



PROBIOL
PROGRAMA DE POSGRADO
EN BIOLOGÍA



IHEM - CONICET
Mendoza - Argentina

Estudio de Proteínas Implicadas en el Transporte de Catepsina D en Células TumORAles MAmarias y su Regulación Hormonal

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Médica Nadia Bannoud

Director: Dr. Miguel Ángel Sosa Escudero
Co-directora: Dra. Laura María Vargas Roig

**Laboratorio de Biología y Fisiología Celular “Dr. Francisco Bertini”
Instituto de Histología y Embriología “Dr Mario Burgos”. IHEM - CONICET
Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo.
Mendoza, Abril de 2017**



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

**A todas aquellas personas que apuestan a la ciencia
para el desarrollo soberano de un país.
A mi familia, Taufik, Elina, Florencia e Ignacio.**

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral ha contado con invaluable aportes de personas e instituciones, que han apoyado e impulsado la realización de esta investigación desde muchos aspectos. En estas líneas quisiera reflejar mi agradecimiento a todos ellos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme una beca para la realización de esta tesis doctoral.

Al Instituto de Histología y Embriología "Dr. Mario Burgos" (IHEM-CCT Mendoza), por brindarme las instalaciones y el equipamiento para la realización de la mayoría de los experimentos.

A la Facultad de Ciencias Médicas de la UNCuyo, por otorgarme financiamiento para cursos, congresos y pasantías.

Al Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU-CCT Mendoza), por poner a mi disposición todas sus instalaciones siempre que lo necesité.

A los miembros del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas (PROBIOL). A mis tutores: Dr. Rubén Carón, Dra. Silvina Nadin, Dr. Carlos Gamarra, por asesorar cada etapa de mi trayecto en la carrera del doctorado. A los miembros del jurado de esta tesis: Dr. Luis Mayorga, Dra. Teresa Damiani, Dr. Carlos Davio, por la lectura crítica del manuscrito, por valorar cada uno de los resultados e interpretaciones, por sus importantes sugerencias y aportes. A las secretarías, Elisa y Mariana por su excelente predisposición para asesorar y resolver distintas eventualidades a lo largo de estos 5 años.

A mi Director, el Dr. Miguel Ángel Sosa Escudero, por abrirme las puertas de su laboratorio y estimular mi formación científica desde que era una estudiante de grado. Por fomentar las buenas relaciones humanas generando un excelente ambiente de trabajo. Por guiar mi trabajo de tesis doctoral, inculcándome criterio científico. Por la paciencia en cada etapa de esta tesis.

A mi Co-directora, la Dra. Laura Vargas Roig, por asesorar y enriquecer este trabajo de tesis doctoral en todas sus instancias.

Al Dr. Carlos Morales por recibirme en su laboratorio, en el Departamento de Anatomía y Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad McGill, Montreal, Canadá. Por contribuir a mi formación científica permitiéndome no sólo manejar nuevas técnicas sino también conocer nuevas culturas, formas de trabajo y actividades académicas.

Al Dr. Eduardo Callegari, de South Dakota Infrastructure Network-NCCR-NIH, por su colaboración técnica y excelente predisposición a todo lo largo del estudio proteómico realizado.

A todos los miembros del IMBECU por su colaboración técnica. En particular, a la Dra. Marina Flamini, a la Dra. Belén Hapon, a la Dra. Virginia Pistone, a la Lic. Analía Redondo.

A los docentes de cada uno de los cursos de posgrado realizados, que ampliaron mi horizonte y contribuyeron a desarrollar un espíritu crítico.

A la Dra. “Loló” Carvelli por TODO. Por acercarme a una pipeta y a una sala de cultivo por primera vez. Por las largas reflexiones y discusiones de resultados, que me permitieron contemplar otras explicaciones de los fenómenos observados. Por compartir la fascinación por este mundo lleno de preguntas y ser la responsable de que mi vocación y yo estemos juntas.

A mi gran amiga y compañera de camino Mari Troncoso, por su amistad sincera e incondicional. Por sus palabras de aliento, por la confianza.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Pato, Esteban, Johana, Renata, Carolina, Patri. Por hacer que mi memoria esté llena de buenos recuerdos.

A Jael y Florencia, mis estudiantes-becarias, por compartir el aprendizaje del trabajo en equipo.

A Tirso Sartor por su invaluable asesoramiento técnico, por su ayuda en la optimización y ejecución de protocolos de trabajo.

A Antonella Losinno, por formarme en el campo de la microscopía confocal, por brindarme consejos y opiniones. Por su amistad incondicional.

Al Dr. Darío Fernández, por sus aportes y sugerencias en la realización de los estudios proteómicos.

A Paula I., Dani C., Ceci G., Dani N., Nati L., Sebastián, Rodolfo, por su apoyo diario, por todos sus consejos y aportes científicos. Por la amistad.

Al Dr. Walter Berón por su calidez humana, sus consejos y predisposición a ayudar en todo.

A Wanda, Anna y Arturo, por hacerme sentir parte de su familia. Por cuidarme y brindarme su amistad. Su amor y contención mitigaron el estar lejos de casa.

A mis amigas Nati, Anto y Clarita por ser mi cable a tierra y apoyarme incondicionalmente.

A mi padre y a mi madre, quienes me acompañaron en este camino, apoyando desde un principio la decisión de orientar mi profesión al mundo científico. Por inculcarme valores, por ser mi ejemplo de trabajo, dedicación y constancia. Por el amor incondicional.

A mi hermana, con quien tengo la dicha de compartir la pasión por la ciencia. Por sus consejos y su apoyo.

A Ignacio, mi compañero de vida, que con su amor y paciencia me apoyó en cada una de las instancias del desarrollo de esta tesis, alentando cada logro, conteniendo mis emociones y valorando el esfuerzo diario que este trabajo requirió, permitiéndome priorizarlo cada vez que así lo requería. Por sacarme una sonrisa cada día.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| Índice..... | 4 |
| Resumen..... | 9 |
| Abreviaturas..... | 11 |
| Capítulo I - Introducción | |
| 1. La célula en el contexto de los organismos multicelulares..... | 13 |
| 1.1. La organización de los epitelios..... | 13 |
| 1.2. El desarrollo de los tumores de origen epitelial..... | 14 |
| 1.2.1 El carcinoma de mama y sus diferentes fenotipos..... | 15 |
| 1.3. La célula normal y tumoral..... | 16 |
| 2. El transporte intracelular de moléculas..... | 19 |
| 2.1. La maquinaria lisosomal..... | 19 |
| 2.1.1 El transporte de proteínas lisosomales en las células eucarióticas...20 | |
| 2.1.2. El transporte selectivo de hidrolasas ácidas a lisosomas.....21 | |
| 2.1.2.1 Los receptores a manosa 6-fosfato (MPRs).....23 | |
| 2.1.2.1.1. El receptor a manosa 6-fosfato catión-independiente.24 | |
| 2.1.2.1.2. El receptor a manosa 6-fosfato catión-dependiente...25 | |
| 2.1.2.1.3. La función de los receptores a manosa 6-fosfato.....26 | |
| 2.1.2.1.4. Los receptores a manosa 6-fosfato en cáncer.....28 | |
| 2.1.2.2 Rutas alternativas para el transporte de hidrolasas ácidas...30 | |
| 2.1.2.2.1 Sortilina.....31 | |
| 2.1.2.2.1.1. Características estructurales.....32 | |
| 2.1.2.2.1.2. Sortilina: una proteína multifuncional.....33 | |
| 2.1.2.2.1.3. Sortilina en cáncer.....34 | |
| 2.1.3. La secreción de enzimas lisosomales.....35 | |
| 2.1.4. Catepsina D. Una proteasa multifuncional.....36 | |
| 2.1.4.1. Transcripción génica de catepsina D y su regulación.....37 | |
| 2.1.4.2. Estructura, síntesis y localización intracelular de catepsina D38 | |
| 2.1.4.3. Procesamiento proteolítico y maduración de catepsina D...38 | |
| 2.1.4.4. La secreción de catepsina D.....41 | |

| | |
|---|----|
| 2.1.4.5. La interacción de catepsina D con otras proteínas (prosaposina)..... | 43 |
| 2.1.4.5.1. Características estructurales y funcionales de prosaposina..... | 43 |
| 2.1.4.6. Catepsina D y cáncer..... | 44 |
| 2.1.4.6.1. La catepsina D y otras proteasas en la progresión tumoral..... | 45 |
| 2.1.4.6.2. Catepsina D y sus efectos protumorales..... | 47 |
| 2.1.4.6.3. Las interacciones tumor-estroma regulan la expresión de proteasas..... | 49 |
| 2.1.4.6.4. La secreción de catepsina D por células tumorales ¿regulada o por defecto?..... | 49 |
| 2.1.4.6.5. La catepsina D como posible blanco molecular en la lucha contra el cáncer..... | 51 |
| 2.1.4.6.5.1. Inhibidores de la actividad proteolítica..... | 51 |
| 2.1.4.6.5.2. Inhibidores de la interacción de catepsina D con otras proteínas..... | 52 |
| 2.1.4.6.5.3. Sustratos de catepsina D en cáncer..... | 52 |

Capítulo II – Objetivos

| | |
|---|----|
| Hipótesis, Objetivo general, Objetivos específicos..... | 54 |
|---|----|

Capítulo III – Materiales y Métodos

| | |
|---|----|
| 1. Líneas celulares..... | 57 |
| 2. Cultivo celular..... | 58 |
| 3. Charcolización del suero fetal bovino..... | 59 |
| 4. Tratamientos hormonales..... | 59 |
| 5. Tratamientos con bases débiles..... | 59 |
| 6. Procesamiento de las células para “inmunoblot”..... | 60 |
| 7. Precipitación con sulfato de amonio..... | 60 |
| 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida (sds-page) e “inmunoblot”..... | 61 |
| 9. Análisis de péptidos por espectrometría de masas. Huella peptídica..... | 62 |

| | |
|--|----|
| 10. Ensayo de “pull-down” de proteínas de medios de cultivo con partículas de agarosa-fosfomanano..... | 62 |
| 11. Transfecciones transientes..... | 64 |
| 12. Inmunofluorescencia indirecta y análisis por microscopía confocal..... | 64 |
| 13. Fraccionamiento subcelular de homogenatos..... | 65 |
| 14. Análisis estadístico..... | 67 |

Capítulo IV – Resultados

Parte 1. Estudios comparativos entre las cuatro líneas celulares mamarias: MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D

| | |
|---|-----------|
| 1.1. Las líneas celulares tumorigénicas y la no tumorigénica poseen distintos niveles de expresión de CatD, CD-MPR, sortilina y CI-MPR..... | 71 |
| 1.1.1. Catepsina D..... | 71 |
| 1.1.2. El receptor a manosa 6-fosfato catión-dependiente (CD-MPR)..... | 71 |
| 1.1.3. Sortilina..... | 72 |
| 1.1.4. El receptor a manosa 6-fosfato catión-independiente (CI-MPR)..... | 73 |
| 1.1.5. ¿Otras formas del CI-MPR?..... | 74 |
| 1.1.6. Las proteínas de 100 kDa de los homogenatos y de 220kDa de los medios de cultivo derivan del CI-MPR..... | 75 |
| 1.1.7. La fracción soluble del CI-MPR se corresponde con la región luminal del receptor..... | 78 |
| 1.2. La distribución subcelular de CatD y del CD-MPR en las líneas celulares tumorigénicas y no tumorigénicas..... | 79 |
| 1.3. Los receptores CD-MPR y CI-MPR presentan una distribución diferente en las células MCF-7..... | 84 |
| Conclusiones parciales..... | 86 |

Parte 2. Regulación hormonal del transporte intracelular de catepsina D en las líneas celulares mamarias tumorigénicas MCF-7 y T-47D.

| | |
|--|----|
| 2.1. El 17- β -estradiol induce sobreexpresión y redistribución de catepsina D y del CD-MPR en células tumorales que expresan receptores estrogénicos..... | 90 |
|--|----|

| | |
|---|------------|
| 2.1.1. Expresión y distribución de catepsina D en células MCF-7, en presencia de 17- β estradiol..... | 90 |
| 2.1.2. Expresión y distribución del CD-MPR en células MCF-7, en presencia de 17- β estradiol | 92 |
| 2.1.3. Efecto del 17- β estradiol sobre la expresión de CatD y del CD-MPR en células T-47D..... | 94 |
| 2.1.4. El 17- β estradiol no induce cambios en la expresión de CatD ni en la del CD-MPR en las células MCF-10A..... | 95 |
| 2.1.5. Acción del tamoxifeno en la expresión y procesamiento de CatD, en células MCF-7..... | 96 |
| 2.1.6. El 17- β -estradiol modifica la distribución de la catepsina D y del CD-MPR en las células MCF-7 sin alterar el grado de colocación entre ambas proteínas..... | 98 |
| 2.1.7. El 17- β estradiol induce una redistribución del CD-MPR hacia fracciones celulares livianas en las células MCF-7..... | 101 |
| 2.2. Efecto del 17- β -estradiol sobre la expresión de sortilina y del CI-MPR en células MCF-7..... | 103 |
| Conclusiones parciales..... | 105 |

Parte 3. El efecto de aminos acidotrópicas sobre la expresión y distribución de proteínas en las líneas celulares mamarias tumorigénicas MCF-7 y T-47D

| | |
|---|-----|
| 3.1. El efecto de las aminos acidotrópicas sobre las células MCF-7 y T-47D..... | 107 |
| 3.1.1. Acción de las aminos acidotrópicas sobre la expresión y distribución de catepsina D en las células MCF-7 | 107 |
| 3.1.2. Acción de las aminos acidotrópicas sobre la expresión de catepsina D en las células T-47D..... | 110 |
| 3.1.3. Acción de las aminos acidotrópicas sobre la expresión y distribución del CD-MPR en las células MCF-7..... | 112 |
| 3.1.4. Efecto de las aminos acidotrópicas sobre la expresión del CD-MPR en las células T-47D..... | 113 |

| | |
|---|------------|
| 3.1.5. Efecto de las aminos acidotrópicas sobre la expresión del CI-MPR en las células MCF-7 | 114 |
| 3.1.6. Efecto de las aminos acidotrópicas sobre la expresión del CI-MPR en las células T-47D..... | 115 |
| 3.1.7. Acción de las aminos acidotrópicas sobre la expresión y distribución de sortilina en las células MCF-7 | 117 |
| 3.1.8. Acción de las aminos acidotrópicas sobre la expresión de sortilina en las células T-47D..... | 118 |
| 3.2. ¿Existe una interregulación entre los receptores CD-MPR, sortilina y CI-MPR?.. | 119 |
| 3.2.1.La sobreexpresión de sortilina modifica la expresión de CatD y del CD-MPR en células MCF-7 y MCF-10A..... | 119 |
| Conclusiones parciales..... | 123 |
| Capítulo V – Discusión | |
| 1. Estudios Comparativos entre las Cuatro Líneas Celulares..... | 125 |
| 2. La Hormono-Dependencia de los Receptores y la Enzima | 128 |
| 3. Estudios con Aminos Acidotrópicas (cloruro de amonio/cloroquina)..... | 130 |
| Capítulo VI – Proyecciones..... | 134 |
| Capítulo VII – Bibliografía..... | 136 |

RESUMEN

La secreción aberrante de hidrolasas lisosomales es un cambio fenotípico común en muchos cánceres humanos. En este contexto, la catepsina D (CatD) es una de las proteasas que más ha sido estudiada, ya que su secreción promueve la proliferación de las células tumorales y aumenta su potencial metastásico. Particularmente, en carcinomas mamarios hormono-sensibles, la enzima es altamente secretada en respuesta al 17- β -estradiol, y sus niveles de expresión se han vinculado al pronóstico de la enfermedad. En la mayoría de las células no cancerosas, la CatD está confinada a lisosomas, siendo conducida a ellos por los receptores a manosa 6-fosfato catión independiente (CI-MPR), catión dependiente (CD-MPR), y/o por sortilina. Varias hipótesis han sido propuestas para explicar la secreción de CatD por las células tumorales; entre ellas una saturación del CI-MPR (generada por una sobreexpresión de CatD y por una deficiencia de dicho receptor), y/o un defecto de acidificación de compartimientos. En ambos casos se favorecería la secreción de la enzima por defecto. Sin embargo, en algunos modelos celulares fisiológicos, hay antecedentes que vinculan al CD-MPR con la secreción de CatD. Por lo tanto proponemos como hipótesis que el transporte y secreción de CatD en células tumorales mamarias son mediados por receptores, cuya expresión y distribución son reguladas por estrógenos. Para probar nuestra hipótesis, estudiamos la expresión y distribución del CD-MPR, CI-MPR y sortilina en cuatro líneas celulares mamarias; una no tumorigénica (MCF-10A) y tres tumorigénicas (MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D), dos de las cuales sobreexpresan receptores estrogénicos α (MCF-7 y T-47D), y las correlacionamos con la expresión y distribución de CatD. Determinamos que los niveles de expresión de los tres receptores difieren entre las cuatro líneas celulares, siendo mayor la expresión del CD-MPR y sortilina en las líneas celulares tumorigénicas respecto a la no tumorigénica, mientras que la expresión del CI-MPR es alta en las células no tumorigénicas. A su vez, la sobreexpresión de sortilina, en células MCF-7, indujo una disminución en la expresión del CD-MPR. En esta misma línea celular, demostramos que el CD-MPR colocaliza con CatD y que la expresión de ambos es inducida por 17- β -estradiol. Además, el CD-MPR es redistribuido hacia fracciones celulares livianas en presencia de la hormona, como sucede con la CatD. Mediante estudios con aminos acidotrópicos observamos una disminución del procesamiento de la enzima y del contenido intracelular total de la misma. Nuestros resultados sugieren que el transporte intracelular de CatD es mediado por receptores en

células MCF-7. Entre ellos, el CD-MPR sería uno de los que, además, conduciría a CatD hacia la membrana plasmática para su secreción, efecto promovido por el 17- β -estradiol. También demostramos que dicha secreción no es debida a un defecto de acidificación de compartimientos, tal como ha sido reportado por algunos autores. Por último proponemos que existiría un mecanismo compensatorio o de regulación entre el CD-MPR, el CI-MPR y sortilina en las cuatro líneas celulares estudiadas.

ABREVIATURAS:

CatD: catepsina D

proCatD: procatepsina D

M6P: manosa 6-fosfato

MPRs: receptores a manosa 6-fosfato

CD-MPR / MPR-46: receptor a manosa 6-fosfato catión-dependiente

CI-MPR / MPR-300: receptor a manosa 6-fosfato catión-independiente

Sort: sortilina

aa: aminoácidos

TGN: región trans del aparato de Golgi

RER: retículo endoplasmático rugoso

EGF: "epidermal growth factor" (factor de crecimiento epidérmico)

RE: receptor de estrógenos

RP: receptor de progesterona

HER2: "human epidermal growth factor receptor 2" (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)

PM: peso molecular

MEC: matriz extracelular

TEM: transición epitelio - mesenquimática

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. LA CÉLULA EN EL CONTEXTO DE LOS ORGANISMOS MULTICELULARES

Las células evolucionaron inicialmente como individuos de vida libre, pero las más importantes para los seres humanos son las que constituyen un organismo pluricelular. En el cuerpo humano se han caracterizado más de 200 tipos celulares diferentes, aunque todos ellos comparten el mismo genoma. Una particularidad común de todas las células del organismo humano es que han perdido las características necesarias para sobrevivir de forma independiente y han adquirido características que satisfacen las necesidades del conjunto del organismo, permitiéndoles formar tejidos que desarrollan una amplia variedad de funciones [1].

Entre las interacciones que establecen las células para constituir los tejidos, están aquellas que les permiten mantenerse unidas. Esta capacidad da origen a los tejidos de tipo epitelial, que constituyen gran parte del cuerpo de los vertebrados. Del mismo modo que una membrana celular se invagina para dividir una célula eucariota en dos, los epitelios se invaginan y parten el cuerpo de un vertebrado, revistiendo las superficies y cavidades y generando compartimientos internos en los que tienen lugar procesos específicos. Por lo tanto el revestimiento epitelial sería uno de los caracteres más ancestrales en la evolución de los animales, el cual se diversifica de diferentes maneras.

1.1. ORGANIZACIÓN DE LOS EPITELIOS

Las células que integran los epitelios poseen tres características principales; están adheridas entre sí por medio de uniones intercelulares especializadas; tienen polaridad morfológica y funcional (es decir que las diferentes funciones se asocian con tres regiones superficiales de morfología distinta: la región apical, la región lateral y la región basal) y están adheridas a una membrana basal subyacente. Como ya mencionamos, los epitelios recubren las superficies externas del cuerpo y revisten las cavidades internas cerradas y los “tubos” que comunican con el exterior (aparatos digestivos, respiratorio y genitourinario). Además, los epitelios forman la porción secretora (parénquima) de las glándulas y sus conductos excretores [2].

El ensamblaje de las células para formar un epitelio es un proceso reversible. Las células dispersas y no adheridas, que a menudo se denominan células mesenquimáticas, pueden reunirse formando un epitelio si se activa la expresión de sus moléculas de adhesión. Al contrario, las células epiteliales pueden cambiar su carácter, segregarse y migrar lejos de su epitelio de origen como entidades individuales. Tales transiciones epitelio-mesenquimáticas tienen un papel importante en el desarrollo embrionario normal como, por ejemplo, en el origen de la cresta neural. También suceden como procesos patológicos en la vida adulta, como ocurre en el caso del cáncer. La mayoría de los tumores se originan en los epitelios, pero se hacen propensos a diseminarse, convirtiéndose en malignos, cuando las células cancerosas se escapan del epitelio original e invaden otros tejidos.

1.2. EL DESARROLLO DE LOS TUMORES DE ORIGEN EPITELIAL

Todos los tumores, benignos y malignos, tienen dos componentes básicos: células neoplásicas proliferantes que constituyen su *parénquima* y un *estroma* de soporte constituido por el tejido conectivo circundante y vasos sanguíneos. Las células del parénquima dependen críticamente de su estroma, ya que hay un intercambio de información entre las células tumorales y las células estromales que influye directamente sobre el crecimiento de los tumores [3].

Los tumores malignos que se originan en la célula epitelial se denominan *carcinomas*. La mayoría de los carcinomas pueden clasificarse en dos categorías que reflejan las dos principales funciones biológicas de los epitelios: *carcinomas de células escamosas* (se originan en células epiteliales con función de revestimiento) y *adenocarcinomas* (se originan a partir de células epiteliales especializadas en la secreción de sustancias) [3].

Entre los tumores epiteliales, el carcinoma mamario es una de las neoplasias más estudiadas debido a que es la más frecuente en las mujeres de todo el mundo.

1.2.1. El carcinoma de mama y sus diferentes fenotipos

El carcinoma mamario es la neoplasia con mayor incidencia y la primera causa de muerte por tumores en mujeres, en Argentina (www.msal.gov.ar).

Según la clasificación histopatológica del cáncer de mama de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (tabla 1), las variedades más frecuentes son el carcinoma ductal y lobulillar. Cada una de estas dos variedades se divide en: *carcinoma no invasor*, denominado “carcinoma in situ”, y *carcinoma invasor*. El carcinoma ductal invasor representa entre el 65 y el 80% de los tumores mamarios [4].

| | Porcentaje |
|---|--------------|
| I. Carcinomas no invasores | 15-30 |
| a. Carcinoma ductal in situ | 80 |
| b. Carcinoma lobulillar in situ | 20 |
| II. Carcinomas invasores | 70-85 |
| a. Carcinoma ductal invasor | 79 |
| b. Carcinoma lobulillar invasor | 10 |
| c. Carcinoma mucinoso | |
| d. Carcinoma medular | |
| e. Carcinoma papilar | |
| f. Carcinoma tubular | |
| g. Carcinoma adenoidequístico | |
| h. Carcinoma secretorio juvenil | |
| i. Carcinoma apocrino | |
| j. Carcinoma con metaplasia | |
| III. Enfermedad de Paget del pezón | |

Tabla 1: Clasificación histopatológica de los tumores mamarias según la OMS.

Las características clínicas e histológicas del cáncer de mama han sido utilizadas, y lo siguen siendo, como elementos importantes para la definición de los diferentes factores pronóstico y para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, la identificación de las características inmunohistoquímicas del tumor permiten diferenciar alteraciones

genéticas que proporcionan la posibilidad de clasificar el cáncer de mama de una manera más adecuada en lo que se refiere a pronóstico y efectividad en el tratamiento [5] [6]. Por lo tanto, desde el punto de vista molecular, el cáncer de mama se ha clasificado en cuatro grupos fundamentales, descritos en la tabla 2:

| | |
|--------------|-------------------|
| 1- LUMINAL A | RE+ ; RP+ ; HER2- |
| 2- LUMINAL B | RE+ ; RP+ ; HER2+ |
| 3- HER 2 | RE- ; RP- ; HER2+ |
| 4- BASAL | RE- ; RP- ; HER2- |

Tabla 2: Clasificación molecular del cáncer de mama.

RE: receptores de estrógeno; RP: receptores de progesterona; HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

Estas características moleculares representan solo algunos de los muchos cambios que tienen lugar en las células tumorales durante el proceso de formación del tumor. Actualmente se tiende, cada vez más, a aplicar terapias dirigidas, es decir aquellas que interfieran con moléculas específicas que participan en el crecimiento, la progresión y la diseminación del cáncer. Para ello resulta fundamental conocer y entender cada uno de los cambios que se producen a nivel celular que inciden en el proceso tumorigénico y en el comportamiento tumoral.

1.3. LA CÉLULA NORMAL Y TUMORAL

El proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas se denomina carcinogénesis. Esta transformación es progresiva, y se origina en alteraciones en el material genético de una célula [7], que le confieren una ventaja selectiva, permitiendo que se divida más rápido que sus vecinas y convirtiéndola en la fundadora de un clon mutante en crecimiento. Posteriormente las células hijas acumulan subsecuentes y diversas mutaciones que permiten generar distintos clones. Estos presentan ventajas proliferativas con respecto a su contraparte normal que permite generar un clon neoplásico persistente [8]. En este contexto, Hanahan y Weinberg [9], describieron 8

capacidades (“hallmarks”) que son adquiridas por los diversos tipos celulares a través de distintos mecanismos y eventos durante el proceso carcinogénico, y que se ven favorecidas por la inestabilidad genómica y la inflamación sostenida (figura 1). Ellas son:

- 1- Mantenimiento de señales proliferativas
- 2- Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento
- 3- Evasión de apoptosis
- 4- Invasión y metástasis
- 5- Potencial de replicación ilimitado
- 6- Inducción de angiogénesis sostenida
- 7- Reprogramación del metabolismo energético celular
- 8- Evasión de la destrucción por el sistema inmune

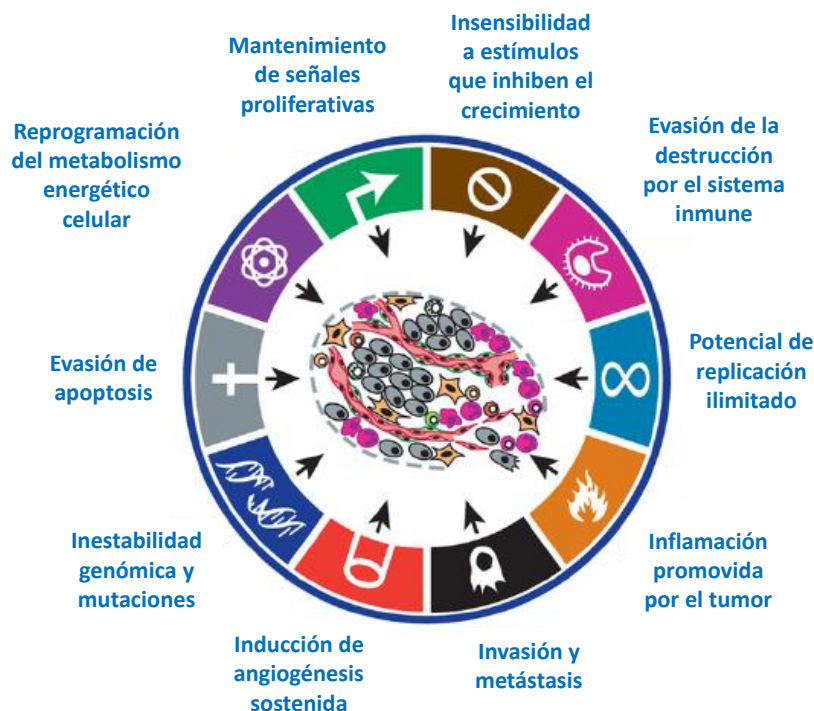


Figura 1: Hallmarks del cáncer. Modificado de D. Hanahan y R.A. Weinberg [9].

A continuación ampliaremos aquellas capacidades que están más vinculadas con este trabajo de tesis:

Independencia de señales de crecimiento: Normalmente las células son estimuladas por señales externas de proliferación (principalmente factores de crecimiento) que activan receptores presentes en la superficie celular. Este evento permite la activación consecutiva de vías de señalización intracelular que regulan la progresión a través del ciclo celular y el crecimiento de la célula, favoreciendo la supervivencia celular. En las células tumorales se observan mutaciones en los genes involucrados en estas vías de señalización (en general oncogenes) que mantienen activa la proliferación de manera anormal [10] [11].

Insensibilidad a estímulos que inhiban el crecimiento: La tasa de proliferación aumentada de las células tumorales también se encuentra favorecida por la evasión de los mecanismos de regulación negativa de la división celular, controlados por los genes supresores de tumores. Estos genes actúan a distintos niveles, limitando el crecimiento tumoral y la proliferación celular [12] [13].

Invasión y metástasis: La mayor parte de las muertes asociadas a tumores sólidos se debe a la diseminación a distancia de las células tumorales y el consecuente desarrollo de metástasis. Del tumor primario, sólo algunas células adquieren mutaciones que les permiten desarrollar el potencial de invadir el tejido que las rodea (invasión) y posteriormente sitios distantes (metástasis). Dentro de estas mutaciones, la mejor caracterizada es la que provoca la disminución de la expresión de E-cadherina en carcinomas, una proteína fundamental en la adhesividad con otras células y con la matriz extracelular (MEC) por lo que las células tumorales pierden el anclaje al epitelio [14]. Las células tumorales con capacidad invasiva cambian su fenotipo haciéndose más parecidas a las células mesenquimáticas, en un proceso denominado transición epitelio-mesenquimática (TEM) [15]. Las células pierden las uniones adherentes, cambian su morfología epitelial pareciéndose a los fibroblastos, aumentan la expresión de enzimas que degradan la MEC y aumentan su motilidad, lo que favorece la invasión. Por otra parte, los fibroblastos que rodean a las células tumorales también se modifican favoreciendo el proceso carcinogénico y la TEM, generando un microambiente pro-tumoral, denominado “estroma reactivo” [16][17].

2. EL TRANSPORTE INTRACELULAR DE MOLÉCULAS

Todas las moléculas sintetizadas por las células, normales y tumorales, deben transportarse a través de ellas hacia los distintos compartimientos membranosos o hacia el exterior celular. Esto lo logran a través de las vesículas de transporte, que emergen por gemación de la membrana de un compartimiento y se fusionan con la membrana de otro, o con la membrana plasmática [18][19]. Este tráfico de membranas fluye a lo largo de rutas direccionales muy organizadas; la vía biosintética-secretora se dirige hacia el exterior, desde el retículo endoplasmático (RE) hacia el complejo de Golgi y la superficie celular, con una desviación hacia los lisosomas, mientras que la ruta endocítica se dirige hacia el interior desde la membrana plasmática[18].

En general los lisosomas son puntos de encuentro en los que convergen diferentes corrientes del tráfico intracelular. Una ruta que se dirige hacia fuera desde el RE vía complejo de Golgi entrega la mayoría de las enzimas hidrolíticas, mientras que al menos tres vías desde diferentes orígenes introducen sustancias en los lisosomas para su degradación. Estas vías son la endocítica, la autofágica y la fagocítica [20].

2.1. LA MAQUINARIA LISOSOMAL

Por mucho tiempo los lisosomas fueron considerados organelas terminales involucradas en la degradación de diferentes sustratos. Sin embargo, esta visión está cambiando rápidamente por la evidencia que demuestra que estas organelas y su contenido tienen funciones especializadas, más allá de la conocida función degradativa. Muchas proteínas lisosomales han sido implicadas en funciones celulares especializadas y en desórdenes vinculados al procesamiento antigénico, al transporte específico de proteínas surfactantes y a enfermedades por depósito lisosomal [21].

Los lisosomas son organelas ácidas, limitadas por una membrana simple que contienen en su interior unas 120 proteínas de membrana y más de 50 hidrolasas ácidas solubles. Estas enzimas alcanzan su mayor actividad catalítica a un pH 4.5 - 5.0, que es justamente el pH luminal lisosomal. Este pH ácido, es mantenido gracias a bombas protónicas del tipo H⁺/ATPasa insertas en la membrana de las mencionadas organelas. A

su vez, la presencia de proteínas integrales de membrana altamente glicosiladas (e.g. LAMPs, LIMPs) protege a las membranas lisosomales de la actividad de sus propias enzimas.

Una característica esencial de los lisosomas es su heterogeneidad, ya que en un mismo tipo celular hay poblaciones lisosomales con distintas baterías de enzimas.

El material que se digiere en los lisosomas puede provenir del exterior de las células (por endocitosis) o también desde el propio citoplasma (por autofagia). El material que no puede ser digerido completamente, queda acumulado en los lisosomas, transformándolos en cuerpos residuales.

Las hidrolasas ácidas presentes en los lisosomas comprenden glicosidasas, lipasas, nucleasas, fosfatasas, sulfatasas, proteasas y otras [22] [23]. Entre las proteasas están aquellas de la familia de las catepsinas, como la proteasa aspártica catepsina D (CatD), uno de los objetos de estudio de este trabajo de tesis.

2.1.1. El transporte de proteínas lisosomales en las células eucarióticas

Las proteínas lisosomales son conducidas a los lisosomas de una manera selectiva. La mayor parte de las hidrolasas ácidas recién sintetizadas son modificadas post-traduccionalmente en sus carbohidratos de un modo muy especial: adquieren residuos manosa 6-fosfato [24]. Esta modificación sobre las enzimas es reconocida específicamente por los receptores a manosa 6-fosfato catión independiente (CI-MPR) y/o catión dependiente (CD-MPR) en el complejo de Golgi, los cuales las transportan hacia los endosomas, desde donde son posteriormente conducidas a los lisosomas. Sin embargo, otras enzimas solubles y proteínas no enzimáticas son transportadas a los lisosomas de una manera independiente de manosa 6-fosfato, ya sea mediada por receptores alternativos como la proteína integral de membrana lisosomal 2 (LIMP-2) o por sortilina (Sort) (figura 2), u otros mecanismos aún no identificados [25] [26][27].

Tanto las proteínas estructurales de las membranas lisosomales como los receptores, presentan señales específicas en su región citoplasmática para su correcta distribución. Estas señales son secuencias basadas en dileucinas o tirosinas que les permiten interactuar con proteínas citosólicas que forman la cubierta de vesículas de transporte, como las proteínas GGAs (Golgi-localizing, Y-adaptin ear domain homology,

ARF-binding protein) o los complejos de proteínas adaptadores (AP). Además, fosforilaciones y modificaciones lipídicas regulan el reconocimiento de estas señales, modulando el tráfico de las proteínas de la membrana lisosomal. Todo lo mencionado garantiza un transporte específico de proteínas hacia los lisosomas [23] [28].

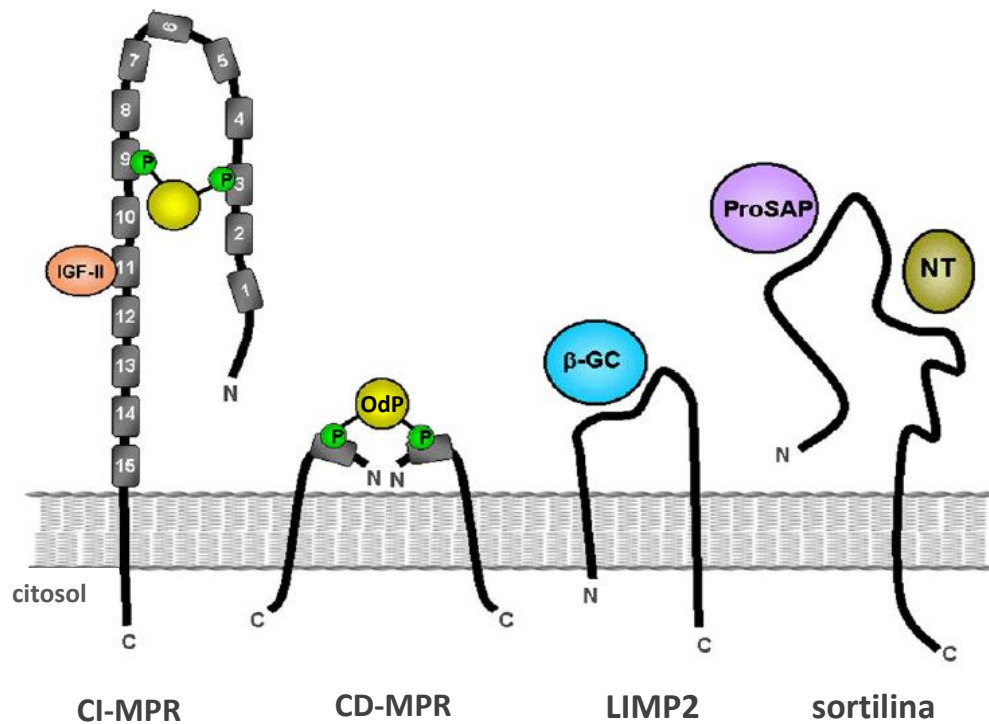


Figura 2: Receptores involucrados en el transporte específico de proteínas lisosomales solubles. El receptor a manosa 6-fosfato (CI-MPR) contiene dos sitios distintos de unión a M6P, en los segmentos 3 y 9, y un sitio de unión a IGF II en el segmento 11. El receptor a manosa-6-fosfato (CD-MPR) contiene un solo sitio de unión a M6P y forma dímeros no-covalentes que pueden unir oligosacáridos difosforilados (OdP). La proteína integral de membrana lisosomal (LIMP2) transporta a la β-glucocerebrosidasa (β-GC) lisosomal. Sortilina es un receptor de transporte para neurotensina (NT), lipoprotein lipasa y precursores de proteínas activadoras de esfingolípidos (ProSAP). Modificado de T.Braulke y J.S. Bonifacino [23].

2.1.2. El transporte selectivo de hidrolasas ácidas a lisosomas

Como se mencionó anteriormente, los precursores de las enzimas lisosomales sufren modificaciones post-traduccionales en su estructura química que les permiten alcanzar su destino final. Estas modificaciones consisten en la adición de residuos de manosa 6-fosfato (M6P) a los oligosacáridos de la molécula enzimática. Una vez que la

molécula precursora llega a la región cis del aparato de Golgi, su oligosacárido es sometido a la acción secuencial y coordinada de dos enzimas residentes en esa región: la N-acetil-glucosaminafosfotransferasa y la N-acetil-glucosaminafosfodiesterasa. Estas enzimas transforman un residuo manosa terminal en M6P, el cual es reconocido luego por receptores específicos a manosa 6-fosfato (MPRs) localizados en las membranas de la región trans del aparato de Golgi (TGN). De este modo, los MPRs concentran las hidrolasas ácidas y las segregan de otras proteínas, permitiendo su inclusión en pequeñas vesículas de transporte. Las vesículas que llevan los complejos enzima/receptor son vesículas cubiertas con clatrina (CCV), que se desprenden del TGN y se fusionan con un compartimiento acidificado (i.e. endosomas tardíos), como se esquematiza en la figura 3. El pH ácido de ese compartimiento (≈ 5.5) permite la disociación del complejo enzima-receptor y, luego, las enzimas son transportadas a los lisosomas, mientras que los MPRs son reciclados al TGN [29] (figura 3).

Es importante mencionar que, en condiciones basales, entre un 10-20% de los MPRs están presentes también en la membrana plasmática de las células, desde donde pueden recapturar algunas enzimas que escaparon de la selección y fueron liberadas al medio extracelular (aproximadamente el 10% del total de enzimas producidas). En este caso los MPRs redireccionan las enzimas hacia los lisosomas a través de la vía endocítica, motivo por el cual también se ha descrito la presencia de MPRs en endosomas tempranos [28][30].

