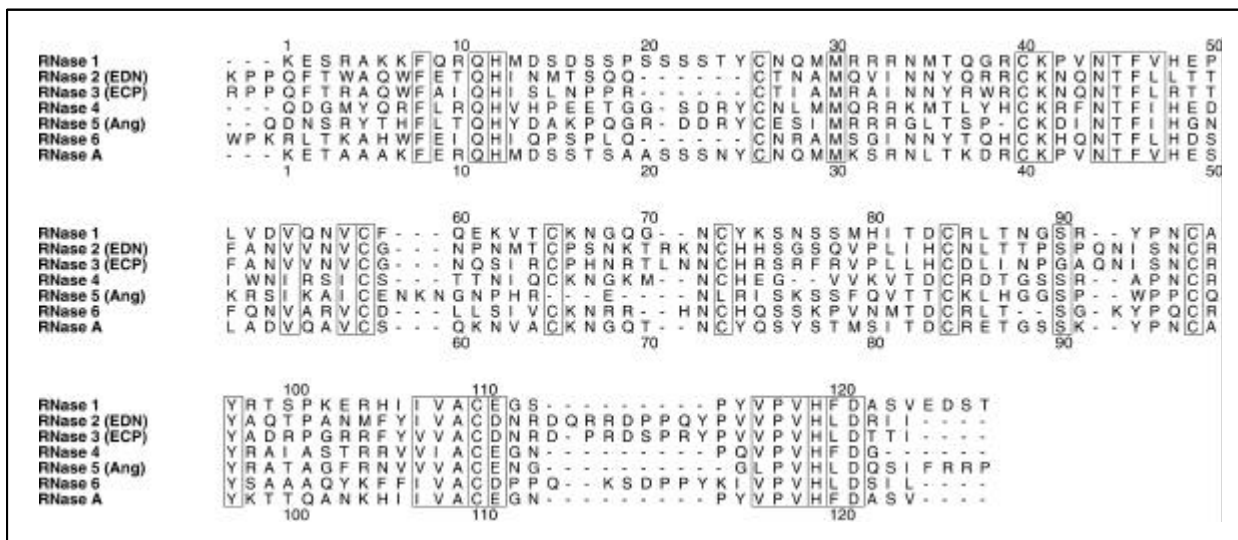


Figura I.2: Comparació de seqüències aminoacídiques de sis de les ribonucleases humanes conegudes i de la ribonucleasa A bovina. S'han requadrat els aminoàcids conservats i la numeració superior i inferior correspon a l'ordre dels residus aminoacídics de la RNasa 1 i de la ribonucleasa A bovina, respectivament. Adaptat de Rosenberg i Dyer (1996) amb el programa d'alineament ALSRIPT (Barton, 1993).

Aquests membres són, segons la classificació feta per Beintema i col. (1997): la RNasa 1, anomenada de tipus secretori o pancreàtic; la ribonucleasa 2, de tipus no secretori o neurotoxina derivada d'eosinòfil (EDN); la ribonucleasa 3 o proteïna catiònica d'eosinòfil (ECP); la ribonucleasa 4; la ribonucleasa 5 o angiogenina (Ang); la ribonucleasa k6 descrita per Rosenberg i Dyer (1996) i les ribonucleases 7 i 8, caracteritzades recentment per Zhang i col. (2002; 2003).

La ribonucleasa pancreàtica humana o RNasa 1, objecte d'aquest treball, va ser seqüenciada per Beintema i col. (1984), que trobaren que estava composta per 128 aminoàcids i 4 ponts disulfur, i que diferia en 37 posicions de la ribonucleasa A. El seu pes molecular, per electroforesi en gel de poliàcrilamida, és d'aproximadament 15 kDa. Pel que fa a l'activitat, aquesta RNasa 1 té major preferència pel substrat àcid policitidílic (poliC), que pel RNA o l'àcid poliuridílic (poliU) (Sorrentino i Libonati, 1997), i el seu pI és d'aproximadament 9.5. No està clar que la seva única funció biològica sigui com a enzim digestiu, ni si en podria fer d'altres.

La ribonucleasa pancreàtica o RNasa 1 és expressada per les cèl·lules acinars pancreàtiques i és secretada als ductes pancreàtics (Futami i col., 1997; Fernández-Salas i col., 2000; Peracaula i col., 2000). La RNasa 1 és expressada per les cèl·lules del teixit d'adenocarcinoma pancreàtic i també és secretada al medi de cultiu per línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic, de suposat origen ductal (Fernández-Salas i col., 2000; Peracaula i col., 2000).

Aquesta ribonucleasa humana de tipus secretori s'ha aïllat, principalment, de pàncreas (Weickmann i col., 1981), però també se'n troba en sèrum (Weickmann i Glitz, 1982), en orina (Kurokawa i col., 1983), en saliva (Ruiz, 1997), en semen, en cervell, en cor i en ronyó, entre d'altres (Neuwelt i col., 1978).

Futami i col. (1997) varen determinar, per transferència tipus Northern, els teixits humans on s'expressava RNasa 1 i observaren la seva expressió a: cor, cervell, placenta, pulmó, fetge, múscul esquelètic, ronyó, pàncreas, melsa, timus, pròstata, testicle, ovari, intestí prim i còlon, tot i que en diferents quantitats, essent majoritària en pàncreas.

Tournut i col. (1978) ja observaren que les ribonucleases existeixen en múltiples formes a diferents espècies animals, i que això era degut al fet que es podien trobar glicosilades.

En un estudi global, Yamashita i col. (1986) determinaren que el 93% de la RNasa 1 de pàncreas està glicosilada. Aquest enzim es pot trobar glicosilat en qualsevol de les tres dianes de N-glicosilació: l'Asn-34, l'Asn-76 i l'Asn-88. El nombre i l'estructura dels arbres de glicosilació dependran del teixit d'origen (Beintema i col., 1988). A la RNasa 1 purificada de pàncreas, l'asparagina 34 està glicosilada en la majoria de molècules de RNasa 1, mentre que els llocs asparagina 76 i asparagina 88 tenen sucres en més o menys la meitat i una petita part de les molècules, respectivament (Ribó i col., 1994) (fig. I.3).

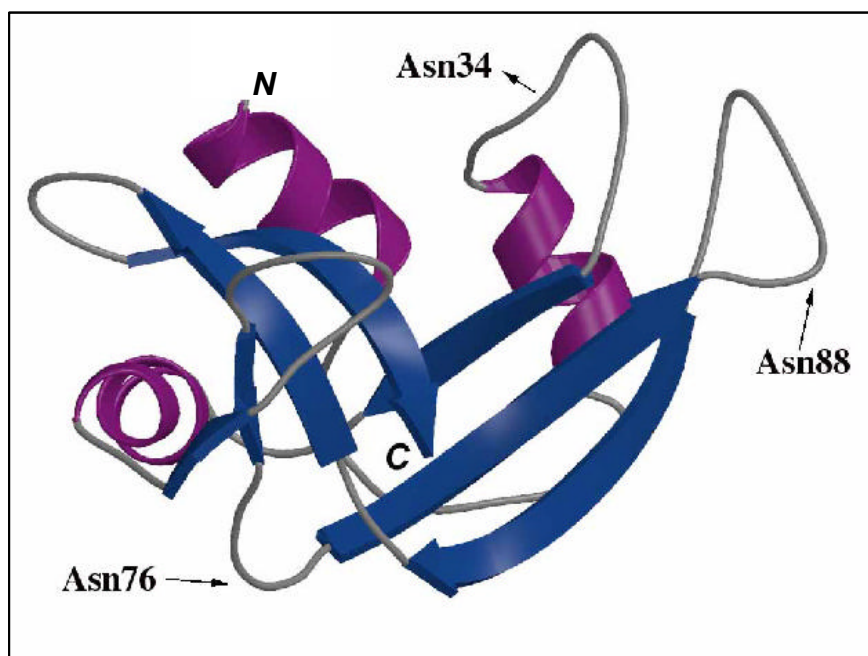


Figura I.3: Estructura de la des1-7RNasa 1 (RNase1ΔN7) indicant els possibles llocs d'unió de les cadenes glucídiques: Asn34, Asn76 i Asn88. Adaptat de Pous i col. (2001).

Realitzant estudis amb lectines sobre ribonucleases extretes de diferents teixits i fluids humans: orina, pàncreas, pulmó, leucòcits, ronyó, fetge, melsa, estómac i semen, Yamashita i col. (1986) trobaren que les ribonucleases de tipus secretori (RNasa 1) presentaven certa especificitat de teixit en el tipus de glicosilació. Més tard, Lawrence i col. (1993), amb estudis similars sobre ribonucleases de tipus no secretori

(RNasa 2 o EDN) purificades de fetge, ronyó i melsa, trobaren que no hi havia diferències apreciables en la glicosilació en funció del teixit d'origen de la proteïna.

Schein (1997), després de fer una revisió dels estudis fets amb ribonucleases, va determinar que l'activitat ribonucleolítica es troba augmentada en sèrums i extractes de teixit en una gran varietat de neoplàsies i malalties infeccioses; i que algunes d'aquestes proteïnes, o dels seus activadors o inhibidors específics, podrien utilitzar-se en el disseny de fàrmacs per tal de controlar l'angiogènesi als tumors, les reaccions al·lèrgiques o la replicació vírica.

II.1.1.1. La RNasa 1 com a marcador tumoral

L'interès clínic de la detecció de ribonucleases existeix des que diversos estudis trobaren una correlació entre els nivells d'activitat ribonucleolítica en sèrum i orina humans i l'aparició de diverses situacions patològiques, entre les que es trobaven la pancreatitis (Warshaw, 1987) i el carcinoma pancreàtic (Reddi i Holland, 1976).

Com a resultat d'estudis d'activitat enzimàtica utilitzant diversos substrats, Neuwelt i col. (1978), determinaren que la ribonucleasa present al sèrum humà és fonamentalment de tipus secretori (RNasa 1). La ribonucleasa present a pàncreas podria arribar a sèrum per via ductal, perquè seria secretada al duodè i absorbida per la mucosa intestinal (De Llorens i Cuchillo, 1986).

Reddi i Holland (1976) van descriure una correlació específica entre nivells alts d'activitat ribonucleolítica en sèrum i la presència d'adenocarcinoma de pàncreas (fig. I.4). Segons aquests autors l'elevació de l'activitat enzimàtica de la ribonucleasa sèrica seria un marcador d'aquest tipus de neoplàsia. Més endavant, però, alguns autors com Kottel i col. (1978) contradiren les seves dades, ja que detectaven elevats nivells d'activitat ribonucleolítica en sèrum a grups de pacients amb diferents carcinomes, però no podien distingir entre els diferents tipus de patologies neoplàsiques.

Kobayashi i Kawakubo (1994) determinaren els nivells sèrics de diferents molècules que podrien actuar com a marcadors tumorals, entre ells la ribonucleasa pancreàtica humana, a 2126 subjectes asimptomàtics visitats a diferents ambulatoris del Japó durant dos anys. La determinació de la ribonucleasa la van fer per activitat enzimàtica amb àcid policitidílic. Entre 5 i 7 anys després, van revisar les històries clíniques dels pacients que havien desenvolupat diferents tipus de càncer i van

observar que aquests subjectes ja presentaven, 5 anys abans, nivells alts de diversos marcadors en sèrum, entre ells la ribonucleasa. Aquest treball indica que els nivells sèrics de ribonucleasa augmenten en avançar el desenvolupament de diferents tipus de càncer, però no s'observen nivells per sobre dels normals fins als estadis més avançats.

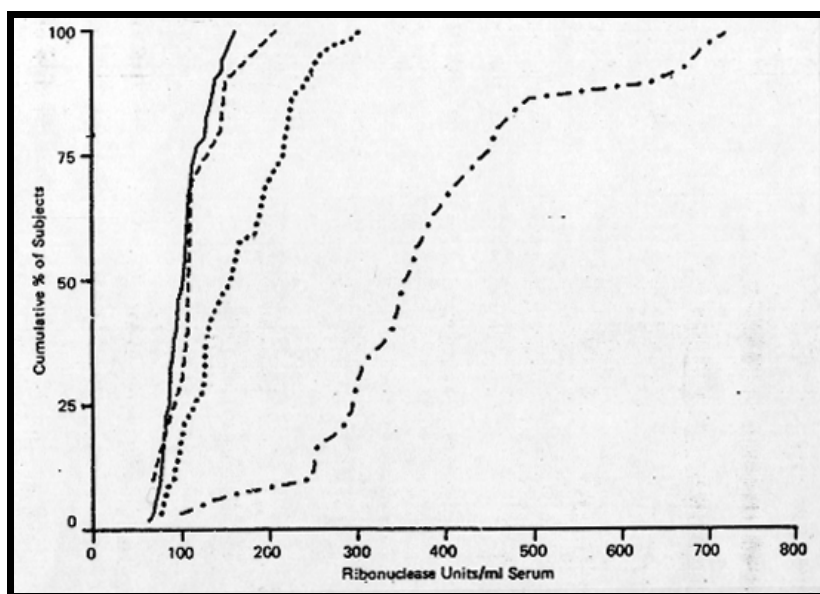


Figura I.4: Gràfic de la concentració de ribonucleasa en sèrum per activitat davant poliC, del grup de pacients normals (—), de pancreatitis (---), de diferents càncers (····) i de càncer de pàncreas (-.-.-). Extret de Reddi i Holland (1976).

Altres grups de recerca (Peterson, 1979; Isaacs, 1981; Corbishley i col., 1982; Basso i col., 1985; Kemmer i col., 1991) també detectaren nivells de ribonucleasa en sèrum superiors en grups de pacients de càncer de pàncreas respecte a grups de pacients control sans (taula I.1). No obstant, aquestes diferències no eren significatives, ja que hi havia pacients de càncer de pàncreas amb nivells de ribonucleasa en sèrum iguals que els nivells d'alguns pacients control. Això indicaria que la mesura dels nivells de ribonucleasa en sèrum no seria prou sensible per a diferenciar correctament entre pacients afectats i sans, ni prou específica per a diferenciar entre patologies relacionades.

Molts d'aquests estudis mesuraven els nivells de ribonucleasa per activitat enzimàtica, cosa que dificulta la comparació dels resultats obtinguts pels diferents grups (taula I.1), ja que els protocols de mesures de l'activitat enzimàtica diferien

entre sí pels mètodes de detecció i pels substrats de l'enzim utilitzats (Sorrentino i Libonati, 1997). A més, els estàndards de proteïna són diferents per als diversos autors; alguns disposaven de ribonucleasa aïllada de pàncreas o de suc pancreàtic, amb protocols i resultats de puresa diferents. Tot això podria explicar l'elevada variabilitat trobada comparant els nivells de ribonucleasa detectats per activitat enzimàtica entre els diferents grups de recerca esmentats anteriorment.

Altres estudis es van portar a terme amb mètodes immunològics (RIA) de detecció dels nivells de RNasa 1 (Weickmann i col., 1984; Kurihara i col., 1984). En aquest cas, tampoc no detecten diferències significatives en les concentracions de RNasa 1 en sèrum de pacients control i d'adenocarcinoma pancreàtic. A més, en alguns casos es detecten nivells de RNasa 1 en sèrum a pacients d'adenocarcinoma pancreàtic que són iguals que els d'alguns pacients afectats d'altres neoplàsies o que els nivells d'alguns pacients del grup control.

Determinació	Resultats					Referència
	Patologia	N	Mín.	Mitjana	Màx.	
Activitat amb poliC ^a	Controls	52		104 ± 24 ^f		Reddi i Holland (1976)
	Carcinoma pancreàtic	30		383 ± 145		
	Pancreatitis	10		120 ± 39		
Activitat amb ¹²⁵ I(r-RNA) d' <i>E.coli</i> ^e	Controls	21	137	273	426	Kottel i col. (1978)
	Diversos carcinomes	76	196	430	765	
Activitat amb poliC ^a	Controls	40	18.1	24.9	29.6	Peterson (1979)
	Carcinoma pancreàtic	16	22.2	37.3	76.5	
	Pancreatitis	18	19.3	38.5	62.4	
	Insuficiència renal	21	70.6	175.8	395	
Activitat amb poliC ^a	Controls	25		250 ± 70 ^f		Isaacs (1981)
	Carcinoma pancreàtic	10		466 ± 321		
	Pancreatitis crònica	25		279 ± 94		
	Insuficiència renal	17		605 ± 276		
Activitat amb poliC ^a	Controls	93	1.7	5.0	12	Corbishley i col. (1982)
	Carcinoma pancreàtic	24	3.7	12.4	31.8	
	Pancreatitis crònica	14	2.5	5.2	7.5	
Radio-immunoassaig (RIA) ^b	Controls	74	254.8	405.6	686.4	Weickmann i col. (1984)
	Carcinoma pancreàtic	25	195	585	1638	
	Pancreatitis	9	286	364	884	
Radio-immunoassaig (RIA) ^c	Carcinoma pancreàtic	12		780 ± 87 ^g		Kurihara i col. (1984)
	Carcinoma gàstric	21		617 ± 80		
	Carcinoma mamari	7		443 ± 53		
	Insuficiència renal	2		>5000		
Activitat amb poliC ^a	Controls	18		210.3 ± 32.8 ^g		Basso i col. (1985)
	Carcinoma pancreàtic	22		518.9 ± 69.2		
	Pancreatitis crònica	13		216.8 ± 31.2		
Activitat amb t-RNA d' <i>E.coli</i> ^d	Controls	25	97	143	302	Kemmer i col. (1991)
	Carcinoma pancreàtic	21	212	297	427	
	Pancreatitis crònica	17	162	235	265	
	Insuficiència renal	14	1800	2492	3586	

Taula I.1: Comparació dels resultats de la quantificació de ribonucleasa en sèrums de grups de pacients amb diferents patologies, fetes seguint diferents mètodes. **a:** Els resultats s'expressen en unitats/mL. Els autors defineixen una unitat com els μmol de poliC que es tornen solubles en àcid, en 1 min, a 37°C. **b:** Els resultats s'expressen en ng/mL de ribonucleasa, amb una recta patró feta amb ribonucleasa purificada de pàncreas d'autòpsies. **c:** Els resultats s'expressen en ng/mL de ribonucleasa, amb una recta patró feta amb ribonucleasa purificada de suc pancreàtic. **d:** Els resultats s'expressen en ng equivalents/mL, perquè la recta patró s'ha fet amb ribonucleasa A bovina. **e:** unitats/mL, definint una unitat d'activitat com el rendiment d'1 nmol de nucleòtids en 5 min a 37°C, mesurats per radioactivitat **f:** Valors expressats com a mitjana ± desviació estàndard. **g:** Valors expressats com a mitjana ± error estàndard].

Els estudis immunològics són més específics quant al tipus de ribonucleasa detectat. Tanmateix, la utilització d'anticossos policlonals diferents porta associada una variabilitat en funció de l'animal i del lot amb que es treballa. A més, la proteïna contra la qual s'han produït (RNasa 1) ha estat purificada de diferents fonts i pot estar diferentment glicosilada. Per exemple, el grup de Weickmann i col. (1984) utilitzaven anticossos produïts contra la RNasa 1 purificada de pàncreas procedents d'autòpsies (Weickmann i col., 1981). Aquests pàncreas podrien presentar diferents nivells de degradació perquè el temps transcorregut entre la mort del pacient i l'extirpació de l'òrgan variava entre unes hores i varis dies. En canvi, el grup de Kurihara i col. (1984) utilitzava anticossos policlonals contra la RNasa 1 purificada de suc pancreàtic, molt ric en aquest enzim –més de 10 vegades superior a l'enzim present en sèrum (Kurihara i col., 1982)– però que provenia de canulacions fetes a pacients de neoplàsia periampular o de carcinoma gàstric amb infiltració pancreàtica.

En cap dels dos casos s'ha tingut en compte, a l'hora de produir i utilitzar els anticossos, que la RNasa 1 present a pàncreas, a suc pancreàtic i a sèrum es troba glicosilada (Ribó i col., 1994; Weickman i col., 1984; Muñoz, 1992). Tot i això, els dos grups d'autors arriben a resultats comparables de nivells de ribonucleasa.

L'únic resultat en que coincideixen tots els grups d'autors de la taula I.1 és l'augment significatiu dels nivells de ribonucleasa en sèrum a pacients amb insuficiència renal, causada per la dificultat que pateixen en l'eliminació de les proteïnes de baix pes molecular, com la ribonucleasa. A més, destacar el fet que s'han trobat nivells elevats de ribonucleasa sèrica en situacions de malnutrició (Shenkin i col., 1976) i que s'ha observat que l'activitat ribonucleolítica en sèrum no disminueix després d'una pancreatectomia (Peterson, 1979).

Donada la controvèrsia entre els resultats dels diferents autors sobre si la concentració de RNasa 1 podria ser o no un marcador per al càncer de pàncreas, es proposa establir un mètode de detecció de RNasa 1 immunològic, sensible i específic per a determinar si els nivells d'aquesta glicoproteïna en sèrum poden servir com a marcador del càncer de pàncreas.

Estudis previs del grup de treball mostren que la RNasa 1 de pàncreas de pacients sans està glicosilada de manera diferent que la RNasa 1 produïda per línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic (Nan i col., 1998; Fernández-Salas i col., 2000).

Es proposa, doncs, determinar aquestes diferències en la glicosilació de la RNasa 1 d'origen normal (procedent de pàncreas de donant sa) i tumoral (procedent de medi de cultiu de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic). D'una banda cal establir una metodologia que permeti la detecció de la glicosilació de la RNasa 1, basant-se en la combinació d'anticossos que captin la proteïna, amb d'altres que permetin determinar la glicosilació aberrant que pot presentar la RNasa 1 en situació tumoral. I d'altra banda, cal purificar la proteïna per a poder establir exactament les estructures glucídiques presents en cada cas. D'aquesta manera s'obriria una nova via per a l'ús de la RNasa 1 com a marcador tumoral de l'adenocarcinoma pancreàtic.

2. OBJECTIUS

L'estudi de la ribonucleasa pancreàtica humana (RNasa 1) s'ha centrat en dos objectius principals:

1. Establir un mètode de quantificació dels nivells proteics de RNasa 1:
 - 1.1. Comparar els nivells sèrics de RNasa 1 en pacients control, afectats de neoplàsia pancreàtica, de pancreatitis o d'altres patologies, per tal d'avaluar el seu potencial diagnòstic.
2. Analitzar les estructures glucídiques de la RNasa 1 procedent de pàncreas de donant sa i de medi de cultiu de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic.
 - 2.1. Establir una metodologia per analitzar i determinar les diferències glucídiques a partir d'aquestes mostres, sense purificació prèvia de la RNasa 1.
 - 2.2. Establir un procés de purificació de la RNasa 1, per a caracteritzar-ne les estructures glucídiques.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Material bàsic

Durant la realització d'aquest treball s'han utilitzat els aparells que es detallen a continuació.

Aparell	Model	Marca i País
Agitadors magnètics	Agimàtic-S	Selecta, Espanya
Agitador horitzontal	Rotamax	Heidolf, Alemanya
Agitador / <i>Vortex</i>	GENIE-2	Scientific Industries, EEUU
Aparells d'ultrafiltració d'aigua	Milli-RO/ Milli-Q	Millipore, EEUU
Autoclau	AE-75	Raypa, Espanya
Balances	FY-300/ ER-120A	Salter, Japó
Bany termostàtic	Precistern	Selecta, Espanya
Campana de flux laminar vertical	BIO 48M	Cultek, Espanya
Centrifuga de tubs <i>ependorf</i>	Mikro12-24	Hettich, Alemanya
Centrifuga de tubs refrigerada	Digicen-R	Alresa, Espanya
Congeladors -20°C / nevera 4°C	Greenfresh/ ART866G	Balay, Aspes, Espanya/ Whirpol, Alemanya
Congelador -20°C	405	Bosch, Alemanya
Congelador -80°C	Ultralow freezer	Nuaire, Japó
Equip d'electroforesi	Miniprotean II	BioRad, EEUU
Equip d'electroforesi bidimensional	Multiphor II	Pharmacia, Suècia
Equip de cromatografia FPLC	AKTA	Amersham Biosciences, Suècia
Equip de nitrogen líquid		Abelló Oxigen Linde, Espanya
Equip de transferència	Miniprotean II	BioRad, EEUU
Espectrofotòmetre	CE6602	Cecil, Anglaterra
Fonts d'alimentació per electroforesi	PowerPac300/ EPS200	BioRad, EEUU/ Pharmacia Biotech, Suècia
Hemocitòmetre	Neubauer improve	Afora, Espanya
Incubador amb camisa d'aigua	Hotcold-S	Selecta, Espanya
Incubador de CO ₂ per cultius	FunctionLine	Heraeus, Alemanya
Lector de microplaques de 96 pouets	ELX800	Biotek, EEUU
Liofilitzador	Cryodos	Telstar, Espanya
Microscopi invertit contrast de fases		Zeiss, Alemanya
pH-metre	micropH2000	Crisón, Espanya
Micropipetes i multicanals	Pipetman/ Gilson	Gilson, França/ Finnpiette, Finlàndia
Ultrafiltració tangencial	Easy-Load	Millipore, EEUU
Ultracentrifuga refrigerada	RC5B Sorvall	DuPont Instruments, França
Ultrasonicador		Selecta, Espanya

Els reactius que s'han utilitzat, en els que no s'especifica la marca comercial, són de Merck, Sigma-Aldrich o Serva.

3.2. Producció i purificació d'anticossos policlonals de gallina contra la RNasa 1

Es disposa de RNasa 1 (RNasa 1) recombinant pura, produïda a *Escherichia coli* pel laboratori del Dr. M. Seno de la Universitat d'Okayama (Japó), (Futami i col., 1995). Amb aquesta proteïna s'ha immunitzat a l'animal i s'ha fet la posterior caracterització dels anticossos.

S'immunitza una gallina ponedora de 22-24 setmanes, seguint el protocol de Gassmann i col.(1990).

Seqüència d'immunització de la gallina:

1. La primera punxada és de 100 µg de proteïna dissolts en tampó PBS i el mateix volum d'adjuvant complet de Freund (Sigma, EEUU). Aquesta solució es barreja enèrgicament amb un agitador vòrtex durant 45 min. La punxada és intramuscular al múscul pectoral.
2. La segona punxada, 15 dies després, és de 100 µg de proteïna dissolts en tampó PBS i el mateix volum d'adjuvant incomplet de Freund (Sigma, EEUU). Aquesta solució es barreja enèrgicament amb un agitador vòrtex durant 45 min. La punxada és intramuscular al múscul pectoral.
3. Es comencen a recollir els ous 10 dies després de la segona punxada, perquè és quan apareix el pic de producció d'immunoglobulines, segons la corba de resposta immunitària d'aquest animal.

Un cop recollits els ous, s'extrauran les immunoglobulines (majoritàriament IgY) del rovell de l'ou, per precipitació amb polietilenglicol (PEG).

Extracció d'IgY de rovells d'ou:

1. Es separen les clares dels rovells amb compte i es mesura el volum dels rovells.
2. En un vas de precipitats amb un agitador magnètic, s'hi posen els rovells i s'hi va afegint, lentament, dues vegades el volum dels rovells de la solució: 10mM fosfat sòdic pH 7.5, 100mM NaCl, 5.25% PEG. Es deixa agitant 5 min a temperatura ambient.
3. Es centrifuga 10 min a 12000g i 4°C (rotor GSA, Sorvall).
4. Es filtra el sobrenedant amb dues capes de gassa.
5. Es mesura el volum de sobrenedant i es passa a un vas de precipitats amb un agitador magnètic.
6. S'hi afegeix, molt lentament i en agitació, un terç del volum del sobrenedant de la solució: 10mM fosfat sòdic pH 7.5, 100mM NaCl, 37.5% PEG. Es deixa agitant 5 min a temperatura ambient.
7. Es centrifuga 10 min a 12000g i 4°C (rotor GSA, Sorvall).
8. Es descarta el sobrenedant. El precipitat, que conté les immunoglobulines, es redissol en un terç del volum dels rovells, d'una solució de fosfat sòdic pH 7.5.

Després de l'extracció de les immunoglobulines es realitzen diferents controls, que indicaran la resposta dels anticossos davant de l'antigen amb que s'ha immunitzat l'animal, o titulació, i la puresa de les solucions d'immunoglobulines obtingudes.

Pel que fa a la titulació, es realitza amb un assaig d'ELISA directe, on es col·loca sempre la mateixa quantitat d'antigen al pouet (40 ng de RNasa 1 per pouet), i es varia la dilució de l'anticòs problema, en aquest cas de les IgY. L'anticòs utilitzat per a detectar les immunoglobulines de gallina és un anticòs d'ase contra anticossos de gallina que ha estat conjugat amb l'enzim peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Inc., EEUU).

ELISA directa:

1. Preparar tampons:

Solució Saline-Tween: Es dilueix 1/10 la solució x10 preparada amb 90 g/L de NaCl i s'hi afegeix un 0.05% de Tween 20 (polioxietilensorbitan monolaurat; Sigma, EEUU).

Tampó PBS-Tween (pH 7.2): Es dilueix 1/5 una dissolució x5 de composició: 40.9 g/L de NaCl, 6.7 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 1.7 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, si cal s'ajusta el pH a 7.2 amb àcid fosfòric o NaOH. I s'hi afegeix un 0.05% de Tween 20.

Tampó Carbonat-Bicarbonat (pH 9.6): Barrejant 26 mL de la solució A (2.75 g de Na_2CO_3 en 130 mL d'aigua milliQ), 74 mL de solució B (6.22 g de NaHCO_3 en 370 mL d'aigua milliQ) i 100 mL d'aigua milliQ.

2. Es col·loquen 100 μL d'una solució de RNasa 1 dissolta en tampó carbonat-bicarbonat, per a que en un pouet d'una microplaca de 96 pouets hi hagi 40 ng de RNasa 1. Les plaques utilitzades tenen un pretractament per a la unió de proteïnes (NUNC, Dinamarca). S'incuba tota la nit a 4°C o 1h a 37°C en una cambra humida.
3. Es decanta el contingut de la placa i es fan tres rentats amb Saline-Tween, buidant la placa cada vegada per decantació i assecant-la bé.
4. Es bloquegen els llocs lliures amb 100 μL per pouet d'una solució de llet en pols *Molico Sveltesse* (Nestlé, Suïssa) a l'1% en tampó PBS-Tween i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
5. Es decanta la solució de bloqueig i es fan tres rentats igual que al punt 3.
6. S'afegeixen a cada pouet 100 μL d'una dilució en PBS-Tween de les diferents dilucions d'anticòs problema, i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
7. Es decanta el contingut dels pouets i es fan els rentats igual que al punt 3.
8. S'afegeixen a cada pouet 100 μL d'una dilució 1:4000 en PBS-Tween de l'anticòs d'ase contra anticossos de gallina conjugat químicament a l'enzim peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., EEUU), i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
9. Es decanta la solució i es renta igual que al punt 3.
10. Es revela afegint 100 μL de la solució reveladora *BM-peroxidase substrate soluble TMB* (Roche, Alemanya) i s'agita lleugerament fins que comenci a aparèixer el color blau (de 10 s a 5 min). El color apareix com a resultat de l'activitat peroxidasa que presenta l'enzim conjugat a l'anticòs utilitzat en el punt 8.
11. S'atura la reacció de revelat afegint a cada pouet 100 μL d'una solució de H_2SO_4 0.25M. Aquí, la solució es torna groga i es poden detectar les diferències d'intensitat de manera colorimètrica. Es mesura l'absorbància de cada pouet a 450 nm (zona de l'espectre corresponent al groc), amb una absorbància de referència de 620 nm, utilitzant un lector de microplaques.

Pel que fa a la determinació de la puresa de les immunoglobulines (IgY), es realitza mitjançant un gel d'electroforesi amb SDS tenyit amb Blau de Coomassie, en condicions desnaturalitzants. Es tracten les mostres d'anticossos amb el tampó de càrrega que conté un 5% de β -mercaptoetanol i es bull la mostra 5 min a 100°C abans de carregar-la al gel d'electroforesi. D'aquesta manera es poden diferenciar les cadenes lleugeres (~24kDa) de les pesades (~55 a 70 kDa) de les IgY.

L'electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzats es porta a terme segons una modificació del protocol de Laemmli (1970).

Gel d'electroforesi en poliacrilamida en condicions desnaturalitzants:

1. Preparar els tampons:

Tampó del gel separador (x4): TrisHCl 1.5M pH 8.6-8.8, 0.4% SDS (dodecilsulfat sòdic)

Tampó del gel apilador (x4): TrisHCl 0.5 M pH 6.8, 0.4% SDS

Solució d'acrilamida: acrilamida 30%, N-N'-bisetilen acrilamida 0.8% (preservada de la llum)

Tampó d'elució (x10): Glicina 1.92M, Tris 0.25M, 1% SDS pH 8.3-8.5

Tampó d'aplicació de mostres (x4): TrisHCl 120mM, glicerol 40% (v/v), 8% SDS (p/v), blau de bromofenol 0.05% (p/v). Ajustar a pH 6.8.

2. Per a preparar els gels d'acrilamida s'utilitza un aparell *mini protean II* (Biorad, EEUU). Es munten els suports per a gels de 0.75 mm o d'1.5mm de gruix, segons calgui.

3. Es prepara el gel separador de proteïnes. Per a un gel de 0.75 mm i un 15% d'acrilamida les proporcions dels diferents components són: 1mL de tampó del gel separador, 1mL d'aigua milliQ, 2mL de solució d'acrilamida, 4µL de temed (N,N,N',N'- tetrametiletlen diamina) i 40µL de persulfat amònic 15%.
 4. Es deixa polimeritzar uns 15 minuts entre els vidres dels suports de gels.
 5. Es prepara el gel apilador de proteïnes. Per a un gel de 0.75 mm i un 15% d'acrilamida les proporcions dels diferents components són: 0.37mL de tampó del gel apilador, 0.97mL d'aigua milliQ, 0.15mL de solució d'acrilamida, 1.5µL de temed i 15µL de persulfat amònic 15%.
 6. Es deixa polimeritzar afegint-hi un motlle per a formar les butxaques on carregar les mostres.
 7. Es submergeixen els gels en tampó d'elució x1, fins que quedin ben coberts.
 8. Es preparen les mostres amb tampó d'aplicació de mostres i es carreguen a les butxaques del gel apilador.
 9. Es connecta a una font de corrent elèctric a amperatge constant, a 15mA/ gel de 0.75mm fins que el blau de bromofenol surti del gel.
 10. El gel es pot tenyir o transferir les proteïnes a una membrana de PVDF segons un protocol de transferència tipus western.
- Per tal de determinar la massa molecular de les diferents proteïnes problema s'utilitzen marcadors de pes molecular pre-tenyits (*See-Blue*, Invitrogen, EEUU) o no tenyits (*Mark12*, Invitrogen, EEUU) segons el tipus de detecció de proteïnes que s'utilitzi.

La tinció amb blau de Coomassie és un mètode quantitatiu i específic per a proteïnes amb una sensibilitat al voltant d'1 µg per banda de proteïna.

Tinció del gel d'electroforesi amb blau de Coomassie:

1. Es col·loca el gel en una cubeta i s'hi afegeix solució fixadora: 50% metanol, 7% àcid acètic. Es deixa en agitació suau entre 30 min i 1h.
2. S'elimina la solució fixadora i es tenyeix durant 15min amb solució de Coomassie preparada amb Coomassie Brilliant Blue R a l'1% (Merck, EEUU) dissolt en àcid acètic, metanol i aigua a una proporció 1:4:4.
3. Es retira la solució de tinció i s'elimina l'excés de colorant amb diversos rentats amb àcid acètic al 7%. El gel estarà totalment destenyit quan torni a ser transparent.

En funció del títol obtingut i de la puresa observada en la tinció amb blau de Coomassie del gel d'electroforesi, es decideix si cal que les immunoglobulines siguin purificades cromatogràficament.

La purificació es duu a terme mitjançant una cromatografia líquida, a pressió atmosfèrica, de bescanvi aniònic, amb reina de DEAE-*Sepharose*, segons el mètode descrit per Song i col. (1985).

Cromatografia líquida a pressió atmosfèrica de besvanvi aniònic:

1. Tots els passos es realitzen a 4°C per a preservar la integritat dels anticossos. Primer es dialitzen les mostres que contenen els anticossos, amb membranes de diàlisi de 3500 de límit de porus (SpectraPor, EEUU), contra el tampó 10 mM fosfat sòdic pH 8, fent 3 canvis de tampó de 4h cadascun i deixant-ho després tota la nit.
2. Es renta la reina DEAE *Sepharose* amb 2L d'aigua milliQ, 500 mL de tampó 0.5 M fosfat sòdic pH 8 i 500 mL de tampó 10 mM fosfat sòdic pH 8 utilitzant un embut Büchner i una bomba de buit.
3. Es col·loca la reina en una columna de vidre de 17 mm de diàmetre i s'equilibra fent-hi passar 150 mL de tampó 10 mM fosfat sòdic pH 8, a un flux d'1 mL/min. El volum de columna és de 50 mL.
4. Es carrega la mostra, es disminueix el flux a 0.5-0.6 mL/min i es comencen a recollir fraccions cada 2 min.
5. S'hi passen 100 mL de tampó 10 mM fosfat sòdic pH 8.
6. Es comença un gradient iònic del tampó 10 mM fosfat sòdic pH 8 al tampó 0.3 M fosfat sòdic pH 8, amb un volum total de 200 mL i un flux constant de 0.5 mL/min.
7. Es renta la columna amb tampó 10 mM fosfat sòdic pH 8, 1.5 M NaCl, a un flux d'1 mL/min.

8. Es va seguir el procés d'elució de proteïnes de la columna espectrofotomètricament, mesurant l'absorbància a una longitud d'ona de 280 nm.

Les fraccions recollides corresponents al pic d'absorbància del cromatograma es carreguen en un gel d'electroforesi i es determina la seva puresa i el títol d'anticossos tal com s'ha explicat anteriorment, alhora que es determina si aquests anticossos presenten reaccions creuades contra altres ribonucleases humanes o bovines.

3.3. ELISA sandvitx de quantificació de RNasa 1

Per a quantificar la concentració en que la RNasa 1 és present al sèrum, s'ha posat a punt un mètode de determinació basat en tècniques immunològiques, que és l'ELISA sandvitx.

Aquest mètode es basa en la captura de RNasa 1 present al sèrum humà per part d'un anticòs policlonal i la posterior detecció de la RNasa 1 capturada per part d'un anticòs policlonal d'una espècie animal diferent, específic també, per a la RNasa 1 (Harlow i Lane, 1988). Aquest doble reconeixement augmenta molt la sensibilitat del mètode de detecció, respecte d'un ELISA directe amb un sol anticòs.

ELISA sandvitx:

1. Preparar tampons:

Solució Saline-Tween: Es dilueix 1/10 la solució x10 preparada amb 90 g/L de NaCl i s'hi afegeix un 0.05% de Tween 20 (polioxietilensorbitan monolaurat; Sigma, EEUU).

Tampó PBS-Tween (pH 7.2): Es dilueix 1/5 una dissolució x5 de composició: 40.9 g/L de NaCl, 6.7 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 1.7 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, si cal s'ajusta el pH a 7.2 amb àcid fosfòric o NaOH. I s'hi afegeix un 0.05% de Tween 20.

Tampó Carbonat-Bicarbonat (pH 9.6): Barrejant 26 mL de la solució A (2.75 g de Na_2CO_3 en 130 mL d'aigua milliQ), 74 mL de solució B (6.22 g de NaHCO_3 en 370 mL d'aigua milliQ) i 100 mL d'aigua milliQ.

2. Es col·loquen 100 μL d'una dilució 1:2000 d'anticòs policlonal de conill anti-RNasa 1 dissolt en tampó carbonat-bicarbonat, per pouet d'una microplaca de 96 pouets amb pretractament per a la unió de proteïnes (NUNC, Dinamarca), i s'incuba tota la nit a 4°C o 1h a 37°C en una cambra humida.
3. Es decanta el contingut de la placa i es fan tres rentats amb Saline-Tween, buidant la placa cada vegada per decantació i assecant-la bé.
4. Es bloquegen els llocs lliures amb 100 μL per pouet d'una solució de llet en pols *Molico Sveltesse* (Nestlé, Suïssa) a l'1% en tampó PBS-Tween i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
5. Es decanta la solució de bloqueig i es fan tres rentats igual que al punt 3.
6. S'afegeixen a cada pouet 100 μL d'una dilució en PBS-Tween dels antigens, i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida. Els antigens són diferents dilucions de mostres que contenen RNasa 1 i la RNasa 1 recombinant pura per a la recta patró (entre 0 i 2 ng/pouet).
7. Es decanta el contingut dels pouets i es fan els rentats igual que al punt 3.
8. S'afegeixen 100 μL a cada pouet d'una dilució 1:400 d'anticòs policlonal de gallina anti-RNasa 1 en tampó PBS-Tween, i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
9. Es decanta la solució i es renta igual que al punt 3.
10. S'afegeixen a cada pouet 100 μL d'una dilució 1:4000 en PBS-Tween de l'anticòs d'ase contra anticossos de gallina conjugat químicament a l'enzim peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., EEUU), i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
11. Es decanta la solució i es renta igual que al punt 3.
12. Es revela afegint 100 μL de la solució reveladora *BM-peroxidase substrate soluble TMB* (Roche, Alemanya) i s'agita lleugerament fins que comenci a aparèixer el color blau (de 10 s a 5 min). El color apareix com a resultat de l'activitat peroxidasa que presenta l'enzim conjugat a l'anticòs utilitzat en el punt 10.
13. S'atura la reacció de revelat afegint a cada pouet 100 μL d'una solució de H_2SO_4 0.25M. Aquí, la solució es torna groga i es poden detectar les diferències d'intensitat de manera colorimètrica.
14. Es mesura l'absorbància de cada pouet a 450 nm (zona de l'espectre corresponent al groc), amb una absorbància de referència de 620 nm, utilitzant un lector de microplaques.

Cal incloure alguns pouets de control negatiu: Un sense l'anticòs de captura (policlonal de conill), un sense antigen (0 ng de RNasa 1), un amb un anticòs policlonal de conill que no reconegui la RNasa 1, un amb un antigen diferent (5 ng/pouet de lisozim) i un amb anticossos de gallina preimmunes.

3.4. Obtenció i tractament de les mostres de sèrum humà

Els sèrums són de pacients de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona, que han estat recollits en dejú entre les 8 i les 10 del matí. S'han deixat coagular de 10 a 30 min a temperatura ambient i s'han centrifugat a 3500 rpm en tubs que permeten la separació estricta del sèrum i de les cèl·lules sanguínies. Així s'han conservat a 4°C, com a màxim 4 dies i després s'han aliquotat i congelat a -20°C.

Els 14 sèrums control corresponen a pacients amb ingrés hospitalari per una patologia que no afecta a l'aparell gastrointestinal, procedents dels serveis de

traumatologia i oftalmologia, 5 són de dones i 9 són d'homes, i s'han recollit entre l'abril i l'agost de 1999.

La resta de sèrums s'han recollit entre l'abril i el novembre de 1999, i 13 són sèrums del grup de pacients de neoplàsia de pàncreas, 5 del de pacients de pancreatitis, 1 del d'insuficiència renal i 8 d'altres patologies gastrointestinals, com la neoplàsia gàstrica, la de recte i la de còlon, i algunes disfuncions pancreàtiques, com un nòdul de cap de pàncreas, una fistula pancreàtica o una metastasi d'origen no pancreàtic.

Tots aquests sèrums són de pacients ja diagnosticats d'aquestes patologies en el moment de l'extracció. A més, en alguns casos es disposa dels valors obtinguts per a diferents marcadors tumorals com l'antigen carcino-embrionari (CEA) o l'antigen glucídic CA19.9, marcadors tumorals utilitzats clínicament per a detectar, entre d'altres, càncer de pàncreas.

3.5. Caracterització glucídica de la RNasa 1

3.5.1. ELISA sandvitx per a detecció de glicosilació de la RNasa 1

El protocol utilitzat en aquest cas és una variació del protocol d'ELISA sandvitx explicat a l'apartat 3.3. En aquest cas la detecció, enlloc de fer-se amb anticossos de gallina contra la RNasa 1, es fa amb anticossos específics contra antigens glucídics.

ELISA sandvitx de detecció de glicosilació en mostres que contenen RNasa 1 glicosilada:

1. Es preparen els tampons:
Solució Saline-Tween: Es dilueix 1/10 la solució x10 preparada amb 90 g/L de NaCl i s'hi afegeix un 0.05% de Tween 20.
Tampó PBS-Tween (pH 7.2): Es dilueix 1/5 una dissolució x5 de composició: 40.9 g/L de NaCl, 6.7 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 1.7 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, s'ajusta el pH a 7.2 amb àcid fosfòric o NaOH. I s'hi afegeix un 0.05% de Tween 20.
Tampó Carbonat-Bicarbonat (pH 9.6): Barrejant 26 mL de la solució A (2.75 g de Na_2CO_3 en 130 mL d'aigua milliQ), 74 mL de solució B (6.22 g de NaHCO_3 en 370 mL d'aigua milliQ) i 100 mL d'aigua destil·lada.
2. Es col·loquen 100 μL d'una dilució 1:2000 d'anticòs policlonal de conill anti-RNasa 1 dissolt en tampó carbonat-bicarbonat en un pouet d'una microplaca de 96 pouets, amb pretractament per a la unió de proteïnes, i s'incuba tota la nit a 4°C o 1h a 37°C en una cambra humida.
3. S'aboca el contingut de la placa i es fan tres rentats amb Saline-Tween. Buidant la placa cada vegada per decantació i assecant-la bé.
4. Es bloquegen els llocs lliures de la placa, que no han quedat recoberts d'antigen, amb 100 μL d'una solució d'albumina sèrica bovina (BSA) a l'1% en tampó PBS-Tween i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
5. Es decanta la solució bloquejant i es fan tres rentats igual que al punt 3.
6. S'afegeixen a cada pouet 100 μL d'una dilució en PBS-Tween dels antigens, i s'incuba 1h a 37°C en una cambra humida. Els antigens són diferents dilucions de mostres que contenen RNasa 1 glicosilada.
7. Es decanta la solució i es fan tres rentats com al punt 3.
8. S'afegeixen a cada pouet 100 μL d'una dilució, en PBS-Tween, de l'anticòs monoclonal específic per a l'antigen d'estudi i s'incuba 2h a temperatura ambient en cambra humida.

AcM<Le^y>R 1:50 (Calbiochem, EEUU)

- AcM<sLe^x>R-CSLEX1 1:66 (Calbiochem, EEUU)
 AcM<sLe^a>R 1:2 (donats pel laboratori de la Dra. C. de Bolós)
9. Es decanta la solució d'anticòs i es renten els pouets igual que al punt 3.
 10. S'afegeixen a cada pouet 100 µL d'una dilució, en PBS-Tween, de l'anticòs específic que reconegui a l'anticòs anterior i que estigui conjugat amb l'enzim peroxidasa. S'incuba 1h a 37°C en una cambra humida.
 AcP<IgGratolí>Ca-POD 1:2000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, EEUU)
 11. Es decanta la solució i es renta igual que al punt 3.
 12. Es revela afegint 100 µL de la solució reveladora *BM-peroxidase substrate soluble* (3',3'-5',5'-tetrametilbenzadina, TMB) (Roche, Alemanya) i s'agita lleugerament fins que comenci a aparèixer color blau (de 10 s a 5 min). Aquesta solució reveladora conté el substrat de l'enzim peroxidasa que es troba conjugat a l'anticòs utilitzat al punt anterior.
 13. S'atura la reacció de revelat afegint a cada pouet 100 µL d'una solució de H₂SO₄ 0.25M. Aquí, la solució es torna groga i es poden detectar les diferències d'intensitat de manera colorimètrica.
 14. Es mesura l'absorbància a 450 nm de cada pouet (zona de l'espectre corresponent al groc), amb una absorbància de referència de 620 nm, utilitzant un lector de microplaques.
 15. S'hi inclouen alguns pouets de control positiu i negatiu, segons l'antigen glucídic que es vulgui detectar.

3.6. Caracterització glucídica de la superfície cel·lular

3.6.1. ELISA sobre cèl·lules fixades

Aquest mètode permet la detecció de les estructures glucídiques presents a la superfície cel·lular. Quan un cultiu de cèl·lules en placa de 96 pouets arriba a confluència, es fixen les cèl·lules i se'n detecten les estructures glucídiques amb anticossos seguint un protocol similar a l'ELISA directe.

ELISA sobre cèl·lules fixades:

1. Es preparen els tampons:
Tampó PBS(pH 7.2): Es dilueix 1/5 una dissolució x5 de composició: 40.9 g/L de NaCl, 6.7 g/L de Na₂HPO₄·2H₂O i 1.7 g/L de NaH₂PO₄·H₂O, s'ajusta el pH a 7.2 amb àcid fosfòric o NaOH.
Tampó de dilució d'anticossos: PBS 1% BSA.
Tampó de fixació: formaldehid 2% en PBS.
2. Se sembren 10⁴ cèl·lules/pouet en medi complet (DMEM 10%FBS) i es deixen créixer fins a confluència canviant el medi cada 2 dies.
3. Es renten les cèl·lules 3 vegades amb PBS.
4. S'hi afegeixen 100 µL de tampó de fixació i es deixen fixar a temperatura ambient 20min.
5. S'aboca el contingut de la placa i es fan tres rentats amb PBS. Buidant la placa cada vegada per decantació i assecant-la bé.
6. Es bloquegen els llocs lliures de la placa, que no han quedat recoberts de cèl·lules, amb 100 µL d'una solució d'albumina sèrica bovina (BSA) a l'1% en tampó PBS i s'incuba 1h a temperatura ambient en una cambra humida.
7. Es decanta la solució bloquejant i es fan tres rentats igual que al punt 5.
8. S'afegeixen a cada pouet 100 µL d'una dilució, en tampó de dilució d'anticossos, de l'anticòs monoclonal específic per a l'antigen d'estudi i s'incuba 2h a temperatura ambient en cambra humida.
 AcM<sLe^x>R-CSLEX1 1:66 (Calbiochem, EEUU)
 AcM<sLe^a>R 1:2 (donats pel laboratori de la Dra. C. de Bolós)
 AcM<H2>R 1:800 (donats pel laboratori de la Dra. C. de Bolós)
 AcM<Le^y>R 1:50 (Calbiochem, EEUU)
9. Es decanta la solució d'anticòs i es renten els pouets igual que al punt 5.
10. S'afegeixen a cada pouet 100 µL d'una dilució, en tampó de dilució d'anticossos, de l'anticòs específic que reconegui a l'anticòs anterior i que estigui conjugat amb l'enzim peroxidasa. S'incuba 1h a temperatura ambient en una cambra humida.
 AcP<IgGratolí>Ca-POD 1: 2000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, EEUU)
11. Es decanta la solució i es renta igual que al punt 5.
12. Es revela afegint 100 µL de la solució reveladora *BM-peroxidase substrate soluble* (3',3'-5',5'-tetrametilbenzadina, TMB) (Roche, Alemanya) i s'agita lleugerament fins que comenci a aparèixer color blau (de 10 s a 5 min). Aquesta solució reveladora conté el substrat de l'enzim peroxidasa que es troba conjugat a l'anticòs utilitzat al punt anterior.
13. S'atura la reacció de revelat afegint a cada pouet 100 µL d'una solució d'H₂SO₄ 0.25M. Aquí, la solució es torna groga i es poden detectar les diferències d'intensitat de manera colorimètrica.

14. Es mesura l'absorbància a 450 nm de cada pouet (zona de l'espectre corresponent al groc), amb una absorbància de referència de 620 nm, utilitzant un lector de microplaques.
15. S'hi inclouen alguns pouets de control positiu i negatiu. Un dels controls negatius són les cèl·lules de carcinoma mamari MCF-7 que no contenen aquests tipus d'antígens Lewis (Soule i col., 1973).

3.7. Purificació de RNasa 1 de medi de cultiu de cèl·lules de càncer de pàncreas humà

Les cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic humà són adaptades a créixer en medi de cultiu BMS 10%. Es recull el medi condicionat on les cèl·lules han secretat la RNasa 1 i es congela.

La purificació consta de tres passos cromatogràfics: el primer és una columna d'afinitat a heparina, el segon és una columna d'intercanvi catiònic i el darrer és una cromatografia de fase reversa.

3.7.1. Cultiu de cèl·lules i acumulació de medi:

La línia cel·lular Capan-1 (ATCC HTB-79) és una línia d'adenocarcinoma pancreàtic humà molt diferenciada, establerta a partir d'una metàstasi a fetge d'un tumor primari de pàncreas (Fogh i col., 1977). La línia cel·lular MDAPanc-3 (Frazier i col., 1990) és una línia d'adenocarcinoma pancreàtic humà establerta a partir de la metàstasi a fetge d'un adenocarcinoma pancreàtic moderadament diferenciat localitzat al cap del pàncreas. Aquestes cèl·lules secreten RNasa 1 al medi de cultiu (Fernández-Salas i col., 2000).

Les cèl·lules s'adapten a créixer en medi bàsic suplementat amb 10%BMS (*basal medium supplement*; Seromed, Alemanya), que gairebé no conté RNasa bovina, ja que aquesta podria interferir en l'estudi donat que la RNasa A que conté és molt similar a la RNasa 1 (Fernández, 1998).

Així, s'han cultivat en medi de cultiu: DMEM Glutamax (Gibco, Regne Unit), amb un 10% de BMS i 5µg/mL de Gentamicina (Gibco, Regne Unit).

El protocol de cultiu cel·lular rutinari i d'acumulació i concentració del medi de cultiu és el que es descriu a continuació.

Cultiu rutinari de cèl·lules i acumulació de medi condicionat:

Se sembren 10^6 cèl·lules en un flascó de cultiu de 175cm^2 amb 35 mL de volum de medi de cultiu DMEM (Gibco, Regne Unit) suplementat amb un 10% de BMS (Seromed, Alemanya) i $5\mu\text{g/mL}$ de Gentamicina (Gibco, Regne Unit) i es deixen en un incubador a 37°C , 5% de CO_2 i 90% d'humitat durant 48h. Quan les cèl·lules es trobin en creixement exponencial, es canvia el medi per medi fresc i es deixen a l'incubador 48h més. Passades aquestes 48h, se'n recull el medi i es congela.

Si les cèl·lules han arribat a ocupar un 80% de la superfície del flascó de cultiu (han arribat a confluència) es procedeix a desenganxar les cèl·lules de la superfície del flascó (procés anomenat tripsinització).

Tripsinització: es retira el medi de cultiu, s'afegeixen 3 mL de solució salina-EDTA per a eliminar les restes de medi i s'hi afegeixen 1.5mL de tripsina (Gibco, Regne Unit), deixant-la actuar fins que s'observi que les cèl·lules es desprenen de la superfície del flascó de cultiu, com a màxim 1 minut.

El procés de tripsinització s'atura afegint 4mL de medi de cultiu suplementat amb 10% sèrum boví fetal (FBS; GIBCO, Regne Unit), que conté inhibidors de tripsina. Se'n recull la suspensió de cèl·lules i es centrifuga 8min a 1500rpm. El precipitat de cèl·lules és ressuspès en un volum determinat de medi complet i se sembren altra vegada 10^6 cèl·lules en un flascó de cultiu de 175cm^2 , les cèl·lules restants es poden congelar i conservar en nitrogen líquid.

El procés d'acumulació de medi es repeteix, fent sembres consecutives, fins a aconseguir el volum desitjat.