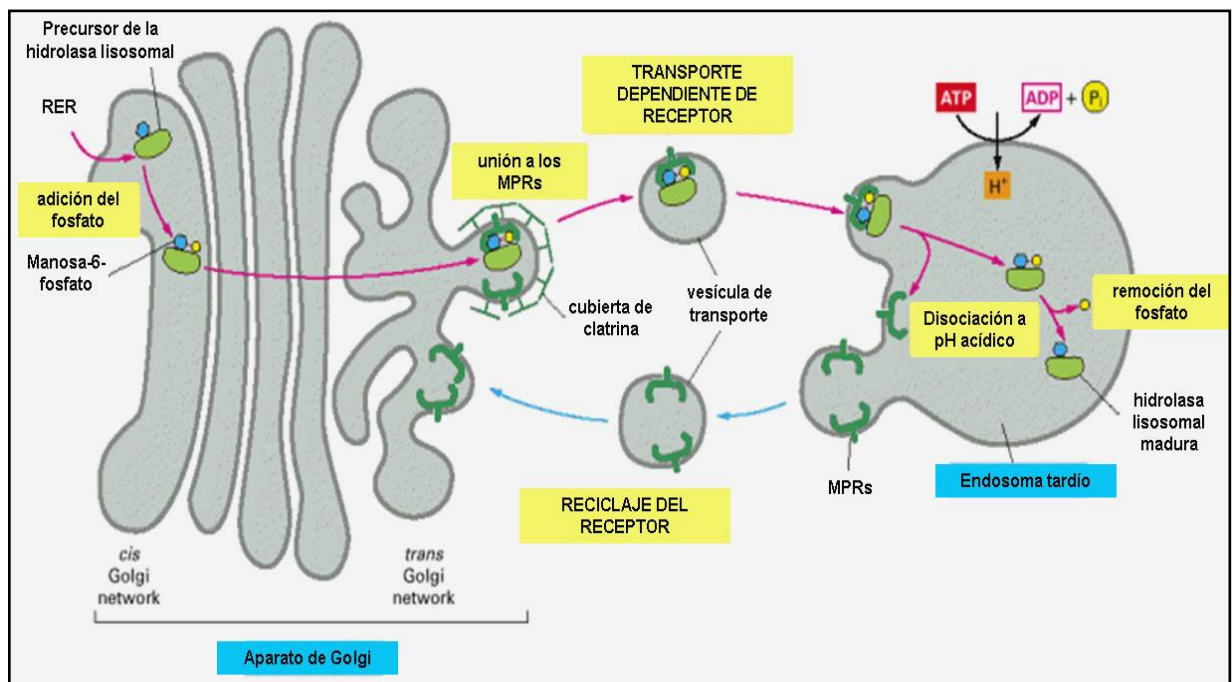


Figura 3: Transporte de hidrolasas ácidas sintetizadas “de novo” a los lisosomas.

Los precursores de hidrolasas lisosomales son modificados por la adición de un residuo de M6P en la región cis del aparato de Golgi. El receptor concentra las hidrolasas ácidas para discriminarlas de otras proteínas y permitir su inclusión en las vesículas de transporte. Las vesículas cubiertas con clatrina se desprenden del TGN y luego se fusionan con los endosomas tardíos, donde el pH ácido de los mismos disocia el ligando del receptor. Los receptores reciclan luego al aparato de Golgi donde son reutilizados. Modificado de B. Alberts y col. [1].

2.1.2.1. LOS RECEPTORES A MANOSA 6-FOSFATO (MPRs)

En los mamíferos, los receptores a manosa 6-fosfato (MPRs) son los responsables del transporte de las hidrolasas solubles recién sintetizadas a los endosomas para su subsiguiente transferencia a los lisosomas [31]. Hasta el momento, se han identificado y caracterizado dos formas de MPRs: el **receptor a manosa 6-fosfato catión dependiente (CD-MPR)** y el **receptor a manosa 6-fosfato catión independiente (CI-MPR)**, de 46 kDa y 300 kDa, respectivamente. El CD-MPR necesita de iones bivalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} o Mn^{+2}) en muy bajas concentraciones para interactuar con sus ligandos, mientras que el CI-MPR puede prescindir de ellos [32] [33]. A pesar de que entre los dos receptores hay una baja homología (alrededor de un 20%), se acepta que los genes de ambos MPRs surgieron de un ancestro común. De hecho, se ha sugerido que el CI-MPR se originó de duplicaciones

múltiples de un gen ancestral común [34]. Ambos MPRs son glicoproteínas transmembrana tipo I y están presentes en el TGN, en endosomas y en la membrana plasmática, pero no se han detectado en lisosomas [30]. A su vez, el CI-MPR presenta dos sitios de unión de alta afinidad para M6P, mientras que el CD-MPR contiene sólo uno. Este último receptor puede estar en las membranas como dímeros lo que le permite unir oligosacáridos que contengan 2 residuos de M6P, de manera similar al CI-MPR (figura 2). Ambos receptores son co-expresados en la mayoría de las células eucarióticas y tienen una distribución subcelular similar, la cual depende, a su vez, del tipo celular [35].

2.1.2.1.1. EL RECEPTOR A MANOSA 6-FOSFATO CATION-INDEPENDIENTE (CI-MPR)

Este receptor pertenece a la familia de las lectinas tipo P, y en humanos está codificado por un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 6. En relación a su estructura, el CI-MPR atraviesa la membrana una sola vez y en su dominio NH₂-terminal se encuentra el sitio de unión o “binding” al ligando [36]. En la forma madura del CI-MPR podemos distinguir tres regiones perfectamente diferenciadas (figura 4):

- Una región extracelular (o luminal en caso de estar en las estructuras intracelulares) de 2265 aminoácidos, formada por 15 unidades repetidas, de aproximadamente 145 aminoácidos cada una.
- Una región transmembrana, de 23 aminoácidos.
- Una región citoplasmática en el extremo carboxilo-terminal, de 163 aminoácidos.

Actualmente, se ha estimado que el peso molecular del CI-MPR es de 300 kDa aproximadamente, de los cuales 270 kDa lo aportaría su esqueleto polipeptídico, y los restantes 20 o 30 kDa sus extensos oligosacáridos. Se ha demostrado que este receptor puede formar dímeros en presencia de ligandos multivalentes, como β -Glucuronidasa [37]. Esta dimerización reforzaría el “binding” de los ligandos e induciría un aumento en la velocidad de internalización, tal como ocurre en el “clearance” del péptido mitogénico IGF-II [38][39]. La naturaleza multifuncional del CI-MPR se demuestra por la presencia de dos sitios de unión a residuos fosfomanosilados (los dominios 3 y 9) y uno de unión al factor mitogénico de crecimiento IGF-II (dominio 11) en su región luminal (figura 2 y 4).

En los mamíferos, se ha descrito también una forma soluble del CI-MPR (sCI-MPR) que es naturalmente liberada por clivaje proteolítico en cultivos [40]. En algunos estudios *in vivo* se ha observado que esta forma soluble circula en el suero hasta concentraciones de 5µg/ml [41].

2.1.2.1.2. EL RECEPTOR A MANOSA 6-FOSFATO CATION-DEPENDIENTE (CD-MPR)

El CD-MPR también pertenece a la familia de las lectinas tipo P, pero a diferencia del CI-MPR, está codificado por un gen localizado en el cromosoma 12 humano y requiere de cationes bivalentes como Ca^{+2} , Mg^{+2} o Mn^{+2} para interactuar con sus ligandos [42].

Estructuralmente, el receptor maduro está formado por 3 dominios (figura 4):

- Un dominio luminal, de 159 aminoácidos que contiene el sitio de unión a M6P, con alta homología con las unidades repetitivas del CI-MPR.
- Un dominio hidrofóbico transmembrana de 25 aminoácidos.
- Un dominio citoplasmático de 67 residuos en el extremo carboxilo-terminal.

La proteína no glicosilada tiene un peso molecular aparente de 28 kDa, indicando que el oligosacárido hace una gran contribución a la estructura final del receptor que posee un peso molecular de 46 kDa [42]. El dominio citoplasmático del CD-MPR, al igual que el del CI-MPR, posee una señal de internalización, una señal de selección en el TGN, un sitio de palmitoilación, y un sitio de fosforilación para caseinkinasa II. Este receptor puede formar oligómeros no covalentes, dímeros y tetrámeros, aunque el estado más común es el de homodímero [43].

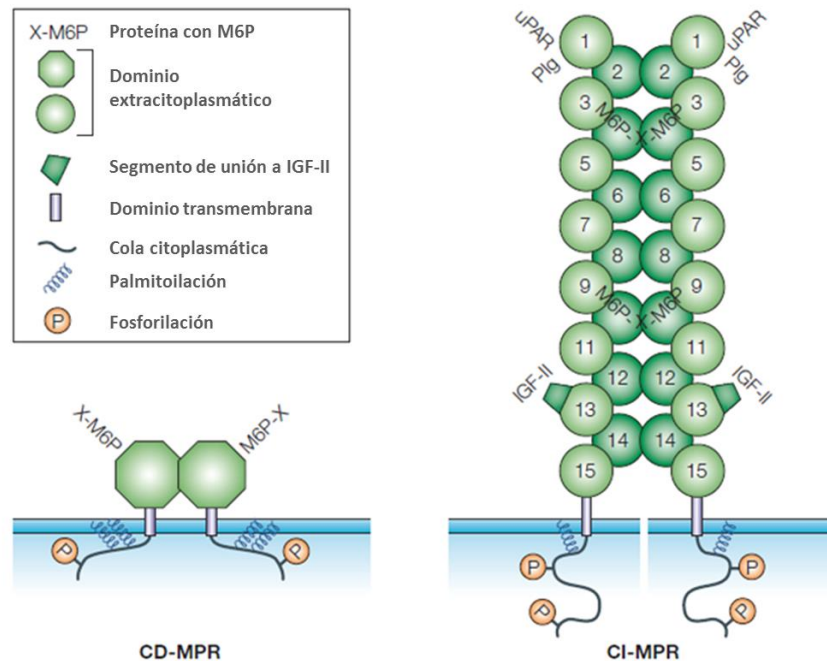


Figura 4: Los receptores a manosa 6-fosfato.

El receptor a manosa 6-fosfato catión dependiente (CD-MPR) está presente en las membranas predominantemente como un homodímero estable, y tiene un solo sitio de unión a M6P por polipéptido. El receptor a manosa 6-fosfato catión independiente (CI-MPR) también suele estar dimerizado en las membranas celulares. uPAR (receptor de activador de plasminógeno tipo urokinasa); IGF-II (factor de crecimiento simil-insulina tipo II); Plg (plasminógeno). Modificado de P. Gosh y col. [44].

2.1.2.1.3. LA FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES A MANOSA 6-FOSFATO

Ambos receptores coexisten en la mayoría de las células eucarióticas y aún no se conoce bien la razón de esta coexistencia. Los dos receptores pueden unir los mismos ligandos aunque con distinta afinidad y pH óptimo [45]. Sin embargo, un análisis proteómico de suero de ratones deficientes en MPRs reveló que la tripeptidil peptidasa I, Creg1, RNAsa t2 y heparanasa serían transportadas selectivamente por el CD-MPR, mientras que α -manosidasa B1, catepsina D y prosaposina serían preferencialmente transportadas por el CI-MPR [46]. Por otro lado, hay autores que sostienen que la contribución del CD-MPR en el transporte de enzimas lisosomales recién sintetizadas se

torna importante sólo ante una deficiencia del CI-MPR, o su bloqueo con anticuerpos. En ese caso, se incrementa la secreción de las enzimas lisosomales recién sintetizadas [47].

El CD-MPR y el CI-MPR unen sus ligandos (proteínas lisosomales recién sintetizadas que contienen M6P) en el transcurso de la ruta biosintética-secretoria y los transfieren a la ruta endocítica, donde son liberados y conducidos a los lisosomas. Los complejos MPR-ligando emergen del TGN en forma de vesículas cubiertas con clatrina, que se fusionan con compartimientos endosomales [48]. Debido al bajo pH de estas organelas, los complejos se disocian, y los MPRs reciclan al TGN para ser reutilizados (figura 5).

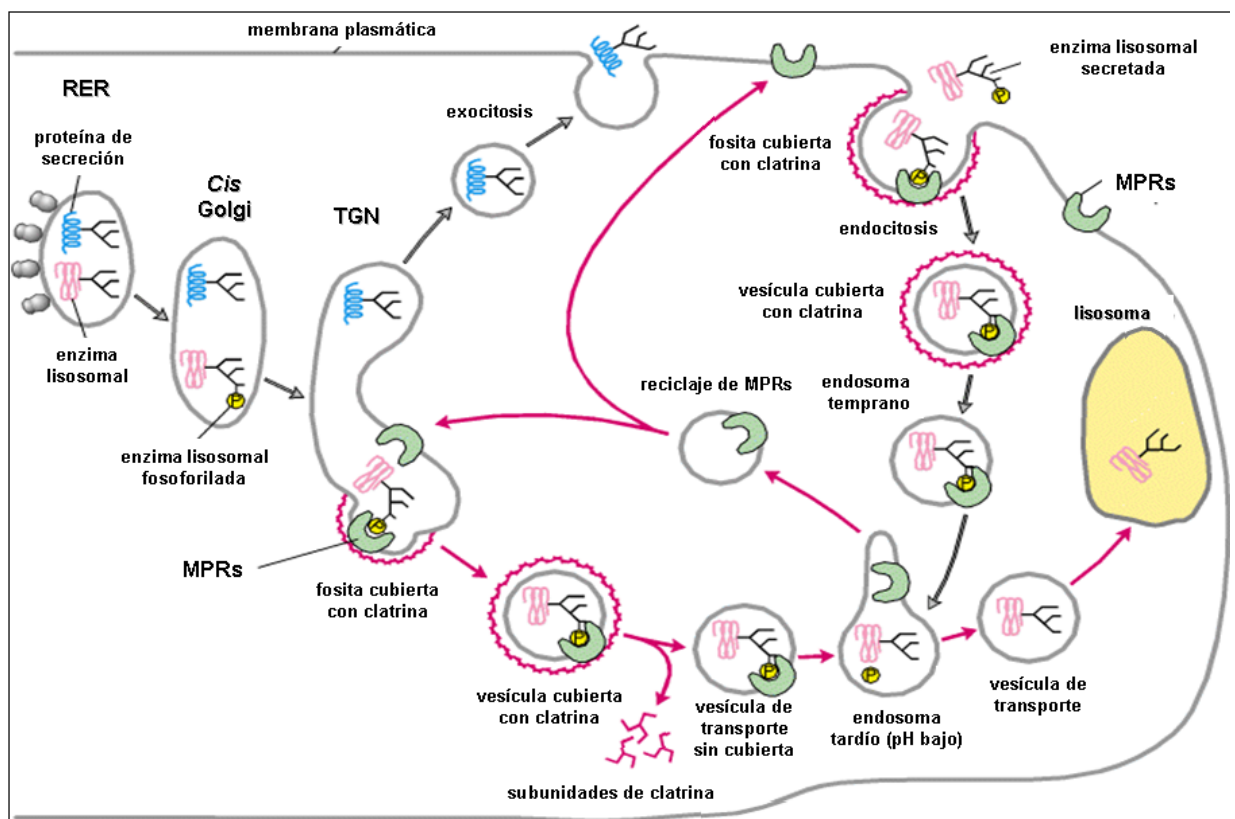


Figura 5: Transporte cíclico de MPRs. Modificado de H. Lodish y col. [49].

Como ya mencionamos, un porcentaje de ambos MPRs son localizados en la membrana plasmática (entre un 10-20% del contenido total de MPRs de las células)[28][30], donde el CI-MPR media la endocitosis de polipéptidos que contienen M6P. Aunque el CD-MPR también ha sido localizado en la membrana plasmática, tiene

baja capacidad para endocitar ligandos extracelulares, a pesar de su permanente reciclaje entre la superficie celular y las membranas intracelulares [50].

Por otro lado, en líneas celulares no tumorales, entre un 5 y un 10% de las proteínas lisosomales recién sintetizadas son secretadas. Esta secreción basal había sido atribuida a una falla en la unión de estas enzimas lisosomales a los receptores o a un englobamiento inespecífico en vesículas que participan en la secreción constitutiva. Sin embargo, Chao y col. [47] propusieron que el CD-MPR sería el responsable de dicha secreción, demostrando que parte de las enzimas lisosomales recién sintetizadas se unen a este receptor y son secretadas. Para esta propuesta, la disociación ligando-receptor podría ocurrir en la superficie celular o en endosomas tempranos, quienes finalmente conducirían a los ligandos a la superficie celular.

Por otra parte, el CI-MPR puede unir ligandos que no contienen M6P. Uno de ellos es el IGF II (“insulin-like growth factor II” o factor de crecimiento simil insulina tipo II), y por ello este receptor es también conocido como IGF2R o IGFII/MPR. Para esta función, el CI-MPR une al IGF-II en la superficie celular, y lo internaliza para ser degradado en lisosomas. Esto previene la acumulación excesiva de IGF-II, e impide una acción mitogénica del péptido, la cual sería dañina para un organismo especialmente durante el desarrollo embrionario [44]. Además, el CI-MPR permite la activación del proTGF- β (precursor del “transforming growth factor β ”) a su forma biológicamente activa, TGF- β [51], mediante la formación de un complejo con el receptor del activador de plasminógeno tipo urokinasa (uPAR) en la superficie de las células. Esto genera la posterior activación del plasminógeno a plasmina quien cataliza la remoción del propéptido del TGF- β .

Otra función que se le atribuye al CI-MPR es la internalización de granzima B, una serin proteasa involucrada en la apoptosis inducida por células T citotóxicas [52]. Otros ligandos del CI-MPR son el ácido retinoico y el “leukemia inhibitory factor” (LIF), un miembro de la familia de IL-6 [53]. Tanto el IGF II como el ácido retinoico han sido descritos como reguladores de la distribución celular del CI-MPR y del tráfico de enzimas lisosomales mediado por este receptor [54][55].

2.1.2.1.4. LOS MPRS EN CÁNCER

El CI-MPR es actualmente considerado un supresor tumoral ya que hay evidencias que demuestran que mutaciones que generan una pérdida de función en su gen están implicadas en la patogénesis de un amplio espectro de patologías malignas. Se han reportado las siguientes alteraciones en el gen del CI-MPR:

- Inestabilidad de microsatélites, lo que conduce a una disrupción del marco de lectura con el consecuente truncamiento de la proteína (en tumores gastrointestinales).
- Pérdida de heterocigosidad (LOH) (en cáncer de mama, tumores adrenocorticales, carcinoma hepatocelular, carcinoma de pulmón y tumores de cabeza y cuello). Esto está vinculado con el hecho de que el gen del CI-MPR posee un “imprinting” materno (se produce la metilación de residuos citosina del alelo heredado de la madre) [56]. Consecuentemente, cualquier modificación del único alelo expresado puede conducir a la pérdida de función del gen, de manera análoga a la pérdida de heterocigosidad de los genes supresores tumorales.
- Mutaciones somáticas del alelo remanente (en cáncer de mama y hepatocelular) [57].

Varios mecanismos estarían involucrados en la supresión tumoral mediada por este receptor:

- En primer lugar, el CI-MPR induce la internalización y degradación de varios factores promotores del crecimiento, tales como el IGF-II [58], LIF y algunas citoquinas que contienen M6P, como el factor estimulante de colonias macrofágico [53].
- En segundo lugar, limitaría el nivel de enzimas lisosomales secretadas responsables de la degradación de la matriz extracelular y de la diseminación tumoral [59].
- En tercer lugar, el CI-MPR se une al TGF β (un inhibidor de crecimiento) e incrementa su activación a través de una vía compleja que involucra al receptor del activador del plasminógeno tipo urokinasa (uPAR) [51].
- Por último, este receptor es necesario para el “binding” e internalización de granzima B y por lo tanto es esencial para la apoptosis de células blanco inducida por linfocitos T [52].

En tumores gastrointestinales, un defecto en la expresión del CI-MPR (pérdida alélica y mutaciones puntuales) se correlaciona con una concentración exacerbada del factor de supervivencia y mitogenicidad IGF-II, y con una concentración reducida del inhibidor del crecimiento TGF β activo [60].

2.1.2.2. Rutas Alternativas para el Transporte de Hidrolasas Ácidas

A pesar de que los MPRs tienen un rol preponderante en el transporte intracelular de las enzimas lisosomales recién sintetizadas, hay evidencias que sugieren la existencia de un mecanismo alternativo de transporte de las mismas. La evidencia más relevante proviene de estudios en células de pacientes con la enfermedad genética de "I-cell" o mucopolisacaridosis II. Estos individuos presentan mutaciones en el gen que codifica para la N-acetil-glucosaminofosfotransferasa, lo que resulta en una falta de fosforilación de los grupos manosa de las proenzimas lisosomales para formar M6P. Esta deficiencia conduce a una disminución de enzimas lisosomales en los tejidos y un aumento en la sangre, ya que las enzimas son secretadas en vez de ser conducidas a los lisosomas. [61][62][63]. La falta de enzimas en los lisosomas conduce a la acumulación de metabolitos dentro de ellos que forman cuerpos de inclusión. Sin embargo, en algunos tipos celulares de estos pacientes tales como los hepatocitos, las células de Kupffer y los linfocitos, se encontraron niveles normales de algunas hidrolasas ácidas y las mismas estaban localizadas en los lisosomas [64][65][66]. Una de las enzimas, la proteasa lisosomal CatD, era conducida normalmente a lisosomas, aun careciendo del residuo M6P, en una línea celular (derivada de linfoblastos de células B) de pacientes con la mencionada enfermedad [67]. Posteriormente, mediante el uso de proteínas quiméricas (CatD/pepsinógeno), se corroboró que una secuencia de la región carboxilo-terminal de CatD era necesaria y suficiente para la llegada de la enzima a lisosomas. Otras dos proteínas lisosomales, como las activadoras de esfingolípidos (SAPs), y GM2AP también son transportados normalmente a los lisosomas en los fibroblastos de los pacientes con la enfermedad de I-cell [66]. Todos estos hallazgos sugirieron que existían vías independientes de MPRs para el transporte de proteínas solubles a los lisosomas. En la búsqueda de esas vías, en los últimos años surgieron dos receptores alternativos: LIMP-2 y sortilina (Sort). LIMP-2 está

implicada en el transporte de la β -glucocerebrosidasa a los lisosomas [25]. La actividad de dicha enzima es defectuosa en pacientes con enfermedad de Gaucher, y mutaciones en el gen que codifica para su transportador, LIMP2, exacerban el fenotipo de estos pacientes [68]. Por otro lado, Sort es un receptor multifuncional capaz de unir diferentes ligandos, como neurotensina, prosaposina (PSAP), proteína activadora de GM2 (GM2AP), esfingomielinasa ácida (ASM) y catepsinas D y H [26].

2.1.2.2.1. SORTILINA

La sortilina fue descubierta en 1997 por Petersen y col. [69] quienes purificaron una glucoproteína de ≈ 95 kDa por cromatografía de afinidad, usando las proteínas RAP (ligando para sortilina) acopladas a matrices. Esta proteína fue denominada inicialmente gp95 y posteriormente sortilina, atribuyéndosele un PM de 100 kDa [70].

Sortilina es uno de los cinco miembros de la familia de receptores con dominio Vps10 (sortilina, SorLA, SorCS1, SorCS2 y SorCS3), frecuentemente encontrados en la región trans del Golgi y endosomas tempranos [71]. Estas proteínas se caracterizan por poseer un dominio luminal homólogo al receptor Vps10 (Vacuolar Protein Sorting 10 protein) de las levaduras y un pequeño dominio citoplasmático que contiene secuencias para su internalización y transporte intracelular [70]. A su vez, todas ellas son sintetizadas como pro-receptores y son funcionalmente activas luego del clivaje por la enzima proteolítica furina. De hecho, se ha probado que la sortilina recién sintetizada no puede unir sus ligandos al dominio Vps10 hasta que haya sido clivada por furina en el TGN[72].

Es importante mencionar que el dominio citoplasmático de sortilina es similar al de los MPRs ya que contiene motivos involucrados en el transporte desde el Golgi a los endosomas y viceversa, e interactúan con las mismas proteínas adaptadoras (GGAs y AP1) responsables del transporte anterógrado de los MPRs. Además, el reciclaje retrógrado de sortilina involucra la interacción con el complejo retromérico, del mismo modo que los MPRs [73]. Por otro lado, algunos indicios sugieren que la ruta de “sorting” de sortilina podría representar un mecanismo de transporte lisosomal aún más antiguo que aquél mediado por los MPRs. A pesar de que los MPRs son descritos usualmente como análogos al receptor Vps10 de levaduras, la sortilina comparte muchas más similitudes

con el Vps10 que los MPRs, ya que sortilina contienen el dominio Vps10, el cual está ausente en los MPRs [74]. Además, sortilina y Vps10 interactúan con sus ligandos a través de interacciones proteínicas, mientras que los MPRs reconocen sus ligandos a través de una cadena de oligosacáridos presente en los ligandos (residuos de M6P) [75][73].

Por lo tanto, aunque la vía mediada por los MPRs habría surgido como un mecanismo muy específico de “sorting” de hidrolasas lisosomales solubles, éste no sustituyó completamente el mecanismo mediado por sortilina, que retiene la capacidad de translocar diferentes proteínas cargo, entre las que se destacan prosaposina, GM2AP [76], esfingomielinasa ácida [21] y catepsinas D y H [26]. Por otro lado, aún no está claro por qué la célula necesita más de un mecanismo para dirigir las proteínas a los lisosomas, y si estos mecanismos son alternativos o simplemente redundantes.

2.1.2.2.1.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Sortilina, también llamada receptor de neurotensina-3 (NTR3), es una proteína de membrana tipo 1, perteneciente al grupo de receptores que no se acoplan a proteína G [70].

En humanos, sortilina es codificada por el gen SORT1, ubicado en el cromosoma 1p. Está formada por 833 aminoácidos, 44 de los cuales corresponden al pro-péptido. En la estructura del receptor maduro se pueden distinguir las siguientes regiones aminoacídicas (figura 6):

- Un dominio luminal
- Un dominio transmembrana
- Un dominio citoplasmático

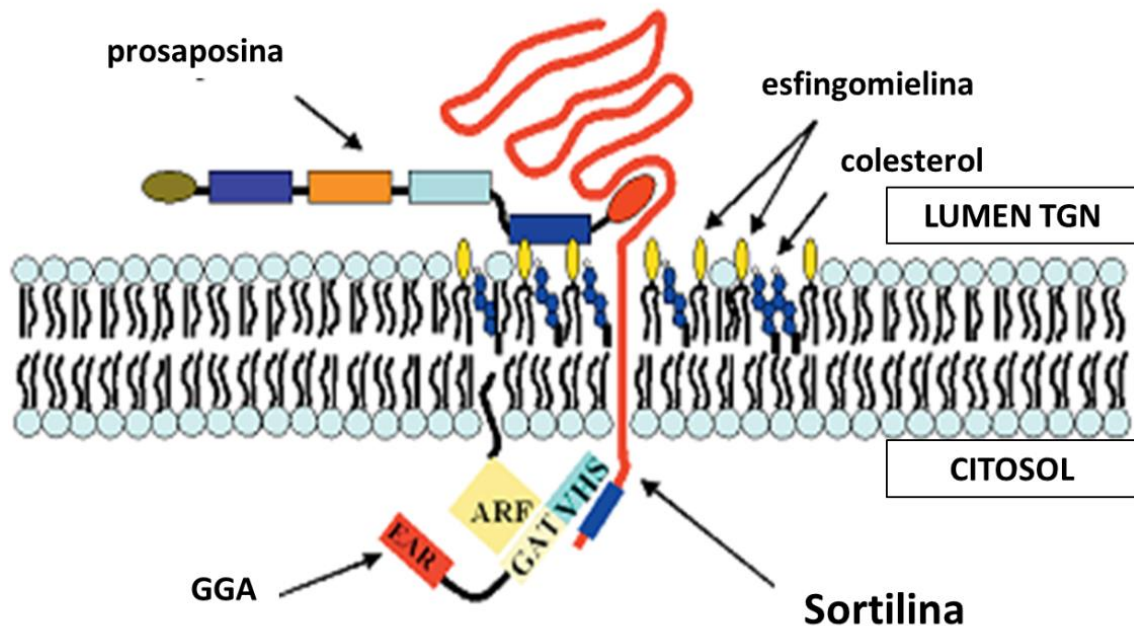


Figura 6: Sortilina. Esquema del receptor sortilina y su interacción con uno de sus principales ligandos: prosaposina. Se observan los dominios que interactúan con proteínas adaptadoras en el citoplasma. Modificado de [21].

2.1.2.2.1.2. SORTILINA. UNA PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL

A pesar de que sortilina es un receptor primitivo, durante el proceso evolutivo ha desarrollado funciones adicionales que están siendo gradualmente descubiertas. Sortilina tiene roles clave en varios procesos biológicos importantes, tales como: el metabolismo de la glucosa [77][78]; el metabolismo de lipoproteínas mediante su interacción con RAP, lipoprotein lipasa y apolipoproteína A-V; la proliferación y muerte neuronal [79]; la maduración de fagosomas [27]. Por otro lado, sortilina también interviene en procesos patológicos como las enfermedades neurodegenerativas, entre las cuales se encuentra la Enfermedad de Alzheimer [80] y el cáncer [81][82][83][84][85]. Sortilina parece ser una proteína multifacética, que podría asumir diferentes funciones dependiendo de las circunstancias.

Sortilina interviene entonces en los siguientes procesos intracelulares:

-“Sorting” intracelular: une las proteínas PSAP, GM2AP, catepsinas D y H [26] en el Golgi para conducir las hacia los endosomas-lisosomas [76][86].

-Endocitosis: de LpL (lipoprotein lipasa), NT (neurotensina) y Pro-NGF (precursor del factor de crecimiento nervioso) [87] [88].

-Señalización intracelular: forma un complejo con el receptor de Neurotensina I asociado a prot G en la membrana plasmática, modulando la señalización de neurotensina. También forma un complejo con el proNGF y el receptor de neurotrofina p75^{NTR} e induce apoptosis neuronal [88].

2.1.2.2.1.3. SORTILINA EN CÁNCER

Una característica intrigante de muchos cánceres humanos es la expresión de proteínas relacionadas con el sistema nervioso, tales como factores de crecimiento neurotróficos, moléculas de guía neuronal y receptores relacionados a la neurotransmisión. Esto probablemente esté vinculado al origen embriológico común que tienen las células epiteliales y las neuronas, ya que ambas se originan en el neuroectodermo [81].

Hasta el momento se han descrito algunas líneas celulares cancerígenas que expresan sortilina, cuyos niveles de expresión pueden afectar el fenotipo de dichas células. Entre ellas se mencionan células provenientes de cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, melanoma y cáncer de mama [81][82][83][84][85].

En la línea celular de cáncer de pulmón A 549, sortilina media la liberación y transferencia de exosomas [83]. En células de cáncer de próstata, sortilina parece regular la actividad estimuladora de progranulina sobre el crecimiento de las células tumorales [84]. A su vez, en células de melanoma, sortilina es co-receptor del pro factor de crecimiento nervioso (proNGF), actuando en cooperación con el receptor de neurotrofina p75^{NTR} para promover la invasión de las células tumorales [85] y en células de cáncer de mama, se ha demostrado que sortilina participa en la invasión celular inducida por proNGF a través de la cooperación con el receptor de tirosina kinasa TrkA [89].

Sin embargo, hay controversia con respecto al efecto que tendría sortilina sobre el crecimiento, invasión y metástasis tumoral. Mientras que Tanimoto y col. [84] proponen un efecto antitumoral, Roselli y col. [81] plantean un efecto pro-tumoral de sortilina.

2.1.3. La Secreción de Enzimas Lisosomales

Las enzimas lisosomales son proteínas que normalmente están confinadas a compartimientos intracelulares, principalmente en los lisosomas. Sin embargo se acepta que entre un 5-10% del contenido celular total de las mismas puede ser secretado, considerado como una secreción “basal”. Se desconoce aún si esta secreción es constitutiva o mediada por algún receptor y si hay algún factor que la estimule [90] [47]. Por otro lado, hay sistemas biológicos en los que la secreción de hidrolasas ácidas supera ampliamente este porcentaje, lo que ha sido motivo de estudios que tratan de explicar este fenómeno. Algunos ejemplos de células secretoras:

-Los osteoclastos son una de las pocas células con alta actividad secretora. En este caso se ha propuesto que el CI-MPR estaría involucrados en el transporte vectorial de las enzimas lisosomales recién sintetizadas hacia la membrana plasmática apical, para ser secretadas al compartimiento de resorción del hueso [90].

-Otro caso es el epitelio epididimario de los mamíferos, donde varias hidrolasas ácidas son secretadas al lumen para formar parte del fluido epididimario [91][92][93][94][95][96]. Aunque se ha descrito una probable influencia hormonal sobre el mecanismo de secreción epididimario, aún se desconocen las bases moleculares que conducen a tal secreción [97].

-Por otra parte, Chao y col. [47] demostraron que la sobreexpresión del CD-MPR en células BHK (provenientes de riñón de hámster) inducía la secreción de polipéptidos con residuos de M6P, entre ellos los precursores de arilsulfatasa A y β -hexosaminidasa. Dicha secreción disminuía drásticamente al bloquear los sitios “binding” del CD-MPR con anticuerpos anti-CDMPR. A su vez, los autores propusieron que la secreción incrementada de las enzimas sería consecuencia de un desbalance entre el CD-MPR y el CI-MPR. Esto fue sustentado por el hecho de que una sobreexpresión del CD-MPR, incrementaba la secreción de enzimas y este efecto era revertido por la coexpresión del CI-MPR. Por lo tanto, propusieron que el CD-MPR no sólo mediaría el transporte de proteínas lisosomales, sino también su secreción. Debido a que las enzimas eran secretadas como pro-enzimas, se sugirió que los endosomas tempranos o la superficie celular serían los sitios más probables de disociación de los complejos ligando-CD-MPR. Como ya hemos mencionado, los CD-MPR presentes en la membrana plasmática de las células no

participan en la endocitosis de ligandos fosfomanosilados [50]. Por último los autores plantearon que los complejos ligando-CD-MPR alcanzarían la superficie celular en forma directa (a través de una ruta intracelular diferente a la que conduce los complejos a los lisosomas) o en forma indirecta, vía endosomas tempranos.

- Muchas células cancerígenas sobreexpresan y secretan elevadas concentraciones de enzimas lisosomales, entre ellas catepsinas L, B y D [98][99].

Entre las enzimas lisosomales que pueden ser secretadas, la CatD adquiere gran relevancia en muchos procesos fisiológicos y patológicos. Hay evidencia que sugiere que la secreción de la forma precursora de CatD (proCatD) es mediada por el CD-MPR en algunos tipos celulares [100].

Esta enzima y su transporte son uno de los objetivos de este trabajo de tesis por lo que a continuación describiremos algunos aspectos de esta proteasa.

2.1.4. Catepsina D. Una proteasa multifuncional

Desde su descubrimiento como hidrolasa de tipo lisosomal [101][102], la CatD ha sido objeto de intensos estudios por numerosos grupos científicos. Esto ha llevado a conocer su estructura, su ruta biosintética, y las proteínas que la acompañan en el contexto de su función como una proteína constitutiva. Sin embargo, en las últimas dos décadas la CatD ha emergido como una enzima multifuncional, involucrada en muchos otros procesos biológicos, más allá de su rol original. La CatD es responsable de clivajes selectivos y limitados (a diferencia de la degradación proteica no-específica) de sustratos vitales para el correcto funcionamiento subcelular. Estos eventos proteolíticos son críticos en el control de procesos biológicos, tales como la progresión del ciclo celular, la diferenciación, la migración celular, la morfogénesis y remodelación tisular, los procesos inmunológicos, la ovulación, la fertilización, el crecimiento neuronal, la angiogénesis y la apoptosis. En consistencia con la relevancia biológica de CatD, su regulación alterada o modificaciones post-traduccionales deficientes conllevan a condiciones patológicas importantes, como el cáncer, la aterosclerosis o patologías neurológicas y cutáneas. Específicamente, alteraciones en su síntesis, modificaciones post-traduccionales

incorrectas e hipersecreción de CatD, junto con sus efectos mitogénicos, son “hallmarks” establecidos del cáncer.

2.1.4.1. TRANSCRIPCIÓN GÉNICA DE CATEPSINA D Y SU REGULACIÓN

En humanos, el gen de catepsina D contiene 9 exones y está localizado en el cromosoma 11p15 [103]. La región del promotor contiene múltiples islas CpG y secuencias TATA, lo que le confiere la característica de promotor mixto. Debido a esta estructura mixta, el promotor puede dirigir dos tipos de transcripción: una transcripción “TATA-independiente”, que comienza en varios sitios corriente arriba de la caja TATA (dirigida por islas CpG y el factor Sp1); y una transcripción TATA-dependiente, que inicia 28 pares de base corriente abajo de la caja TATA (figura 7) [104].

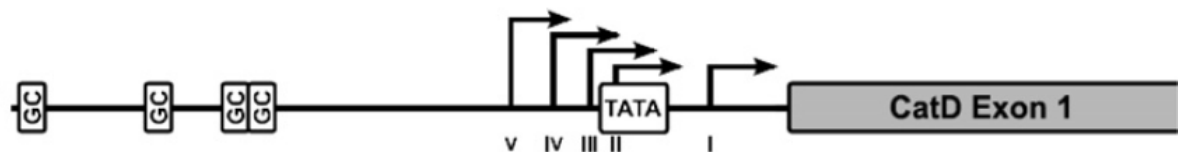


Figura 7: Representación esquemática de la región promotora del gen de catepsina D.

Las secuencias TATA y GC están representadas por rectángulos y cuadrados, respectivamente. Cinco sitios de inicio de transcripción (SIT-I a -V) están indicados por flechas. Modificado de N. Zaidi y col [105].

La región TATA-independiente es la que le confiere las propiedades de gen “house keeping”, mientras que la región TATA-dependiente es característica de genes regulados, pudiendo ser inducida bajo condiciones fisiológicas específicas (e.g. durante el desarrollo y remodelado tisular). En este contexto, la expresión constitutiva de CatD en humanos es TATA-independiente, y su transcripción puede comenzar en alguno de los sitios de inicio de transcripción ubicados corriente arriba de la caja TATA (SIT-II a -V). Sin embargo, en ciertos tejidos la expresión de catepsina D es inducida. Este es el caso de las células tumorales mamarias humanas donde la expresión de catepsina D es inducida por estrógenos [106]. En este caso la transcripción del gen es TATA-dependiente, iniciando 28 pares de base corriente abajo de la caja TATA (SIT-I) [106][107]. Por otro lado, ciertos factores de crecimiento, como la insulina, IGF-I, TGF- α y EGF, también inciden en la

transcripción del gen, induciendo la síntesis del ARNm de CatD [108]. Todo esto demuestra la complejidad del mecanismo que regula la transcripción del gen de catepsina D.

2.1.4.2. ESTRUCTURA, SÍNTESIS Y LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE CATEPSINA D

La catepsina D es una proteinasa aspártica intracelular de la superfamilia de la pepsina. Está presente en todas las células de mamíferos, tiene una localización lisosomal típica y es la enzima proteolítica predominante en este tipo de compartimientos [109].

La CatD es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso (RER) como una pre-pro-enzima (preprocatepsina D -preproCatD-) de 412 aa, incluidos los 20aa de un péptido señal[110]. Este péptido señal es removido en el RER, generándose una procatepsina D (proCatD) de \approx 52 kDa, la cual es proteolíticamente inactiva [111]. A continuación, esta proenzima es glicosilada en los residuos asparragina N134 y N263 (preproCatD numbering, UniProtKB/*Swiss-Prot*) y posteriormente transportada al Golgi. Allí, los oligosacáridos son modificados covalentemente y sus residuos de manosa son fosforilados en la posición seis. Como ocurre con otras enzimas lisosomales (descrito en el ítem 2.1.2) estos residuos de M6P son reconocidos por los receptores a manosa-6-fosfato CI-MPR y CD-MPR, en el TGN [42]. Desde allí, esta hidrolasa lisosomal y otras enzimas son segregadas en vesículas para ser transportadas selectivamente a los endosomas tardíos y lisosomas. Por lo tanto, a pesar de que la glicosilación de CatD no tiene efectos en su plegamiento ni en su actividad enzimática, juega un papel muy importante porque permite su correcto transporte al compartimiento lisosomal.