3.7.2. Concentració del medi de cultiu

Per a reduir el volum de medi de cultiu acumulat, aquest es concentra per ultrafiltració tangencial amb una membrana que permet el pas de molècules menors de 5000Da (EasyLoad, Millipore, EEUU).

Prèviament, el medi acumulat s'ha de centrifugar 30min a 10000g per a eliminar-ne les restes cel·lulars, i s'ha de filtrar a través de filtres amb $0.22\mu\text{m}$ de mida de porus i baixa retenció de proteïnes (Gelman Laboratory- Pall, EEUU).

Al medi concentrat obtingut s'hi troben totes les molècules de més de 5000Da, entre elles la RNasa 1 secretada per les cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic (d'aproximadament 15 kDa).

3.7.3. Cromatografia d'afinitat a Heparina

El medi concentrat es dialitza en el tampó A de la cromatografia d'afinitat utilitzant sacs de diàlisi que permeten el pas de molècules menors de 3000Da (SpectraPor, EEUU) i s'injecta a la columna.

La columna utilitzada és una *HiTrap Heparin* (Amersham Biosciences, Suècia) per a un sistema d'elevada resolució FPLC. Aquesta columna està constituïda per una reïna d'agarosa que porta unida covalentment heparina (un glicosaminoglicà altament sulfatat de la mucosa intestinal de porc) i està indicada per a separar enzims d'unió a àcids nuclèics, com la RNasa 1, o d'altres proteïnes (factors de creixement o proteïnes de coagulació).

Cromatografia d'afinitat a Heparina *HiTrap Heparin*:

Tampons filtrats i desgasificats per ultrasonificació:

A: 50mM TrisHCl 20mM NaCl pH 7

B: 50mM TrisHCl 1.5M NaCl pH 7

El volum de columna és 5mL.

En un sistema FPLC.

1. S'equilibra la columna amb 10 volums de columna de tampó A a un flux 1mL/min.
2. Es carrega a la columna la mostra dialitzada i es comencen a recollir fraccions d'1mL a un flux de 1 mL/min.
3. S'elueix la mostra que no s'uneix a la reïna d'*Heparina* amb 1 volum de columna de tampó A.
4. S'elueix part de la mostra unida a la reïna amb un primer gradient salí de 20 volums de columna fins a un 40% de tampó B.
5. S'elueix la mostra unida amb 10 volums de columna fins a un 100% de tampó B.
6. Es regenera la columna amb 2 volums de columna de tampó B 100%.
7. Es renta amb 5 volums de columna de tampó A i 10 volums de columna d'aigua milliQ i es conserva en etanol 20%.

Per tal de seguir purificant la RNasa 1 es procedeix a reunir les fraccions positives per a RNasa 1 determinades per ELISA sandvitx (veure apartat 3.3). Posteriorment, es dialitzen front d'aigua milliQ, per a eliminar-ne les sals, i es liofilitzen.

Se'n determina la quantitat de proteïna total pel mètode de Bradford (veure apartat 3.9) i la quantitat total de RNasa 1 de les fraccions positives per ELISA sandvitx.

3.7.4. Cromatografia d'intercanvi catiònic

Per a la següent etapa de purificació s'utilitza una columna cromatogràfica *MONO-S HR 5/5* (Amersham Biosciences, Suècia) en un equip de cromatografia FPLC.

En aquesta columna queden retingudes aquelles proteïnes de pI superior al pH del tampó d'equilibrat (carregades positivament), ja que poden interaccionar amb els grups SO_3^- de la reïna. S'utilitza un tampó d'equilibrat a pH 5.5, de manera que la ribonucleasa, de pI elevat, queda retinguda a la columna, i és eluïda amb un gradient salí creixent.

Cromatografia d'intercanvi catiònic MONO-S HR 5/5:

Tampons filtrats i desgasificats per ultrasonicació:

A: 25mM Acetat sòdic pH 5.5

B: 25mM Acetat sòdic 1M NaCl pH 5.5

El volum de columna és 1mL.

En un sistema d'elevada resolució FPLC.

1. S'equilibra la columna amb 15 volums de columna de tampó A a un flux constant d'1mL/min.
2. Es carrega a la columna la mostra ressuspensa en tampó A i es comencen a recollir fraccions d'1mL a un flux de d'1 mL/min.
3. S'elueix la mostra que no s'uneix a la reïna de *MONO-S* amb 15 volums de columna de tampó A
4. S'elueix part de la mostra unida a la reïna amb un primer gradient salí de 75 volums de columna fins a un 40% de tampó B.
5. S'elueix la mostra unida amb 15 volums de columna fins a un 100% de tampó B.
6. Es regenera la columna amb 10 volums de columna de tampó B 100%.
7. Es renta amb 5 volums de columna de tampó A i 10 volums de columna d'aigua milliQ i es conserva en etanol 20%.

Les fraccions que per ELISA sandvitx contenen RNasa 1 s'uneixen, es dialitzen en aigua MilliQ i es liofilitzen.

Si després d'aquest punt el contingut de proteïna total (mesurat pel mètode de Bradford) és molt elevat per a seguir amb una cromatografia de fase reversa, es portarà a terme una segona cromatografia d'afinitat a heparina per disminuir el contingut proteic total.

3.7.5. Cromatografia de fase reversa

Finalment, les proteïnes presents en les fraccions amb RNasa 1 que són eluïdes de la columna anterior són separades segons la seva hidrofobicitat mitjançant una cromatografia de fase reversa amb una columna *Protein C4* (Vydac, EEUU) per a HPLC.

Cromatografia de fase reversa amb una columna *Protein C4* (Vydac):

Tampons desgasificats per ultrasonificació:

A: Aigua milliQ 0.1% àcid trifluoroacètic

B: acetonitril 0.1% àcid trifluoroacètic

El flux de treball és de 0.5 mL/min i el volum de columna és de 2.5mL.

1. S'equilibra la columna amb 4 volums de columna d'un 10% de tampó B i un 90% de tampó A.
2. S'injecta la mostra dissolta en aigua milliQ.
3. S'elueix la mostra no unida amb 2 volums d'un 10% de tampó B i un 90% de tampó A.
4. S'elueix la mostra amb un gradient de 4 volums de columna de 10 a 22% de tampó B.
5. S'elueix la mostra més unida amb un gradient de 15 volums de columna de 22 a 33% de tampó B.
6. S'acaben d'eluir les proteïnes encara unides amb un gradient d'1 volum de columna de 33 a 100% de tampó B.
7. Es regenera la columna amb 2 volums de columna de tampó B 100%.
8. Es reequilibra la columna amb 4 volums de columna de 10% de tampó B.

La determinació i quantificació de la RNasa 1 també s'ha portat a terme mitjançant assaigs d'ELISA sandvitx.

3.8. Caracterització i quantificació de la RNasa 1 durant la purificació

3.8.1. Gel d'electroforesi de detecció d'activitat ribonucleolítica: zimograma

El protocol utilitzat es basa en el descrit per Bravo i col. (1994) i consisteix a separar electroforèticament les proteïnes d'una mostra determinada, detectant per activitat, la presència de ribonucleasa. És un mètode molt sensible, que pot detectar fins a 1 pg de ribonucleasa A bovina (Bravo i col., 1994).

L'electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants amb dodecil-sulfat sòdic (PAGE-SDS) es realitza tal com es descriu a l'apartat 3.2 d'aquest capítol. Aquest mètode es basa en la polimerització d'un gel inferior, que presenta una proporció d'acrilamida adient per a la separació de proteïnes segons el seu pes molecular, i després, la d'un gel apilador, que presenta una proporció d'acrilamida baixa, que afavoreix el posicionament sincronitzat de les mostres a l'inici del gel separador. Per al zimograma la proporció d'acrilamida del gel inferior és del 15% i la del gel superior és del 3%.

L'adaptació del mètode electroforètic per a poder detectar ribonucleasa, consisteix a incloure en el gel inferior un substrat de l'enzim ribonucleasa: àcid policitidílic (poliC) o àcid poliuridílic (poliU) d'elevat pes molecular (Pharmacia, Suècia), fins a una concentració de 3 mg/mL.

L'electroforesi corre a 15mA/gel de poliacrilamida durant uns 90 min, i després es procedeix al revelat del gel d'activitat seguint el següent protocol:

Revelat del gel d'activitat o zimograma:

1. S'extreu l'SDS del gel d'electroforesi al 15%, deixant-lo en agitació suau a temperatura ambient en una cubeta amb una solució 10 mM Tris-HCl pH 8, 20% isopropanol (v/v), fent-ne dos canvis de 15 min cadascun.
2. Es deixa el gel en agitació suau a temperatura ambient en una solució 10 mM Tris-HCl pH 8, fent-ne dos canvis de 15 min cadascun, per eliminar l'isopropanol.
3. S'incuba el gel en agitació suau a temperatura ambient en una solució 0.1 M Tris-HCl pH 8 fins que es vegin les bandes de la digestió enzimàtica prou definides. El seguiment es realitza posant el gel sota llum ultraviolada ($\lambda=254\text{nm}$).
4. Es tenyeix durant 5 min en agitació suau a temperatura ambient amb Blau de Toluidina al 0.1% en 0.1 M Tris-HCl pH 8 (p/v).
5. Es renta amb aigua destil·lada abundant fins que s'hagi eliminat l'excés de colorant.

L'efecte de l'alliberament de nucleòtids per l'activitat ribonucleolítica és visible durant el procés de digestió enzimàtica col·locant el gel sota llum ultraviolada. També es poden veure les zones del gel on l'enzim és present tenyint-lo amb blau de toluidina, que tenyeix nucleòtids específicament. Allà on l'enzim és present s'hi veuran bandes blanques sobre un fons blavós degut a l'activitat de la RNasa 1 que haurà degradat el substrat.

3.8.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants amb SDS: tinció amb nitrat de plata

Aquest mètode es basa en que, una barreja de proteïnes problema se separen per electroforesi en gel de poliacrilamida, en condicions desnaturalitzants per la presència de dodecilsulfat sòdic (SDS), segons el mètode descrit per Laemmli (1970).

La tinció amb nitrat de plata és un mètode no quantitatiu i específic per a proteïnes que té una sensibilitat que permet detectar entre 2 i 5ng per banda de proteïna.

Tinció de gels d'electroforesi d'acrilamida amb nitrat de plata:

1. Fixació de les proteïnes: 50% metanol, 12% d'àcid acètic, formaldehid 37% (0.5 mL/L) durant 1h amb agitació suau.
2. Rentats: Tres rentats de 20 min cadascun amb etanol 50%.
3. Pretractament oxidant: Es deixa 1 min en $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L).
4. Rentats: Tres rentats de 20 s cadascun amb aigua milliQ.
5. Impregnació: Es deixa 20 min ben protegit de la llum en AgNO_3 (2g/L), formaldehid 37% (0.75 mL/L), en agitació suau.
6. Rentats: Dos rentats de 20 s cadascun amb aigua milliQ.
7. Revelat: Es deixa 10 min en agitació suau en una solució de Na_2CO_3 (60g/L), formaldehid 37% (0.5 mL/L), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 mg/L).
8. Rentats: Dos rentats de 2 min cadascun amb aigua milliQ.

9. Aturada: Es deixa 10 min en 50 % metanol, 12% àcid acètic.
10. Rentats: Deixant-ho aproximadament 20 min en metanol 50%. Els gels es poden conservar en metanol 50%.

3.9. Determinació de la quantitat de proteïna total

3.9.1. *Mètode de Bradford*

Aquest mètode de determinació de la quantitat de proteïna total, descrit per Bradford (1976), es basa en el canvi del màxim d'adsorció de 465 a 595nm que experimenta el colorant Coomassie Brilliant Blue G250 (BioRad, Alemanya) en resposta a diferents concentracions de proteïna. El colorant s'uneix principalment als aminoàcids bàsics i aromàtics (especialment l'arginina) i és un assaig útil per a determinar concentracions de proteïnes i de polipèptids amb pesos moleculars de més de 3000-5000 Da, depenent dels seus grups carregats.

La quantificació de la proteïna d'una mostra problema s'ha determinat interpolant el valor de l'absorbància en una recta patró construïda amb concentracions conegudes de proteïna (entre 0 i 50 µg/mL), en aquest cas s'utilitza albúmina de sèrum boví (BSA; Sigma, EEUU).

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Determinació de la concentració de RNasa 1 en sèrum

4.1.1. Producció i purificació d'anticossos policlonals de gallina contra la Ribonucleasa 1

Per tal de dur a terme l'assaig de determinació de RNasa 1 en sèrum són necessaris dos anticossos que reconeguin la RNasa 1.

Es disposa d'un anticòs policlonal de conill contra la RNasa 1, produït pel grup de treball i utilitzat, prèviament, per al marcatge immunològic de teixit pancreàtic per tècniques d'immunohistoquímica. Aquest anticòs no presenta reaccions creuades amb la resta de ribonucleases humanes (Peracaula i col., 2000).

S'ha escollit produir el segon anticòs policlonal en gallina, donada la seva distància evolutiva amb el conill. D'aquesta manera s'espera que els epítops de la RNasa 1 reconeguts per ambdós anticossos siguin diferents.

La producció d'anticossos policlonals en gallina presenta d'altres avantatges com: la facilitat d'obtenció i purificació dels anticossos a partir del rovell de l'ou (Schade i col., 1996) i les grans quantitats que se'n poden obtenir (Gassmann i col., 1990). Alhora, les proteïnes molt conservades en els mamífers, com la RNasa 1 (Schein, 1997), són més immunogèniques en aus, perquè ambdues espècies estan distanciades filogenèticament. Per tant, la quantitat d'antigen necessària per a una resposta immunitària eficient en gallina, és menor que per a conill (Gassmann i col., 1990). A més, la ribonucleasa de gallina té una homologia de seqüència molt baixa (31%) amb la ribonucleasa pancreàtica humana.

Les immunoglobulines de gallina del tipus Y (IgY) es troben al sèrum i al rovell de l'ou, perquè les gallines protegeixen la seva descendència transferint anticossos materns del sèrum al rovell de l'ou (Gassmann i col., 1990).

Per a obtenir IgY específiques per a la RNasa 1, s'immunitza una gallina amb RNasa 1 pura recombinant i s'obté una solució concentrada d'IgY, per precipitació amb polietilenglicol (PEG). Si la puresa de la solució no es considera suficient, es pot purificar la solució d'IgY precipitades per cromatografia atmosfèrica de bescanvi aniònic (Song i col., 1985).

S'ha determinat el títol i la puresa dels anticossos obtinguts, després de la cromatografia de bescanvi aniònic, mitjançant un assaig d'ELISA directe i per

electroforesi de proteïnes en condicions desnaturalitzants. El títol és aproximadament 1:400 (fig. I.5a) i la concentració d'IgY, mesurades com a concentració de proteïna total pel mètode de Bradford, és de 2.8 mg/mL, però, per electroforesi en gel de poliàcrilamida en condicions desnaturalitzants, es comprova que es troben parcialment pures (fig. I.5b).

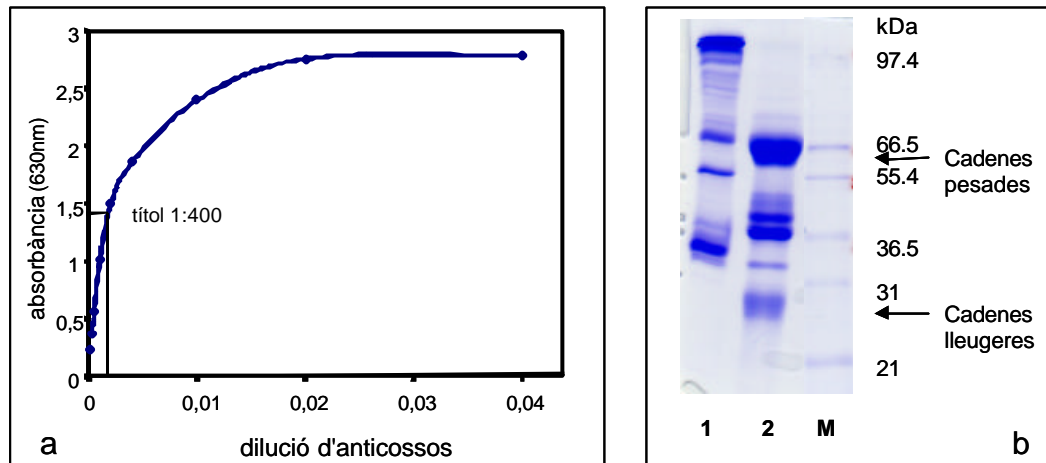


Figura I.5: a) Gràfic de la determinació del títol d'anticossos per ELISA directe. **b)** Electroforesi en gel de poliàcrilamida en condicions desnaturalitzants tenyit amb blau de Coomassie [1:anticossos; 2: anticossos tractats amb 2-mercaptoetanol; 3: marcadors de pes molecular (M)].

4.1.2. *Detecció de RNasa 1 en sèrum per ELISA sandvitx*

Per a detectar la presència de RNasa 1 en mostres sèriques i per a quantificar-la s'ha establert un protocol d'ELISA sandvitx. Aquest protocol es basa en la captura de RNasa 1 del sèrum amb un anticòs policlonal de conill i en la detecció posterior d'aquesta proteïna amb un anticòs policlonal de gallina. Aquests anticossos produïts són específics per a la detecció de RNasa 1, no presenten reacció creuada amb cap ribonucleasa humana.

S'estableix una recta patró de RNasa 1 recombinant pura que permet quantificar la proteïna en les diferents mostres sèriques (fig. I.6).

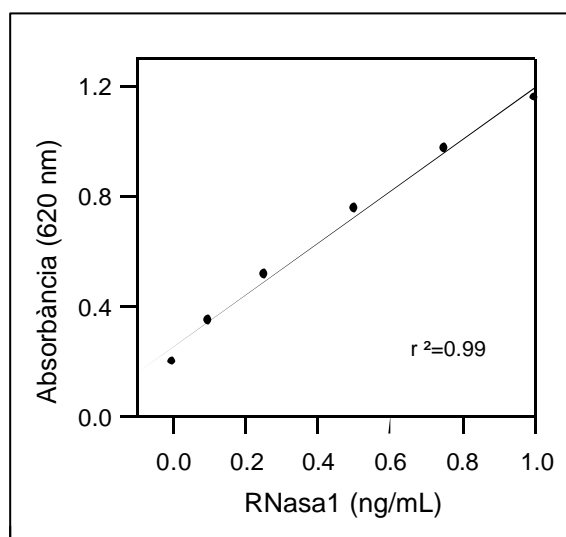


Figura I.6: Recta patró utilitzada per a determinar la concentració sèrica de RNasa 1.

Aquesta recta patró és lineal entre 0.1 i 1 ng/mL de RNasa 1, cosa que suposa que aquest ELISA sandvitx és un mètode sensible.

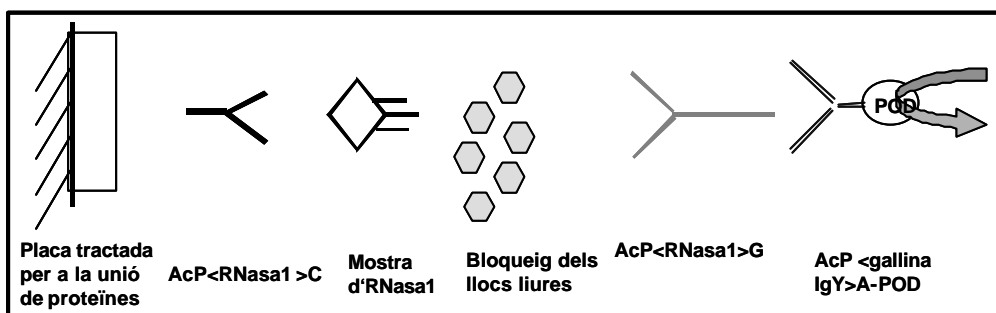


Figura I.7: Esquema del protocol de quantificació de RNasa 1 per ELISA sandvitx.

El protocol d'ELISA sandvitx amb anticossos policlonals de conill i gallina (fig. I.7), seria fàcil d'utilitzar com a control rutinari de la detecció de nivells de RNasa 1 en sèrum perquè permet l'assaig de moltes mostres alhora, l'error metodològic comès no supera l'11% i la variabilitat entre assaigs és d'un 10%, com a màxim.

Els anticossos policlonals de conill i de gallina utilitzats en el present treball s'han produït contra proteïna (RNasa 1) pura recombinant, donada la necessitat de disposar d'antígens totalment purs per a limitar la irreproducibilitat i variabilitat pròpia dels anticossos policlonals. A més, per tal de disminuir la variabilitat intrínseca

d'aquests anticossos, a cada assaig s'ha utilitzat una recta patró interna amb aquesta proteïna pura.

Les mesures dels nivells de RNasa 1 sèrica s'han portat a terme en sèrums de diferents pacients de l'Hospital Universitari Dr. J. Trueta de Girona. En un grup de 13 pacients de neoplàsia de pàncreas, que es troben en el rang d'edat entre 52 i 89 anys, en un grup de 6 pacients de pancreatitis, que tenen edats compreses entre 31 i 83 anys i en un grup de pacients d'altres patologies associades, com la neoplàsia gàstrica, de recte i de còlon, la insuficiència renal i patologies no neoplàsiques associades al pàncreas, com una fistula o un nòdul de cap de pàncreas, que es troben en el marge d'edat entre 47 i 82 anys. El grup de 14 pacients control sans tenen entre 29 i 78 anys, i són pacients amb ingrés hospitalari per patologies no relacionades amb el tracte gastrointestinal, que procedeixen dels serveis de traumatologia i d'oftalmologia.

Al gràfic conjunt per a totes les patologies (fig. I.8), es pot observar que alguns pacients de càncer de pàncreas presenten nivells més alts que els controls, però també n'hi ha alguns que els tenen com els controls. Pel que fa a la pancreatitis, hi ha un pacient de pancreatitis crònica amb nivells molt més alts que la resta de pacients del mateix grup i que els del grup control. Si no es té en compte aquest pacient (taula I.2), els nivells mitjans de RNasa 1 del grup de pacients de pancreatitis són com els del control. Al grup de pacients de diverses patologies es troben nivells molt elevats al pacient d'insuficiència renal i, si no es té en compte (taula I.2), la resta de pacients tenen valors mitjans similars als dels pacients del grup afectat de neoplàsia de pàncreas.

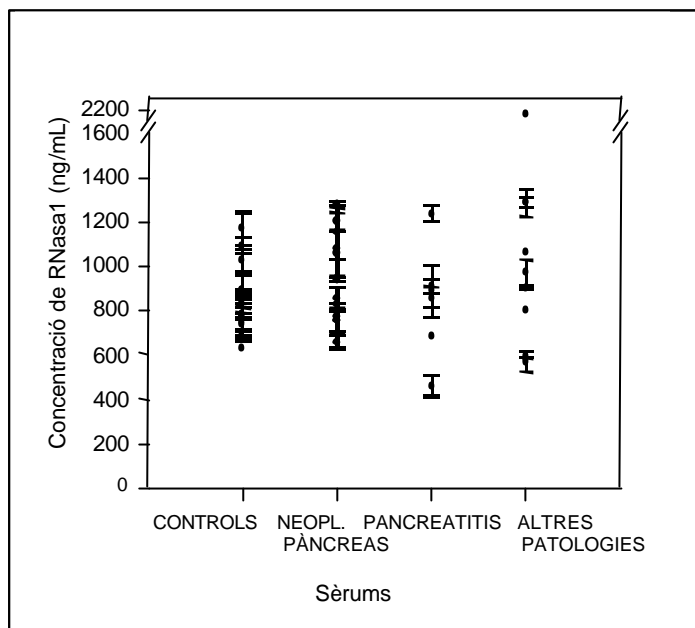


Figura I.8: Representació gràfica de la concentració de RNasa 1 en sèrum de pacients agrupats segons la patologia: pacients control sans, pacients de neoplàsia pancreàtica, de pancreatitis i d'altres patologies no pancreàtiques.

Patologia	N	ng/mL de RNasa 1 ^a
Control	14	851 ± 150
Neoplàsia de pàncreas	13	935 ± 192
Pancreatitis	5	763 ± 171
Pancreatitis crònica	1	1240 ± 36
Insuficiència renal	1	1858 ± 287
Altres patologies	8	948 ± 244

Taula I.2: Concentracions de RNasa 1 en sèrum de diferents pacients, mesurades per ELISA sandvitx [a: Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard, N és el nombre de pacients].

No es troben diferències significatives en un anàlisi de variàncies ANOVA ($F=1.2$; $p=0.32$), entre la RNasa 1 detectada al grup de pacients control, al de pacients de neoplàsia de pàncreas, de pancreatitis o d'altres patologies. A més, es compara el valor dels pacients control amb el dels altres tres grups, per a veure si hi ha diferències significatives entre els nivells quan existeix qualsevol estat patològic, i es veu, amb un contrast d'ANOVA, que no hi ha diferències significatives ($t=0.87$; $p=0.1$).

Els pacients d'insuficiència renal, tal com havien determinat ja altres autors, com Shenkin i col. (1976) i els de la taula I.1, tenen nivells molt elevats de RNasa 1 a sèrum a causa de la dificultat dels pacients afectats d'eliminar aquesta proteïna de la sang. En aquest cas, les diferències respecte als pacients control, sí que serien significatives en un test t-Student ($t=-6.8$; $p<0.01$).

Amb el mètode de detecció desenvolupat en el present treball, s'han trobat concentracions de RNasa 1 en sèrum (taula I.2) lleugerament més elevades que les dels autors que ho havien determinat abans, tant per activitat com per radioimmunoassaig (taula I.1).

Aquesta diferència pot ser deguda a que els anticossos utilitzats en el present treball (tot i ser policlonals) no presenten reaccions creuades amb altres ribonucleases humanes perquè s'han produït contra RNasa 1 recombinant pura, a diferència dels anticossos produïts per altres autors (Kurihara i col., 1982).

Un altre aspecte que podria explicar aquesta diferència, fa referència al fet que la RNasa 1 està glicosilada, i que a cap dels assaigs d'altres grups no s'havia avaluat la influència de la glicosilació de la RNasa 1, utilitzada per a la producció d'anticossos contra aquesta proteïna. Això podria explicar que aquests autors detectin nivells més baixos de ribonucleasa sèrica que els observats en aquest treball, ja que, en aquest cas, s'ha utilitzat RNasa 1 recombinant no glicosilada.

La presència d'altres tipus de ribonucleases al sèrum no interfereix a l'assaig d'ELISA sandvitx, si en canvi, interfereix en els assaigs d'activitat enzimàtica, on tots els tipus de ribonucleases presents al sèrum poden degradar qualsevol substrat utilitzat, encara que amb diferent eficiència enzimàtica, i seran detectats en conjunt (Sorrentino i Libonati, 1997).

De les dades presentades se'n desprèn que la quantitat de RNasa 1 present al sèrum no es pot utilitzar com a marcador per al càncer de pàncreas, tot i haver millorat la sensibilitat del mètode de detecció amb un ELISA sandvitx específic.

Estudis previs del grup de treball mostren que la RNasa 1, en pàncreas de pacients sans, està glicosilada de manera diferent que la RNasa 1 produïda per línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic (Nan i col., 1998; Fernández-Salas, i col., 2000).

Aquestes diferències glucídiques sobre la proteïna s'estudien per a avaluar el seu ús com a marcador del càncer de pàncreas

4.2. Caracterització glucídica de la RNasa 1

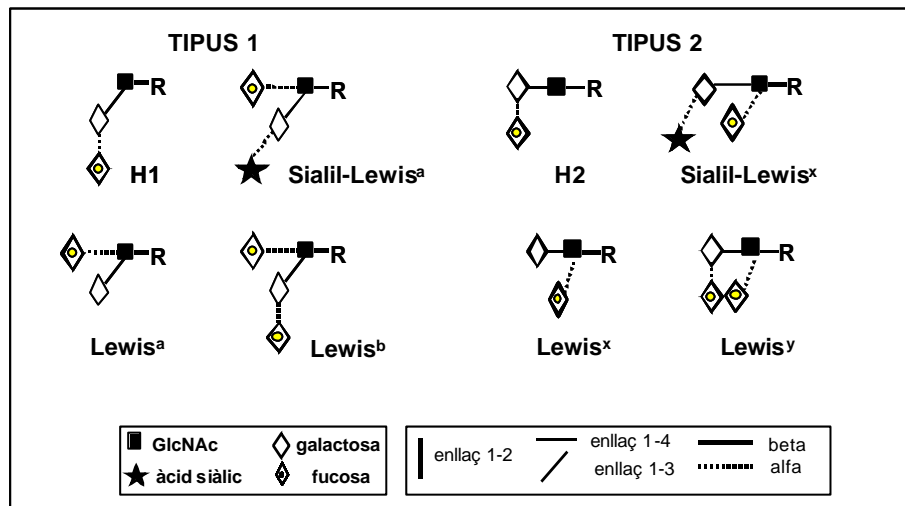
L'anàlisi de la composició en monosacàrids dels glicans de la RNasa 1 purificada de pàncreas sa mostra nivells elevats de fucoses, absència d'àcid siàlic i la presència de l'antígen Lewis^y (Le^y). En canvi, la RNasa 1 purificada del medi de cultiu de la línia d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 presenta àcid siàlic i l'antigen glucídic sialilLewis^x (sLe^x) (Ribó i col., 1994; Fernández-Salas i col., 2000).

Amb aquestes dades prèvies, es desenvolupa una metodologia d'estudi de la glicosilació de la RNasa 1 sobre mostres biològiques sense necessitat de purificar-la prèviament.

Aquesta metodologia es posa a punt a partir de medis de cultiu de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic i de teixit homogeneïtzat de pàncreas de donant sa, ja que presenten una major concentració de RNasa 1.

4.2.1. Anàlisi de la glicosilació de la RNasa 1

Donada la informació prèvia sobre la glicosilació de la RNasa 1 (Ribó i col., 1994; Fernández-Salas i col., 2000) es desenvolupa un mètode que permeti detectar la presència d'antígens sialilats del tipus Lewis, com el sLe^x i el sLe^a i d'antígens fucosilats del tipus Le^y (taula I.3).



Taula I.3: Taula resum dels antígens de tipus Lewis.

Aquest mètode es basa en un ELISA sandvitx on la RNasa 1 present en una mostra és capturada per un anticòs policlonal de conill, específic contra aquesta, i la seva glicosilació és detectada mitjançant diferents anticossos contra estructures glucídiques del tipus Lewis.

El medi de cultiu s'obté de línies d'adenocarcinoma pancreàtic: Capan-1 i MDAPanc-3, ambdues secretores de RNasa 1 (Fernández-Salas i col., 2000).

Per tal d'avaluar la sensibilitat i especificitat d'aquest assaig immunològic, es comprova la capacitat de detecció de l'antigen sLe^x de la RNasa 1 present al medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma pancreàtic Capan-1.

A la figura I.9. es comprova l'especificitat de l'assaig, ja que en diluir més la mostra disminueix proporcionalment l'absorbància mesurada. També es comprova la sensibilitat de l'assaig. Així, aquest ELISA sandvitx detecta la presència de l'antigen

sLe^x en mostres de RNasa 1 capturada del medi de cultiu concentrat de cèl·lules Capan-1 diluït fins a 100 vegades, és a dir, en una mostra que conté com a mínim 3ng de RNasa 1.

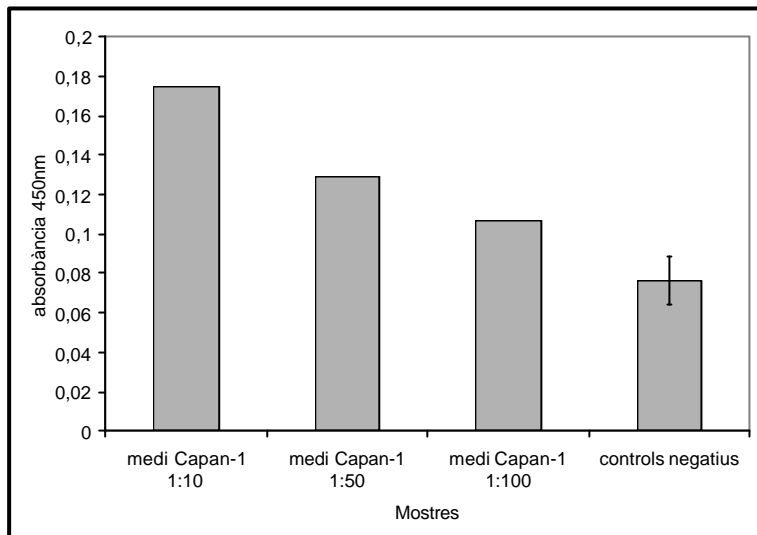


Figura 1.9: Detecció de la glicosilació de la RNasa 1 de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma pancreàtic per ELISA sandvitx amb detecció de l'antigen sLe^x. Es mostra la barra de la desviació estàndard del càlcul de la mitjana dels valors dels controls negatius.

Donada l'especificitat i sensibilitat de l'assaig, aquest s'estén a l'avaluació de la presència de diferents antigens del tipus Lewis en diferents mostres biològiques que contenen RNasa 1, com un homogenat de teixit pancreàtic o el medi de cultiu de diferents línies cel·lulars de carcinoma pancreàtic: Capan-1 i MDAPanc-3.

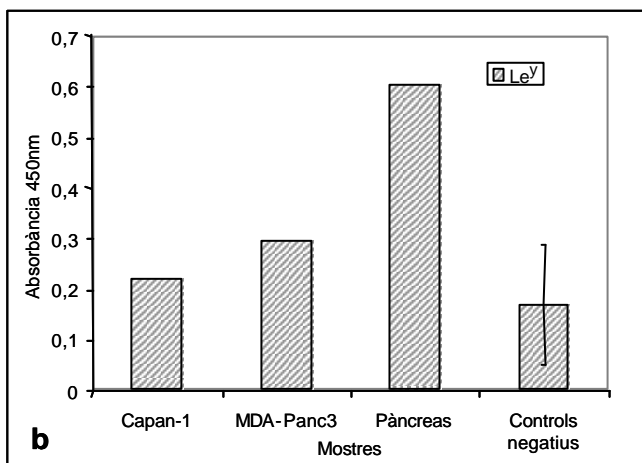
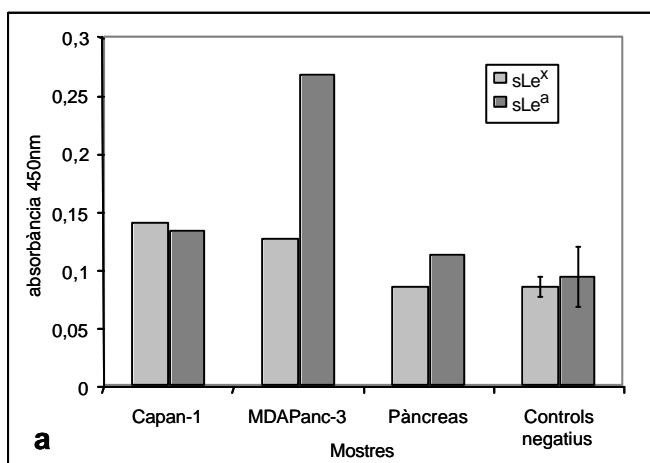


Figura I.10: Detecció de glicosilació de la RNasa 1 per ELISA sandvitx amb detecció dels antígens sLe^x, sLe^a (a) i Le^y (b). Es mostra la barra de la desviació estàndard del càlcul de la mitjana dels valors dels controls negatius.

La figura I.10a mostra que amb aquest assaig es detecten antígens sialilats només en mostres de RNasa 1 d'origen tumoral (medi de cultiu de línies cel·lulars d'adenocarcinoma pancreàtic) i no se'n detecta la presència en mostres de RNasa 1 de pàncreas de donant sa. L'antigen sLe^x és present en baixa proporció a la RNasa 1 del medi de Capan-1 i de MDAPanc-3, mentre que l'antigen sLe^a és present principalment a la RNasa 1 del medi de les cèl·lules MDAPanc-3.

Comparant la detecció de l'antigen Lewis^y, que presenta fucosa en la seva estructura, s'observa que aquest antigen és propi de la situació normal i és absent en la situació tumoral. Com es pot observar en la figura I.10b només hi ha resposta positiva per les mostres de pàncreas i no per a les de medi de cultiu de Capan-1 ni de MDAPanc-3

Aquests resultats corroboren els estudis previs del grup quant a la glicosilació de la RNasa 1 (Nan i col., 1998; Fernández-Salas i col., 2000), on es descrivia la presència d'àcid siàlic només en mostres d'origen tumoral i una elevada presència de fucoses en les mostres procedents de pàncreas de donant sa.

Aquest treball ha servit de base per a estudis posteriors de la glicosilació de la RNasa 1 present al sèrum (Barrabés, 2002), on es descriuen diferències en el patró bidimensional de les isoformes glicosilades de la RNasa 1 de sèrum d'un individu sa i les isoformes de la RNasa 1 de sèrum de pacients de neoplàsia pancreàtica.

4.3. Anàlisi de la glicosilació de la superfície cel·lular

Els antígens sialilats i fucosilats de la superfície de les membranes de les cèl·lules de carcinoma pancreàtic Capan-1 i MDAPanc-3 (fig. I.11) s'estudien mitjançant un ELISA utilitzant anticossos monoclonals contra els antígens tipus Lewis sLe^x i sLe^a.

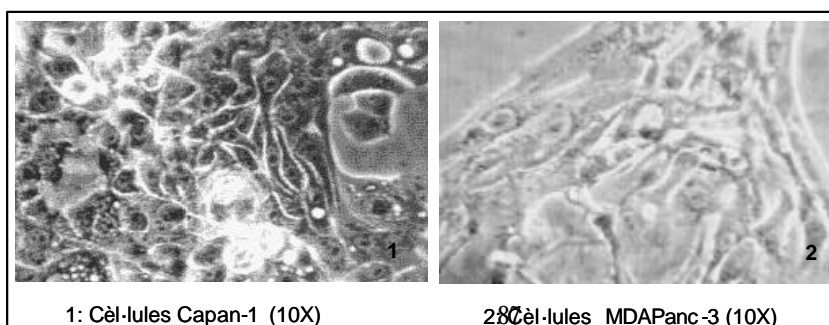


Figura I.11: Fotografies de les cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic utilitzades en aquest treball, sota microscopi de contrast de fases, a 10 augments.

Amb aquest assaig es poden determinar quines estructures glucídiques es troben a les glicoproteïnes i glicolípid de membrana. La detecció es realitza sobre les cèl·lules fixades en plaques de cultiu de 96 pouets després d'haver crescut fins a confluència.

S'ha observat la presència de l'antigen sLe^x sobre cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 i MDAPanc-3 i l'antigen sLe^a només sobre les cèl·lules MDAPanc-3, utilitzant com a controls cèl·lules de carcinoma mamari (MCF-7) que no expressen aquests antigens a membrana (fig. I.12). Aquests resultats es corresponen amb els descrits per Sinn i col. (1992) per immunocitologia, en que detectaven la presència de l'antigen sLe^x a la superfície de les cèl·lules Capan-1.

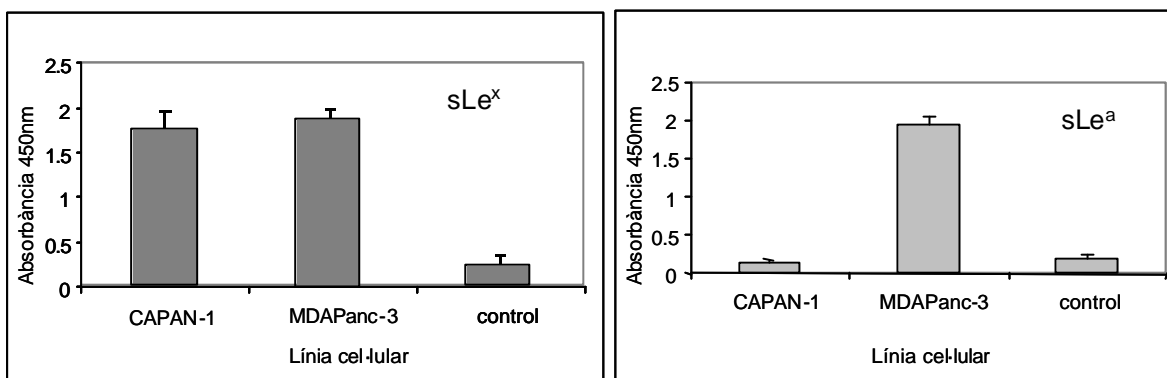


Figura I.12: ELISA sobre cèl·lules on es detecta la presència dels antigens sialilats sLe^x i sLe^a .

Els canvis en la glicosilació de les glicoproteïnes i glicolípid de membrana, concretament l'expressió de sLe^x i sLe^a , estan relacionats amb els estadis tardans de malignitat, que inclouen la invasió i la metastasi, ja que aquests antigens Lewis són lligands de l'E i la P-selectines, i permetrien la migració cel·lular emulant el sistema immunitari (Fukuda, 1996; Ohya i col., 1999), (fig. I.13).

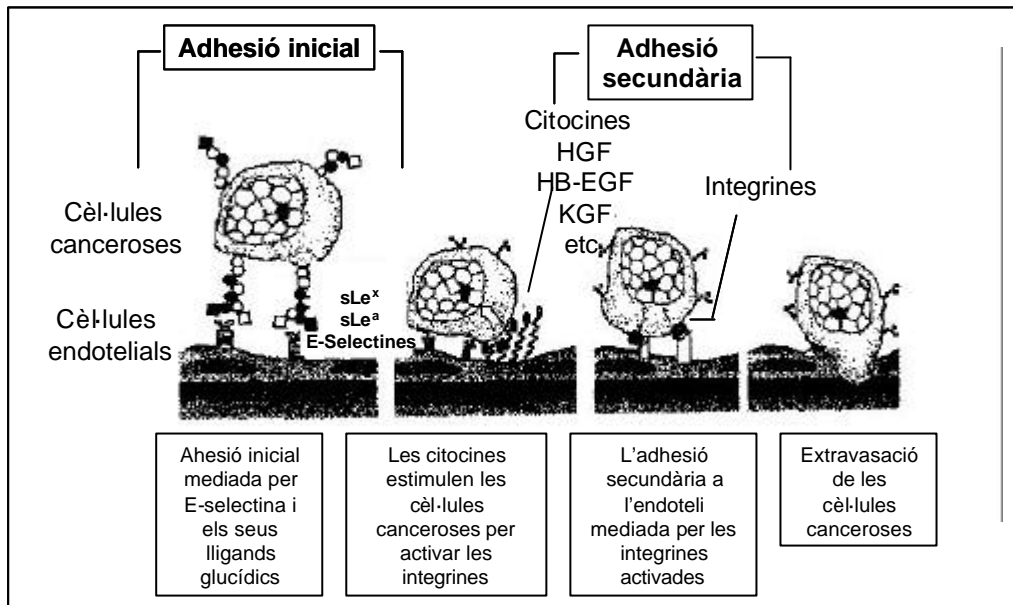


Figura I.13: Esquema del procés d'invasió i metàstasi on es troben involucrades les glicoproteïnes i glicolípids de membrana. Modificat de Kannagi (1997).

Els resultats obtinguts a l'ELISA sobre cèl·lules, quant a la presència d'antígens Lewis sialilats, s'adiuen amb el fet que les línies tumorals estudiades provenen d'una metàstasi a fetge d'un adenocarcinoma pancreàtic. D'aquesta manera sembla que la presència dels antígens sLe^x i sLe^a a les membranes d'aquestes cèl·lules es pot relacionar amb el fet que són línies cel·lulars metastàsiques i invasives.

Estudis immunohistoquímics sobre teixits de pàncreas normal i de càncer de pàncreas mostren l'expressió d'antígens relacionats amb Le^x en mostres tumorals i la presència d'antígens Le^y a la majoria de teixits normals (Kim i col., 1988; Sinn i col., 1992). Aquests resultats s'adiuen amb els trobats sobre la glicosilació de la superfície cel·lular de cèl·lules tumorals i sobre la glicosilació present a la RNasa 1 secretada per part d'aquestes.

S'observa la presència dels antígens sLe^x i sLe^a sobre les membranes cel·lulars i sobre la RNasa 1 secretada per aquests línies. Aquest fet suggereix que els canvis produïts en l'expressió de diferents glicosiltransferases presents a les cèl·lules tumorals, es poden observar tant en la glicosilació aberrant de la superfície cel·lular com en la glicosilació de proteïnes de secreció.

4.4. Purificació de RNasa 1 de medis de cultiu d'adenocarcinoma pancreàtic

Per tal d'establir i ampliar l'estudi de les diferències en la glicosilació de la RNasa 1 entre la situació normal i la tumoral es decideix purificar aquesta proteïna de pàncreas de donant sa i de medi de cultiu de diferents línies d'adenocarcinoma pancreàtic (Capan-1 i MDAPanc-3), per poder dur a terme la seva seqüenciació glucídica.

Protocols previs del grup havien permès la purificació de la RNasa 1 de pàncreas de donant sa i de medi de cultiu de diferents línies d'adenocarcinoma pancreàtic (Ribó i col., 1994; Fernández-Salas i col., 2000). No obstant, les quantitats de RNasa 1 obtingudes no eren suficients per a dur a terme una seqüenciació glucídica.

Per aquest motiu es decideix modificar algunes de les condicions dels protocols de purificació establerts (Fernández i col., 1994): S'augmenta la quantitat de medi de cultiu inicial, es milloren les condicions del protocol de concentració del medi de cultiu i la primera etapa de purificació per cromatografia de bescanvi iònic es substitueix per una cromatografia d'afinitat a heparina.

En aquest treball s'ha dut a terme la purificació de RNasa 1 de medi de cèl·lules MDAPanc-3. La ribonucleasa pancreàtica secretada per aquesta línia cel·lular d'adenocarcinoma pancreàtic es purifica a partir del medi de cultiu que es va recollint i emmagatzemant quan aquestes cèl·lules es troben confluents al flascó de cultiu.

El seguiment del procés de purificació es realitza mitjançant la quantificació de proteïna total pel mètode de Bradford i la quantificació de RNasa 1 per ELISA sandvitx. Alhora que la puresa es determina per gel d'electroforesi en poliacrilamida tenyit amb nitrat de plata i la presència d'activitat ribonucleolítica es detecta per zimograma.

Es parteix de 4L de medi de cultiu amb un contingut en proteïna de 7400mg i 97µg de RNasa 1.

Després de concentrar el medi per ultrafiltració tangencial fins a 20 vegades, el primer fraccionament comatogràfic es porta a terme amb una columna d'afinitat a heparina (fig. I.14), enlloc d'una cromatografia de bescanvi aniònic DEAE-*Sepharose* utilitzada anteriorment pel grup (Fernández, 1994). Aquest canvi suposa una millora perquè a causa del pH de treball de la cromatografia de bescanvi aniònic DEAE

(7.25), utilitzada anteriorment, es podrien perdre algunes fraccions de RNasa 1 de baix punt isoelèctric (pI) que quedessin unides a la reïna. Aquestes fraccions de baix pI són importants perquè serien les que presentarien àcid siàlic en l'arbre de glicosilació.

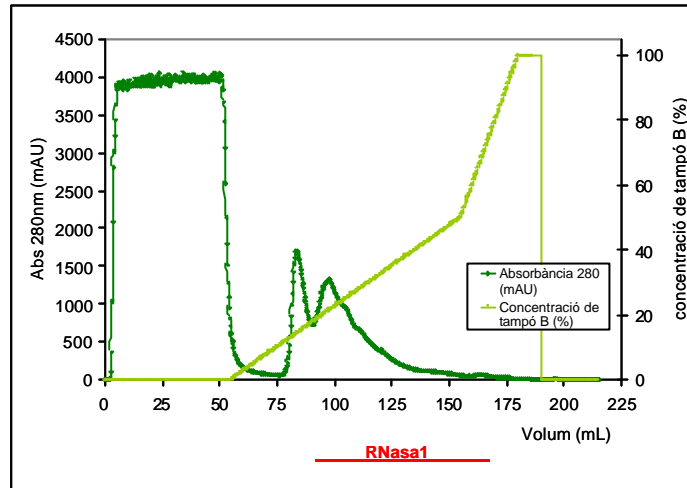


Figura I.14: Cromatograma de la purificació de RNasa 1 mitjançant una cromatografia d'afinitat a Heparina [La barra sota la figura indica les fraccions positives per presència de RNasa 1 amb detecció per zimograma].

Com es pot observar a la figura (I.14), gran part del contingut proteic no presenta afinitat a heparina, cosa que permet un primer pas cromatogràfic on es redueix molt el contingut de proteïna total i on no hi ha pèrdues apreciables de RNasa 1, ja que aquesta queda retinguda per afinitat a l'heparina i és eluïda mitjançant un gradient salí.

El següent pas cromatogràfic és una cromatografia de bescanvi catiònic Mono-S, que aprofita que la ribonucleasa al pH de treball (5.5) es troba amb càrrega positiva i serà retinguda i eluïda selectivament en aplicar un gradient salí (fig. I.15).

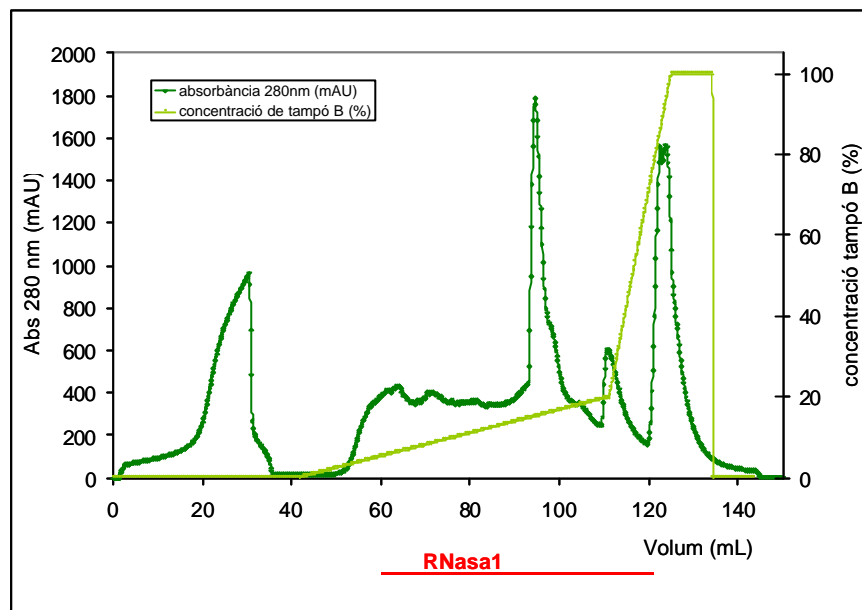


Figura I.15: Cromatograma de la purificació de RNasa 1 mitjançant una cromatografia de bescanvi catiónic Mono-S. [La barra sota la figura indica les fraccions positives per presència de RNasa 1 amb detecció per zimograma].

El darrer pas de purificació és una cromatografia de fase reversa Vydac-C4, en que les proteïnes s'elueixen depenent de la seva hidrofobicitat. Aquest darrer pas, a més de permetre una purificació total de la RNasa 1, és capaç de separar les diferents fraccions depenent del seu diferent grau de glicosilació, cosa que permetrà la divisió en RNasa 1 altament, mitjana i poc glicosilada (fig. I.16).

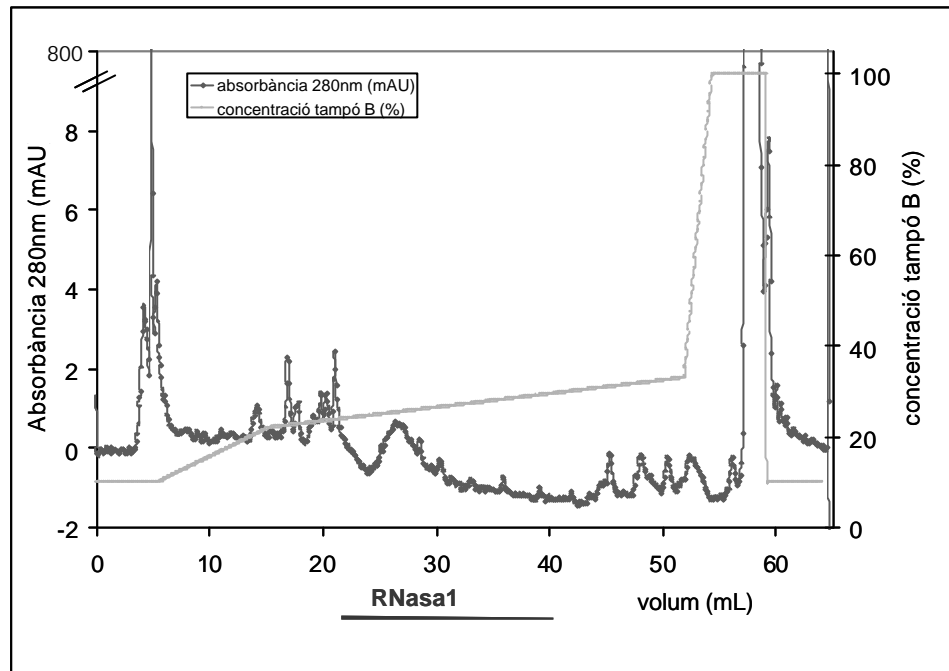


Figura I.16: Cromatograma de la purificació de RNasa 1 mitjançant una cromatografia de fase reversa Vydac-C4. [La barra sota la figura indica les fraccions positives (de 22 a 38) per presència de RNasa 1 amb detecció per zimograma].

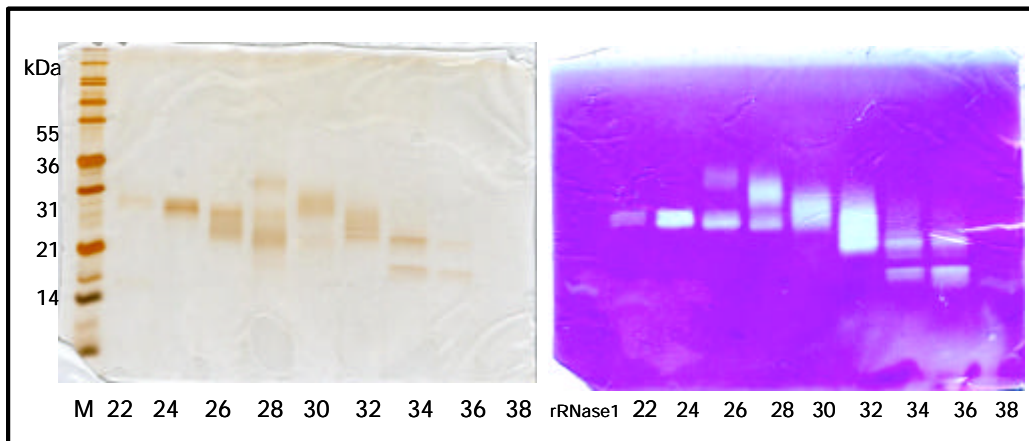


Figura I.17: Gel d'electroforesi en poliacrilamida tenyit amb nitrat de plata i zimograma de les fraccions positives per RNasa 1 obtingudes seqüencialment de la purificació a partir de medi de cultiu de cèl·lules MDAPanc-3, de la 22 a la 38. Com a referència s'han utilitzat marcadors de pes molecular conegut (M) i RNasa 1 recombinant (rRNase 1).

A la figura I.17 s'hi mostra l'esglaonament de bandes degut als diferents graus de glicosilació que presenta la RNasa 1 que s'obté seqüencialment de la cromatografia de fase reversa. S'hi pot observar, també, la puresa de les fraccions obtingudes després del darrer pas cromatogràfic. La puresa de la proteïna obtinguda es posa de

manifest comprovant que les bandes del zimograma on s'observa activitat són les mateixes que es detecten en un gel d'electroforesi per detecció de proteïnes amb nitrat de plata.

El resum del procés de purificació es mostra a la taula I.4.

Pas de purificació	Volum (mL)	Proteïna total (mg)	RNasa 1 total (mg)	Puresa (%)	Rendiment (%)
Medi de cultiu recollit	4000	7400	97	0.001	100
Medi de cultiu concentrat	200	7400	97	0.001	100
Cromatografia d'afinitat a Heparina	80	93	94	0.1	97
Cromatografia de bes canvi catiònic Mono-S	200	33	75	0.23	77
Cromatografia de fase reversa	6	-	12	100	12

Taula I.4: Resum de la purificació de RNasa 1 secretada per les cèl·lules MDAPanc-3.

Tal com es pot observar a la taula de purificació el rendiment és baix degut, principalment, a la darrera etapa cromatogràfica. Però s'obté suficient proteïna per portar a terme la seqüenciació parcial de les estructures glucídiques que presenta la RNasa 1 secretada per les cèl·lules MDAPanc-3 (Peracaula i col., 2003a).

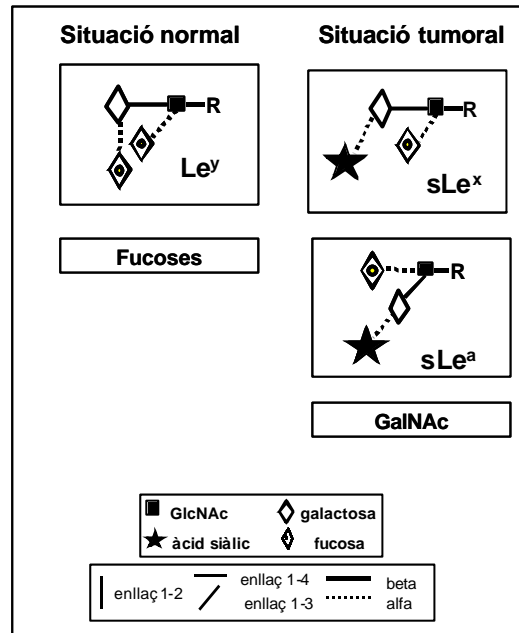
Les cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 secreten més RNasa 1 al medi de cultiu [66 ng/mL] (Mallorquí, 2003) que les MDAPanc-3 [24 ng/mL]. Els processos cromatogràfics seguits per a la purificació de la RNasa 1 d'ambdues línies cel·lulars són els mateixos.

La purificació de la RNasa 1 de diferents mostres: de pàncreas de donant sa i de medi de cultiu de línies d'adenocarcinoma pancreàtic, com Capan-1 o MDA-Panc-3, han permès la seqüenciació de les estructures glucídiques que presenta aquesta proteïna i comparar-les segons el seu origen (Peracaula i col., 2003a).

Així doncs, s'ha trobat que la composició en oligosacàrids d'aquestes mostres era molt diferent, sobretot pel que fa a la comparació dels antígens de grup sanguini del tipus Lewis. La RNasa 1 secretada per cèl·lules tumorals presenta estructures amb càrrega negativa com els antígens sLe^x o sLe^a i la purificada de pàncreas sa no presenta cap estructura sialilada. Una altra diferència entre la glicosilació de la RNasa 1 d'origen normal i tumoral és que la RNasa 1 purificada de pàncreas sa presenta més contingut en fucoses que la RNasa 1 d'origen tumoral, cosa que explica la presència

de l'antigen Le^y, entre d'altres. L'estructura GalNAc amb unió β trobada només en la RNasa 1 d'origen tumoral no es troba normalment en glicans del tipus *N* suggerint que l'expressió d'aquest tipus de glicans està relacionada amb una transformació maligna (Peracaula i col., 2003a), (taula I.5).

A la taula I.5 es resumeixen els resultats obtinguts de la seqüència glucídica de les diferents mostres de RNasa 1 pura.



Taula I.5: Resum de les diferències en les estructures glucídiques de la RNasa 1 purificada de pàncreas de donant (normal) i de medi de cèl·lules de carcinoma pancreàtic (tumoral).

Aquests resultats de seqüenciació corroboren els resultats obtinguts anteriorment mitjançant mètodes immunològics, com l'ELISA sandvitx de detecció de sucres sobre mostres que contenen RNasa 1 però sense purificar-la. Així doncs, s'està estudiant l'aplicació d'aquests mètodes de detecció d'estructures glucídiques de la RNasa 1 sobre mostres sèriques i determinar si es podria establir un mètode que permetés utilitzar la glicosilació de la RNasa 1 com a marcador per al càncer de pàncreas.

CAPÍTOL II:

L'ANTIGEN PROSTÀTIC ESPECÍFIC (PSA)

5. INTRODUCCIÓ

5.1. La glàndula prostàtica

La pròstata és una glàndula fibromuscular que envolta la uretra masculina i que està travessada per aquesta i els dos ductes ejaculatoris (fig. II.1a). La pròstata està dividida en diferents zones anatòmiques, el 95% de la glàndula constitueix la zona glandular distal, dividida alhora en perifèrica (P) i central (C), i el 5% que resta constitueix la zona proximal o zona de transició (T) (fig. II.1b). La pròstata és la glàndula accessòria més gran del sistema reproductor masculí. La seva secreció, juntament amb la de les vesícules seminals, contribueix al volum d'ejaculat.

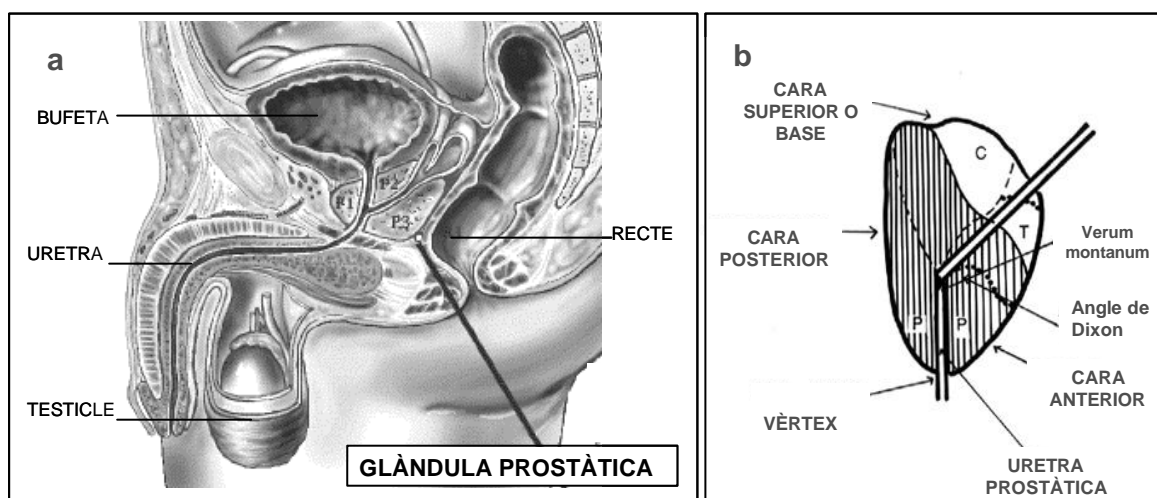


Figura II.1: a) Esquema anatòmic de la situació de la glàndula prostàtica en l'home. Extret i modificat de www.netdoctor.co.uk. b) Esquema d'un tall sagital de la pròstata amb la zona central (C), de transició (T) i perifèrica (P). Extret de <http://escuela/med.puc.cl>.

Les cèl·lules que formen l'epiteli prostàtic contenen abundant reticle endoplàsmic rugós, un prominent aparell de Golgi i molts grànuls de secreció.

A la llum de la glàndula prostàtica s'hi observen amb freqüència cossos amilacis o concrecions prostàtiques, que estan formats per glicoproteïnes, entre elles l'antigen prostàtic específic (PSA), i poden presentar, a més, dipòsits de calci (Fawcett, 2000).

La testosterona és la hormona responsable del creixement normal i de la funció del teixit prostàtic, a través de la seva conversió en dihidrotestosterona (DHT) per l'acció de l'enzim 5- α -reductasa. Més del 95% de la producció de testosterona té lloc

a les cèl·lules de Leydig dels testicles estimulades per acció de l'hormona luteïnizant. Gairebé el 90% de la testosterona que es difon a la pròstata és convertida en DHT.

5.2. Anomalies prostàtiques

5.2.1. La hiperplàsia benigna de pròstata (BPH)

La hiperplàsia benigna de pròstata (BPH) és una de les patologies prostàtiques més comuns, ja que afecta a més del 60% dels homes de més de 60 anys, però només dues terceres parts d'aquests en desenvoluparan els símptomes. Aquesta patologia està causada per un engrandiment de la pròstata, que pot provocar disfuncions de la bufeta urinària. La BPH es presenta principalment a la zona de transició (T) de la pròstata. Es coneix que els andrògens testiculars i l'edat són necessaris per al desenvolupament de la BPH, però encara se'n desconeixen els mecanismes moleculars (Ward i col., 2001; de la Rosette, 2000).

Fins ara, el diagnòstic es realitzava mitjançant l'examinació histològica del teixit extret per biòpsia o cirurgia, però Jacobsen i col. (2001) han portat a terme un estudi exhaustiu d'altres metodologies diagnòstiques utilitzades actualment. Així, des del punt de vista dínic i fisiològic, es realitzen qüestionaris sobre símptomes del tracte urinari i mesures del flux de micció i del volum prostàtic, donat que, en presència de BPH, la pressió exercida per la pròstata engrandida sobre la part proximal de la uretra pot causar una disminució en el flux urinari.

Pel que fa als nivells sèrics del marcador antígen prostàtic específic (PSA), entre el 25 i el 50% dels pacients de BPH presenten nivells de PSA superiors a 4ng/mL (Laguna i Alivizatos, 2000). El fet que la pròstata tingui un volum superior fa que els nivells de PSA en sèrum siguin més elevats degut a l'augment d'epiteli secretor. La forma del PSA lliure es troba en concentracions relativament superiors en el sèrum de pacients de BPH que de càncer de pròstata (Mikolajczyk i col., 2002).

El tractament que s'hi aplica sol ser el seguiment vigilat, la teràpia amb fàrmacs, les noves tècniques de cirurgia invasiva mínima i la cirurgia per a la ressecció transuretral de la pròstata. Algunes de les quimioteràpies utilitzades són el bloqueig del receptor d'andrògens o la inhibició de l'enzim 5- α -reductasa amb fàrmacs o per fitoteràpia (Ward i col., 2001; de la Rosette, 2000; Cabelin i col., 2000). La majoria de les teràpies quirúrgiques porten associat un augment dels nivells de PSA sèric. En

canvi, la quimioteràpia porta una disminució dels nivells de fins al 50% (Laguna i Alivizatos, 2000).

També s'ha de tenir en compte que la presència de BPH i la coexistència de BPH amb carcinoma prostàtic dificulta molt el diagnòstic específic d'aquestes patologies (Filella i col., 2000; Laguna i Alivizatos, 2000).

5.2.2. La neoplàsia prostàtica intraepitelial (PIN)

Una nova lesió descrita com a precursora del càncer de pròstata es relaciona amb un procés inflamatori i s'anomena atròfia inflamatòria. D'aquesta manera les cèl·lules amb atròfia inflamatòria esdevenen cèl·lules de neoplàsia prostàtica intraepitelial (PIN) i després es transformen en cèl·lules de càncer de pròstata, en perdre el gen protector GSTP1 (que codifica per una S-transferasa de glutatió), perquè es fan més susceptibles a danys per agents oxidants i carcinògens de l'ambient (Nelson i col., 2003).

La neoplàsia prostàtica intraepitelial (PIN) es caracteritza per la presència de cèl·lules atípiques limitant amb ductes d'arquitectura normal. Quan en una biòpsia s'hi troba un PIN d'alt grau, en el 30-50% de les següents biòpsies apareixerà càncer de pròstata. Com que el PIN no comporta un trencament de la membrana basal, la concentració sèrica de PSA no varia (Ward i col., 2001).

Un epitelí prostàtic normal pateix diferents alteracions cel·lulars, bioquímiques i genètiques portant a la formació d'una neoplàsia prostàtica intraepitelial, primer de grau baix i després d'alt grau.

El creixement de la cèl·lula epitelial prostàtica transformada és un fenomen dependent d'andrògens. Canvis genètics addicionals en PIN d'alt grau, porten a un càncer de pròstata amb creixement dependent d'andrògens i del que se'n pot seguir l'evolució amb mesures dels nivells sèrics del marcador tumoral antígen prostàtic específic (PSA) sèric (Agarwal, 2000); (fig. II.2).

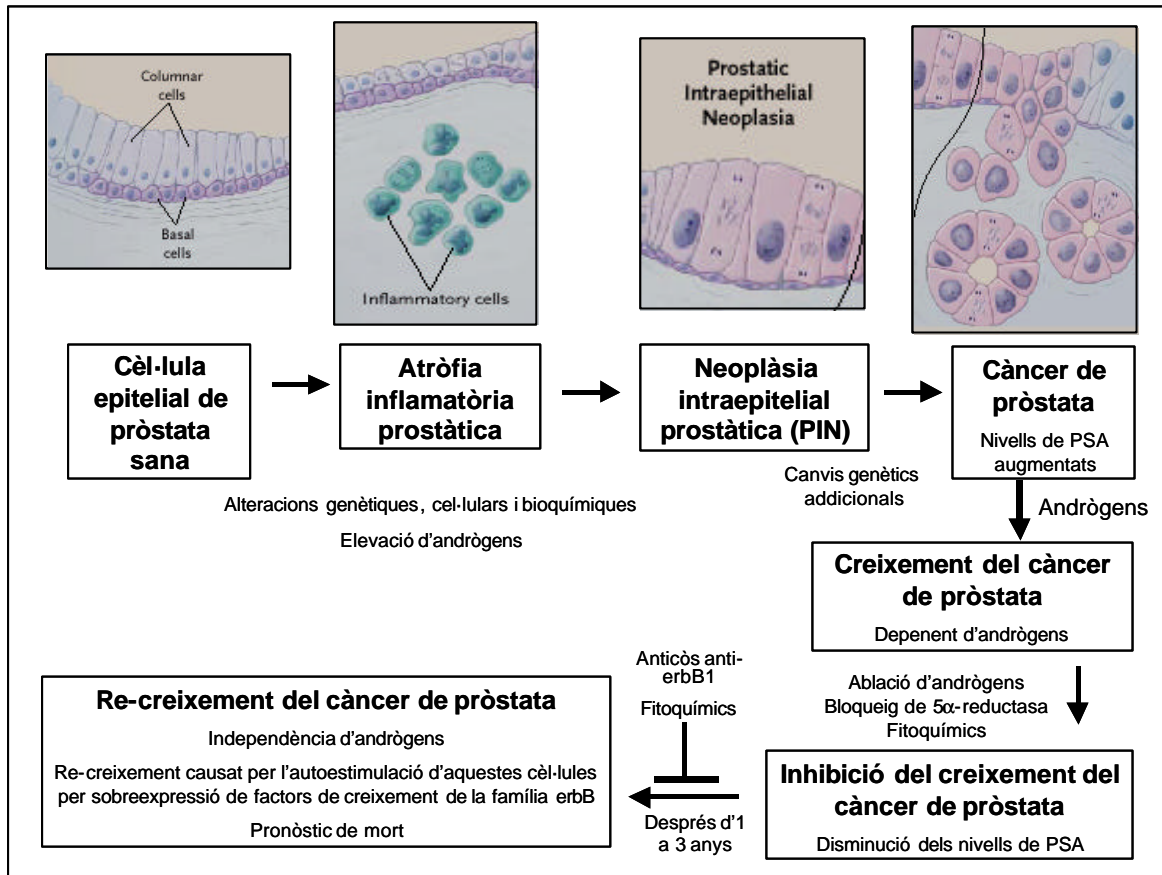


Figura II.2: Esquema del procés de gènesi del càncer de pròstata humà. Extret i modificat de Agarwal (2000) i de Nelson i col. (2003).

5.2.3. El càncer de pròstata

Incidència i mortalitat

El carcinoma prostàtic és el càncer més comú en els homes occidentals. És de creixement lent, cosa que fa que molts homes morin amb càncer de pròstata però no per causa d'aquest. El càncer de pròstata és el segon, pel que fa a morts per càncer al món (Moul i col., 2003), tot i que als Estats Units ocupa el cinquè lloc (Jemal i col., 2003). La prevalença d'aquest càncer és proporcional a l'edat, essent l'edat mitjana dels homes afectats de càncer de pròstata al voltant dels 72 anys (Ward i col., 2001). Alguns estudis han permès avaluar que fins a un 30% d'homes de més de 50 anys, i el 80% del majors de 80, presenten focus de càncer de pròstata no detectats, degut al lent desenvolupament del tumor (Brawer, 1999).

Aquest tipus de càncer mostra una incidència creixent deguda, principalment, a la correlació d'aquesta neoplàsia amb l'edat i al progressiu augment de l'esperança de vida de la població, així com a les millores en les tècniques de detecció (López-Otín i Diamandis, 1998).

La taxa d'incidència d'aquest càncer varia geogràficament. La màxima taxa d'incidència es troba als països escandinaus i la menor als països més orientals. També hi ha diferències racials, essent la taxa d'incidència superior en homes de raça negra (Súchil, 2001; Ward i col., 2001; Nelson i col., 2003).

L'any 2000 s'estimaren 60000 morts per càncer de pròstata a Europa, cosa que suposa un augment d'un 5% del risc de mort per aquesta patologia. Per països, Espanya es troba dins del grup de països amb més tendència a l'augment del risc de mort per càncer de pròstata en els propers anys (Boyle i col., 2003).

Pel que fa a la província de Girona, en l'estudi de la incidència del càncer de pròstata per poblacions, s'observa que la taxa d'incidència és de 18 casos cada 100000 homes i la seva distribució espacial es pot observar a la figura II.3.

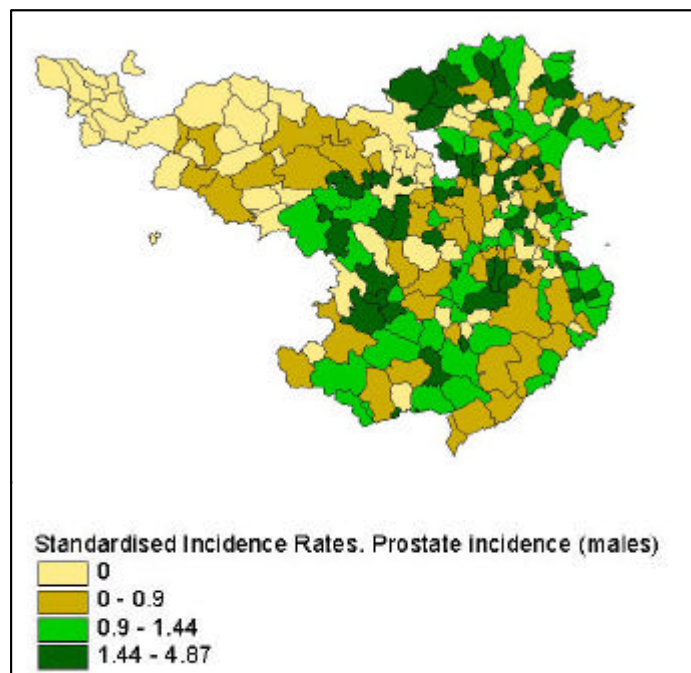


Figura II.3: Distribució espacial de la incidència de càncer de pròstata en els homes de la província de Girona, per poblacions. Gentilesa del Dr. M. Sáez de la Universitat de Girona.

S'ha observat certa tendència familiar en l'aparició d'aquest càncer, així com l'associació amb l'inici de la patologia precoçment en parents de primer grau. El consum d'alcohol sembla ser un factor de risc per al càncer de pròstata, principalment per l'acció depressora aguda que exerceix sobre els nivells de testosterona circulant. En canvi, tot i haver trobat nivells de testosterona més elevats en individus fumadors, no està clar que sigui un factor de risc per al carcinoma prostàtic (Súchil, 2001; Nelson i col., 2003).

Pel que fa a la presència d'una patologia prostàtica prèvia, es troba que aquesta està associada amb un risc superior de desenvolupar càncer de pròstata. Però la hiperplàsia benigna de pròstata (BPH) no sembla ser una condició precancerosa important perquè tendeix a presentar-se amb major freqüència a les zones periuretral i de transició i no a la zona perifèrica, on ocorren la majoria de tumors malignes (Súchil, 2001).

Característiques patològiques

Pel que fa a la patologia, el 95% dels càncers de pròstata són adenocarcinomes i la resta són sarcomes, limfomes, carcinomes de cèl·lules esquamoses o metàstasi d'altres orígens. El 80% dels tumors de pròstata s'originen a la zona perifèrica de la pròstata, la resta s'originen a la zona de transició (Ward i col., 2001).

El càncer de pròstata és una patologia multifocal en més del 85% de les prostatectomies. Després d'un creixement inicial localitzat a la glàndula prostàtica, el tumor penetra la càpsula que envolta la pròstata seguint els canals perineurals i limfàtics fins arribar als teixits periprostàtics. Les primeres metàstasi apareixen als primers nòduls limfàtics per obturació, després algunes cèl·lules metastàsiques circulants arriben a allotjar-se a l'esquelet i hi formen metàstasi osteoescleròtiques. Rares vegades es troben metàstasi a fetge, a bufeta o a glàndules adrenals (Ward i col., 2001).

Diagnòstic

Molts homes no tenen símptomes a l'hora del diagnòstic i són actius físicament i sexual. Pel que fa a la qualitat de vida dels pacients diagnosticats de càncer de pròstata, s'haurà de tenir en compte l'efecte psicològic i físic de la malaltia i del tractament. Els elements que més poden afectar a la qualitat de vida dels pacients diagnosticats de càncer de pròstata és la impotència i la incontinença urinària, i en molts pacients encara no diagnosticats, la ginecomàstia i el dolor de mames degut a la privació d'andrògens, poden causar algunes incomoditats. Tot i que aquests problemes són més greus en la teràpia anti-andrògens (Moul i col., 2003).

Actualment no existeix cap manera de prevenir el carcinoma prostàtic, per aquest motiu els esforços se centren en diagnosticar i tractar aquesta patologia el més aviat possible. Bàsicament s'utilitzen els nivells sèrics de l'antigen prostàtic específic (PSA) i el tacte rectal digital (DRE) per al diagnòstic d'aquesta patologia maligna.

Tradicionalment, el tacte rectal ha estat l'exploració més usada en el diagnòstic del càncer de pròstata. Es calcula que la biòpsia demostra la presència de càncer de pròstata en el 40-50% dels pacients amb tacte rectal positiu (Filella i col., 2000).

La majoria d'autors consideren que els nivells de PSA i el DRE són complementaris, ja que des de l'inici de l'ús del PSA combinat amb DRE, la majoria dels nous casos diagnosticats es troben confinats a l'organ i la incidència de metàstasi

ha disminuït, és a dir, ha augmentat la detecció de càncers potencialment curables (Nash i Melezinek, 2000).

El PSA és l'únic marcador tumoral que s'utilitza actualment per a dur a terme tests de garbell no invasius sobre poblacions, i que permet la detecció de càncers de pròstata microscòpics de manera precoç. Gràcies a això, si es millora l'especificitat d'aquest marcador, es podrien localitzar els individus que encara no han desenvolupat el càncer, però que ho faran, i poder fer-los un seguiment especial i aplicar-los una teràpia preventiva (Garnick i Fair, 1999; Brawer, 1999).

La utilitat del PSA en el diagnòstic precoç del càncer de pròstata ha de ser valorat en referència a quatre criteris: especificitat, és a dir, capacitat per a diferenciar entre càncer de pròstata i patologies benignes com la BPH, sensibilitat diagnòstica, complementarietat amb el tacte rectal i precocitat diagnòstica (Filella i col., 2000).

Estudis previs (Catalona i col., 1991 i Brawer i col., 1999) demostraren que nivells de PSA en sèrum superiors a 4ng/mL en homes de 50 anys o més estan associats amb aproximadament un 33% de possibilitats de detecció de càncer de pròstata en la primera biòpsia diagnòstica.

La definició d'un llindar de PSA planteja un dilema entre l'elecció d'un nivell que garanteixi la sensibilitat suficient i que ofereixi una elevada especificitat. Actualment s'accepta que pacients amb una concentració de PSA inferior a 4ng/mL, no cal que siguin sotmesos a biòpsia prostàtica, i que pacients amb concentracions de PSA superiors a 10ng/mL sí que hi han de ser sotmesos. Es defineix una zona gris per a concentracions de PSA sèric entre 4 i 10ng/mL (fig. II.4)

Malauradament, els nivells de PSA sèric no són específics. Fins a un 25% dels homes amb càncer de pròstata presenten una concentració sèrica de PSA normal (inferior a 4 ng/mL). Sense oblidar que més de la meitat dels individus amb concentracions altes de PSA no tenen càncer, podent patir altres malalties prostàtiques no malignes (Garnick i Fair, 1999).

Les prostatitis agudes i la BPH són les causes dels falsos positius que poden observar-se quan s'utilitza el PSA com a marcador tumoral (Filella i col., 2000).

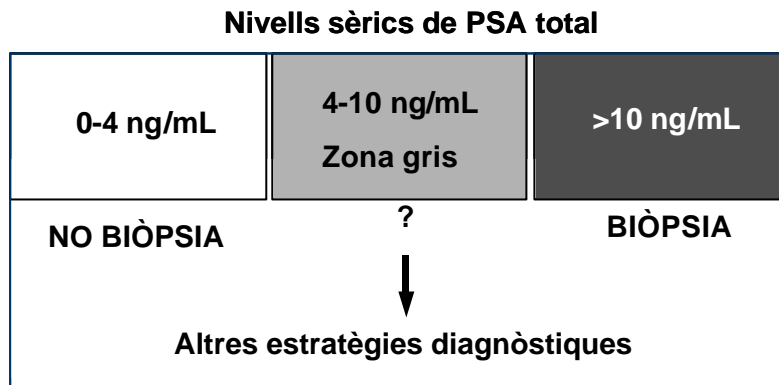


Figura II.4: Esquema de l'anomenada zona gris en les mesures de PSA sèric en el diagnòstic del càncer de pròstata. Extret de Filella i col. (2000).

Concentracions de PSA superiors a 100ng/mL abans de la prostatectomia són indicatius de metàstasi, en canvi, nivells per sota de 10ng/mL no solen estar associats amb un escàner ossi positiu (Diamandis, 1998).

Tractament

Tot i els avanços aconseguits en la detecció i en el tractament radical d'aquesta malaltia en estadis més inicials, la taxa de mortalitat no sembla haver disminuït (Ward i col., 2001). El tractament del càncer de pròstata és complex, a causa dels processos confinats a la glàndula. Les opcions són la radioteràpia, la prostatectomia radical o l'espera i seguiment de la malaltia. Per a processos metastàsics, el més utilitzat és la teràpia hormonal amb antiandrògens, tot i que la majoria de pacients sol escapar al control hormonal de la malaltia després de 2 o 3 anys d'haver-se iniciat la teràpia i la seva esperança de vida es veurà limitada a 6-9 mesos (Ward i col., 2001; Moul i col., 2003).

La teràpia hormonal sol aplicar-se quan s'observen nivells del marcador tumoral PSA superiors als normals després de prostatectomia o radioteràpia (Moul i col., 2003).

Aquest tractament consisteix, normalment, en la combinació de dues classes de fàrmacs: superagonistes de l'hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH) i antiandrògens (Garnick i Fair, 1999).

La 5- α -reductasa té un paper molt important en la carcinogènesi prostàtica. Els inhibidors d'aquest enzim representen una nova classe de compostos que

selectivament bloquegen l'activitat enzimàtica, sense afectar la resta de processos dependents de la testosterona (Súchil, 2001), com el cas del *finasteride* (Filella i col., 2000).

Després de prostatectomia radical, la concentració de PSA sèric baixa per sota de 0.01 ng/mL en les següents quatre setmanes (Ward i col., 2001). Però si es detecten nivells de PSA superiors a 0.1ng/mL, es relacionaran amb recurrència de la patologia, per presència de metàstasi i amb un mal pronòstic (Nash i Melezinek, 2000).

Fase independent d'andrògens

Després d'una reducció terapèutica dels nivells de testosterona i DHT, l'emergència del càncer de pròstata independent d'andrògens està associada amb a) mutacions al domini d'unió a lligand del receptor d'andrògens (AR), que permet una activació del receptor per altres lligands; b) un augment de l'expressió de receptors d'andrògens i c) una activació del receptor d'andrògens independent de lligand (Nelson i col., 2003; Feldman i Feldman, 2001). Aquestes modificacions en la independència d'andrògens també s'han suggerit en la metàstasi (Navone i col., 1999).

A més, el creixement independent d'andrògens suposarà una sobreexpressió de diferents factors de creixement que comportaran un avantatge proliferatiu a aquestes cèl·lules i el pronòstic serà de mort (Agarwal, 2000) (veure figura II.2).

5.3. L'antigen prostàtic específic (PSA)

El principal marcador tumoral utilitzat per al diagnòstic i seguiment del carcinoma prostàtic és l'antigen prostàtic específic (PSA). El PSA és la única molècula sèrica aprovada per la *United States Food and Drug Administration* per a utilitzar-la per a propòsits diagnòstics (Brawer, 1999).

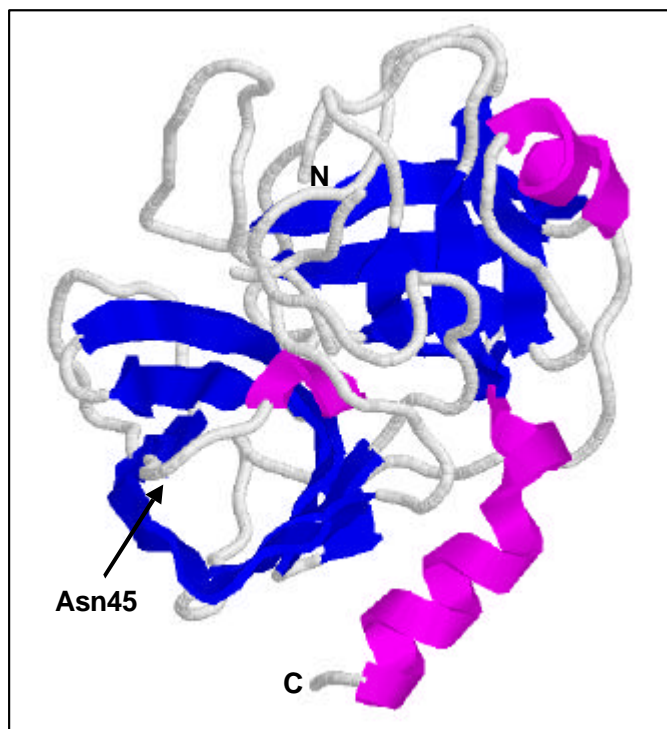


Figura II.5: Estructura tridimensional d'un modelat de l'antigen prostàtic específic on s'indica l'Asn45, lloc de N-glicosilació. Modificat de Coombs i col. (1998).

5.3.1. *Característiques generals*

L'antigen prostàtic específic o PSA és una glicoproteïna d'aproximadament 28kDa amb 237 residus aminoacídics i cinc ponts disulfur, i amb un punt isoelèctric mitjà de 7.3. Aproximadament el 8% de la seva massa molecular correspon a carbohidrats units a l'asparagina 45 amb una unió de tipus *N* (fig. II.5).

El PSA és una serín-proteasa amb activitat similar a la quimiotripsina perquè forma part de les proteïnes involucrades en el procés de líquefacció del fluid prostàtic. Aquest enzim digereix les proteïnes formadores de gel del fluid de la vesícula seminal, com la semenogolina I, II i la fibronectina (Yousef i Diamandis, 2001). Pertany a la família de les kalikreïnes humanes, que consta de 15 membres (Yousef i Diamandis, 2001). En concret el PSA és la kalikreïna humana 3 (hk3) i presenta un 80% d'homologia de seqüència amb la kalikreïna glandular o kalikreïna 2 (hk2) i un 63% amb la kalikreïna pancreatorenal o kalikreïna 1 (hK1) (Ward i col., 2001; Diamandis, 1998) (fig. II.6).

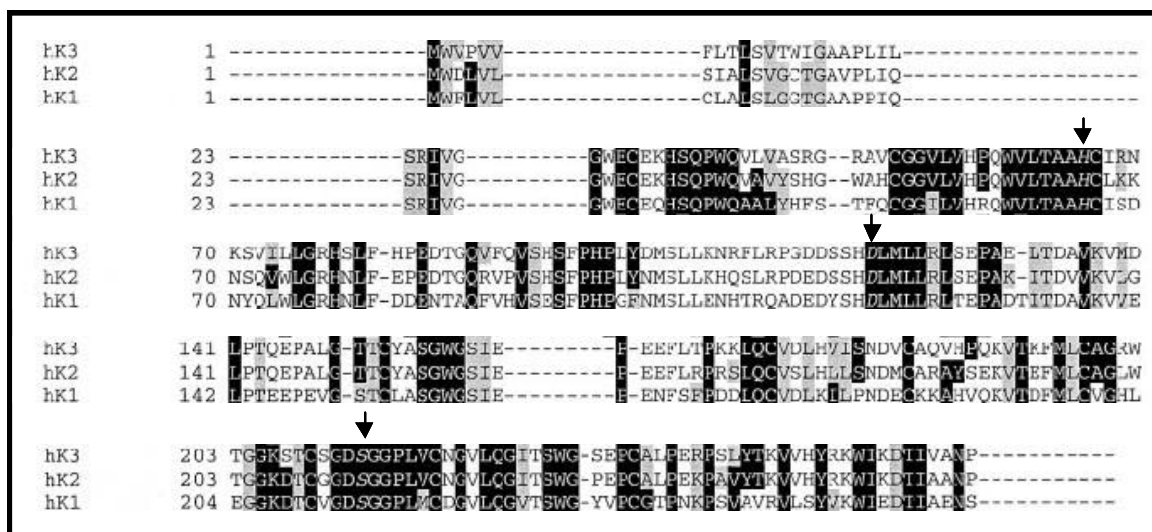


Figura II.6: Seqüències aminoacídiques comparades de les kalikreïnes humanes hK1,hK2 i hK3 o PSA [S'indiquen amb una fletxa els aminoàcids del centre catalític (H, D, S), els aminoàcids idèntics a les seqüències de totes les kalikreïnes humanes es troben marcats amb negre, els aminoàcids similars en totes les kalikreïnes humanes estan marcats en gris]. Extret de Yousef i Diamandis, (2001).

Els gens de les kallikreïnes es localitzen tots al cromosoma 19 (Yousef i Diamandis, 2001) i, concretament el de la kallikreïna 3 o PSA, està codificat per un gen de 6 kb constituït per 4 introns i 5 exons (Filella i col., 2000; Ward i col., 2001).

Les posicions dels residus de la triada catalítica de les serín-proteases estan conservades, amb la histidina (H) sempre prop del final de la segona regió codificadora, l'aspartat (D) al mig del tercer exó codificador i la serina (S) al principi del cinquè exó codificador (Diamanis i Yousef, 2002), (fig. II.6).

Les kallikreïnes són sintetitzades com a pre-pro-pèptids amb un pèptid senyal de 17 a 20 aminoàcids a la regió aminoterminal, seguida per un pèptid d'activació de 4 a 9 aminoàcids, seguit per la proteïna madura, enzimàticament activa (Diamanis i Yousef, 2002). El PSA és secretat normalment per les cèl·lules de l'epiteli luminal prostàtic en forma de proenzim (proPSA o pPSA). El pro-pèptid està constituït per un pèptid de 7 aminoàcids (APLILSR) unit a la regió N-terminal de la proteïna madura i s'escindeix extracel·lularment (Mikolajczyk i col, 2002). Estudis in vitro suggereixen que la hK2 activa el zimogen o forma proPSA, i la forma prohK2 (autoactivació), cosa que indicaria una possible funció de la hK2 com a reguladora de l'activitat del

PSA (Kumar i col., 2000). Aquest procés ocorre de manera molt eficient al plasma seminal, de manera que en aquest fluid no s'hi troben formes pPSA.

Regulació hormonal

Molts dels gens codificadors de kallikreïnes presenten una regulació hormonal (Yousef i Diamandis, 2001). Per exemple, el gen del PSA disposa de dos promotors a la part proximal, un dels quals conté un element de resposta a andrògens, que augmenta la transcripció de PSA (Filella i col., 2000) i, recentment, s'ha identificat una regió intensificadora que afecta a la transcripció del PSA sota l'inducció amb andrògens (Yousef i Diamandis, 2001).

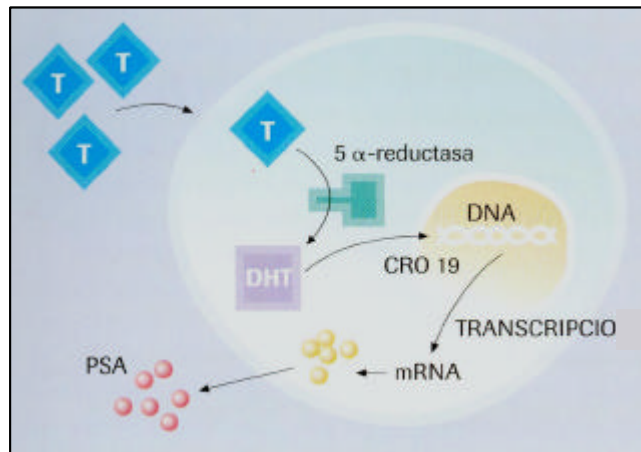


Figura II.7: Esquema dels processos involucrats en la secreció de PSA hormono-dependent que té lloc a les cèl·lules de la pròstata. [T: testosterona; DHT: dihidrotestosterona; CRO19: cromosoma 19]. Modificat de Filella i col. (2000).

El mecanisme d'expressió gènica de PSA induïda per andrògens comença quan la testosterona entra a les cèl·lules prostàtiques i es transforma en dihidrotestosterona (DHT) dins de la cèl·lula per acció de l'enzim 5 α-reductasa. Abans d'unir-s'hi la DHT, els receptors d'andrògens es troben inactius i, quan s'hi uneix la DHT, formen un homodímer amb una altra molècula de receptor activada per DHT. L'homodímer actiu s'uneix a unes zones del DNA de seqüència específica, anomenades elements de resposta a hormones (HRE). Aquesta unió porta a l'atracció d'altres molècules implicades en la maquinària de transcripció i en resulta un augment de diferents

proteïnes específiques, com el PSA, o d'altres que porten a la cèl·lula a entrar en divisió (Navarro Bosch i col., 2002), (fig. II.7).

El PSA a plasma seminal

El fluid prostàtic correspon a un 30% del volum de l'ejaculat, és acídic i ric en fosfatases àcides, zinc, magnesi, albúmina i calci, i la seva funció és la de suport als espermatozoides. L'epiteli ductal i acinar de la glàndula prostàtica és el responsable de la producció i secreció del PSA des d'on és abocat al plasma seminal a una concentració de 0.5-3.0 g/L (Diamandis, 1998).

Estudis del PSA present al plasma seminal mostren que la major part del PSA d'aquest fluid s'hi troba en la forma d'aproximadament 28kDa o forma lliure. Però aquesta forma no és homogènia, inclou PSA enzimàticament actiu (50-70%) i inactiu (30-50%) (Zhang i col., 1995). En aquest fluid apareixen fins a cinc isoformes de PSA, que difereixen en el seu grau de glicosilació, dues d'elles actives i les altres tres inactives o formes trencades (Ward i col., 2001). Les formes inactives de PSA inclouen diferents molècules de PSA amb un trencament en un enllaç peptídic, per acció d'altres proteases presents, que les fa inactives com a proteases. La conversió de pPSA a PSA és tant eficient que no s'han detectat formes de pPSA a plasma seminal (Mikolajczyk i col., 2002).

El PSA a sèrum

La concentració de proteïnes en el sèrum humà és de 57-80 g/L. La proteïna sèrica majoritària és l'albúmina, que representa aproximadament un 63% del contingut proteic del sèrum. Després, hi ha les immunoglobulines, amb un percentatge al voltant d'un 17%, i la resta correspon a 300 proteïnes diferents (González de Buitrago i col., 1998).

En homes normals la concentració de PSA trobada al sèrum és aproximadament un milió de vegades menor que la que es troba a plasma seminal (Diamandis, 1998).

El PSA es pot detectar en el sèrum de pacients amb lesions prostàtiques severes, com la inflamació de la glàndula prostàtica, la hiperplàsia benigna de pròstata (BPH) i el carcinoma prostàtic (Huber i col., 1995).

Hi ha barreres, com la membrana basal o l'endoteli capil·lar que eviten el pas del PSA del lumen prostàtic a la sang (fig. II.8). Però algunes d'aquestes capes de cèl·lules es veuen afectades en diferents processos patològics, com el càncer de pròstata, o la neoplàsia prostàtica intraepitelial, i la concentració de PSA sèric es veu augmentada (Brawer, 1999).

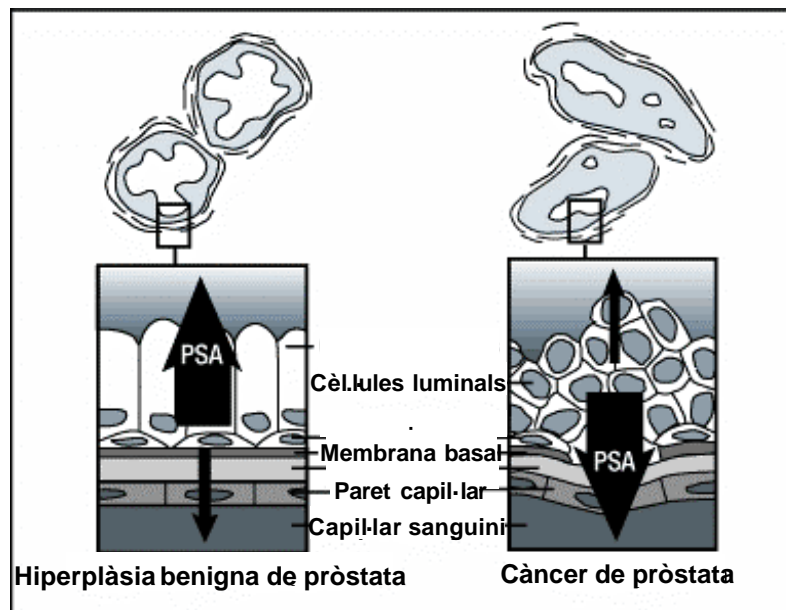


Figura II.8: Esquema del teixit prostàtic en situació benigna i maligna i la seva relació amb l'arribada de PSA a sang. Modificat de Brawer (1999).

La forma molecular majoritària en sèrum (un 45-95% del PSA immunoreactiu) és el PSA unit a l' α 1-antiquimiotripsina (ACT), formant un complex que presenta una massa molecular aproximada de 80-90kDa. El PSA lliure representa una proporció petita però variable del PSA total, aquest darrer es defineix com la suma del PSA lliure i del PSA unit. Fraccions menors de PSA existeixen com a complexos amb d'altres inhibidors de proteases, predominantment α 2-macroglobulina (A2M o AMG), l'inhibidor d'inter- α -tripsina (IATI), α 1-antitripsina (AAT) i inhibidor de proteïna C (PCI) (Diamandis, 1998; Mikolajczyk i col., 1997; Lilja i col., 1991; Ward i col., 2001); (taula II.1).

L'ACT és una proteïna de fase aguda membre de la família dels inhibidors de serín-proteases. És sintetitzada pel fetge i per l'epiteli bronquial i sembla que podria actuar com a agent anti-inflamatori (Goptu i col., 2000). Aquesta proteïna presenta

un pes molecular aproximat de 58kDa i un contingut en carbohidrats del 24%, que corresponen a tres llocs de glicosilació del tipus *N*. Les estructures glucídiques descrites per ressonància magnètica nuclear són del tipus disialilat biantenari amb àcid siàlic α -2-6 i trisialilat triantenari amb àcid siàlic α -2-6 majoritàriament, però també α -2-3 (Laine i col., 1991).

El PSA lliure es presenta al sèrum en tres formes, com a mínim, de PSA inactiu. Una forma s'ha identificat com el proenzim (proPSA o pPSA), i s'associa amb el càncer; una segona forma és un PSA trencat o degradat (BPSA), que s'associa amb la BPH; i la tercera forma (iPSA) està constituïda per moltes variants minoritàries similars al PSA intacte, però que tenen canvis a les conformacions estructurals que les fan enzimàticament inactives (taula II.1). Algunes d'aquestes formes inactives es correspon amb les trobades al plasma seminal (Mikolajczyk i col., 2002).

Aquest BPSA no és actiu perquè presenta un trencament en els enllaços peptídics de la Lys145 i la Lys182. Els nivells sèrics de BPSA es volen utilitzar en la millora del diagnòstic de la BPH, ja que es troba en concentracions relativament superiors en el sèrum de pacients de BPH que de càncer de pròstata (Mikolajczyk i col., 2002).

Formes de PSA unit	Característiques
PSA-ACT	Forma majoritària a sèrum. Es forma amb PSA actiu.
PSA-AMG	Forma no detectable immunològicament. Es forma amb PSA actiu.
PSA-IATI, PSA-AAT, PSA-PCI	Formes minoritàries a sèrum. Es formen amb PSA actiu.
Formes de PSA lliure	
pPSA	Zimogen de PSA amb el pro-peptid. PSA inactiu. La seva presència a sèrum s'associa a càncer.
BPSA	PSA inactiu per trencament o degradació. La seva presència a sèrum s'associa a BPH.
iPSA	Variants minoritàries de PSA inactiu però intacte.

Taula II.1: Taula de les diferents formes de PSA lliure i unit. Dades extretes de Mikolajczyk i col. (2002), Diamandis (1998), Lilja i col. (1991) i Ward i col. (2001).

El PSA a teixit

La forma majoritària de PSA en teixit prostàtic és el PSA lliure, independentment de l'origen del teixit (cancerós i no cancerós). La presència de PSA-ACT és menor del 5% (Jung i col., 2000). El treball de Samadi i col. (1999) suggereix que les

concentracions de PSA sèric són independents dels nivells de PSA cel·lulars mesurats en teixit.

S'ha identificat la presència de PSA en nivells molt baixos en teixits de diferents òrgans, com a mama, tiroides, glàndules salivars, pulmó i tràquea. També s'ha detectat a diferents fluids, a més dels ja comentats, com al fluid de quist mamari, aspirat de mama, llet de dona lactant, fluid amniòtic i extractes de tumor (Yousef i Diamandis, 2001).

El PSA a models cel·lulars de carcinoma prostàtic

Existeixen línies cel·lulars de càncer de pròstata (LNCaP, PC-3, DU-145) que provenen de metàstasi de càncers de pròstata; LNCaP de metàstasi a nòdul limfàtic (Horosewicz i col., 1983; ATCC no CRL-1740), PC-3 de metàstasi a òs (Kaighn i col., 1979; ATCC no CRL-1435) i DU-145 de metàstasi a cervell (Stone i col., 1978; ATCC no HTB-81). També s'han establert línies cel·lulars benignes immortalitzades, que es caracteritzen per la manca d'expressió de PSA, PAP i AR. Recentment, s'han establert dues línies cel·lulars de carcinoma prostàtic MDA-PCa2a i MDA-PCa2b (ATCC no CRL-2422), són línies originades d'una metàstasi òssia d'un càncer de pròstata que presentava un creixement independent d'androgen (Navone i col., 1999; Rajagopal i col., 1998). Cap d'aquestes línies establertes, excepte LNCaP, MDAPCa2a i MDAPCa2b responen a andrògens i expressen PSA i receptor d'andrògens (AR), (Mitchell i col., 2000; Navone i col., 1999).

Així doncs, la línia cel·lular de carcinoma prostàtic LNCaP és sensible a andrògens, secreta PSA i s'hi ha detectat el mRNA corresponent al PSA (Corey i col., 1998). Aquestes cèl·lules presenten una mutació en el domini d'unió a andrògens del receptor i no només responen a andrògens, sinó a antiandrògens, estrògens i progestines. Les cèl·lules LNCaP s'han vingut utilitzant com a model del càncer de pròstata perquè presenten característiques similars al càncer de pròstata metastàtic, ja que les mutacions en el receptor d'andrògens no són rares en aquesta patologia i algunes d'aquestes mutacions augmenten la sensibilitat d'aquestes cèl·lules a les hormones (Navone i col., 1999; Lee i col., 1995).

Segons Corey i col., (1998), el PSA secretat per les cèl·lules LNCaP no es troba en forma complexa amb ACT, tot i que les cèl·lules LNCaP produeixen baixes concentracions d'ACT. Però Wu i col. (1998) detecten que una petita part del

complex PSA-ACT es forma dins de la cèl·lula i que fora de la cèl·lula es pot formar el complex amb l'ACT del sèrum boví fetal del medi de cultiu. Altres estudis observen que només un terç del PSA lliure secretat pot unir-se a ACT afegit, perquè només s'uneix a les formes ezimàticament actives de PSA, i que al medi de les cèl·lules LNCaP hi ha una concentració important de la forma zimògena del PSA, el pPSA (Väisänen i col., 1999).

També s'han establert alguns models en ratolins xenògrafs, que també conserven les característiques de dependència d'hormones i de secreció de PSA, però que no poden proliferar *in vitro* (Navone i col., 1999).

5.3.2. El PSA com a glicoproteïna

L'oncogènesi està sovint relacionada amb canvis a les estructures glucídiques (Fukuda, 1996), d'aquí que molts marcadors glucídics s'han utilitzat en la caracterització de carcinomes humans (Hakomori, 1996). La glicosilació es considera una modificació post-traducciona involucrada en la modulació de la secreció de diverses proteïnes (Samadi i col., 1999).

A nivell transcripcional, la seqüència aminoacídica del PSA és la mateixa en situació normal, de carcinoma prostàtic o de BPH, però sembla que les modificacions postraduccionals són les responsables de canvis estructurals i funcionals del PSA en les diferents situacions. D'entre ells, la glicosilació és una important modificació per a determinar el procés de secreció de PSA (Samadi i col., 1999).

PSA de plasma seminal

Per ressonància magnètica nuclear (RMN), s'ha descrit que el PSA secretat a plasma seminal conté una cadena oligosacàrida majoritària de tipus complex amb unió de tipus *N* biantenària amb àcid siàlic α -2-6, i on un 70% de les molècules contenen un residu de fucosa amb unió α -1-6 a l'*N*-acetilglucosamina del nucli principal (fucosa *inner core*), (fig. II.9) (Bélanger i col., 1995).

El PSA de plasma seminal mostra heterogeneïtat de càrrega degut a que el grau de sialilació és variable i aquestes diferències queden paleses en el pI. Zhang i col. (1995), purifiquen de plasma seminal dues formes majoritàries de PSA i les caracteritzen per isoelectroenfoc. Una d'aquestes formes té un pI 7.2 i representa un 5-10% del total i la resta presenta un pI de 6.9. Després de digerir els terminals siàlics, el pI de tot el PSA és aproximadament 7.7.

Okada i col. (2001) digereixen l'àcid siàlic del PSA de plasma seminal i en seqüencien la resta de sucres per digestió amb glicosidases. Aquests autors detecten més formes oligosacàrides que Bélanger i col (1995), perquè el mètode que utilitzen de purificació i seqüenciació és més sensible, però en les formes majoritàries coincideixen. Observen que l'àcid siàlic es troba unit a les estructures Gal β 1-4GlcNAc. També detecten l'estructura GalNAc β 1-4GlcNAc, trobada en poques proteïnes de vertebrats, i que les fucoses detectades són del nucli principal (*inner core*), no en detecten d'unides a les branques externes de l'estructura oligosacàrida.

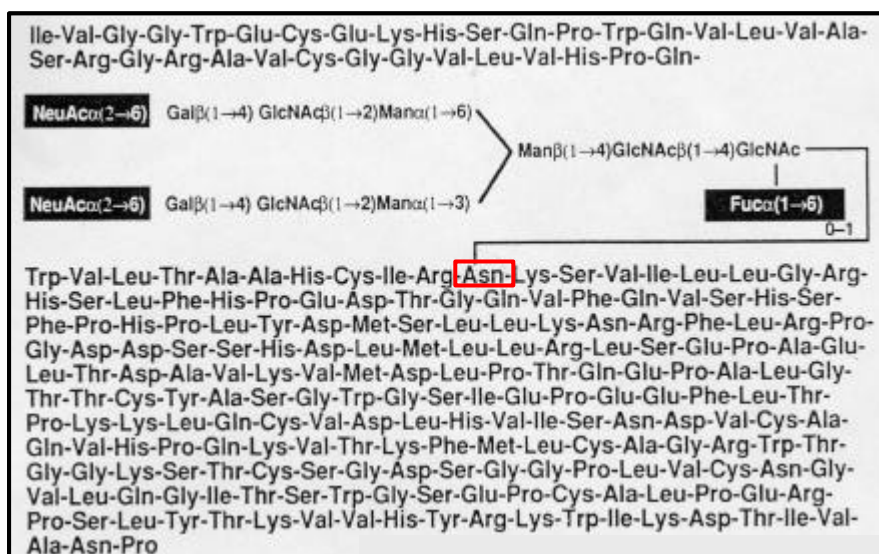


Figura II.9: Esquema de l'estructura aminoacídica del PSA de plasma seminal i de l'estructura glucídica majoritària seqüenciades per RMN. [Fuc: fucosa; NeuAc: àcid N-acetil neuramínic o àcid siàlic; Gal: galactosa; Man: manosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina]. Modificat de Bélanger i col. (1995).

PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP

En situació tumoral, s'ha caracteritzat parcialment per electroforesi d'oligosacàrids en gel de poliacrilamida el PSA de la línia cel·lular LNCaP. Presenta una cadena oligosacàrida de tipus biantenari, triantenari i potser tetraantenari (Prakash i Robbins, 2000).

PSA sèric

Huber i col. (1995), per cromatofoc, determinaren que existeixen certes diferències en el pI del PSA de sèrum de pacients de BPH (pI 7.0 o inferior) i de pacients afectats de carcinoma prostàtic (pI superior a 7.3). Alhora, després de tractaments amb sialidases, determinaren que els isoenzims de PSA de sèrum d'un pacient de BPH porten més residus d'àcid siàlic que el PSA que prové de sèrum de pacients amb càncer de pròstata, el que explica els diferents valors de pI observats.

PSA tissular

Sumi i col. (1999) per cromatografia seriada amb diferents lectines caracteritzaren el PSA de teixit prostàtic de pacients de neoplàsia prostàtica i de BPH. Els resultats

obtinguts mostren que les estructures multiantenàries de tipus complex amb unió GlcNAc β 1-4 es troben augmentades en teixit de neoplàsia prostàtica i que les cadenes biantenàries de tipus complex amb o sense fucosa a l'estructura principal es troben augmentades en teixit de BPH. Això suggereix que l'enzim N-acetilglucosaminil-transferasa IV, que afegeix GlcNAc a les cadenes oligosacàrides amb unió β 1-4 i converteix les estructures biantenàries en multiantenàries, es troba expressat en nivells més elevats en teixit de neoplàsia prostàtica.