La segunda vía de transporte de pro-CatD al compartimiento endosomal es independiente de M6P. La misma involucra a sortilina [112], y será descrita posteriormente.

2.1.4.3. PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO Y MADURACIÓN DE CATEPSINA D

Una vez segregada en los compartimientos endolisosomales, la proCatD es sometida a varios procesamientos proteolíticos consecutivos hasta generar la CatD madura de doble cadena. En primer lugar, la pro-CatD (52 kDa) se disocia de los MPRs en los endosomas tardíos, gracias al pH ácido de ese compartimiento, y subsecuentemente

el grupo fosfato es removido. Luego, se escinde el propéptido de pro-Cat D (también llamado “péptido de activación”), generándose una forma intermedia de cadena simple (≈ 48 kDa), la cual es catalíticamente activa [113]. La remoción de dicho propéptido es mediada por proteasas cisteínicas, tales como catepsina L y catepsina B [114]. La forma intermedia de CatD es ulteriormente procesada, por las mismas proteasas, a la forma madura de doble cadena. Esta forma consta de una cadena liviana amino-terminal (≈ 14 kDa) y una cadena pesada carboxi-terminal (≈ 33 kDa), que se mantienen asociadas mediante interacciones hidrofóbicas [114][115] (figura 8). También es posible que la proCatD sea procesada autocatalíticamente, originando una forma intermedia enzimáticamente activa llamada pseudocatepsina D. Sin embargo, el procesamiento autocatalítico es incapaz de autoactivar la proenzima a su forma madura [116].

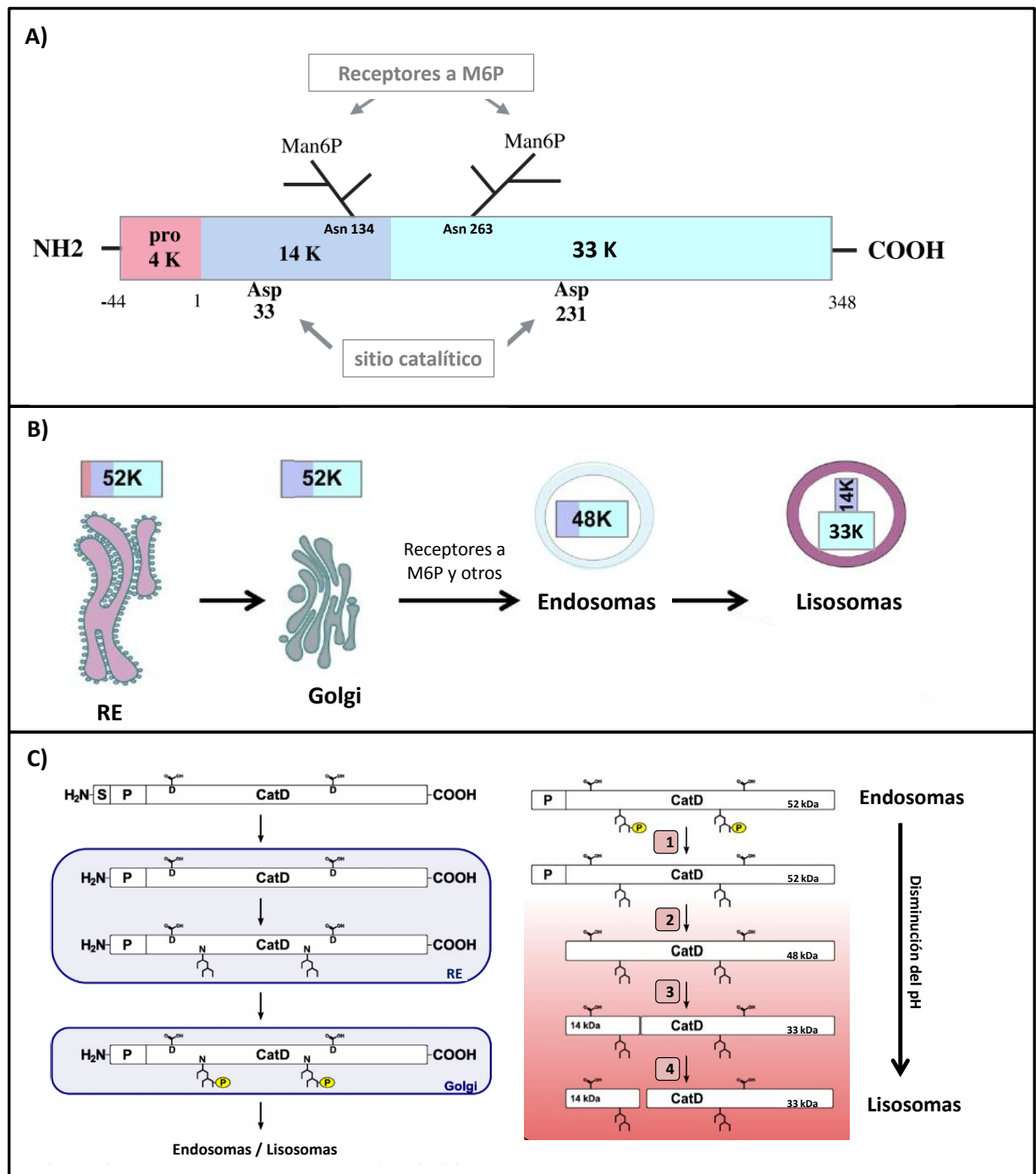


Figura 8: Procesamiento y maduración de catepsina D.

A) Representación esquemática de la secuencia de la catepsina D humana de 52 kDa. Se indican las localizaciones del profragmento de 4 kDa y de las cadenas pesada y liviana de 33 y 14 kDa, respectivamente. La forma intermedia de 48 kDa corresponde a las cadenas de 14 y 33 kDa no clivadas. Se muestra la posición de los dos ácidos aspárticos del sitio catalítico, y de las dos cadenas glicosiladas que contienen M6P. **B)** Procesamiento de catepsina D en los distintos compartimientos. **C)** Modificaciones post-traduccionales y principales eventos proteolíticos de catepsina D. En el RER se sintetiza CatD como una preproenzima. Durante su traslocación, se produce la remoción del péptido señal (S), originándose

procatepsina D (52 kDa). En el RE también se adicionan azúcares en los sitios de N-glicosilación ubicados en residuos asparragina N134 y N263. En el Golgi, se produce la fosforilación de los residuos de manosa en la posición 6. Estas marcas de M6P son reconocidas por MPRs en el TGN, permitiendo la segregación de la hidrolasa lisosomal en vesículas que se fusionan con endosomas. Una vez en los compartimientos ácidos, (específicamente en endosomas tardíos) la proenzima atraviesa los siguientes eventos (números en la imagen), desde los endosomas a los lisosomas: 1) Disociación del complejo proCatD-receptor inducida por el bajo pH, y subsecuente remoción del grupo fosfato. 2) Escisión del propéptido, generándose una forma intermedia de simple cadena (48 kDa, 348aa), enzimáticamente activa. 3) Procesamiento de la forma intermedia de CatD a su forma madura de doble cadena. 4) Remoción de 7 aa ubicados entre las cadenas pesada y liviana. Modificado de N. Zaidi y col. y de O. Masson y col. [105] [117].

2.1.4.4. LA SECRECIÓN DE CATEPSINA D

En condiciones fisiológicas, la catepsina D es una enzima confinada a lisosomas y sólo una mínima fracción de su forma inmadura (proCatD) es secretada. Esta secreción ha sido vinculada al proceso de cicatrización de heridas y remodelación tisular [118] y también se ha detectado la presencia de proCatD en fluidos biológicos humanos, tales como sangre y leche [119][120].

En la glándula mamaria, la proCatD es secretada principalmente en la superficie apical de las células. Esta liberación apical varía considerablemente entre los diferentes estadios del desarrollo mamario, con una máxima secreción durante la lactancia temprana [121]. Sin embargo, se desconocen aún los mecanismos de transporte y secreción de la proenzima a la leche.

Por otro lado, también se ha descrito la liberación basolateral de la forma intermedia de la catepsina D (IntCatD). Esta liberación ocurre en la glándula mamaria lactante y es inducida por la hormona prolactina (PRL). La enzima liberada, que es catalíticamente activa aún a pH fisiológico, produce el clivaje de la PRL, generando un fragmento biológicamente activo de la hormona de 16 kDa [122] (figura 9). Este fragmento ha recibido considerable atención en los últimos años debido a su potente efecto inhibidor de la angiogénesis [123] [124]. Para evitar los efectos catalíticos adversos de IntCatD sobre la membrana basal y/o la matriz extracelular, la liberación basal de la enzima en la glándula mamaria lactante debe estar finamente regulada, a tal punto que,

durante la lactancia, está reprimida la expresión de las proteasas que degradan la matriz extracelular [125].

La liberación apical y basal de catepsina D por células epiteliales mamarias podría responder a mecanismos de señalización distintos, que aún deben ser dilucidados. Aparentemente el transporte y la secreción basolateral de IntCatD estarían siendo regulados por PRL, y, en este caso, la función de la hidrolasa estaría vinculada al clivaje de la PRL. Sin embargo, se desconoce la relevancia fisiológica de la proCatD secretada apicalmente, así como su mecanismo de transporte y secreción hacia la leche.

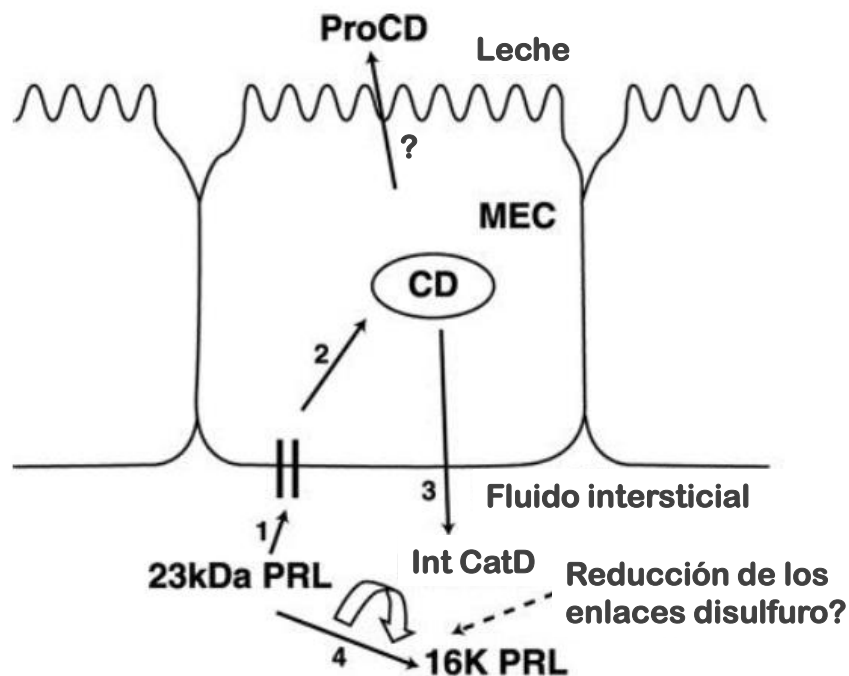


Figura 9: Modelo de la regulación del transporte de catepsina D a la región basal del acino mamario. La PRL plasmática (23 kDa) se une a su receptor (líneas negras) en la membrana basolateral de las células epiteliales mamarias (MEC) (1) e incrementa tanto el transporte de vesículas conteniendo CatD a la región basal de la célula, como la secreción de la forma intermedia de CatD (IntCatD) al medio extracelular a través del lado basolateral de las células (2 y 3). Una vez secretada en el fluido intersticial, esta forma intermedia de CatD, podría clivar una parte de la PRL plasmática (4). Dependiendo de una posible reducción de enlaces disulfuro, una pequeña cantidad de PRL de 16 kDa podría ser liberada localmente. Modificado de [126].

2.1.4.5. LA INTERACCIÓN DE CATEPSINA D CON OTRAS PROTEÍNAS (PROSAPOSINA)

Está demostrado que procatepsina D forma un complejo con prosaposina (PSAP), y que ambas proteínas son transportadas por el receptor sortilina, el cual cicla entre el TGN y los compartimientos endosomales, de un modo similar a los MPRs [26]. Aparentemente la interacción de proCat D con PSAP ocurriría en el RER, inmediatamente después de su síntesis. Una vez en el Golgi, el complejo se asociaría a la membrana a través de sortilina (independiente de M6P) [76]. También es posible que los complejos PSAP-proCatD sean secretados al espacio extracelular [127].

Por otro lado se ha comprobado que CatD participa en el procesamiento de PSAP, y que PSAP acelera la activación de Cat D, estimulando su actividad catalítica [128].

2.1.4.5.1. CARÁCTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE PSAP

La prosaposina es una glicoproteína multifuncional ya que es la precursora de cuatro proteínas activadoras de esfingolípidos no-enzimáticas (saposinas), necesarias para la hidrólisis de esfingolípidos [129] y además presenta actividad neurotrófica. Con respecto a esta última función, PSAP participa en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central y periférico, en la regeneración y plasticidad neuronal, en la estimulación de neuritas, y en la proliferación de células de neuroblastoma y otorga protección de la muerte celular o apoptosis [130][131].

Se ha comprobado que mutaciones en el gen de prosaposina resultan en severos desórdenes por depósito de material en los lisosomas, como una variante de la enfermedad de Gaucher [132].

La prosaposina es sintetizada en el RE como una proteína de 53 kDa y modificada postraduccionalmente a una forma de 65 kDa después de la adición de alta manosa [133][134]. Posteriormente esta forma se asocia a la membrana del aparato de Golgi (aparentemente en la región cis), desde donde es seleccionada y conducida a lisosomas [135]. El receptor que media el transporte de la PSAP monomérica es sortilina. Sin embargo, hay moléculas de PSAP que continúan su tránsito por el Golgi y llegan al TGN, donde son glicosiladas adicionalmente a formas de 70 kDa. Éstas formas adquieren capacidad de formar oligómeros que son posteriormente secretados, y se pueden encontrar en varios fluidos tales como leche, secreción pancreática, fluido de túbulo seminíferos y fluido cerebroespinal [86] [135] (figura 10).

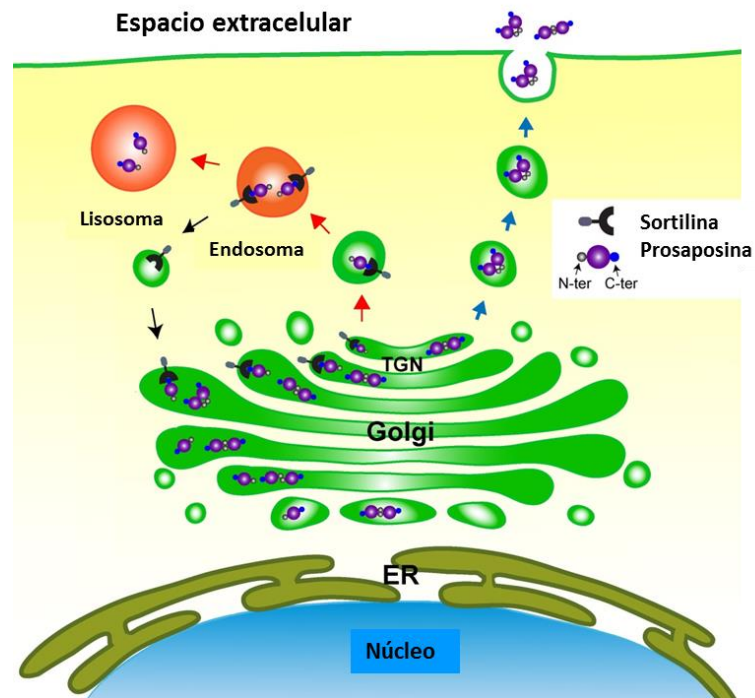


Figura 10: Prosaposina monomérica y oligomérica

La PSAP de 65 kDa se une por su región C-terminal a sortilina para ser conducida a endosomas, y luego a lisosomas. El pH ácido de los endosomas (≈ 5.5) induce la disociación del complejo ligando-receptor, por lo cual sortilina recicla al Golgi. Por otro lado, hay moléculas de PSAP que no se unen a sortilina y forman oligómeros, los cuales son secretados por las células. Modificada de L. Yuan y col. [127].

2.1.4.6. CATEPSINA D Y CÁNCER

Como ya se ha mencionado, la catepsina D es sobreexpresada e hipersecretada por varios tipos de tumores malignos, entre ellos cáncer de mama, ovario, próstata, pulmón, endometrio, cabeza y cuello, vejiga y melanoma [136][137][138]. El concepto de que catepsina D está involucrada en el cáncer de mama fue introducido por primera vez en un modelo de carcinoma mamario en rata, inducido por 3-methylcholanthrene (o 7,12-dimethylbenz[a] anthracene)[139]. Sin embargo, la significancia de estos hallazgos fue valorizada recién en la década de los 80' cuando se estableció la relación entre catepsina D y el cáncer de mama humano [140] [141]. Estudios clínicos independientes demostraron que la sobreexpresión de CatD se correlaciona con un mayor riesgo de metástasis clínica y una baja supervivencia en cáncer de mama [142][143][144]. Además, se

observó un aumento en los niveles plasmáticos de procatD en pacientes con metástasis de carcinoma mamario [145].

En aquellas líneas celulares tumorigénicas mamarias sensibles a estrógenos (positivas para receptores estrogénicos -RE-), la Cat D es sobreexpresada en respuesta a β -estradiol y a factores de crecimiento, tales como IGF1, EGF, insulina, entre otros [146]. En cambio, en las líneas celulares tumorigénicas mamarias negativas para receptores estrogénicos, la CatD está sobreexpresada constitutivamente. El mecanismo por el cual la enzima es sobreexpresada en estas líneas celulares podría involucrar una reorganización local de la cromatina donde se encuentra el promotor de CatD [147].

Por otro lado, se han descrito patrones de glicosilación diferentes en algunas proteínas de las líneas celulares tumorigénicas mamarias, específicamente en la proCatD secretada [104]. De este modo, las estructuras de N-glicanos en el tumor y suero de pacientes con cáncer de mama (y otros tipos de cáncer) son diferentes de las del tejido normal [148]. Sin embargo, la implicancia de las alteraciones en la glicosilación en el transporte y/o secreción de catepsina D aún no ha sido establecidas [104].

Se ha demostrado que la secreción de procatepsina D por células tumorales afecta múltiples etapas de la progresión tumoral, incluyendo la proliferación [149], angiogénesis [150] y metástasis [151].

2.1.4.6.1. LA CATEPSINA D Y OTRAS PROTEASAS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL

La progresión tumoral es un proceso que implica una serie de pasos que van desde múltiples alteraciones de una célula normal que conducen a la formación de un tumor localizado hasta la adquisición de la habilidad para invadir y metastatizar. La invasión tumoral implica la adherencia de las células tumorales a la membrana basal subyacente, seguida de la proteólisis local y migración de las células tumorales a través de las regiones modificadas proteolíticamente [152]. Luego, para que una célula metastatice, debe ser capaz de introducirse en la vasculatura (intravasación), sobrevivir en el torrente circulatorio, detenerse para salir de la vasculatura (extravasación), invadir el tejido circundante y proliferar (figura 11). Todos estos pasos involucran la interacción de las células tumorales con las células estromales, las células del sistema inmunitario y la

matriz extracelular. Se cree que las proteasas expresadas por todas estas células participan en algunas de las etapas mencionadas [153][150].

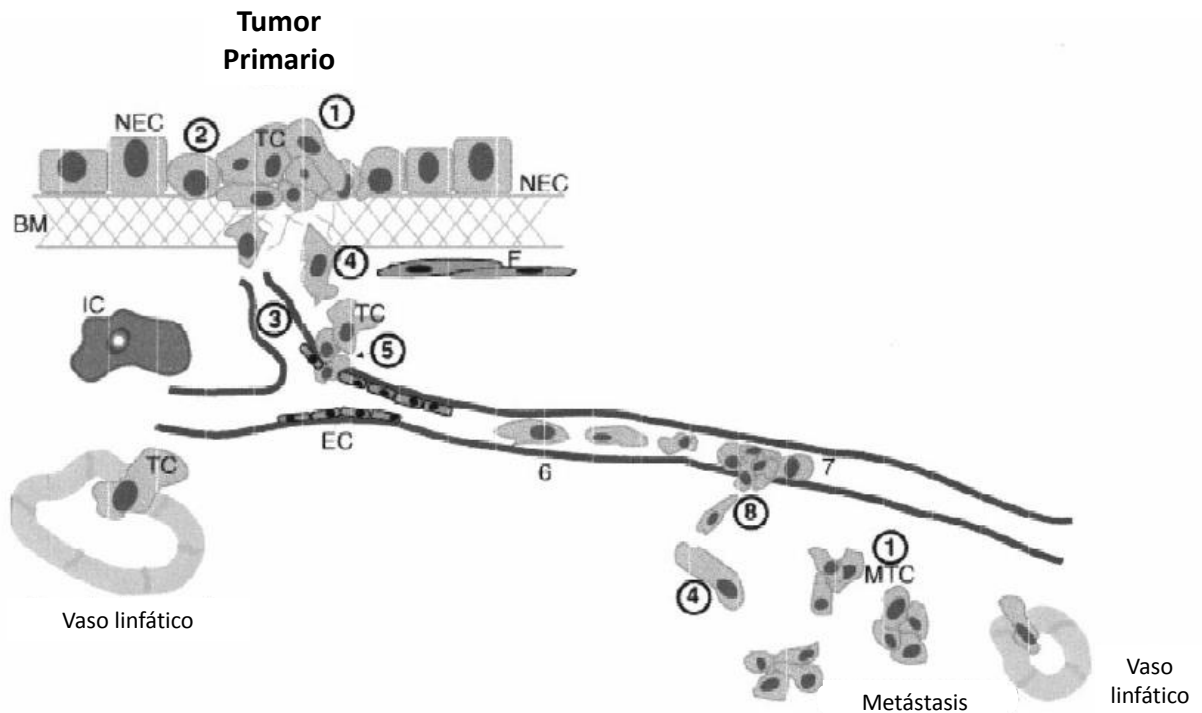


Figura 11: El rol de las proteasas en el proceso metastásico.

(1) Las células epiteliales normales (NEC) se transforman, conduciendo a la formación y crecimiento tumoral. **(2)** Las células tumorales (TC) experimentan transformación epitelio-mesenquimal. **(3)** Las células endoteliales (EC) proliferan e invaden la zona tumoral, lo que conduce a la formación de neovasos (angiogénesis). **(4)** Las TC invaden el tejido conectivo. **(5)** Las TC se intravascan. **(6)** Las TC sobreviven en la circulación, **(6)** se adhieren, **(7)** extravasan, **(8)** e invaden el microambiente local. **(4)** Proliferación en el nuevo microambiente. **(1)** Establecimiento de la metástasis (MTC: células tumorales metastásicas). Estos pasos metastásicos ocurren a través de la interacción de TC, EC, fibroblastos (F), células inflamatorias (IC), tales como macrófagos, y matriz extracelular. Los pasos donde se cree que participan las proteasas se muestran en negrita. Modificada de J. Koblinski y col. [154].

En la proteólisis local, las proteasas que se encuentran unidas a la superficie celular [155] y/o las que son secretadas desde las células tumorales, son las protagonistas. Por ejemplo, la catepsina B, que es activa contra una gran cantidad de sustratos tales como laminina, fibronectina y colágeno tipo IV, en condiciones de pH fisiológico y a 37°C, puede degradar componentes de la matriz extracelular fuera de la

célula [156] [157]. En este contexto cabe aclarar que el pH del microambiente tumoral es generalmente más ácido que el del tejido normal [158]. Montcourrier y cols [159] encontraron que las células tumorigénicas mamarias pueden liberar protones al medio extracelular a través de la producción de ácido láctico y la activación de bombas H⁺/ATPasas en la membrana plasmática, pudiendo reducir el pH extracelular a valores de 5.5. De este modo, las células tumorales podrían activar la procatepsina B a través de la acidificación del microambiente tumoral.

Por otro lado, hay evidencia que demuestra que en la proteólisis local también participan las proteasas intracelulares de las células tumorales. En este caso lo harían mediante la digestión de matriz extracelular internalizándola por endocitosis. Coopman y col [160] han mostrado una correlación entre la habilidad invasiva de diferentes líneas celulares tumorigénicas y la capacidad para fagocitar la matriz extracelular. Otro estudio revela que grandes vesículas ácidas, identificadas como heterofagosomas [161] son más abundantes en las células tumorigénicas mamarias con mayor capacidad migratoria a través de Matrigel® [162]. Estas grandes vesículas ácidas pueden contener y digerir matriz extracelular. Además, los heterofagosomas contienen catepsina D madura y han sido vistos en células tumorigénicas mamarias humanas *in vivo* [161] [162] [163], y en líneas celulares tumorigénicas mamarias [154].

La mayoría de los investigadores han enfocado sus estudios en el rol de las proteasas en los pasos finales de la progresión tumoral: la invasión y metástasis. Sin embargo, hay estudios que indican que las mismas están involucradas tempranamente en la progresión tumoral: en el crecimiento tumoral, tanto en el sitio primario como en el metastático [164].

2.1.4.6.2. CATEPSINA D Y SUS EFECTOS PROTUMORALES

Varios estudios han reportado que la catepsina D estimula la proliferación de los tumores e incrementa su potencial metastático ([165][166][167][168]. En la búsqueda de los mecanismos moleculares que subyacen a estos efectos protumorales, se ha demostrado que varios de ellos estarían mediados por la actividad catalítica de la enzima. Entre estos, hay quienes sostienen que CatD es una de las principales responsables de la

excesiva degradación de la membrana basal y matriz extracelular que ocurre en los tumores [169]. En este contexto se ha reportado que la CatD produciría la proteólisis de cistatina C, una pequeña proteína ubicuamente expresada en casi todos los fluidos corporales y considerada el más potente inhibidor endógeno extracelular de catepsinas cisteínicas. Por lo tanto, la ausencia de cistatina C conduciría a una mayor actividad proteolítica extracelular de las catepsinas cisteínicas, con la consecuente degradación de la matriz extracelular [170]. También se ha sugerido que la catepsina D secretada podría estar implicada en la liberación de factores de crecimiento desde la matriz extracelular, tales como el FGF2 (“fibroblast growth factor 2” o factor de crecimiento fibroblástico) [171]. Otros autores proponen que la catepsina D intracelular estimula el crecimiento de las células tumorales mediante la inactivación de ciertos inhibidores del crecimiento, tales como la hsp70 constitutiva (“heat shock cognate 70 protein”) [172][173]. Por otro lado, se ha vinculado a la enzima con una inhibición de la respuesta immune antitumoral mediante la degradación enzimática de ciertas citoquinas proinflamatorias [174]. Sin embargo, aún permanece el interrogante si el microambiente del tumor (más ácido que el de tejidos normales) [158], es suficiente para generar las condiciones necesarias para que la procatepsina D secretada pueda auto-activarse extracelularmente a pseudo-catepsina D (catalíticamente activa) [175].

A pesar de que varios de estudios han sugerido que el potencial metastásico de la catepsina D depende de su actividad catalítica, algunos autores han propuesto que habría efectos protumorales independientes de dicha actividad [166]. Específicamente se ha documentado que la procatepsina D secretada por las células tumorales funciona como un factor de crecimiento autócrino y parácrino [176] y que dicha función mitogénica es mediada por el propéptido o péptido de activación de la procatepsina D, ya que tiene efectos proliferativos aún en presencia de pepstatina A (un inhibidor de la actividad enzimática de catepsina D) [177]. Además, se ha observado que el péptido de activación de CatD está involucrado en la unión de la proCatD a receptores de la superficie de células tumorales aún no identificados [178]. También se ha reportado que la región del propéptido entre los aminoácidos 27 y 44 es esencial para la actividad mitogénica de procatepsina D sobre las células tumorales mamarias [165]. En cuanto a su función mitogénica parácrina, la catepsina D estimularía el crecimiento de fibroblastos, el principal tipo celular del compartimiento estromal y estimularía la angiogénesis tumoral

[150][179]. Por último, hay autores que proponen que la procatepsina D secretada actuaría como un mitógeno a través de la competencia con el IGF-II por la interacción con el receptor a manosa-6-fosfato CI-MPR. Así, el IGF-II sería desplazado y se uniría al receptor para IGF-I, resultando en la activación de la vía mitogénica mediada por este último receptor [180] [181].

2.1.4.6.3. LAS INTERACCIONES TUMOR-ESTROMA REGULAN LA EXPRESIÓN DE PROTEASAS

Es importante destacar que las células tumorales son apenas una parte del microambiente tumoral. Por ello, el papel del estroma y de las células estromales en el cáncer es cada vez más estudiado. Numerosos estudios histológicos de tejido tumoral vinculan a las células estromales con el proceso de malignización [17] [16]. En este contexto, se ha descrito que interacciones directas e indirectas entre las células tumorales y las estromales pueden aumentar la expresión de las proteasas in vitro. Puntualmente, la expresión de ciertas metaloproteinasas de matriz, como las gelatinasas A y B, está incrementada en fibroblastos a través del contacto directo con las células tumorales [182]. Estos fibroblastos pueden entonces participar en la degradación de la matriz. Por otro lado, la regulación en la expresión de proteasas por las interacciones tumor-estroma también puede ser indirecta, involucrando a ciertos factores difundibles. De este modo algunos factores de crecimiento como el FGF, EGF, IGF-1 e insulina incrementan la expresión de catepsina D en las células tumorigénicas mamarias MCF-7 [183].

2.1.4.6.4. LA SECRECIÓN DE CATEPSINA D POR CÉLULAS TUMORALES. ¿REGULADA O POR DEFECTO?

Como se ha dicho anteriormente, muchas células tumorigénicas mamarias y colorectales secretan cantidades incrementadas de procatepsina D al espacio extracelular, contribuyendo al potencial metastásico e invasivo de las células cancerígenas [154] [184] (figura 12). Para explicar este fenómeno, se han propuesto varias hipótesis;

- Un defecto en la acidificación de los compartimientos endosomales en células tumorales. Esto imposibilitaría el procesamiento de la enzima y el reciclaje de los receptores que la

transportan, acumulándose proCatD en el TGN, lo que conduciría a la secreción de la enzima por defecto [185].

- Una disminución en la expresión del CI-MPR, en respuesta al estradiol, con la consecuente saturación del receptor y posterior secreción por defecto [186].
- Una pérdida de heterocigosidad del gen del CI-MPR lo que conduciría a un menor "binding" de la enzima con el receptor y con ello a un redireccionamiento hacia la vía secretora, por un mecanismo de defecto [187].
- Secreción de Cat D madura directamente desde vesículas pericelulares [188].
- También se propone que la hipersecreción sea una consecuencia directa de la sobreexpresión de la enzima en células tumorales, inducida por la sobreexpresión del receptor estrogénico α [189], o bien por una sobreexpresión constitutiva [176].

Sin embargo, hasta ahora no hay una explicación satisfactoria que permita conocer el mecanismo de secreción de procatepsina D por las células cancerígenas [105].

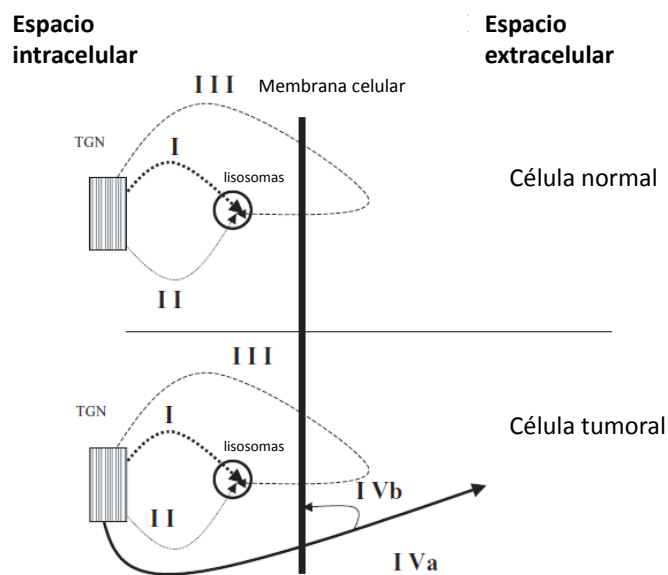


Figura 12: Transporte de catepsina D en células normales y tumorales.

En las células normales, la proCatD es transportada por los MPRs (ruta I) o de forma independiente de MPRs (ruta II) a compartimentos prelisosomales ácidos, y desde allí es conducida a lisosomas. Un pequeño porcentaje de la enzima puede ser secretado por la célula, pero es endocitado gracias al CI-MPR (ruta III). En el caso de las células tumorales, hay una gran cantidad de proCatD que es secretada. Esta proenzima puede actuar como un factor mitogénico autócrino (ruta IVb) o parácrino (ruta Va). Modificado de M. Fusek y V. Vetvicka [190].

Así, el tráfico intracelular de CatD y el procesamiento proteolítico de proCatD son temas cruciales en la biología y en la medicina. La importancia del transporte intracelular de CatD recae en el hecho de que la llegada de la enzima a lisosomas es crítica para su función proteolítica normal. Cualquier mal direccionamiento de la enzima puede estar asociado a condiciones atípicas para las células y los organismos. Por ejemplo, la traslocación de CatD desde lisosomas al citosol está asociada con apoptosis [191] y la secreción incrementada de CatD al espacio extracelular por las células tumorales contribuye al potencial metastático e invasivo de estas células [154] [184].

2.1.4.6.5. LA CATEPSINA D COMO POSIBLE BLANCO MOLECULAR EN LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER

Teniendo en cuenta la importancia que puede tener esta enzima en el desarrollo de tumores, se han buscado diferentes maneras de neutralizar su acción:

2.1.4.6.5.1. INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

En estos últimos 10 años, ha ido aumentando el interés por desarrollar inhibidores potentes de varias peptidasas aspárticas, ante la creciente evidencia de la intervención de estas enzimas en enfermedades humanas [192], tales como la renina en la hipertensión arterial [193], la γ -secretasa en la enfermedad de Alzheimer [194] y peptidasas aspárticas en las infecciones por *Candida* [195], entre otras. Contrariamente a otras proteinasas (como por ej las serin proteasas, metaloproteinasas o catepsinas cisteínicas), no se conoce ningún inhibidor endógeno lisosomal ni citoplasmático para la enzima CatD en los mamíferos. Cuando la CatD es liberada al plasma, es inactivada por su interacción con α 2-macroglobulina a pH neutro, pero no a pH ácido [196]. En células normales, la CatD sólo es activa en compartimientos ácidos intracelulares, y por lo tanto, las células están protegidas de una proteólisis descontrolada. En cáncer, en cambio, la CatD es hipersecretada al microambiente tumoral ácido por lo que puede tener un profundo efecto sobre el remodelado de la matriz o la proteólisis de factores extracelulares. La mayoría de los inhibidores de CatD conocidos hasta ahora son péptidos y polipéptidos producidos por microorganismos, plantas y animales inferiores [197]. El polipéptido inhibidor más potente de proteasas aspárticas es la pepstatina A, que es producida por

varias especies de *Actinomyces* [198]. Algunos estudios han mostrado que la administración de pepstatina A *in vivo* induce una significativa reducción de las metástasis, aunque todavía es controvertido [199]. También se han descrito tripéptidos inhibidores de CatD que contienen análogos de estatinas (Rocheft 1999), polipéptidos inhibidores producidos por plantas, como las hojas de tomate y las raíces de papa [200] e inhibidores producidos por animales inferiores, tales como equistatina producida por *Actinia equina* [201].

2.1.4.6.5.2. INHIBIDORES DE LA INTERACCION DE CATEPSINA D CON OTRAS PROTEÍNAS

La CatD también puede actuar independientemente de su actividad catalítica (interaccionando con otras proteínas). En este contexto, se han publicado estudios donde se refiere que anticuerpos anti procatepsina D, dirigidos contra los péptidos 27-44 del profragmento de la enzima, revertirían el crecimiento de tumores mamarios humanos en ratones [202].

2.1.4.5.5.3. SUSTRATOS DE CATEPSINA D EN CÁNCER

El descubrimiento de nuevos sustratos fisiológicos de catepsina D probablemente genere nuevos blancos críticos para la terapia contra el cáncer. La catepsina D cliva preferencialmente uniones -Phe-Phe-, -Leu-Tyr-, -Tyr-Leu- y -Phe-Tyr- de cadenas de péptidos que tengan al menos cinco aminoácidos, a pH ácido [203]. Muchos sustratos de catepsina D han sido reportados *in vitro*, pero aún no se han identificado claramente sus sustratos endógenos en cáncer. Sin embargo, hasta el momento no hay inhibidores específicos que puedan ser usados para bloquear la acción de la enzima en cáncer.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Considerando que la catepsina D está implicada en el desarrollo de muchos tumores, es necesario conocer la razón por la cual esta proteasa actúa fuera de un ambiente lisosomal. Para ello, es crucial conocer el mecanismo de su transporte e identificar las proteínas que puedan intervenir en él. Esto podría ser útil para el desarrollo de futuras terapias basadas en el impedimento de la secreción y actividad de esta proteasa. Teniendo en cuenta esta inquietud y los antecedentes descritos previamente, hemos planteado la siguiente hipótesis y objetivos:

HIPÓTESIS

El transporte de catepsina D en células tumorales mamarias es mediado por receptores específicos y la secreción excesiva de esta enzima se debe a cambios en la expresión y distribución de proteínas receptoras, las cuales son reguladas por hormonas.

OBJETIVO GENERAL

Proponer un modelo de transporte para la catepsina D en células tumorales mamarias, a partir del estudio de sus posibles proteínas transportadoras y de la regulación hormonal de las mismas, que contribuya a interpretar el mecanismo de secreción de la proteasa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Comparar la expresión y distribución de catepsina D (o sus pro-enzimas) en líneas celulares mamarias humanas; no tumorigénica (MCF-10A) y tumorigénicas (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D), dos de las cuales expresan receptores estrogénicos α (MCF-7 y T-47D).
- 2- Estudiar y comparar la expresión y localización del receptor a manosa 6-fosfato catión-dependiente (CD-MPR), el receptor a manosa 6-fosfato catión-independiente (CI-MPR) y sortilina (Sort) en las líneas celulares mencionadas en 1, y correlacionarlas con la expresión y distribución de catepsina D.

- 3- Evaluar el efecto del 17- β -estradiol sobre la expresión y distribución de catepsina D en las líneas celulares tumorales mamarias humanas que expresan receptores estrogénicos α .
- 4- Estudiar el efecto del 17- β -estradiol sobre la expresión y distribución de Sort, el CI-MPR y el CD-MPR en las líneas celulares tumorales mamarias humanas que expresan receptores estrogénicos α .
- 5- Evaluar la expresión y localización de catepsina D y de los receptores CD-MPR y sortilina en las líneas celulares de tumores mamarios humanos, en ausencia o presencia de aminos acidotrópicas, e interpretar la ruta de transporte intracelular de la enzima y su implicancia en la secreción de la misma.
- 6- Estudiar si existe una relación y/o regulación entre las proteínas de transporte de catepsina D.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron cuatro líneas celulares mamarias humanas: una no tumorigénica y tres tumorigénicas:

No tumorigénica:

MCF-10A: línea celular epitelial mamaria humana no tumorigénica.

Esta línea fue obtenida a partir de tejido mamario de una paciente con diagnóstico de enfermedad fibroquística. Las células MCF-10A presentan características de epitelio mamario normal ya que cumplen con los siguientes criterios: a) ausencia de tumorigenicidad en ratones “*nude*”; b) crecimiento tridimensional en colágeno; c) crecimiento en cultivo bajo control hormonal y factores de crecimiento; d) ausencia de crecimiento independiente de anclaje; y e) formación de estructuras análogas a acinos mamarios en cultivos confluentes (“*dome formation*”) [204].

Tumorigénicas:

MCF-7: línea celular derivada de adenocarcinoma ductal mamario sensible a hormonas.

Esta línea celular fue generada a partir de células tumorales aisladas de un derrame pleural de una paciente de 67 años con diagnóstico de adenocarcinoma ductal mamario metastático. Las MCF-7 son células muy utilizadas para estudios “*in vitro*” de cáncer mamario ya que conservan varias características particulares del epitelio mamario diferenciado, entre ellas, la capacidad de formar estructuras análogas a acinos mamarios en cultivo y la presencia de receptores estrogénicos α citoplasmáticos [205], (www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx).

T-47D: línea celular derivada de adenocarcinoma ductal mamario sensible a hormonas.