5.3.3. L'antigen prostàtic específic com a marcador tumoral

Com s'ha indicat a l'apartat 1.2.3., el PSA s'utilitza actualment com a marcador per al diagnòstic del càncer de pròstata.

Els assaigs immunològics comercials utilitzen la proporció 90:10 de PSA-ACT i PSA lliure per als controls de calibració de PSA total, establerts com a Estàndard Internacional (Ward i col., 2001). Per als assaigs immunològics de PSA s'ha de tenir en compte que la vida mitja del PSA total és de 3 dies i la del PSA lliure és de 0.8 dies, i que les mostres sèriques per a la mesura de PSA s'han de recollir abans de l'examen per tacte rectal digital (DRE) i de l'ejaculació per evitar falsos resultats (Ward i col., 2001).

Els anticossos utilitzats en aquests assaigs immunològics reconeixen alguns dels epítops que presenta el PSA. Quatre d'aquests epítops s'han localitzat temptativament als residus aminoacídics 1-13, 53-64, 80-91 i 151-164. L'altre epítop determina els anticossos específics per al PSA lliure unint-se al loop de les kalikreïnes entre els residus 84-91. Aquest darrer domini incorpora el centre actiu i es bloqueja quan es forma el complex amb l'ACT (Ward i col., 2001; Diamandis 1998; Yousef i Diamandis, 2001).

Actualment, en el diagnòstic del càncer de pròstata es combinen les mesures de PSA total i lliure amb el tacte rectal digital (DRE). Seguint l'esquema de Filella i col. (2000), representat a la figura II.10, s'hauria de realitzar una biòpsia de la pròstata a aquells pacients amb tacte rectal positiu, o bé, quan el tacte rectal és negatiu, i el PSA total és superior a 10ng/mL. També quan l'índex de PSA és inferior al 20%, essent els nivells de PSA total entre 4 i 10 ng/mL.

L'índex de PSA es defineix com el PSA lliure expressat com a percentatge del PSA total. Es detecten proporcions més baixes de PSA lliure en el carcinoma prostàtic que en la BPH. Adoptant un llindar del 25% en l'índex de PSA, es redueixen les biòpsies negatives fins a un 30% amb una pèrdua acceptable de sensibilitat (fig. II.10), però aquest índex de PSA és vàlid només per concentracions de PSA total entre 3 i 10 ng/mL i hi poden haver resultats erronis en pacients amb metàstasi o d'estadis tardans (Ward i col., 2001). Tot i això, aquest índex permet determinar que el risc de desenvolupar un càncer de pròstata en 10 anys és baix si el PSA total és menor a 3ng/mL i l'índex PSA lliure / PSA total és menor al 18% (Stephan i col., 2000).

La raó de perquè el ratio PSA lliure/ PSA total és diferent en els pacients de carcinoma prostàtic encara no està clara a nivell molecular, però a nivell cel·lular hi ha algunes hipòtesis: (1) una síntesi d'ACT superior a les cèl·lules neoplàsiques que a les benignes, observada per immunohistoquímica; (2) la secreció en diferents proporcions de PSA enzimàticament inactiu, que reaccionarà de manera diferent amb l'ACT circulant; (3) l'alteració de les estructures glucídiques del PSA a les cèl·lules neoplàsiques, portant a diferències en les taxes d'eliminació de la sang d'aquestes formes de PSA i a diferències en el punt isoelèctric del PSA sèric d'origen normal i tumoral (Jung i col., 2000; Stephan i col., 2000).

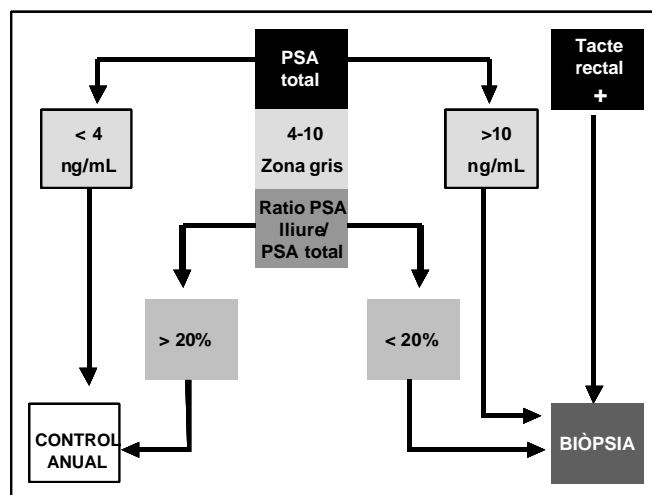


Figura II.10: Esquema dels procediments portats a terme segons els nivells de PSA total i lliure mesurats i segons els resultats del tacte rectal. Extret de Filella i col. (2000).

Tanmateix, l'estratègia diagnòstica actual no presenta una especificitat suficient, per aquest motiu s'estudien diverses aproximacions per a la millora del diagnòstic del càncer de pròstata.

5.3.4. Aproximacions per a la millora de la utilització del PSA com a marcador tumoral

El punt de tall acceptat pel PSA (4ng/mL de PSA total) a l'hora de diferenciar entre una situació benigna i una maligna suposa un 65% de falsos positius, perquè el PSA és òrgan-específic però no càncer-específic. Concentracions elevades de PSA s'observen en neoplàsies prostàtiques, però també en BPH, neoplàsia prostàtica intraepitelial (PIN), isquèmia prostàtica, prostatitis aguda i crònica i després d'una manipulació clínica. Alhora que aproximadament entre un 20% dels pacients amb neoplàsia prostàtica presenten nivells de PSA inferiors a 4ng/mL en el moment del diagnòstic (Stephan i col., 2000). L'especificitat és un problema, ja que només entre un 25 i un 30% dels pacients amb nivells de PSA anormals, que es sotmenten a biòpsia tenen realment un carcinoma (Brawer, 2000).

Els càncers prostàtics en estadis inicials mostren nivells de PSA sèric similars als trobats en pacients amb BPH, per aquest motiu es fa palesa la necessitat de millorar l'especificitat de les mesures de PSA (Huber i col., 1995).

La taxa de proPSA respecte a PSA total també s'ha estudiat com a possible millora del diagnòstic amb PSA. S'ha observat una elevació dels nivells de proPSA en el càncer de la zona perifèrica respecte de nivells de proPSA gairebé indetectables a la zona de transició, suggerint una relació més directa entre el proPSA i el càncer de pròstata que amb la BPH. Encara no es coneix, però, perquè l'activació de proPSA a PSA és diferent en els teixits d'aquestes patologies (Stephan i col., 2000).

S'ha observat en teixits de càncer de pròstata la presència de formes truncades de pPSA. Són formes que contenen un propèptid de 2, 4 o 5 aminoàcids, enlloc de 7. Aquestes formes són el resultat de trencaments proteolítics post-traduccionals i són enzimàticament inactives (Mikolajczyk i col., 2002).

La densitat de PSA és la relació entre la concentració de PSA i el volum de la pròstata mesurat per la tècnica d'ultrasons transrectals. Valors elevats es relacionen amb càncer de pròstata i valors baixos amb hiperplàsia benigna. El seu valor

potencial seria sobre pacients amb nivells de PSA entre 4-10ng/mL i un tacte rectal digital (DRE) negatiu, però estudis clínics no han trobat cap avantatge quant a la sensibilitat (Ward i col., 2001).

La velocitat del PSA és el canvi dels nivells de PSA sèric al llarg del temps. Aquesta mesura és útil en homes on un procés benigne avança fins a un càncer de pròstata, perquè els nivells de PSA augmenten de manera més ràpida en aquests casos. Però la sensibilitat no és prou important perquè s'ha de tenir en compte la variació biològica pròpia de l'òrgan i la metodologia per a mesurar els nivells de PSA (Brawer, 1999). Malgrat això, velocitats per sobre de 0.75ng/mL per any es consideren indicatius de malignitat (Ward i col., 2001).

Una altra aproximació que representa una certa millora de l'especificitat és la relació entre el PSA total i el complexe, però tampoc assoleix millores significatives de la sensibilitat (Brawer, 1999).

5.3.5. Altres molècules com a marcadors del càncer de pròstata

Actualment es tendeix més a l'estudi de noves molècules com a marcadors del càncer de pròstata que a la millora dels assaigs que detecten PSA, els seus derivats o les seves diferents formes (Brawer, 1999).

La fosfatasa àcida prostàtica (PAP) és un antigen de diferenciació específic de l'epiteli prostàtic. És un dímer proteic d'aproximadament 100kDa amb activitat histidina fosfatasa amb tres llocs de N-glicosilació del tipus ric en manoses i complexe. La seva secreció és estimulada per andrògens. És el marcador per càncer de pròstata que s'utilitzava abans que el PSA, però actualment no s'utilitza. Freqüentment es troba elevat en el sèrum de pacients de carcinoma prostàtic i correlaciona amb la progressió del tumor (Lin i col., 2000).

L'antigen prostàtic específic de membrana (PSMA) és una glicoproteïna transmembrana de tipus 2 de 750 residus aminoacídics, un pes molecular aparent de 110kDa i 10 llocs potencials de N-glicosilació.

És un marcador de l'epiteli prostàtic i apareix més freqüentment expressat en els càncers més agressius. Actualment s'estan desenvolupant assaigs immunològics per a la seva detecció i s'han observat nivells elevats de PSMA en pacients amb carcinoma prostàtic. A més, en pacients a qui s'ha practicat una prostatectomia radical, s'hi observa un augment dels nivells de PSMA en aquells pacients on progressa la malaltia, i una caiguda dels nivells en els pacients que presenten un retrocés. El PSMA també s'utilitza per a localitzar cèl·lules prostàtiques circulants i és la base d'una nova aproximació immunoterapèutica per al càncer de pròstata avançat (Brawer, 1999).

La kalikreïna humana 2 (hK2) és una serín-proteasa amb activitat del tipus tripsina, de la mateixa família que el PSA (o hK3) i també secretada per l'epiteli prostàtic. Sembla que actua sobre el trencament del pro-PSA cap a la seva forma activa. S'ha detectat per immunohistoquímica en teixits de carcinoma prostàtic i també a sèrum. S'ha observat, com pel PSMA, un augment de la intensitat del marcatge des de l'epiteli prostàtic benigne fins a la neoplàsia prostàtica intraepitelial i el carcinoma (Brawer, 1999). Actualment s'estan desenvolupant assaigs immunològics de detecció de hK2 en sèrum que han millorat l'especificitat dels assaigs amb PSA total en homes amb nivells de PSA total superiors a 3 ng/mL, que inicialment no eren diagnosticats de càncer de pròstata (Becker i col., 2003).

Les concentracions en sèrum de hK2 representen entre l'1 i el 2% de les concentracions de PSA. Si s'utilitza sola, la hK2, és un marcador tumoral pitjor que el PSA. Tanmateix, la relació hK2 / PSA lliure és més elevada en el càncer de pròstata que en la BPH (Stenman i col., 2000).

Processos de glicosilació aberrant en cèl·lules tumorals poden contribuir a la síntesi d'estructures glucídiques tals que a les cèl·lules transformades augmenten els nivells d'àcid siàlic a la seva superfície. Alhora s'ha descrit una elevació de l'àcid siàlic total en sèrum en pacients de càncer de pròstata comparats amb pacients controls i s'ha observat un augment dels nivells d'àcid siàlic associat a lípids en pacients amb metàstasi, comparat amb pacients sense metàstasi. D'aquí que Romppanen i col. (2002) hagin descrit un model de combinació complexa de nivells de PSA, relació

PSA total i PSA lliure, valors d'àcid siàlic total i tacte rectal, que permet discriminar pacients de càncer de pròstata de pacients amb BPH.

A més de tots aquests possibles marcadors tumorals per a la pròstata, el factor de creixement de tipus insulina IGF-1 sembla que promou el desenvolupament de la BPH i els factors de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) podrien donar informació sobre el risc del càncer de pròstata, donat que són factors de creixement angiogènics (Stenman i col., 2000). Tanmateix, altres autors suggereixen que els nivells de IGF-1 correlacionen positivament amb el risc de desenvolupar càncer de pròstata i podrien ser útils com a estratègia de prevenció en individus de risc. En aquest sentit, han fet evident que el PSA pot accelerar la carcinogènesi de la pròstata perquè trenca la proteïna d'unió a IGF-1 (IGFBP3), alliberant-ne el IGF1, que és una molècula mitogènica per a les cèl·lules estromals i epitelials de la pròstata. El PSA també pot activar el factor de creixement transformant (TGF- β), que estimula l'adhesió cel·lular i facilita l'extensió del tumor (Bok i Small, 2002).

També s'ha utilitzat la detecció del mRNA codificant per PSA present en el sèrum de pacients de carcinoma prostàtic per veure si existia alguna relació entre l'expressió de PSA a les cèl·lules circulants i l'estadi d'evolució de la malaltia, si era confinada a l'òrgan o s'hi presentaven metàstasi, però la relació no va resultar significativa (Llanes i col., 2000).

Estudiant la Biologia Molecular del càncer de pròstata, González-Espinosa i col. (2002), proposaren alguns marcadors moleculars alterats com a factors pronòstic d'aquesta patologia, per exemple, la sobreexpressió de la proteïna codificada pel gen *bcl-2*, que prolonga la supervivència de les cèl·lules tumorals, la proteïna producte del gen *p53*, implicada en mecanismes de reparació de DNA, de regulació de l'apoptosi i de control del cycle cel·lular, o el gen *ki-67*, l'expressió del qual és superior en PIN que en BPH, o el gen supressor de tumor *rb*, l'alteració del qual porta una desregulació de l'inici del cycle cel·lular. Les alteracions d'aquests gens s'utilitzen com a marcadors de progressió de la malaltia en peces quirúrgiques de pacients amb càncers confinats a la pròstata.

En el present treball s'aborda l'estudi de la glicosilació del PSA com a possible millora de l'especificitat d'aquest marcador pel càncer de pròstata. Es caracteritza a nivell glucídic el PSA de diferents fluids biològics, que permetin la comparació entre la situació benigna i la maligna.

4. OBJECTIUS

L'estudi de l'antigen prostàtic específic (PSA) s'ha centrat en dos objectius principals:

1. Purificar i analitzar les estructures glucídiques del PSA purificat de:
 - 1.1. Medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP i de plasma seminal de donant sa.
 - 1.2. Sèrum d'un pacient afectat de neoplàsia prostàtica.
2. Establir mètodes de detecció de la glicosilació del PSA en diferents fluids biològics, sense purificar-lo prèviament:
 - 2.1. En plasma seminal de donant sa i medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP.
 - 2.2. En sèrum de pacients afectats de neoplàsia prostàtica.

5. MATERIAL I MÈTODES

5.4. Material bàsic

El material bàsic utilitzat és el mateix que per al capítol I del present treball.

5.5. Caracterització glucídica del PSA

5.5.1. Immunoadsorció indirecta seguida de detecció per transferència tipus western

El sèrum humà és molt ric en proteïnes (González de Buitrago i col., 1998) i el PSA hi és en molt baixa concentració (de l'ordre de ng/mL). Per aquest motiu s'han establert protocols d'immunoadsorció del PSA, per a enriquir la mostra en aquesta proteïna.

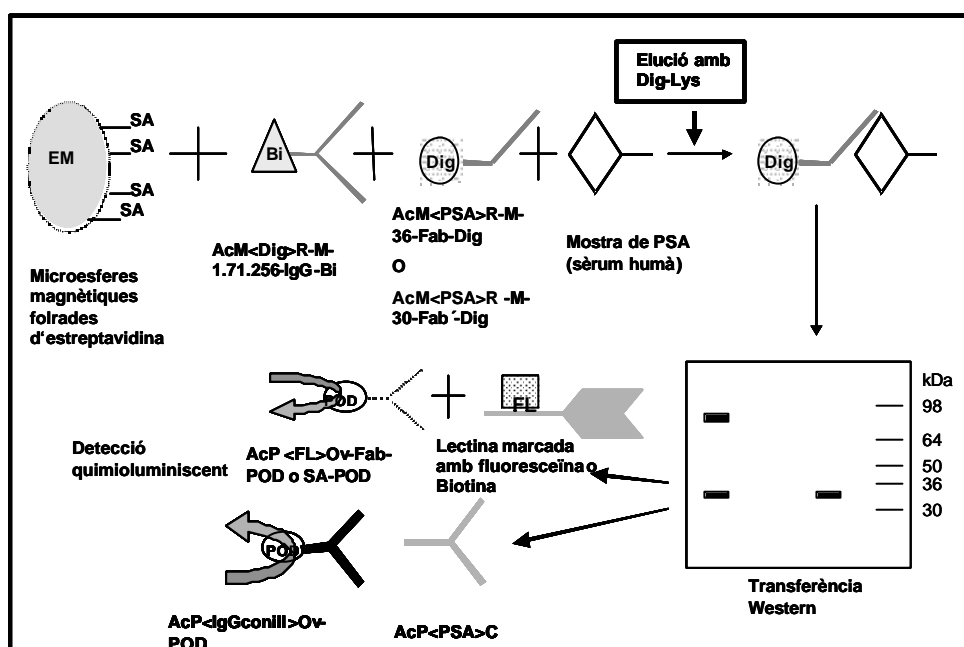


Figura II.11: Esquema del protocol de immunoadsorció indirecta seguida de detecció per transferència tipus western.

Per a la immunoadsorció s'utilitzen microesferes magnètiques folrades d'estreptavidina a les que s'uneix el PSA mitjançant anticossos específics i que, una vegada eluït de les partícules de manera específica, es detecta mitjançant assaigs immunològics com l'ELISA o la transferència tipus western. És una adaptació del protocol establert per Peter i col. (1999) i Peter i col. (2000) esquematitzat a la figura II.11.

Immunoadsorció indirecta de PSA de sèrum humà per a detecció per transferència tipus western:

Solucions:

Solució de rentat: PBS pH 7.2, 0.1% Tween-20: Es dilueix 1/5 una dissolució x5 de composició: 40.9 g/L de NaCl, 6.7 g/L de Na₂HPO₄·2H₂O i 1.7 g/L de NaH₂PO₄·H₂O, s'ajusta el pH a 7.2 amb àcid fosfòric o NaOH. I s'hi afegeix un 0.1% de Tween 20.

Solució d'incubació: PBS pH 7.2, 1% BSA, 0.02% Tween-20

1. S'afegeixen 500 µL d'una suspensió de microesferes magnètiques folrades d'estreptavidina (SA) (Roche, Alemanya) (1 mg/mL) en un tub.
2. Es precipiten les esferes per imantació o per centrifugació 2s a 13000rpm i es renten afegint 0.5mL de solució de rentat i incubant 3min amb agitació i es repeteix fins a tres vegades.
3. S'afegeixen 250µL d'una solució 15µg/mL de l'anticòs monoclonal biotinitat contra digoxigenina dissolt en tampó d'incubació: AcM<Dig>R-M-1.71.256-IgG-Bi (Roche, Alemanya). S'incuba 30 min a temperatura ambient i agitació (1000rpm).
4. Es precipiten les esferes i es renten com al pas 2.
5. S'afegeixen 250µL d'una solució 15µg/mL de l'anticòs monoclonal digoxigenilat anti-PSA total: AcM<PSA>R-M36-Fab-Dig (Roche, Alemanya) o anti-PSA lliure AcM<PSA>R-M30-Fab'-Dig (Roche, Alemanya) dissolt en tampó d'incubació. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació (1000rpm).
6. Es renta dues vegades com al pas 2.
7. S'afegeix fins a 0.5 mL d'una mostra que contingui PSA. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació (1000rpm).
8. Es renta tres vegades com al pas 2.
9. S'elueix el PSA unit a les microesferes per competència de la digoxigenina de l'anticòs amb 0.1mL d'una solució de Dig-LysHCl 1mM, 0.05% Tween-20. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació (1000rpm). Aquest pas es pot repetir per a recuperar més PSA immunoabsorbit.
10. Es precipiten les esferes per imantació o per centrifugació 2s a 13000rpm i es guarda el sobrenedant, on hi haurà el PSA. Aquest sobrenedant es pot carregar en un gel d'electroforesi i fer una detecció immunològica del PSA per transferència tipus western.

5.5.2. Transferència tipus Western

La transferència tipus Western combina la resolució del gel d'electroforesi amb l'especificitat de la detecció immunològica (Harlow i Lane, 1988).

Aquest mètode es basa en que primer, la barreja de proteïnes problema se separa per electroforesi en gel de poliàcrilamida en condicions desnaturalitzants, segons el mètode de Laemmli (1970). Després, aquestes proteïnes es transfereixen a una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF; Millipore, EEUU), que uneix proteïnes de manera inespecífica per interaccions hidrofòbiques. La transferència es duu a terme posant la membrana en contacte directe amb el gel i col·locant-los en un camp elèctric que transfereixi les proteïnes del gel a la membrana. Després, els llocs buits de la membrana es bloquegen, per evitar reaccions inespecífiques posteriors. Seguidament, la localització de l'antigen estudiat es realitza utilitzant un anticòs específic, seguit d'un anticòs secundari que reconegui al primer i que estigui conjugat a un enzim. Finalment, es posa en contacte la membrana amb un substrat quimioluminiscent específic de l'enzim, que emetrà fotons que es podran detectar sobre un film fotogràfic. Segons els anticossos i les lectines utilitzats es podrà detectar PSA o les seves estructures glucídiques.

Les lectines són proteïnes o glicoproteïnes que deriven de plantes, animals o microorganismes que tenen especificitat per residus de carbohidrats terminals o subterminals (Rhodes & Milton, 1998); (Taula 1 de la Introducció General; pàg. 25).

Transferència tipus western:

Preparació de tampons:

Tampó d'electrotransferència: Glicina 192 mM, Tris 25 mM, metanol 20% i aigua destil·lada. Abans d'utilitzar-lo s'ha de deixar refredar a 4°C unes hores.

Tampó TBST (pH 7.5): Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 al 0.1% i aigua mi lliQ.

Tampó de bloqueig: RotiBlock (Roth, Alemanya) 1X diluït en aigua milliQ o BSA a l'1% en TBST.

Tampó d'incubació: Per anticossos: 50% tampó TBST/ 50% tampó de bloqueig. Per lectines: 0.1M tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, pH 7.6.

1. S'activa la membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF; Millipore, EEUU): Primer, es mulla amb metanol uns 2 s, després es deixa en aigua milliQ d'1 a 5 min i, finalment, es deixa de 10 a 20 min en tampó d'electrotransferència.
2. També es deixen en el tampó d'electrotransferència: 4 papers de filtre (Whatman) per gel, 2 esponges per gel i el gel d'electroforesi, que s'ha fet córrer prèviament amb les mostres i amb marcadors de pes molecular pretenyits (Invitrogen, EEUU), segons el protocol descrit a l'apartat 3.2 del Capítol I (pàgina 66), però amb un gel separador al 12% d'acrilamida.
3. Es munta l'electrotransferència. Prenent com a referència el càtode, l'ordre de col·locació dels diferents components és el següent: esponja, 2 papers de filtre, gel d'electroforesi, membrana de PVDF, 2 papers de filtre i esponja.
4. Es connecta a una font d'electroforesi i es deixa transferir 16h a 30 V i 4°C, en agitació constant dins de la cubeta.
5. Quan acaba la transferència, se separen els diferents components i la membrana es renta 15 min amb tampó TBST.
6. S'incuba la membrana 1h en tampó de bloqueig a temperatura ambient en agitació.
7. Es renta 5 vegades d'1s cadascuna en aigua milliQ i 1 vegada, durant 5 min, amb TBST.
8. S'incuba la membrana 1h en agitació a temperatura ambient en una dilució adequada del primer anticòs o lectina (tots de Roche, Alemanya) en el tampó d'incubació adient.
 - AAA-Dig 1µg/mL
 - SNA-Dig 1µg/mL
 - AAA-Bi 2µg/mL
 - SNA-Bi 2µg/mL
 - AcP<PSA>C 1: 4000
9. Es renta 5 vegades d'1s cadascuna en aigua milliQ i 3 vegades, de 5 min cadascuna, amb TBST.
10. S'incuba la membrana 1h en agitació, a temperatura ambient, en una dilució adequada de l'anticòs que reconegui específicament la part constant de l'anterior anticòs o que reconegui el marcador unit a la lectina, i que estigui conjugat amb l'enzim peroxidasa.
 - AcP<Dig>Ov-POD 20mU/mL (Roche, Alemanya)
 - SA-POD 10mU/mL (Roche, Alemanya)
 - AcP<IgGconill>Ov-POD 1: 40000 (Pierce, EEUU)
11. Es renta 5 vegades d'1s cadascuna en aigua milliQ i 5 vegades, de 5 min cadascuna, amb TBST.
12. Es revela amb el reactiu quimioluminiscent *WestDura* o *WestPico* (Pierce, EEUU). Aquest reactiu de revelat es prepara barrejant el mateix volum de solució *Luminol/Enhancer* i de solució *Stable Peroxide*. Es submergeix la membrana durant 5 min en el reactiu de revelat preparat.
13. Es posa la membrana a la casset d'exposició, col·locant un film fotogràfic sobre la membrana i tancant-lo bé. El temps d'exposició és variable, des de 30s a 1h. D'aquesta manera els fotons emesos, per la degradació del substrat per l'enzim peroxidasa conjugat a l'anticòs, impressionen el film fotogràfic.
14. Es renta el film amb aigua milliQ fregant suaument amb els guants.
15. Revelar el film: Primer es submergeix en revelador (Agfa b/n, Alemanya) fins que apareguin les bandes, després es renta amb aigua milliQ per treure-li l'excés de revelador, després es fixa (Agefix; Agfa, Alemanya) durant 2 min i, finalment, es renta amb aigua milliQ per treure-li l'excés de fixador i es deixa assecar.

Es poden revelar les mateixes membranes utilitzant anticossos diferents. Això és possible perquè les membranes, un cop feta la transferència de proteïnes i revelades

amb un anticòs, es poden guardar a 4°C i reutilitzar-les després. Només cal extreure els anticossos amb que es van revelar la primera vegada, sotmetent les membranes a condicions desnaturalitzants i revelar-les de nou amb un altre anticòs seguint el protocol explicat anteriorment.

Extracció dels anticossos de revelat d'una membrana de transferència (*stripping*):

1. Es deixa la membrana sota condicions desnaturalitzants: 30 min a 50°C en agitació, en tampó TBS, 100 mM 2-mercaptoetanol i 2% SDS.
2. Es renta 2 vegades, de 15 min cadascuna, amb TBS.
3. Es comença de nou al punt 6 (bloqueig) del protocol de transferència tipus Western, per poder revelar la mateixa membrana amb un altre anticòs.

5.5.3. Immunoadsorció indirecta de doble marcatge seguida de detecció per ELISA

Després de la immunoadsorció del PSA de diferents mostres biològiques es pot detectar la seva presència amb anticossos específics contra la part proteica o amb lectines específiques contra les estructures glucídiques que presenta, mitjançant un assaig ELISA (fig. II.12).

En el protocol que s'explica a continuació, l'anticòs anti-PSA està doblement marcat: amb digoxigenina i amb biotina. Amb digoxigenina per a l'elució (com al protocol anterior de la fig. II.11) i amb biotina per unir la mostra immunoabsorbida a la placa d'ELISA folrada d'estreptavidina. D'aquesta manera es millora l'especificitat de detecció del PSA immunoabsorbit.

Marcatge dels anticossos anti PSA total i lliure

Els anticossos que detecten PSA lliure i total biotinitats i digoxigenilats s'han marcat amb digoxigenina, després d'estar marcats amb biotina, seguint el següent protocol:

Marcatge del anticòssos anti PSA total i lliure amb digoxigenina:

1. Preparació dels anticòssos: Es dialitzen els anticòssos amb 100 vegades el seu volum contra 0.1M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, pH 8.4.
2. Es determina la concentració de l'anticòss per densitat òptica a 280nm. La concentració de proteïna ha de ser superior a 10mg/mL, si cal s'ha de concentrar utilitzant Centricon (Millipore, EEUU).
3. Es prepara la solució de Digoxigenina-XOSu (digoxigenina-3-O-metilcarbonil- ϵ -àcid aminocapròic-N-hidroxisuccinimida éster, Roche, Alemanya) a una concentració 9.0 mg/mL en DMSO.
4. Es dilueix l'anticòss en una solució amb 0.1M $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, pH 8.4 a una concentració final de 10mg/mL i s'atempera la solució a 25°C en un bany.
5. S'afegeix la solució de digoxigenina a la d'anticòss lentament i en agitació, per a que la relació molar d'anticòss i digoxigenina sigui 1: 5.
6. Es deixa incubar en agitació 1h a 25°C.
7. Per aturar la reacció s'afegeix una solució 1M de Lisina-monohidroclozur en H_2O milliq fins a una concentració final de 10mM. Aquest excés de lisina unirà l'excés de digoxigenina no unida a l'anticòss.
8. S'incuba 15min en agitació a 25°C.
9. Es dialitza per eliminar la lisina unida a digoxigenina durant 12h contra 10mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, pH 7.2.
10. Es centrifuga l'anticòss digoxigenilat i se'n determina la concentració de proteïna per densitat òptica.
11. Per a una millor preservació s'hi pot afegir sacarosa a una concentració final del 6.5%. S'aliquota i es conserva a -20°C.
12. Aquest anticòss es testa per ELISA per a determinar si el marcatge ha estat correcte.

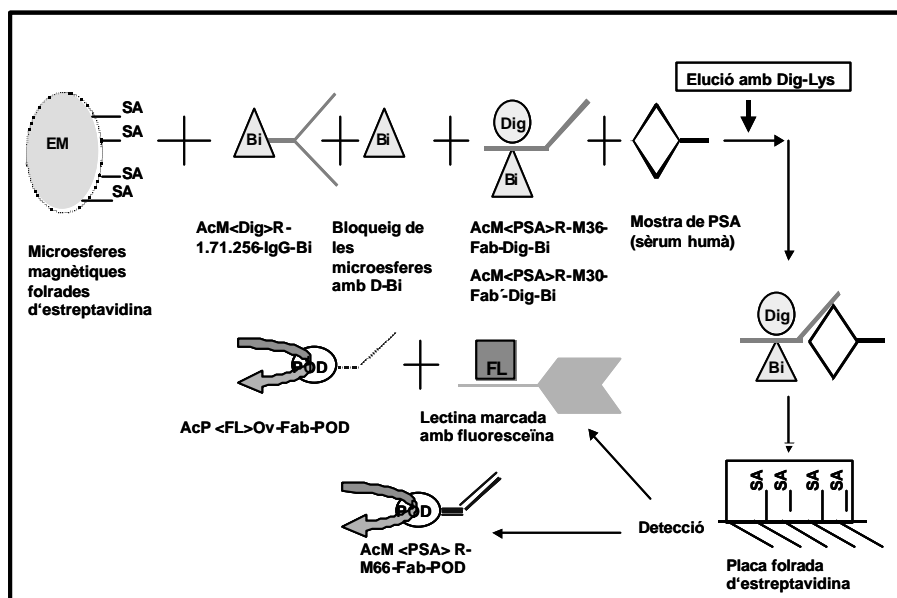


Figura II.12: Esquema del protocol de Immunoabsorció indirecta de doble marcatge seguida de detecció per ELISA.

Immunoabsorció indirecta de doble marcatge:

Solucions:

Solució de rentat: PBS pH 7.2, 0.5% Tween-20

Solució d'incubació: PBS pH 7.2, 1% BSA, 0.5% Tween-20

1. S'afegeixen 500 μL d'una suspensió de microesferes magnètiques folrades d'estreptavidina (1mg/mL) en un tub.
2. Es precipiten les esferes per imantació o per centrifugació 2s a 13000rpm i es renten afegint 0.5mL de solució de rentat i incubant 3min amb agitació i es repeteix fins a tres vegades.
3. S'afegeixen 250 μL d'una solució 15 $\mu\text{g/mL}$ de l'anticòss monoclonal biotinitat contra digoxigenina dissolt en tampó d'incubació: AcM<Dig>R-M-1.71.256-IgG-Bi. S'incuba 30 min a temperatura ambient i agitació (1000rpm).
4. Es precipiten les esferes i es renten com al pas 2.

5. Es bloquegen els llocs lliures d'estreptavidina de les microesferes amb 1µg de D-Bi (D-Biotin-N-hydroxysuccinimide ester; Roche, Alemanya), dissolt en PBS. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació (1000rpm).
6. Es precipiten les esferes i es renten com al pas 2.
7. S'afegeixen 250µL d'una solució 15µg/mL de l'anticòs monoclonal biotinitat i digoxigenilat anti-PSA: AcM<PSA>R-M36-Bi-Dig o AcM<PSA>R-M30-Bi-Dig dissolt en tampó d'incubació. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació (1000rpm).
8. Es precipiten les esferes i es renten com al pas 2.
9. S'afegeixen fins a 0.5 mL d'una mostra que contingui PSA. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació (1000rpm).
10. Es precipiten les esferes i es renten com al pas 2.
11. S'elueix el PSA unit a les microesferes per competència de la digoxigenina de l'anticòs amb 0.1mL d'una solució de Dig-LysHCl 1mM 0.05% Tween-20. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació (1000rpm). Aquest pas es repeteix i s'uneixen els sobrenedants obtinguts.
12. Es precipiten les esferes per imantació o per centrifugació 2s a 13000rpm i es guarden els sobrenedants, on hi haurà el PSA.

Aquests sobrenedants es poden assajar per ELISA directament sobre plaques folrades d'estreptavidina. Es pot detectar PSA o detectar les estructures glucídiques mitjançant lectines. Aquestes lectines han d'estar marcades amb fluoresceïna per tal d'evitar reaccions creuades amb els marcatges dels anticossos utilitzats a l'assaig. Per a fer-ho es pot seguir el següent protocol.

Detecció de PSA o d'estructures glucídiques per ELISA:

Solucions:

Solució d'incubació: PBS pH 7.2, 1% BSA, 0.05% Tween-20

Solució per lectines: 0.1M Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, pH 7.6

Solució de rentat: 9g/L NaCl, 0.05% Tween-20.

1. Es dilueixen les mostres, immunoprecipitades segons el protocol anterior, en solució d'incubació i se'n col·loquen 120µL/pouet en una placa d'ELISA folrada d'estreptavidina (NUNC, Dinamarca). La placa s'incuba a temperatura ambient durant 1h en agitació.
2. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
3. S'afegeixen 100 µL/pouet d'una solució 2µg/mL de les lectines digoxigenilades (Roche, Alemanya) corresponents dissoltes en tampó per a lectines, si es volen detectar les estructures glucídiques. Si es vol detectar PSA, s'afegeixen 100 µL/pouet d'una dilució 1:5000 de l'anticòs anti-PSA marcat amb l'enzim peroxidasa, AcM<PSA>R-M66-Fab-POD. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació.
4. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
5. S'afegeixen 100µL/pouet d'una solució 20mU/mL en tampó d'incubació, de l'anticòs conjugat a peroxidasa que detecta fluoresceïna 20mU/mL de AcP<FL>Ov-Fab-POD (Roche, Alemanya). Pel cas del PSA ara ja es pot revelar la placa seguint el protocol descrit al pas 7. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació.
6. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
7. S'afegeixen 100µL/pouet de solució TMB (Roche, Alemanya) i s'atura la reacció després de 5min amb 100µL/pouet de 0.25M H₂SO₄. Seguidament, es llegeix l'absorbància a 450nm amb una referència de 620nm.

5.5.4. Trencament del complex PSA-ACT

Per a augmentar la quantitat de PSA lliure de la que se'n volen caracteritzar els glúcids, s'ha portat a terme un protocol de trencament del complex PSA-ACT, basat en el tractament alcalí de les mostres sèriques (abans o després de la immunoadsorció indirecta) amb etanolamina 2M, segons el protocol descrit per Peter i col. (2000).

Trencament del complex PSA-ACT en condicions alcalines:

1. Es barregen 270µL de PBS (pH 7.4) amb 30µL d'etanolamina 2M (pH 12).
2. S'hi afegeixen 300µL de mostra de PSA (sèrum humà) i es testa el pH, que ha de ser 10.3.
3. La concentració final d'etanolamina ha de ser 0.1M. S'incuba 24h a 25°C.
4. Es pot detectar el trencament del complex per transferència tipus western o ELISA, però abans caldrà neutralitzar el pH de la mostra afegint el volum adient de HCl 5N, ja que el següent pas s'haurà de portar a terme a pH neutre.

Les quantitats es poden ajustar segons el cas, respectant la concentració final d'etanolamina.

5.5.5. *ELISA inversa de captura per lectines de PSA immunoprecipitat*

La detecció de la glicosilació del PSA immunoprecipitat per immunoabsorció indirecta es pot realitzar amb una captura de la part glucídica utilitzant lectines i una detecció amb un anticòs anti-Digoxigenina, perquè les mostres de PSA eluïdes de la immunoabsorció portaran unit un anticòs anti-PSA digoxigenilat.

ELISA inversa de captura per lectines:

La immunoabsorció indirecta es porta a terme seguint el protocol descrit a l'apartat 3.2.1, ja que no serà necessari que l'anticòs anti-PSA utilitzat estigui doblement marcat. El PSA obtingut estarà unit a un anticòs digoxigenilat i la digoxigenina serà el que s'utilitzi per a la detecció.

Solucions:

Solució d'incubació: PBS pH 7.2, 1% BSA, 0.05% Tween-20

Solució de rentat: 9g/L de NaCl, 0.05% Tween-20.

1. S'uneixen les lectines biotinilades SNA o AAA (Roche, Alemanya) a la placa d'ELISA forrada d'estreptavidina (Greiner, Alemanya). La concentració utilitzada és 5µg/mL. Es dilueixen les lectines en solució d'incubació i s'afegeixen 130µL/pouet. S'incuben a temperatura ambient durant 1h en agitació.
2. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
3. Es preparen les dilucions de les mostres, immunoprecipitades per immunoabsorció indirecta (segons el protocol descrit al punt 3.2.1), en solució d'incubació. S'afegeixen 100 µL de solució d'incubació a cada pouet i després, 20 µL de les diferents dilucions de les mostres. S'incuba en agitació 1h a temperatura ambient.
4. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
5. S'afegeixen 100µL/pouet d'una solució 20mU/mL en tampó d'incubació, de l'anticòs conjugat a peroxidasa que detecta digoxigenina AcP<Dig>Ov-Fab-POD (Roche, Alemanya). S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació.
6. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
7. S'afegeixen 100µL/pouet de solució TMB (Roche, Alemanya) i s'atura la reacció després de 15min amb 100µL/pouet de 0.25M H₂SO₄. Seguidament, es llegeix l'absorbància a 450nm amb una referència de 620nm.

5.5.6. ELISA directe amb detecció per lectines

Per tal de caracteritzar i determinar les estructures glucídiques de les mostres de PSA purificades de diferents orígens s'ha dut a terme un assaig d'ELISA directe de detecció d'estructures glucídiques amb lectines (fig. II.13).

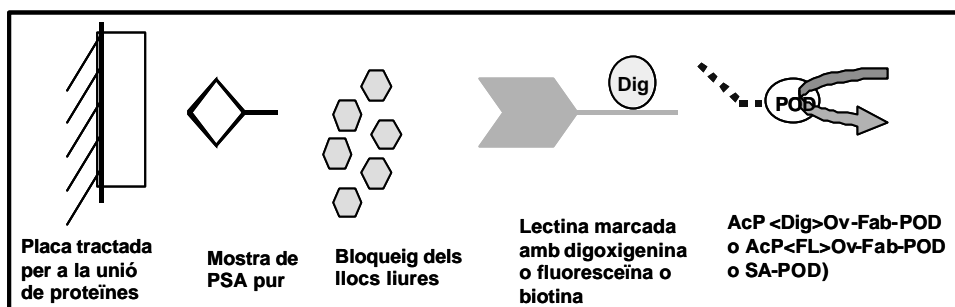


Figura II.13: Esquema del protocol d'ELISA directe de detecció d'estructures glucídiques del PSA amb lectines.

ELISA directe de detecció per lectines:

Solucions:

Solució d'unió: Coating buffer (Scil Diagnostics, Alemanya) diluït 10 vegades en aigua milliQ.

Solució d'incubació: PBS pH 7.2, 1% BSA, 0.05% Tween-20

Solució per lectines: 0.1M Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, pH 7.6

Solució de rentat: 9g/L NaCl, 0.05% Tween-20.

1. Es dissolen les mostres en solució d'unió i se'n col·loquen 100µL/pouet en una placa d'ELISA tractada per a la unió de proteïnes (NUNC, Dinamarca). La placa s'incuba a temperatura ambient durant 1h en agitació.
2. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
3. Es bloquegen els llocs lliures de la placa amb una dilució de RotiBlock (Roth, Alemanya) dissolt en solució d'incubació sense BSA. S'afegeixen 100 µL de solució a cada pouet i s'incuba en agitació 1h a temperatura ambient.
4. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
5. S'afegeixen 100 µL/pouet d'una solució 1µg/mL de les lectines digoxigenilades (Roche, Alemanya) corresponents dissoltes en tampó per a lectines. S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació.
6. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
7. S'afegeixen 100µL/pouet d'una solució 20mU/mL en tampó d'incubació, de l'anticòs conjugat a peroxidasa que detecta digoxigenina AcP<Dig>Ov-Fab-POD, o fluoresceïna 20mU/mL de AcP<FL>Ov-Fab-POD, o 10mU/mL del compost SA-POD, que detecta biotina (tots de Roche, Alemanya). S'incuba 1h a temperatura ambient i agitació.
8. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
9. S'afegeixen 100µL/pouet de solució TMB (Roche, Alemanya) i s'atura la reacció després de 5min amb 100µL/pouet de 0.25M H₂SO₄. Seguidament, es llegeix l'absorbància a 450nm amb una referència de 620nm.

Aquestes lectines poden estar marcades amb diferents substàncies i d'això dependrà el mètode de detecció. Poden trobar-se marcades amb digoxigenina, amb biotina, o amb fluoresceïna. Per a detectar la digoxigenina i la fluoresceïna hi ha anticossos específics, però per a detectar el marcatge amb biotina s'utilitza estreptavidina (SA) amb l'enzim peroxidasa unit.

5.5.7. Assaig immunològic associat a l'activitat sialiltransferasa (GISA)

El protocol GISA (*Glycosylation Immunosorbent Assay*) es basa en una primera etapa de captura d'una glicoproteïna en una placa d'ELISA mitjançant anticossos específics contra la proteïna. A continuació es realitza una reacció enzimàtica d'unió d'àcid siàlic, marcat amb fluoresceïna (FL), mitjançant sialiltransferases específiques (fig. II.14), segons es descriu a Poon i col. (2002).

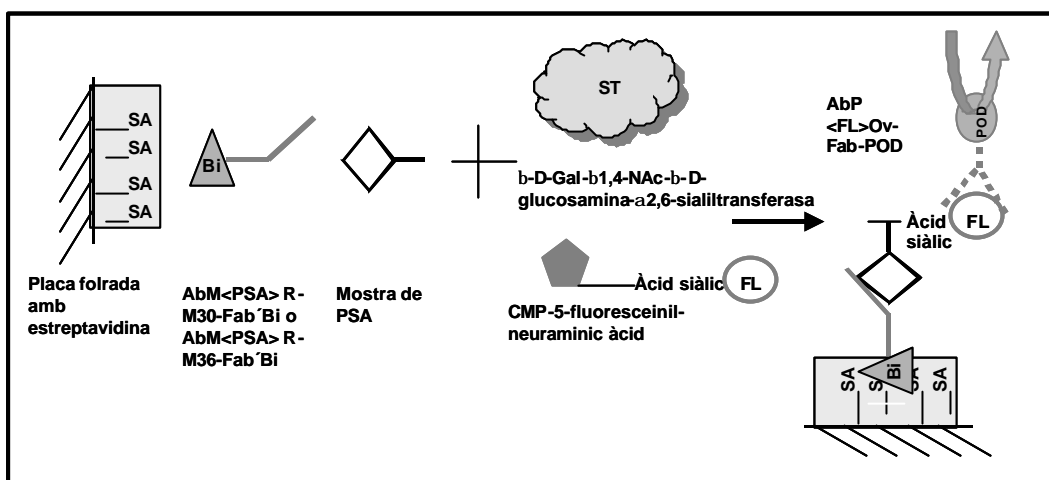


Figura II.14: Esquema de l'assaig immunològic associat a l'activitat sialiltransferasa (GISA).

D'aquesta manera, els terminals glucídics del PSA que permetin la unió d'àcid siàlic seran detectats per un anticòs que reconeix el marcatge d'aquest substrat enzimàtic. En aquest cas el substrat és el nucleòtid CMP-5NeuAc marcat amb fluoresceïna, gentilesa del laboratori del Dr R. Brossmer (Gross i col., 1990; Brossmer i Gross, 1994).

Assaig immunològic associat a l'activitat sialiltransferasa (GISA):

Solucions:

Solució d'incubació d'anticossos i mostres: PBS pH 7.2, 1% BSA, 0.05% Tween-20

Solució d'activitat enzimàtica: 15mM Tris-HCl, 45mM NaCl, 1mL/L TritonX100, 1g/L BSA, pH 7.2

Solució de rentat: PBS pH 7.2, 0.05% Tween-20

1. S'uneixen els anticossos biotinilats anti-PSA lliure o anti-PSA total a la placa d'ELISA folrada d'estreptavidina (Greiner, Alemanya). Les concentracions d'anticòs (Roche, Alemanya) utilitzades són:
 - AcM<PSA>R-M-30-Fab'-Bi 4µg/mL per a detectar PSA lliure
 - AcM<PSA>R-M-36-Fab'-Bi 4µg/mL per a detectar PSA total
 Es dilueixen els anticossos en solució d'incubació i 130µl/pouet s'incuben a 37°C durant 30min.
2. Es renta la placa 4 vegades amb solució de rentat.
3. Es preparen les dilucions de les mostres en solució d'incubació. S'afegeixen 100 µL de les diferents dilucions de les mostres a cada pouet. S'incuba 1h a 37°C.
4. Es renta la placa 4 vegades amb solució de rentat i 1 amb solució d'activitat.
5. S'afegeixen 45 µL/pouet d'una solució 2.5U/L de α2-6-(N) sialiltransferasa de rata recombinant en *Spodoptera frugiperda* (Calbiochem, EEUU) i 0.75mg/L CMP-5-fluoresceinyl-neuraminic acid (donació del Dr. Brossmer) en solució d'activitat. S'incuba 2h a 37°C.
6. Es renta la placa 4 vegades amb solució de rentat.
7. S'afegeixen 100µL/pouet d'una solució 1:2000 en tampó d'incubació, de l'anticòs conjugat a peroxidasa que detecta fluoresceïna AcP<FL>Ov-Fab-POD (Roche, Alemanya). S'incuba 1h a 37°C.
8. Es renta la placa 5 vegades amb solució de rentat.
9. S'afegeixen 100µL/pouet de solució TMB (Roche, Alemanya) i s'atura la reacció després de 5 min amb 100µL/pouet de 0.25M H₂SO₄. Seguidament, es llegeix l'absorbància a 450nm amb una referència de 620nm.

NOTA: Quan es vulguin testar mostres prèviament immunoprecipitades seguint el protocol d'immunoabsorció indirecte de doble marcatge (punt 3.2.3), no caldrà folrar els pouets amb els anticossos anti-PSA, es podrà començar al punt 3 d'aquest protocol.

5.6. Caracterització glucídica de la superfície cel·lular

5.6.1. Per ELISA de cèl·lules fixades

El protocol utilitzat és el mateix que està descrit a l'apartat 3.6 del Capítol I del present treball (pàgs. 70-71), però aquí les cèl·lules testades són de carcinoma prostàtic: LNCaP (ATCC CRL-1740), PC-3 (ATCC CRL-1435) i DU-145 (ATCC HTB-81). Com a controls s'utilitzen les línies Capan-1 (ATCC HTB-79) d'adenocarcinoma pancreàtic i la línia MCF-7 (ATCC HTB-22) de carcinoma mamari.

Per a la detecció, a més dels anticossos específics per a estructures glucídiques tipus Lewis utilitzats a l'apartat 3.6, s'usen lectines: ECL-FL, AAA-Bi, SNA-Bi i MAA-Dig a 2 µg/mL, i un anticòs monoclonal contra l'epítop H2, donat per la Dra. C. de Bolós. Quan s'utilitzen lectines es realitza el pas de bloqueig amb PVP (polivinilpirrolidona) 2% en tampó PBS, enlloc d'albumina sèrica bovina.

5.7. Determinació i quantificació del PSA durant la purificació

5.7.1. ELISA sandvitx de detecció de PSA:

Per a realitzar el seguiment de la purificació del PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP s'utilitza un ELISA sandvitx de captura i detecció de PSA. Aquest assaig també s'utilitza per a quantificar la concentració de PSA en cada moment, afegint a l'assaig d'ELISA una recta patró preparada amb una mostra de PSA control de concentració coneguda (del kit *ELECSYS* de Roche Diagnostics, Alemanya).

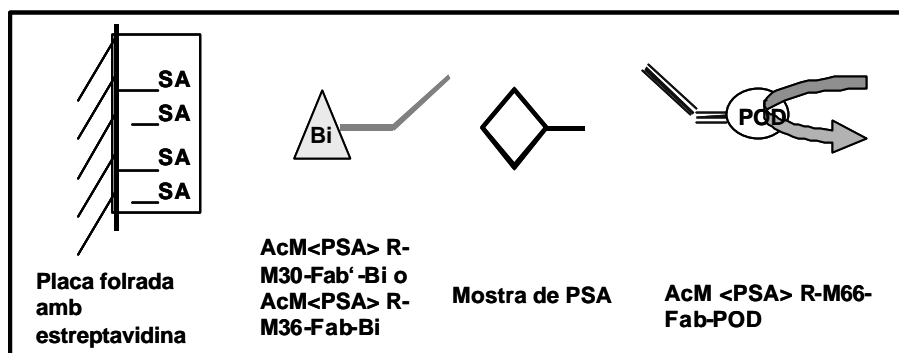


Figura II.15: Esquema del protocol d'ELISA sandvitx de quantificació de PSA.

Per a la captura s'utilitza un anticòs biotinitat anti-PSA lliure o anti-PSA total, que s'uneix a una placa d'estrepavidina, i la detecció es realitza amb un anticòs anti-PSA unit a l'enzim peroxidasa, que permetrà la detecció colorimètrica de l'assaig (fig II.15).

ELISA sandvitx de quantificació de PSA:

Solucions:

Solució d'incubació: PBS, 1% BSA, 0,1% Tween-20, pH 7.2.

Solució de rentat: 9g/L NaCl, 0,05% Tween-20.

1. S'uneixen els anticossos biotinitats contra PSA lliure o total a la placa d'ELISA folrada d'estrepavidina (Greiner, Alemanya). Les concentracions d'anticòs utilitzades són:
Per PSA lliure, AcM<PSA>R-M-30-Fab'-Bi 4µg/mL
Per PSA total, AcM<PSA>R-M-36-Fab-Bi 2µg/mL
Es dilueixen els anticossos en solució d'incubació i s'incuben 130µl/pouet a temperatura ambient durant 30min en agitació.
2. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
3. Es preparen les dilucions de les mostres en solució d'incubació. S'afegeixen 100 µL de solució d'incubació a cada pouet i després, 20 µL de les diferents dilucions de les mostres. S'incuba en agitació 1h a temperatura ambient.
4. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
5. S'afegeixen 100 µL/pouet d'una dilució 1:6000 en solució d'incubació d'un anticòs monoclonal de ratolí contra PSA total conjugat a l'enzim peroxidasa, AcM<PSA>R-M66-Fab-POD. S'incuba en agitació 1h a temperatura ambient.
6. Es renta la placa 3 vegades amb solució de rentat.
7. S'afegeixen 100µL/pouet de solució TMB (Roche, Alemanya) i s'atura la reacció després de 1-2 min amb 100µL/pouet de 0.25M H₂SO₄. Seguidament, es llegeix l'absorbància a 450nm amb una referència de 620nm.

5.7.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants amb

SDS: tinció amb nitrat de plata

Aquesta electroforesi amb tinció amb nitrat de plata s'utilitza per a determinar la puresa de les mostres al llarg de la purificació del PSA, ja que la tinció amb nitrat de plata permet detectar la presència de totes les proteïnes d'una mostra amb una sensibilitat de 2 a 5ng per banda.

S'ha utilitzat el mateix protocol de polimerització i tinció del gel que al punt 3.2. del Capítol I (pàg. 66). Però per al PSA, de massa molecular aproximadament 28kDa, el gel separador de proteïnes serà al 12% d'acrilamida.

5.8. Purificació del PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic

Les cèl·lules de la línia LNCaP (ATCC CRL-1740) han estat cedides pel Departament d'Urologia de l'Hospital Universitario de Getafe (Madrid) i per l'Institut Català de Ciències Cardiovasculars CID-CSIC de Barcelona.

S'han cultivat en medi de cultiu complet: RPMI-1640 (Gibco, Regne Unit), amb o sense un 10% de Sèrum Boví Fetal (FBS; Linus, Regne Unit), 5µg/mL de Gentamicina (Gibco, Regne Unit) i amb o sense l'hormona dihidrotestosterona (DHT; Sigma, EEUU) 125nM. Aquestes cèl·lules LNCaP secreten PSA al medi de cultiu i proliferen dependent de l'estimulació hormonal (Corey i col., 1998).

5.8.1. Cultiu de cèl·lules LNCaP i acumulació de medi:

El protocol utilitzat per a l'acumulació de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP és el mateix que s'ha descrit a l'apartat 3.7.1 del Capítol I, però al medi de les cèl·lules LNCaP s'hi pot afegir o no, segons el tractament, la hormona dihidrotestosterona.

Així doncs, s'ha purificat PSA secretat per cèl·lules LNCaP cultivades amb tres medis suplementats diferents: (1) amb 10%FBS, (2) sense FBS però amb 125nM de la hormona dihidrotestosterona i (3) sense FBS ni DHT. El protocol de purificació que és descrit a continuació correspon a la purificació del PSA a partir del medi de cultiu de cèl·lules LNCaP que han crescut amb medi suplementat amb 10%FBS.

Aquest protocol consta de quatre passos cromatogràfics: dues columnes d'afinitat amb cibacron-blue, una columna de gel-filtració i una columna de fase reversa Vydac

C4. Per al medi no suplementat amb FBS el protocol es redueix a dos passos cromatogràfics: Una columna atmosfèrica d'afinitat amb cibacron-blue i una columna de fase reversa Vydac C4, degut a la menor quantitat de proteïna total del medi de cultiu.

Abans de la purificació el medi també és concentrat per ultrafiltració tangencial seguint el mateix protocol que el descrit a l'apartat 3.7.2 del capítol anterior.

5.8.2. Cromatografia d'afinitat amb cibacron-blue:

S'ha observat que algunes proteïnes són afins a determinats colorants degut a similituds estructurals amb cofactors o substrats d'aquestes proteïnes, i també degut a determinades propietats iòniques o hidrofòbiques que presentin aquestes. La reïna de *cibacron-blue 3GA* (Sigma, EEUU) consta d'un colorant, el cibacron-blue, unit a una matriu d'agarosa. S'ha determinat que presenta afinitat per enzims amb unions a nucleòtids o a cofactors nucleotídics, i que també s'uneix a deshidrogenases, cinases, endonucleases de restricció, albúmina i interferó, i inclús podria unir-se a d'altres proteïnes.

Proves preliminars realitzades amb columnes amb aquesta matriu han determinat que el PSA s'uneix fortament al cibacron-blue, pel que resulta útil per a la seva purificació.