Esta línea celular fue obtenida a partir de células presentes en un derrame pleural de una paciente de 54 años con diagnóstico de adenocarcinoma ductal mamario metastático, origen similar al de las células MCF-7 (<https://www.atcc.org/Products/All/HTB-133.aspx>).

Las células MCF-7 y las T47-D son clasificadas como subtipos Luminal A (RE+/RP+/HER2-), de la clasificación molecular del cáncer de mama. Según algunos

autores, la tasa de proliferación de las células T-47D es más alta con respecto a las MCF-7. Por otro lado, ambas líneas celulares son positivas para E cadherina y negativas para vimentina, lo que les confiere un fenotipo más epitelial que mesenquimal. Más aún, son positivas para CD24 (molécula asociada a la adhesión celular) y negativas para CD44 (molécula asociada a la capacidad migratoria e invasiva) [206].

MDA-MB-231: línea celular derivada de adenocarcinoma ductal mamario no sensible a hormonas.

Molecularmente la línea celular MDA-MB-231 es clasificada como triple negativa (RE-/RP-/HER2-) o basal. En cuanto a su fenotipo, se las considera más mesenquimales que epiteliales ya que son negativas para E-cadherina y positivas para vimentina, un marcador de células mesenquimales. Además expresan la proteína CD44, vinculada a un fenotipo migratorio e invasivo [206].

2. CULTIVO CELULAR

Todas las células fueron cultivadas en frascos de cultivo (T25 o T75), a una temperatura de 37°C y a una atmósfera de 5% de CO₂. La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla a continuación:

MCF-10A:

DMEM F12 HAM (Sigma D-8900), suplementado con: L-glutamina 2mM, insulina 10µg/ml, EGF 10ng/ml, hidrocortisona 500ng/ml (todos de Sigma®), penicilina-estreptomomicina 50U/50µg/ml (Gibco®) y suero fetal bovino 10% (Internegocios®) previamente charcoalizado.

MCF-7, T-47D y MDA-MB-231:

DMEM Base (Sigma® D5030) suplementado con L-glutamina 2mM, bicarbonato de sodio 44mM, piruvato de sodio 1mM, glucosa 5,6mM, penicilina-estreptomomicina 50U/50µg/ml (Gibco®) y de suero fetal bovino 10% (Internegocios®) charcoalizado. Cabe destacar que utilizamos este medio de cultivo porque no posee rojo fenol, ya que se ha demostrado que dicho indicador de pH posee actividad estrogénica débil y por ende podría interferir en nuestros estudios [207].

3. CHARCOLIZACIÓN DEL SUERO FETAL BOVINO

El suero fetal bovino (SFB) utilizado para preparar los medios de cultivo, fue sometido previamente a un proceso de charcolización. El mismo consistió en incubar el SFB con partículas de carbón recubiertas con dextrano durante 12h en agitación a 4°C. Posteriormente se separó el SFB de las partículas mencionadas mediante centrifugación y filtración. El carbón activado adsorbe moléculas lipofílicas y por ende permite remover del SFB hormonas tales como los andrógenos, estradiol, testosterona, progesterona, cortisol, T3 y T4. Se utilizó carbón recubierto por dextrano ya que éste último permite que haya menos pérdida de proteínas que si se usara carbón solo.

4. TRATAMIENTOS HORMONALES

Las células MCF-7 (60% de confluencia) y T-47D fueron expuestas al medio de cultivo descrito previamente, suplementado además con: estradiol 20 nM o estradiol 20 nM con tamoxifeno 2 µM, durante 12, 24 y 48 h. Antes de los tratamientos, las células se mantuvieron 24 horas en un medio privado de esteroides. Después de las incubaciones a los tiempos indicados, las células fueron colectadas y procesadas para diferentes estudios.

Cabe aclarar que el tamoxifeno es considerado un modulador selectivo de los receptores estrogénicos (SERM). Los SERMs son agentes que se unen al receptor estrogénico donde simulan la actividad de los estrógenos en ciertos tejidos (efecto agonista), mientras inhiben su acción en otros (efecto antagonista). El tamoxifeno posee acciones estrogénicas en la mayor parte de los tejidos, como el hueso (disminuye la resorción ósea), el endometrio y el hígado (media una reducción de los valores séricos de colesterol total y LDL). Sus acciones antiestrogénicas las ejerce sobre la glándula mamaria, la vagina y el sistema nervioso central. Por otro lado, este fármaco compite con los estrógenos por la unión al receptor, aunque la afinidad de ellos es mayor (unas 100 a 1000 veces). Por lo tanto, el tamoxifeno debe coexistir en los tejidos con una concentración molar al menos 100 veces superior a la de los estrógenos [208][209].

5. TRATAMIENTOS CON BASES DÉBILES

Las células MCF-7 y T-47D fueron expuestas durante 6, 12, 18 y 24 h a aminos acidotrópicas: cloruro de amonio 10 mM o cloroquina 50 mM. Después de las

incubaciones a los tiempos indicados, las células fueron colectadas y procesadas para diferentes estudios.

Las aminos acidotrópicas neutralizan el pH endosomal/lisosomal, impidiendo el reciclaje de los MPRs al trans-Golgi. Esto disminuye la disponibilidad de los receptores en dicho compartimiento por lo cual varias enzimas recientemente sintetizadas terminan siendo liberadas al medio. Es una herramienta importante para diferenciar transportes mediados por receptores de aquellos más inespecíficos.

6. PROCESAMIENTO DE LAS CÉLULAS PARA “INMUNOBLOT”

Las células de las cuatro líneas celulares cultivadas en las condiciones descriptas anteriormente fueron recolectadas mediante tripsinización y posterior centrifugado a 500g durante 5min. A continuación, el pellet celular fue resuspendido en un buffer de lisis [PBS conteniendo detergente nonidet P-40 1% e inhibidor de proteasas PMSF 1% (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)], y homogeneizado mediante disrupción celular con aguja de 0,5 mm y sonicación (3 pulsos de 15seg). Por último, los homogenatos fueron sometidos a una centrifugación de 800 g durante 20 min y los sedimentos (conteniendo núcleos y células sin disgregar) fueron descartados. La concentración proteica de las muestras fue medida por el método de Lowry.

7. PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

Para concentrar las proteínas presentes en los medios de cultivo de las 4 líneas celulares en estudio, se puso a punto la técnica de precipitación con sulfato de amonio. Para ello, los medios de cultivo de las 4 líneas celulares fueron centrifugados a 100.000g durante 30 min a 4°C, con el propósito de eliminar debris celulares. A continuación, se les agregó gradualmente un volumen de solución saturada de sulfato de amonio suficiente para alcanzar una saturación del 45%, y se los incubó durante 30min en hielo, para favorecer la formación de los agregados coloidales de proteínas. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 100.000g durante 30 min. El precipitado obtenido fue resuspendido en buffer PBS, y sometido a diálisis durante 12h a 4°C, para eliminar el sulfato de amonio.

Es importante aclarar que el sulfato de amonio es un agente agregante, no desnaturizante, de proteínas que altera de forma totalmente reversible la configuración

terciaria y cuaternaria de las mismas por medio de sus cargas iónicas (las proteínas conservan su función). Por la misma razón es muy usado como conservante de proteínas.

8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) E “INMUNOBLOT”

Las proteínas (40 µg) de los homogenatos celulares o de los medios de cultivo, fueron resuspendidas en buffer de Laemmli (SB) (buffer Tris 32 mM, glicerol 10 %, SDS 1%, ditiotreitol 10 mM y azul de bromofenol 0,01 %, pH: 6,8) y calentadas a 95°C durante 5 min, para la posterior detección de la mayoría de las proteínas estudiadas (condiciones reductoras). Aquellas muestras en las que se pretendía detectar el CI-MPR, fueron resuspendidas en SB sin DTT y no fueron calentadas (condiciones no reductoras).

A continuación, las muestras fueron analizadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), al 6-10%, según Laemmli [210].

Las proteínas fueron luego electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, de acuerdo a Burnette [211]. Estas membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en buffer T-PBS durante 1 h a temperatura ambiente (TA) y lavadas tres veces con buffer T-PBS durante 5 min. Luego, fueron incubadas con los anticuerpos primarios, según diluciones detalladas a continuación, durante 12 h a 4°C, y lavadas 4 veces con buffer T-PBS durante 5 min, cada vez. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios (HRP y/o conjugados con biotina) durante 2 h, seguido de 4 lavados con buffer T-PBS durante 5 min c/u. Aquellas membranas incubadas con anticuerpos conjugados con biotina, fueron incubadas adicionalmente con una solución de avidina-peroxidasa (Sigma Chemical Co. 1:10000 en solución A) durante 1 h a TA. La detección de las bandas fue realizada por el método quimioluminiscente de luminol (Sigma®) y la señal de luminiscencia fue detectada con el sistema de imagen LAS-4000 (Fujifilm Lifescience, USA). Las bandas fueron cuantificadas por densitometría, usando el software *Image J* (NIH[<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]).

Anticuerpos: origen y dilución utilizada

- anti-CD-MPR, policlonal producido en conejo (donado por el Dr. Luzio, Cambridge University, UK), 1:250.
- anti-CI-MPR, policlonal producido en conejo (donado por la Dra. Nancy M. Dahms, Medical College of Wisconsin, USA), 1:500.

- anti-catepsina D, policlonal producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology®), 1:1000.
- anti-sortilina, monoclonal producido en ratón (BD Biosciences®), 1:1000.
- anti-tubulina, producido en ratón (AbCam®), 1:7000.
- anti-golgina-97, producido en ratón (Santa Cruz Biotechnology®), 1:300.
- anti-LAMP1, producido en conejo (AbCam®), 1:1000.
- Anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa (HRP-Horseradish peroxidase) contra IgGs de conejo, ratón o cabra (Sigma®), 1:5000.
- Anticuerpos secundarios conjugados con biotina contra IgGs de conejo, ratón o cabra (Sigma-Aldrich®), 1:5000.

9. ANÁLISIS DE PÉPTIDOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS. HUELLA PEPTÍDICA

Este análisis lo llevamos a cabo mediante a una colaboración con el laboratorio del Dr. Eduardo Callegari (South Dakota Infrastructure Network-NCCR-NIH).

Las bandas de 100 y 220 kDa de geles de poliacrilamida al 6% (provenientes de muestras de homogenatos celulares y medios de cultivos, respectivamente), teñidas con azul de Coomassie, fueron recortadas de forma manual, minimizando la cantidad de gel. Luego fueron hidrolizadas con tripsina y una alícuota del sobrenadante obtenido (conteniendo péptidos) se depositó en una placa "Anchor-chip" que se introdujo en un espectrómetro de masas de tipo MALDI-TOF (MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization TOF: Time-Of-Flight). Los péptidos obtenidos fueron analizados por MASCOT de Matrix science. Este software compara cada péptido obtenido con una base de datos biológica de proteínas cuya secuencia se conoce. La ulterior comparación entre las huellas de tamaños de péptidos obtenidas con las depositadas en las bases de datos permite asociar estadísticamente la proteína desconocida con la más semejante de la base de datos.

10. ENSAYO DE "BINDING" Y "PULL-DOWN" DE PROTEÍNAS DE MEDIOS DE CULTIVO CON PARTÍCULAS DE AGAROSA-FOSFOMANANO

Para determinar si el fragmento del CI-MPR hallado en los medios de cultivo de las 4 líneas celulares correspondía a la región luminal o citoplasmática del mismo, se realizó un ensayo de "pull-down" con partículas de agarosa-fosfomanano (donadas gentilmente por

el Dr. Von Figura, University of Göttingen, Germany). El fosfomanano es una lectina multivalente que tiene muchos residuos de manosa, varios de ellos fosforilados. El ensayo consistió en incubar el medio de cultivo de células MDA-MB-231 con las partículas de fosfomanano-agarosa en un buffer TrisHCl 10 mM pH 7 (“Buffer Binding”), y posteriormente evidenciar la unión o ausencia de unión del CI-MPR a las mismas mediante *western blot*. El ensayo fue realizado “en batch”. A continuación se detalla el experimento:

Materiales:

- Muestra: Medio de cultivo de células MDA-MB-231 concentrado con sulfato de amonio y dializado contra “Buffer Binding” (para evitar que el fosfato del buffer PBS interfiriera en la unión del receptor a las partículas de agarosa-fosfomanano).
- Partículas de agarosa-fosfomanano hidratadas en “Buffer Binding”.

Protocolo:

1- Las partículas de agarosa-fosfomanano y el medio de cultivo fueron incubados de la siguiente manera:

| | Fosfomanano | Muestra | M6P 5 Mm* |
|------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|
| Tubo 1 “Blanco” | X (+ buffer binding) | - | - |
| Tubo 2 | X | X | - |
| Tubo 3 | X | X | X |

Tubo 1 “Blanco”: 100ul de fosfomanano + 75ul de “Buffer Binding”

Tubo 2: 100ul de fosfomanano + 75ul de muestra

Tubo 3: 100ul de fosfomanano + 75ul de muestra + manosa 6-fosfato 5mM*

*Se usó manosa 6-fosfato como control de especificidad del binding, ya que la misma compite por la unión a las partículas de agarosa-fosfomanano.

2- Los 3 tubos fueron incubados a TA durante 2h en agitación y luego centrifugados a 2500g durante 8min a TA.

3- Los sobrenadantes se guardaron, para su posterior análisis por *western blot* (aquí se encontrarían las moléculas del CI-MPR que no se hayan unido a las partículas de fosfomanano).

4- Los pellets (aquí se encontrarían las partículas de agarosa-fosfomanano que contendrían el CI-MPR unido a ellas) fueron lavados con 1ml de "Buffer Binding" y posteriormente centrifugados por 10min a 4000g.

5- Las proteínas pegadas a las partículas de agarosa-fosfomanano fueron separadas de las mismas con SB y sometidas a electroforesis para su posterior análisis por inmunoblot.

11. TRANSFECCIONES TRANSIENTES

Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Carlos Morales, en la Universidad de McGill, Montreal, Quebec, Canada.

Las células MCF 10A, y las MCF-7, fueron transfectadas con el plásmido de expresión en eucariotas pcDNA3.1A conteniendo la secuencia que codifica para el receptor sortilina WT. Se utilizó Polyfect® (QIAGEN) como reactivo de transfección y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Pasadas 24 h, las células fueron fijados y procesados para inmunofluorescencia indirecta.

12. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA Y ANÁLISIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos depositados en el fondo de pocillos de cultivo, con el medio y condiciones descriptas anteriormente. Una vez alcanzada una confluencia del 50%, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y luego fijadas con paraformaldehído al 3,7% durante 20 min. Posteriormente fueron permeabilizadas con 0,1% de saponina durante 15min, y bloqueadas durante 30min con suero de caballo al 5%. A continuación, las células fueron incubadas durante 12h a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-catepsina D (1/150), anti-sortilina (1/100), anti-CDMPR (1/200), anti-CIMPR (1/100), anti-Golgina 97 (1/250), anti-Rab5 (1/200) y/o anti-LAMP1 (1/1000). Después de 2 lavados con PBS1X, se agregaron los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-IgG de conejo, cabra o ratón conjugados con FIT C (1/200), Alexa 594 (1/200) o Cy3 (1/300), y se incubaron durante 90min a temperatura ambiente. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoescht (1/1000) y finalmente los cubreobjetos conteniendo las células fueron montados con mowiol sobre portaobjetos.

Las células fueron observadas con un microscopio confocal Olympus FV1000 y las imágenes fueron adquiridas con el programa FV 10-ASW 1.7 (Olympus, Japón), utilizando un objetivo con una apertura numérica de 63X y un pinole estándar (1 Airy disk). Para

corroborar la especificidad de los anticuerpos secundarios, los ensayos se repitieron sin la presencia del anticuerpo primario.

Análisis cuantitativo de colocalización:

El análisis de colocalización se realizó con la aplicación JACoP del software *Image J* (NIH[<http://rsb.info.nih.gov/ij>]). Se calcularon dos coeficientes de correlación: Pearson (PCC) y Mander (MCC). Para el cálculo de PCC, se midió la dependencia de pixeles en las imágenes de dos canales (canal verde y rojo para CD-MPR y CatD, respectivamente). Los valores de los pixeles de las dos imágenes se muestran en un diagrama de distribución de pixeles (gráfico de dispersión). Por medio de una regresión lineal se calculó la relación existente entre las intensidades de las dos imágenes. Además, se obtuvo la función de correlación cruzada (CCF) donde se representa la variación de los PCC según el desplazamiento de pixeles (∂x) en la dirección x de la imagen verde respecto de la imagen de color rojo. El valor real del PCC se estima a $\partial x=0$, varía entre 1 y -1, donde el valor 1 indica correlación completa mientras que -1, correlación negativa. El coeficiente MCC aportó dos datos, MCC-M1 y MCC-M2, que fueron útiles para describir la fracción de CatD que colocalizaba con la del CD-MPR y la fracción del CD-MPR que colocalizaba con la de CatD, respectivamente. Los valores de MCC varían entre 0 y 1, correspondientes a imágenes que no colocalizan o que colocalizan completamente, respectivamente.

13. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE HOMOGENATOS

Fracciones subcelulares de las células MCF-7 cultivadas bajo tratamiento hormonal, fueron obtenidas en gradiente discontinuo de sacarosa según el método de Massagué J y col. [212] y analizadas por *western blot*. Para esto se siguió el siguiente protocolo:

- 1- Las células MCF-7 fueron cultivadas hasta alcanzar un 90% de confluencia en condiciones control, tratadas con estradiol y estradiol + tamoxifeno, y recolectadas luego de 24h.
- 2- Posteriormente, las células fueron resuspendidas en Buffer A (TrisHCl 10mM pH 7, 4; Na₂EDTA 1Mm, sacarosa 0,25M y PMSF 0,02%) y homogeneizadas en un homogenizador de vidrio/teflón.
- 3- A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 3000g durante 10min. Los pellet,

conteniendo los núcleos celulares, fueron descartados, mientras que los sobrenadantes (enriquecidos en membranas y citosoles) fueron sometidos a una ulterior centrifugación de 30000g por 20min.

4- El pellet, de cada muestra, obtenido a partir de la última centrifugación, fue resuspendido en un volumen pequeño de Buffer A, y se procedió a medir la concentración de proteínas en el mismo.

5- Cada muestra fue cargada en un gradiente discontinuo de sacarosa, previamente elaborado con soluciones de sacarosa a distintas concentraciones (20%, 25%, 30%, 40% y 50%) en Buffer B (TrisHCl 10mM pH 7, 4; Na₂EDTA y PMSF 0,02%).

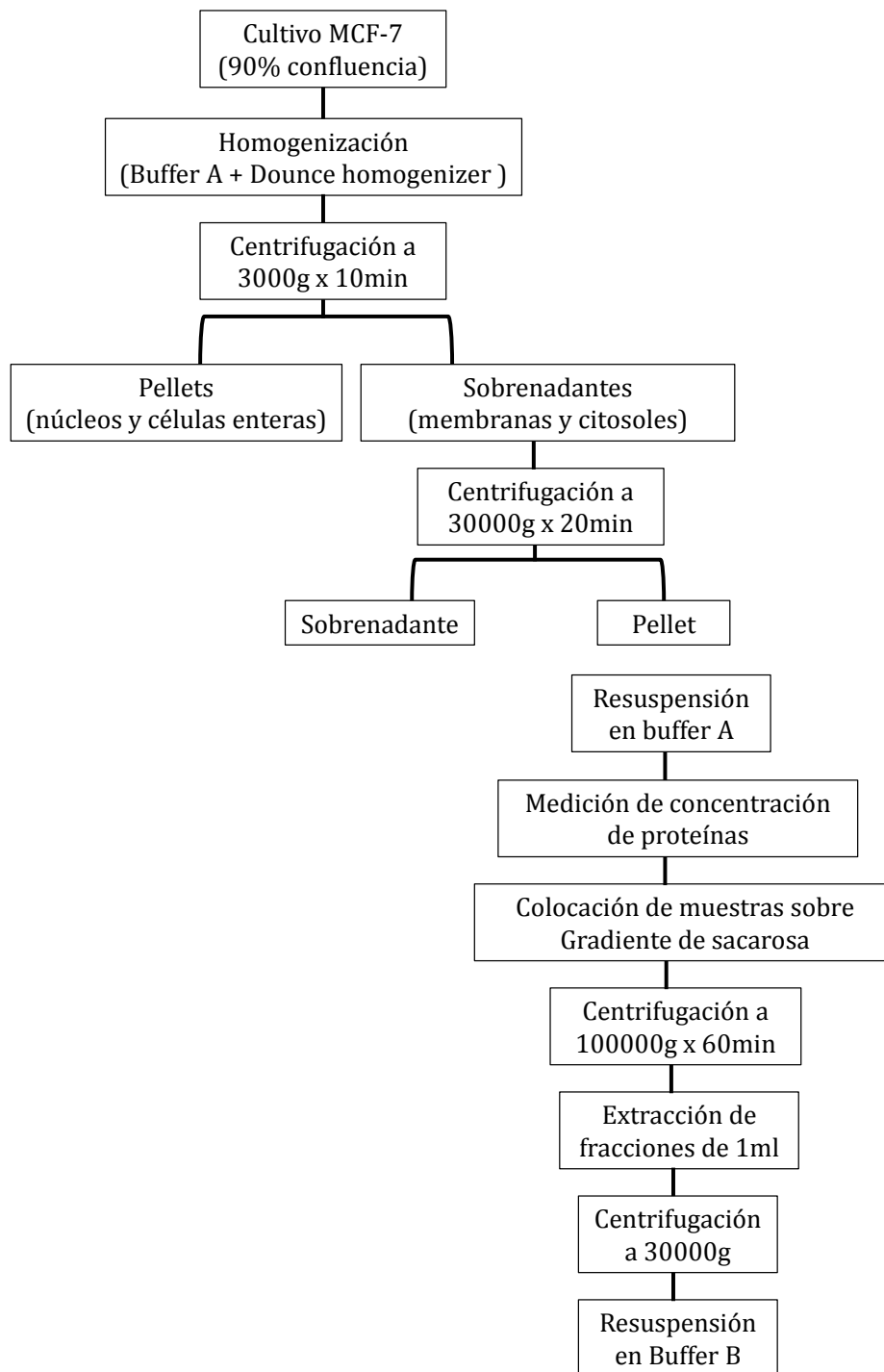
6- Cada gradiente fue centrifugado a 100000g durante 60min, a 4°C.

7- Fracciones de aproximadamente 1ml fueron colectadas desde el fondo del tubo del gradiente y cada una de ellas fue pesada en balanza analítica para calcular su densidad en función del volumen exacto (medido con micropipeta) de cada fracción.

8- Posteriormente, cada fracción fue diluida con 2ml de Buffer B y centrifugada a 30000g por 30min a 4°C, para eliminar la sacarosa.

9- Los pellets finales fueron resuspendidos en 0,2ml de Buffer B y procesados para "immunoblotting".

A continuación se esquematiza el protocolo del fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa:



Esquema 1: Protocolo para el fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron sujetos a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, utilizando el software KyPlot.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

PARTE 1

Estudios Comparativos entre las Cuatro Líneas Celulares Mamarias: MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D.

Nuestro trabajo se orientó al estudio del transporte intracelular de la enzima catepsina D en células tumorales mamarias. Para poder abordarlo, en primer lugar determinamos los niveles de expresión basales de proteínas que posiblemente estén involucradas en el mismo, en cuatro líneas celulares mamarias que elegimos como modelos de estudio: MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D. Puesto que tienen implicancias directas en nuestro trabajo, es importante tener presente las diferencias principales entre estos tipos celulares:

- las MCF-10A son no tumorigénicas mientras que las otras tres son tumorigénicas.
- las MCF-7 y T-47D expresan receptores estrogénicos α (RE α), mientras que las MDA-MB-231 son triple negativas (RE-/RP-/Her2-) (Ver Tabla IV.1).

| | | |
|-------------------------|--|-------------------------|
| No tumorigénicas | MCF-10A | |
| Tumorigénicas | Expresan RE α | Triple negativas |
| | MCF-7 T-47D | MDA-MB-231 |

Tabla IV.1: Características generales de las líneas celulares utilizadas en este trabajo

1.1 Las líneas celulares tumorigénicas y la no tumorigénica poseen distintos niveles de expresión de catepsina D, CD-MPR, sortilina y CI-MPR.

1.1.1 Catepsina D

En la figura 1.1.1, observamos que la proteasa catepsina D es expresada por las cuatro líneas celulares, aunque sus niveles de expresión difieren significativamente entre ellas. A su vez, la forma madura de la enzima (≈ 33 kDa) está altamente expresada en las células estrógeno-dependientes MCF-7 y T-47D. Por otro lado, la forma inmadura de la enzima, procatepsina D (≈ 52 kDa), es detectada principalmente en la línea celular MCF-7.

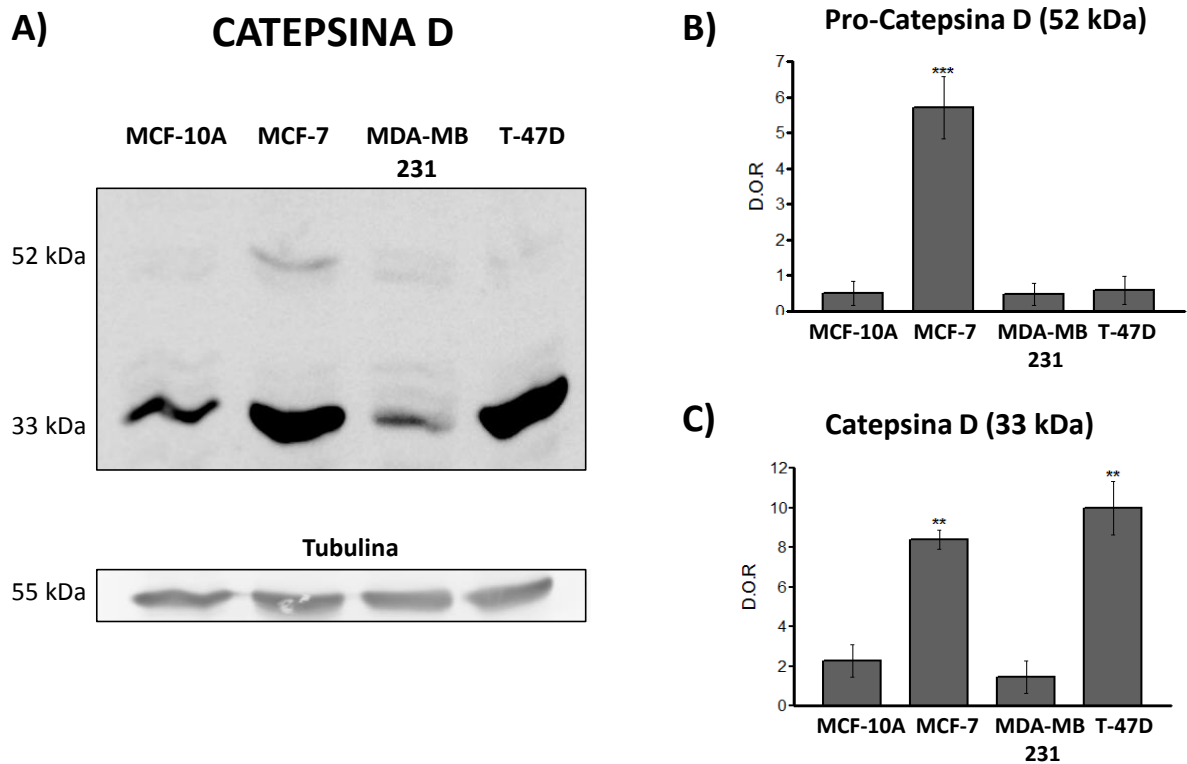


Figura 1.1.1: Expresión de la enzima catepsina D en las líneas celulares mamarias MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D.

A) “Inmunoblot” representativo de los homogenatos celulares para la detección de catepsina D. **B y C)** Cuantificación por densitometría óptica de las bandas de las formas inmadura (~52 kDa) y madura (~33 kDa) de CatD, respectivamente. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R.) de cuatro experimentos independientes \pm SE. (***) Significativamente diferente del resto ($p < 0,001$) y (**) significativamente diferente de MCF-10A y MDA-MB-231 ($p < 0,01$). La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga.

1.1.2 El receptor a manosa 6-fosfato catión-dependiente (CD-MPR)

Con respecto a los niveles de expresión de este receptor posiblemente involucrado en el transporte de la enzima, encontramos que son significativamente más altos en la línea celular MCF-7 (figura 1.1.2).

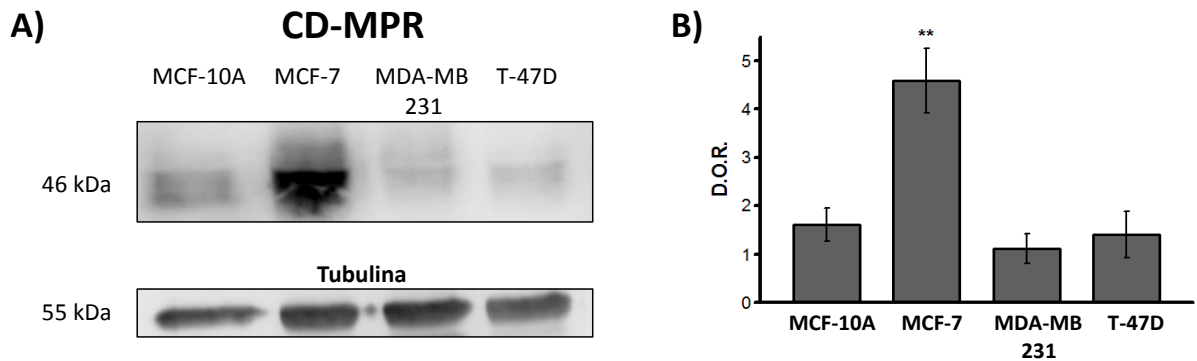


Figura 1.1.2: Expresión del receptor CD-MPR en las líneas celulares mamarias MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D.

A) “Inmunoblot” representativo de los homogenatos celulares para la detección de la proteína en estudio. **B)** Cuantificación por densitometría óptica. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R.) de cuatro experimentos independientes \pm SE. (***) Significativamente diferente del resto ($p < 0,01$). La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga.

1.1.3 Sortilina

Se observó que las líneas celulares tumorigénicas expresan mayores niveles de este receptor con respecto a las células no tumorigénicas, siendo significativa la diferencia en las líneas celulares MCF-7 y T-47D (figura 1.1.3).

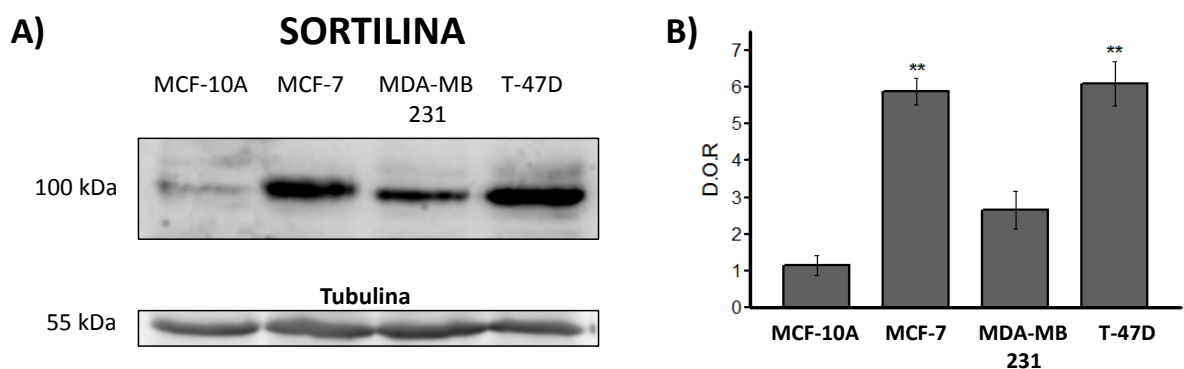


Figura 1.1.3: Expresión del receptor sortilina en las líneas celulares mamarias MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D.

A) “Inmunoblot” representativo de homogenatos celulares para la detección de la proteína en estudio. **B)** Cuantificación por densitometría óptica. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas

relativas (D.O.R) de cuatro experimentos independientes \pm SE. (**) Significativamente diferente de MCF-10A y MDA-MB-231 ($p < 0,01$). La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga.

A partir de estos resultados destacamos que los niveles de expresión de los dos receptores son llamativamente superiores en las tres líneas tumorigénicas en comparación con la línea celular no tumorigénica.

1.1.4 El receptor a manosa 6-fosfato catión-independiente (CI-MPR)

Por último evaluamos la expresión del CI-MPR, el cual es un receptor de alto peso molecular (≈ 300 kDa). Por “inmunoblot” detectamos su presencia en las cuatro líneas celulares, y si bien no se observaron diferencias significativas entre ellas, puede apreciarse niveles menores en la expresión del receptor en las células MCF-7 (figura 1.1.4).

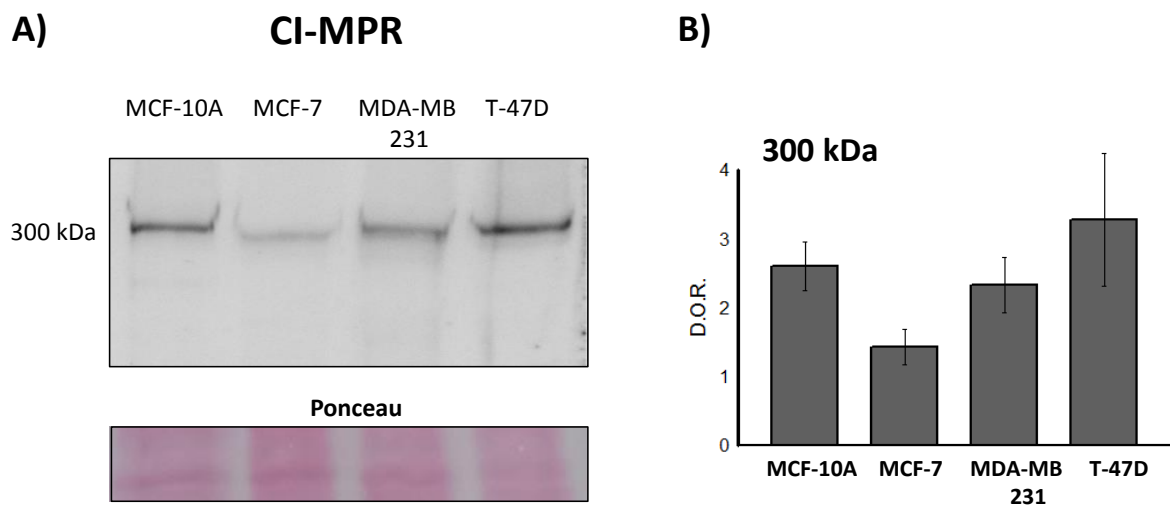


Figura 1.1.4: Expresión del receptor CI-MPR en las líneas celulares mamarias MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D.

A) “Inmunoblot” representativo de homogenatos celulares para la detección del CI-MPR **B)** Cuantificación por densitometría óptica. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de cuatro experimentos independientes \pm SE. Como control de carga se utilizó la tinción de las membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau. Para el cálculo de la D.O.R, se dividió la densidad óptica de la banda correspondiente al receptor con la densidad óptica promedio de tres bandas diferentes de la membrana teñida con rojo ponceau.

1.1.5 ¿Otras formas del CI-MPR?

Llamativamente, el anticuerpo anti-CI-MPR también mostró reactividad en otra banda, de ≈ 100 kDa, en los homogenatos de las cuatro líneas celulares (figura 1.1.5.1).

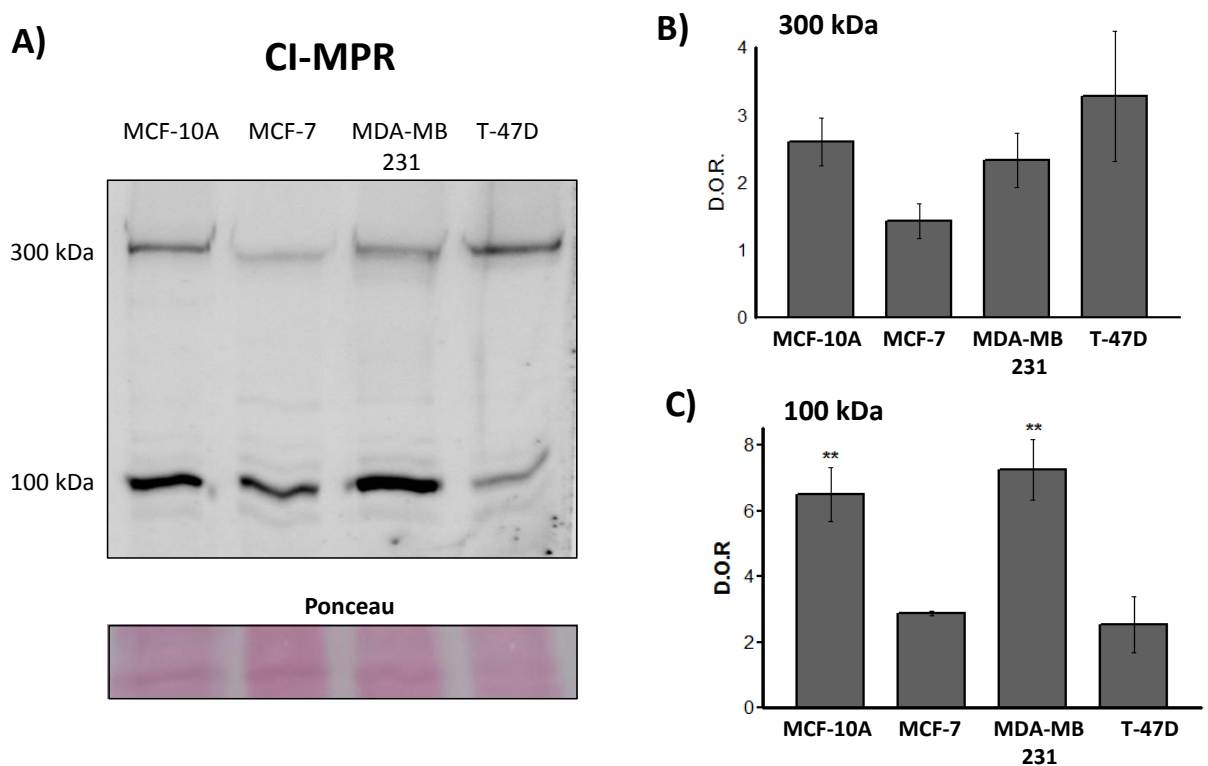


Figura 1.1.5.1: Dos formas del receptor CI-MPR en las líneas celulares mamarias MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D.

A) “Inmunoblot” representativo de homogenatos celulares para la detección del CI-MPR maduro (300 kDa) y de una forma de 100 kDa. **B)** Cuantificación de la banda de 300 kDa. **C)** Cuantificación de la banda de 100 kDa. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de cuatro experimentos independientes \pm SE. (**) Significativamente diferente de MCF-7 y T-47D ($p < 0,01$). Como control de carga se utilizó la tinción de las membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau. Para el cálculo de la D.O.R., se dividió la densidad óptica de la banda correspondiente al receptor con la densidad óptica promedio de tres bandas diferentes de la membrana teñida con rojo ponceau.

Habiendo descartado una inespecificidad de la reacción y considerando que la detección de esta banda es aparentemente a expensas del receptor maduro de 300 kDa, planteamos la hipótesis de que la nueva banda detectada en los homogenatos celulares podría corresponder a un fragmento del receptor. Esto podría ser consecuencia de la síntesis de una proteína trunca o de un clivaje proteolítico del receptor maduro. Si fuese este último caso, debería encontrarse el fragmento restante. Dado que no lo detectamos en los homogenatos celulares, decidimos buscarlo en los medios de cultivo de las células.

Por “inmunoblot”, detectamos una banda reactiva de ≈ 220 kDa para el anticuerpo anti-CI-MPR en los medios de cultivo de las cuatro líneas celulares (figura 1.1.5.2). Esta forma fue considerada un fragmento soluble del CI-MPR ($_s$ CI-MPR).