El medi concentrat es dialitza en el tampó A de la cromatografia d'afinitat utilitzant sacs de diàlisi que permeten el pas de molècules menors de 3000Da (SpectraPor, EEUU).

Essencialment la cromatografia d'afinitat a cibacron-blue consisteix en deixar que les proteïnes de la mostra s'uneixin lentament a la reïna, segons la seva afinitat al colorant i a desunir les proteïnes seqüencialment aplicant un gradient salí de 20mM a 2M de NaCl en 25mM TrisHCl pH 7.5 i, posteriorment eluir les proteïnes unides fortament, com és el cas del PSA, aplicant un tampó 25mM TrisHCl, 1M NaSCN pH 7.5.

Cromatografia d'afinitat a cibacron-blue:

Tampons filtrats i desgasificats per ultrasonificació:

A: 25mM TrisHCl, 20mM NaCl pH 7.5

B: 25mM TrisHCl, 2M NaCl pH 7.5

C: 25mM TrisHCl, 1M NaSCN pH 7.5

El volum de columna és 100mL.

1. S'empaqueta la columna amb 100mL d'una matriu de cibacron-blue, que s'ha rentat prèviament amb 5 volums de columna d'aigua MilliQ i 5 volums de columna de tampó A.
2. S'equilibra la columna amb 5 volums de columna de tampó A a un flux 0.5mL/min.
3. Es carrega a la columna la mostra dialitzada i es comencen a recollir fraccions de 5mL a un flux de 0.2 mL/min.
4. S'elueix la mostra que no s'uneix a la reïna de cibacron-blue amb 5 volums de columna de tampó A, a un flux de 0.5 mL/min.
5. S'elueix part de la mostra unida a la reïna amb un gradient salí lineal de 2.5 volums de columna de tampó A i 2.5 volums de columna de tampó B, a un flux de 0.5 mL/min.
6. S'elueix la mostra unida amb 3 volums de columna de tampó B a un flux de 0.5 mL/min.
7. S'elueix la mostra fortament unida amb 3 volums de columna de tampó C a un flux de 0.5 mL/min.
8. Es regenera la columna amb 5 volums de columna de 0.1M Borat, 1M NaCl a pH 9.8, seguits de 5 volums de columna de 0.1M Borat pH 9.8.
9. S'extreu la reïna de la columna, es renta amb 10 volums de columna d'aigua milliQ i es conserva en 2M NaCl.

Es procedeix a reunir les fraccions positives per a PSA determinades per ELISA (punt 3.4.1), es dialitzen front d'aigua milliQ, per a eliminar-ne les sals, i es liofilitzen.

Se'n determina la quantitat de proteïna total pel mètode de Bradford (veure apartat 3.9.1 del capítol anterior) i la quantitat de PSA de les fraccions positives també per ELISA (punt 3.4.1 d'aquest capítol).

5.8.3. Cromatografia de gel-filtració P60:

El *Biogel P* (BioRad, EEUU) és una reïna constituïda per petites esferes de poliacrilamida molt hidrofíliques i quasi sense càrrega, que s'utilitza per a discriminar molècules segons el seu pes molecular. El límit d'exclusió del *Biogel P60* és de 3000-60000Da, és a dir, quedaran retingudes pel gel de la reïna aquelles molècules de menys de 60000Da, i el seu temps de retenció dependrà inversament de la seva mida molecular.

Cromatografia de gel-filtració *Biogel P60*:

1. S'equilibra la columna amb 2 volums de columna de tampó: TrisHCl 50mM NaCl 200mM pH 7.5 filtrat i desgasificat per ultrasonicació, al flux de treball (el flux recomanat depèn del diàmetre de la columna, quant més lent sigui el flux millor serà la resolució). Per a una columna de diàmetre 1.8 cm, s'ha utilitzat un flux 0.15 mL/min
2. Es dilueix la mostra en el menor volum possible de tampó, es centrifuga a 10000rpm 5min. i es carrega a la columna. Quan hagi entrat completament, s'afegeix tampó i es connecta altra vegada el flux.
3. S'hi fan passar fins a 3 volums de columna de tampó i se'n recullen les fraccions eluïdes. Es segueix l'elució de proteïna mesurant l'absorbància a 280nm i la presència de PSA per ELISA.

Les fraccions que contenen PSA es reuneixen, es dialitzen contra aigua MilliQ i es liofilitzen. Aquesta mostra es ressuspèn en el tampó A de la columna d'afinitat a cibacron-blue i es recromatografia per una columna *Hi-Trap cibacron-blue* d'1mL de reïna (Pharmacia, Suècia), utilitzant un sistema de cromatografia FPLC per a una millor resolució. Es segueix el mateix protocol i s'utilitzen els mateixos tampons que per la columna atmosfèrica de cibacron-blue utilitzada anteriorment (apartat 3.5.2).

5.8.4. Cromatografia de fase reversa per a HPLC:

Finalment, les proteïnes presents en les fraccions positives per PSA, eluïdes de la columna anterior, són separades segons la seva hidrofobicitat mitjançant una cromatografia de fase reversa amb una columna *Protein C4* (Vydac, EEUU) per a HPLC, segons el següent protocol:

Cromatografia de fase reversa amb una columna *Protein C4* (per a la purificació de PSA):

Tampons filtrats i desgasificats per ultrasonificació:

A: Aigua milliQ 0.1% àcid trifluoroacètic

B: acetonitril 0.1% àcid trifluoroacètic

El flux de treball és de 0.5 mL/min i el volum de columna és de 2.5mL.

1. S'equilibra la columna amb 2 volums de columna d'un 10% de tampó B i un 90% de tampó A.
2. S'injecta la mostra dissolta en tampó A.
3. S'elueix la mostra no unida amb 2 volums d'un 10% de tampó B i un 90% de tampó A.
4. S'elueix la mostra amb un gradient de 3 volums de columna de 10 a 25% de tampó B.
5. S'elueix la mostra més fortament unida amb un gradient de 10 volums de columna de 25 a 50% de tampó B.
6. S'acaben d'eluir les proteïnes encara unides amb un gradient de 2 volums de columna de 50 a 100% de tampó B.
7. Es regenera la columna amb 2 volums de columna de tampó B 100%.
8. Es reequilibra la columna amb 3 volums de columna de 10% de tampó B.

La seqüenciació de la fracció aminoterminal del PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP s'ha portat a terme mitjançant un protocol de degradació automàtica d'Edman, en un seqüenciador de proteïnes LF3000 (Beckman), al Servei de Proteòmica de l'Institut de Biomedicina i Biotecnologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

5.9. Obtenció i tractament de les mostres de sèrum humà

Els sèrums provenen de pacients de carcinoma prostàtic i d'hiperplàsia benigna de pròstata de l'Hospital Universitari Dr. Josep Trueta de Girona, que han estat recollits en dejú entre les 8 i les 10 del matí al Servei d'Anàlisis Clíniques (Laboratori ICS Girona), entre novembre de 2000 i març de 2003. S'han deixat coagular de 10 a 30

min a temperatura ambient i s'han centrifugat a 3500 rpm en tubs que permeten la separació estricta del sèrum i de les cèl·lules sanguínies. Així s'han conservat a 4°C, com a màxim 4 dies i després s'han al·liquotat i congelat a -20°C.

El sèrum d'un pacient d'hiperplàsia benigna de pròstata és d'un home de 78 anys amb un contingut de PSA total entre 5 i 10ng/mL, anomenat *BPH A*. Els dos sèrums de dos pacients diagnosticats d'adenocarcinoma de pròstata corresponen a un home de 82 anys amb 100ng/mL de PSA total (anomenat *PCa B*) i un altre a un home de 78 anys amb 10-20 ng/mL de PSA total (anomenat *PCa C*).

Tots aquests sèrums són de pacients diagnosticats d'aquestes malalties al Servei d'Anatomia Patològica. A més, es disposa dels valors mesurats de l'antigen prostàtic específic (PSA).

El sèrum de carcinoma prostàtic utilitzat com a control dels diferents assaigs immunològics i per a la purificació de PSA correspon a un malalt de càncer de pròstata avançat. Aquest sèrum presenta una concentració elevada de PSA total (al voltant de 2 µg/mL) i ha estat cedit pel Dr. W. Hösel del Laboratori de Química de Proteïnes de Roche Diagnostics (Penzberg, Alemanya), aquest sèrum s'anomena *PCa A*.

5.10. Purificació de PSA de sèrum humà

Donada la composició proteica del sèrum i la baixa concentració en que s'hi troba el PSA, respecte de la concentració proteica total, s'han seguit cinc etapes cromatogràfiques i una immunoprecipitació final. Aquestes etapes són: dues cromatografies d'adsorció tiofílica, una cromatografia d'afinitat amb cibacron-blue, una cromatografia d'afinitat amb proteïna A i una cromatografia d'afinitat amb heparina.

5.10.1. Cromatografia d'adsorció tiofílica

La primera etapa cromatogràfica consisteix en una cromatografia d'adsorció tiofílica, *3S T-Gel fractogel* (EM Industries, EEUU), segons el protocol descrit per Kawiski i col. (2002).

El mètode es basa en l'adsorció de proteïnes a un lligand heteroalifàtic, promoguda per sals. La unió de les proteïnes té lloc, probablement, via dipèptids aromàtics accessibles. El PSA s'uneix fortament a aquesta reïna, cosa que permet

extreure la major part de l'albumina sèrica present a la mostra ja que aquesta no presenta les característiques adequades per a unir-s'hi.

El protocol cromatogràfic utilitzat per a la purificació parcial del PSA sèric d'una mostra de 34 mL del sèrum PCa A (1-2 µg/mL de PSA) és el següent,

Cromatografia d'adsorció tiofílica 3S T-Gel fractogel

Tampons:

A: 25mM Hepes 1M sulfat sòdic, pH 7.0

B: 25mM Hepes, pH 7.0

El flux de treball és de 0.5 mL/min i el volum de columna és de 23mL.

1. S'empaqueta la reïna a la columna després de rentar-la amb un excés d'aigua milliQ i 3 volums de columna de tampó A.
2. S'equilibra la columna amb 5 volums de columna de tampó A.
3. S'injecta un volum conegut de sèrum humà dissolt en el mateix volum de tampó A dues vegades concentrat. Es comencen a recollir fraccions de 3mL.
4. S'elueix la mostra no unida amb 4 volums de columna de tampó A.
5. S'elueix la mostra unida amb un gradient lineal de 8 volums de columna de tampó B.
6. S'elueix la mostra fortament unida amb 4 volums de columna de tampó B.
7. Es regenera la columna amb 20 volums de columna d'aigua milliQ.
8. Es conserva la reïna en etanol al 20%.

La determinació de les fraccions positives per PSA, així com la seva quantificació es realitzen seguint el mètode d'ELISA (apartat 3.4.1) i la quantificació de proteïna es realitza mitjançant un assaig de Bradford.

5.10.2. Cromatografia d'afinitat amb cibacron-blue

Les fraccions positives per PSA de la cromatografia anterior, es reuneixen, es dialitzen contra aigua milliQ i es liofilitzen.

La cromatografia d'afinitat a *cibacron-blue* es realitza seguint el mateix protocol que s'ha descrit per a la purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP (punt 3.5.2), però amb una columna de volum 12mL, ja que la quantitat de proteïna total en aquest pas de purificació és menor que en el cas anterior.

Després es determinen les fraccions positives per PSA i es quantifica, tant el PSA total i lliure com el contingut en proteïna. Aquestes fraccions es reuneixen, es dialitzen contra aigua milliQ i es liofilitzen.

5.10.3. Cromatografia d'afinitat amb proteïna A

Un 17% del contingut proteic del sèrum són immunoglobulines, i es coneix que la majoria s'uneixen per afinitat a proteïna A en condicions de pH neutre i força iònica fisiològica.

En la cromatografia d'afinitat a proteïna A s'uneixen les immunoglobulines a la reïna i s'elueixen aplicant un tampó a pH àcid. Les proteïnes que no tinguin afinitat a aquesta reïna seran eluïdes al volum d'exclusió.

Cromatografia d'afinitat amb proteïna A:

Tampons:

A: 100mM TrisHCl, pH 8.0

B: 100mM Glicina, pH 3.0

El flux de treball és de 0.2 mL/min i el volum de columna és de 4mL.

1. S'empaqueta la reïna a la columna després d'hidratar el gel de *proteïna A-sepharose CL-4B* (Pharmacia, Suècia) amb un excés d'aigua milliQ i 3 volums de columna de tampó A.
2. S'equilibra la columna amb 10-20 volums de columna de tampó A.
3. S'injecta la mostra liofilitzada ressuspesa en tampó A. Es recull la mostra injectada que surt de la columna i es torna a injectar. Es comencen a recollir fraccions d'1mL.
4. S'elueix la mostra no unida amb 5 volums de columna de tampó A.
5. S'elueix la mostra unida amb 3 volums de columna de tampó B. A les fraccions recollides s'hi ha d'afegir 0.1mL de tampó Ax10 per a neutralitzar el pH àcid del tampó B que podria malmetre les proteïnes.
6. Es regenera la columna amb 10 volums de columna de tampó A.

S'avaluen les fraccions obtingudes i les que contenen PSA es reuneixen, es dialitzen contra aigua milliQ i es liofilitzen.

5.10.4. Cromatografia d'afinitat amb heparina

La columna utilitzada és una *HiTrap Heparin* (Amersham Biosciences, Suècia) per a un sistema FPLC. Proves prèvies amb aquesta reïna han determinat que el PSA hi queda unit.

El protocol de purificació del PSA sèric és el següent:

Cromatografia d'afinitat a Heparina *HiTrap Heparin*:

Tampons filtrats i desgasificats per ultrasonicació:

A: 50mM TrisHCl, 20mM NaCl pH 7

B: 50mM TrisHCl, 1M NaCl pH 7

El volum de columna és 5mL. En un sistema FPLC.

1. S'equilibra la columna amb 10 volums de columna de tampó A a un flux 1mL/min.
2. Es carrega a la columna la mostra ressuspesa en tampó A i es comencen a recollir fraccions d'1mL.
3. S'elueix la mostra que no s'uneix a la reïna d'*Heparina* amb 1 volum de columna de tampó A
4. S'elueix part de la mostra unida a la reïna amb un primer gradient salí de 5 volums de columna fins a un 35% de tampó B.
5. S'elueix la mostra unida amb un segon gradient de 15 volums de columna de 35-70% de tampó B.
6. S'elueix la mostra unida amb un tercer gradient de 5 volums de columna fins al 100% de tampó B.
7. Es regenera la columna amb 2 volums de columna de tampó B 100%.
8. Es renta amb 3 volums de columna de tampó A i 10 volums de columna d'aigua milliQ i es conserva en etanol 20%.

Les fraccions que contenen PSA es reuneixen, es dialitzen contra aigua milliQ i se'n quantifica el contingut en PSA lliure, PSA total i proteïna total.

Per tal de reduir el contingut en proteïna total i augmentar la puresa de la mostra de PSA es repeteix la cromatografia d'adsorció tiofíllica però amb una columna de volum 4mL (veure el protocol al punt 3.7.1).

Després de determinar les fraccions positives per PSA, es reuneixen es dialitzen contra aigua milliQ i es liofilitzen.

Per tal d'obtenir el PSA en forma de PSA lliure, es tracten les mostres amb etanolamina 2M per a trencar el complex PSA-ACT. Se segueix el protocol descrit al punt 3.2.4.

5.10.5. Immunoadsorció indirecta

Se segueix el mateix protocol d'immunoadsorció indirecta descrit al punt 3.2.1.

La detecció del PSA immunoprecipitat és per electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants tenyit amb blau de Coomassie. Per tal de reduir el volum eluït i poder-lo carregar al gel d'electroforesi sense que hi interfereixin les sals, la mostra eluïda es dialitza contra aigua milliQ i es liofilitza.

5.10.6. Detecció en gel de poliacrilamida tenyit amb blau de Coomassie

S'utilitzarà un gel de poliacrilamida al 12% en condicions desnaturalitzants amb SDS polimeritzat segons el protocol de Laemmli (1970), descrit a l'apartat 3.2 del capítol anterior.

Les mostres s'han de desnaturalitzar abans de ser carregades al gel seguint el següent protocol:

Processat de les mostres abans del gel d'electroforesi:

1. Es ressuspenen les mostres en 26µL d'aigua milliQ.
2. S'hi afegixen 10µL de tampó de mostres x4:
3. S'hi afegixen 4µL de DTT 0.5M. S'incuba 10 minuts a 70°C.
4. Es deixa refredar i s'hi afegixen 4.4µL de iodoacetamida (Sigma, EEUU) 100mM. Es deixa 30minuts a temperatura ambient i protegit de la llum. Després ja es poden carregar les mostres al gel d'electroforesi.

La tinció del gel per a detectar les bandes de proteïna es porta a terme amb blau de Coomassie, seguint el següent protocol, que permet el posterior processament per extreure els N-glicans sense modificacions o alteracions en la seva estructura.

Tinció de gels d'electroforesi d'acrilamida amb blau de Coomassie:

1. Tinció del gel: 2.5g/L de *Coomassie R-250 BrilliantBlue* (Merck, EEUU) en 50% metanol, 10% àcid acètic, 40% aigua milliQ. Deixar durant 2-3h en agitació suau.
2. Rentat: 2-3 minuts en solució 1: 50% metanol, 7% àcid acètic, 43% aigua milliQ.
3. Rentats: 1 minut en solució 2: 5% metanol, 7% àcid acètic, 88% aigua milliQ.
4. Rentats: fins que el gel estigui totalment destenyit (tota la nit) en solució 2, afegint-hi una esponja que absorbeixi el blau de Coomassie.

Es retallen les bandes corresponents a PSA lliure. Es porta a terme l'extracció i seqüenciació dels sucres al Laboratori de Glicoimmunologia del Glycobiology Institut (GBI) de la Universitat d'Oxford.

5.10.7. Electroforesi bidimensional amb detecció immunològica

L'electroforesi bidimensional es basa en la separació de les proteïnes d'una mostra complexa en dues dimensions. La primera dimensió separa en funció del punt isoelèctric i la segona en funció de la massa molecular.

Per tal d'evitar el soroll de fons en la detecció de PSA, s'utilitza aquest mètode amb mostres prèviament purificades per adsorció tiofílica. La detecció específica del PSA es realitza mitjançant anticossos utilitzant un protocol per transferència tipus western (punt 3.2.2.)

Electroforesi Bidimensional:**REHIDRATACIÓ**

1. Es prepara el tampó de rehidratació: 8M urea, 0,5% (v/v) Triton X-100, 13 mM DTT, 1 % (v/v) IPG-Buffer (pH 3-10 o pH 6-11), traces de Blau de Bromofenol.
2. Es col·loca el *Reswelling Tray* en un lloc pla.
3. Es posen 750 ml de tampó de rehidratació a cada solc del *Reswelling Tray* per cada tira de primera dimensió a rehidratar. Aquestes tires són del tipus *Immobiline Dry-Strip* (Pharmacia, Suècia) pH 3-10 o pH 6-11, 110mm.
4. Es col·loca a cada solc una tira amb el costat punxegut a l'inici i el gel cap avall.
5. Es cobreix amb 2-3 ml de querosé cada tira per evitar l'evaporació.
6. Es deixa rehidratar tota la nit.
7. Es preparen les mostres diluint-les en tampó de mostres: 8 M Urea, 0.5 % (v/v) Tritó X-100, 13 mM DTT, 1 % (v/v) IPG Buffer. Si es carrega la mostra amb pouets, el volum màxim són 100µL.

PRIMERA DIMENSÍO: ISOELECTROENFOC

8. Es prepara l'aparell *Multiphor II* (Pharmacia, Suècia) i es fixa la temperatura de la placa refrigeradora a 20°C.
9. Es posen 3-4 ml de querosè sobre la placa refrigeradora i s'hi col·loca la safata (amb l'ànode, vermell, a dalt).
10. Es posen 10 ml d'oli de parafina a sobre i es col·loca l'alineador amb els solcs dels carrils cap amunt.
11. Es tallen 3 paperets per tira i se'n mullen dos en aigua milliQ, i un en ditiotreitòl (DTT; USB, EEUU) 13 mM.
12. Es treuen les tires del *Reswelling Tray* i s'extreu l'excés de tampó entre dos papers secants molls.
13. Es col·loquen les tires a l'alineador amb el costat punxegut a l'ànode i el recte al càtode (per orientar el gradient de pH).

14. Es posen els papers molls amb aigua a les puntes de les tires amb una part en contacte amb el gel. Després es posen els corresponents electrodes a sobre. El paper moll amb DTT s'ha de col·locar a 1 cm del càtode.
15. Es col·loca la barra amb els pouets de càrrega de mostra en el lloc més adient. Es col·locarà al punt del gel per a poder carregar les mostres a pH 7.
16. Es carrega la mostra.
17. S'engega el programa i passats uns minuts s'hi afegeix querosè fins a cobrir les tires de gel i els pouets. El programa consisteix en tres passos. El primer d'un minut de 0 a 300V, el segon de 300 a 3500V en 1h30min i el tercer, 3h a 3500V. A un amperatge màxim per a tots els passos de 2mA.
18. Quan s'acaba el programa, s'eixuguen les tires entre dos papers secants humits per eliminar l'excés de querosè i es preparen per a la segona dimensió, si no s'utilitzen en aquest moment es poden congelar a -80°C (embolicats amb film transparent).

SEGONA DIMENSÍO: SDS-PAGE VERTICAL

19. Es posen les tires 15 minuts en 10 ml de tampó d'equilibrat: 6 M Urea, 30% (v/v) glicerol, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Tris-HCl pH 8.8 (50mM).
20. Es posen les tires 15 minuts en 10 mL de tampó d'elució d'electroforesi: Glicina 192mM, Tris 25mM, SDS 0.1% pH 8.3-8.5, amb traces de blau de bromofenol.
21. Es porta a terme en un *Mini Protean II* (Biorad, EEUU). El gel separador de 1.5 mm de gruix al 12% d'acrilamida i el gel apilador al 3% d'acrilamida es preparen seguint el protocol descrit a l'apartat 3.2. del Capítol I.
22. Es col·loca la tira de primera dimensió sobre el gel apilador sense butxaques i s'hi introdueix una peça de plàstic per a carregar els marcadors de pes molecular de referència i es segella amb agarosa al 0.5% en tampó d'elució d'electroforesi.
23. Es fa córrer el gel durant 15minuts a 15mA/gel i després 1h30min a 30mA/gel.
24. Un cop acabada l'electroforesi es procedeix a muntar la transferència tipus western seguint el mateix protocol descrit al punt 3.2.2.

Per tal de comparar quantitativament el mapa bidimensional de diferents mostres, es quantifica la intensitat dels punts o taques obtinguts. Aquesta quantificació es porta a terme amb el programa *Quantity-One42* de BioRad (EEUU).

5.10.8. Digestió glicolítica del PSA

Per tal d'estudiar la presència de cadenes glucídiques amb unió de tipus *N* o la presència d'àcid siàlic a les mostres de PSA, s'han digerit algunes de les mostres assajades per electroforesi bidimensional amb tres enzims glicolítics: l'*N*-glicosidasa F o PNGasa de *Flavobacterium meningosepticum* recombinant en *Escherichia coli*, la Neuraminidasa o Sialidasa purificada de *Clostridium perfringens* i la Neuraminidasa o Sialidasa de *Streptococcus pneumoniae* recombinant en *E.coli* abans de la immunoadsorció indirecta, o després del tractament per adsorció tiofíllica, seguint el següent protocol:

Digestió glicolítica del PSA amb sialidases:

- **Digestió combinada amb Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (CPN) i N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* recombinant en *E. coli* (PNGasa F) (Roche, Alemanya):**

Pre-tractament desnaturalitzant:

1. S'afegeixen a 10 μL de mostra (1 μg PSA) 90 μL de tampó desnaturalitzant (0.1M 2-mercaptoetanol, 0.1% SDS, 0.05% BSA).
2. Es bull 5 min a 90°C .
3. Es centrifuga a 8000 rpm durant 1 segon i es deixa refredar.

Digestió: Sobre 50 μL de mostra (500ng PSA) s'afegeixen 7.2 μL de tampó 0.2M fosfat sòdic pH 7.2, 6 μL de TritóX100 al 10%, 2U de PNGasa F i 50mU de CPN i el volum final s'ajusta a 72 μL amb aigua milliQ.

- **Digestió amb Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (CPN)** (Roche, Alemanya): Sobre 15µL de mostra (300ng PSA) s'afegeixen 5µL de tampó 0.5M acetat sòdic pH 5, 7µL de TritóX100 al 10% i 50mU de Neuraminidasa i el volum final s'ajusta a 50µL amb aigua milliQ
- **Digestió amb Neuraminidasa de *Streptococcus pneumoniae* recombinant en *E.coli* (NANI)** (Glyco, Regne Unit): Sobre 15µL de mostra (300ng PSA) s'afegeixen 5µL de tampó 0.2M fosfat sòdic pH 6 i 50mU de NANI, el volum final s'ajusta a 50µL amb aigua milliQ.

En tots els casos:

1. Es deixen incubar 16h a 37°C.
2. S'atura la reacció de digestió congelant les mostres a -20°C.
3. S'avalua per electroforesi uni o bidimensional.

6. RESULTATS I DISCUSSIÓ

El PSA és el marcador tumoral més utilitzat per al diagnòstic i seguiment del càncer de pròstata (Ward i col., 2001). Degut a la seva especificitat i sensibilitat és l'únic marcador tumoral que s'utilitza per al garbell de la població, és a dir, per a determinar la presència d'aquesta patologia prou aviat per a que pugui ser tractada. Amb nivells de PSA total en sèrum superiors a 10ng/mL s'aconsella realitzar més proves diagnòstiques al pacient, com el tacte rectal digital o la biòpsia. Nivells per sota de 4ng/mL es consideren normals, però existeix un interval de risc, entre 4 i 10 ng/mL, en que el PSA no és prou específic per a distingir una situació benigna d'una maligna. Per aquesta raó, s'estan portant a terme diferents aproximacions i millores en la detecció del PSA sèric per tal d'augmentar la seva l'especificitat (Brawer, 1999).

En el present treball, tenint en compte que el PSA és una glicoproteïna, es proposa la caracterització de la glicosilació del PSA d'origen normal i tumoral i la seva comparació. D'aquesta manera es planteja la possibilitat que, si existeixen diferències a nivell glucídic, es pugui millorar l'especificitat del PSA com a marcador del càncer de pròstata.

En una primera part es porta a terme la purificació del PSA de diferents fluids biològics i se'n caracteritzen les seves estructures glucídiques. En una segona part es posen a punt diversos mètodes de detecció de la glicosilació del PSA de diferents mostres biològiques, sense haver-lo de purificar.

5.11. Purificació i caracterització glucídica del PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic

S'utilitza la línia cel·lular de carcinoma prostàtic LNCaP, que secreta PSA al medi de cultiu, i que prové d'una metàstasi a nòdul limfàtic (Horoszewicz i col., 1983).

Corey i col. (1998) i Kumar i col. (2000) suggereixen que al medi de cultiu de cèl·lules LNCaP s'hi troben diferents formes de PSA quan les cèl·lules es cultiven amb FBS: la forma activa, i tres formes inactives: la forma proPSA (que pot activar-se en tractar-la amb una tripsina, com la hK2, segons descriu el treball de Väisänen i col. (1999)), la que presenta un enllaç tallat a la Lys 145 (forma *nicked*) i altres formes

que s'inactiven en formar complexos amb inhibidors diferents de l'ACT, com l' α 2-macroglobulina (AMG).

En el medi de cultiu de les cèl·lules LNCaP la presència del complex PSA-ACT és poc important, ja que la quantitat d'ACT produïda per aquestes cèl·lules és molt baixa. Però el PSA lliure secretat es pot unir a l' α 1-antiproteïnasa bovina que hi hagi a l'FBS. El PSA unit representa el 9% del PSA total, però quan es cultiven sense FBS, tot el PSA es troba en forma lliure. La quantitat de hK2 produïda per les cèl·lules LNCaP correspon al 3.4-5.0% del PSA produït (Väisänen i col., 1999).

Altres grups han purificat PSA del medi de cultiu de les cèl·lules LNCaP per cromatografia d'afinitat amb anticossos monoclonals contra aquesta proteïna, seguida d'una cromatografia d'interacció hidrofòbica (Kumar i col., 2000), o amb dues cromatografies d'afinitat consecutives amb anticossos monoclonals (Väisänen i col., 1999), o per immunoprecipitació (Prakash i Robbins, 2000).

Wu i col. (1998) produeixen i purifiquen mil·ligrams de PSA lliure del medi de cultiu de cèl·lules LNCaP utilitzant un bioreactor (*micro-mouse hollow fiber bioreactor*) per al cultiu de cèl·lules i amb tractament amb l'hormona sintètica R1881, que redueix la purificació del PSA lliure a una cromatografia per gel filtració S-100 o S-200.

5.11.1. Condicions de cultiu

Les cèl·lules LNCaP presenten una secreció de PSA dosi-depenent d'andrògens, com la dihidrotestosterona (DHT) o el seu anàleg sintètic R1881 (Lee i col., 1995; Corey i col., 1998; Väisänen i col., 1999; Kumar i col., 2000). El creixement d'aquestes cèl·lules també depèn de la concentració d'andrògens de manera positiva, però només fins a una concentració màxima de 30nM de DHT, a partir de la qual s'alenteix la taxa de proliferació. Tanmateix, concentracions entre 10 i 100 nM de DHT comporten una secreció màxima de PSA (Lee i col., 1995).

Caldrà tenir en compte les concentracions òptimes d'hormona al cultiu i el nombre de passos que tinguin les cèl·lules a l'hora d'obtenir el millor rendiment en la secreció de PSA (Esquenet i col. 1997). S'ha descrit que cèl·lules LNCaP de més de 70 passos poden assolir un creixement independent d'hormona i que apareixen

canvis en la sensibilitat a andrògens i en els nivells de receptor androgènic de les cèl·lules LNCaP sota la influència de les condicions de cultiu (Langeler i col., 1993).

Les cèl·lules LNCaP utilitzades en el present treball, provinents del Departament d'Urologia de l'Hospital Universitario de Getafe (Madrid) i de l'Institut Català de Ciències Cardiovasculars CID-CSIC de Barcelona, presentaven inicialment un pas de cultiu inferior a 40. S'han estimulat aquestes cèl·lules amb 125nM del lligand natural dihidrotestosterona (DHT) després de proves prèvies per a trobar la concentració òptima, en que es testaren 5, 50 i 125nM de DHT. A concentracions altes de DHT s'observa un alentiment del creixement perquè les cèl·lules presenten més dificultats a recuperar-se després de fer-ne un subcultiu, però la producció de PSA és màxima.

Es cultivaran les cèl·lules sota tres condicions diferents: a) en medi (RPMI-1640) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS), b) en medi sense FBS però amb la hormona dihidrotestosterona (DHT) i c) sense FBS ni hormona.

La concentració de PSA secretat per aquestes cèl·lules en les condicions de cultiu amb FBS és de 1.5 µg/mL. Väisänen i col. (1999) detecten 0.5 µg/mL de PSA quan les cèl·lules es cultiven amb medi amb FBS i, quan es cultiven sense FBS però amb 5nM de l'hormona sintètica R1881, la concentració augmenta 3 vegades. En el present treball, quan les cèl·lules es cultiven sense FBS però amb 125nM de DHT, la concentració augmenta fins a 3.5 µg/mL i sense FBS ni DHT és només de 0.6 µg/mL.

El fet de cultivar les cèl·lules sense FBS redueix molt el contingut proteic de la mostra, cosa que simplifica el protocol de purificació. El PSA secretat per les cèl·lules cultivades en medi amb FBS es purifica seguint quatre passos cromatogràfics: dues columnes d'afinitat a *cibacron-blue*, una columna de gel-filtració i una columna de fase reversa *Vydac C4*. Per al medi no suplementat amb FBS el protocol es redueix a dos passos cromatogràfics: Una columna atmosfèrica d'afinitat a *cibacron-blue* i una columna de fase reversa *Vydac C4*.

5.11.2. Purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP

S'estableix un protocol de purificació per a aquesta glicoproteïna. Aquest protocol s'inicia amb el cultiu i acumulació del medi, que posteriorment es concentra per filtració tangencial i del que se'n purifica el PSA seguint diferents passos cromatogràfics.

Al llarg dels diferents processos de purificació es quantifica el PSA lliure i el total amb l'assaig d'ELISA sandvitx establert. Donat que els resultats obtinguts amb diferents immunoassaigs poden variar lleugerament entre sí (Cheli i col., 1998), totes les quantificacions es duen a terme amb aquest mateix assaig, amb els mateixos anticossos monoclonals contra PSA lliure o total (extrets del kit *ELECSYS* de Roche Diagnostics), els mateixos tampons i el mateix calibrador de PSA (extret del kit *ELECSYS* de Roche Diagnostics).

Es parteix d'1 L de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP, del que conté FBS. Després de concentrar-lo per filtració tangencial, s'obtenen 40mL de medi de cultiu amb 3400 mg de proteïna total i 460 µg de PSA lliure. A partir d'aquest medi concentrat es porten a terme les diferents etapes cromatogràfiques.

Cromatografia d'afinitat amb *cibacron-blue*

La reïna de *cibacron-blue* uneix bàsicament albúmina i enzims amb unió a nucleòtids o a factors nucleotídics, però es pot unir a d'altres proteïnes. Com que l'FBS conté una proporció important d'albúmina, amb aquesta cromatografia es pretenia eliminar-la, però es va observar que el PSA s'uneix fortament a aquesta reïna i no es pot separar del tot de l'albúmina present.

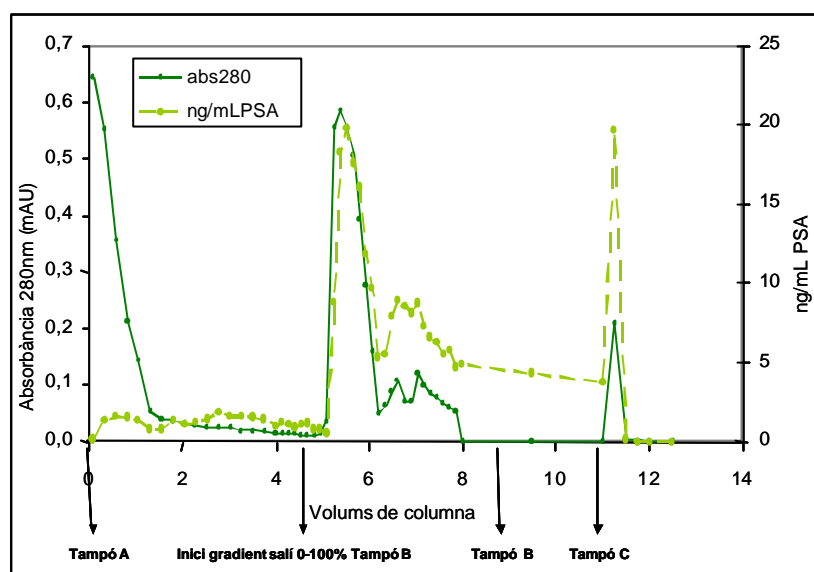


Figura II.16: Cromatograma de la purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP amb una reïna d'afinitat amb *cibacron-blue*.

Tal com s'observa a la figura II.16, el PSA queda retingut a aquesta reïna i s'elueix en afegir-hi el tampó B i el C. Després d'aquesta cromatografia es reuneixen les fraccions que contenen PSA i es redueix el contingut en proteïna total (per a seguir la quantificació del procés veure el resum a la taula II.2).

Cromatografia per gel-filtració

La cromatografia per gel-filtració permet separar les proteïnes en funció de la seva mida molecular. Si es compara la massa molecular de l'albúmina sèrica (66kDa) amb la del PSA (28-30kDa) sembla que amb aquest tipus de cromatografia s'haurien de separar.

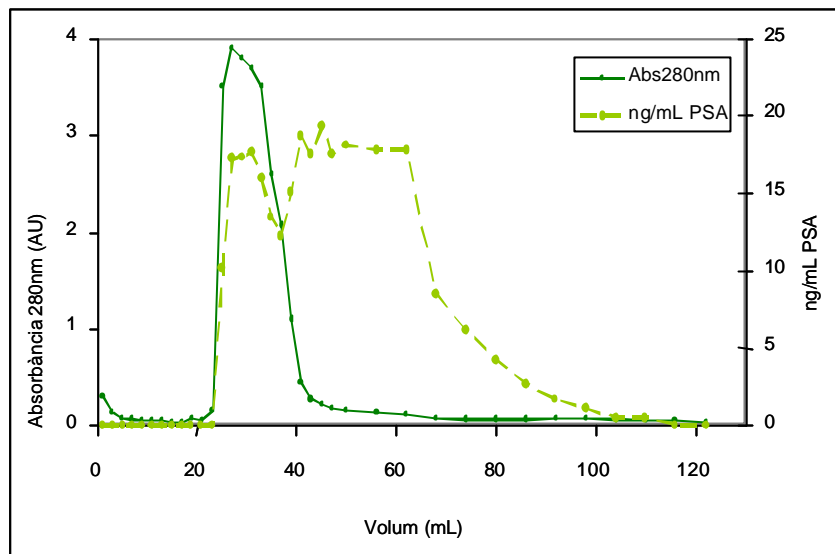


Figura II.17: Cromatograma de la purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP amb una reïna de gel filtració.

Malgrat tot, tal com s'observa a la figura II.17, hi ha certa coincidència entre el pic de PSA i el de proteïna total, per aquest motiu les fraccions positives per PSA es reuneixen i són cromatografiades amb una altra columna d'afinitat a *Cibacron-blue*.

Després d'aquesta segona cromatografia d'afinitat, la quantitat de proteïna total disminueix molt i la puresa del PSA augmenta (veure taula resum II.2).

Cromatografia per fase reversa

Així doncs, aquesta mostra es carrega en una columna de cromatografia per fase reversa Vydac C4 que permetrà obtenir el PSA pur (fig II.18).

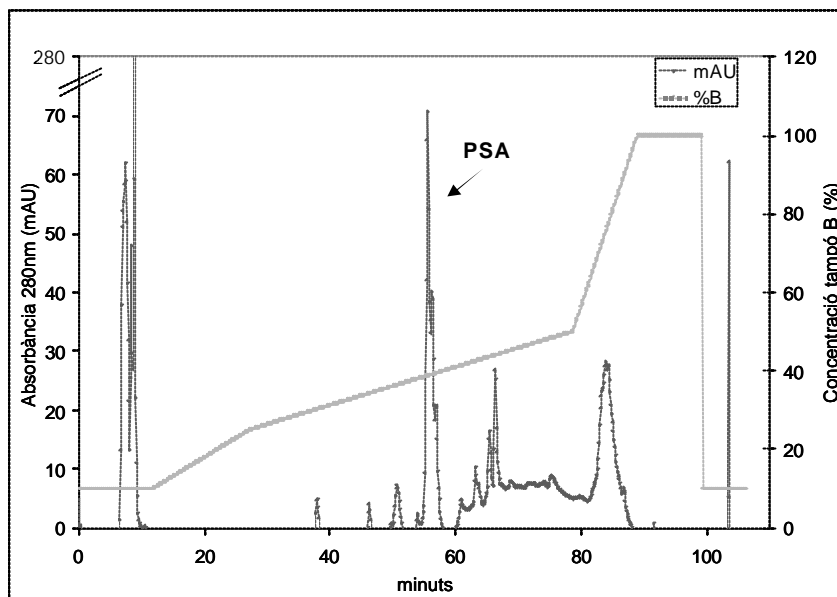


Figura II.18: Cromatograma de la purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP amb una reïna de fase reversa.

Resum del procés

S'ha quantificat el PSA lliure i el total per ELISA sandvitx i la proteïna total per Bradford dels diferents passos cromatogràfics de purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP; aquests resultats estan resumits a la taula II.2.

	Volum (mL)	mg proteïna	µg PSA lliure	Puresa (%)	Rendiment (%)
Inicial	40	3400	460	0.013	100
Afinitat a <i>cibacron-blue</i>	3.4	642.5	358	0.056	78
Gel-filtració P-60	9	7.5	293	4	64
Afinitat a <i>cibacron-blue</i>	1	1.2	140	12	30
Fase reversa Vydac C4	2	0.07	70	100	15

Taula II.2: Resum del procés de purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP cultivades amb 10%FBS.

S'han analitzat alíquotes dels diferents passos de purificació per electroforesi amb tinció per nitrat de plata i per transferència tipus western de detecció de PSA (fig. II.19).

El rendiment del procés cromatogràfic no és gaire alt però el PSA pur obtingut és suficient per a dur a terme la caracterització i la seqüenciació de les estructures glucídiques que presenta.

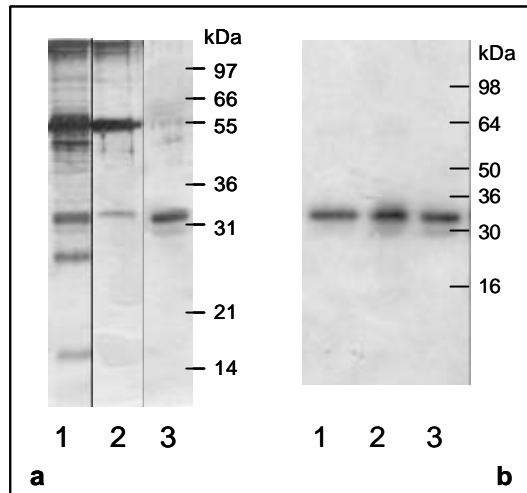


Figura II.19: a) Gel d'electroforesi en condicions desnaturalitzants amb tinció per nitrat de plata dels diferents passos cromatogràfics de la purificació de PSA de medi de cèl·lules LNCaP [1: 100ng de proteïna total del medi de cultiu de les cèl·lules LNCaP abans de purificar-ne el PSA; 2: 100ng de proteïna total després de la cromatografia d'afinitat a cibacron-blue; 100ng de proteïna total després de la cromatografia per fase reversa; M: marcadors de pes molecular]. **b)** Transferència tipus western de detecció de PSA dels diferents passos cromatogràfics de la purificació de PSA de medi de cèl·lules LNCaP. [1: Medi de cèl·lules LNCaP; 2: PSA després de la cromatografia d'afinitat a cibacron-blue; 3: PSA després de la cromatografia per fase reversa].

També s'ha purificat el PSA secretat per les cèl·lules LNCaP cultivades sota les altres condicions de cultiu: sense FBS i amb o sense 125nM de DHT.

El protocol de purificació per a aquestes cèl·lules cultivades sense FBS és més senzill i se n'obté un millor rendiment (veure taula II.3), perquè, en contenir menys proteïna total, només calen dos passos cromatogràfics.

	Volum (mL)	mg proteïna	µg PSA lliure	Puresa (%)	Rendiment (%)
125nM DHT					
Inicial	160	4.7	500	11	100
Afinitat a <i>cibacron-blue</i>	42	1.9	400	21	80
Fase reversa Vydac C4	2	0.084	84	100	17
Sense DHT					
Inicial	170	2.4	108	4.5	100
Afinitat a <i>cibacron-blue</i>	20	1.3	103	8	95
Fase reversa Vydac C4	2	0.03	30	100	28

Taula II.3: Resum del procés de purificació de PSA de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP cultivades amb 0%FBS i amb i sense DHT 125nM.

5.11.3. Caracterització del PSA purificat per seqüenciació N-terminal

Per tal de caracteritzar el PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP, s'ha dut a terme la seqüenciació de l'extrem N-terminal de la proteïna. La majoria de molècules de PSA corresponen a la proteïna madura, amb un terminal NH₂ normal. Tot i que un terç de les molècules s'hi troben en forma de zimogen o Pro-PSA (pPSA), la més abundant és la -5 pPSA (LILSR) i la menys abundant la forma -7 (APLILSR).

Altres autors observaren que la major part del PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP per cromatografia d'afinitat es troba en forma de zimogen. Al voltant d'un terç del PSA correspon a la forma -5pPSA, un terç a la forma -7 i l'altre terç correspon a la forma madura, i menys d'un 5% del PSA es troba en la forma madura però truncada a l'extrem aminoterminal, començant a l'aminoàcid +5. Tanmateix, no s'han trobat diferències entre el PSA secretat per les cèl·lules cultivades amb i sense FBS (Väisänen i col. 1999).

Les diferències entre els resultats obtinguts en aquest treball i els descrits a la bibliografia poden ser degudes a que, durant el procés de purificació, la presència de hK2 (malgrat la baixa proporció en que és present al medi de cultiu de les cèl·lules LNCaP) pot activar les formes proPSA i augmentar la proporció de forma madura, respecte de la observada per Väisänen i col. (1999), que sí separen el PSA de la hK2 durant la purificació. També podria deure's a un procés d'autoproteolisi del PSA, en quant que el PSA és una serín-proteasa.

5.11.4. Caracterització glucídica del PSA purificat, comparada amb el PSA purificat de plasma seminal

Les estructures glucídiques del PSA purificat de les diferents condicions de cultiu s'han analitzat i presenten el mateix patró. Per tant, sembla que es podria adoptar el protocol de cultiu sense FBS i amb DHT si s'hagués de produir i purificar més PSA de medi de cultiu, donada la seva millor eficiència.

Una part del PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP s'analitzarà amb assaigs immunològics de detecció amb lectines, molècules que reconeixen diferents estructures glucídiques. La resta es porta al Departament de Bioquímica del Glycobiology Institut de la Universitat d'Òxford per a seqüenciar-ne les estructures glucídiques.

Es disposa de PSA purificat de plasma seminal de donant sa (Lee Scientific, EEUU), que s'utilitzarà en la comparació de les corresponents estructures glucídiques del PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP (tumoral).

Nom	Especificitat	Glicoproteïnes control
AAA	L-Fuc α \pm GlcNAc	Eritropoietina
DSL	Gal β (1-4)GlcNAc β (1-6)Man o Gal β (1-4)GlcNAc β (1-2) Man	Asialofetuïna
ECL	Gal β (1-4)GlcNAc o Gal β (1-4)GalNAc	Asialofetuïna
LEL	Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3) _n Gal β (1-4)GlcNAc	Eritropoietina
MAA	Sia(α 2-3) Gal β (1-4)Glc o Sia(α 2-3) Gal β (1-4)GlcNAc	Fetuïna
SNA	Sia(α 2-6)Gal o Sia(α 2-6)GlcNAc o Sia(α 2-6)GalNAc	Fetuïna
STL	GlcNAc	Eritropoietina

Taula II.4: Lectines utilitzades en el present treball per a la caracterització de les estructures glucídiques. S'hi indiquen els corresponents controls positius utilitzats.

Bélanger i col. (1995) i Okada i col. (2001), descriuen una cadena majoritària de N-glicosilació del tipus biantenària amb àcid siàlic unit α 2-6 a la galactosa final de les dues ramificacions glucídiques, i amb la presència de fucosa α 1-6 unida a l'N-acetilglucosamina del nucli principal. Pel que fa al PSA secretat per les cèl·lules de la

línia cel·lular de càncer de pròstata LNCaP, només es coneix que presenta una cadena oligosacàrida de tipus bi i triantenària (Prakash i Robbins, 2000). Donada la informació prèvia sobre la glicosilació del PSA de plasma seminal, s'escullen les lectines utilitzades per a la detecció (taula II.4).

Amb aquestes mostres de PSA purificat de plasma seminal i de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP, s'ha dut a terme un ELISA directe de detecció d'estructures glucídiques amb les lectines llistades a la taula II.4 (fig. II.20).

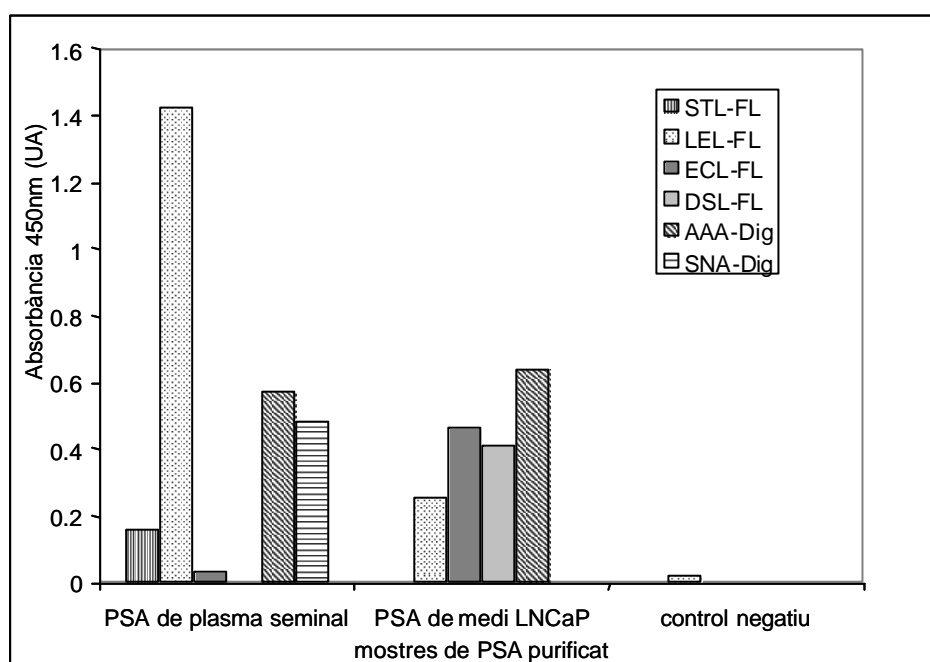


Figura II.20: ELISA directa de detecció d'estructures glucídiques amb lectines de mostres de PSA purificades de plasma seminal i de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP. Les lectines utilitzades es troben marcades amb fluoresceïna (FL) o amb digoxigenina (Dig).

Tal com es pot observar en la figura anterior, la lectina que detecta àcid siàlic α 2-6, la SNA-Dig, només és positiva clarament per a la mostra de PSA purificat de plasma seminal i no pel PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP. Aquests resultats s'adiuen amb els trobats amb les lectines ECL-FL i DSL-FL, que detecten l'estructura Gal β 1-4GlcNAc, sempre que aquesta no acabi en àcid siàlic. Aquestes lectines només reconeixen el PSA purificat de medi de cèl·lules LNCaP. El fet que la lectina ECL serveixi com a indicador de l'absència d'àcid siàlic, s'ha corroborat en

tractar mostres de PSA de plasma seminal i de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica, que contenen àcid siàlic, amb la sialidasa genèrica de *Clostridium perfringens*, i s'ha confirmat que les mostres tractades són detectades amb la lectina ECL.

Pel que fa a les diferències trobades en la proporció de fucoses entre el PSA d'aquestes dues mostres, la lectina AAA-Dig presenta una resposta lleugerament superior sobre la mostra de PSA de cèl·lules LNCaP que sobre la de plasma seminal.

S'observen diferències importants entre les dues mostres de PSA quan s'utilitzen a l'assaig les lectines LEL i STL. Ambdues lectines estan relacionades amb la detecció d'estructures riques en GlcNAc. Segons els resultats obtinguts, la mostra de PSA purificada de plasma seminal conté més monosacàrid GlcNAc a les seves estructures glucídiques, que la mostra de PSA purificada de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP.

Aquestes mostres purificades també s'assagen per transferència tipus western amb detecció per lectines (fig. II. 21), utilitzant la SNA, l'AAA i l'ECL, per a determinar les diferències més importants en contingut de fucoses i àcid siàlic que s'han descrit després de l'assaig d'ELISA anterior. Només s'utilitzen aquestes lectines perquè la resta presenten un soroll de fons important en assaigs del tipus transferència western.

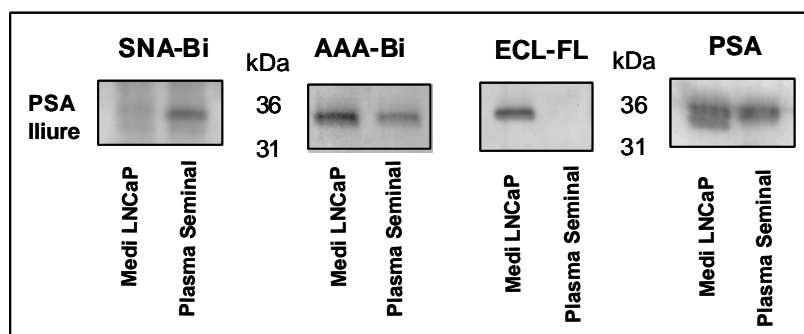


Figura II.21: Transferència tipus western amb detecció de les estructures glucídiques per lectines: SNA, AAA i ECL, sobre mostres de PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP i de plasma seminal.

Com es pot observar a la figura anterior es corroboren els resultats observats en l'ELISA anterior. Existeixen diferències molt importants en el contingut d'àcid siàlic, només present en el PSA de plasma seminal, i en el contingut de fucoses, observades principalment a la mostra de PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP.

Pel que fa als resultats extrets de la seqüenciació glucídica (taula II.5), les estructures glucídiques del PSA purificat de LNCaP són neutres, no presenten àcid siàlic, i contenen fucoses. Les fucoses trobades són al nucli (o *core*) en gairebé totes les estructures glucídiques, però també es troben fucoses unides a les branques més externes per un enllaç α 1-2 a residus de galactosa, aquesta estructura correspon a l'epítot glucídic H2. També s'ha trobat que la proporció d'estructures glucídiques del PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP que contenen el monosacàrid GalNAc és del 65% (Peracaula i col., 2003b).

Els resultats s'adiuen amb els obtinguts en la detecció amb lectines, perquè la glicosilació del PSA purificat del medi de cultiu de les cèl·lules LNCaP era detectada per la lectina AAA, que detecta fucoses i per la lectina ECL que detecta l'estructura Gal β 1-4GlcNAc quan no presenta àcid siàlic unit. A més, no presenten reacció positiva amb la lectina SNA, que detecta la presència d'àcid siàlic α 2-6.

La important presència de fucoses α 1-2 es correlaciona amb els resultats de Chandrasekaran i col. (2002), que observen l'activitat de l' α 1,2-L-fucosiltransferasa a les cèl·lules LNCaP.

Les estructures glucídiques trobades al PSA purificat de plasma seminal són biantenàries complexes i contenen glicans mono o disialilats, amb àcid siàlic unit per enllaços α 2-3 i α 2-6. Aproximadament un 25% de les estructures glucídiques contenen GalNAc. La fucosa unida al nucli (o *core*) només és present en un 83% de les estructures (Peracaula i col., 2003b). Aquests resultats amplien els descrits per Bélanger i col. (1995) i corroboren els obtinguts per detecció amb lectines, ja que la SNA detecta la presència clara d'àcid siàlic en aquesta mostra i l'AAA detecta la presència de fucoses. En aquest PSA de plasma seminal hi ha menys estructures fucosilades i sempre al nucli, a diferència del PSA del medi de cultiu, que presenta més estructures amb el monosacàrid fucosa unit, dins i fora del nucli glucídic.

L'anàlisi de la glicosilació del PSA purificat de plasma seminal i del purificat de medi de cultiu de les cèl·lules LNCaP mostra importants diferències en les seves estructures glucídiques. Els sucres del PSA d'ambdós orígens són del tipus complex biantenari i es diferencien en els continguts de GalNAc, àcid siàlic i fucosa, cosa que

porta a que presentin estructures glucídiques diferents (Peracaula i col., 2003b). Un resum de les estructures diferencials es presenten a la taula II.5.

	PSA de Plasma seminal	PSA de medi LNCaP
Àcid siàlic	SI	NO
Fucosa α 1-6GlcNAc (nucli)	83% dels glicans	>83% (gairebé tots)
Fucosa α 1-2 (fora del nucli)	NO	10-15% dels glicans
GalNAc	25% dels glicans	65% dels glicans

Taula II.5: Taula resum de les principals diferències glucídiques entre el PSA purificat de plasma seminal i el purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP.

D'aquests resultats s'extreu que el PSA es troba diferentment glicosilat quan és secretat per cèl·lules tumorals. Això obre la possibilitat de que aquestes diferències glucídiques puguin trobar-se al PSA sèric de pacients de càncer de pròstata i ser útils en la millora del diagnòstic d'aquest tipus de tumor.

5.12. Desenvolupament de mètodes per a la caracterització glucídica del PSA de fluids biològics, sense purificació prèvia
Donats els resultats obtinguts en la caracterització glucídica del PSA purificat de plasma seminal i de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP, on s'observen diferències significatives en el contingut d'àcid siàlic, fucoses i GalNAc, es planteja el desenvolupament de mètodes de caracterització i detecció d'estructures glucídiques del PSA de diferents fluids biològics, sense purificar-lo prèviament. D'aquesta manera es caracteritzen les estructures glucídiques del PSA de plasma seminal, de medi de cèl·lules LNCaP i de sèrum de pacients afectats de neoplàsia prostàtica.

5.12.1. Caracterització glucídica del PSA amb mètodes immunològics

En una primera aproximació, s'avalua la detecció de la glicosilació del PSA per ELISA, sense haver d'immunoprecipitar la proteïna abans. Primer es porta a terme la captura del PSA i després, la detecció dels glicans mitjançant lectines. Aquest protocol es realitza sobre mostres de plasma seminal de donant i sobre medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP.

Aquestes mostres biològiques presenten un contingut alt de PSA, el plasma seminal de donant sa conté de 0.5-3 mg/mL de PSA lliure (Diamandis, 1998) i el medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP concentrat conté entre 1-2 µg/mL de PSA lliure.

Tenint en compte els resultats de la caracterització glucídica del PSA purificat s'han escollit tres lectines a l'hora d'assajar les mostres sense purificar: la SNA, que detecta l'àcid siàlic α 2-6, la lectina ECL, que reconeix les estructures Gal β 1-4GlcNAc o Gal β 1-4GalNAc i la lectina AAA, que detecta les fucoses, tant les presents al nucli com a les ramificacions de l'estructura glucídica.

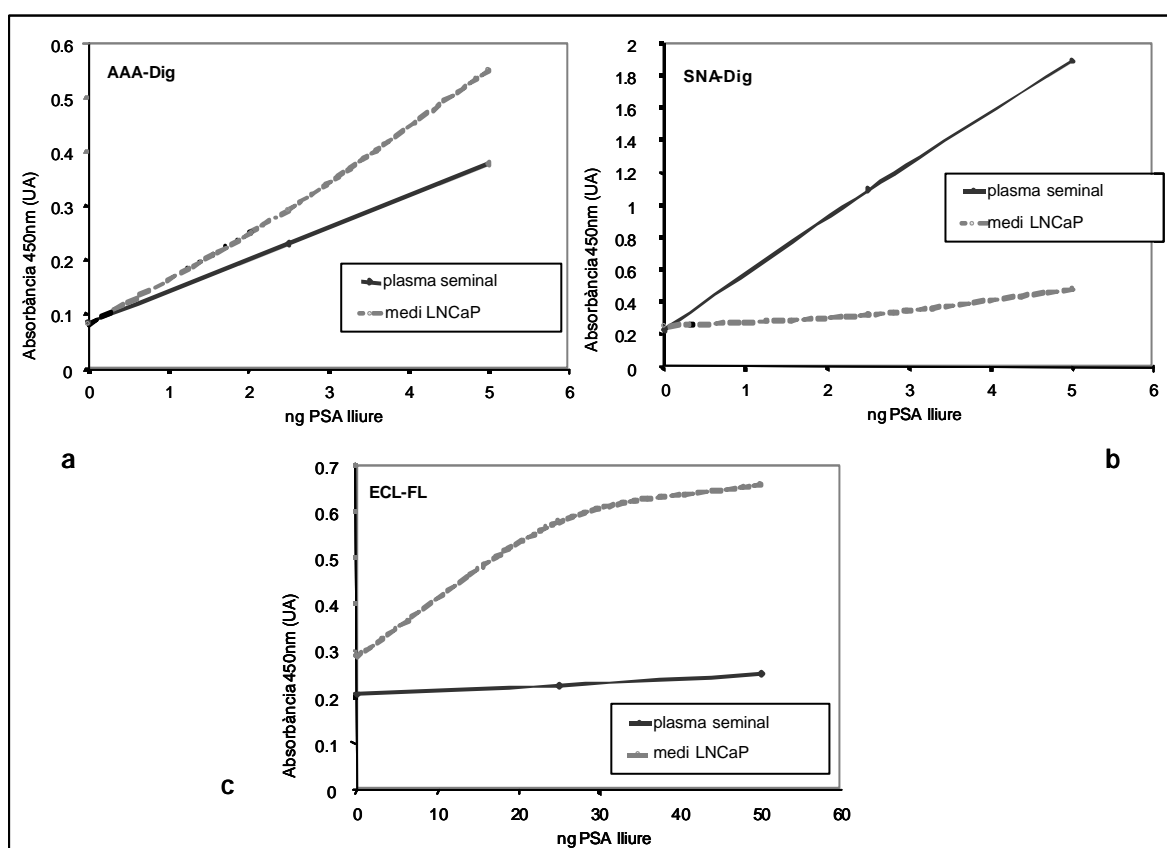


Figura II.22: Gràfics dels ELISAs de detecció d'estructures glucídiques del PSA amb lectines sense purificació prèvia. a) Lectina AAA marcada amb digoxigenina (Dig), b) Lectina SNA marcada amb digoxigenina (Dig) i c) Lectina ECL marcada amb fluoresceïna (FL).

Tal com s'observa a la figura II.22, la presència de fucoses es detecta en el PSA capturat de les dues mostres, però és lleugerament superior per al PSA de medi de cèl·lules LNCaP. L'àcid siàlic es troba només al PSA de plasma seminal, detectant la seva presència amb SNA-Bi. Amb la lectina ECL-FL es corrobora l'absència d'àcid

siàlic al PSA del medi de cultiu de LNCaP, detectant-se les estructures neutres Gal β 1-4GlcNAc i Gal β 1-4GalNAc.

Quan aquest assaig s'ha dut a terme amb mostres sèriques s'ha observat un important soroll de fons degut a que el PSA es troba en una concentració molt baixa en sèrum i que aquest és molt ric en proteïnes. Per aquest motiu, s'estableixen diferents aproximacions per a enriquir en PSA les mostres sèriques i evitar interferències o falsos positius deguts a reaccions inespecífiques de les lectines amb d'altres glicoproteïnes presents.

En primer lloc es duu a terme el tractament de les mostres amb un compost nucleofílic, l'etanolamina, que facilita el trencament del complex entre el PSA i l' α 1-antiquimiotripsina (PSA-ACT), (Peter i col., 2001). Això permetrà l'estudi de la glicosilació de tot el PSA present a sèrum: el lliure i el que estava prèviament unit a ACT, i evitar la presència de l'ACT, que també és una glicoproteïna (Laine i col., 1991). La captura d'aquest PSA es realitza per immunoabsorció indirecta específica per a PSA lliure, per a la que s'utilitzen anticossos d'elevada afinitat, evitant reaccions inespecífiques amb d'altres proteïnes.

Immunoabsorció indirecta de PSA seguida de transferència tipus western i detecció per lectines

Un dels assaigs immunològics per a la detecció de la glicosilació del PSA lliure és la immunoabsorció indirecta de PSA procedent de diferents mostres biològiques, seguida de transferència tipus western i detecció per lectines.

L'aplicació d'una immunoabsorció indirecta prèvia a la detecció glucídica, mitjançant les lectines SNA, AAA i ECL, permet un enriquiment de les mostres en PSA, disminuint el seu contingut total de proteïnes.

Pel que fa a la detecció de la glicosilació (fig. II.23), s'observen diferències en la presència d'àcid siàlic, detectat mitjançant la lectina SNA-Bi. Es detecta la presència d'aquest monosacàrid a les mostres de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica i de plasma seminal de donant sa, però no se'n detecta a la mostra de medi de les cèl·lules LNCaP.

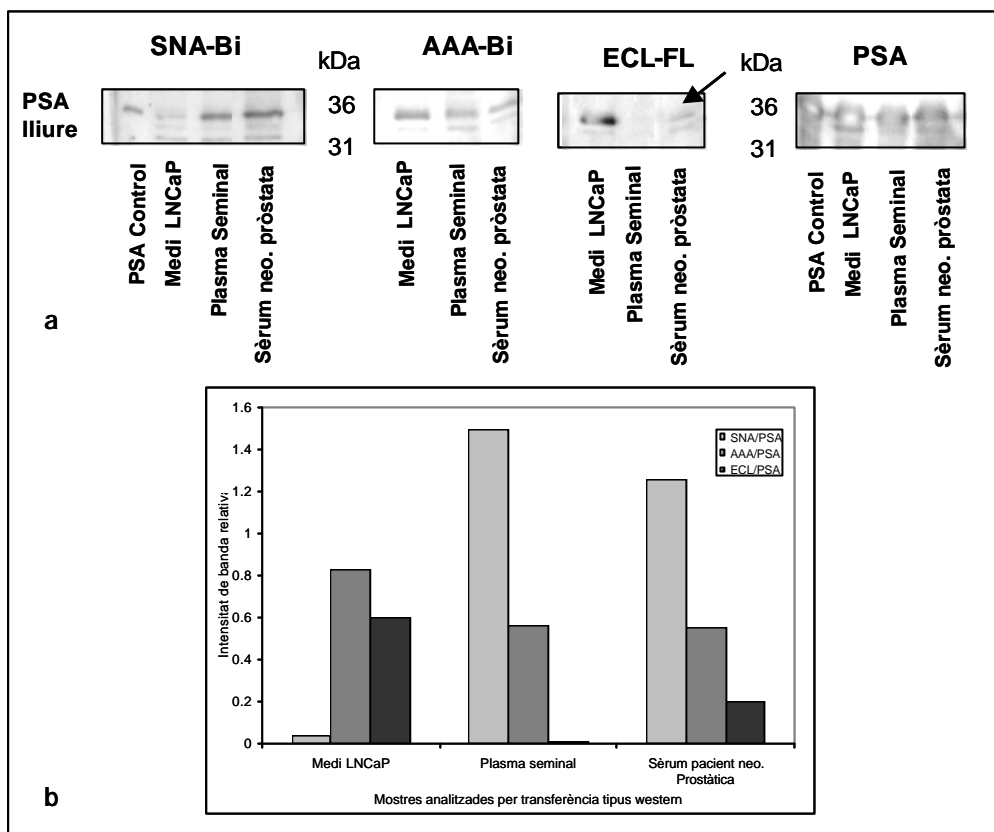


Figura II.23: a) Resultats de les transferències tipus western després d'immunoprecipitar diferents mostres que contenen PSA lliure després d'un tractament amb etanolamina. El PSA control és PSA purificat de plasma seminal (Lee Scientifics, EEUU). Les lectines utilitzades es troben marcades amb biotina (Bi) o fluoresceïna (FL). **b)** Intensitat de banda detectada per lectines relativa a la intensitat de banda detectant la part proteica del PSA.

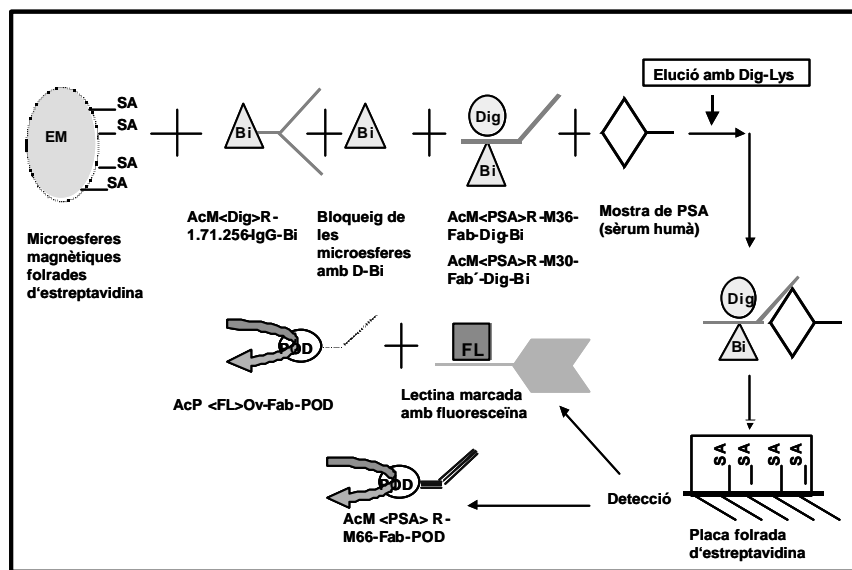
Es detecta la presència de fucoses, amb la lectina AAA-Bi, a totes les mostres assajades (fig. II.23a), amb una intensitat de banda lleugerament superior per LNCaP que per a la resta, quan les quantitats de PSA assajades són iguals.

Per la lectina ECL-FL, que detecta l'estructura Gal β 1-4GlcNAc, els resultats mostren una banda clara corresponent al PSA del medi LNCaP. Per a la mostra de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia pròstica es detecta una banda feble (veure fletxa de la figura II.23). Això indicaria que el PSA del sèrum d'un pacient de carcinoma pròstàtic, pel que fa a la glicosilació, conté majoritàriament el PSA sialilat, present en situació normal (com el de plasma seminal), però també estructures que reaccionen amb ECL (com les presents a LNCaP).

Immunoabsorció indirecta amb doble marcatge seguida d'ELISA i detecció per lectines

Un altre assaig immunològic per a detectar la glicosilació del PSA és un ELISA de captura de PSA immunoabsorbit, seguit d'una detecció mitjançant lectines. Per tal de combinar el protocol d'immunoabsorció indirecta amb la detecció per ELISA cal un anticòs contra PSA lliure doblement marcat, amb digoxigenina i biotina; la digoxigenina per a l'elució específica i la biotina per a unir la mostra de PSA a una placa d'ELISA folrada d'estreptavidina (fig. II.24). Aquest doble marcatge redueix el nombre d'anticòsos que s'haurien d'utilitzar i, per tant, els falsos positius per reaccions creuades entre ells. Aquest assaig, però, presenta l'inconvenient d'haver de bloquejar les microesferes magnètiques folrades d'estreptavidina per a evitar que l'anticòs doblement marcat s'hi uneixi per la biotina, d'aquí que la concentració de biotina per al bloqueig sigui molt crítica.

Figura II.24: Esquema del protocol d'immunoabsorció indirecta amb doble marcatge



seguida per ELISA amb detecció per lectines. S'hi indica la nomenclatura simplificada dels anticòsos i lectines utilitzats.

D'entre totes les lectines testades amb aquest mètode (taula II.4), la que sembla mostrar diferències més importants sense donar falsos positius és l'ECL-FL. D'aquí que els assaigs sobre mostres sèriques es realitzin amb aquesta lectina, però amb més quantitat de PSA per a assegurar-ne les diferències.

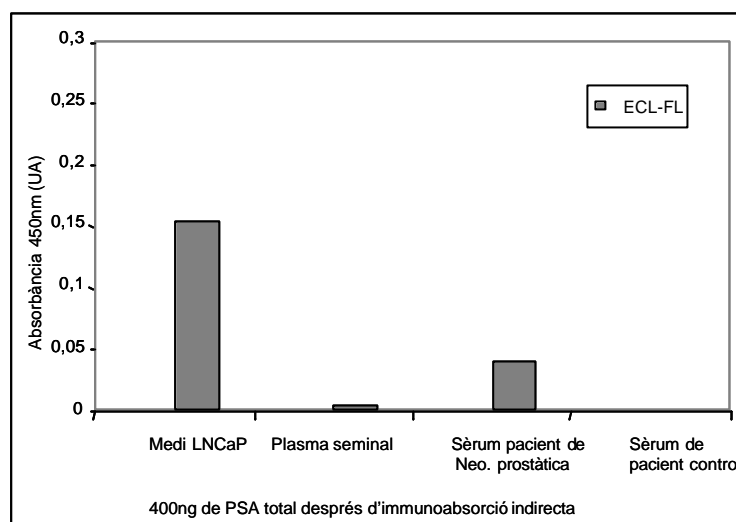


Figura II.25: Gràfic d'ELISA de detecció d'estructures glucídiques del PSA amb la lectina ECL-FL amb immunoprecipitació indirecta amb doble marcatge de mostres de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP, de plasma seminal i de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica (PCa A) i d'un pacient control sa.

Segons els resultats presentats a la figura II.25, sembla que el PSA sèric d'un pacient de carcinoma prostàtic és més proper, quant a la glicosilació, al PSA de plasma seminal de donant que al de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP. Malgrat això, presenta certa reactivitat amb ECL, més característica de la situació tumoral. Això corrobora els resultats presentats per a l'assaig de transferència tipus western anterior.

L'inconvenient d'aquest assaig és que és necessària una quantitat de PSA de com a mínim 400ng, per a que l'ECL-FL sigui prou sensible, i les mostres de sèrum de pacients afectats de carcinoma prostàtic no sempre presenten concentracions de PSA elevades. Seria interessant establir un mètode que permetés millorar el diagnòstic del carcinoma prostàtic a la 'zona gris', entre 4 i 10 ng/mL de PSA total. El fet de necessitar quantitats elevades de PSA, dificulta l'establiment d'aquest assaig com a rutinari o extendre'l a l'estudi de més mostres sèriques.

Immunoabsorció indirecta seguida d'ELISA de captura per lectines

Per tal de disminuir la quantitat de PSA necessari per a la detecció de les seves estructures glucídiques s'estableix una modificació del protocol d'ELISA anterior: la immunoabsorció es simplifica, s'utilitza l'establerta per al protocol de transferència tipus western, i la captura és amb lectines marcades amb biotina. D'aquesta manera es detecta el PSA que contingui les estructures capturades per les lectines AAA-Bi i

SNA-Bi, malauradament no es disposa de la lectina ECL-Bi. Com que hi ha una immunoadsorció prèvia per PSA s'eviten els falsos positius pel fet de capturar proteïnes de la mostra que continguin àcid siàlic o fucoses i no siguin PSA (fig. II.26).

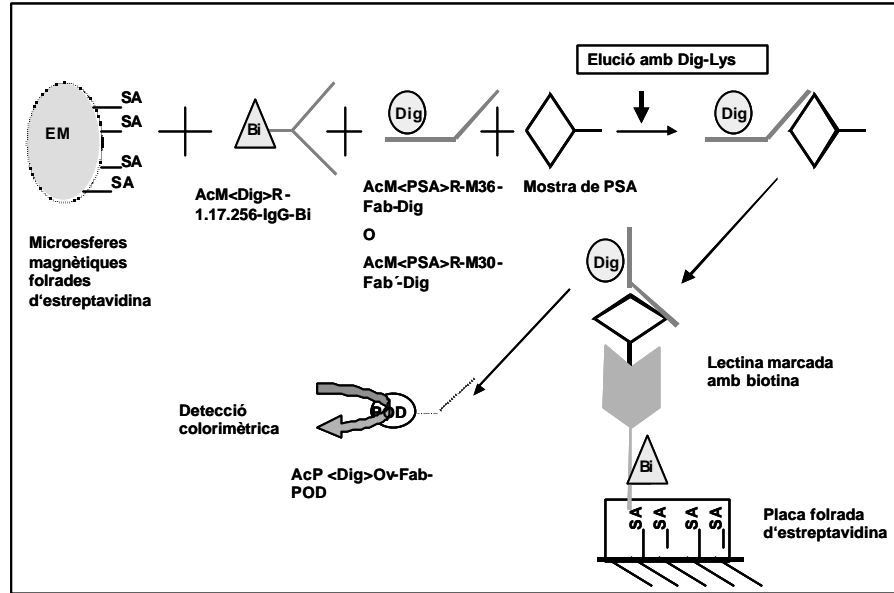


Figura II.26: Esquema del protocol d'immunoadsorció indirecta seguida d'ELISA per captura amb lectines. S'hi indica la nomenclatura simplificada dels anticòsols utilitzats.

A la figura II.27 s'hi representen els resultats d'aquest assaig. Es detecta àcid siàlic principalment a les mostres de plasma seminal i de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica (PCa A), de manera que es corroboren els resultats obtinguts anteriorment, però utilitzant només 25 ng de PSA lliure. Amb aquest assaig no es podria diferenciar clarament el PSA d'una situació normal (plasma seminal de donant) del PSA d'una situació tumoral (sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica).

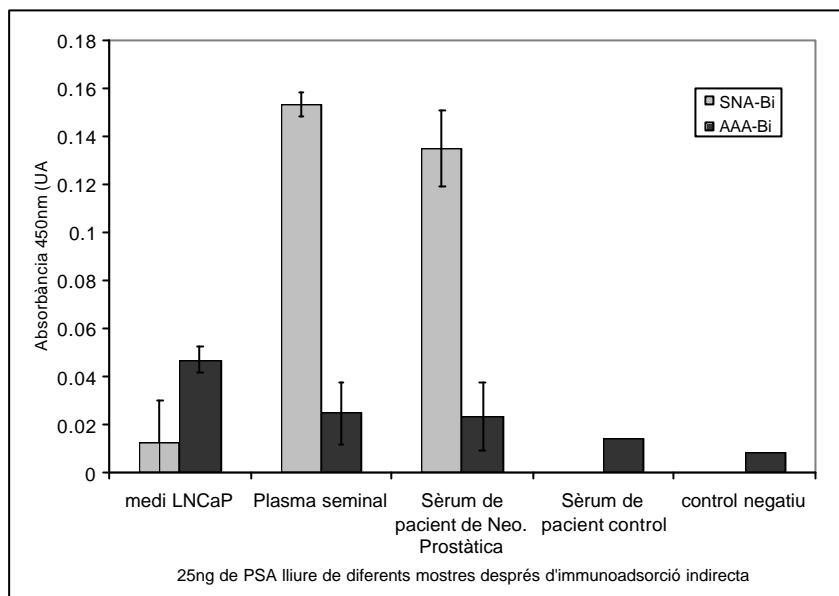


Figura II.27: Gràfic d'ELISA de detecció d'estructures glucídiques del PSA per captura amb les lectines SNA-Bi i AAA-Bi amb immunoprecipitació indirecta prèvia, de mostres de medi de cultiu LNCaP, de plasma seminal i de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica.

La detecció feble d'àcid siàlic a la mostra de PSA de medi de cèl·lules LNCaP no s'havia observat anteriorment, pot ser deguda a una lleugera reacció inespecífica amb alguna proteïna sialilada present. Podrien ser traces d'ACT unides al PSA capturat perquè, tal com han observat altres autors (Corey i col., 1998; Wu i col. 1998), les cèl·lules LNCaP produeixen baixes concentracions d'ACT i, si es cultiven amb FBS, també hi ha ACT bovina present al medi de cultiu. A més, l'ACT es troba abundantment sialilat (Laine i col., 1991).

Pel que fa a les fucoses, se'n detecta la presència a totes les mostres, essent més important la seva presència a la mostra de PSA de medi de cèl·lules LNCaP. Però s'observen falsos positius en utilitzar-la sobre el sèrum d'un pacient control sense PSA.

5.12.2. Caracterització glucídica del PSA per activitat sialiltransferasa

L'assaig d'immunoabsorció lligada a activitat sialiltransferasa (GISA) permet quantificar el grau de sialilació d'una glicoproteïna utilitzant la capacitat de marcatge d'una sialiltransferasa que reconeix específicament un residu terminal d'una cadena de carbohidrats. D'aquesta manera també es podrien diferenciar les formes mono i disialilades.

El fet que una de les possibles diferències detectades en la glicosilació del PSA en situació normal i tumoral sigui la presència d'àcid siàlic, planteja la utilització d'un assaig GISA.

Una modificació d'aquest assaig GISA, establert per Poon i col. (2002) que l'apliquen a l'estudi de l' α -fetoproteïna, detecta el grau de sialilació del PSA. Aquest grau depèn dels terminals que presentin les seves cadenes, és a dir, a una cadena biantenària disialilada no s'hi podrà unir més àcid siàlic, mentre que en una monosialilada o neutra sí. El fet que el nou àcid siàlic estigui marcat amb fluoresceïna permetrà diferenciar-lo de l'àcid siàlic propi. A més, en capturar específicament les molècules de PSA presents en una mostra biològica, mitjançant anticossos específics, es pot saber l'índex de sialilació del PSA d'una mostra concreta (fig. II.28).

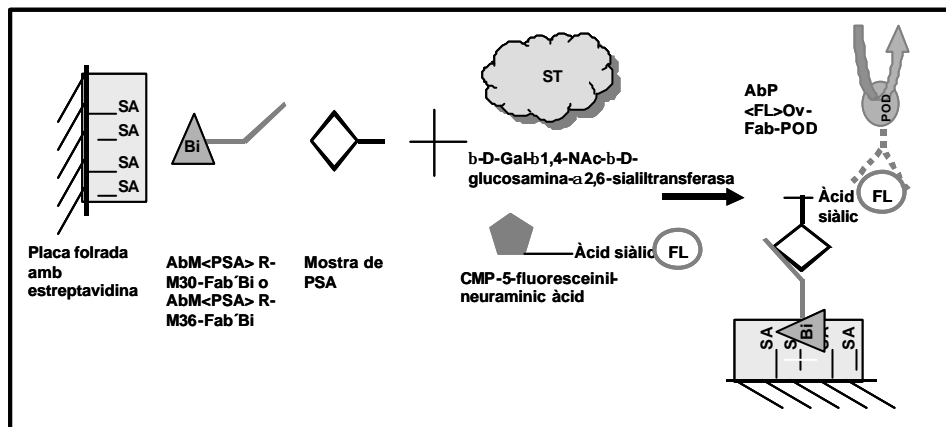


Figura II.28: Esquema de l'assaig GISA utilitzat.

En una primera aproximació es van testar mostres de PSA de plasma seminal i de medi de cèl·lules LNCaP (fig. II.29) i els resultats mostren una diferència molt

important en el grau de sialilació. Al PSA lliure de plasma seminal gairebé no s'hi afegeix àcid siàlic nou, ja que les seves estructures són biantenàries di i monosialilades. Mentre que al PSA lliure del medi de cèl·lules LNCaP la resposta és més important en augmentar la quantitat de PSA assajat, perquè les seves estructures glucídiques són neutres i presenten terminals que poden ser sialilats. Això indica que el PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP no presenta àcid siàlic, que se n'hi pot unir de nou, i que aquesta unió és dependent del PSA capturat pels anticossos.

Aquests resultats corroboren els observats anteriorment per ELISA i transferència tipus western de detecció de sucres amb lectines. Sobretot pel que fa a que la lectina ECL-FL, que detecta les estructures Gal β 1-4GlcNAc, a les que pot unir-se l'àcid siàlic, i detecta principalment el PSA del medi de cultiu de cèl·lules LNCaP. També s'adiuen amb les estructures glucídiques del PSA purificat de plasma seminal i de medi de cèl·lules LNCaP determinades en aquest treball i observades sobre plasma seminal per Bélanger i col. (1995).

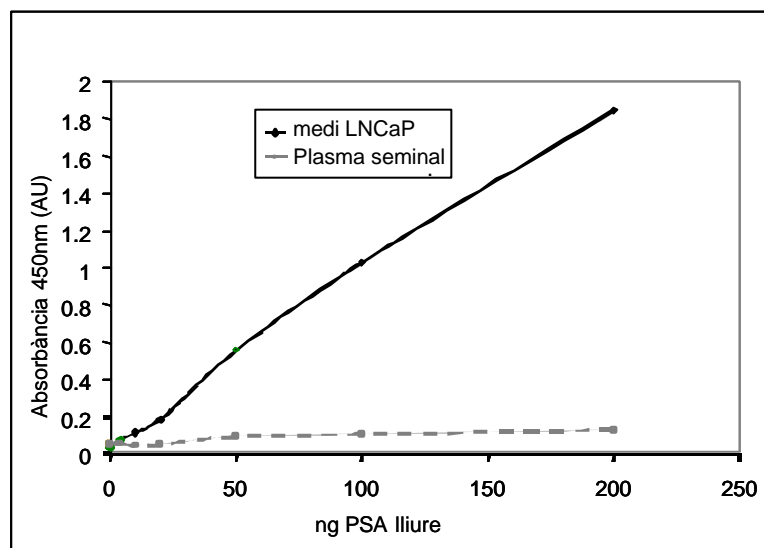
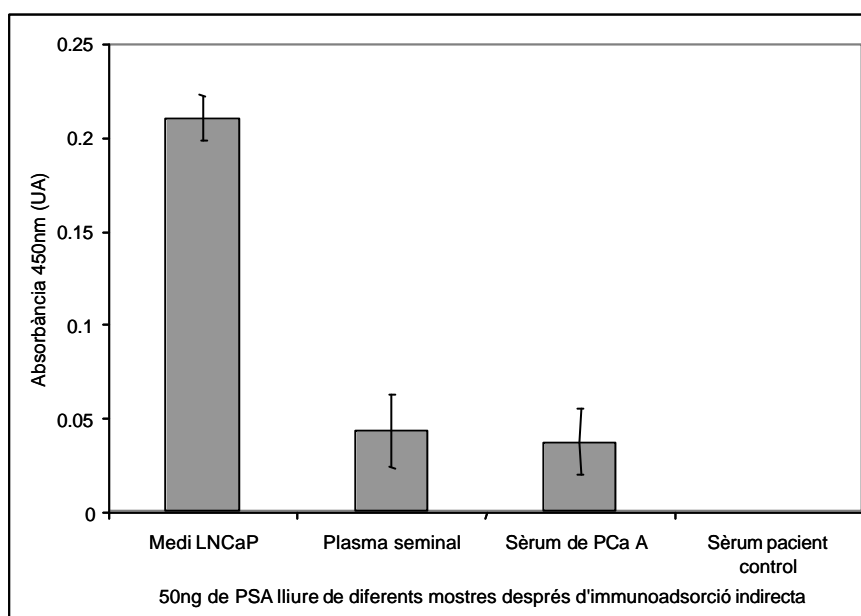


Figura II.29: Assaig GISA amb mostres de PSA de plasma seminal i medi de cèl·lules LNCaP.

Mostres sèriques immunoprecipitades

Aquest assaig es testa amb mostres de sèrum de pacients de carcinoma prostàtic i de pacients control però, igual que amb els assaigs immunològics anteriors, l'elevada concentració de proteïnes del sèrum pot portar a falsos resultats al GISA. Per aquest motiu es porta a terme una immunoadsorció indirecta (amb l'anticòs anti-PSA total marcat amb digoxigenina), seguida d'un tractament amb etanolamina 2M per a trencar el complex PSA-ACT i detectar només la sialilació del PSA lliure, evitant així els falsos positius deguts a la sialilació pròpia de l'ACT.

Figura II.30: Assaig GISA amb mostres de PSA de plasma seminal, de medi de cèl·lules LNCaP i de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica (PCa A).



Dels resultats presentats a la figura II.30, es desprèn que el PSA lliure immunoprecipitat de sèrum de PCa A presenta un nivell de sialilació similar al del plasma seminal de donant sa. Segons aquests resultats, les estructures glucídiques del PSA d'un pacient de neoplàsia prostàtica serien més properes, quant a àcid siàlic, al que presenta el plasma seminal (situació normal) que al que presenta la situació tumoral (medi de LNCaP). Per a l'assaig de GISA no és necessària tanta quantitat de PSA, amb menys de 50ng de PSA lliure és suficient.

Així doncs, amb aquest assaig de GISA no es podria diferenciar clarament una situació normal d'una tumoral. Tanmateix, seria interessant comparar el PSA sèric de

diferents pacient afectats d'hiperplàsia benigna de pròstata amb el de diferents pacients afectats de neoplàsia prostàtica per tal de contrastar aquest comportament.

Mostres sèriques prepurificades per cromatografia d'interacció tiofílica

Un altre tractament al que s'han sotmès les diferents mostres biològiques que contenen PSA és tractar-les prèviament per una cromatografia d'adsorció tiofílica. Aquest procés permet reduir el contingut en proteïna total sense disminuir el contingut en PSA i separar el PSA lliure del PSA unit, per a caracteritzar-ne els nivells de sialilació independentment (fig. II.31).

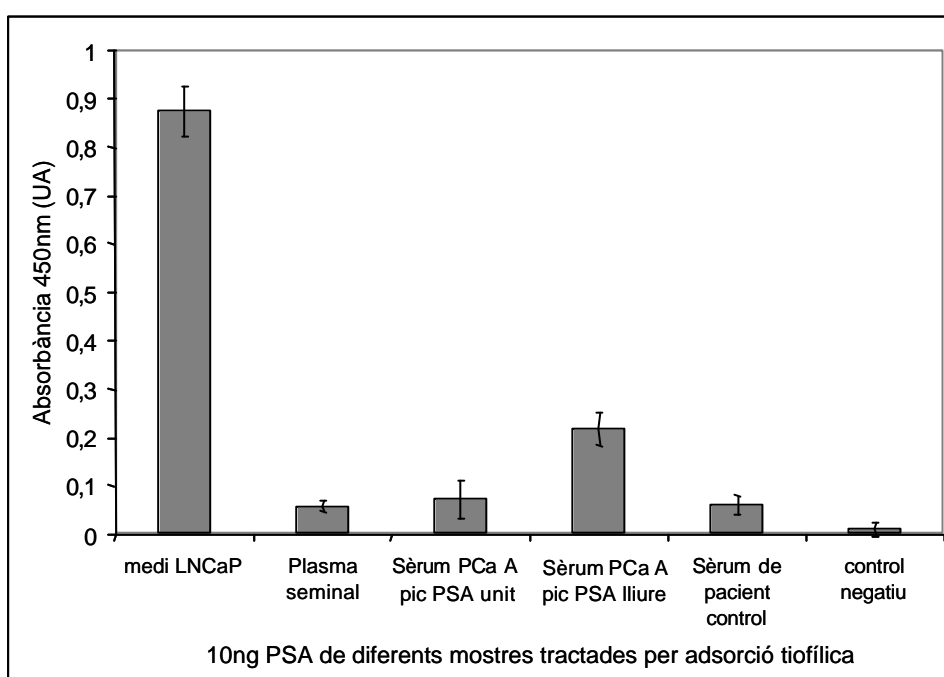


Figura II.31: Assaig GISA amb mostres de PSA de plasma seminal, de medi de cèl·lules LNCaP i de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica (PCa A), tractades prèviament per adsorció tiofílica.

L'anàlisi GISA dels nivells de sialilació de les estructures glucídiques del PSA tractat per adsorció tiofílica mostren resultats similars als obtinguts per GISA de mostres tractades per immunoadsorció indirecta. És a dir, el PSA del medi de cultiu de cèl·lules LNCaP no es troba sialilat i el PSA de plasma seminal presenta àcid siàlic a les seves estructures glucídiques.

Pel que fa a les mostres sèriques, en aquest cas s'han analitzat els pics de PSA unit i lliure per separat, tot i que el PSA unit ha estat tractat amb etanolamina i ja no es

troba unit a l'ACT. Segons els resultats observats, el PSA lliure presenta més llocs de possible sialilació que el PSA que havia estat unit a l'ACT.

Això ha permès portar a terme una caracterització glucídica de diferents mostres que contenen PSA després de cromatografiar-les per adsorció tiofílica, mitjançant un assaig GISA (fig. II.32).

Les mostres analitzades seguint aquest protocol de pre-purificació són: plasma seminal, medi de cultiu de cèl·lules LNCaP, sèrums de pacients de carcinoma prostàtic, de BPH i un sèrum control d'un individu sa. Entre els sèrums de pacients afectats de carcinoma prostàtic s'hi inclou el sèrum ric en PSA (PCa A), separat mitjançant cromatografia d'adsorció tiofílica en un pic de PSA lliure i un de PSA complex. També s'hi inclouen 2 sèrums de pacients diagnosticats de carcinoma prostàtic PCa B i PCa C, amb 100 i 20ng/mL de PSA total, respectivament. Un sèrum control que no conté PSA total i el d'un pacient amb BPH (BPH A) que conté menys de 10ng/mL de PSA total.

Després del protocol d'adsorció tiofílica es quantifica el PSA total obtingut. De totes les mostres hi ha suficient PSA per a caracteritzar-ne les estructures mitjançant GISA, excepte per a la mostra de sèrum d'un pacient de BPH (menys de 5 ng).

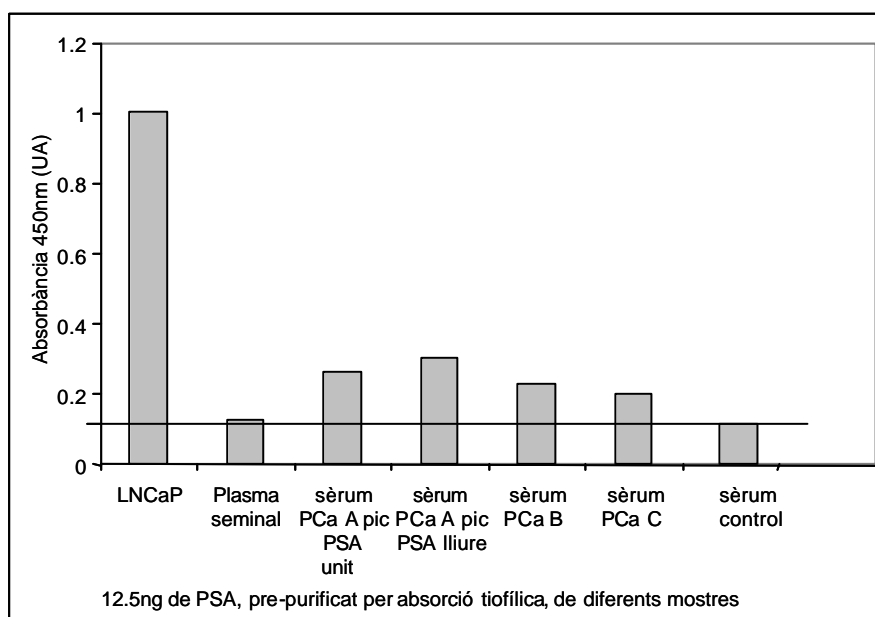


Figura II.32: GISA de detecció de sialilació del PSA sobre mostres de medi de cultiu LNCaP, de plasma seminal i de sèrum de pacients de neoplàsia prostàtica, de BPH i control.

Com es pot observar a la figura, sembla que el potencial de sialilació del PSA lliure és lleugerament superior al del PSA unit, cosa que ja s'havia observat anteriorment. Però a causa dels continguts en PSA dels sèrums PCa B i PCa C, no s'han pogut separar els pics de PSA lliure i unit per a intentar corroborar el mateix comportament que PCa A.

El grau de sialilació de les mostres de PSA sèric de pacients de neoplàsia prostàtica és molt proper al del plasma seminal de donant, però lleugerament superior a aquest. És a dir, sembla que el PSA sèric de pacients de neoplàsia prostàtica presenta una major proporció d'estructures susceptibles d'ésser sialilades respecte del PSA de plasma seminal. Pel que fa al PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP, també es confirmen els resultats obtinguts, que mostren un potencial de sialilació molt elevat.

Dels resultats de tots aquests assaigs se n'extreu que la glicosilació del PSA d'origen tumoral secretat per les cèl·lules LNCaP i el procedent del sèrum d'un pacient afectat de neoplàsia prostàtica (PCa A) són diferents. És a dir, que pel que fa a la glicosilació del PSA, les cèl·lules LNCaP no serien un bon model de la situació tumoral real en pacients de neoplàsia prostàtica.

En estudis previs de glicosilació del PSA s'observa que Sumi i col. (1999), que estudien la glicosilació del PSA per cromatografies consecutives amb diferents lectines, detecten sobre PSA lliure extret de teixit de BPH i de càncer de pròstata, que l'estructura complexa, multiantenària amb $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-4Man}$ està augmentada en càncer de pròstata. També detecten que l'estructura biantenària complexa amb o sense Fuc unida a GlcNAc es troba disminuïda en càncer de pròstata. Amb això suggereixen que l'alteració dels *N*-glicans del PSA durant l'oncogènesi podria servir com a eina diagnòstica pel càncer de pròstata.

En el seu treball sobre detecció de glicosilació per lectines sobre teixits de càncer de pròstata, de pròstata normal i de BPH, Arenas i col. (1999), conclouen que el desenvolupament d'un carcinoma prostàtic s'associa amb un augment dels residus de Gal, i que alguns d'aquests residus estan emmascarats per àcid siàlic o grups sulfat.

També observen que la quantitat de residus d'àcid siàlic $\alpha 2-6$ (reconeguts per la lectina SNA) és similar a la trobada en pròstata normal i BPH, i que pertany a estructures glucídiques amb unió de tipus *O*. En canvi, els residus d'àcid siàlic $\alpha 2-3$ (reconeguts per MAA) corresponen a glicoproteïnes amb unió *N* als residus de Gal i els observaren augmentats en càncer de pròstata. Pel que fa als residus de fucosa, aquests autors observen un marcatge per UEA (*Ulex Europaeus* agglutinin lectin, Vector, EEUU) i AAA moderat a teixit normal, intens a BPH i molt intens a càncer de pròstata.

Aquests estudis són difícils de comparar amb els resultats observats en el present treball ja que la naturalesa de l'aproximació sobre fluids biològics és difícilment comparable amb les observacions sobre teixits.

Existeix un estudi preliminar de glicosilació del PSA en mostres sèriques on Barak i col. (1989) observen diferències significatives entre les taxes d'unio del PSA a ConA entre pacients de càncer de pròstata i BPH. Recentment, Basu i col. (2003), recuperant aquest estudi, han determinat que valors per sobre de $3\mu\text{g/ml}$ de contingut glucídic, en un precipitat per interacció de la lectina genèrica ConA (que detecta $\text{Man}\alpha$ i $\text{Glc}\alpha$) combinat amb concentracions de PSA sèric, són indicatius de malignitat. D'aquí, suggereixen que aquest valor de contingut glucídic podria diferenciar el càncer de pròstata de la BPH. Tanmateix, altres grups (Marrink i col., 1992; Pelt i van Deieijen, 1992) no les han observat. Per tant, la taxa d'unio del PSA sèric a la lectina ConA no seria un marcador tumoral útil, segurament degut a que detectant la glicosilació del PSA sèric, estan detectant principalment PSA-ACT i l'ACT està altament glicosilat.

5.13. Electroforesi bidimensional amb detecció per transferència tipus western

Algunes de les mostres pre-purificades per adsorció tiofílica s'han caracteritzat per electroforesi bidimensional. Emprant aquest mètode se separen les proteïnes segons dos criteris, el primer dependent del punt isoelectric (pI) de la proteïna i el segon per la seva massa molecular.

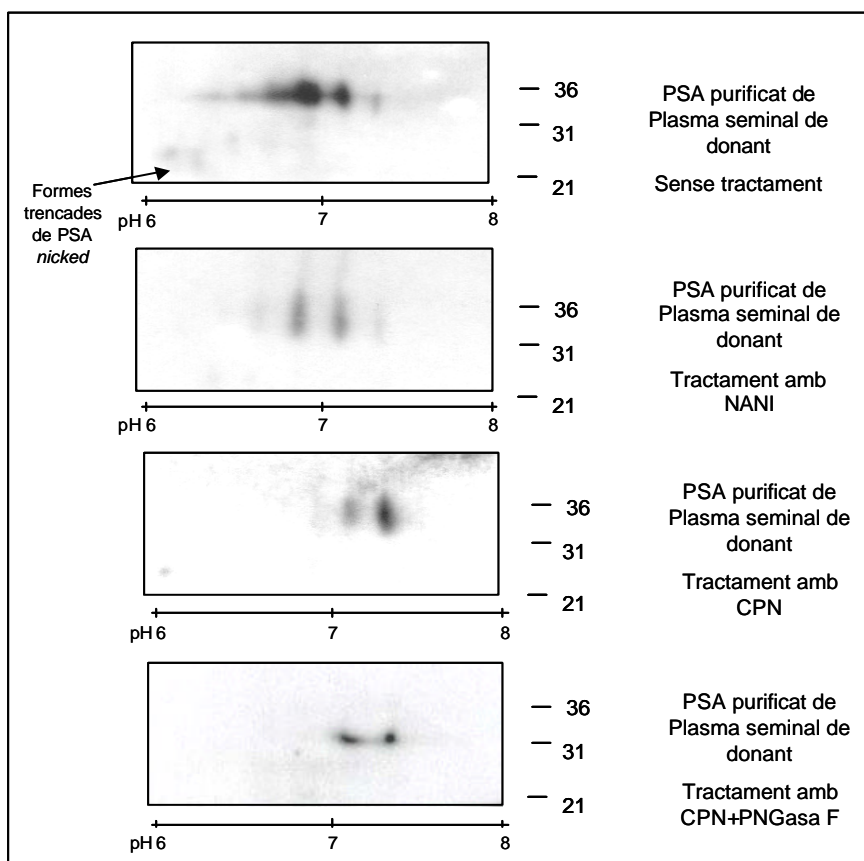
Quan una proteïna conté àcid siàlic a les seves estructures glucídiques, el pI es troba desplaçat cap a pH àcid. Per tant, l'aproximació per electroforesi bidimensional

també permetrà caracteritzar indirectament la glicosilació de diferents mostres de PSA.

Les propietats que contribueixen a la separació en glicofomes al llarg d'un gradient de pI és complexa i multifactorial i difícil d'interpretar assignant a cadascuna d'elles modificacions úniques de la glicoproteïna (Packer i col., 1998).

Pel cas concret del PSA, a més de la glicosilació, s'ha de tenir en compte la presència de formes trencades (*nicked*), a les que manquen aminoàcids, i que es trobaran a un pH més àcid i amb un pes molecular diferent segons el nombre d'aminoàcids escindits (Charrier i col., 1999). També s'ha d'avaluar la presència de les diferents formes de proPSA, que presenten un punt isoelèctric (pI) diferent depenent dels aminoàcids alliberats. Així, la forma -7pPSA presenta un pI teòric de 7.91, les formes de la -6pPSA a la -2pPSA de 7.7 i el -1pPSA i el PSA actiu de 7.26.

Figura II.33: Electroforesi bidimensional de PSA de plasma seminal i detecció per



transferència tipus western. La mostra s'ha tractat amb glicosidases: sialidases de *Clostridium perfringens* (CPN) i de *Streptococcus pneumoniae* (NANI) i N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* (PNGasa F).

En una primera aproximació, per a determinar les diferències de corrent electroforètic degudes a l'àcid siàlic, es tracta amb sialidases una mostra de PSA purificat de plasma seminal. El tractament es duu a terme amb dues sialidases, una purificada de *Clostridium perfringens* (CPN), que digereix els enllaços d'àcid siàlic α 2-6 i α 2-3, i l'altra originària de *Streptococcus pneumoniae* i recombinant en *E.coli* (NANI), que digereix només enllaços d'àcid siàlic α 2-3.

A la figura II.33 i a la taula II.6 s'hi mostren els mapes bidimensionals de la digestió amb sialidases comparada amb la mostra de PSA de plasma seminal no tractada així com la quantificació del percentatge d'intensitats dels diferents punts observats a l'electroforesi bidimensional, respectivament.

% d'intensitat	pI 6.4	pI 6.6	pI 6.9	pI 7.2	pI 7.4
Plasma seminal	5	18	43	27	6.5
+NANI	-	9	42	38	9.8
+CPN	-	-	-	29	71

Taula II.6: Taula resum del percentatge d'intensitat dels punts obtinguts de l'electroforesi bidimensional, de mostres de PSA purificades de plasma seminal digerides amb sialidases: CPN (de *Clostridium perfringens*) i NANI (de *Streptococcus pneumoniae* recombinant a *E.coli*).

El PSA de plasma seminal presenta 5 formes majoritàries a pI 6.4, 6.6, 6.9, 7.2 i 7.4. El tractament amb NANI disminueix la intensitat de les formes situades a pI àcid, donant dos punts principals de pI 6.9 i 7.2 atribuïbles a formes en les que només s'ha digerit l'àcid siàlic α 2-3.

Després de la digestió amb CPN desapareixen les formes més àcides, de pI entre 6.4 i 6.9. Aquestes formes de pI àcid es podrien, doncs, relacionar amb diferents nivells de sialilació i amb el tipus d'enllaç α 2-6 o α 2-3. Això corrobora els resultats observats per seqüenciació glucídica, que mostren la presència d'àcid siàlic amb unió α 2-3 i α 2-6 al PSA de plasma seminal (Peracaula i col., 2003b).

Per tal de determinar que la digestió amb sialidases, en concret CPN, hagi estat completa, la mostra de PSA de plasma seminal digerida es testa per ELISA amb detecció d'àcid siàlic per la lectina SNA i no s'observa detecció. Així, com a resultat de la digestió amb CPN, el PSA no conté àcid siàlic i, per tant, les formes a pI 7.2 i

7.4 són neutres. La diferència entre aquestes dues formes pot ser deguda a la diversitat en les estructures glucídiques. Però el fet que la digestió amb PNGasa resolgui amb dues formes als mateixos pI, descarta aquesta possibilitat. Així doncs, les diferències entre les formes de pI 7.2 i 7.4 no són degudes a la *N*-glicosilació, i podrien ser atribuïbles a una pèrdua d'aminoàcids amb càrrega positiva, com suggereixen Zhang i col. (1995). Aquests autors també observen una certa heterogeneïtat en el cas del PSA de plasma seminal, on han descrit la presència de formes trencades (*nicked*), algunes d'aquestes formes trencades presenten la mateixa massa molecular per electroforesi a causa de la cohesió donada pels cinc ponts disofre que presenta aquesta glicoproteïna. També s'ha descrit la presència de PSA inactiu al que manquen alguns aminoàcids de l'extrem N-terminal en teixit prostàtic (Mikolajczyk i col., 2000). Tanmateix, Isono i col. (2002), sobre PSA purificat de plasma seminal determinen diverses glicofomes en una electroforesi bidimensional, però no observen diferències en els cinc primers aminoàcids quan seqüencien les formes de PSA d'aproximadament 28kDa. Les diferències en el pI degudes a la pèrdua d'aminoàcids les observen sobre formes de menys massa molecular. Tot i que les pèrdues d'aminoàcids podrien donar-se en d'altres punts de la molècula.

A partir d'aquests resultats es porta a terme la separació per electroforesi bidimensional de mostres tractades per cromatografia per interacció tiofílica: plasma seminal de donant, medi de cultiu de cèl·lules LNCaP i sèrum de dos pacients de carcinoma prostàtic PCa A i PCa B (fig. II.34).

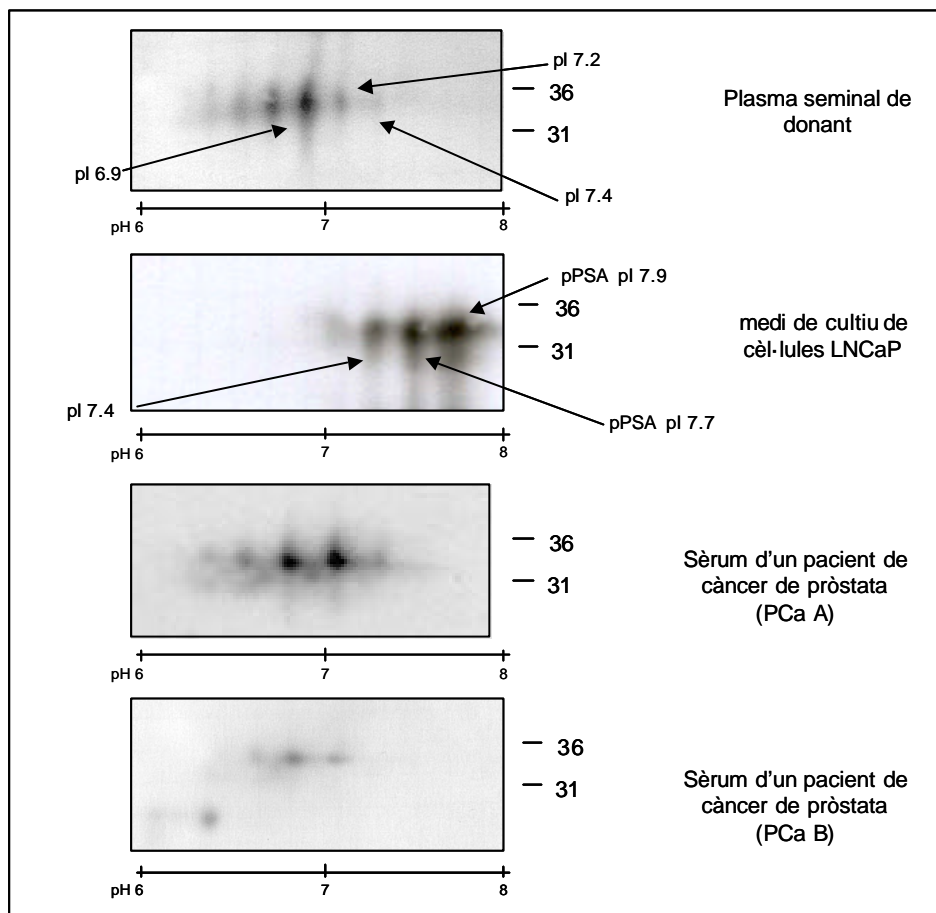


Figura II.34: Transferència tipus western de detecció de PSA després d'una electroforesi bidimensional de mostres de PSA pre-purificades per adsorció tiofílica de plasma seminal, medi de cèl·lules LNCaP i sèrums de pacients de carcinoma prostàtic (PCa A i PCa B).

Plasma seminal

El patró de punts de l'electroforesi bidimensional d'un mostra de plasma seminal pre-purificada per adsorció tiofílica mostra els mateixos 5 punts entre pI 6.4 i 7.4 observats en la mostra pura (fig. II.33) amb una forma majoritària a pI 6.9 i d'altres formes a pI inferiors que corresponen a formes amb àcid siàlic amb enllaç α 2-3 i α 2-6. També s'hi observen les formes menys intenses de pI 7.2 i 7.4 que no es trobarien sialilades (fig. II.34).

El plasma seminal no conté formes pPSA donada l'eficiència de la conversió del pPSA a PSA (Mikolajczyk i col., 2002).

Per electroforesi bidimensional, Charrier i col. (1999) observen que el PSA de plasma seminal presenta 5 punts corresponents a isoformes de PSA intactes i que conté, a més, vàries formes trencades de massa molecular entre 10 i 31kDa i de pI

més àcid. Aquestes formes es poden observar a la figura II.33, perquè s'han utilitzat quantitats de PSA més elevades que les de la figura II.34. La presència de formes trencades de PSA i l'absència de la forma unida PSA-ACT al plasma seminal és descrita també per Qian i col. (1997) i Isono i col. (2002).

Medi de cèl·lules LNCaP

La distribució del PSA de medi de cèl·lules LNCaP és molt diferent a la descrita per plasma seminal. El PSA del medi de cultiu presenta 4 formes a pI entre 7.2 i 7.9. Les formes majoritàries, de pI més bàsic (7.7 i 7.9), es corresponen amb els pI teòrics de dues formes de pPSA, -5pPSA i -7pPSA, respectivament. Aquesta distribució espacial, majoritàriament a la zona bàsica, corrobora l'absència d'àcid siàlic entre les estructures glucídiques del PSA del medi de cèl·lules LNCaP. Mikolajczyk i col. (2002) i Herrala i col. (1998) descriuen que el PSA del medi d'aquestes cèl·lules es troba a pI entre 6.8 i 8.2, valors també de la zona més bàsica.