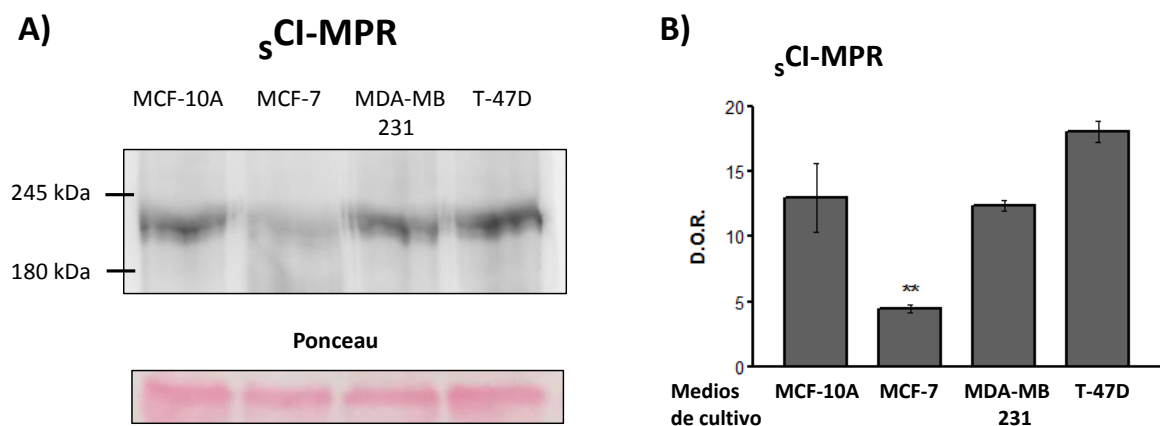


Figura 1.1.5.2: Detección de una forma soluble del CI-MPR ($_s$ CI-MPR) en los medios de cultivo de las líneas celulares mamarias MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D.

A) “Inmunoblot” representativo de medios de cultivo celulares para la detección del $_s$ CI-MPR (≈ 220 kDa). **B)** Cuantificación por densitometría óptica. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de tres experimentos independientes \pm SE. (**) Significativamente diferente del resto ($p < 0,01$). Como control de carga se utilizó la tinción de las membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau. Para el cálculo de la D.O.R., se dividió la densidad óptica de la banda correspondiente al receptor con la densidad óptica promedio de tres bandas diferentes de la membrana teñida con rojo ponceau.

1.1.6 Las proteínas de 100 kDa en los homogenatos celulares y de 220 kDa en los medios de cultivo, derivan del CI-MPR.

Para confirmar que las bandas detectadas eran fragmentos del receptor CI-MPR, realizamos un análisis proteómico mediante huella peptídica por MALDI-TOF.

Las bandas de 100 y 220 kDa de geles de poliacrilamida al 6% (provenientes de muestras de homogenatos celulares y medios de cultivos, respectivamente) teñidas con azul de Coomassie, fueron extraídas del gel, escindidas y analizadas por Maldi-TOF (MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, desorción/ionización mediante láser asistida por matriz). En la ionización, los analitos co-cristalizados con una matriz apropiada son convertidos en iones mediante la acción de un láser. Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF: Time-Of-Flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, y de allí se obtiene la huella peptídica de las masas de la proteína. Los péptidos obtenidos fueron analizados por MASCOT de Matrix science. Este software compara cada péptido obtenido con la secuencia de todas las proteínas de la base de datos, determinando alineación (coincidencia) entre el péptido y alguna región de la secuencia de alguna proteína.

En un análisis de amplio espectro se comprobó que, con un “score” significativo de 95 %, de los péptidos obtenidos a partir de la banda de 100 kDa (proveniente de homogenatos celulares), al menos dos de estos péptidos presentaron coincidencia con secuencias del dominio citoplasmático del CI-MPR (figura 1.1.6.1 y 1.1.6.2). Con respecto a los péptidos obtenidos a partir de la banda de 220 kDa (proveniente de medios de cultivo), tres de ellos alinearon con la secuencia del CI-MPR, como puede observarse en las figuras 1.1.6.1 y 1.1.6.2.

| | | | | | |
|------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1 | MGAAAGRSPH | LGPAPARRPQ | RSLLLLQLLL | LVAAPGSTQA | QAAPFPELCS |
| 51 | YTWEAVDTKN | NVLYKINICG | SVDIVQCGPS | SAVCMHDLKT | RTYHSVGD ^{SV} |
| 101 | LRSATRSLE | FNTTVSCDQQ | GTNHRVQSSI | AFLCGKTLGT | PEFVTATECV |
| 151 | HYFEWRTTAA | CKKDIFKANK | EVPCYVFDEE | LRKHDLNPLI | KLSGAYLVDD |
| 201 | SDPDTSLFIN | VCRDIDTLRD | PGSQLRACPP | GTAACLVRGH | QAFDVGQPRD |
| 251 | GLKLVRKDR | VLSYVREEAG | KLDFCDGHSP | AVTITFVCPS | ERREGTIPKL |
| 301 | TAKSNCRYEI | EWITEYACHR | DYLESKTCSL | SGEQDVSID | LTPLAQSGGS |
| 351 | SYISDGKEYL | FYLNVCGETE | IQFCNKKQAA | VCQVKKSDTS | QVKAAGRYHN |
| 401 | QTLRYSDGDL | TLIYFGGDEC | SSGFQRM ^{SVI} | NFECNKTAGN | DGKGT ^{PVFTG} |
| 451 | EVDCTYFFTW | DTEYACVKEK | EDLLCGATDG | KKRYDLSALV | RHAEPEQ ^{NWE} |
| 501 | AVDGSQTETE | KKHFFINICH | RVLQEGKARG | CPEDA ^{AVCAV} | DKNGSKNLGK |
| 551 | FISSPMKEKG | NIQLSYSDGD | DCGHGKKIKT | NITLVCKPGD | LESAPVLR ^{TS} |
| 601 | GEGGCFYEF | WHTAAACVLS | KTEGENCTVF | DSQAGFSFDL | SPLTK ^{KN} GAY |
| 651 | KVETKKYDFY | INVCGPVS ^{VS} | PCQPD ^{SGACQ} | VAKSDEKT ^{WN} | LGLSNAKLSY |
| 701 | YDGMIDLN ^{YR} | GGTPYNNERH | TPRATLITFL | CDRDAGV ^{GFP} | EYQ ^{EEDNSTY} |
| 751 | NFRWYTSYAC | PEEPLECVVT | DPSTLEQYDL | SSLAKSE ^{GGL} | GGN ^{WYAM} DNS |
| 801 | GEHVTWRKY ^Y | INVCRPLNPV | PGCNRYASAC | QMKYE ^{KDQGS} | FTEVVSISNL |
| 851 | GMAKTGPVVE | DSGSLLE ^{YV} | NGSACTTSDG | RQTTYT ^{TRIH} | LVCSRGLNS |

```

901  HPIFSLNWEK VVSFLWNTEA ACPIQTTTDT DQACSIKDPN SGFVFNLNPL
951  NSSQGYNVSG IGKIFMFNVC GTMPVCGTIL GKPASGCEAE TQTEELKNWK
1001 PARPVGIEKS LQLSTEGFIT LTYKGPLSAK GTADAFIVRF VCNDDVYSGP
1051 LKFLHQDIDS GQGIRNTYFE FETALACVPS PVDQVTDLA GNEYDLTGLS
1101 TVRKPWTAVD TSVDRGRKRTF YLSVCNPLPY IPGCQGSVAVG SCLVSEGNSW
1151 NLGVVQMSPE AAANGSLSIM YVNGDKCGNQ RFSTRITFEC AQISGSPAFQ
1201 LQDGCCEYVFI WRTVEACPVV RVEGDNCEVK DPRHGNYDL KPLGLNDTIV
1251 SAGEYTYFFR VCGKLSSDVC PTSDKSKVVS SCQEKREPQG FHKVAGLLTQ
1301 KLTYRNGLLK MNFTGGDTCH KVVQRSTAF FYCDRGTQRP VFLKETSDCS
1351 YLFEWRTQYA CPPFDLTECS FKDGAGNSFD LSSLSRYSQN WEAITGTGDP
1401 EHYLINVCKS LAPQAGTEPC PPEAAAALLG GSKPVNLGRV RDGPQWRDGI
1451 IVLKYVDGDL CPDGRKKST TIRFTCSSES VNSRPMFISA VEDCEYTFAW
1501 PTATACPMKS NEHDDCQVTN PSTGHLFDLS SLSGRAGFTA AYSEKGLVYM
1551 SICGENENCP PGVGACFGQT RISVVKANKR LRYVDQVLQL VYKDGSPCPS
1601 KSGLSYKSVI SFVCRPEARP TNRPMLISL KQCTCLFFSW HTPLACEQAT
1651 ECSVNGLSSI VDLSPLIHRT GGYEAYDESE DDASDTNPDF YINICQPLNP
1701 MHGVPCPAGA AVCKVPIQGP PIDIGRVAGP PILNPIANEI YLNFESSTPC
1751 LADKHFNYTS LIAFHCKRGV SMGTPKLLRT SECDFVFEWE TPVVCPDEVK
1801 MDGCTLTDEQ LLYSFNLSSL STSTFKVTRD SRTYSVGVCT FAVGPEQGGC
1851 KGGVCLLSG TKGASFGRLQ SMKLDYRHQD EAVVLSYVNG DRCPPETDDG
1901 VPCVFPFIFN GKSIEECIE SRAKLWCSTT ADYDRDHEWG FCRHSNSYRT
1951 SSIIFKCDDE EDIGRPQVFS EVRGCDVTFE WTKVVCPPK KLECKFVQKH
2001 KTYDLRLLSS LTGSWSLVHN GVSYYINLCQ KIYKGPLGCS ERASICRRTT
2051 TGDVQVLGLV HTQKLGIVGD KVVVTYSKGY PCGGNKTASS VIELTCTKTV
2101 GRPAFKRFDI DSCTYYFSWD SRAACAVKPQ EVQMVNGTIT NPINGKSFSL
2151 GDIIYFKLFRA SGMRTNGDN YLYEIQLSSI TSSRNPACSG ANICQVKPND
2201 QHFSRKVGTS DKTKYYLQDG DLDVVFASSS KCGDKTKSV SSTIFFHCDP
2251 LVEDGIPEFS HETADCQYLF SWYTSAVCPL GVGFDSENGG DDGQMHKGLS
2301 ERSQAVGAVL SLLLVALTCC LLALLLYKKE RRETVISKLT TCCRSSNVK
2351 YKYSKVNKEE ETDENETEWL MEEIQLPPR QGKEGQENGH ITTKSVKALS
2401 SLHGDDQDSE DEVLTIPEVK VHSGRGAGAE SSHPVRNAQS NALQEREDDR
2451 VGLVRGEKAR KGKSSSAQK TVSSTKLVSF HDDSDEDLLH I
    
```

Figura 1.1.6.1: Secuencia peptídica completa del CI-MPR y péptidos que presentaron alineación con ella. Los péptidos resaltados en rojo se obtuvieron por huella peptídica a partir de la banda de 220 kDa (de medios de cultivo de células MDA-MB-231) y presentaron coincidencia con distintas regiones de la secuencia del CI-MPR. Los péptidos resaltados en verde se obtuvieron por huella peptídica a partir de la banda de 100 kDa (de homogenatos de células MDA-MB-231) y presentaron coincidencia con la secuencia del CI-MPR.

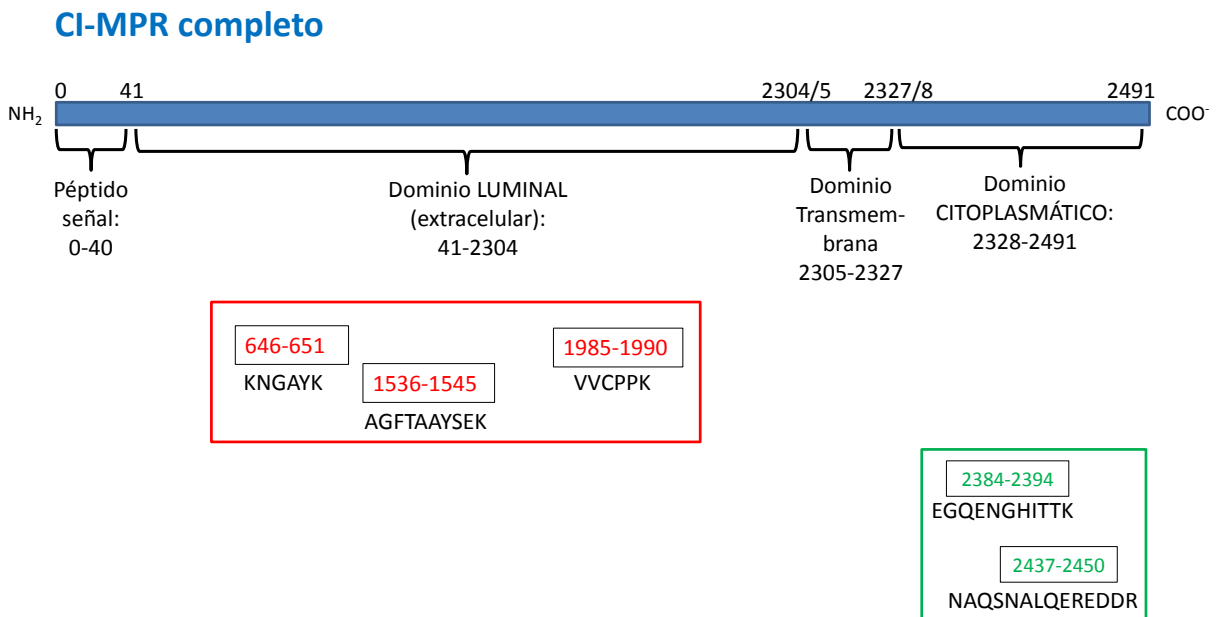


Figura 1.1.6.2: Esquema del CI-MPR y de los péptidos que presentaron alineación con él, obtenidos mediante proteómica.

En la parte superior se esquematiza la secuencia completa del CI-MPR. Los números representan la posición de los aminoácidos que limitan cada dominio del receptor: péptido señal (40 aminoácidos); dominio luminal (2263 aminoácidos), dominio transmembrana (22 aminoácidos) y dominio citoplasmático (163 aminoácidos). En rojo se representan las secuencias de los péptidos detectados en la banda de 220 kDa (del gel de poliacrilamida) que presentaron alineación con el CI-MPR. La muestra utilizada fue obtenida del medio de cultivo de células MDA-MB 231. En verde se representan las secuencias de los péptidos detectados a partir de la banda de 100 kDa (del gel de poliacrilamida) que presentaron alineación con el dominio citoplasmático del CI-MPR. La muestra utilizada fue obtenida del homogenato celular de células MDA-MB-231.

Observación: para estos estudios se utilizaron células MDA-MB-231 y MCF-10A debido a la mayor concentración del CI-MPR en ellas, asumiendo que las bandas de las líneas celulares MCF-7 y T-47D pertenecen a la misma proteína.

1.1.7 La fracción soluble del CI-MPR se corresponde con la región luminal del receptor.

Para confirmar si el fragmento del CI-MPR encontrado en el medio de cultivo de las cuatro líneas celulares correspondía a la región luminal del receptor, realizamos un ensayo de “binding” y “pull-down” con partículas de agarosa conjugadas con fosfomanano,

en presencia o ausencia de manosa 6-fosfato. Utilizamos el medio de cultivo de las células MDA-MB-231 (utilizada en los estudios proteómicos). Demostramos que dicho fragmento está conformado por la región luminal del CI-MPR, ya que se asoció a las partículas de fosfomanano, y esta asociación fue inhibida por manosa 6-fosfato (figura 1.1.7).

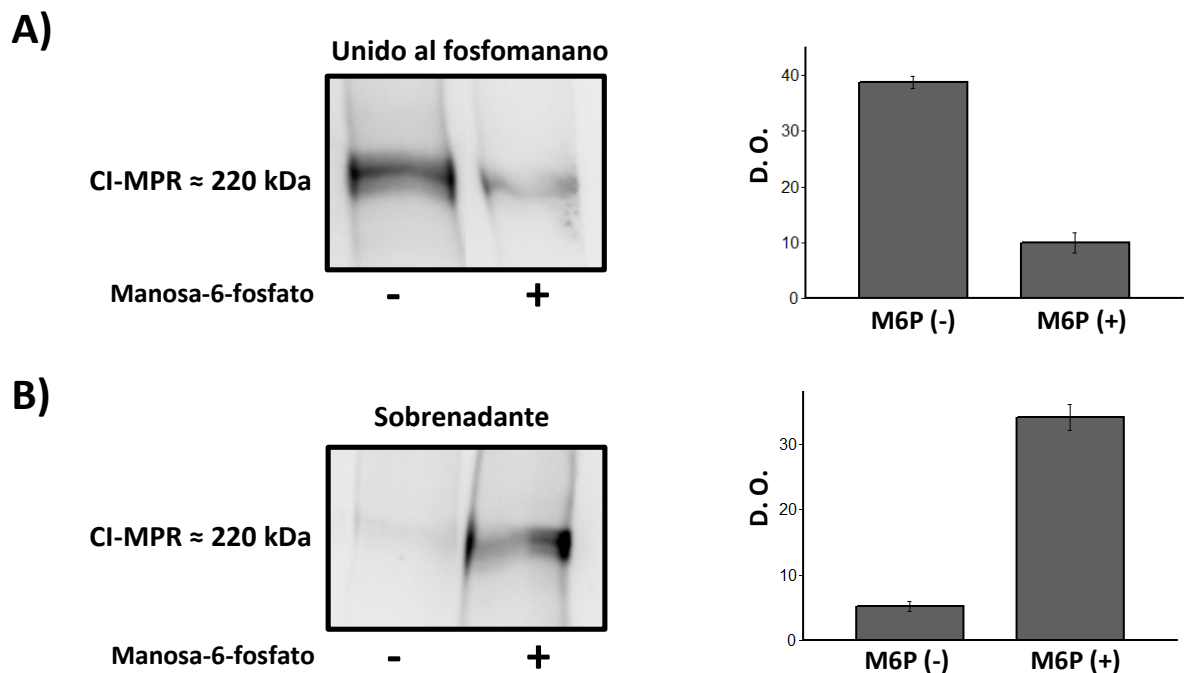


Figura 1.1.7: Ensayo de “binding” y “pull-down” de proteínas de medios de cultivo con agarosa-fosfomanano.

Los medios de cultivo de las células MDA-MB-231 fueron incubados con partículas de agarosa acopladas con fosfomanano, en presencia o ausencia de manosa 6-fosfato (M6P). **A)** Detección por “inmunoblot” del ζ CI-MPR que se unió a las partículas, en ausencia o presencia de M6P y su cuantificación correspondiente. **B)** Detección por “inmunoblot” del ζ CI-MPR que no se unió al fosfomanano (en el sobrenadante), en ausencia o presencia de M6P, con su respectiva cuantificación. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas (D.O.) de dos experimentos independientes \pm SE.

1.2 La distribución subcelular de CatD y del CD-MPR en las líneas celulares tumorigénicas y no tumorigénica.

Mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), observamos que en las células tumorigénicas MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D, la CatD presenta una marcación perinuclear

y una distribución granular citoplasmática que se extiende hacia los límites celulares. Sin embargo, en las células MCF-10A la distribución de la enzima no alcanza la periferia celular (figura 1.2.1).

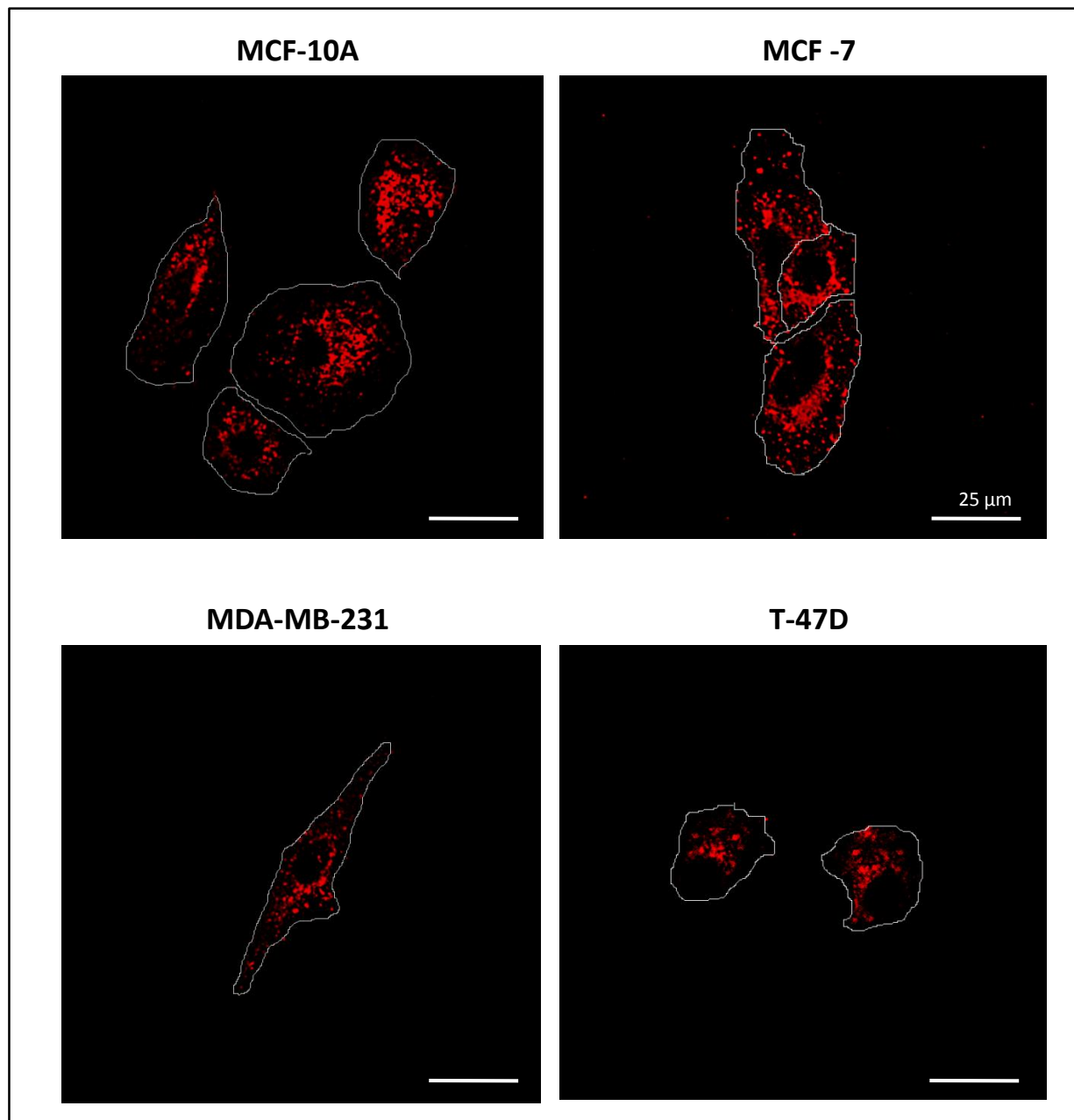


Figura 1.2.1: Distribución de CatD en las líneas celulares mamarias MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D. Inmunofluorescencia indirecta para la detección de CatD. Se utilizó una línea blanca para delimitar los bordes celulares. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

En las líneas celulares que mostraron una distribución diferente de la enzima (células MCF-10A y MCF-7), se estudió si había colocalización entre CatD y LAMP1 (una proteína de localización lisosomal). Se observó que CatD colocaliza con LAMP1 en ambas líneas celulares. Sin embargo, cuando se analizó el coeficiente de colocalización de Manders para evaluar el porcentaje de CatD que colocaliza con LAMP1, se observó que difería entre las células MCF-10A ($0,86 \pm 0,021$) y las MCF-7 ($0,64 \pm 0,0641$). Esta diferencia resultó significativa, lo que sugiere que hay mayor porcentaje de CatD localizada en compartimentos no lisosomales de las células MCF-7 con respecto a las células MCF-10A (figura 1.2.2).

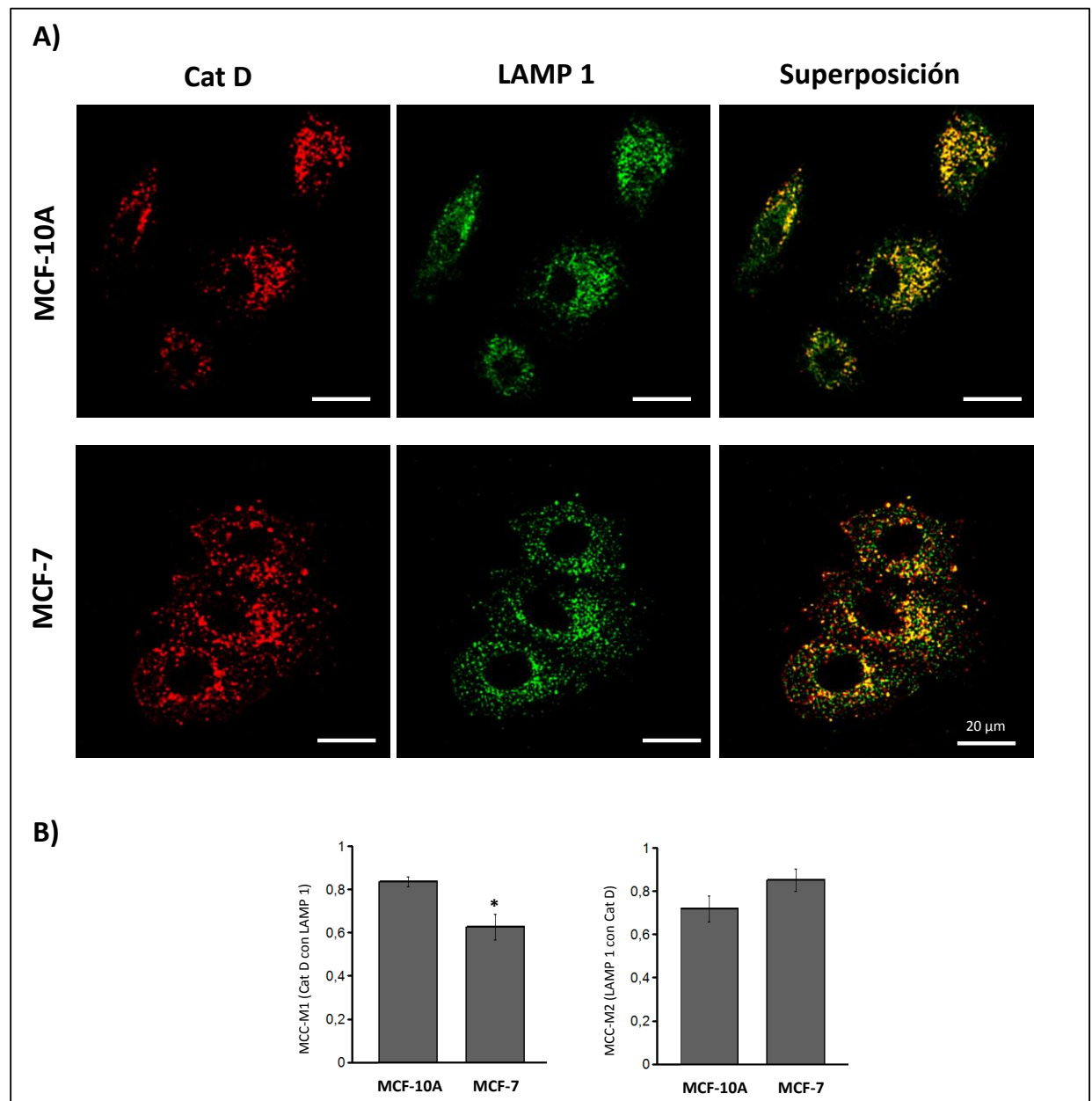


Figura 1.2.2: Colocalización de CatD con LAMP1 en células mamarias MCF-10A y MCF-7.

A) Distribución de CatD y LAMP1 por inmunofluorescencia indirecta en células MCF-10A y MCF-7. **B)** Análisis cuantitativo de colocalización entre CatD y LAMP1 (MCC-M1) y entre LAMP1 y CatD (MCC-M2). Las barras representan los promedios de los coeficientes de correlación \pm SE, calculados a partir de 50 células. (*) Significativamente diferente de MCF-10A ($p < 0,05$). MCC-M1 en MCF-10A: $0,86 \pm 0,021$ y MCC-M1 en MCF-7: $0,64 \pm 0,0641$.

En cuanto al CD-MPR, observamos que presenta una distribución perinuclear en las cuatro líneas celulares, que correspondería al aparato de Golgi ya que colocaliza con la proteína golgina-97 (marcador del trans Golgi) (figura 1.2.3). En las células MCF-7 la distribución subcelular del CD-MPR y golgina-97 resulta más dispersa en comparación con el resto de las líneas celulares. Esto concuerda con la estructura fragmentada que tiene el Golgi en estas células, descrita por otros autores [213]. A su vez, el porcentaje de CD-MPR que colocaliza con golgina-97 en células MCF-7 es significativamente menor con respecto a las otras 3 líneas celulares (figura 1.2.3 C), lo que también justificaría la marcación dispersa que muestra este receptor en las células MCF-7. Por otro lado, la mayor dispersión de la señal del CD-MPR en células MCF-7 va acompañada de un aumento en su intensidad, en comparación a las otras líneas celulares (figura 1.2.3) y en concordancia con lo observado por *western blot*.

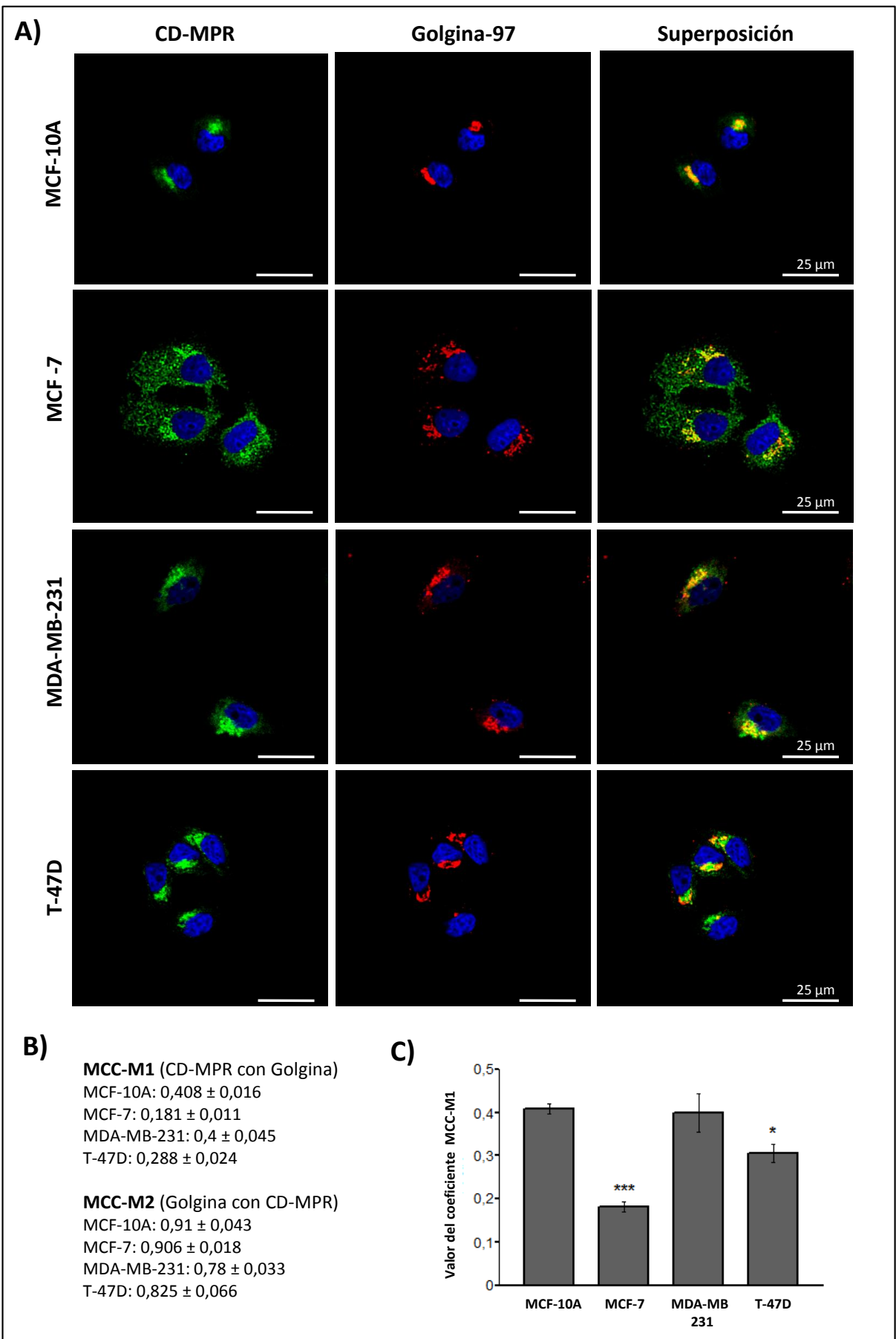


Figura 1.2.3: Distribución del receptor CD-MPR en las líneas celulares MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 y T-47D.

A) Inmunofluorescencia indirecta para la detección del CD-MPR y golgina-97. **B)** Análisis cuantitativo de colocalización entre el CD-MPR y golgina-97 en las cuatro líneas celulares. El coeficiente de Manders MCC-M1 representa el porcentaje de CD-MPR que colocaliza con golgina-97 \pm SE, mientras que el MCC-M2 representa el porcentaje de golgina-97 que colocaliza con el receptor \pm SE, ambos coeficientes calculados a partir de 50 células de cada línea celular. **C)** Comparación del coeficiente de colocalización MCC-M1 obtenido en cada línea celular. (***) Significativamente diferente del resto ($p < 0,001$). (*) Significativamente diferente del resto ($p < 0,05$).

1.3 Los receptores CD-MPR y CI-MPR presentan una distribución diferente en las células MCF-7.

Luego de estudiar la distribución del CD-MPR en las células MCF-7 (figura 1.2.3), analizamos la distribución del receptor CI-MPR. En la figura 1.3.1, observamos que el CI-MPR presenta una distribución citoplasmática con una marca muy evidente en la periferia celular, mientras que el CD-MPR muestra una distribución perinuclear, que se dispersa hacia el resto del citoplasma celular, sin concentrarse en la periferia celular. Al realizar análisis de colocalización con golgina-97, observamos que esta proteína colocaliza con el CI-MPR y con el CD-MPR, en un porcentaje de 78% y 90%, respectivamente (MCC-M2: $0,781 \pm 0,058$ y $0,906 \pm 0,018$). Sin embargo, el porcentaje de CI-MPR que colocaliza con golgina-97 es del 10% (MCC-M1: $0,1 \pm 0,007$), lo que sugiere que el CI-MPR se encuentra distribuido además en otros compartimientos (figura 1.3.1 C2). A su vez, la colocalización del CI-MPR con golgina-97 resultó significativamente menor a la colocalización del CD-MPR con esta proteína (MCC-M1: $0,181 \pm 0,011$) (figura 1.3.1 C3).

Por otro lado, la distribución del CD-MPR y del CI-MPR en las células MCF-7 es muy diferente a la observada en las células no tumorigénicas MCF-10A (figura 1.3.2 A y B).

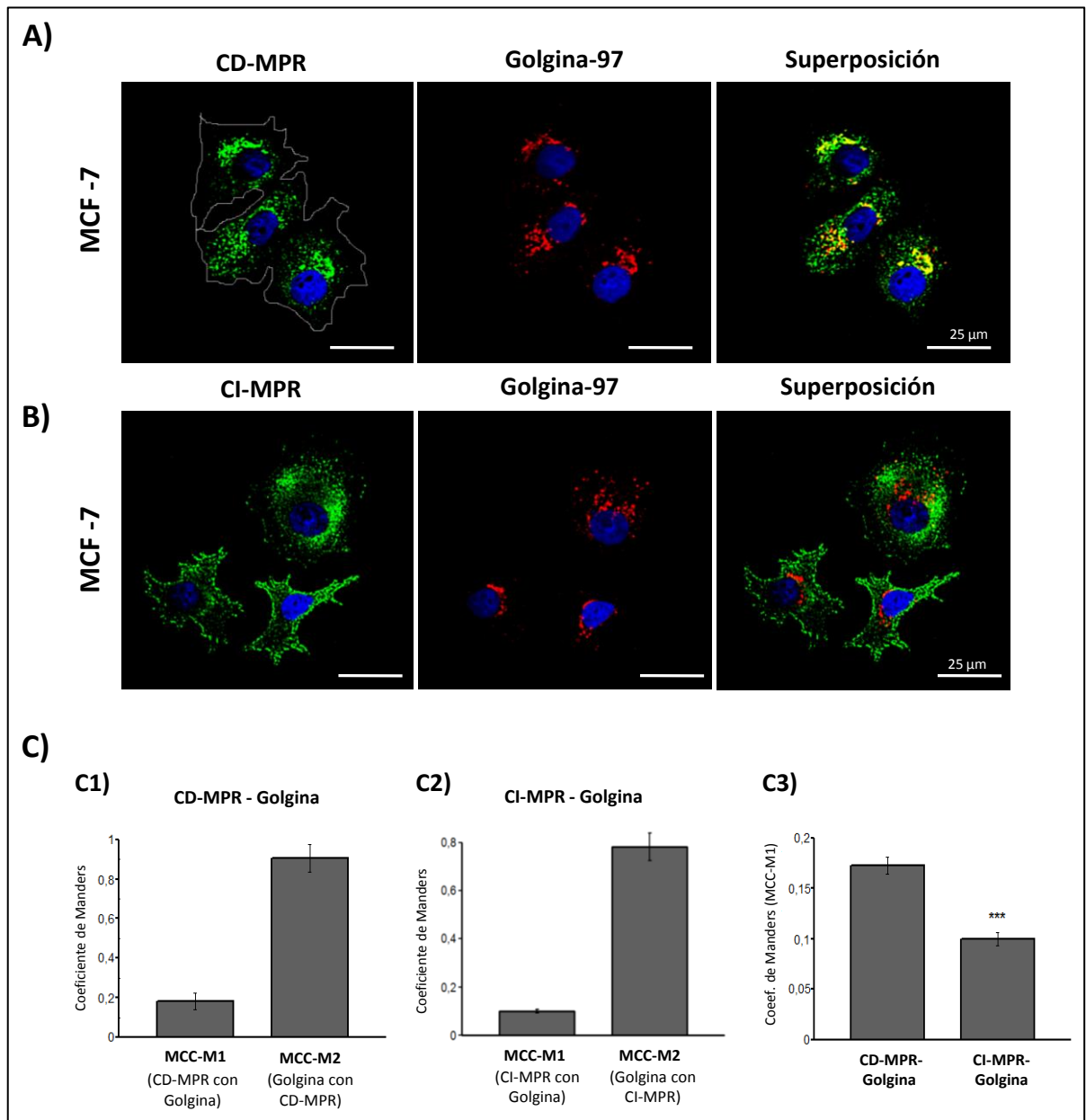


Figura 1.3.1: Distribución del CD-MPR y CI-MPR en células MCF-7.

A y B) Inmunofluorescencia indirecta para la detección simultánea del CD-MPR y golgina-97 y del CI-MPR y golgina-97 en las células MCF-7 (en A, se utilizó una línea blanca para delimitar el borde celular). **C1 y 2)** Análisis cuantitativo de colocalización entre el CD-MPR y golgina-97 y entre el CI-MPR y golgina-97. El coeficiente de Manders MCC-M1 representa el porcentaje de receptor que colocaliza con golgina-97 \pm SE, mientras que el MCC-M2 representa el porcentaje de golgina-97 que colocaliza con el receptor \pm SE, ambos coeficientes calculados a partir de 50 células. **C3)** Comparación del coeficiente de colocalización MCC-M1 obtenido a partir de la colocalización entre CD-MPR y golgina-97 con el MCC-M2 del CI-MPR con golgina-97. (***) Significativamente diferente ($p < 0,001$).