Pel que fa a l'assignació dels diferents punts observats sobre la mostra de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP, aproximadament un terç del PSA del medi de cèl·lules LNCaP es troba en forma -7pPSA, l'altre terç correspon a la forma -5pPSA i l'altre terç a la forma activa segons Väisänen i col. (1999). Això s'adiu amb les proporcions observades a la taula II.6, essent les formes de pI 7.9 i 7.7 les corresponents a les formes pPSA i les 7.2-7.4 corresponents a la proteïna activa.

Per isoelectroenfoc Väisänen i col. (1999) comparen els punt isoelèctrics (pI) de les diferents formes del PSA purificat del medi de cultiu de cèl·lules LNCaP i de plasma seminal. Teòricament, l'arginina del propèptid del PSA pot causar un canvi de pI entre la forma pro i la forma madura de PSA donat el seu caràcter bàsic. Aquests autors observen que el PSA madur presenta pI entre 6.3 i 7.5 i dues bandes de pI 8.2 i 8.4, bandes que desapareixen en tractar el proPSA amb hK2 i que correspondrien a les formes -5 i -7 proPSA. Aquestes bandes més bàsiques no es detecten al PSA de plasma seminal perquè tot es troba en forma madura (pI entre 6.4 i 7.4). Huber i col. (1995) eren capaços de detectar aquestes formes de pI al voltant de 8.3 en el medi de cultiu de cèl·lules LNCaP i en el sèrum de pacients de carcinoma prostàtic, però no ho podien detectar en el sèrum de pacients de BPH.

Per cromatoenfoc Wu i col. (1998) caracteritzen el PSA lliure purificat de plasma seminal i purificat de medi de cèl·lules LNCaP i determinen que el PSA del medi de LNCaP presenta dos pics majoritaris més bàsics que el PSA de plasma seminal. Aquestes observacions són confirmades per Herralta i col. (1998).

Els resultats obtinguts amb mostres de PSA de plasma seminal i de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP s'adiuen amb les estructures descrites per a la proteïna anteriorment, per assaigs immunològics amb detecció per lectines i per seqüenciació glucídica.

Sèrums de pacients de neoplàsia prostàtica

Les formes de PSA presents a les mostres dels dos sèrums són similars, pel que fa als pI i a les intensitats. Tot i que a la mostra de PCa B se n'observen menys degut a que el contingut total de PSA és menor que al sèrum PCa A. En aquest últim s'observen 5 formes entre pI 6.4 i 7.4, amb tres de majoritàries entre 6.6 i 7.2.

La forma PSA-ACT es troba a sèrum en proporcions elevades, apareix a pI molt àcid, al voltant de 5, degut a l'elevada sialilació de l'ACT (Laine i col., 1991) i presenta una massa molecular de 90kDa (Charrier i col., 1999; Qian i col., 1997). Però aquí no s'observa aquesta forma unida perquè, per tal d'augmentar el PSA lliure que es vol caracteritzar, totes les mostres s'han tractat prèviament amb etanolamina per a trencar el complex PSA-ACT.

Si es comparen les intensitats amb les observades sobre PSA de plasma seminal (taula II.7), s'observen poques diferències entre aquestes mostres. Això s'adiu amb les observacions prèvies sobre el PSA d'ambdós orígens caracteritzat per mètodes immunològics.

Tanmateix, el PSA de plasma seminal presenta una estructura majoritària a pI 6.9 i el PSA de sèrum de neoplàsia prostàtica presenta en proporcions similars una forma sialilada a pI 6.9 i una de neutra a pI 7.2.

Charrier i col. (2001) descriuen els punts que observen sobre mostres de PSA de sèrum de diferents pacients de càncer de pròstata i detecten 3 formes majoritàries a pI entre 6.6 i 7. Pel que fa a les formes trencades, en detecten menys a sèrums de càncer de pròstata que a sèrums de BPH i suggereixen que aquesta diferència podria esdevenir un mètode diagnòstic. Tanmateix, Isono i col. (2002) no detecten formes

de PSA de massa molecular menor a 32kDa en sèrums de pacients de càncer de pròstata, encara que suggereixen que es deu a la sensibilitat del mètode. El mateix que podria ocòrrer en el present treball, perquè tampoc s'observen aquestes formes trencades de PSA sèric.

% d'intensitat	pl 6.4	pl 6.6	pl 6.9	pl 7.2	pl 7.4	pl 7.7	pl 7.9
Plasma seminal	9.5 ± 6	22.8 ± 2.2	42 ± 0.7	19.5 ± 1	6.7 ± 1	-	-
Medi LNCaP	-	-	-	9	23	31	37
PCa sèrum A	7.5 ± 2.5	18 ± 2	31 ± 1	34 ± 2	9 ± 0.7	-	-
PCa sèrum B	-	14.7	51.2	34	-	-	-

Taula II.7: Taula resum del percentatge d'intensitat dels punts obtinguts de l'electroforesi bidimensional, de mostres de PSA pre-purificades per adsorció tiofíllica de plasma seminal, medi de cèl·lules LNCaP i sèrums de pacients de carcinoma prostàtic (PCa A i PCa B) [s'indica el valor ± la desviació estàndard sobre els assaigs realitzats per duplicat].

Per cromatofoc Huber i col. (1995) observen que la distribució de pics del PSA de medi de cèl·lules LNCaP és similar a la del PSA de sèrum de pacients afectats de carcinoma prostàtic i que es troba entre pI 7 i 8.3. En canvi, els isoenzims presents en sèrums de pacients de BPH, es troben situats a la zona de pI més àcid, entre 6.6 i 7.3. Després d'una digestió glicolítica amb l'enzim neuraminidasa, aquests autors expliquen les diferències de pI per la presència d'àcid siàlic a les mostres de sèrum de pacients de carcinoma prostàtic, de BPH i de medi de cèl·lules LNCaP. Aquesta darrera determinació, sobre el PSA del medi de cèl·lules LNCaP, no s'ha observat en el present treball amb cap tipus de mètode de detecció de glicosilació.

Les formes de pPSA descrites per Peter i col. (2001) al sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica es poden detectar en aquests assaigs d'electroforesi bidimensional quan s'utilitza més quantitat de PSA. En concret, s'han observat en assaigs previs algunes d'aquestes formes a pI 7.7 i 7.9. Aquestes formes podrien correspondre's a les descrites al PSA de medi de cèl·lules LNCaP.

Diferents autors han realitzat estudis d'electroforesi bidimensional amb mostres de teixit prostàtic. Així, Ornstein i col. (2000) observen que el PSA de teixit de neoplàsia prostàtica presenta pI més àcids que el PSA present a llisats de cèl·lules de

la línia LNCaP, cosa que confirmaria també els resultats observats en el present treball sobre els corresponents fluids.

Isono i col. (2002) descriuen les isoformes de PSA del teixit d'un pacient de BPH i observen que són molt similars als detectats sobre el PSA de plasma seminal de donant. Alhora, descriuen que les formes de PSA d'un llisat de cèl·lules LNCaP són molt similars a les detectades en mostres de sèrum de pacients de càncer de pròstata; contràriament als resultats observats per Ornstein i col. (2000) i en el present treball, tot i que s'adiuen amb les observacions fetes per Huber i col. (1995).

A més, Isono i col. (2002) suggereixen que hi ha diferències en la glicosilació del PSA entre la situació normal i tumoral, observant els patrons d'isoformes d'aquesta proteïna per electroforesi bidimensional. Cosa que s'ha confirmat amb els resultats del present treball on, malgrat existir similituds pel que fa al contingut d'àcid siàlic entre el PSA d'ambdós orígens, s'observen diferències pel que fa a les proporcions entre les formes sialilades i les formes neutres.

Coneguts aquests resultats, es duu a terme la purificació del PSA del sèrum d'un pacient afectat de neoplàsia prostàtica del que se'n disposa en quantitat suficient i que presenta concentracions de PSA elevades, per tal de determinar-ne les estructures glucídiques.

5.14. Purificació i caracterització glucídica del PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica

Recentment s'ha pogut purificar suficient PSA del sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica (PCa A), per poder determinar les seves estructures glucídiques per seqüenciació glucídica. Aquest coneixement permetrà validar les lleugeres diferències observades en la glicosilació del PSA de plasma seminal i de sèrum d'un pacient afectat de neoplàsia prostàtica i contrastar els mètodes immunològics, d'assaig enzimàtic i d'electroforesi bidimensional utilitzats.

La concentració de proteïnes al sèrum humà es troba entre 57 i 80 g/L, dels quals, el 67% és albúmina, el 17% són immunoglobulines i la resta està compost per unes 300 proteïnes diferents que s'hi troben a concentracions molt baixes (menys de 3.6

g/L), (González de Buitrago i col., 1998). Una d'aquestes proteïnes és l'antigen prostàtic específic (o PSA).

El PSA es pot trobar en sèrum en dues formes: unida a un inhibidor de proteases com l' α 1-antiquimiotripsina (o ACT) o l' α 2-macroglobulina (o AMG); o en forma lliure. S'ha descrit que la major part de la proteïna es troba formant un complex amb l'ACT (70-90%) i es parla de PSA total com la suma del PSA lliure i de l'unit (Ward i col., 2001).

5.14.1. Purificació de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica

Les formes en que el PSA es pot trobar al sèrum, bàsicament en forma lliure o unit a l'inhibidor ACT, s'han de tenir en compte a l'hora de plantejar una estratègia de purificació si es volen caracteritzar només les estructures glucídiques que presenta el PSA lliure. S'ha de separar de l'ACT perquè aquesta es troba altament glicosilada (Laine i col., 1991) i podria interferir en l'estudi.

Wu i col. (1995) estudien diferents mètodes cromatogràfics per a separar el PSA lliure i el complex PSA-ACT que es troben a sèrum, i estableixen un sèrie de cromatografies seqüencials, primer una cromatografia d'intercanvi iònic després, per separar-ne l'albumina sèrica, una columna d'afinitat a la lectina Concanavalina A, després per cromatoenfoc i, finalment separen el PSA lliure del complex pur per cromatografia per gel-filtració S-200, perquè el pes molecular del PSA lliure és al voltant de 30kDa i el de l'unit a ACT és aproximadament 90kDa.

Hilz i col. (1999) caracteritzen les mostres de PSA sèric després de purificar-lo per immunoafinitat, seguida d'una cromatografia d'afinitat a proteïna A i una altra per gel-filtració.

En la purificació portada a terme en el present treball no se segueixen aquestes etapes cromatogràfiques perquè l'objectiu no és separar el PSA lliure del complex PSA-ACT, sinó purificar-lo tot, lliure i unit. Així, el protocol establert per a la purificació del PSA sèric se centra en la purificació del PSA total mitjançant cinc etapes cromatogràfiques. Després, es tracta en condicions alcalines, de manera que es trenca el complex amb l'ACT i s'obté el PSA lliure. Aquest s'acaba de purificar per immunoadsorció específica per PSA lliure.

Es parteix del sèrum PCa A (amb nivells de PSA total d'entre 1-2 µg/mL) del que se'n disposa de 34mL que provenen del Dpt. de Química de Proteïnes de Roche Diagnostics (Penzberg, Alemanya).

Al llarg de la purificació caldrà tenir en compte que el PSA, en ser una serín-proteasa, té la capacitat d'autodegradar-se si no es troba inhibida la seva activitat enzimàtica. Per tant, s'haurà d'evitar aquest procés per a que no se'n vegi reduït el

rendiment, treballant a baixes temperatures i no trencant el complex amb l'inhibidor ACT fins al final del protocol de purificació.

La quantificació del PSA lliure i total al llarg de la purificació es porta a terme mitjançant un assaig d'ELISA sandvitx amb anticossos específics contra aquestes dues formes de PSA.

Cromatografia per interacció tiofíllica

La primera etapa cromatogràfica consisteix bàsicament a eliminar de la mostra de sèrum la proteïna majoritària, l'albumina. Això es porta a terme utilitzant una reïna d'adsorció tiofíllica (3S T-gel), basada en una adsorció de proteïnes a un lligand heteroalifàtic que conté els grups sulfona i tioéter i que és promoguda per sals. Sota unes condicions cromatogràfiques similars a les d'una cromatografia per hidrofobicitat, permet la unió d'immunoglobulines i d'altres proteïnes, com el PSA, però no de les albumines sèriques. El 90% de les proteïnes presents al sèrum no tenen afinitat per aquest gel i seran eliminades de la mostra després del procés cromatogràfic. El protocol de purificació s'ha portat a terme segons Kawinski i col. (2002) que l'utilitzen per a l'estudi del PSA de diferents fluids biològics.

Proves prèvies amb només 1mL d'aquest sèrum de pacient de neoplàsia prostàtica mostren una separació clara del PSA respecte de la resta de proteïnes de la mostra. El PSA s'elueix en dos pics, un corresponent al PSA lliure i l'altre al PSA total, essent el PSA lliure el que queda més fortament retingut a la reïna (fig. II.35). Aquestes diferències s'observen clarament si s'analitzen els pics cromatogràfics per ELISA sandvitx específica per a la detecció de PSA total i lliure. Aquesta distribució ja havia estat descrita per Kawinski i col. (2002). Aquests autors, a més, determinen les diferents formes de PSA segons si es troba lliure o complexat amb diferents inhibidors de proteases, en carregar les fraccions eluïdes de la columna en un gel d'electroforesi en gradient d'acrilamida de 4-15%.

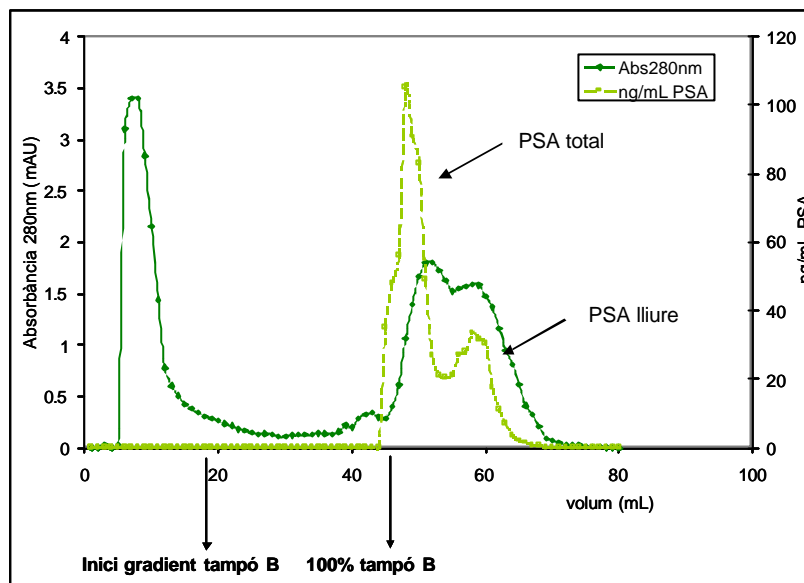


Figura II.35: Cromatograma de la prova de purificació de PSA d'1mL de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica amb una reïna d'adsorció tiofílica.

Després d'aquesta prova prèvia, es porta a terme la purificació del PSA del sèrum PCa A començant amb una cromatografia d'adsorció tiofílica.

Com es pot observar a la figura II.36, gran part de la proteïna total no queda retinguda per la reïna i, quan s'inicia el gradient, comença a eluir-se el PSA. Donat que la relació entre la quantitat de proteïna total i de reïna no és òptima, es podria explicar que, en aquest cas, la separació del PSA total i lliure en dos pics no sigui tan clara.

Després de la separació cromatogràfica, les fraccions positives per PSA, tant lliure com total, s'uneixen, es dialitzen contra aigua milliQ i es liofilitzen.

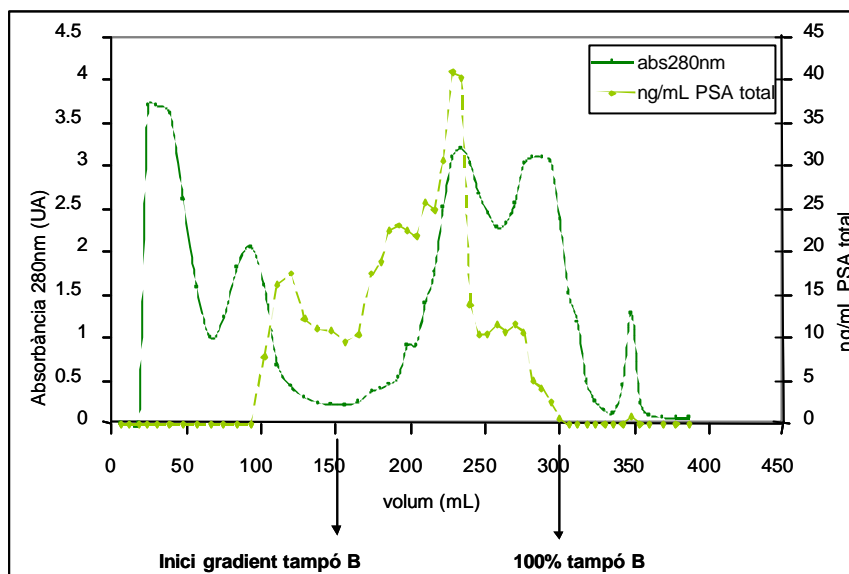


Figura II.36: Cromatograma de la purificació de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica amb una reïna d'adsorció tiofíllica.

Cromatografia d'afinitat amb *cibacron-blue*

El següent pas de purificació de PSA es realitza mitjançant una cromatografia d'afinitat amb *cibacron-blue*. Aquesta permetrà separar de la mostra les proteïnes que no hi queden retingudes perquè el PSA hi queda fortament retingut i serà eluït al final del procés cromatogràfic (fig. II.37). D'aquesta manera també es pot eliminar l'albumina que quedi després de la primera cromatografia, perquè aquesta proteïna queda retinguda per la reïna de *cibacron-blue*, però més feblement que el PSA.

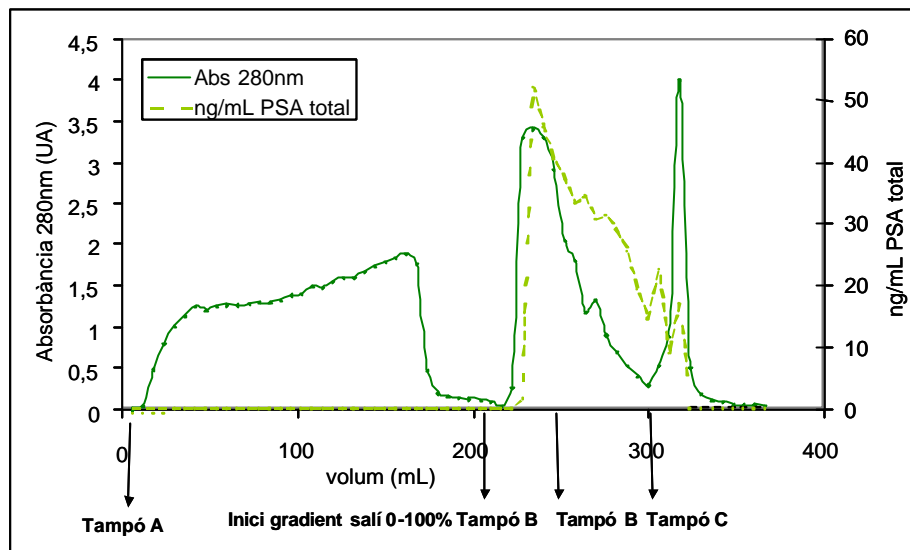


Figura II.37: Cromatograma de la purificació de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica amb una reïna d'afinitat a *cibacron-blue*.

Cromatografia d'afinitat amb proteïna A

Després d'haver eliminat la proteïna majoritària del sèrum, l'albumina, amb les dues cromatografies anteriors, es porta a terme una cromatografia d'afinitat amb proteïna A per tal d'eliminar les immunoglobulines, que representen el 17% del contingut proteic total del sèrum.

Aquesta cromatografia es basa en l'elevada afinitat que presenta la proteïna A per les immunoglobulines humanes, cosa que permetrà separar-les de la mostra de sèrum perquè el PSA no hi queda retingut.

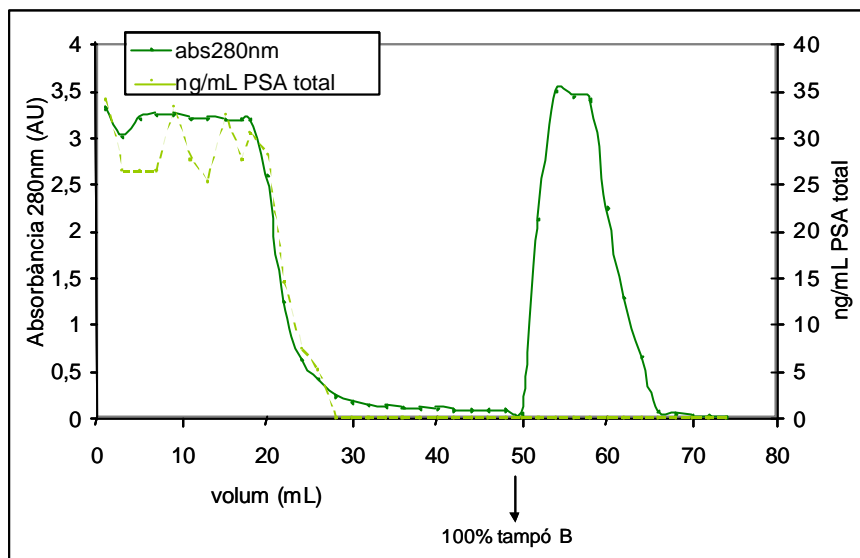


Figura II.38: Cromatograma de la purificació de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica amb una reïna d'afinitat a proteïna A.

Tal com s'esperava, el PSA és eluït al pic inicial i les immunoglobulines queden retingudes i són eluïdes de la columna aplicant un tampó a pH àcid que trenca les interaccions d'afinitat per la proteïna A (fig. II.38).

Cromatografia d'afinitat amb heparina

Proves prèvies amb una columna cromatogràfica d'unió a heparina mostraven que el PSA hi queda retingut. Això podria ser perquè s'ha descrit que el PSA presenta dos llocs d'unió a heparina a la seva superfície, que li permeten formar un complex amb l'inhibidor de proteïna C (PCI) (Villoutreix i col., 1996). Així doncs, la següent etapa cromatogràfica que es porta a terme és aquesta, per tal d'eliminar més proteïnes de la mostra que no quedin retingudes per afinitat a heparina.

Tal com es pot observar al cromatograma de la figura II.39, la interacció entre l'heparina i el PSA no és molt forta, perquè part del PSA és eluït amb la fracció no retinguda i part és eluït al pic. Per tal de millorar la purificació, la fracció no retinguda es recromatografia i el pic retingut s'uneix al de l'anterior cromatografia d'afinitat amb heparina.

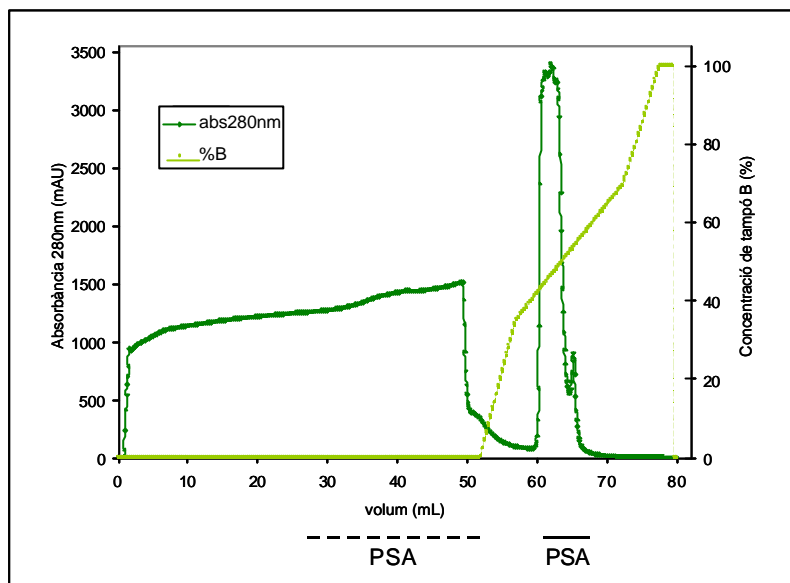


Figura II.39: Cromatograma de la purificació de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica amb una reïna d'afinitat a heparina. La línia contínua mostra les fraccions que presenten un elevat contingut en PSA i la discontinua, aquelles que presenten un contingut en PSA baix.

Els dos pics de les cromatografies d'afinitat a heparina s'uneixen i es cromatografien amb una nova columna d'adsorció tiofílica, ja que és la reïna que millor aïlla el PSA i, en aquest punt de la purificació, la quantitat de proteïna total s'ha reduït molt i no hi ha immunoglobulines que puguin competir per la reïna d'adsorció tiofílica amb el PSA.

Resum del procés de purificació

En aquest punt s'analitza la puresa de les mostres al llarg de la purificació per electroforesi en gel d'acrilamida en condicions desnaturalitzants (fig. II.40) i se'n compara el contingut en proteïna total i en PSA lliure i total (taula II.8).

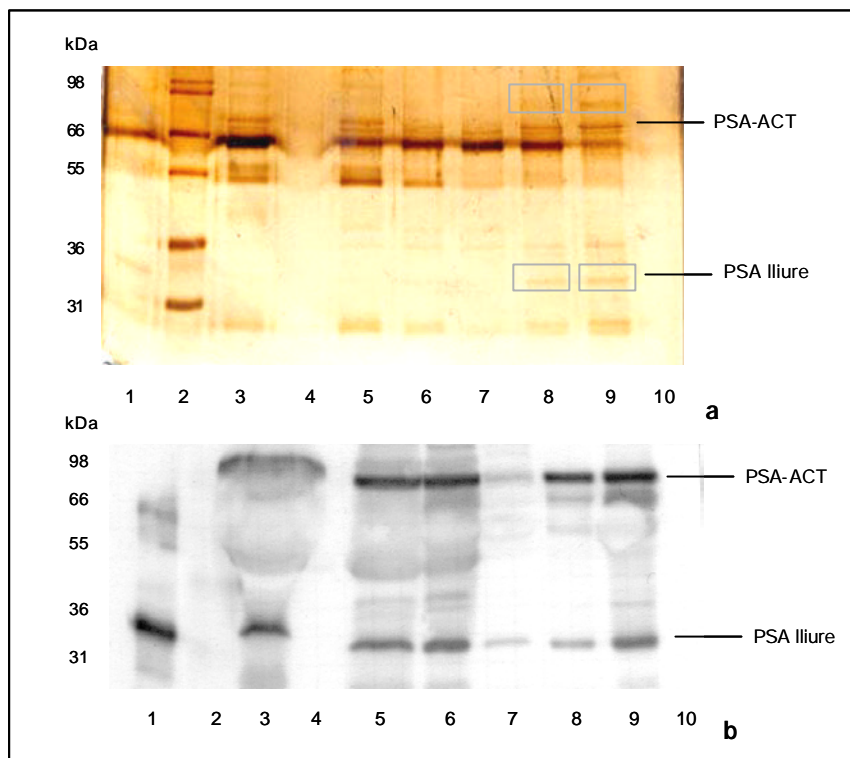


Figura II.40: a) Gel d'electroforesi en condicions desnaturalitzants amb tinció per nitrat de plata dels diferents passos cromatogràfics de la purificació de PSA de sèrum PCa A [50ng de proteïna total dels diferents passos cromatogràfics. 1: 100ng PSA control purificat de plasma seminal. 2: marcadors de pes molecular. 3: sèrum de PCa A abans de la purificació. 5: després de la cromatografia d'adsorció tiofílica. 6: després de la cromatografia d'afinitat a cibacron-blue. 7: després de la cromatografia d'afinitat a proteïna A. 8: després de cromatografia d'afinitat a heparina. 9: després de la segona cromatografia d'adsorció tiofílica]. b) Transferència tipus western de detecció de PSA dels diferents passos cromatogràfics de la purificació de PSA de sèrum PCa A. [10 ng de PSA total dels diferents passos cromatogràfics. 1: 10 ng PSA control purificat de plasma seminal. 2 a 9: veure el gel a)].

S'han requadrat les bandes del gel d'electroforesi tenyit amb nitrat de plata corresponents al PSA lliure i al PSA total de les darreres etapes de purificació (II.40a). Aquestes bandes també es poden observar en la detecció immunològica del PSA per transferència tipus western amb anticossos policlonals contra aquesta proteïna (II.40b).

	Volum (mL)	Proteïna total (mg)	PSA lliure (mg)	PSA total (mg)	Puresa (%)	Rendiment (%)
Sèrum neoplàsia prostàtica	34	2300	12	35	0.001	100
Adsorció tiofíllica	68	406	10	24	0.006	68.4
Afinitat a <i>cibacron-blue</i>	153	236	5.5	13.5	0.006	38.5
Afinitat a proteïna A	35	100	5.5	12.3	0.012	35
Afinitat a heparina	50	51	4	11.2	0.022	32
Adsorció tiofíllica	70	8.6	2.7	10.6	0.123	30

Taula II.8: Resum del procés de purificació de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica. La puresa i el rendiment s'han calculat en funció del PSA total.

Durant el procés de purificació hi ha pèrdues importants de PSA en dos punts, el primer, després de la cromatografia d'adsorció tiofíllica, degut principalment a processos de precipitació per sals, ja que l'important volum de mostra s'ha de dissoldre en un tampó amb elevades concentracions de sulfat sòdic (1M) abans de portar a terme la cromatografia. El segon punt es troba entre la cromatografia anterior i la d'afinitat a *cibacron-blue*, això és degut a que es podria haver perdut mostra en proves prèvies de diferents processos cromatogràfics, portats a terme per tal de posar a punt el protocol de purificació òptim, abans de seguir processant la mostra. A més, durant aquestes proves hi podria haver hagut certs processos d'autodegradació del PSA.

L'objectiu d'aquesta purificació és la caracterització de les estructures glucídiques del PSA present a sèrum, tant el que es troba en forma lliure com el que formava un complex amb l'ACT. Per a alliberar el PSA complexat es porta a terme un protocol de trencament del complex PSA-ACT en condicions alcalines seguit d'una immunoadsorció específica per a PSA lliure segons el protocol establert per Peter i col. (1999). Després, l'eluit obtingut es dialitza contra aigua milliQ per a eliminar-ne les sals i es liofilitza per a reduir-ne el volum.

Una part d'aquest PSA purificat s'utilitza per a la caracterització de les estructures glucídiques mitjançant un assaig immunològic associat a l'activitat sialiltransferasa (GISA). La major part d'aquest PSA purificat s'envia al Glycobiology Institut de la Universitat d'Òxford per a seqüenciar-ne parcialment les estructures glucídiques seguint el mètode descrit per Guile i col. (1994).

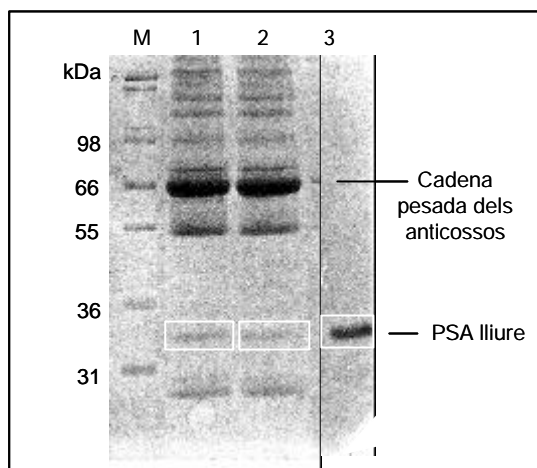


Figura II.41: Gel d'electroforesi en condicions desnaturalitzants amb tinció per blau de Coomassie de les fraccions obtingudes de la immunoabsorció específica pel PSA lliure del sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica [M: marcadors de pes molecular. 1 i 2: PSA purificat i immunoprecipitat. 3: 5µg de PSA control purificat de plasma seminal].

Les bandes que s'observen al gel requadrades (fig. II.41) corresponen al PSA lliure purificat per immunoabsorció (aproximadament 28kDa). També s'hi observen les cadenes lleugeres i pesades corresponents als anticossos utilitzats durant la immunoabsorció.

5.14.2. Caracterització glucídica del PSA purificat de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica

Caracterització per GISA

Amb aquest assaig GISA (veure apartat 4.2.2 a la pàg. 181) es vol determinar la diferent capacitat d'addició d'àcid siàlic sobre les cadenes glucídiques del PSA purificat de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica, de plasma seminal i de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP.

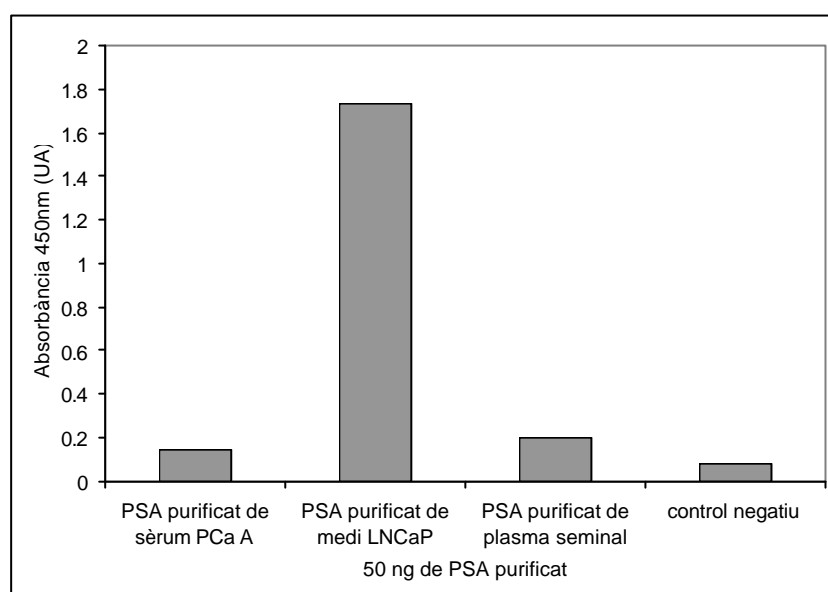


Figura II.42: Assaig GISA sobre les mostres de PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica, de plasma seminal i de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP.

Com es pot observar a la figura II.42, pel que fa al potencial de sialilació, el PSA purificat de sèrum d'un pacient de carcinoma prostàtic no es diferencia del que presenta el PSA purificat de plasma seminal, corroborant els resultats obtinguts a l'apartat 4.2.2 (pàg. 183). Segons aquests resultats, ambdues mostres es troben sialilades i gairebé no permeten la unió de nou àcid siàlic, cosa que sí s'observa sobre la mostra de PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP ja que, com s'ha descrit anteriorment, aquest PSA no es troba sialilat.

Caracterització per seqüenciació glucídica

Malgrat els pocs micrògrams de PSA purificat del sèrum PCa A, s'ha pogut dur a terme una seqüenciació glucídica parcial que ha permès constatar les principals estructures glucídiques presents.

Els resultats de la seqüenciació glucídica mostren la presència d'àcid siàlic en la majoria d'estructures glucídiques del PSA de sèrum PCa A. S'observa, així mateix, la presència de fucoses al nucli d'algunes estructures glucídiques (fucoses *inner core*) i no se n'observa cap fora del nucli. A més, no s'ha observat el monosacàrid GalNAc en cap estructura.

Aquestes observacions diferencien el PSA sèric del purificat de plasma seminal, que conté més estructures amb fucoses al nucli i en un 25% d'aquestes presenta GalNAc. Alhora que el diferencien del PSA secretat per les cèl·lules LNCaP, que no presenta àcid siàlic i les seves estructures contenen més fucoses, dins i fora del nucli, i més GalNAc (veure taula II.9).

	PSA de plasma seminal	PSA de medi de cèl·lules LNCaP	PSA de sèrum d'un pacient de neo. prostàtica
Àcid siàlic	si	no	si
Fucosa α 1-6GlcNAc (nucli)	83% dels glicans	>83% (gairebé tots)	aprox. 1/3 de les estructures
Fucosa α 1-2 (fora del nucli)	no	10-15% dels glicans	n.d.
GalNAc	25% dels glicans	65% dels glicans	n.d.

Taula II.9: Taula resum comparativa dels resultats de seqüenciar les estructures glucídiques del PSA purificat de plasma seminal, de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP i de sèrum PCa A (n.d., no determinat).

Pel que fa als resultats que s'han observat en els assaigs immnològics i enzimàtics previs (apartat 4.2. de la pàg. 173), es poden explicar si es té en compte no només l'àcid siàlic sinó també la resta d'estructures glucídiques presents.

Les diferències en el grau de sialilació entre el PSA de plasma seminal i el de sèrum d'un pacient afectat de càncer de pròstata és més important que l'esperat segons els resultats de seqüenciació glucídica del PSA d'aquestes mateixes mostres. Cal tenir en compte que a l'assaig GISA la sialiltransferasa utilitzada uneix àcid siàlic α 2-6 amb preferència sobre residus de Gal (Harduin-Lepers i col., 2001) i la proporció de Gal accessibles és superior en el PSA del sèrum del PCa A, que en el de plasma seminal, doncs aquest presenta, a més, residus de GalNAc enlloc de Gal.

D'altra banda, segons els resultats obtinguts en la seqüenciació glucídica, s'esperaria una resposta més febla del PSA de sèrum PCa A amb la lectina AAA, donat el baix contingut en fucosa observat en aquesta mostra, respecte del plasma seminal, però no s'ha observat per ELISA o transferència tipus western.

Malgrat que en els estudis de caracterització glucídica del PSA de sèrum de PCa A i de plasma seminal no s'observen diferències significatives, l'estudi s'hauria d'ampliar a la caracterització del PSA de més mostres sèriques de PCa i BPH, per tal de corroborar i ampliar aquests resultats.

Els assaigs immunològics utilitzats en la caracterització glucídica de les mostres no purificades són útils per a aquest objectiu i seran importants per tal de portar a terme un estudi ampli de comparació de PSA sèric de pacients afectats de BPH i de neoplàsia prostàtica. La seroteca per a desenvolupar aquest objectiu s'està establint actualment.

5.15. Anàlisi de la glicosilació de la superfície cel·lular

Les alteracions de la glicosilació de la superfície cel·lular, en glicoproteïnes i glicolípid, és comú en les cèl·lules canceroses i prové de canvis en l'activitat glicosiltransferasa o en l'expressió gènica (Kim i Varki, 1997; Dennis i col., 1999; Orntoft i Vestergaard, 1999).

D'aquí que és interessant conèixer si existeix una relació entre la glicosilació observada en la superfície cel·lular i la glicosilació que presenten les proteïnes de secreció, en aquest cas el PSA.

S'utilitza el mètode de l'ELISA sobre cèl·lules fixades, en que les cèl·lules de càncer de pròstata es fan créixer fins a confluència, es fixen i se'n detecten les estructures glucídiques de superfície mitjançant anticossos i lectines específics. Es comparen les línies cel·lulars de carcinoma prostàtic PC-3, DU-145 i LNCaP (fig. II.43), utilitzant línies cel·lulars control de càncer de pàncreas (Capan-1) i de càncer de mama (MCF-7).

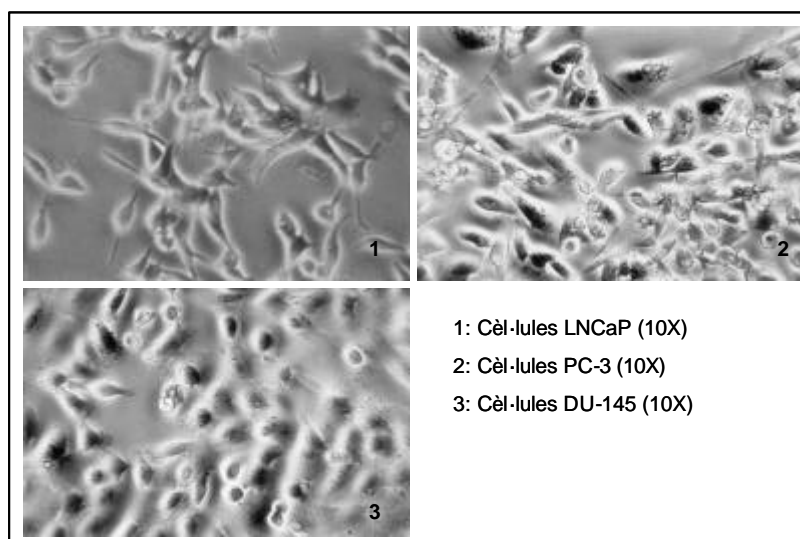


Figura II.43: Fotografies de les cèl·lules de carcinoma prostàtic utilitzades en el present treball, sota microscopi de contrast de fases, a 10 augments.

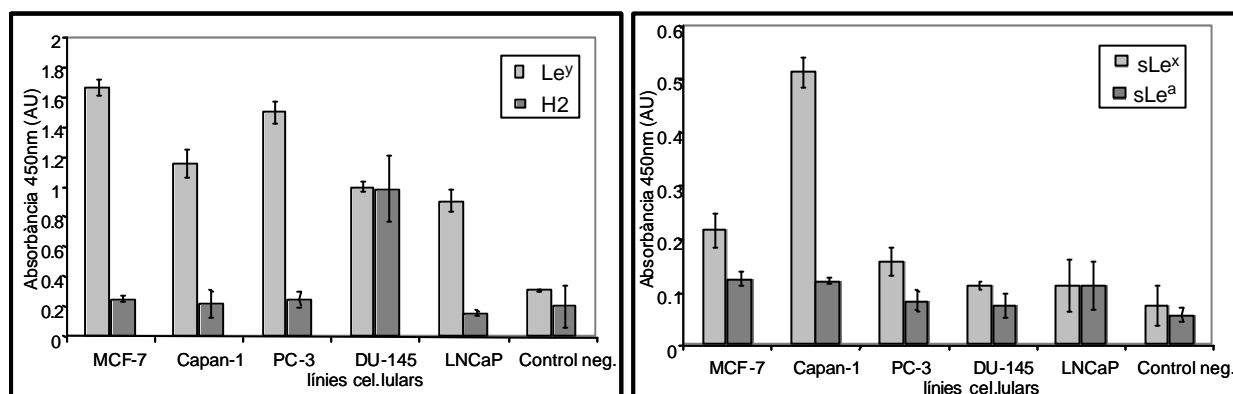


Figura II.44: Gràfics d'ELISA de cèl·lules fixades per a la detecció d'estructures glucídiques mitjançant anticossos. Anticossos contra les estructures Lewis: Le^y, H2, sLe^x, sLe^a.

Tal com s'observa a la figura II.44, s'han testat diferents epítops glucídics amb anticossos específics del grup Lewis: Le^y, H2, sLe^a i sLe^x.

Totes les línies presenten l'estructura glucídica Le^y i només la línia DU-145 és positiva per la presència de l'epítot H2.

L'antigen Le^y s'ha trobat en molts tumors epitelials i en alguns teixits humans normals. Alguns autors observen que la majoria de metàstasi distants i a nòdul limfàtic d'un càncer de pròstata expressen antigens glucídics del tipus Lewis classe 2 (Culig i col., 1998). Això es relaciona amb el treball de Martensson i col. (1995), que indiquen una alteració de l'activitat glicosiltransferasa en càncer de pròstata on és

conservada o, inclús, augmentada, l'activitat dels enzims responsables de la síntesi de la seqüència nucli dels glicans tipus 2 i que poden esdevenir l'estructura Le^y o sLe^x, afegint-hi fucoses i/o àcid siàlic (fig. II.45).

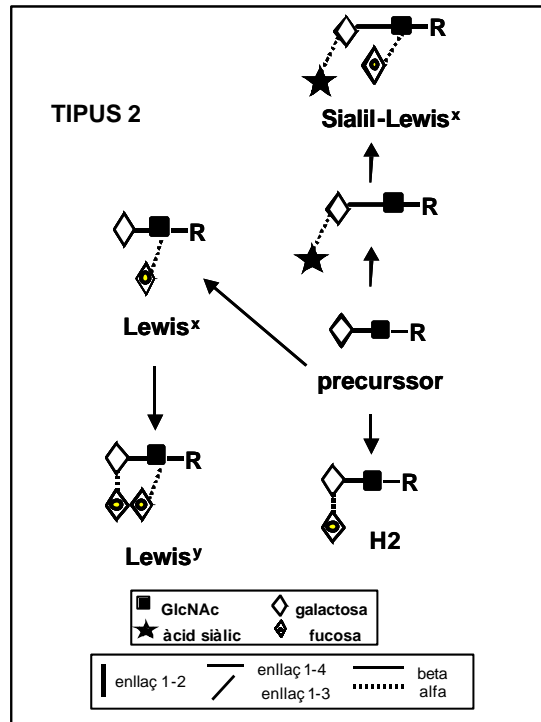


Figura II.45: Esquema de la formació dels diferents antígens de grup Lewis tipus 2. Modificat de Chandrasekaran i col. (1996).

Pel que fa al sLe^x i al sLe^a, les línies de carcinoma prostàtic no els presenten, tot i ser línies metastàsiques. Jorgensen i col. (1995) associen la detecció de sLe^x amb un mal pronòstic del càncer de pròstata, ja que observen que es troba sobre-expressat en teixits de pacients en la fase agressiva de la malaltia, quan es fa hormono-resistent.

Tanmateix, aquestes línies de carcinoma prostàtic és possible que presentin àcid siàlic, com a característica de metastasi, però no les estructures concretes sLe^x i sLe^a.

Per tal d'ampliar la presència d'àcid siàlic i fucoses sobre la superfície cel·lular, es porta a terme el mateix assaig d'ELISA amb detecció de glicosilació per lectines (fig. II.46).

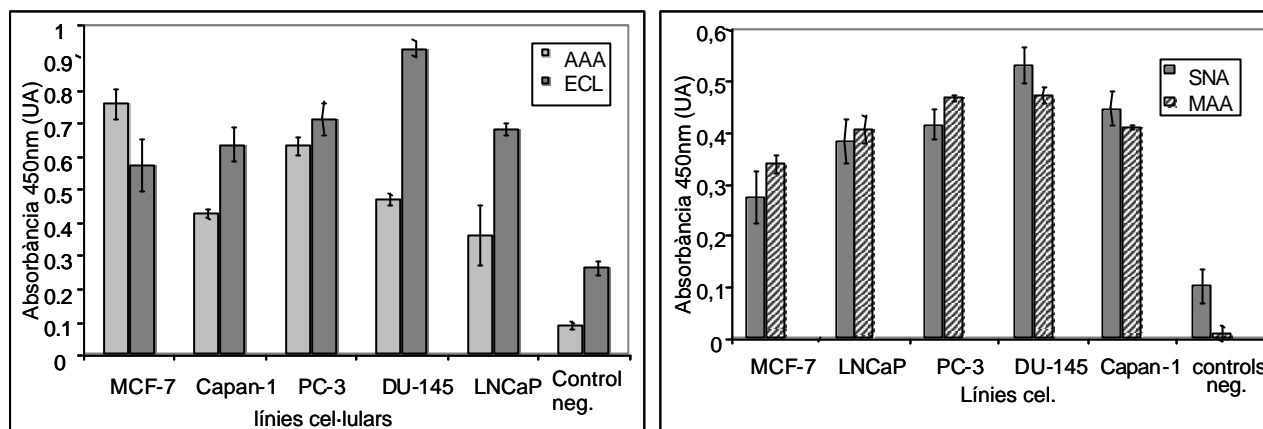


Figura II.46: Gràfic d'ELISA de cèl·lules fixades amb detecció per lectines. Les lectines utilitzades són AAA-Dig, ECL-FL, SNA-Dig i MAA-Dig.

La presència de fucoses es detecta amb la lectina AAA sobre la superfície de totes les línies estudiades. La lectina ECL, que detecta l'estructura Gal β 1-4GlcNAc quan a aquesta no hi ha unit àcid siàlic, és positiva per a totes les línies. Alhora que les lectines SNA i MAA detecten àcid siàlic sobre totes les línies.

Això es podria explicar per diferències de sialilació de les glicoproteïnes i glicolípids de membrana, que es detectarien alhora amb ECL i SNA o MAA. A més, la presència d'àcid siàlic confirma el caràcter metastàtic de les línies estudiades. Però no és transportable a una proteïna de secreció com el PSA.

DISCUSSIÓ GENERAL

El càncer és una malaltia caracteritzada pel creixement excessiu i descontrolat de cèl·lules que envaeixen teixits i òrgans, podent provocar la mort de l'individu (Cross i Dexter, 1991). Als països desenvolupats una de cada cinc persones morirà a causa del càncer (Alberts i col.,1994), concretament, a Europa l'any 2000, s'arribà a un milió de morts a causa d'aquesta patologia (Boyle i col., 2003).

La glicosilació alterada és una característica de les cèl·lules tumorals, que es presenta a la superfície cel·lular d'aquestes com a part de les glicoproteïnes i glicolípidis ancorats a la membrana cel·lular. Les glicoproteïnes de secreció poden reflectir un patró de glicosilació alterat a les cèl·lules canceroses i aquestes podrien utilitzar-se com a marcadors tumorals (Orntoft i Vestergaard, 1999).

La glicosilació alterada s'ha estudiat en d'altres proteïnes de secreció. L'alfa-fetoproteïna sèrica (AFP) és una glicoproteïna amb un lloc de N-glicosilació biantenari de tipus complexe. Els nivells sèrics d'alfa-fetoproteïna s'utilitzen per al diagnòstic del carcinoma hepatocel·lular, però la seva especificitat s'ha de millorar donats els falsos positius observats en patologies hepàtiques no malignes. Johnson i col. (1999) observen nivells més elevats de fucosilació en l'AFP de pacients de carcinoma hepatocel·lular, respecte de patologies hepàtiques benignes. A més, determinen que l'AFP presenta estructures monosialilades en pacients de carcinoma hepatocel·lular, mentre que en malalties hepàtiques benignes l'AFP es troba disialilat. Aquestes diferències els han permès desenvolupar un mètode de detecció immunològica basat en l'activitat sialiltransferasa (GISA), amb el que observen diferències entre la situació benigna i maligna i ho proposen com a marcador serològic per al carcinoma hepatocel·lular (Poon i col., 2002).

D'altres patologies no canceroses presenten també canvis en la glicosilació de les proteïnes de secreció. Rydén i col. (1997) analitzen les diferències en la presència d'àcid siàlic i fucoses de l' α 1-glicoproteïna (AGP), que presenta cinc llocs de N-glicosilació del tipus complexe. Observen que aquesta glicoproteïna sèrica presenta nivells de sialilació i fucosilació diferents en donants, comparats amb pacients de diferents patologies inflamatòries.

Per aquest motiu, en aquest treball s'ha plantejat l'estudi de la glicosilació de dues glicoproteïnes de secreció en situació normal i tumoral.

El càncer de pàncreas

El càncer de pàncreas presenta una taxa d'incidència gairebé igual a la taxa de mortalitat, i suposa la quarta causa de mort per càncer (Cancer Statistics, 2003), tot i ésser un tumor poc freqüent entre els tumors digestius (García Sáenz, 1999).

La RNasa 1 és una glicoproteïna produïda majoritàriament pel pàncreas, amb activitat enzimàtica en la degradació de l'àcid ribonucleic. Presenta tres possibles llocs de *N*-glicosilació, a l'Asn34, l'Asn76 i l'Asn88 (Beintema i col., 1988).

En el present treball s'han determinat els nivells de RNasa 1 en sèrum mitjançant un assaig immunològic tipus ELISA sandvitx, per al que s'han produït anticossos en gallina contra aquesta glicoproteïna. La utilització d'un assaig immunològic amb dos anticossos específics produïts contra la proteïna recombinant ha permès millorar la sensibilitat en la detecció de la RNasa 1 sèrica, respecte de la observada per d'altres autors amb mètodes immunològics (Weickmann i col., 1984; Kurihara i col., 1984). Aquestes diferències de sensibilitat es poden explicar perquè cap d'aquests autors havia tingut en compte que la RNasa 1 es troba glicosilada a l'hora de produir els anticossos i la influència que això podria tenir en el reconeixement immunològic.

Comparant els nivells de RNasa 1 en sèrum de pacients control sans, de pacients afectats d'adenocarcinoma pancreàtic, de pancreatitis o d'altres patologies, no s'han observat diferències significatives. D'aquí que, d'acord amb el que d'altres autors amb diferents metodologies havien descrit (veure taula I.1 del primer capítol, pàg. 57), es conclouï que els nivells sèrics de RNasa 1 no són un marcador tumoral específic per al càncer de pàncreas.

Estudis previs del grup i d'altres autors mostraren diferències entre la glicosilació de la RNasa 1 present en pàncreas de donant sa i la produïda per cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic (Nan i col., 1998; Fernández-Salas i col., 2000), d'aquí que en el present treball s'hagi proposat l'estudi de la glicosilació de la RNasa 1 com a possible marcador del càncer de pàncreas.

D'acord amb les dades anteriors, s'ha desenvolupat una metodologia d'estudi de la glicosilació de la RNasa 1 sobre mostres biològiques sense necessitat de purificar la proteïna prèviament. Això s'ha dut a terme sobre medi de cultiu de cèl·lules

d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 i MDAPanc-3 i sobre homogeneïtzat de teixit de pàncreas de donant.

L'assaig utilitzat per a la determinació de les estructures glucídiques de la RNasa 1 ha estat un ELISA sandvitx amb un anticòs per a la captura d'aquesta proteïna i un altre per a la detecció de les diferents estructures glucídiques. Els anticossos utilitzats en la detecció són monoclonals contra estructures glucídiques del grup Lewis.

S'han detectat els antigens sialidats sLe^x i sLe^a només en mostres de RNasa 1 d'origen tumoral (medis de cultiu de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic) i no n'han detectat sobre mostra de pàncreas de donant sa. En canvi, l'antigen fucosilat Le^y només s'ha observat en mostres de pàncreas sa (situació normal). Aquests resultats corroboren els estudis previs del grup.

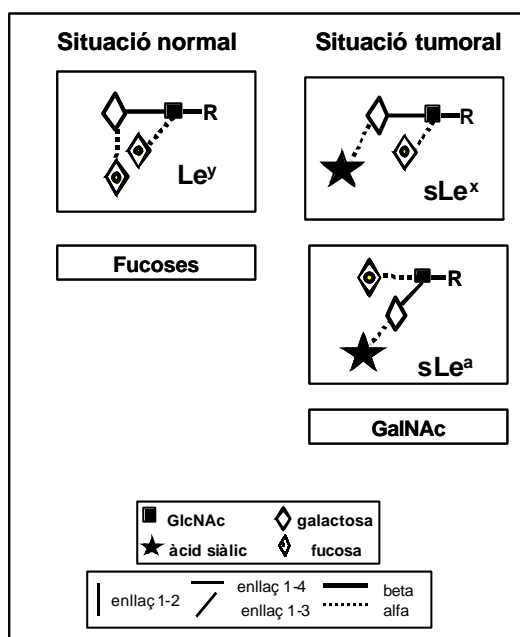
Per tal d'observar la glicosilació de la superfície de les membranes de les cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 i MDAPanc-3 s'ha portat a terme un assaig d'ELISA sobre cèl·lules fixades. Això ha de permetre establir una possible relació amb la glicosilació present a les proteïnes de secreció, com la RNasa 1.