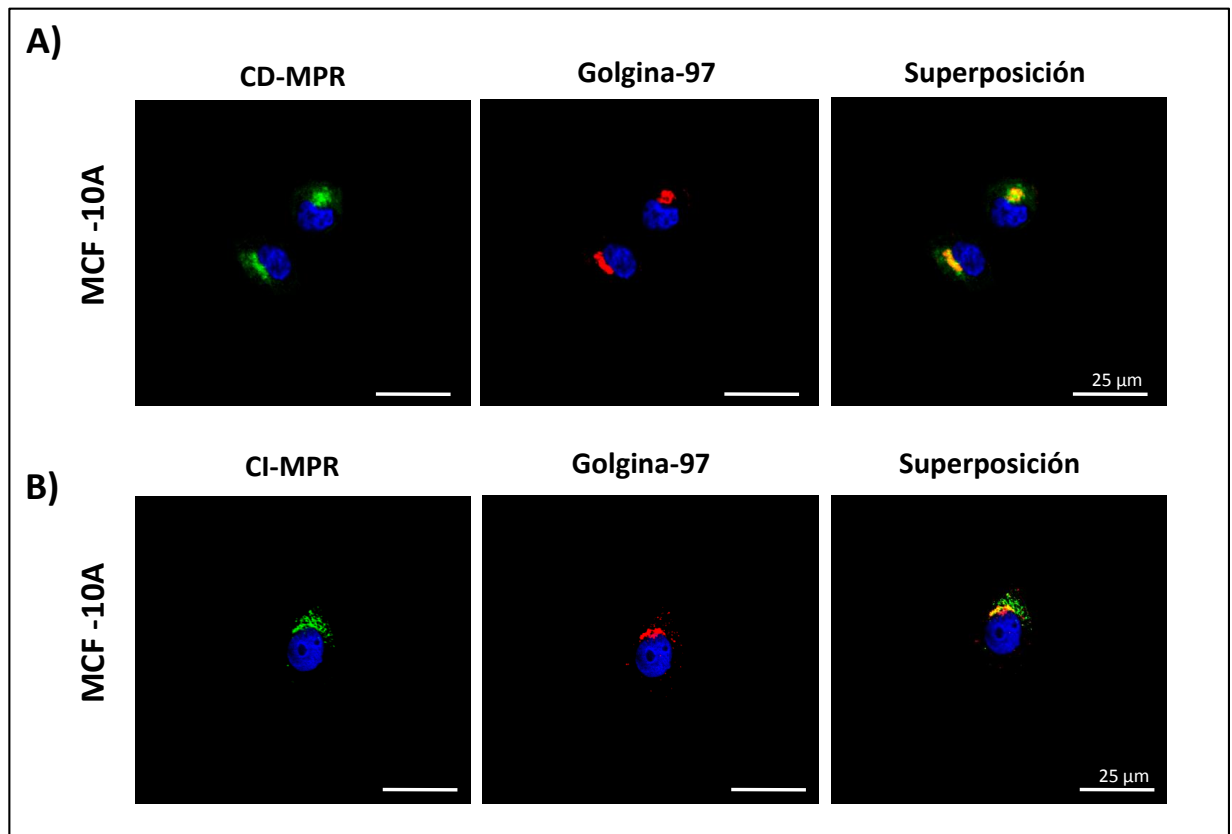


Figura 1.3.2: Distribución del CD-MPR y CI-MPR en células MCF-10A.

A y B) Inmunofluorescencia indirecta para la detección simultánea del CD-MPR y golgina-97 y del CI-MPR y golgina-97 en las células MCF-7. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Conclusiones Parciales

En primer lugar es importante destacar que por primera vez se lleva a cabo un estudio comparativo de la expresión de los receptores CD-MPR, sortilina y CI-MPR entre las cuatro líneas celulares descritas en este trabajo. En segundo lugar, el estudio de los niveles de expresión del CD-MPR en estas células no tenía precedentes ya que, hasta el momento, se había puesto el foco de atención en el CI-MPR. Por todo esto, la determinación de la expresión del CD-MPR y sortilina en estas líneas celulares sienta la base para comenzar con su estudio en distintos aspectos del transporte y secreción de proteínas intracelulares en estas líneas celulares.

Por otro lado, es importante mencionar que tanto el CD-MPR como sortilina son expresados en mayor cuantía por las tres líneas celulares tumorigénicas con respecto a la

no tumorigénica. En cambio, la línea celular no tumorigénica presenta mayores niveles de expresión del CI-MPR. Esto podría estar relacionado con la función de “supresor tumoral” que se le ha atribuido al CI-MPR. Un aspecto que llama la atención es que ninguna de las cuatro líneas celulares coincide en los niveles de expresión de los tres receptores; es decir, aquella con altos niveles del CD-MPR, posee bajos niveles del CI-MPR (i.e. MCF-7), mientras que las células T-47D poseen altos niveles de sortilina y de CI-MPR, y niveles más bajos del CD-MPR; la línea celular que posee bajos niveles de CD-MPR y sortilina, tiene más expresado el CI-MPR (i.e. MCF-10A) y las MDA-MB-231 poseen niveles intermedios de sortilina, bajos de CD-MPR y altos de CI-MPR. Estos resultados hacen pensar en una posible interrelación o interregulación de los receptores y que probablemente estas proteínas puedan actuar, a su vez, como receptores alternativos para el transporte de catepsina D y/o de otras proteínas lisosomales solubles.

Por otro lado, en la línea celular MCF-7, destacamos la diferente distribución de los receptores CD-MPR y CI-MPR (figura 1.3.1). Considerando que el coeficiente de colocalización del CI-MPR con golgina-97 resultó significativamente menor que el coeficiente de colocalización del CD-MPR con golgina-97, y teniendo presentes los elevados niveles de expresión del CD-MPR en esta línea celular (figura 1.1.2), podríamos sugerir que en el Golgi, hay mayor concentración de CD-MPR que de CI-MPR en las células MCF-7. A su vez, resulta llamativa la diferente distribución que presentan estos dos receptores en comparación con la línea celular no tumorigénica MCF-10A (figura 1.3.1 y 1.3.2), donde se observa la marca perinuclear golgiana característica que presenta habitualmente el CD-MPR y el CI-MPR en células epiteliales.

La mayor expresión de CatD en aquellas células que expresan receptores estrogénicos α estaría en consonancia con el hecho de que la enzima posee elementos de respuesta a estrógenos en su genoma. Sin embargo, nuestros resultados muestran esta sobreexpresión en condiciones basales, lo que indicaría que hay algún otro mecanismo de regulación en estos tipos celulares o bien que esta sobreexpresión constituye una característica adquirida durante el proceso tumorigénico que resultó ventajosa para estas células. Al estudiar la distribución de CatD por IFI (figura 1.2.1 y 1.2.2), observamos que en las tres líneas celulares tumorigénicas la enzima alcanza la superficie celular, mientras que en la línea celular no tumorigénica su marca se concentra en la región perinuclear y citoplasmática sin alcanzar la periferia celular. La presencia de CatD en la periferia celular

podría atribuirse a la presencia de poblaciones vesiculares para la secreción de esta enzima por las células tumorigénicas. A su vez, el menor porcentaje de colocalización que presentó CatD con LAMP1 en las células MCF-7 con respecto a las células MCF-10A (figura 1.2.2) sugiere que en esas células tumorigénicas hay un porcentaje de CatD presente en compartimientos LAMP1 negativos, que podrían ser aquellos compartimientos que estén conduciendo la enzima hacia la periferia celular.

Con respecto al hallazgo del fragmento soluble del CI-MPR, es importante destacar que hay algunas evidencias con respecto al mismo en otros modelos. La existencia de un fragmento soluble ha sido descrita en el suero de ratas, siendo su expresión regulada a lo largo del desarrollo fetal y neonatal [40][214]. Por otro lado, se ha sugerido su participación en la proliferación de hepatocitos, fibroblastos [215], en líneas celulares mieloides y linfoides [216] y en algunos modelos de tumores sólidos [217][218]. En algunos trabajos se le ha atribuido una función anti-tumoral [217] [218] pero aún no está totalmente dilucidada su función en cáncer ni el mecanismo por el cual es secretado.

PARTE 2

Regulación Hormonal del Transporte Intracelular de Catepsina D en las Líneas Celulares Mamarias Tumorigénicas MCF-7 y T-47D.

Considerando que los niveles de expresión de CatD y del CD-MPR en células MCF-7 son elevados, que la enzima posee un elemento de respuesta a estrógenos en su genoma y que esta línea celular expresa receptores estrogénicos α , decidimos evaluar el efecto del 17- β -estradiol sobre la expresión y distribución de CatD y del CD-MPR, además del CI-MPR y sortilina. Aunque enfocamos nuestro estudio en las células MCF-7, algunos ensayos fueron llevados a cabo también en las células T-47D.

2.1 El 17- β -estradiol induce sobreexpresión y redistribución de la catepsina D y del CD-MPR en células tumorales que expresan receptores estrogénicos.

2.1.1 Expresión y distribución de catepsina D en células MCF-7, en presencia de 17- β -estradiol.

Como se observa en la figura 2.1.1.A, los niveles de expresión de CatD se incrementaron en presencia de 17- β -estradiol en las células MCF-7 desde las 12 h de incubación, siendo significativos a las 24 y 48 h de tratamiento, con respecto a los controles. Por otro lado, observamos que el tratamiento con tamoxifeno, una droga antiestrogénica, revirtió la sobreexpresión inducida por la hormona. A su vez, el estradiol indujo una redistribución de CatD hacia la periferia de las células, lo que podría estar correlacionado con la mayor secreción de la enzima inducida por esta hormona (figura 2.1.1.B).

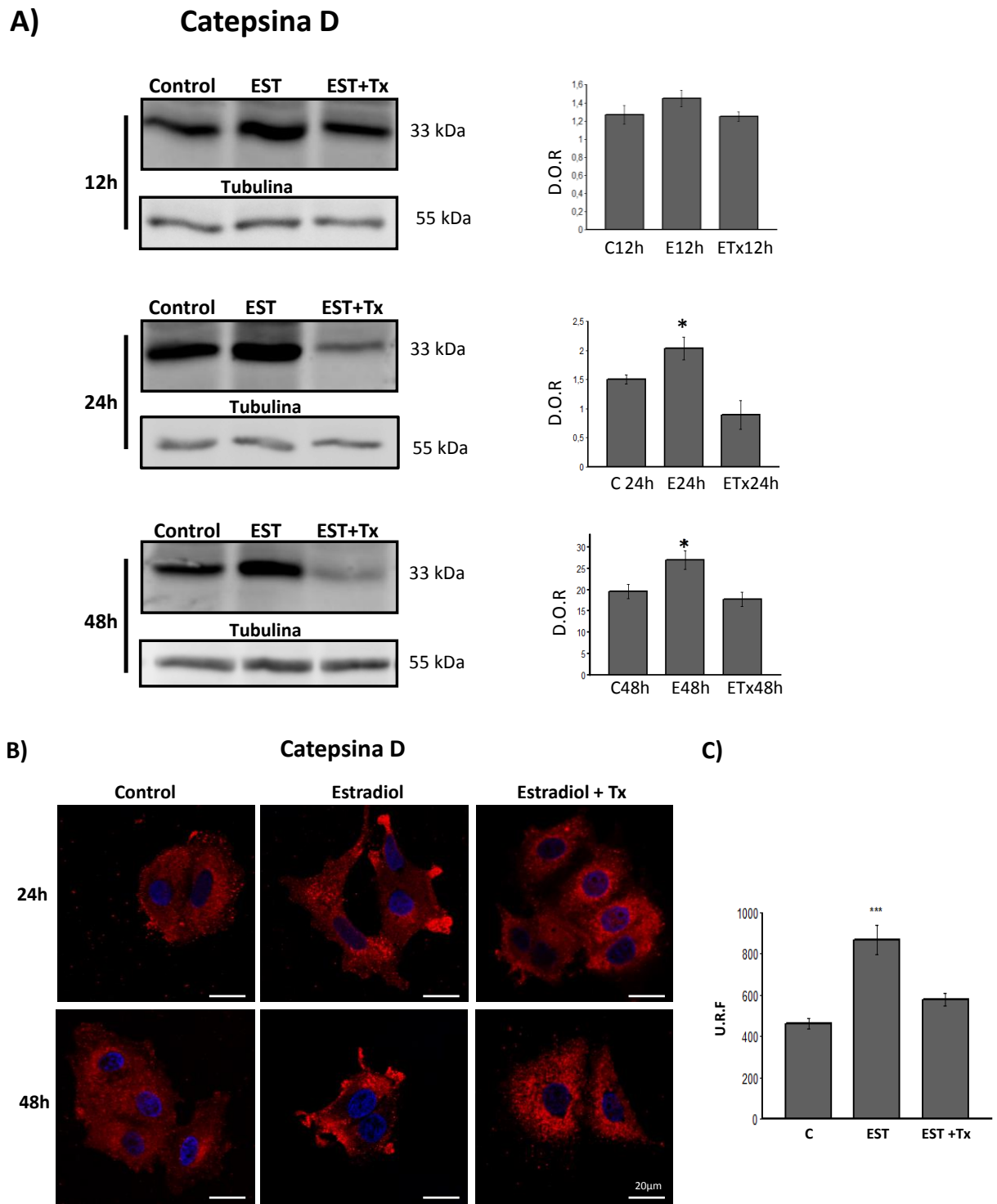


Figura 2.1.1: Efecto del 17- β estradiol sobre la expresión y distribución de CatD en células MCF-7.

Las células fueron cultivadas durante 12, 24 o 48 h en las siguientes condiciones experimentales: en presencia de estradiol (EST) 20 nM o en presencia de EST 20 nM y tamoxifeno 2 μ M (EST + Tx). **A)** “Inmunoblot” representativo para la detección de CatD en las condiciones experimentales mencionadas y su cuantificación correspondiente. Las barras de las 24 y 48 h representan los promedios de las densidades

ópticas relativas (D.O.R) de tres experimentos independientes \pm SE, y las barras de las 12h representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de dos experimentos independientes \pm SE. (*) Significativamente diferente del resto ($p < 0.05$). La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. **B)** Distribución de Catepsina D por inmunofluorescencia indirecta a las 24 y 48 h de tratamiento. **C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de CatD en células MCF-7 controles y tratadas con EST o EST+Tx. Las barras representan los promedios de las intensidades de fluorescencia media de 60 células por condición experimental \pm SE. (***) Significativamente diferente del resto ($p < 0,001$). U.R.F: unidades relativas de fluorescencia.

2.1.2 Expresión y distribución del CD-MPR en células MCF-7 en presencia de 17- β estradiol.

La expresión y distribución del CD-MPR fue estudiada bajo las mismas condiciones de tratamiento. Se observó que el receptor aumenta su expresión en respuesta al 17- β -estradiol, siendo estadísticamente significativo a las 24 y 48 h de tratamiento. Este efecto también fue revertido por el tamoxifeno (figura 2.1.2 A). A su vez, la hormona esteroideal indujo una aparente redistribución del receptor hacia la periferia de la célula, tal como se evidencia en la figura 2.1.2 B.

A) CD-MPR

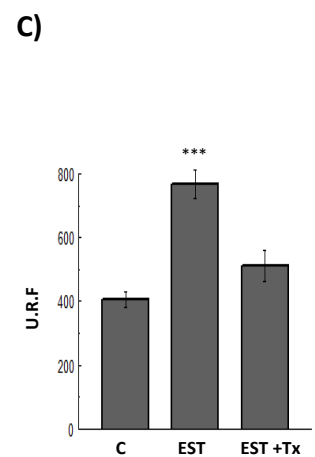
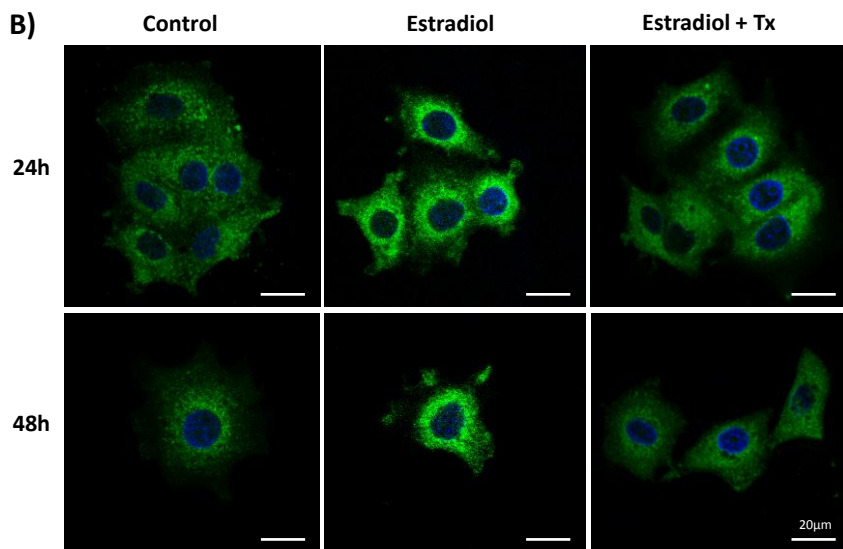
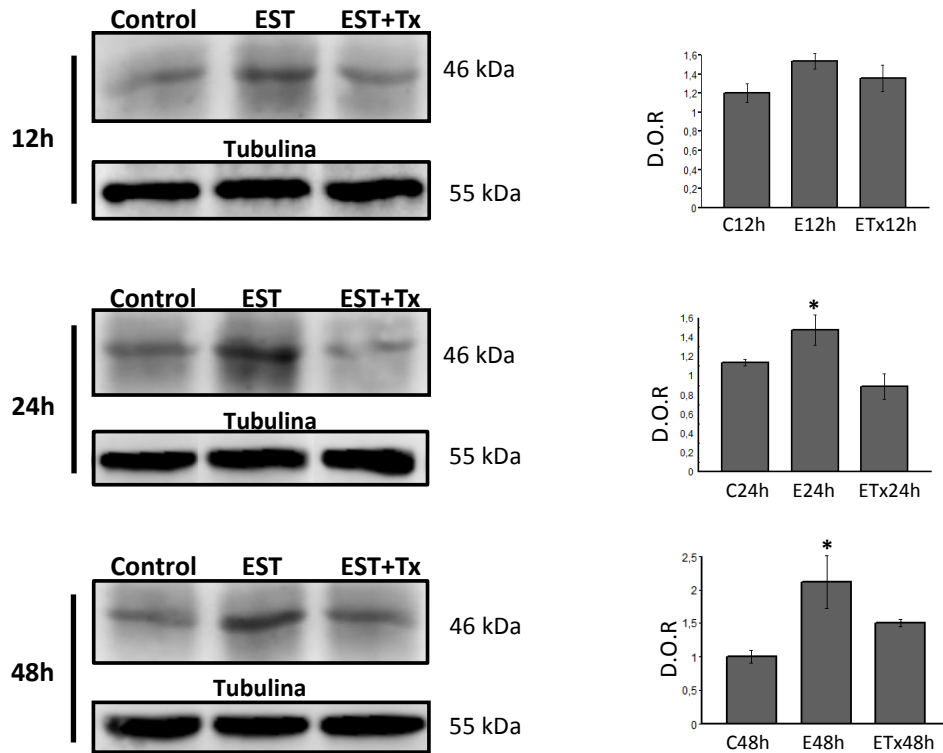


Figura 2.1.2: Efecto del 17- β estradiol sobre la expresión y distribución del CD-MPR en células MCF-7. Las células fueron cultivadas durante 12, 24 y 48 h en las siguientes condiciones experimentales: en presencia de 20 nM de estradiol (EST) o en presencia de EST y 2 μ M de tamoxifeno (EST + Tx). **A)** "Inmunoblot" representativo para la detección del CD-MPR en las condiciones experimentales mencionadas y su cuantificación correspondiente. Las barras de las 24 y 48 h representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de tres experimentos independientes \pm SE, y las barras de las 12h representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de dos experimentos independientes

± SE. (*) Significativamente diferente respecto de EST+Tx 24h y de C 48h ($p < 0.05$). La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. **B)** Distribución del CD-MPR a las 24 y 48 h de tratamiento, observada por IFI. **C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de CD-MPR en células MCF-7 controles y tratadas con EST o EST+Tx. Las barras representan los promedios de las intensidades de fluorescencia media de 60 células por condición experimental ± SE. (***) Significativamente diferente del resto ($p < 0,001$). U.R.F: unidades relativas de fluorescencia.

2.1.3 Efecto del 17- β -estradiol sobre la expresión de CatD y del CD-MPR en células T-47D.

Evaluamos el efecto del estradiol sobre la catepsina D y el CD-MPR en la otra línea celular que expresa receptores estrogénicos α (T-47D). En este modelo celular se pudo observar una tendencia similar a la de las células MCF-7 en respuesta al tratamiento con la hormona; el CD-MPR y la CatD aumentaron en presencia de estradiol, efecto bloqueado por el tamoxifeno (figura 2.1.3).

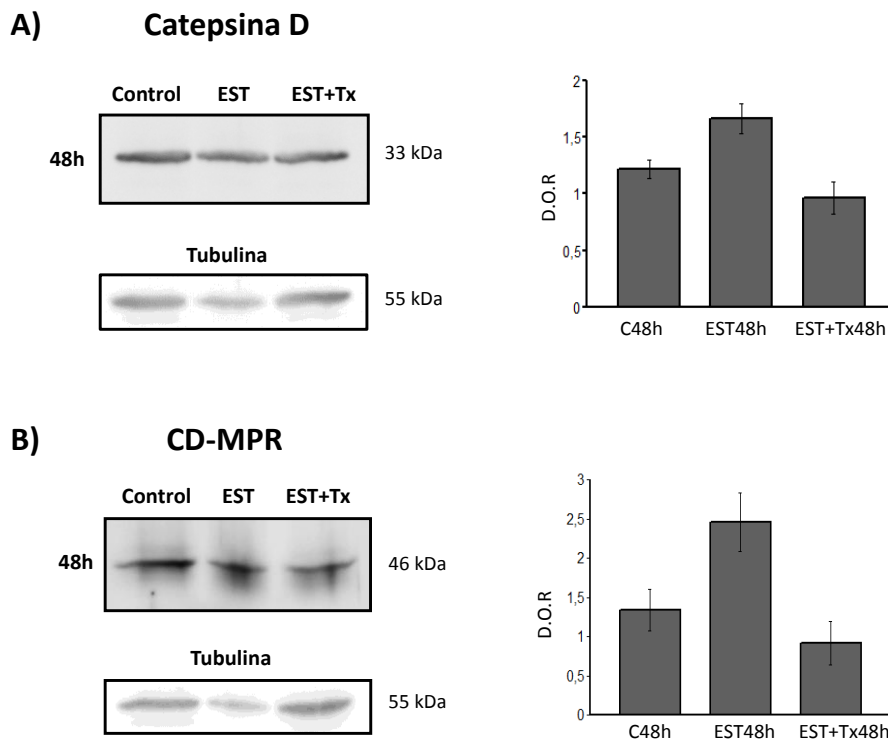


Figura 2.1.3: Efecto del 17- β -estradiol sobre la expresión de CatD y del CD-MPR en células T-47D.

Las células T-47D fueron cultivadas durante 48h en las siguientes condiciones experimentales: en presencia de EST 20nM o en presencia de EST 20nM y de tamoxifeno 2 μ M (EST + Tx). **A)** "Inmunoblot" para la

detección de Cat D en las condiciones experimentales mencionadas y su cuantificación correspondiente. **B)** “Inmunoblot” representativo para la detección del CD-MPR en las condiciones experimentales mencionadas y su cuantificación correspondiente. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de dos experimentos independientes \pm SE.

2.1.4 El 17- β estradiol no induce cambios en la expresión de CatD ni en la del CD-MPR en las células MCF-10A.

Con el fin de confirmar si el efecto del estradiol sobre la expresión de CatD y del CD-MPR es mediado por los RE α , expusimos células que no expresan estos receptores (MCF-10A) a los tratamientos con EST y EST+Tx durante 48 h. Posteriormente, determinamos los niveles de expresión de las proteínas estudiadas y encontramos que el estradiol no indujo cambios significativos en la expresión de CatD ni del CD-MPR (figura 2.1.4).

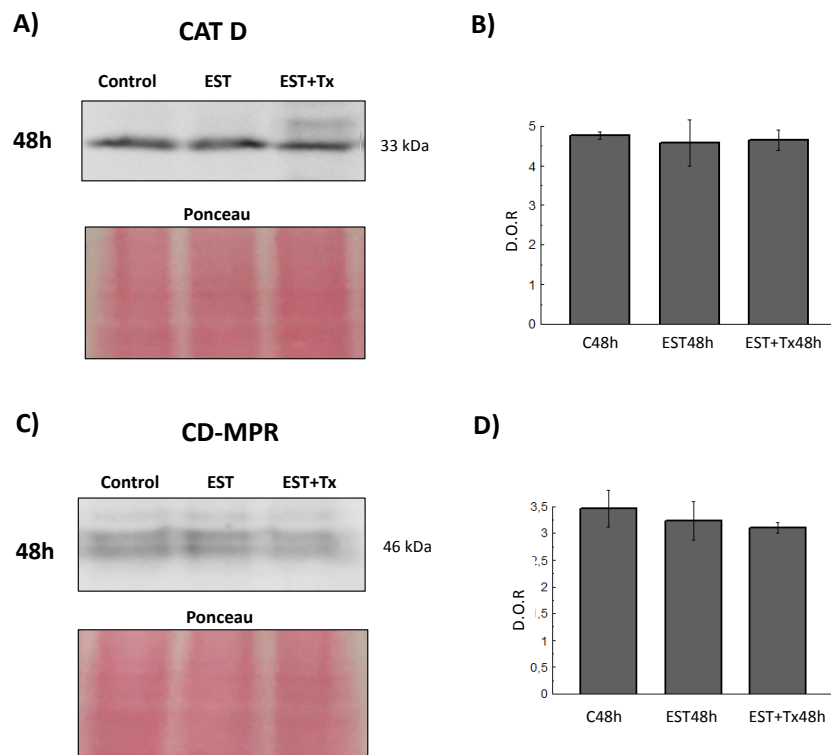


Figura 2.1.4: Efecto del 17- β estradiol sobre la expresión de CatD y del CD-MPR en células que no expresan receptores estrogénicos α (MCF-10A). Las células fueron cultivadas durante 48h en presencia de 20 nM de estradiol (EST) o en presencia de EST + 2 μ M de tamoxifeno (EST + Tx). **A)** “Inmunoblot” para la detección CatD y **B)** del CD-MPR. **C y D)** Las barras representan los promedios de las densidades ópticas

relativas (D.O.R) de dos experimentos independientes \pm SE. Como control de carga se utilizó la tinción de las membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau.

2.1.5 Acción del tamoxifeno en la expresión y procesamiento de Catepsina D en células MCF-7.

Como describimos en la figura 1.1.1, las líneas celulares que expresan RE α (MCF-7 y T-47D) presentan una expresión basal de CatD muy elevada en comparación a las otras dos líneas celulares. Con el fin de determinar si esta elevada expresión basal de la enzima podría ser consecuencia de una estimulación de los RE α , aún en ausencia de administración exógena de 17- β estradiol, decidimos tratar las células con el agente antiestrogénico tamoxifeno (Tx). Inesperadamente la expresión total de CatD no disminuyó debido al Tx (figura 2.1.5.1 A y C). Sin embargo, se observó una disminución en el procesamiento de la enzima, manifestada por un aumento de su forma inmadura (figura 2.1.5.1 A y B). Resulta llamativo que el efecto del Tx sobre el procesamiento de la enzima no se observa en presencia de estradiol (figura 2.1.5.1 D), aunque se puede observar una disminución del contenido intracelular total de CatD con respecto a las células tratadas sólo con la hormona (figura 2.1.5.1 D y E), corroborándose el efecto antiestrogénico esperado del Tx.

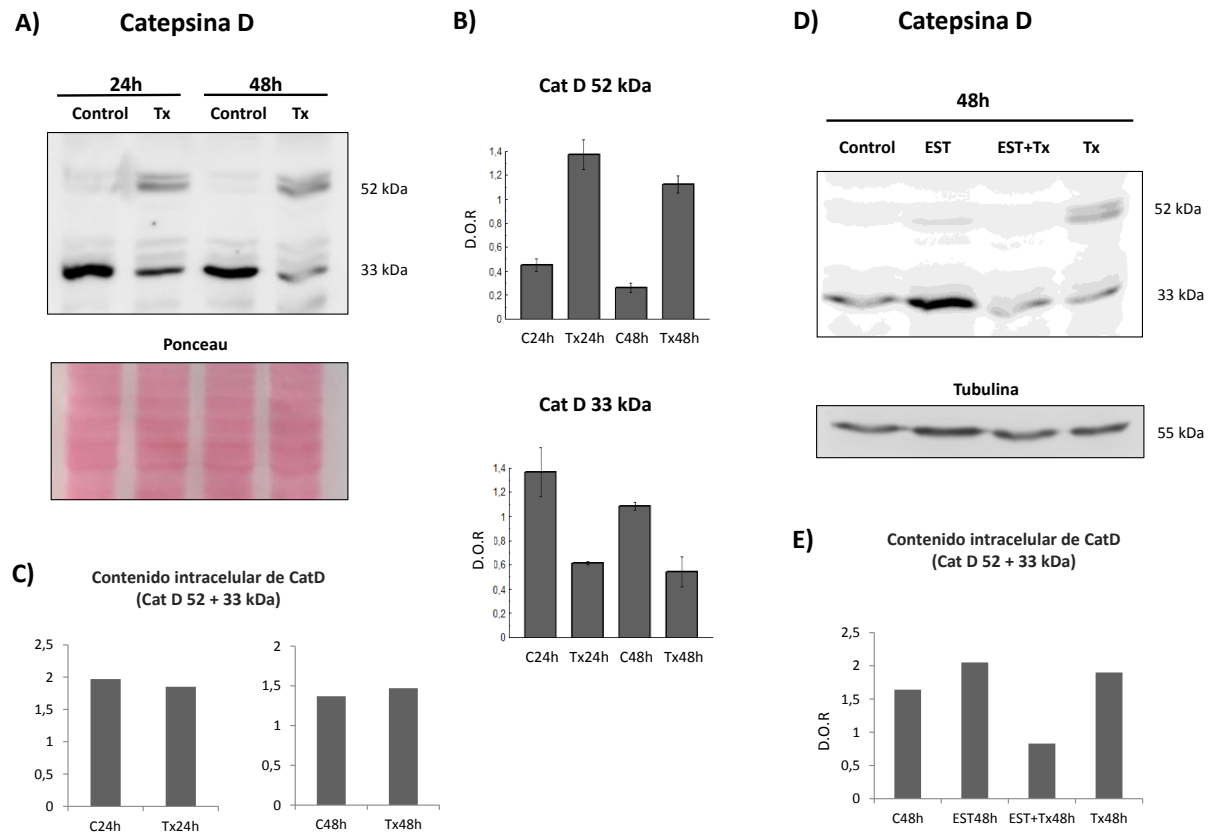


Figura 2.1.5.1: Efecto del tamoxifeno en la expresión y procesamiento de CatD en células MCF-7.

Células MCF-7 fueron cultivadas durante 24 y 48 h en condiciones control o tratadas con: 20 nM estradiol (EST), 20 nM EST + 2 μ M de tamoxifeno (EST + Tx), o 2 μ M tamoxifeno (Tx). **A)** “Inmunoblot” para la detección de CatD en condiciones controles o tratadas con Tx por 24 y 48 h. **B)** Cuantificación de las formas inmadura (52 kDa) y madura (33 kDa) de CatD. Como control de carga se utilizó la tinción de las membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de dos experimentos independientes \pm SE. **C)** Cuantificación del contenido intracelular total de CatD, calculado a partir de la sumatoria de las D.O.R de las formas madura e inmadura de CatD. **D)** “Inmunoblot” para la detección CatD en condiciones control o en presencia de EST, EST+Tx o Tx. **E)** Cuantificación del contenido intracelular total de CatD, calculado a partir de la sumatoria de las D.O.R de las formas madura e inmadura de CatD. Como control de carga se utilizó tubulina.

A raíz del efecto del tamoxifeno sobre el procesamiento de la enzima CatD, quisimos verificar si el mismo es independiente de los RE α . Para ello, incubamos células MCF-10A (que no expresan receptores estrogénicos) en presencia de tamoxifeno 2 μ M. Por “inmunoblot” observamos que en esta línea celular, el tamoxifeno también indujo un

aumento de la forma inmadura de CatD similar a las MCF-7, acompañado de una disminución de su forma madura, confirmando que este efecto no estaría siendo mediado por los RE α (figura 2.1.5.2).

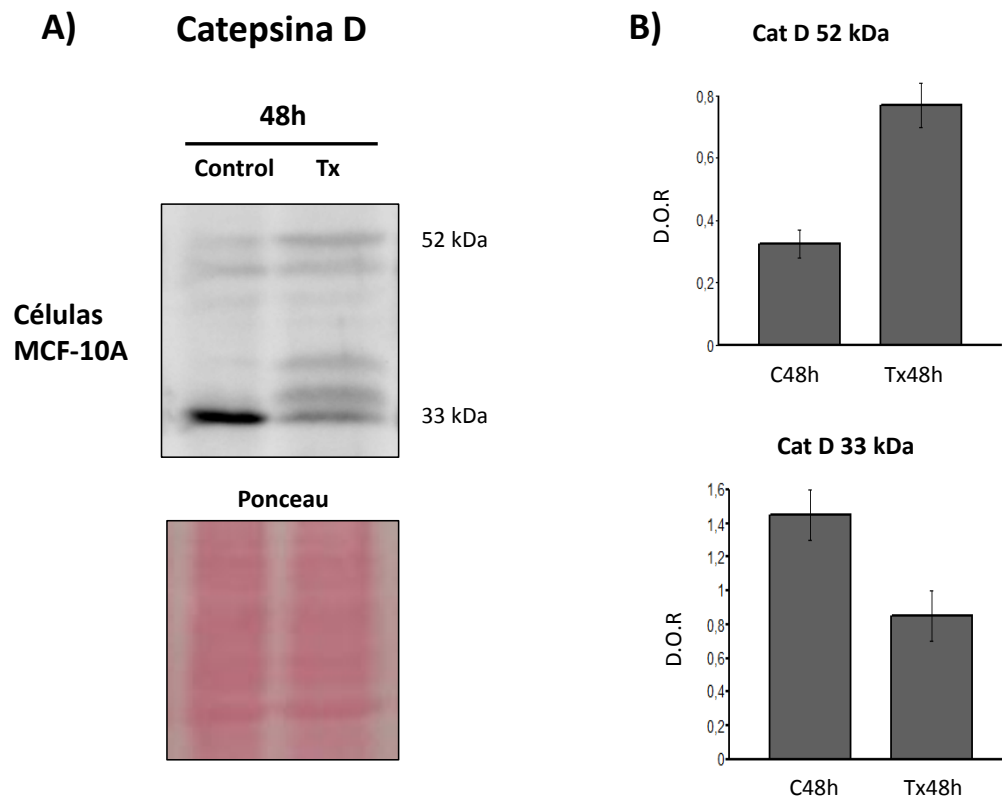


Figura 2.1.5.2: Efecto del tamoxifeno sobre la expresión de CatD en células MCF-10A.

A) Células MCF-10A fueron cultivadas durante 48 h en condiciones control o tratadas con 2 μ M tamoxifeno (Tx). "Inmunoblot" para la detección CatD. **B)** Cuantificación de las formas inmadura (52 kDa) y madura (33 kDa) de CatD. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de dos experimentos independientes \pm SE. Como control de carga se utilizó la tinción de las membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau.

2.1.6 El 17- β -estradiol modifica la distribución de la CatD y del CD-MPR en las células MCF-7 sin alterar el grado de colocación entre ambas proteínas.

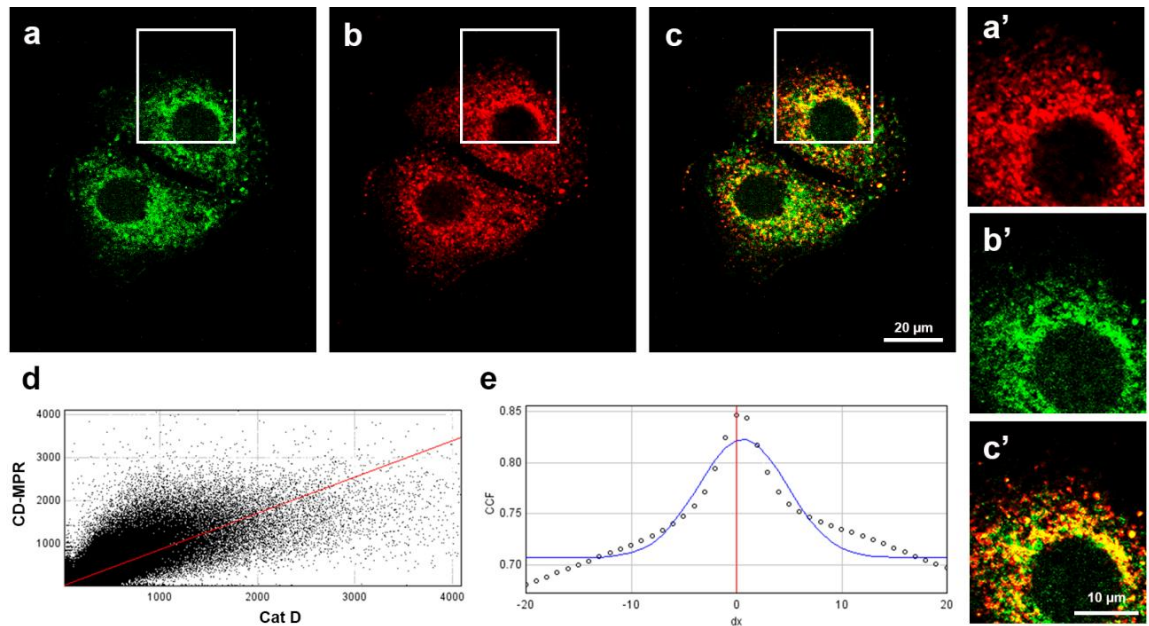
Debido a que tanto la enzima CatD como el receptor CD-MPR muestran un comportamiento similar frente al estradiol, y basados en el antecedente de que la enzima

es transportada por el CD-MPR en otros modelos celulares, realizamos la detección simultánea de ambas proteínas para ver si había algún grado de colocalización entre ellas. En las células MCF-7 bajo condiciones controles y tratadas (con estradiol o estradiol + tamoxifeno) durante 24 h observamos colocalización entre la CatD y el CD-MPR, lo que podría sugerir que la enzima esté siendo efectivamente transportada por el receptor. Para determinar el grado de colocalización entre el CD-MPR y CatD se utilizaron los coeficientes de colocalización de Pearson (PCC), de Manders 1 (MCC-M1) y de Manders 2 (MCC-M2).

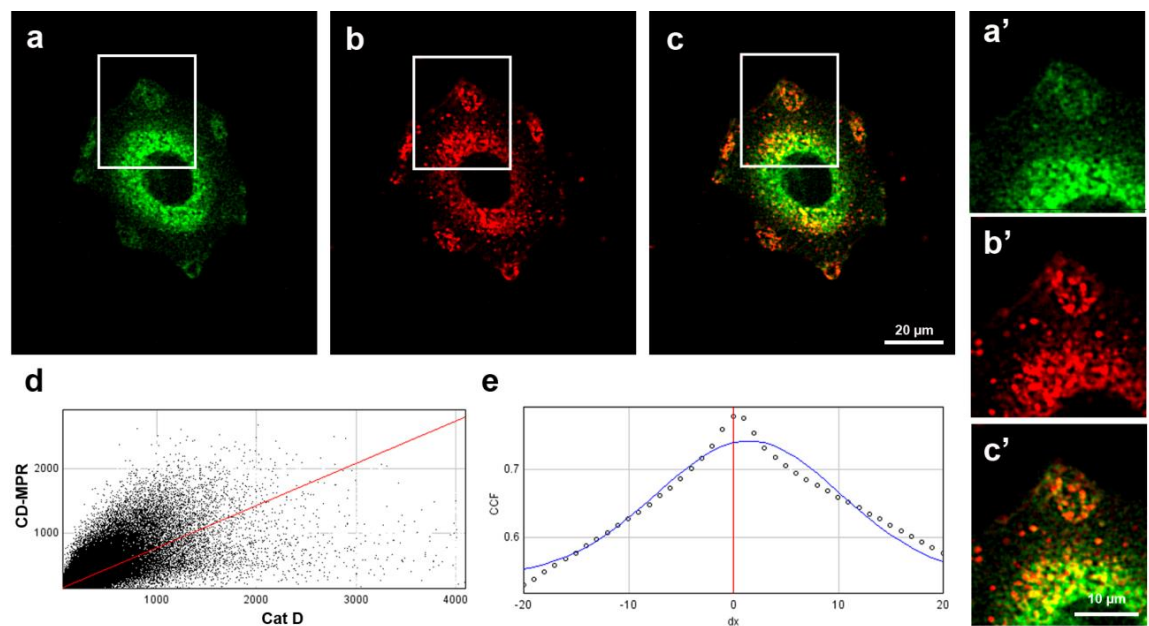
El valor PCC en condición control fue de $0,708 \pm 0,04$, lo que indica colocalización parcial. Sin embargo, por medio de un coeficiente independiente de la intensidad de tinción, MCC, encontramos que el MCC-M1 fue de $0,81 \pm 0,06$ y que el MCC-M2 de $0,95 \pm 0,05$. El primer valor sugiere una alta colocalización de la enzima con el receptor, y el segundo valor, cercano a 1, indica que la colocalización del CD-MPR con CatD es casi completa (figura 2.1.6 A). Los valores de los coeficientes de colocalización arrojados bajo las otras dos condiciones experimentales fueron similares (figura 2.1.6 B y C). Por otro lado, la forma de la curva CCF en todas las condiciones estudiadas demuestra que la colocalización no es aleatoria.

Si bien los tratamientos con estradiol o con estradiol + tamoxifeno no modificaron significativamente el grado de colocalización entre la CatD y el CD-MPR, la hormona esteroideal generó un cambio en la distribución de ambas proteínas, conduciéndolas hacia la periferia celular, agrupándose en estructuras granulares. Este efecto fue claramente revertido en presencia de tamoxifeno, donde prácticamente no se observó presencia del receptor ni de la enzima en la periferia celular (figura 2.1.6).

A) CONTROL



B) ESTRADIOL



C) ESTRADIOL + TAMOXIFENO

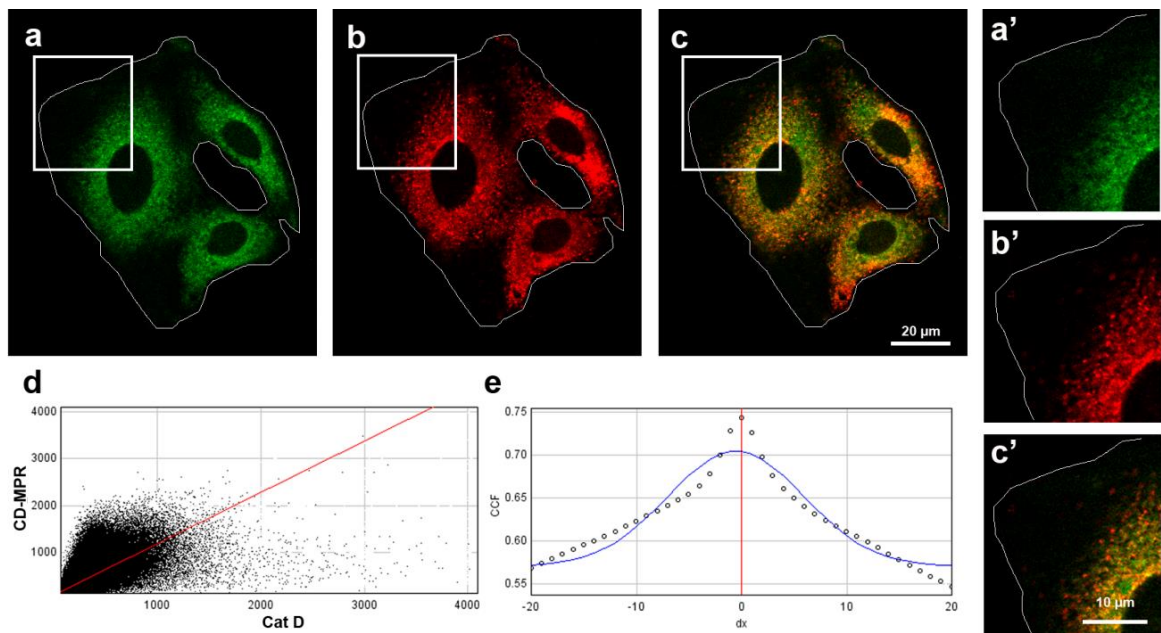


Figura 2.1.6: Colocalización de catepsina D y del CD-MPR en células MCF-7.

Inmunofluorescencia indirecta para la detección de **a)** CD-MPR y **b)** CatD. **c)** Superposición. **d)** Gráfico de dispersión de los eventos de colocalización para CD-MPR vs CatD. **e)** Curva de función de correlación cruzada. **a'b'c')** Ampliación de las áreas seleccionadas en a, b y c, respectivamente. **A)** Control (PCC= 0,708 ± 0,04) **B)** Tratadas con EST durante 24 h (PCC= 0,776 ± 0,03) **C)** Tratadas con EST + Tx durante 24 h (PCC= 0,792 ± 0,05). Imagen representativa de cuatro experimentos independientes, donde se analizaron tres fotografías por preparado. Total: 12 imágenes por cada condición experimental.

2.1.7 El 17-β estradiol induce una redistribución del CD-MPR hacia fracciones celulares livianas en las células MCF-7.

Analizamos las fracciones subcelulares de las células MCF-7 mediante un gradiente discontinuo de sacarosa, bajo las condiciones control o tratadas con estradiol y estradiol + tamoxifeno. Como se observa en la figura 2.1.7.1.A, en las células tratadas con la hormona esteroidea una proporción del contenido total del CD-MPR celular se redistribuyó a fracciones celulares más “livianas”, en comparación con la condición control. Las densidades de dichas fracciones se corresponden con la distribución de marcadores de la membrana plasmática, según datos de la bibliografía [219]. A su vez, también corroboramos la mayor expresión del receptor en respuesta a la hormona. Ambos efectos fueron atenuados por la presencia del tamoxifeno (figura 2.1.7.1).

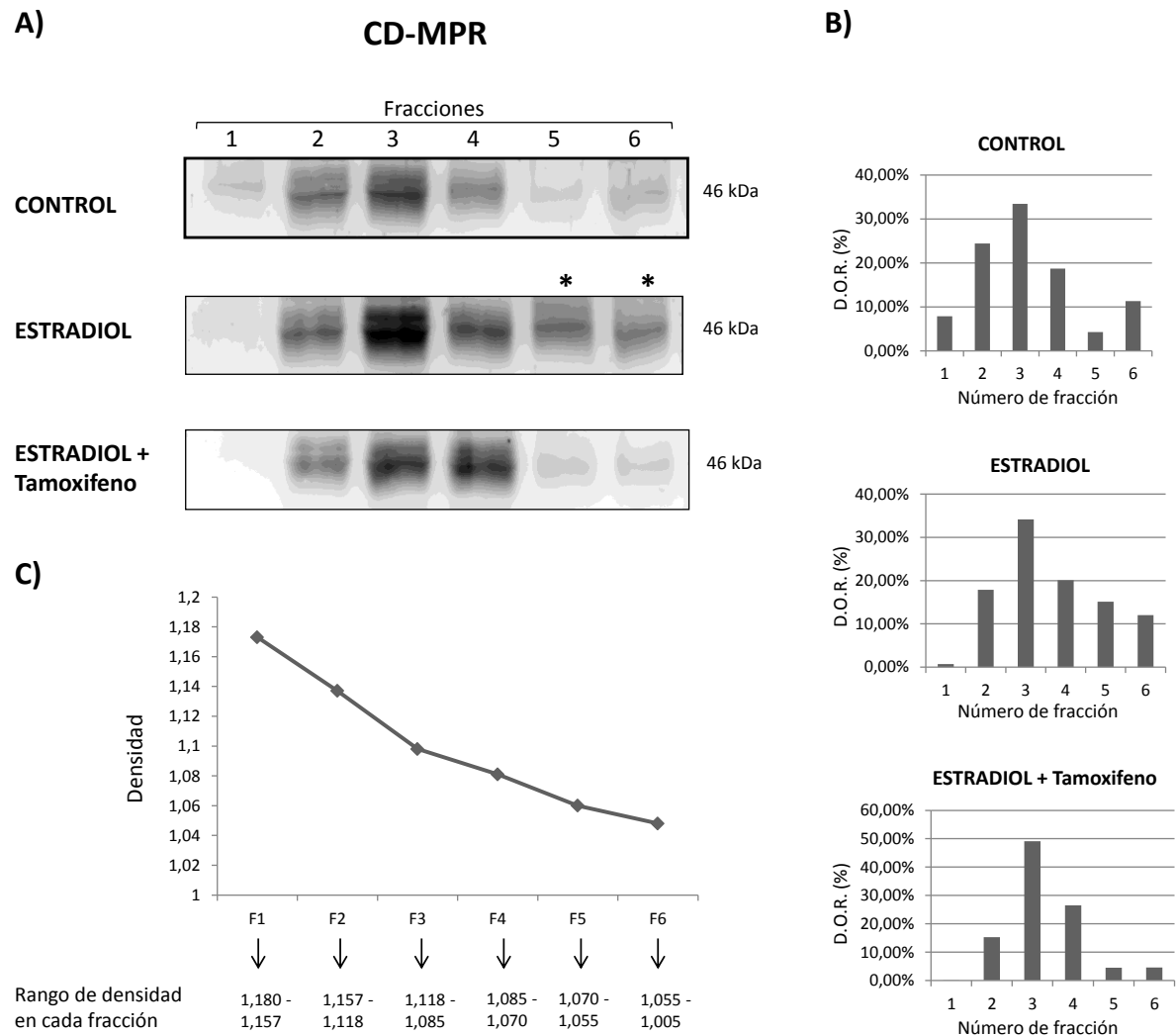


Figura 2.1.7.1: Efecto del 17- β -estradiol y tamoxifeno sobre la distribución del CD-MPR en células MCF-7. Homogenatos de células MCF-7 controles, tratadas con estradiol o con estradiol + tamoxifeno durante 24 h fueron aplicados a gradientes discontinuos de sacarosa. **A)** “Inmunoblot” representativo para la detección del CD-MPR en las fracciones subcelulares obtenidas del gradiente discontinuo de densidad. **B)** Distribución (en porcentaje) del CD-MPR según cuantificación de la densitometría óptica de cada fracción en las condiciones experimentales indicadas. **C)** Densidad de cada fracción del gradiente estimada desde la relación peso/volumen.

Como se puede observar en la figura 2.1.7.2, en condiciones controles, las fracciones pesadas están enriquecidas con el CD-MPR, mientras que en presencia de estradiol la mayor proporción del CD-MPR se encuentra en las fracciones livianas. Con estradiol más tamoxifeno, el receptor fue encontrado mayoritariamente distribuido en la zona media y escasamente en las fracciones livianas.

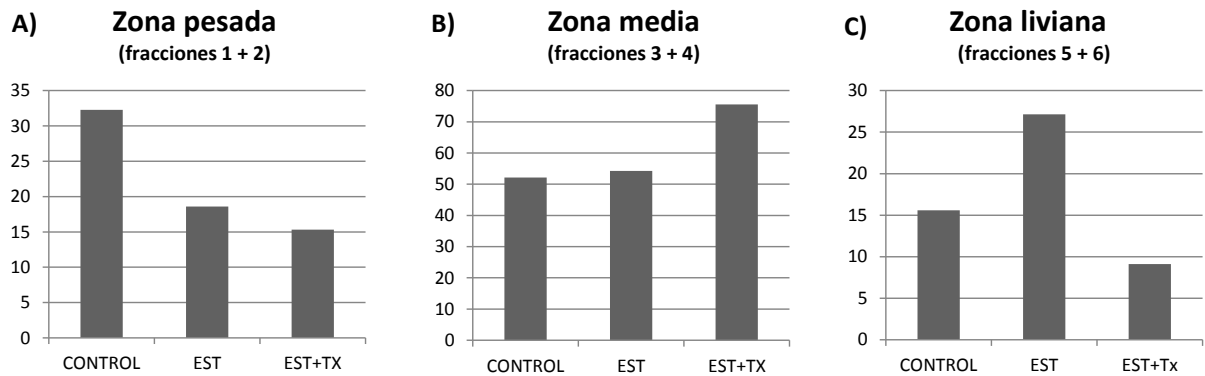


Figura 2.1.7.2: Efecto del 17-β-estradiol y tamoxifeno sobre la distribución del CD-MPR en células MCF-7. Cada gráfica representa el porcentaje de CD-MPR presente en las fracciones pesadas (1-2), medias (3-4) y livianas (5-6) obtenidas del gradiente de sacarosa, en las tres condiciones experimentales. **A)** Porcentaje del receptor presente en zona pesada, para cada condición. **B)** Porcentaje del receptor presente en zona media, para cada condición. **C)** Porcentaje del receptor presente en la zona liviana, para cada condición.

2.2 Efecto del 17-β- estradiol sobre la expresión de sortilina y del CI-MPR en células MCF-7.

Extendimos nuestro estudio al efecto del estradiol sobre los otros dos receptores posiblemente involucrados en el transporte de la enzima, Sort y CI-MPR. Por “inmunoblot” podemos observar una disminución en la expresión de sortilina en presencia de estradiol, pero este efecto no fue bloqueado por el tamoxifeno (figura 2.2.1).

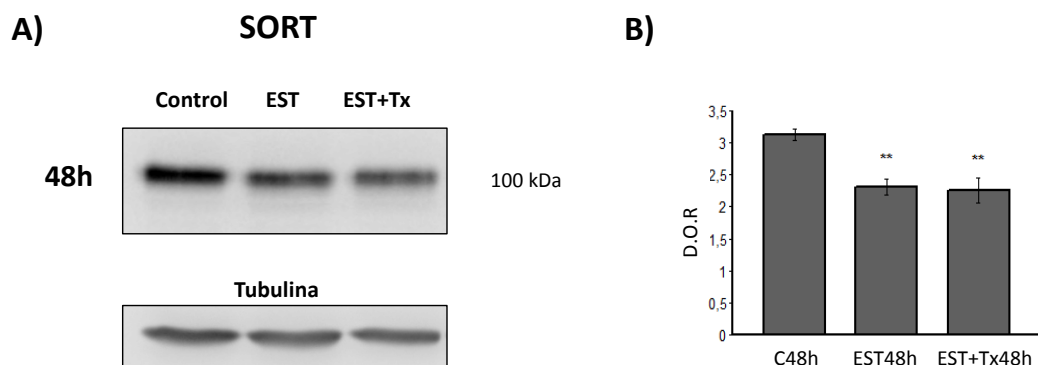


Figura 2.2.1: Efecto del 17-β estradiol sobre la expresión de sortilina en células MCF-7. Las células fueron cultivadas durante 48 h en presencia de 20 nM de estradiol (EST) o en presencia de EST y 2 μM de tamoxifeno (EST + Tx). **A)** “Inmunoblot” representativo para la detección de Sort. **B)** Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de tres experimentos independientes ± SE. (**)

Significativamente diferente respecto de C 48h ($p < 0.01$). La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga.

Un efecto similar ocurrió con el CI-MPR, donde el estradiol disminuyó la expresión del receptor maduro (300 kDa), y no fue bloqueado por el tamoxifeno (figura 2.2.2). Sin embargo, el estradiol aparentemente no generó cambios sobre el fragmento de 100 kDa, dado que su expresión se mantuvo en niveles relativamente similares entre las condiciones experimentales ensayadas.

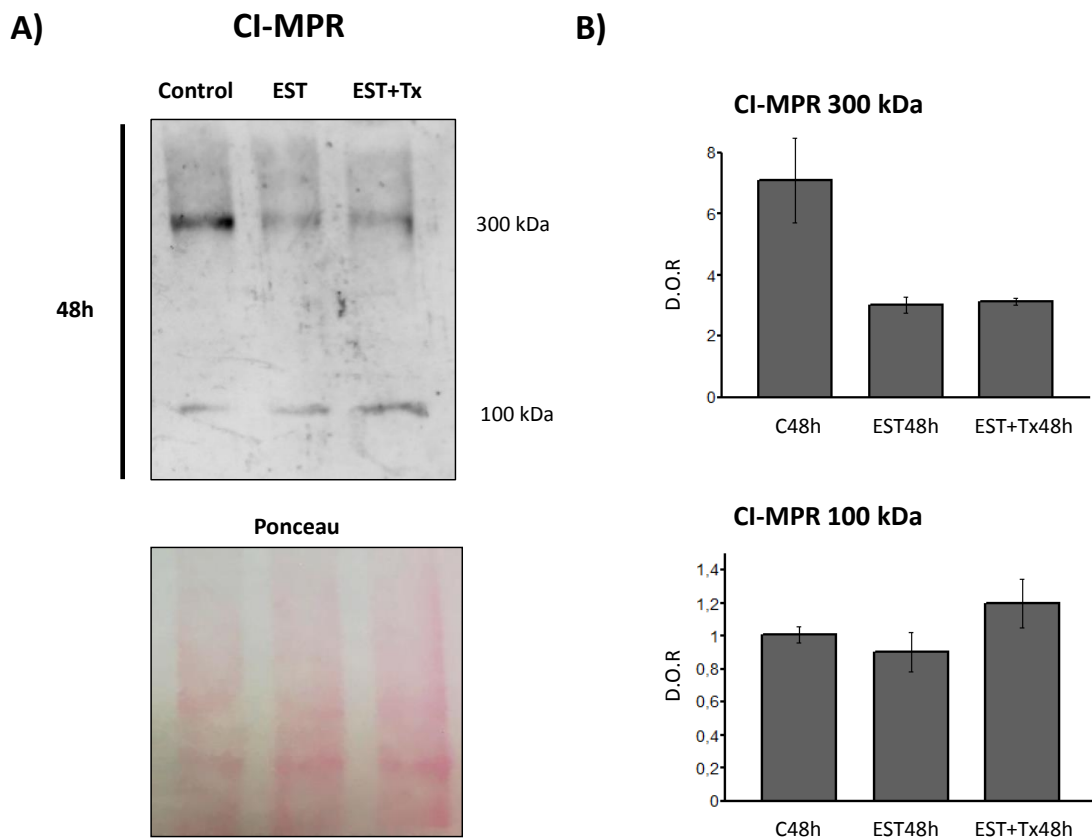


Figura 2.2.2: Efecto del 17- β estradiol sobre la expresión del CI-MPR en células MCF-7. Las células fueron cultivadas durante 48 h en presencia de 20 nM de estradiol (EST) o en presencia de EST y 2 μ M de tamoxifeno (EST + Tx). **A)** “Inmunoblot” representativo para la detección del CI-MPR. **B)** Cuantificación de la banda de 300 kDa (correspondiente al receptor maduro) y de la banda de 100 kDa (correspondiente a un fragmento del receptor). Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de dos experimentos independientes \pm SE. Como control de carga se utilizó la tinción de las membranas de nitrocelulosa con rojo Ponceau.

Conclusiones Parciales

Mediante “inmunoblot” determinamos que la expresión del CD-MPR es inducida por estradiol, del mismo modo que la enzima catepsina D, en las dos líneas celulares estrógeno-dependientes (MCF-7 y T-47D), y este efecto fue bloqueado por la presencia del compuesto antiestrogénico tamoxifeno. Es importante destacar que es la primera vez que se sugiere una regulación hormonal para este receptor. A su vez, confirmamos que la regulación hormonal es mediada por los receptores estrogénicos α , ya que en células MCF-10A (no expresan RE α) los niveles intracelulares de CatD y de CD-MPR no sufrieron cambios por el tratamiento con estradiol.

Por otro lado, determinamos que el tamoxifeno afecta por sí mismo el procesamiento y maduración de proCatD en células MCF-7, de forma independiente de los RE α ya que en células MCF-10A se observó el mismo fenómeno. Esto estaría en línea con lo propuesto por Altan y col. [220][221], quienes le atribuyen al tamoxifeno un efecto inhibitorio de la acidificación no mediado por los RE. Resulta interesante notar que este efecto del Tx **no** ocurre cuando el Tx se utiliza en presencia de estradiol.

En concordancia con la hipótesis de que el CD-MPR podría ser uno de los receptores involucrados en la secreción de catepsina D por células tumorales, observamos que ambas proteínas colocalizan en regiones muy próximas a la membrana plasmática. Además determinamos que en presencia de estradiol, el CD-MPR se redistribuye hacia fracciones celulares livianas, cuyas densidades se corresponden con la distribución de marcadores de la membrana plasmática, según datos de la bibliografía [219]. Todos estos datos sugieren la participación del CD-MPR en la secreción de la enzima CatD por las células MCF-7.

También demostramos que el tratamiento con 17- β -estradiol disminuyó los niveles intracelulares de sortilina y del CI-MPR en células MCF-7, efecto opuesto al descrito para el CD-MPR. Esto podría sugerir una interregulación en la expresión de estos receptores. Sin embargo, la incubación con tamoxifeno más estradiol no bloqueó el efecto de la hormona, observándose la misma disminución en los niveles intracelulares de Sort y CI-MPR generada por el tratamiento con estradiol.

PARTE 3

El Efecto de Aminas Acidotrópicas sobre la Expresión y Distribución de Proteínas en las Líneas Celulares Mamarias Tumorigénicas MCF-7 y T-47D.

Tratando de explicar el mecanismo de secreción de catepsina D por células tumorales, algunos autores plantearon un defecto de acidificación de las células MCF-7 como el responsable de tal secreción. Por ello, decidimos estudiar el efecto de aminas acidotrópicas sobre las dos líneas celulares que expresan los receptores estrogénicos α , pero difieren en su capacidad acidificante [185][222].

Las aminas acidotrópicas, como el cloruro de amonio y cloroquina, son moléculas que incrementan el pH de los compartimientos ácidos intracelulares, tales como los lisosomas y endosomas tardíos, modificando la ruta normal de transporte de hidrolasas ácidas a estos compartimientos. Normalmente, las proteínas solubles lisosomales son conducidas desde el TGN hacia compartimientos ácidos (probablemente endosomas tardíos) en forma de complejos con los receptores (MPRs, sortilina). Al llegar a dichas organelas, los ligandos se disocian de sus receptores, permitiendo el reciclaje de estos últimos al TGN para su re-utilización (ver figura 3 del capítulo I). Al neutralizar el pH de dichos compartimientos ácidos, las aminas acidotrópicas impiden la disociación ligando-receptor y en consecuencia el reciclaje de los receptores al TGN. Esto disminuye la disponibilidad de los receptores en el TGN, por lo que varias enzimas recién sintetizadas son liberadas al medio extracelular [223]. Por este motivo, el uso de aminas acidotrópicas ha sido implementado como una herramienta útil para diferenciar transportes mediados por receptores de aquellos inespecíficos.

3.1 El efecto de las aminas acidotrópicas sobre las células MCF-7 y T-47D.

3.1.1 Acción de las aminas acidotrópicas sobre la expresión y distribución de catepsina D en células MCF-7.

Observamos que en presencia de cloruro de amonio (10 mM) se incrementó la forma inmadura de CatD (52 kDa), de una manera dependiente del tiempo de incubación, a expensas de una disminución de la forma madura de 33 kDa (figura 3.1.1.1 A y B). Esto

se vio reflejado en un cambio en la distribución intracelular de catepsina D, tal como puede observarse en la figura 3.1.1.2, donde CatD presentó una distribución perinuclear por efecto de la amina con respecto a la distribución dispersa que presentaba en condiciones controles. A su vez, hay que considerar que la neutralización endosomal conduce a un “hinchamiento” de estos compartimientos, justificando también la granulación tan evidente que se observa por IFI, y que puede apreciarse a mayor aumento en los insets. Por otro lado, la relación CatD madura/CatD inmadura disminuyó en forma progresiva con los tiempos de incubación con la amina acidotrópica, siendo estadísticamente significativa a partir de las 12 h de tratamiento (figura 3.1.1.1 C).

Sin embargo, a las 24 h de exposición a la amina acidotrópica, se observó una disminución en el contenido total de CatD intracelular con respecto a lo observado a las 18 h (figura 3.1.1.1 D). El decrecimiento del contenido total de CatD fue a expensas tanto de su forma madura como de su forma inmadura (figura 3.1.1.1 A y B).

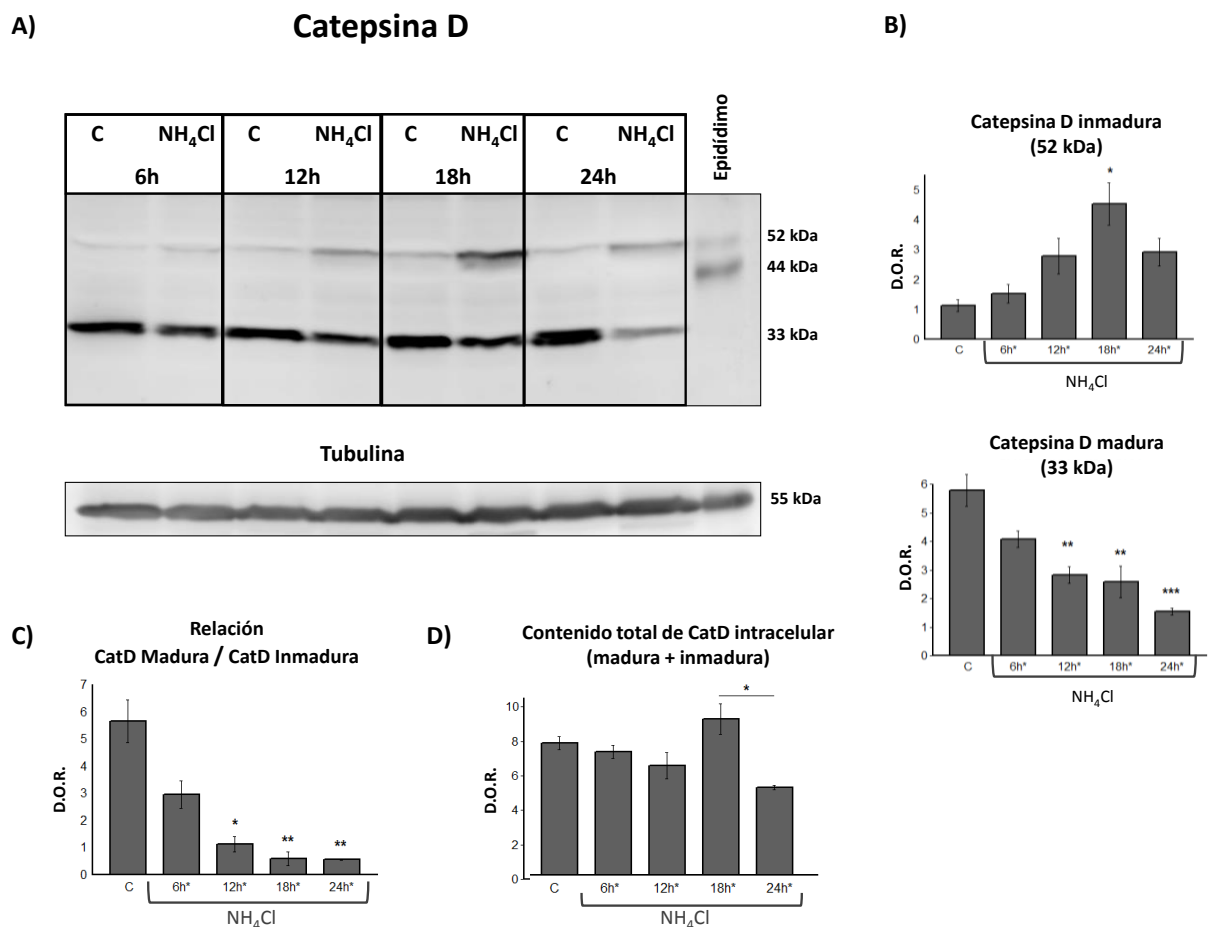


Figura 3.1.1.1: Efecto del cloruro de amonio (NH_4Cl) sobre la expresión y el procesamiento de la enzima catepsina D en células MCF-7.

Las células MCF-7 fueron cultivadas en condiciones controles y en presencia de cloruro de amonio 10 mM durante 6, 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por “inmunoblot”. **A)** “Inmunoblot” representativo mostrando las formas inmadura (52 kDa) y madura (33 kDa) de catepsina D. El homogenato de tejido de epidídimo de rata fue utilizado para mostrar la forma de IntCatD (≈ 44 kDa) y la proCatD (≈ 52 kDa). La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. **B)** Cuantificaciones de la forma madura e inmadura de catepsina D, expresadas en términos de densidad óptica relativa (D.O.R). **C)** Relación CatD madura / Inmadura, calculada a partir de la D.O.R de CatD madura e inmadura. **D)** Contenido total de CatD intracelular, calculado a partir de la sumatoria de las D.O.R de CatD madura con CatD inmadura. Las barras de todas las gráficas representan los promedios de las D.O.R de tres experimentos independientes \pm SE. (*)(**)(***) Significativamente diferente respecto del control: $p < 0.05$, $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.001$, respectivamente. Para la gráfica D, el (*) indica una diferencia significativa entre las 18 y las 24 h de incubación con la amina.

Catepsina D

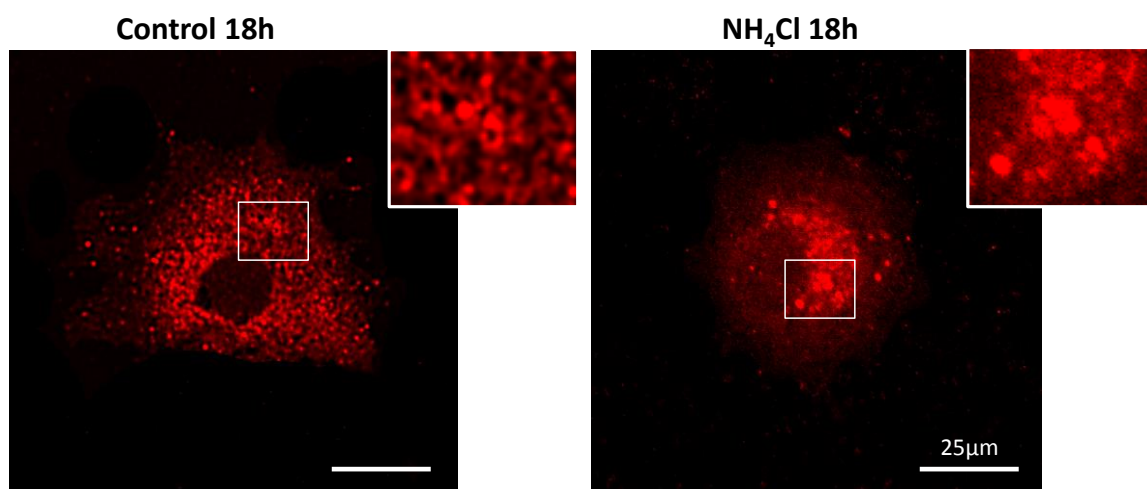


Figura 3.1.1.2: Efecto del cloruro de amonio (NH_4Cl) sobre la distribución de catepsina D en células MCF-7. Las células MCF-7 fueron incubadas por 18 h con NH_4Cl y posteriormente fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta.

Como se observa en la figura 3.1.1.3, un efecto similar al producido por el cloruro de amonio sobre catepsina D fue observado con cloroquina, otra amina acidotrópica conocida.

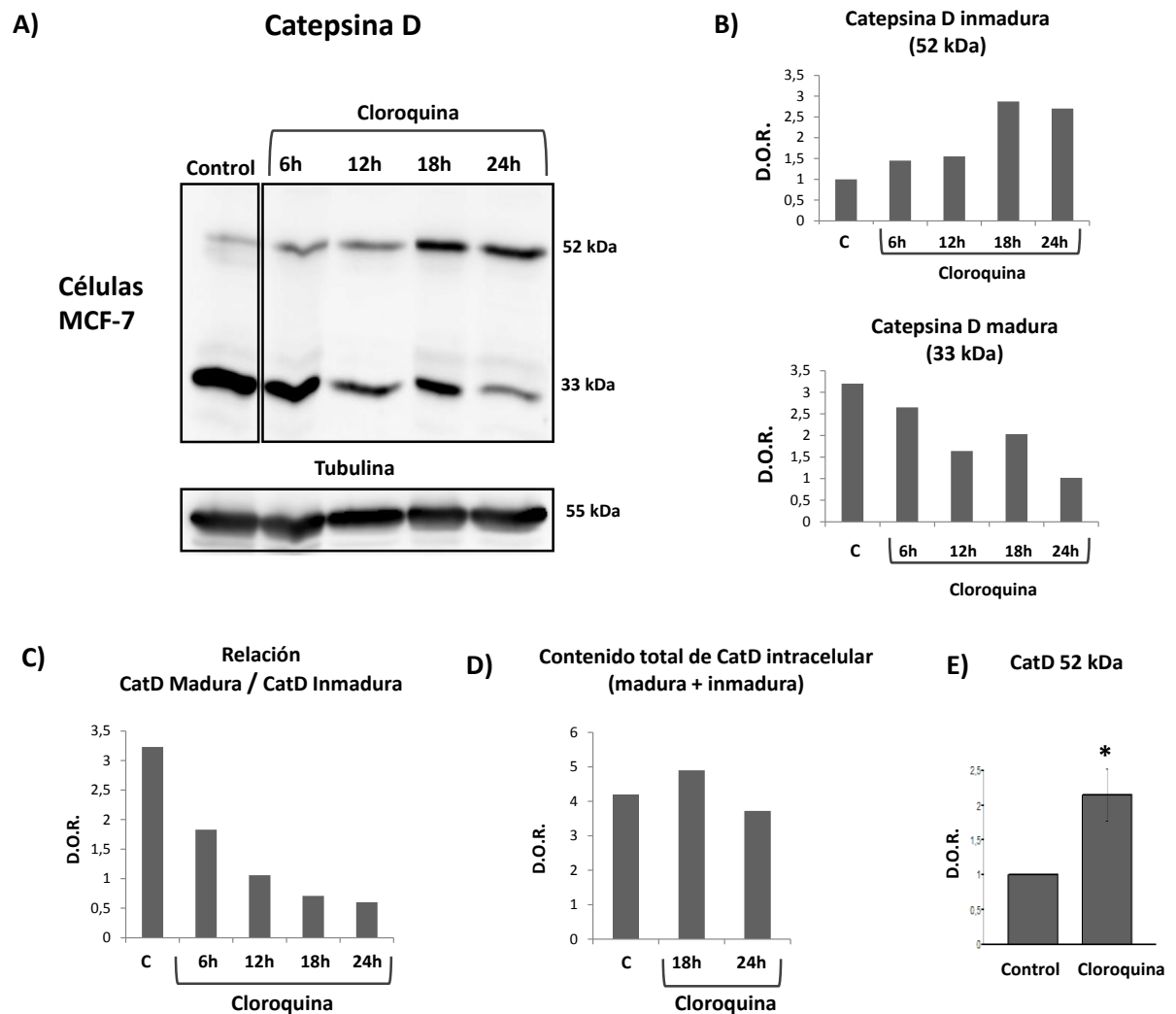


Figura 3.1.1.3: Efecto de cloroquina sobre la expresión y el procesamiento de la enzima catepsina D en células MCF-7.

Las células MCF-7 fueron cultivadas en condiciones controles y en presencia de cloroquina 50 μ M durante 6, 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por "inmunoblot". **A)** "Inmunoblot" de catepsina D mostrando las formas inmadura (52 kDa) y madura (33 kDa) de CatD. La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. **B)** Cuantificaciones de las formas inmadura y madura de CatD, expresadas en términos de densidad óptica relativa (D.O.R.). **C)** Relación CatD madura/CatD Inmadura, calculada a partir de las D.O.R. de la CatD madura e inmadura. **D)** Contenido total de CatD intracelular, calculado a partir de la sumatoria de la D.O.R. de la CatD madura con la inmadura. **E)** Análisis estadístico de los niveles intracelulares de proCatD entre las condiciones control y tratadas con cloroquina.

3.1.2 Acción de las aminos acidotrópicas sobre la expresión de catepsina D en las células T-47D.

Dado que en las células T-47D la acidificación es normal, quisimos comparar el efecto de las bases débiles entre esta línea celular y las MCF-7.

Se observó que la CatD de las células T-47D incubadas con cloruro de amonio, mostró un comportamiento similar al descrito en células MCF-7; un aumento de la forma inmadura de la enzima en presencia de la amina y una disminución del contenido total de catepsina D a las 24 h. Sin embargo, la caída de la relación CatD madura/CatD inmadura aparenta ser más drástica en esta línea celular (figura 3.1.2). Esto estaría relacionado con la diferente acidificación de estas dos líneas celulares.

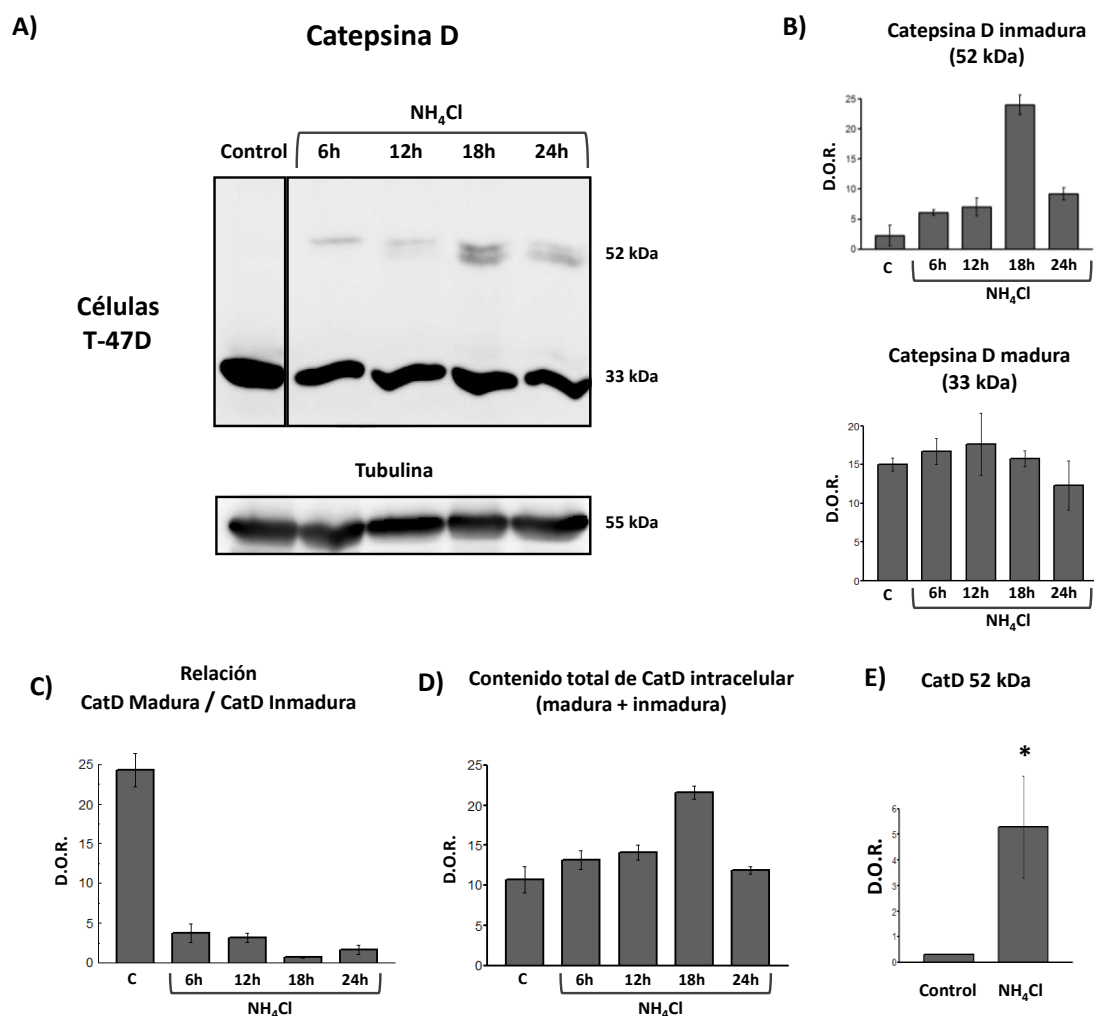


Figura 3.1.2: Efecto del cloruro de amonio (NH₄Cl) sobre la expresión y el procesamiento de la enzima catepsina D en células T-47D.

Las células T-47D fueron cultivadas en condiciones controles y en presencia de cloruro de amonio 10 mM durante 6, 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por "inmunoblot". **A)** "Inmunoblot" de catepsina D mostrando las formas inmadura (52 kDa) y madura (33 kDa) de CatD. La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. **B)** Cuantificaciones de la forma madura e inmadura de CatD, expresadas en términos de D.O.R (densidad óptica relativa). **C)** Relación CatD madura/CatD inmadura, calculada a partir de las D.O.R. de la CatD madura e inmadura. **D)** Contenido intracelular total de CatD, calculado a partir de la sumatoria de las D.O.R. de la CatD madura con la inmadura. **E)** Análisis estadístico de los niveles intracelulares de proCatD entre las condiciones control y tratadas con NH₄Cl. Las barras representan los promedios de las D.O.R de dos experimentos independientes.