L'antigen sLe^x s'ha detectat sobre les dues línies cel·lulars metastàsiques assajades, però l'antigen sLe^a només s'ha detectat sobre les cèl·lules MDAPanc-3. Aquests resultats es poden relacionar amb els observats sobre la glicosilació de la RNasa 1 purificada d'ambdues línies, que presenta aquests antigens Lewis sialilats. Així doncs, les glicoproteïnes secretades reflectirien algunes de les estructures glucídiques de la superfície cel·lular.

Els canvis en la glicosilació de les glicoproteïnes i glicolípidis de membrana, concretament l'expressió de sLe^x i sLe^a, estan relacionats amb els estadis tardans de malignitat, que inclouen la invasió i la metàstasi, ja que aquests antigens Lewis són lligands de l'E i la P-selectines presents a l'endoteli, i permetrien la migració cel·lular emulant el sistema immunitari (Fukuda, 1996; Ohyama i col., 1999; Ortnoft i Vestergaard, 1999).

S'ha purificat la RNasa 1 secretada al medi de cultiu per la línia cel·lular d'adenocarcinoma pancreàtic MDAPanc-3. Conjuntament amb RNasa 1 purificada de pàncreas de donant i de medi de cultiu d'adenocarcinoma pancreàtic Capan-1 se'n van seqüenciar les estructures glucídiques (Peracaula i col., 2003).

De la seqüenciació se n'extreu que hi ha diferències clares en la glicosilació de la RNasa 1 en situació normal i tumoral. Principalment, només hi ha presència d'antígens Lewis sialilats (sLe^x i sLe^a) en situació tumoral i, en situació normal, apareix l'antigen fucosilat Le^y , que no és present en situació tumoral (veure resum a la taula 1).



Taula 1: Resum de les diferents estructures glicídiques de la RNasa 1 purificada de pàncreas de donant (normal) i de medi de cèl·lules de carcinoma pancreàtic (tumoral).

Aquests resultats de seqüenciació corroboren els obtinguts anteriorment mitjançant ELISA sandvitx de detecció de sucres sobre mostres que contenen RNasa 1 però sense purificar-la. Així doncs, s'ha proposat l'aplicació d'aquest mètode de detecció d'estructures glicídiques de la RNasa 1 sobre mostres sèriques de pacients afectats de carcinoma pancreàtic, pancreatitis i pacients control sans. Amb aquest tipus d'assaig es podrà avaluar si la glicosilació de la RNasa 1 pot ser útil com a marcador per al càncer de pàncreas.

El càncer de pròstata

El càncer de pròstata és el segon, pel que fa a nombre de càncers al món (Moul i col., 2003). És de creixement lent, cosa que fa que molts homes morin amb càncer de pròstata però no per causa d'aquest.

L'antigen prostàtic específic (PSA) és una glicoproteïna secretada majoritàriament per la glàndula prostàtica. Presenta activitat serín-proteasa, exerceix la funció de líquar el líquid seminal a l'ejaculació i presenta una cadena glucídica de tipus *N* unida a l'Asn45.

El PSA es troba normalment a plasma seminal en concentracions elevades. També pot detectar-se en sèrum en situacions patològiques, com el càncer de pròstata o la hiperplàsia benigna de pròstata (BPH). Donada la seva activitat serín-proteasa, el PSA sèric sol trobar-se unit a diferents inhibidors de proteases, com l' α 1-antiquimotripsina (ACT) o l' α 2-macroglobulina (AMG). Tot i que, entre un 10 i un 40% del PSA sèric pot trobar-se en forma lliure. Es defineix el PSA total com la suma del PSA unit i el lliure.

Els nivells de PSA en sèrum s'utilitzen actualment com a marcador del càncer de pròstata. Així, concentracions de PSA per sota de 4ng/mL es consideren normals. Amb nivells per sobre de 10ng/mL s'aconsella realitzar una biòpsia, i nivells entre 4 i 10ng/mL es consideren la 'zona gris', donada la incertesa a l'hora del diagnòstic (veure fig. II.4 del segon capítol, pàg. 111).

Per tal de millorar l'especificitat d'aquest marcador tumoral s'han dut a terme diferents aproximacions, entre elles l'índex de PSA, que relaciona els nivells de PSA lliure i total, o altres paràmetres com la velocitat i la densitat del PSA. Tanmateix, cap de les aproximacions estudiades fins ara ha aconseguit millorar significativament l'especificitat del diagnòstic respecte de l'ús dels nivells de PSA total (Brawer, 1999).

La necessitat de millorar l'especificitat del PSA com a marcador del càncer de pròstata i el fet que sigui una glicoproteïna, planteja la possibilitat de caracteritzar les seves estructures glucídiques en situació normal i tumoral per a determinar si existeixen diferències entre elles i si aquestes podrien ser útils en la millora del diagnòstic.

D'una banda, s'ha purificat el PSA secretat per les cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP i el PSA del sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica, se n'han caracteritzat les estructures glucídiques mitjançant lectines i s'han comparat els resultats amb els obtinguts per una mostra de PSA purificat de plasma seminal de donant.

Les mostres de PSA purificat de plasma seminal i de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP presenten diferències importants quant a la glicosilació. El PSA de plasma

seminal conté àcid siàlic, que és absent al medi de les cèl·lules LNCaP. El contingut en fucoses és superior al PSA de medi de cèl·lules LNCaP que al de plasma seminal, detectant-ho amb la lectina AAA. El PSA purificat de sèrum d'un pacient de carcinoma prostàtic presenta àcid siàlic, en nivells comparables al purificat de plasma seminal.

S'observa un contingut inferior en fucoses del nucli, respecte de l'observat al PSA de plasma seminal, i absència de fucoses fora del nucli i del monosacàrid GalNAc. Les diferències en el contingut de fucoses no s'han observat mitjançant assaigs immunològics amb detecció per la lectina AAA.

Aquests resultats obtinguts per mètodes immunològics es corroboren per seqüenciació glucídica. Així, s'observen les mateixes diferències quant al contingut d'àcid siàlic, s'observen fucoses fora del nucli glucídic només al PSA de medi LNCaP, cosa que explicaria el resultat amb lectines, i també s'observen diferències quant al contingut en GalNAc, que és superior al PSA purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP (taula 2).

	PSA de plasma seminal	PSA de medi de cèl·lules LNCaP	PSA de sèrum d'un pacient de neo. prostàtica
Àcid siàlic	si	no	si
Fucosa α 1-6GlcNAc (nucli)	83% dels glicans	>83% (gairebé tots)	aprox. 1/3 de les estructures
Fucosa α 1-2 (fora del nucli)	no	10-15% dels glicans	n.d.
GalNAc	25% dels glicans	65% dels glicans	n.d.

Taula 2: Taula resum de les principals diferències glucídiques entre el PSA purificat de plasma seminal, el purificat de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP i el purificat del sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica (n.d., no determinat).

D'altra banda, coneixent les principals estructures glucídiques del PSA de diferents mostres biològiques, s'han desenvolupat diversos mètodes de detecció de la glicosilació del PSA, sense necessitat de purificar-lo prèviament. S'ha testat el PSA de mostres de plasma seminal, medi de cultiu de cèl·lules LNCaP i sèrums de pacients de carcinoma prostàtic. S'han emprat mètodes immunològics, com l'ELISA, la transferència tipus western o el GISA (basat en l'activitat sialiltransferasa). Aquesta

caracterització necessita del tractament previ de les mostres sèriques per a enriquir-les en PSA per immunoadsorció o per cromatografia d'interacció tiofilica.

Els resultats obtinguts amb els diferents mètodes corroboren la presència d'àcid siàlic en el PSA de plasma seminal i en el de sèrum de pacients de neoplàsia prostàtica, tot i que els nivells d'àcid siàlic són lleugerament inferiors al sèrum. També s'observa l'absència d'àcid siàlic en el PSA de medi de cultiu de cèl·lules LNCaP que, alhora, presenta un contingut en fucoses superior al de les mostres anteriors.

La caracterització del PSA per electroforesi bidimensional (fig. II.45) mostra formes de PSA sialilades (de pI 6.4, 6.6 i 6.9) i neutres (pI 7.2 i 7.4) a les mostres de plasma seminal i de sèrum de pacients de neoplàsia prostàtica, tanmateix, s'hi troben en diferents proporcions les formes neutres i les sialilades. El PSA del medi de cèl·lules LNCaP presenta isoformes de pPSA, que es troben a pH més bàsic que el teòric (7.23). Aquestes formes pPSA també poden detectar-se feblement al PSA sèric de pacients de neoplàsia prostàtica.

La glicosilació del PSA en situació tumoral, secretat per les cèl·lules LNCaP o present al sèrum de pacients afectats de carcinoma prostàtic, és molt diferent, cosa que indicaria que el PSA d'aquesta línia tumoral no seria representatiu del PSA de la situació tumoral real, quant a la glicosilació que presenta. En canvi, les seves estructures glucídiques són més properes a les descrites pel PSA de plasma seminal de donants sans.

Les diferències observades entre el PSA de sèrum de pacients afectats de carcinoma prostàtic i de plasma seminal són poques i se centren en diferències lleugeres en la detecció de l'àcid siàlic per GISA, o indirectament per detecció amb la lectina ECL, i en la distribució i proporció de les diferents formes proteiques per electroforesi bidimensional.

El fet que en el sèrum de pacients de neoplàsia prostàtica es detectin formes de PSA molt similars a les presents en el plasma seminal de donant, es podria explicar pel trencament de les barreres que separen el teixit prostàtic i els capil·lars sanguinis quan es donen processos patològics, com el càncer o la neoplàsia prostàtica

intraepitelial (PIN) (Brawer, 1999). Aquest fet provoca un augment de PSA en sèrum degut a la secreció per part de les cèl·lules tumorals, al que s'ha de sumar el causat pel trencament del teixit circumdant.

S'hauria d'aprofundir, però, en l'estudi de les diferències observades, com l'absència de GalNAc en PSA de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica, i la seva presència en algunes estructures de PSA de plasma seminal. Així com augmentar la sensibilitat o el nombre de mostres assajades, en la detecció de fucoses mitjançant la lectina AAA, per a determinar si s'observen diferències en els nivells de fucosilació del PSA de sèrum de pacients de neoplàsia prostàtica i plasma seminal, com les que s'han obtingut en la seqüenciació glucídica.

Els assaigs establerts per a la caracterització glucídica del PSA seran útils per tal de portar a terme un estudi ampli de comparació de la glicosilació del PSA sèric de pacients de BPH i de pacients de neoplàsia prostàtica i que servirà per a determinar si la glicosilació d'aquesta molècula podrà ser útil en la millora del diagnòstic del càncer de pròstata.

CONCLUSIONS

1. S'ha establert un mètode sensible de detecció i quantificació dels nivells de RNasa 1 en sèrum per ELISA sandvitx. No s'han observat diferències significatives en els nivells sèrics de RNasa 1 en pacients control sans, pacients afectats de carcinoma pancreàtic, de pancreatitis o d'altres patologies. Així, els nivells sèrics de RNasa 1 no serien un marcador per al càncer de pàncreas.
2. Per ELISA sandvitx s'ha caracteritzat la RNasa 1 de medis de cultiu de les cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic MDAPanc-3 i Capan-1, i la RNasa 1 d'homogenats de pàncreas de donant. S'han observat els antígens sLe^x i sLe^a només en situació tumoral (medis de cultiu de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic) i l'antigen Le^y només en situació normal, en RNasa 1 de pàncreas de donant. Aquests resultats han estat corroborats per seqüenciació glucídica.
3. L'estudi de les estructures glucídiques presents a la superfície cel·lular de les cèl·lules Capan-1 i MDAPanc-3 mostra la presència dels antígens sLe^x en ambdues línies, i sLe^a a la línia MDAPanc-3, observant-se una relació entre la glicosilació de les proteïnes secretades i la present a la superfície cel·lular.
4. La caracterització glucídica del PSA purificat del medi de cultiu de cèl·lules LNCaP s'ha comparat amb la del purificat de plasma seminal de donant sa, mitjançant diferents assaigs immunològics amb detecció per lectines. L'àcid siàlic, detectat per la lectina SNA, només és present en situació normal i el monosacàrid fucosa, detectat per la lectina AAA, es troba majoritàriament en situació tumoral. Aquests resultats han estat corroborats per seqüenciació de les respectives estructures glucídiques del PSA purificat.
5. S'han desenvolupat diferents mètodes immunològics per a la caracterització glucídica del PSA sense purificació prèvia: assaigs per ELISA i transferència tipus western amb detecció per lectines i un d'associat a activitat sialiltransferasa GISA. L'aplicació d'aquests mètodes a mostres sèriques suposa el pretractament d'aquestes per a enriquir-les en PSA. Els pretractaments s'han portat a terme per immunoabsorció indirecta o per cromatografia d'adsorció tiofíllica.

- 6.** S'han observat diferències entre la glicosilació present al PSA de plasma seminal, al de medi de cultiu de cèl·lules de carcinoma prostàtic LNCaP i al de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica. El contingut d'àcid siàlic, determinat per GISA i, indirectament, amb la lectina ECL, és lleugerament superior en el PSA de plasma seminal que en el de sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica. El PSA secretat per les cèl·lules LNCaP no presenta àcid siàlic.
- 7.** S'ha comparat el PSA de diferents mostres biològiques per electroforesi bidimensional. Al PSA de plasma seminal s'hi detecten formes sialilades amb pI entre 6.4 i 6.9 i dues formes neutres de pI 7.2 i 7.4. El PSA del medi de cèl·lules LNCaP presenta només formes de PSA neutre, entre les que s'hi troben formes de pI més bàsics (7.7 i 7.9) corresponents al pPSA. El PSA de sèrums de pacients de neoplàsia prostàtica presenta les mateixes formes sialilades que el PSA de plasma seminal, però en menor intensitat respecte de les formes neutres.
- 8.** S'ha purificat el PSA total del sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica que presentava nivells molt elevats d'aquesta glicoproteïna. La caracterització glucídica mostra que els nivells de sialilació del PSA del sèrum d'un pacient de neoplàsia prostàtica són similars als que presenta el PSA purificat de plasma seminal, resultat confirmat per seqüenciació glucídica. A més, s'ha observat un contingut en fucoses i GalNAc molt inferior a l'observat en PSA de plasma seminal.
- 9.** L'estudi de la glicosilació de la superfície cel·lular, de les línies de carcinoma prostàtic LNCaP, PC-3 i DU-145 mostren la presència d'àcid siàlic α 2-3 i α 2-6 i de fucoses, així com l'antigen Le^y a totes elles i el H2 només a DU-145. La presència d'àcid siàlic es relaciona amb l'origen metastàtic d'aquestes cèl·lules.

BIBLIOGRAFIA

A

- Agarwal, R. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. 2000. *Biochemical Pharmacology*, **60**: 1051-1059.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. i Watson, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. 3a ed. 1994. Garland Publishing Inc. EEUU
- Amanatullah, D.F., Reutens, A.T., Zafonte, B.T., Fu, M., Mani, S., Pestell, R.G. Cell-cycle dysregulation and the molecular mechanism of prostate cancer. 2000. *Frontiers in Bioscience*; **5**: d372-390.
- Andicoechea A, Vizoso F, Alexandre E, Martinez A, Cruz Diez M, Riera L, Martinez E i Ruibal A. 1999. Comparative study of carbohydrate antigen 195 and carcinoembryonic antigen for the diagnosis of pancreatic carcinoma. *World J Surg*; **23(3)** :227-31.
- Arenas M.I., Romo, E., de Gaspar, I., Bethencourt, F.R., Sánchez-Chapado, M., Fraile, B. i Paniagua, R. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. 1999. *Glycoconjugate Journal*; **16**: 375-382.
- Audisio, R.A., Veronesi, P., Maisonneuve, P., Chiappa, A., Andreoni, B., Bombardieri, E. i Geraghty, J.G. Clinical Relevance of Serological Markers in the Detection and Follow-up of Pancreatic Adenocarcinoma. 1996; *Surg. Oncol.*; **5**: 49-63.

B

- Barak, M., Mecz, Y., Lurie, A. I gruener, n. Binding of serum prostate specific antigen to concanavalin A in patients with cancer or hyperplasia of the prostate. 1989; *Oncology*. **46**: 375-377.
- Barrabés, S. Estudi de la ribonucleasa sèrica en situació normal i tumoral. Treball de Recerca. 2002. Universitat de Girona.
- Barton, G.J. Alscript, a Tool to Format Multiple Sequence Alignments. 1993; *Prot.Eng.* **6**: 37-40.
- Basso, D., Fabris, C., Meani, A., Del Favero, G., Pannuci, A., Vianello, D., Piccoli, A. i Naccarato, R. Serum Deoxyribonuclease and Ribonuclease in Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis. 1985; *Tumori*. **71**: 529-532.
- Basu, P.S., Ramdhan, M. I Batabyal, S.K. Lectin and serm-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. 2003; *Clinical Biochemistry*. **36**: 373-376.
- Becker, C., Piironen, T., Petterson, K. I Lilja, H. Testing in serum for human glandular kallikrein 2, and free and total prostate specific antigen in biannual screening for prostate cancer. 2003; *J. Urol.* **170**: 1169-1174.
- Beintema, J.J., Breukelman, H.J., Carsana, A. I Furia, A. 1997. Evolution of vertebrate ribonucleases: Ribonuclease A superfamily. In *Ribonucleases: structures and functions*. (D'Alesio, G. & Riordan, J.F., eds.), Academic Press, New York.
- Beintema, J.J., Schüller, C., Irie, M. i Carasana, A. Molecular Evolution of the Ribonuclease Superfamily. 1988; *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **51**: 165-192.
- Beintema, J.J., Wietzes, P., Weickmann, J.L. i Glitz, D.G. The Aminoacid Sequence of Human Pancreatic Ribonuclease. 1984; *Anal. Biochem.* **136**: 48-64.
- Bélanger, A., van Halbeek, H., Graves, H.C.B., Garndbois, K., Stamey, T.A., Huang, L., Poppe, I., Labrie, F. Molecular mass and carbohydrate structure of prostate specific antigen: studies for establishment of an international PSA standard. 1995; *The Prostate*. **27**: 187-197.
- Bockman, D.E. Anatomy of the Pancreas. Dins de: *The Exocrine Pancreas: Biology, Pathobiology, and Diseases (2a ed.)*. V.L.W. Go, J.D. Gardner, H.A. Reber, E. Lebenthal, E.P. DiMagno i G.A. Scheele, ed. Raven Press Ltd. New York. 1993: 1-8.

- Bok R.A. i Small, E.J. Boodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. 2002; *Nature*: **2**: 918-926.
- Boyle, P., d'Onofrio, A., Maisonneuve, P., Severi, G., Robertson, C., Tubiana, M i Veronesi, U. Measuring progress against cancer in Europe: has the 15% decline targeted for 2000 come about? 2003; *Annals of Oncology*. **14**: 1312-1325.
- Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method of Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. 1976; *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bravo, J., Fernández, E., Ribó, M., De Llorens, R. i Cuchillo, C.M. A Versatile Negative-Staining Ribonuclease Zymogram. 1994; *Anal. Biochem.* **219**: 82-86.
- Brawer, M.K. Prostate- specific antigen: current status . 1999; *CA Cancer J. Clin.* **49**: 264 - 281.
- Brockhausen, J., Schutzbach, J. i Kuhns, W. Glycoproteins and their relationship to human disease. 1998; *Acta Anatomica*. **161**: 36-78.
- Brossmer, R. i Gross H.J. Fluorescent and Photoactivatable Sialic Acids. 1994; *Methods in Enzimology* **247**: 177-193.
- C**
- Cabelin M.A., Te, A.E. i Kaplan, S.A. Benign prostatic hyperplasia: challenges for the new millennium. 2000; *Curr. Opin. Urol.* **10**(4): 301-306.
- Catalona, W. J., Partin, A.W., Slawin, K.M., Brawer M.K., Flanigan R.C., Patel A., Richie J.P., deKernion J.B., Walsh P.C., Scardino P.T., Lange P.H., Subong E.N., Parson R.E., Gasior G.H., Loveland K.G. i Southwick PC. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: A prospective multicenter clinical trial. 1998; *JAMA* **279**: 1542-1547.
- Chandrasekaran, EV, Jain, RK, Larsen, RD, Wlasichuck, K i Matta, KL. Characterization of the specificities of human blood group H gene-specified alpha1,2-L-fucosyltransferase toward sulfated/ sialylated/ fucosylated acceptors: evidence for an inverse relationship between alpha1,2-L-fucosylation of Gal and alpha1,6-L-fucosylation of asparagine-linked GlcNAc. 1996; *Biochemistry*. **35**: 8914-8924.
- Chandrasekaran, EV, Chawda, R, Locke, RD, Piskorz, CF i Matta KL. Biosynthesis of the carbohydrate antigenic determinants, Globo H, blood group H, and Lewis b: a role for prostate cancer cell alpha1,2-L-fucosyltransferase. 2002; *Glycobiology*. **12**(3):153-162.
- Charrier, J-P., Tournel, C., Michel, S., Comby, S., Passagot, J., Dalbon, P., Chautard, D. i Jolivet, M. Differential diagnosis of prostate cancer and benign prostate hyperplasia using two-dimensional electrophoresis. 2001; *Electrophoresis*. **22**: 1861-1866.
- Charrier, J-P., Tournel, C., Michel, S., Dalbon, P. i Jolivet, M. Two-dimensional electrophoresis of prostate specific antigen in sera of men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. 1999; *Electrophoresis*. **20**: 1075-1081.
- Cheli, C.D., Marcus, M., Levine, J., Zhou, Z., Anderson, P.H., Bankson, D.D., Bock, J., Bodin, S., Eisen, C., Senior, M., Schwartz, M.K., Yeung, K.K. i Allard, J. Variation in the quantitation of Prostate-specific antigen in Reference Material: Differences in Comercial Immunoassays. 1998; *Clinical Chemistry*. **44**: 1551-1553.
- Coombs GS, Bergstrom RC, Pellequer JL, Baker SI, Navre M, Smith MM, Tainer JA, Madison EL i Corey DR. Substrate specificity of prostate-specific antigen (PSA). 1998; *Chem. Biol.* **5**(9):475-488
- Corbishley, T.P., Greenway, B., Johnson, P.J. i Williams, R. Serum Ribonuclease in the Diagnosis of Pancreatic Carcinoma and in Monitoring Chemotherapy. 1982; *Clin. Chim. Acta*. **124**: 225-233.
- Corella, D., Cortina, P. i Coltell, O. Factores alimentarios y diferencias geográficas de la mortalidad del cáncer de páncreas en España. 1994; *Rev. San. Hig. Pub.* **68**: 361-376.

- Corey, E., Brown, L.G., Corey, M.J., Buhler, K.R. i Vessella, R.L. LNCaP Produces Both Putative zymogen and Inactive, Free form of Prostate Specific Antigen. 1998; *The Prostate*. **35**: 135-143.
- Cross, M. i Dexter, T.M. Growth Factors in Development, Transformation, and Tumorigenesis. 1991; *Cell*. **64**: 271-280.
- Culig Z, Hittmair A, Hobisch A, Bartsch G, Klocker H, Pai LH i Pastan I. Expression of Lewis carbohydrate antigens in metastatic lesions from human prostatic carcinoma. 1998. *Prostate*; **36(3)**:162-7.
- Czernichow, P., Lerebours, E., Hecketsweiler, A. i Colin, R. Épidémiologie temporo-spatiale du cancer du pancréas. Étude de mortalité internationale et française. 1985; *Gastroenterol. Clin. Biol*. **9**: 767-775.
- D**
- De la Rosette, J.J.M.C.H. What we do and don't know about benign prostatic hyperplasia. 2000; *Current Opinion in Urology*. **10**: 1-2.
- De Llorens, R. i Cuchillo, C.M. La ribonucleasa como marcador del cáncer de páncreas. *Neoplasia*. 1986; **3**: 80-87.
- Dennis JW, Granovsky M. i Warren CE. 1999. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta*; **1473(1)**:21-34. Review.
- Deutscher, M.P. Ribonuclease Multiplicity, Diversity and Complexity. 1993; *J.Biol. Chem*. **268**: 13011-13014.
- Diamandis, E. Prostate-Specific antigen: Its Usefulness in Clinical Medicine. 1998; *TEM*. **9**: 310-316.
- Diamandis, E.P. i Yousef, G.M. Human tissue kallikreins: A family of new cancer biomarkers. 2002. *Clinical chemistry*; **48(8)** 1198-1205.
- E**
- Esquetet, M., Swinnen, J.V., Heyns W. i Verhoeven, G. LNCaP Prostatic Adenocarcinoma Cells Derived from Low and High Passage Numbers Display Divergent Responses not Only to Androgens but Also to Retinoids. 1997; *J. Steroid Biochem. Biol.*; **62**: 391-399.
- F**
- Fawcett, D.W. Tratado de Histología. 2000. 12a ed. McGraw Hill Interamericana.
- Feldman B.J. i Feldman, D. The development of androgen-independent prostate cancer. 2001. *Nature*; **1**: 34-45.
- Feneley, M.R. i Partin, A.W. Diagnosis of localized prostate cancer: 10 years of progress. 2000; *Curr. Opin. Urol*. **10**: 319-327.
- Fernández, E., Fallon, M.J., Frazier, M.L., De Llorens, R. i Cuchillo, C.M. Expression of Acinar and Ductal Products in Capan-1 Cells Growing in Synthetic Serum and Serum-free Media. 1994; *Cancer*. **73**: 2285-2295.
- Fernández-Salas, E. Caracterización de ribonucleasas expresadas por células de adenocarcinoma pancreático humano. 1994. Tesis Doctoral. Universitat de Girona.
- Fernández-Salas, E., Peracaula, R., Frazier, M.L. i de Llorens, R. Ribonucleases expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines. 2000; *Eur. J. Biochem*. **267**: 1484-1494.
- Filella, X., Molina, R. i Ballesta, A.M. *Utilidad clínica del PSA*. 2000. Roche Diagnostics ed.
- Fogh, J., Fogh J.M. i Orfeo, T. One hundred and twentyseven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. 1977; *J. Natl. Cancer Inst*. **59**: 221-226.

Frazier, M.L., Pathak, S., Wang, Z.W., Cleary, K., Singletary, S.E., Olivé, M. i col. Establishment of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line. 1990. *Pancreas*; **5**: 8-16.

Fukuda, M. i Kobata, A. *Glycobiology: A practical approach*. 1993. Oxford University Press, New York, EEUU.

Fukuda, M. Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. 1996; *Cancer Research* **56**: 2237-2244.

Futami, J., Seno, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, S. i Yamada, H. Recombinant human Pancreatic Ribonuclease Produced in *E. coli*: Importance of the Amino-terminal Sequence. 1995; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **216**: 406-413.

Futami, J., Tsushima, Y., Murato, Y., Tada, H., Sasaki, J., Seno, M. i Yamada, H. Tissue-Specific Expression of Pancreatic-Type RNases and RNase Inhibitors in Humans. 1997; *DNA Cell Biol.* **16**: 413-419.

G

García Sáenz, J.A. Cáncer de páncreas. 1999; *Medicine*. **7**: 5416-5423.

Garnick, M.B. i Fair, W.R. El cáncer de próstata. 1999. *Investigación y Ciencia*. Febrero, 7-16.

Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T. i Hübscher, U. Efficient Production of Chicken Egg Yolk Antibodies against a Conserved Mammalian Protein. 1990; *FASEB J.* **4**: 2528-2532.

González de Buitrago, J.M., Arilla, E., Rodríguez-Segade, M. I Sánchez, A. *Bioquímica Clínica*. 1998. McGraw-Hill Interamericana. España.

González-Espinosa, D., Jiménez M.A. i Gutiérrez-López, A.A. Aspectos clínicos de la biología molecular del cáncer de próstata. 2002; *Rev. Oncol.* **4**(5): 241-249.

Goptu, B., Hazes, B., Chang, W.S.W., Dafforn, T.R., Carrell, R.W., Read, R.J. i Lomas, D.A. Inactive Conformation of Serpin α 1-Antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: Implications for inhibitory function and conformational disease. 2000; *PNAS*. **97**: 67-72.

Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T. I Thun, M. Cancer statistics, 2001. 2001; *CA Cancer J. Clin.* **51**(1): 15-36.

Gross H.J, Sticher, U. i Brossmer, R. A Highly Sensitive Fluorometric Assay for Sialyltransferase Activity Using CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc as Donor. 1990; *Analytical Biochemistry*. **186**: 127-134.

Guile, G.R., Ruud, P.M., Wing, D.R., Prime, S.B. i Dwek, R.A. 1996. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatography method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem*; **240**: 210-226.

H

Hakomori, S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Research* 1996; **56**: 5309-5318.

Halm, U., Schumann, T., Schiefke, I., Witzigmann H., Mossner, J. i Keim, V. Decrease of CA 19-9 during chemotherapy with gemcitabine predicts survival time in patients with advanced pancreatic cancer. 2000; *Br. J. Cancer*. **82**(5): 1013-1016.

Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.A., Samyn-Petit, B., Julien, S. i Delannoy, P. The Human Sialyltransferase Family. 2001; *Biochimie*. **83**: 727-737.

Harlow, E. i Lane, D. *Antibodies: A Laboratori Manual*. 1988. Cold spring Harbor Laboratory Pub. New York. EEUU.

- Herrala, A., Kurkela, R., Vhinen, M., Kalkkinen, N. i Vihko, P. Androgen-sensitive human Prostate cancer cells, LNCaP, produce both N-terminally mature and truncated prostate-specific antigen isoforms. 1998; *Eur. J. Biochem.* **255**(2): 329-335.
- Hilz, H., Noldus, J., Hammerer, P., Buck, F., Lück, M. i Huland, H. Molecular heterogeneity of freePSA in sera of patients with benign and malignant prostate tumors. 1999; *Eur. Urol.* **36**: 286-292.
- Holmes, E.H., Greene, T.G., Tino, W.T., Boyton, A.L., Aldalpe, H.C., Misrock, S.L. i Murphy, G.P. Analysis of Glycosylation of Prostate-specific Membrane antigen Derived from LNCaP Cells, Prostatic Carcinoma Tumors, and serum From Prostate Cancer Patients. 1996; *The Prostate Supplement.* **7**: 25-29.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P. Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A. i Murphy, G.P. LNCaP model of human prostatic carcinoma. 1983; *Cancer Res.* **43**: 1809-1818.
- Huber, P.R., schmid, H.P., Mattarelli, G., strittmatter, B., van Steenbrugge, G.J. i Mauer, A. Serum Free Prostate specific antigen: Isozymes in Benign Hyperplasia and Cancer of the Prostate. 1995; *The Prostate.* **27**: 212-219.

I

- Isaacs, P. Non-Specificity of Elevated Serum Ribonuclease as a Pancreatic Tumor Marker. 1981; *Digestion.* **22**: 101-107.
- Isobe, K. i Uchiyama, S. An Assay for Ribonuclease Activity, Based on Ultraviolet Absorption of RNA Hydrolysate, Using Phosphotungstic Acid. 1986; *J. Biochem. Biophys. Methods.* **12**: 299-303.
- Isono, T., Tanaka, T., Kageyama, S. I Yoshiki, T. Structural Diversity of Cancer-related and Non-Cancer-related Prostate-specific Antigen. 2002; *Clinical Chemistry.* **48**:**12**: 2187-2194.

J

- Jacobsen, S.J., Girman, C.J. i Lieber, M.M. Natural history of benign prostatic hyperplasia. 2001; *Urology.* **58**: 5-16.
- Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafor, A., Ward, E. i Thun, M. Cancer Statistics, 2003. 2003; *CA Cancer J. Clin.* **53**: 5-26.
- Johnson, P.J., Poon, T.C.W., Hjelm, N.M., Blake, C. i Ho, S.K.W. Structures of disease-specific serum alpha-fetoprotein isoforms. 2000; *British Journal of Cancer.* **83** (10): 1330-1337.
- Jorgensen, T., Berner, A., Kaalhus, O., Tveter, K.J., Danielsen, H.E. i Bryne, M. Up-regulation of oligosaccharide sialyl Lewis^x: A new prognostic parameter in metastatic prostate cancer. 1995; *Cancer Research.* **55**: 1817-1819.
- Jung, K., Brux, B., Lein, M., Rudolph, B., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Schnorr, D., Loening, S.A. i Sinha, P. Molecular Forms of Prostate-specific antigen in Malignant and Benign Prostatic Tissue: Biochemical and diagnostic Implications. 2000; *Clinical Chemistry.* **46**: 47-54.

K

- Kaighn, M.E., Shankar, N., Ohnuki, Y., Lechner, F. i Jones, L.W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC.3). 1979; *Investigative Urol.* **17**: 16-23.
- Kannagi R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. 1997. *Glycoconj J.*; **14**(5):577-84. Review.
- Kawinski, E., Levine, E. i Chadha, K. Thiophilic interaction chromatography facilitates detection of various molecular complexes of prostate-specific antigen in biological fluids. 2002; *The Prostate.* **50**: 145-153.

- Kemmer, T.P., Malfertheiner, P., Büchler, M., Kemmer, M.L. i Ditschuneit, H. Serum Ribonulcease Activity in the Diagnosis of Pancreatic Disease. 1991; *Int. J. Pancreatol.* **8**: 23-33.
- Kim, Y.J. i Varki, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. 1997; *Glycoconjugate Journal* **14**, 569-576.
- Kobayashi, T. i Kawakubo, T. Prospective Investigation of Tumor Markers and Risk Assessment in Early Cancer Screening. 1994; *Cancer.* **73**: 1946-1953.
- Kottel, R.H., Hoch, S.O., Parsons, R.G. i Hoch, J.A. Serum Ribonuclease Activity in Cancer Patients. 1978; *Br. J. Cancer.* **38**: 280-286.
- Kumar, A., Mikolajczyk, S.D., Hill, T.M., Millar, L.S. i Seadi, M.S. Different Proportions of Various Prostate-specific antigen (PSA) and Human Kallikrein 2 (hK2) Forms Are Present in Noninduced and Androgen-Induced LNCaP Cells. 2000; *The Prostate.* **44**: 248-254.
- Kurihara, M., Ogawa, M., Ohta, T., Kurokawa, E., Kitahara, T., Kosaki, G., Watanabe, T. i Wada, H. Purification and Immunological Characterization of Human Pancreatic Ribonuclease. 1982; *Cancer Res.* **42**: 4836-4841.
- Kurihara, M., Ogawa, M., Ohta, T., Kurokawa, E., Kitahara, T., Murata, A., Matsuda, K., Kosaki, G., Watanabe, T. i Wada H. Radioimmunoassay for Human Pancreatic Ribonuclease and Measurement of Serum Immunoreactive Pancreatic Ribonuclease in Patients with Malignant Tumors. 1984; *Cancer Res.* **44**: 2240-2243.
- Kurokawa, E., Ogawa, M., Kurihara, M., Ohta, T., Kosaki, G., Iwama, M., Ohgi, K. i Irie, M. Radioimmunoassays for two types of Human Ribonuclease: Differential Determination of Ribonucleases in Human Serum. 1983; *Clin. Chim. Acta.* **128**: 83-93.
- L**
- Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of Head of Bacteriophage T4. 1970; *Nature.* **227**: 680-685.
- Laguna, P. i Alvizatos, G. Prostate specific antigen and benign prostatic hyperplasia. 2000; *Current Opinion in Urology.* **10**: 3-8.
- Laine, A., Hachulla, E., Strecker, G., Michalski, J.C. i Wieruszkeski, J.M. Structure Determination of the glycans of Human-serum α 1-Antichymotrypsin using $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy and Deglycosylation by *N*-glycanase. 1991; *Eur. J. Biochem.* **197**: 209-215.
- Lamerz, R. Role of Tumor Markers, Cytogenetics. Review. 1999; *Ann. Oncol. (suppl.).* **4**: 145-149.
- Langelier, E.G., van Uffelen, C.J.C., Blankenstein, M.A., van Steenbrugge, G.J. i Mulder, E. Effect of Culture Conditions on Androgen sensitivity of the Human Prostatic Cancer Cell Line LNCaP. 1993; *The Prostate.* **23**: 213-223.
- Lawrence, C.W., Little, P.A., Little, B.W., Miller, M.J., Bazel, B. i Alhadeff, J.A. Human Non-secretori Ribonucleases. I. Purification, Peptide Mapping and Lectin Blotting Analysis of the Kidney, Liver and Spleen Enzymes. 1993; *Glycobiology.* **3**: 241-248.
- Lee, C., Sutkowski, M., sensibar, J.A., Zelner, D., Kim, I., Amsel, I., Shaw, N., Prins, G.S. i Kozlowski, J.M. Regulation of Proliferation and Production of Prostate-specific Antigen in androgen-Sensitive Prostatic cancer Cells, LNCaP, by Dihydrotestosterone. 1995; *Endocrinology.* **136**: 796-803.
- Lilja, H., Christensson, A., Dahlen, U., Matikainen, M.T., Nilsson, O., Pettersson, K. i Lovgren, T. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. 1991; *Clin. Chem.* **37**(9): 1618-1625.
- Lillemo, K.D., Yeo, C.J. i Cameron, J.L. Pancreatic cancer: state-of-the-art care. 2000; *CA Cancer J. Clin.* **50**(4): 241-268.

- Limberg, G., Slim, C.G., Compston, C. A., Stangier, P., Palcic, M. i Furneaux, R.H. A New Assay for Sialyltransferases Using Fluorescein-Labelled Acceptors. 1996; *Liebig's Ann.* 1773-1784.
- Lin, M-F, Lee, M-S, Garcia-Arenas, R. i Lin, F-F. Differential responsiveness of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen mRNA to androgen in prostate cancer cells. 2000; *Cell Biology International.* **24**: 681-689.
- Livingstone, E.H. i Reber, H.A. Cancer of the Pancreas. 1991; *Current Opinion in Gastroenterology.* **7**: 739-743.
- Llanes, L., Páez, A., Ferruelo, A., Luján, M, Romero, I. i Berenguer, A. Detecting circulating prostate cells in patients with clinically localized prostate cancer: clinical implications for molecular staging. 2000; *BJU International*; **86**: 1023-1027.
- López-Otín, C., Diamandis, E.P. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic and biochemical features. *Endocr. Rev.* 1998; **19**: 365-396.

M

- Mallorquí, G. Caracterització estructural de ribonucleases humanes. 2003. Tesi Doctoral. Universitat de Girona.
- Marrink, J., Klip, H. I de Jong, R. Prostate-specific antigen-con-A binding ratio in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. 1992; *The Lancet.* **339**: 619-620.
- Martensson, S., Bigler, S.A., Brown, M., Lange, P.H., Brawer M.K., Hakomori, S. Sialyl-Lewisx and related carbohydrate antigens in the prostate. 1995; *Human Pathology.* **26**: 735-739.
- McKenna, S. i Eatock, M. The medical management of pancreatic cancer. 2003; *The Oncologist.* **8**:149-160.
- Mikolajczyk, S.D., Grauer, L.S., Millar, L.S., et al. A precursor form of PSA (pPSA) is a component of a free PSA in prostate cancer serum. 1997; *Urology.* **50**: 710-714.
- Mikolajczyk, S.D., Marks, L.S., Partin, A.W. i Rittenhouse, H.G. Free Prostate-specific antigen in Serum is Becoming More Complex. 2002; *Urology.* **59**: 797-802.
- Mikolajczyk, S.D., Millar, L.S., Wang, T.J., Rittenhouse, H.G., Marks, L.S., Song, W., Wheeler, T.M. i Slawin, K.M. A Precursor Form of Prostate-specific Antigen Is More Highly Elevated in Prostate Cancer Compared with Benign Transition Zone Prostatic Tissue. 2000; *Cancer Research.* **60**: 756-759.
- Mitchell, S., Abel, P., Ware, M., Stamp, G. i Lalani, E.-N. Phenotypic and Genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines. 2000; *BJU International* **85**: 932-944.
- Molina, R., Ballesta, A.M. i Filella, X. *Marcadores Tumoraes: Estado actual y perspectivas de futuro.* 2000. Roche Diagnostics ed.
- Moul, J.W., Anderson, J., Penson, D.F., Klotz, L.H., Soloway, M.S. i Schulman, C.C. Early prostate cancer: prevention, treatment modalities, and quality of life issues. 2003; *European Urology.* **44**: 283-293.
- Muñoz, A. *Cáncer: Genes y Nuevas Terapias.* Ed. Hélice. Madrid. 1997: 7-12.

N

- Nan, B., Shao, D., Chen, H., Huang, Y., Gu, J., Zhan, Y. i Wu, Z. Alteration of N-acetylglucosaminyltransferases in Pancreatic Carcinoma. 1998; *Glycoconj. J* **15**: 1033-1037.
- Nash, A.F. i Melezinek, I. The role of prostate-specific antigen measurement in the detection and management of prostate cancer. 2000; *Endocrine-Related Cancer.* **7**: 37-51.

Navarro Bosch, D., Cabrera, J.J., Chesa, N., Díaz-Chico, N. Prostate cancer and the androgen receptor gene. 2002; *Rev. Oncol.* **4**(5): 228-240.

Navone, N.M., Logothetis, J., von Eschenbach, A.C. i Troncoso, P. Model Systems of Prostate Cancer: Uses and Limitations. 1999; *Cancer and Metastasis Reviews.* **17**: 361-371.

Nelson, W.G., De Marzo, A.M. i Isaacs, W.B. Prostate Cancer. 2003; *N. Engl. J. Med.* **349**: 366-381.

Neuwelt, E.A., Boguski, M.S., Frank, J.J., Procter-Appich, K. i Levy, C.C. Possible Sites of Origin of Human Plasma Ribonucleases as Evidenced by Isolation and Partial Characterization of Ribonucleases from Several Human Tissues. 1978; *Cancer Res.* **38**: 88-93.

O

Ohyama, C., Tsuboi, S., Fukuda, M. Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells. 1999; *EMBO J.* **18**: 1516-1525.

Okada, T., Sato, Y., Kobayashi, N., Sumida, K., Satomura, S., Matsuura, S., Takasaki, M. i Endo, T. Structural Characteristics of the N-glycans of two Isoforms of Prostate-specific Antigens Purified from Human seminal Fluid. 2001; *Biochimica et Biophysica Acta.* **1525**: 149-160.

Opdenakker G., Rudd P.M., Ponting, C.P. i Dwek, R.A. Concepts and principles of glicobiology. 1993; *FASEB Journal.* **7**: 1330-1337.

Ornstein DK, Gillespie JW, Paweletz CP, Duray PH, Herring J, Vocke CD, Topalian SL, Bostwick DG, Linehan WM, Petricoin EF 3rd i Emmert-Buck MR. Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and in vitro prostate cell lines. 2000; *Electrophoresis.* **21**(11): 2235-42

Orntoft TF, Vestergaard EM. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. 1999; *Electrophoresis.*; **20**(2) : 362-71.

P

Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R., Sánchez, J-C. i Gooley A.A. Analyzing glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. 1998; *Electrophoresis.* **19**: 981-988.

Pelt, J. I van Dieijen-Visser, M.P. PSA-con-A binding ratio in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. 1992; *The Lancet.* **340**: 174-175.

Peracaula, R., Cleary, K.R., Lorenzo, J., de Llorens, R., Frazier, M.L. Human Pancreatic Ribonuclease 1: Expression and Distribution in Pancreatic Adenocarcinoma. 2000; *Cancer.* **89**: 1252-1258.

Peracaula, R., Royle, L., Tabarés, G., Mallorquí-Fernández, G., Barrabés, S., Harvey, D.J., Dwek, R.A, Rudd, P.M. i de Llorens, R. Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: Differences between normal and tumour states. 2003a; *Glycobiology*, **13**(4):227-244.

Peracaula, R., Tabarés, G., Royle, L., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Rudd, P.M. i de Llorens, R. Altered glycosylation pattern allows the distinction between Prostate specific Antigen (PSA) from normal and tumour origins. 2003b; *Glycobiology*, **13**(6):457-470.

Perkins, G.L., Slater, E.D., Sanders, G.K. i Prichard, J.G. Serum tumor markers. 2003; *American Family Physician.* **68**: 1075-1082.

Peter J., Lenz, H., Unverzagt, C. i Hösel, W. Purification of prostate-specific antigen from serum by indirect immunosorption and elution with an hapten. *Clin. Chem.* 2000; **46** (9): 1490-1491.

- Peter, J., Unverzagt, C. i Hösel, W. Analysis of free prostate-specific antigen (PSA) after chemical release from complex with α -1-antichymotrypsin (PSA-ACT). 2000; *Clin. Chem.* **46** (4): 474-482.
- Peter, J., Unverzagt, C., Krogh, T.N., Vorm, O. i Hösel W. Identification of precursor forms of free prostate-specific antigen in serum of prostate cancer patients by immunosorption and mass spectrometry. 2001; *Cancer Research.* **61**: 957-962.
- Peter, J., Unverzagt, C., Lenz, H. i Hösel W. Purification of prostate-specific antigen from human serum by indirect immunosorption. 1999; *Anal. Biochem.* **273**: 98-104.
- Peterson, L.M. Serum RNase in the Diagnosis of Pancreatic Carcinoma. 1979; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 2630-2634.
- Poon, T.C.W., Mok, T.S.K., Chan, A.T.C., Chan, C.M.L., Leong, V., Tsui, S.H.T., Leung, T.W.T., Wong, H.T.M., Ho, S.K.W. i Jonson, P.J. Quantification and Utility of Monosialylated alpha-Fetoprotein in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma with Nondiagnostic Serum Total alpha-Fetoprotein. 2002; *Clinical Chemistry.* **48**(7): 1021-1027.
- Pous, J., Mallorquí-Fernández, G., Peracaula, R., Terzyan, S.S., Futami, J., Tada, H., Yamada, H., Seno, M., de Llorens, R., Gomis-Rüth, F.X. i Coll, M.. Three-dimensional Crystal Structure of Human RNase1 Δ N7 at 1.9Å Resolution. 2001; *Acta Cryst.* **D57**: 498-505.
- Prakash S. i Robbins P.W. Glycotyping of prostate specific antigen. 2000; *Glycobiology.* **10**: 173-176.
- Q**
- Qian, Y., Sensibar, J.A., Zelner, D.J., schaeffer, A.J., Finlay, J.A., Rittenhouse, H.G. i Lee, C. Two-dimensional electrophoresis detects prostate-specific antigen-alpha-1-antichymotrypsin complex in serum but not in prostatic fluid. 1997; *Clinical chemistry.* **43** (2): 352-359.
- R**
- Rajagopal, S., Navone, N.M., Troncoso, P., Fritsche, H.A. i Chakrabarty, S. Modulation of cellular proliferation and production of prostate-specific antigen and matrix adhesion molecules in human prostate carcinoma cells by polypeptide growth factors: Comparative analyses of MDA Pca2a with established cell lines. 1998; *International Journal of Oncology;* **12**: 589-595.
- Reddi, K.K. i Holland, J.F. Elevated Serum Ribonuclease in Patients with Pancreatic Cancer. 1976; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**: 2308-2310.
- Rhodes, J.M. i Milton, J.D. eds. *Lectin Methods and Protocols*. 1998. Humana Press. EEUU.
- Ribó, M., Beintema, J.J., Osset, M., Fernández, E., Bravo, J., De Llorens, R. i Cuchillo, C.M. Heterogeneity in the Glycosylation Pattern of Human Pancreatic Ribonuclease. 1994; *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **375**: 357-363.
- Roberts, G.C., Dennis, E.A., Meadows, D.H., Cohen, J.S. i Jardetzky, O. The Mechanism of Action of Ribonuclease. 1969; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**: 1151-1158.
- Romppanen, J., Haapalainen, T., Punnonen, K. i Penttilä, I. Serum sialic acid and prostate-specific antigen in differential diagnosis of benign prostate hyperplasia and prostate cancer. 2002; *Anticancer Research.* **22**: 415-420.
- Rosenberg, H.F. i Dyer, K.D. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Human Ribonuclease (RNase k6): Increasing Diversity in the Enlarging Ribonuclease Gene Family. 1996; *Nucleic Acids Res.* **24**: 3507-3513.
- Ruiz, N. Estudio de la ribonucleasa de saliva humana. 1997. Treball de Recerca. Universitat de Girona.

Rydén, I., Skude, G., Lunblad, A. i Pählsson, P. Glycosylation of α 1-acid glycoprotein in inflammatory disease: analysis by high-pH anion-exchange chromatography and concanavalin A crossed affinity immunoelectrophoresis. 1997; *Glycoconjugate Journal*. **14**: 481-488.

S

Samadi, A.A., Davidson, S.D., Mordente, J.A., Choudhury, M.S., Tazaki, H., Mallouh, C. i Konno, S. Differential Glycosylation of cellular Prostate specific antigen and the Regulatory Mechanism of Its Secretion. 1999; *Molecular Urology*. **3**: 147-152.

Sceautres, C. La detecció del càncer. 1981; *Mundo científico*. **1**: 1004-1016.

Schade, R., Staak, C., Hendrikse, C., Erhard, M., Hugl, H., Koch, G., Laarson, A., Pollmann, W., van Regenmortel, M., Rijke, E., Spielmann, H., Steinbusch, H. i Straughan, D. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies-IgY. *The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21*. 1996. Berlin, Alemanya.

Schein, C. From Housekeeper to Microsurgeon: The Diagnostic and Therapeutic Potential of Ribonucleases. 1997; *Nature Biotechnology*. **15**: 529-536.

Seno, M., Futami, J., Tsushima, Y., Akutagawa, K., Kosada, M., Tada, H. i Yamada, H. Molecular Cloning and Expression of Human Ribonuclease 4 cDNA. 1995; *Biochim. Biophys. Acta*. **1261**: 424-426.

Shenkin, A., Citrin, D.L. i Rowan, R.M. An Assessment of the Clinical Usefulness of Plasma Ribonuclease Assays. 1976; *Clin. Chim. Acta*. **72**: 223-231.

Sinn, H.P., Brown, S.A., Oberle, E. i Thompson J.S. Analysis of the Lewisx epitope in human pancreas and pancreatic adenocarcinomas. 1992; *Int. J. Pancreatol.* **1(2)**:125-35.

Song, C.S., Yu, J. H., Bai D.H., Hester, P.Y. i Kim, K.H. Antibodies to the α -Subunit of Insulin Receptor from Eggs of Immunized Hens. 1985; *J. Imm.* **135**: 3354-3359.

Sorrentino, S. i Libonati, M. Structure-function Relationships in Human Ribonucleases: main Distinctive Features of the major RNase types. 1997; *FEBS Letters* **404**: 1-5.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. i Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. 1973; *J. Natl. Cancer Inst.* **51(5)**: 1409-1416.

Stenman U., Leinonen, J., Zhang, W, Finne, P. Prostate-specific antigen *Sem. Cancer Biol.* 1999; **9**: 83-93.

Stephan, C., Jung, K., Lein, M., sinha, P., Schnorr, D. i Loening, S.A. Molecular Forms of Prostate-specific antigen and Human kallikrein 2 as Promising Tools for Early Diagnosis of Prostate Cancer. 2000; *Cancer Epidemiology, Biomarkers i Prevention*. **9**: 1133-1147.

Stone, K.R., Mickey, D.D., Wunderly, H., Mickey, G.H. i Paulson, D.F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). 1978; *Intl. J.Cancer*. **21**: 274-281.

Súchil, L. Epidemiología del càncer de próstata. 2001; *Rev. Oncologia*. **5**: 11-21.

Sumi, S., Arai, K., Kitahara, S. i Yoshida, K. Serial lectin affinity chromatography demonstrates altered asparagine-linked sugar chain structures of prostate-specific antigen in human prostate carcinoma 1999; *Journal of Chromatography B*. **727**: 9-14.

T

Tournut, R., Allan, B.J. i White, T.T. Cancer, Pancreatitis, and the Detection of the Isoenzymes of Dnase, RNase and Amylase. 1978; *Clin. Chim. Acta*. **88**: 345-353.

V

Väisänen, V., Lövgren, J., Hellman, J., Piironen, T., Lilja, H. i Pettersson, K. Characterization and processing of prostate specific antigen (hK3) and human glandular kallikrein (hK2) secreted by LNCaP cells. 1999; *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. **2**: 91-97.

Varki, A., Cumings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G. i Marth, J. 1999. *Essentials in Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EEUU.

Villoutreix, B.O., Lilja, H., Pettersson, K., Lovgren, T. i Teleman, O. Structural investigation of the alpha-1-antichymotrypsin: prostate-specific antigen complex by comparative model building. 1996; *Protein Sci.* **5(5)**: 836-851.

W

Ward, M.A., Catto, J.W.F. i Hamdy, F.C. Prostate-Specific Antigen: Biology, Biochemistry and Available Commercial Assays. 2001; *Ann. Clin. Biochem.* **38**: 633-651.

Warshaw, L.A. i Fernández-Del Castillo, C. Pancreatic Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1992; **326**: 455-465.

Warshaw, L.A. Serum Ribonuclease for Detecting Pancreatic Cell Necrosis. Dins de *Acute Pancreatitis*. H.G. Beger, i M. Bücher, eds. Springer-Verlag. Berlin. 1987: 154-157.

Weickmann, J.L. i Glitz, D.G. Human Ribonucleases: Quantitation of Pancreatic-like Enzymes in Serum, Urine, and Organ Preparations. 1982; *J. Biol. Chem.* **257**: 8705-8710.

Weickmann, J.L., Elson, M. i Glitz, D.G. Purification and Characterization of Human Pancreatic Ribonuclease. 1981; *Biochemistry.* **20**: 1272-1278.

Weickmann, J.L., Olson E. M. i Glitz, D. G. Immunological Assay of Pancreatic Ribonuclease in Serum as an Indicator of Pancreatic Cancer. 1984; *Cancer Res.* **44**: 1682-1687.

Wu, J.T., Bradley, W. L., Grace, H.L. i Wu, L.L. Production of miligram concentrations of free prostate specific antigen (fPSA) from LNCaP cell culture: difference between fPSA from LNCaP cell and seminal plasma. 1998; *J. Clin. Lab. Anal.* **12**: 6-13.

Wu, J.T., Zhang, P., Astill, M.E., Wilson, L.W., Lyons, B.W., Wu, L.L. i Stephenson, R. PSA Immunoreactivity Detected in LNCaP Cell Medium, Breast Tumor Cytosol and Female Serum. 1995; *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* **9**: 243-251.

Y

Yamashita, K., Hitoi, A., Irie, M. i Kobata, A. Fractionation by Lectin Affinity Chromatography Indicates that the Glycosilation of most Ribonucleases in Human Viscera and Body Fluids is Organ Specific. 1986; *Arch. Biochim. Biophys.* **250**: 263-266.

Yousef, G.M. i Diamandis, E.P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. 2001; *Endocrine Reviews.* **22(2)**: 184-204.

Z

Zhang, J., Dyer, K.D., i Rosenberg, H.F. Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily. 2003; *Nucleic Acids Research.* **31(2)**: 602-607.

Zhang, J., Dyer, K.D., i Rosenberg, H.F. RNase 8, a novel RNase A superfamily ribonuclease expressed uniquely in placenta. 2002; *Nucleic Acids Research.* **30(5)**: 1169-1175.

Zhang, W. M., Leinonen, J., Kalkkinen, N., Dowell, B. i Stenman, U.H. Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. 1995; *Clin. Chem.* **41(11)**: 1567-1573.

Zhou, H.M. i Strydom, D.J. The Aminoacid Sequence of Human Ribonuclease 4, a highly conserved ribonuclease that cleaves specifically on the 3' side of uridine. 1993; *Eur. J. Biochem.* **217**: 401-410.

S'han utilitzat les bases de dades d'Expasyi de *Swiss-Prot* a: www.expasy.ch/sprot.