3.1.3 Acción de las aminos acidotrópicas sobre la expresión y distribución del CD-MPR en las células MCF-7.

Como se observa en la figura 3.1.3 A y B, la expresión del CD-MPR en células MCF-7 aumentó bajo el efecto de las aminos acidotrópicas desde las 6 h de incubación. A su vez, este efecto se corroboró por IFI, al observarse una mayor intensidad de fluorescencia ante la exposición de las células al cloruro de amonio, acompañada de una granulación citoplasmática característica del hinchamiento endosomal que ocurre por efecto de las bases débiles.

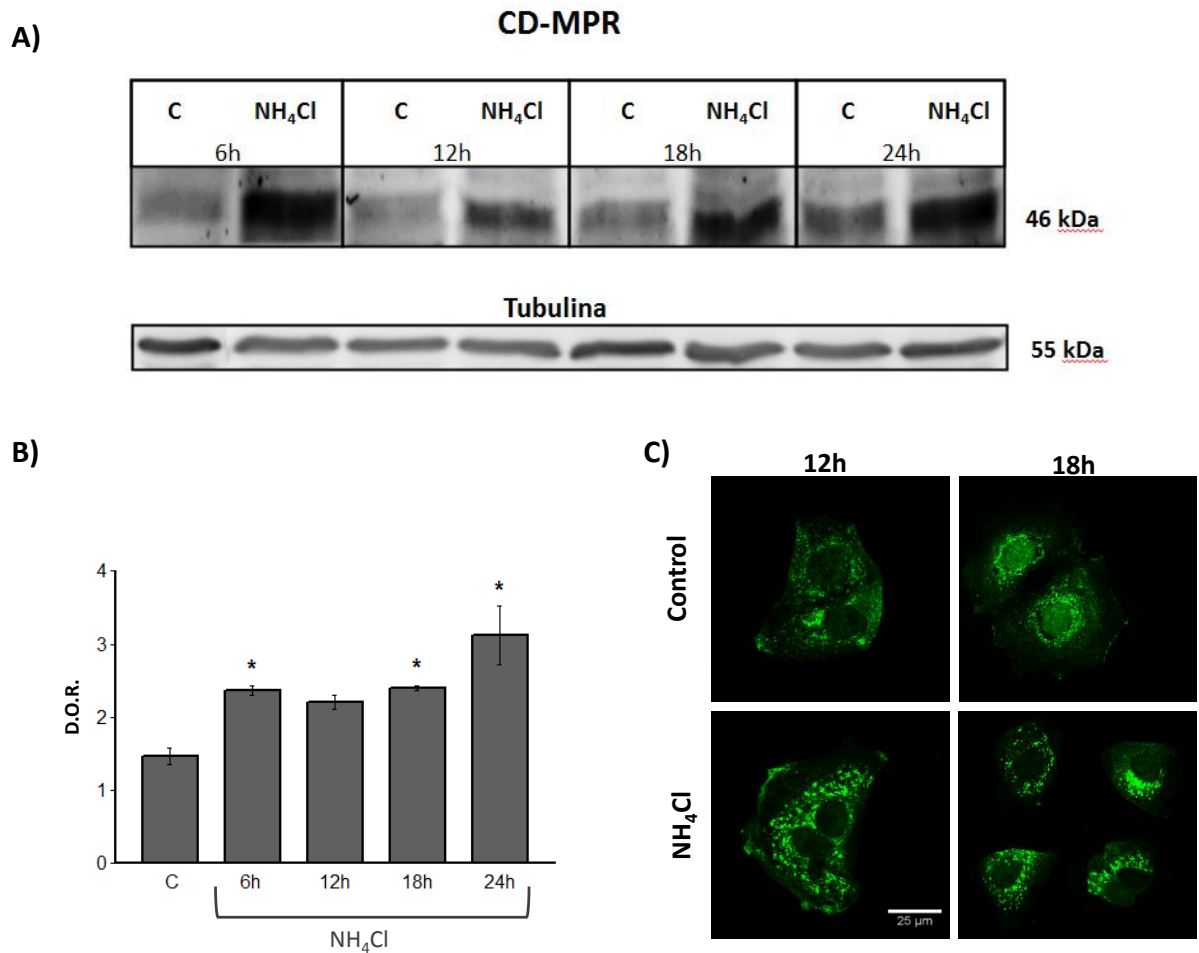


Figura 3.1.3: Efecto del cloruro de amonio (NH₄Cl) sobre la expresión y distribución del CD-MPR en las células MCF-7.

Las células MCF-7 fueron cultivadas en condiciones controles y en presencia de cloruro de amonio 10 mM durante 6, 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por "inmunoblot". **A)** CD-MPR. **B)** Cuantificación de las bandas mediante densitometría óptica. La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de tres experimentos independientes ± SE. (*) Significativamente diferente respecto del control ($p < 0.05$). **C)** Distribución del CD-MPR en células MCF-7 mediante IFI, a las 12 y 18 h de tratamiento con cloruro de amonio.

3.1.4 Efecto de las aminas acidotrópicas sobre la expresión del CD-MPR en las células T-47D.

En las células T-47D tratadas con cloruro de amonio también se observó un aumento en los niveles intracelulares del CD-MPR, en todos los tiempos de incubación (figura 3.1.4).

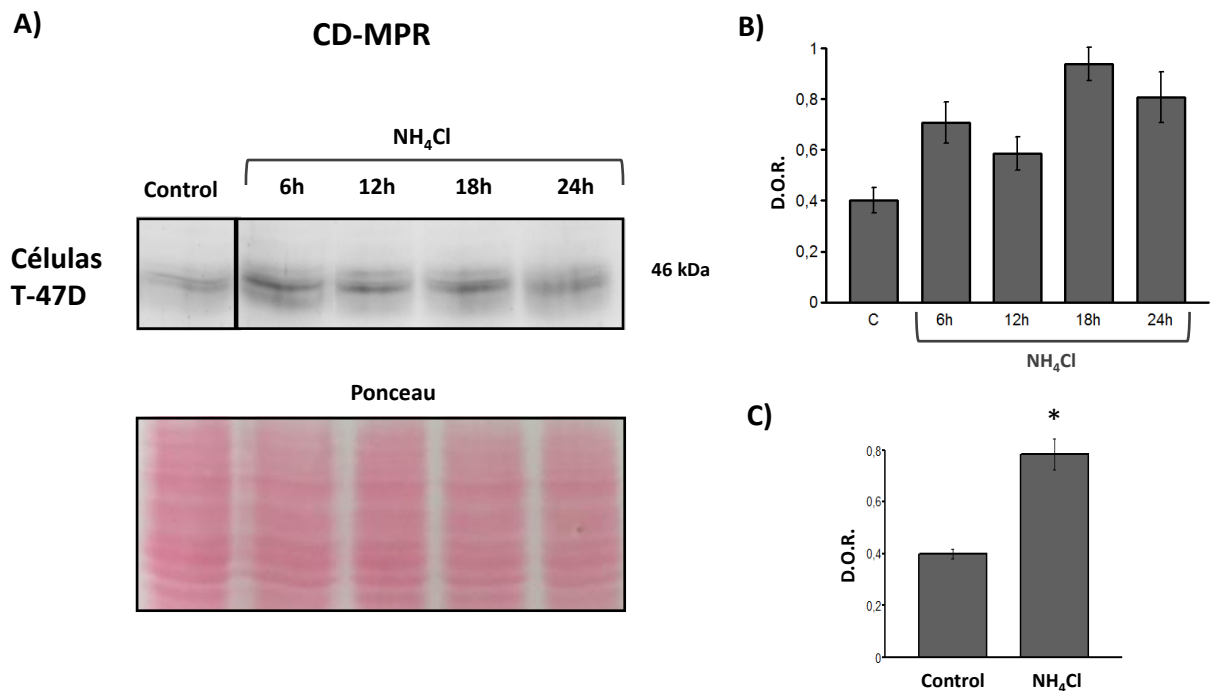


Figura 3.1.4: Efecto del cloruro de amonio (NH₄Cl) sobre la expresión del CD-MPR en las células T-47D.

Las células T-47D fueron cultivadas en condiciones controles y en presencia de cloruro de amonio 10 mM durante 6, 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por "inmunoblot". **A)** CD-MPR. **B)** Cuantificación de las bandas mediante densitometría óptica. Como control de carga se utilizó la tinción de las membranas de nitrocelulosa con rojo ponceau. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de dos experimentos independientes \pm SE **C)** Análisis estadístico de los niveles intracelulares de CD-MPR entre las condiciones control y tratadas con NH₄Cl.

3.1.5 Efecto de las aminas acidotrópicas sobre la expresión del CI-MPR en las células MCF-7.

Evaluamos el efecto del NH₄Cl sobre el otro receptor a manosa-6 fosfato objeto de nuestro estudio, el CI-MPR. En la figura 3.1.5 se puede observar que la amina acidotrópica produce un aumento de los niveles de expresión intracelulares del receptor maduro (300 kDa) a las 12, 18 y 24h de incubación (figura 3.1.5 A y B). Este aumento representa entre un 160 y un 210% aproximadamente del nivel de expresión del receptor en ausencia de NH₄Cl (tabla 3.1.5). Sin embargo, al analizar el efecto de la base débil sobre el fragmento de 100 kDa, notamos que las diferencias con respecto al control no son tan evidentes (figura 3.1.5 B y tabla 3.1.5).

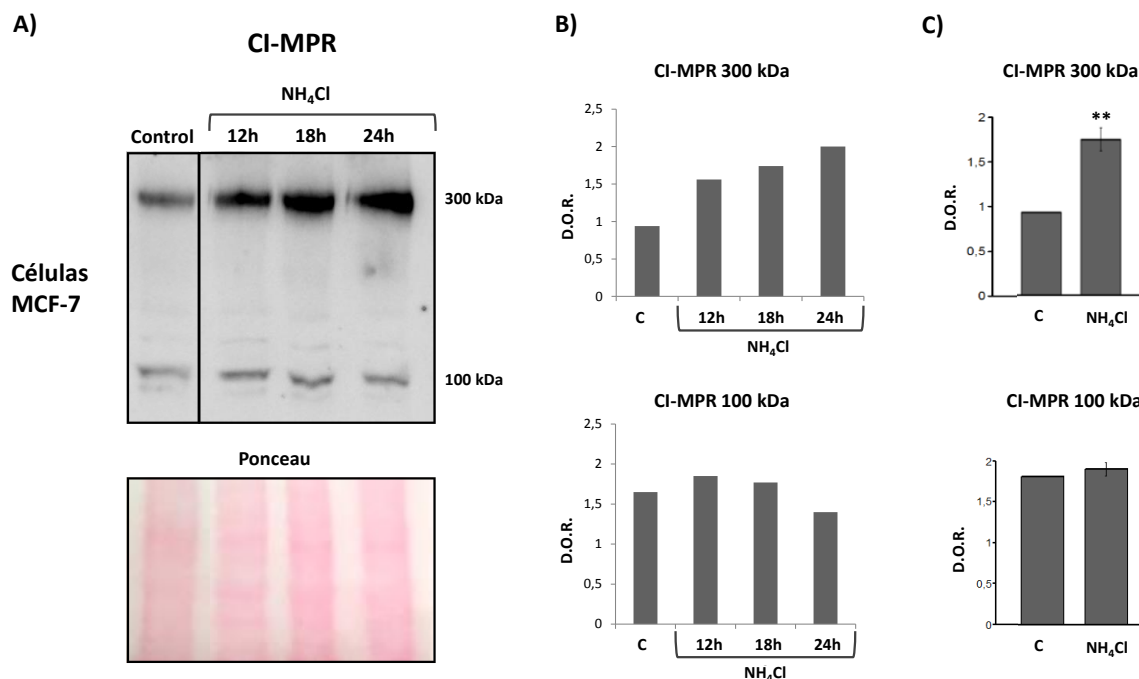


Figura 3.1.5: Efecto del cloruro de amonio (NH₄Cl) sobre la expresión del CI-MPR en las células MCF-7. Las células MCF-7 fueron cultivadas en condiciones control y en presencia de cloruro de amonio 10 mM durante 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por “inmunoblot”. **A)** CI-MPR. **B)** Cuantificación por densitometría óptica de las bandas de 300 kDa y 100 kDa, correspondientes al receptor maduro y a su fragmento, respectivamente. Como control de carga se utilizó la tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau. **C)** Análisis estadístico de los niveles intracelulares del CI-MPR (de 300 y 100 kDa) entre las condiciones control y tratadas con NH₄Cl.

| | Porcentaje de expresión del CI-MPR en relación a su nivel basal | | |
|-----------------------|---|------------------------|------------------------|
| | NH ₄ Cl 12h | NH ₄ Cl 18h | NH ₄ Cl 24h |
| CI-MPR 300 kDa | 166% | 185% | 213% |
| CI-MPR 100 kDa | 112% | 107% | 97% |

Tabla 3.1.5: Porcentaje de expresión del CI-MPR maduro y su fragmento en células MCF-7 tratadas con NH₄Cl, en relación a la expresión basal del receptor. A partir de las D.O.R del receptor, se calculó el porcentaje de expresión del CI-MPR a los distintos tiempos de incubación con la amina acidotrópica, considerando como 100% la expresión basal del mismo.

3.1.6 Efecto de las aminas acidotrópicas sobre la expresión del CI-MPR en las células T-47D.

En el caso de la otra línea celular utilizada en este estudio, las células T-47D, pudimos corroborar que la base débil produjo el mismo efecto sobre el CI-MPR que fue observado en las células MCF-7, es decir un aumento en los niveles intracelulares del receptor maduro a las 12, 18 y 24 h de incubación (figura 3.1.6). A su vez, también se evidencia que el impacto de la amina acidotrópica sobre los niveles de expresión del receptor maduro (300 kDa) es superior con respecto al efecto sobre el fragmento de 100 kDa (figura 3.1.6 y tabla 3.1.6).

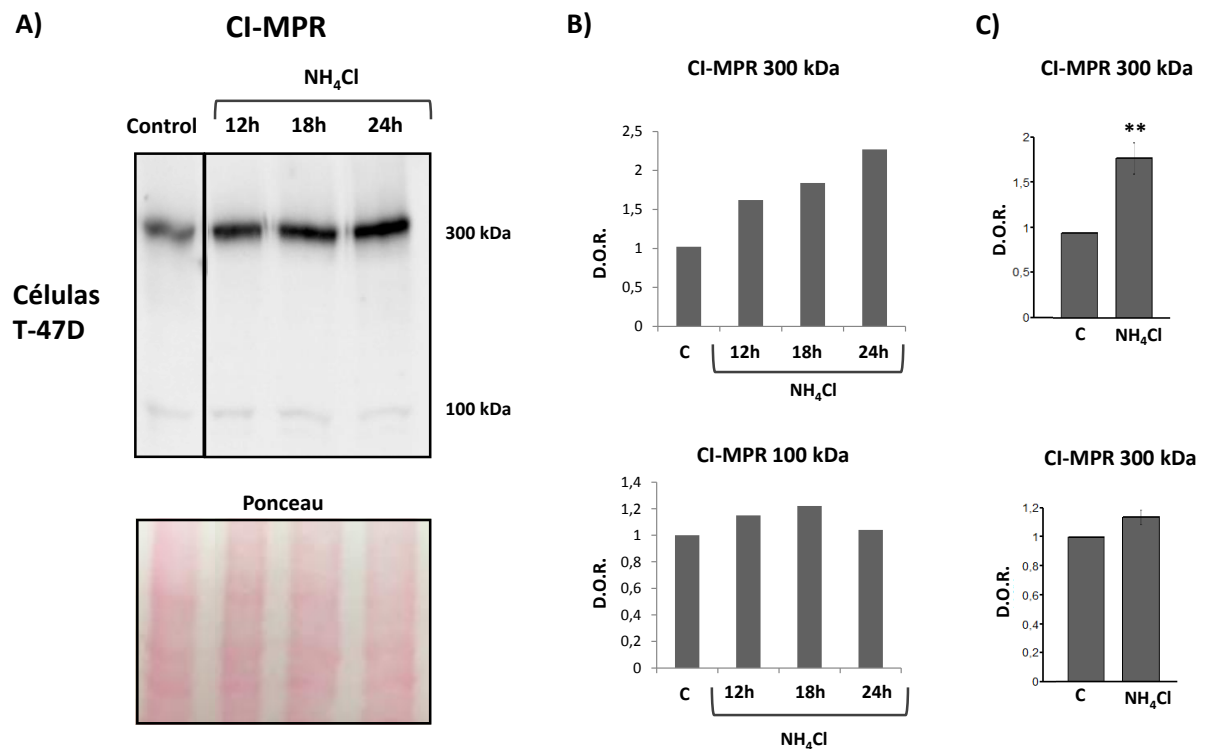


Figura 3.1.6: Efecto del cloruro de amonio (NH₄Cl) sobre la expresión del CI-MPR en las células T-47D. Las células T-47D fueron cultivadas en condiciones control y en presencia de cloruro de amonio 10 mM durante 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por “inmunoblot”. **A)** CI-MPR. **B)** Cuantificación por densitometría óptica de las bandas de 300 kDa y 100 kDa, correspondientes al receptor maduro y a su fragmento, respectivamente. Como control de carga se utilizó la tinción de la membrana de nitrocelulosa con rojo Ponceau. **C)** Análisis estadístico de los niveles intracelulares del CI-MPR (de 300 y 100 kDa) entre las condiciones control y tratadas con NH₄Cl.

| | Porcentaje de expresión del CI-MPR en relación a su nivel basal | | |
|-----------------------|---|------------------------|------------------------|
| | NH ₄ Cl 12h | NH ₄ Cl 18h | NH ₄ Cl 24h |
| CI-MPR 300 kDa | 159% | 180% | 222% |
| CI-MPR 100 kDa | 115% | 122% | 105% |

Tabla 3.1.6: Porcentaje de expresión del CI-MPR maduro y su fragmento en células T-47D tratadas con NH₄Cl, en relación a la expresión basal del receptor. A partir de las D.O.R del receptor, se calculó el porcentaje de expresión del CI-MPR a los distintos tiempos de incubación con la amina acidotrópica, considerando como 100% la expresión basal del mismo.

3.1.7 Acción de las aminas acidotrópicas sobre la expresión y distribución de sortilina en las células MCF-7.

En el caso del otro receptor, sortilina, la incubación con aminas acidotrópicas (cloruro de amonio o cloroquina) produjo una significativa disminución en su expresión desde las 6 h de tratamiento en las células MCF-7 (figura 3.1.7.1 A y B, y 3.1.7.2). También puede observarse un cambio en la distribución del receptor por el efecto de las bases débiles, desde una marca perinuclear dispersa a una distribución más granular, consistente con lo observado para la CatD y el CD-MPR (figura 3.1.7 C).

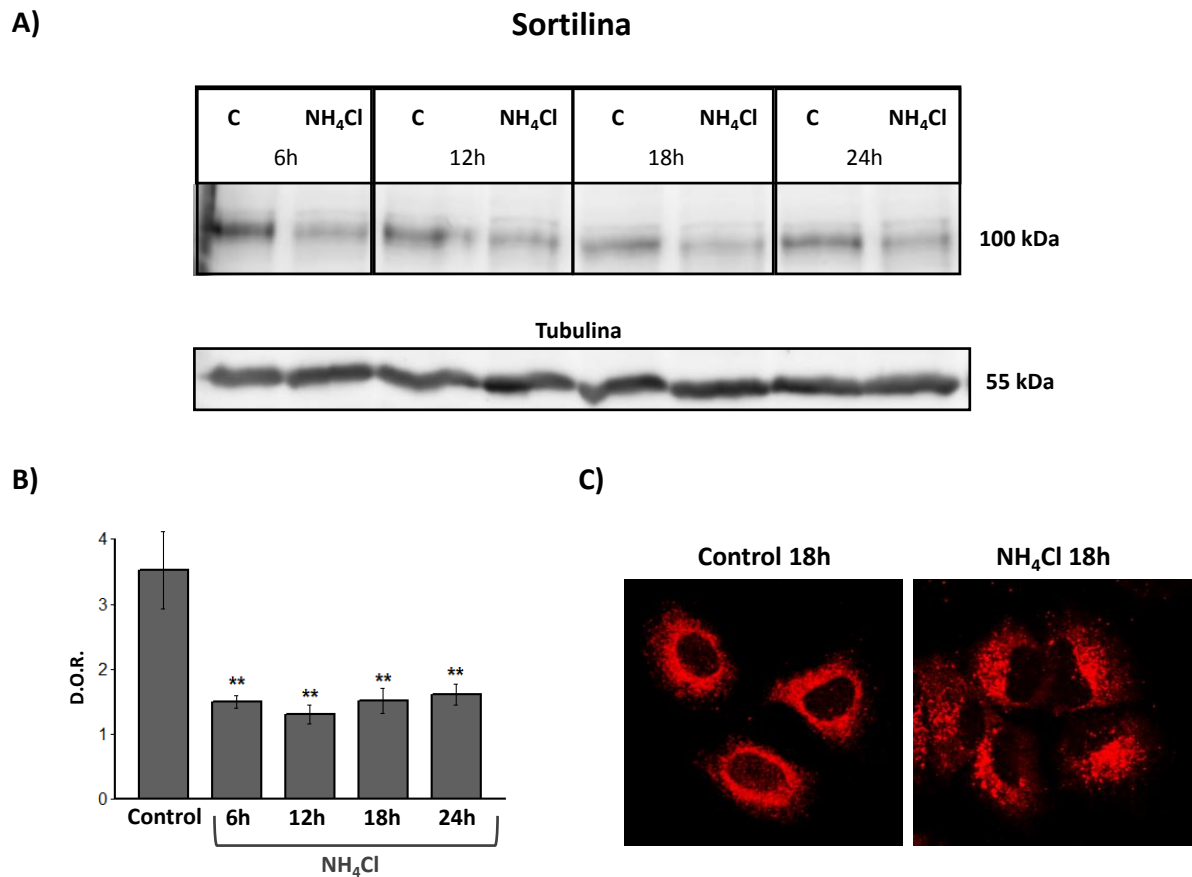


Figura 3.1.7.1: Efecto del cloruro de amonio (NH₄Cl) sobre la expresión y distribución de sortilina en las células MCF-7.

Las células MCF-7 fueron cultivadas en condiciones controles y en presencia de cloruro de amonio 10 mM durante 6, 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por “inmunoblot”. **A)** Sortilina **B)** Cuantificación de las bandas mediante densitometría óptica. La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. Las barras representan los promedios de las densidades ópticas relativas (D.O.R) de tres experimentos independientes ± SE. **C)** Distribución de sortilina en células MCF-7 mediante IFI, a las 18 h de tratamiento con cloruro de amonio.

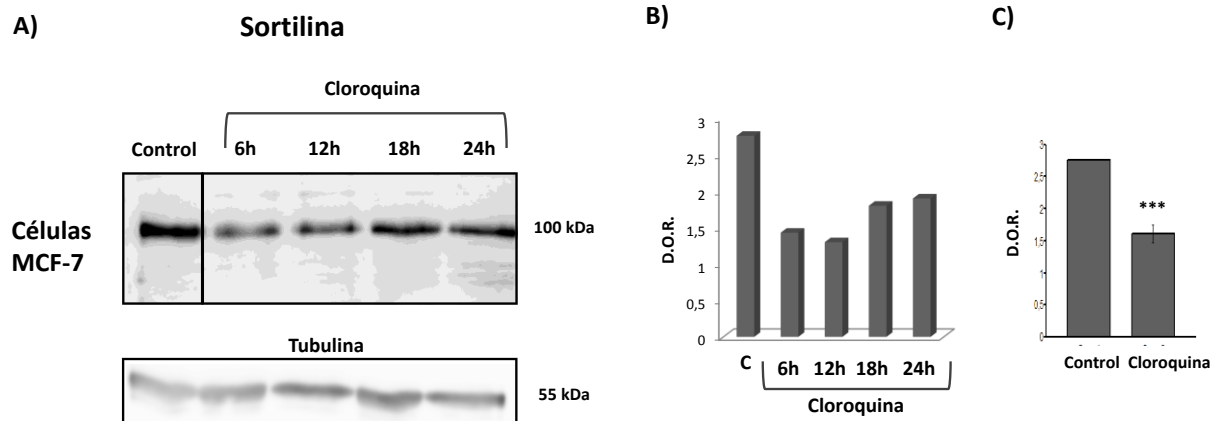


Figura 3.1.7.2: Efecto de cloroquina sobre la expresión de sortilina en las células MCF-7.

Las células MCF-7 fueron cultivadas en condiciones control y en presencia de cloroquina 50 μ M durante 6, 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por “inmunoblot”. **A)** Sortilina. **B)** Cuantificación por densitometría óptica. La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. **C)** Análisis estadístico de los niveles intracelulares de sortilina entre las condiciones control y tratadas con cloroquina.

3.1.8 Acción de las aminas acidotrópicas sobre la expresión de sortilina en las células T-47D.

La disminución de sortilina también se produjo en células T-47D incubadas con cloruro de amonio (figura 3.1.8).

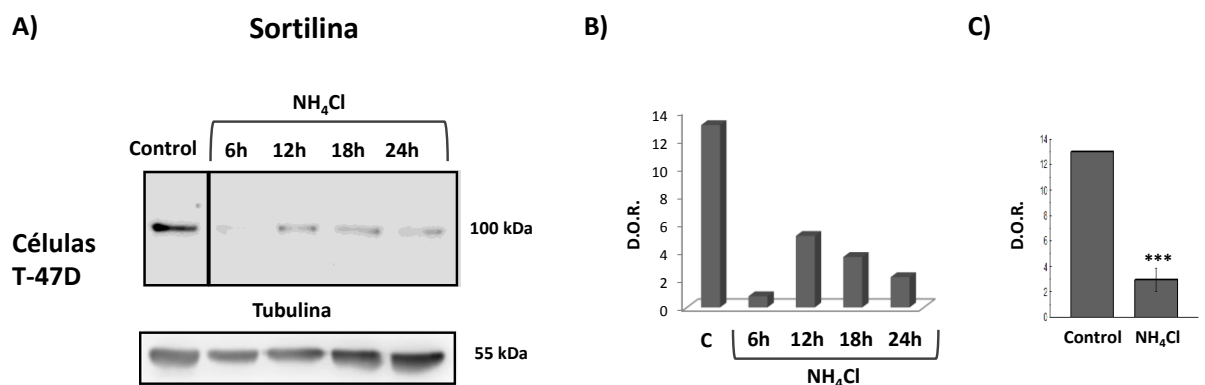


Figura 3.1.8: Efecto del cloruro de amonio (NH₄Cl) sobre la expresión de sortilina en las células T-47D.

Las células T-47D fueron cultivadas en condiciones controles y en presencia de cloruro de amonio 10 mM durante 6, 12, 18 y 24 h. Posteriormente fueron procesadas y los homogenatos analizados por “inmunoblot”

A) Sortilina. **B)** Cuantificación por densitometría óptica. La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. **C)** Análisis estadístico de los niveles intracelulares de sortilina entre las condiciones control y tratadas con cloruro de amonio.

3.2. ¿Existe una interregulación entre los receptores CD-MPR, sortilina y CI-MPR?

En el desarrollo de este trabajo, ciertos resultados nos permitieron hipotetizar que los tres receptores estudiados, el CD-MPR, el CI-MPR y Sort, podrían estar interregulando su expresión.

En las figuras 1.1.2, 1.1.3 y 1.1.5, descritas en la 1er parte del capítulo de resultados, se observó una mayor expresión del CD-MPR y sortilina en las células tumorigénicas con respecto a la no tumorigénica, y, a su vez, distintos niveles de expresión del CD-MPR, sortilina y del CI-MPR entre las cuatro líneas celulares. A su vez, en el capítulo destinado a la regulación hormonal de las proteínas en estudio, determinamos que mientras el estradiol generaba a un aumento en los niveles intracelulares del CD-MPR, la expresión del CI-MPR y la de Sort disminuían en presencia de esta misma hormona (figuras 2.1.2, 2.2.1 y 2.2.2). Por otro lado, en el estudio con aminos acidotrópicos, la incubación con las bases débiles condujo a un aumento en los niveles intracelulares del CD-MPR y del CI-MPR (figuras 3.1.3 y 3.1.7), mientras que disminuyó los niveles de sortilina (figura 3.1.5.1).

En este contexto, y como una primera aproximación para tratar de establecer si los tres receptores podrían actuar como receptores alternativos e interregular su expresión, estudiamos el efecto de la sobreexpresión de sortilina sobre la expresión y distribución de del CD-MPR, por inmunofluorescencia indirecta. A su vez, evaluamos los niveles intracelulares de CatD, la proteína que estaría siendo transportada alternativamente por estos receptores.

3.2.1 La sobreexpresión de sortilina modifica la expresión de catepsina D y del CD-MPR en células MCF-7 y MCF-10A.

Como se observa en la figura 3.2.1.1, las células MCF-10A que sobreexpresan sortilina “wild type” (WT) muestran una mayor expresión de catepsina D, comparadas con las células no transfectadas. Además, se observa que hay colocalización entre ambas proteínas y que ésta aparentemente es más importante en las células transfectadas.

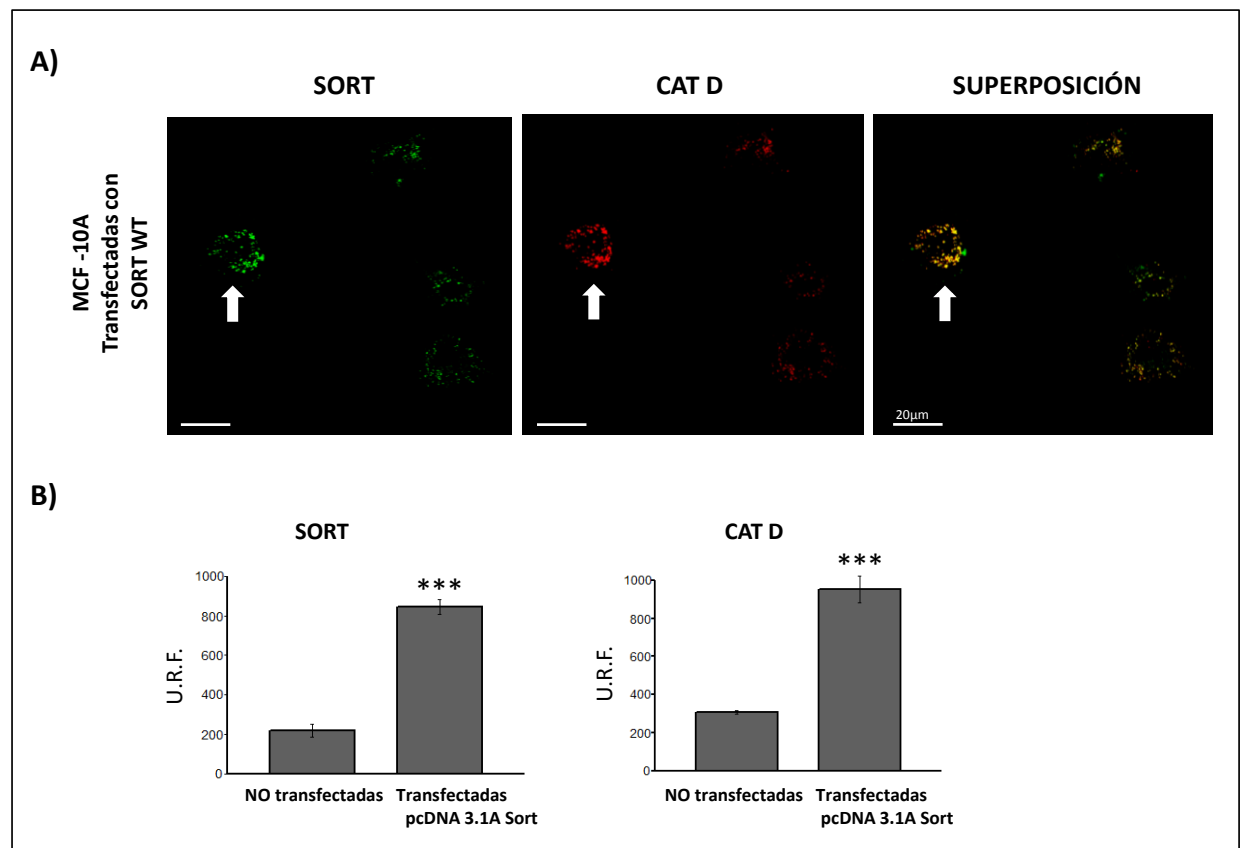


Figura 3.2.1.1: Efecto de la sobreexpresión de Sort sobre la expresión y distribución de CatD en la línea celular MCF-10A. Detección de Sort (verde) y CatD (rojo). La flecha blanca señala una célula transfectada sobreexpresando Sort WT.

En las células MCF-7, observamos un efecto similar a las MCF-10A, con una colocalización parcial entre CatD y sortilina muy evidente en una zona perinuclear y en algunos puntos dispersos en el citoplasma (figura 3.2.1.2).

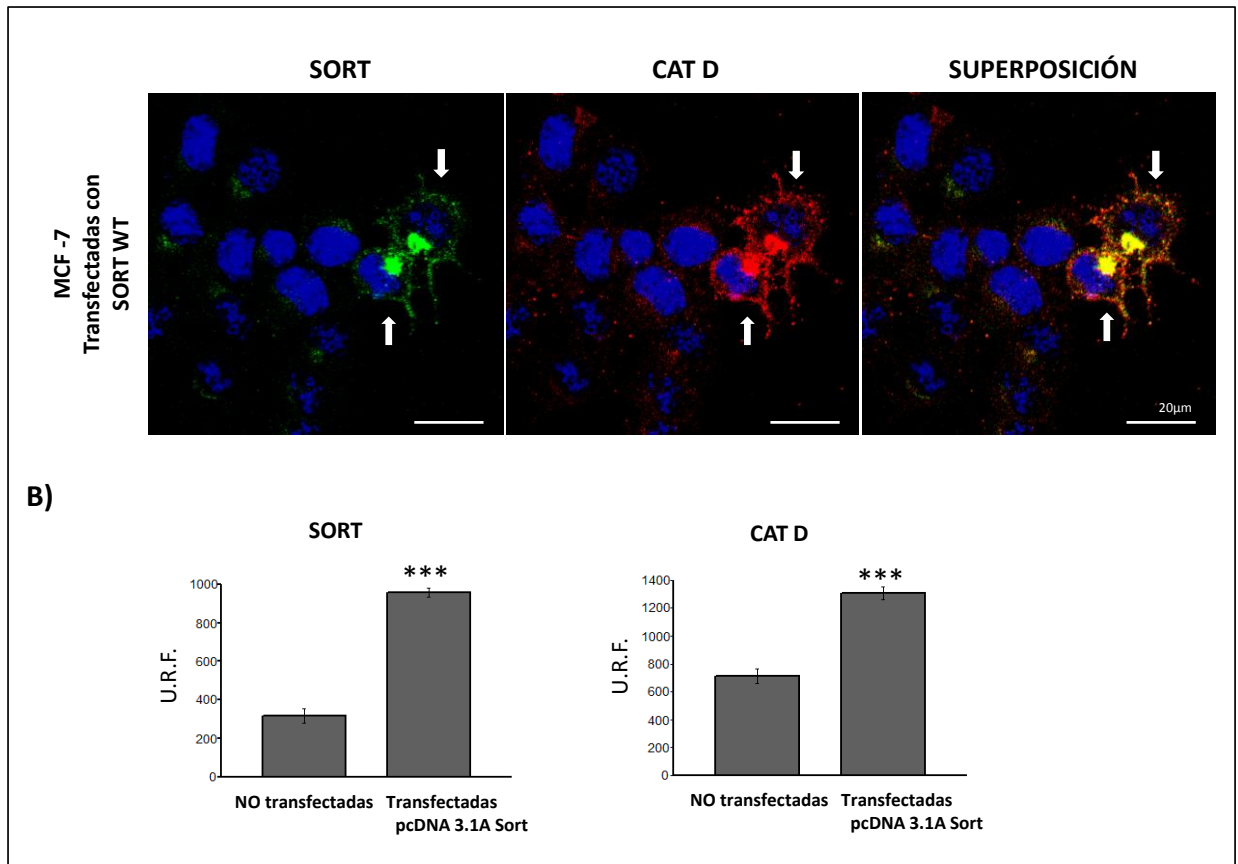


Figura 3.2.1.2: Efecto de la sobreexpresión de Sort sobre la expresión y distribución de CatD en la línea celular MCF-7. A) Detección de Sort (verde) y Cat D (rojo). Las flechas blancas señalan dos células transfectadas sobreexpresando Sort WT.

Por otro lado, se puede notar que aquellas células que sobreexpresan sortilina presentan una disminución en la expresión del CD-MPR, en comparación con las células no transfectadas (figura 3.2.1.3).

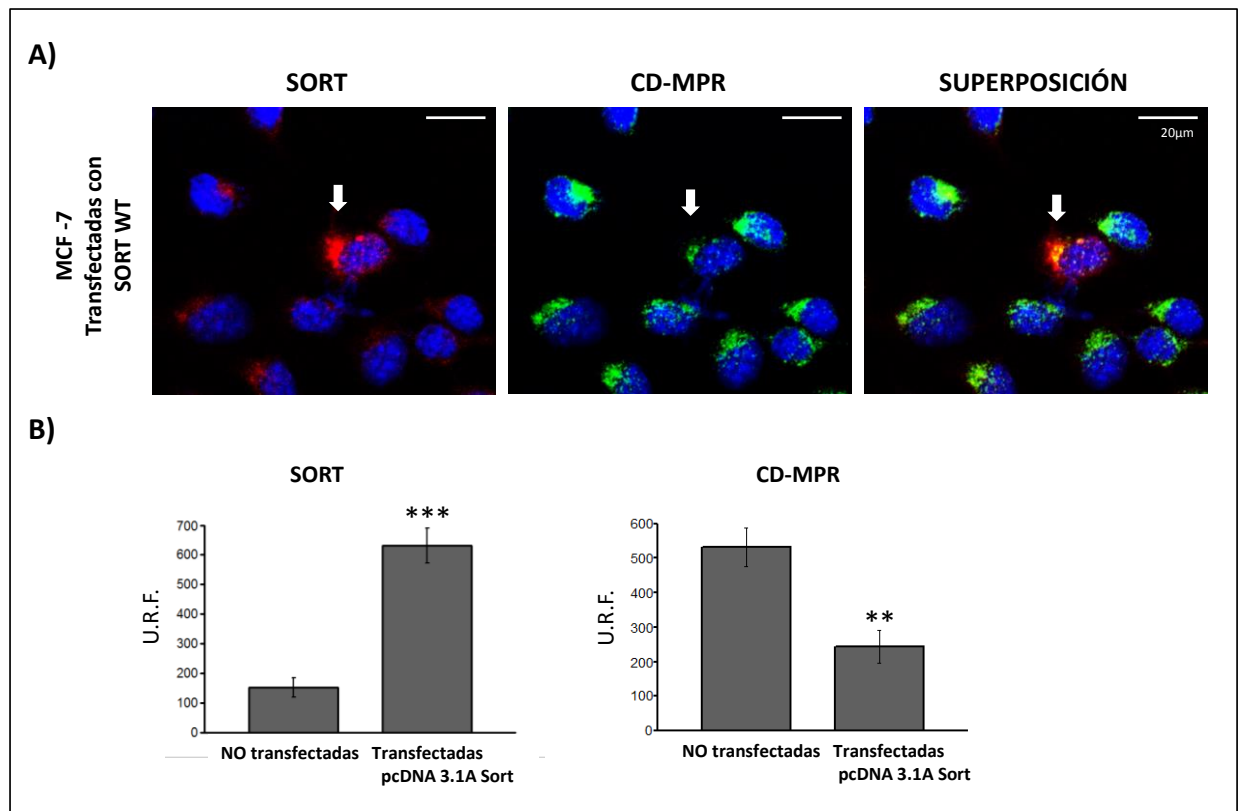


Figura 3.2.1.3: Efecto de la sobreexpresión de Sort sobre la expresión y distribución del CD-MPR en la línea celular MCF-7. A) Detección de Sort (rojo) y CD-MPR (verde). Las flechas blancas señalan una célula transfectada sobreexpresando Sort WT.

Conclusiones Parciales

Las aminos acidotrópicas produjeron cambios que sugieren que el transporte de CatD es mediado por receptores en células MCF-7 y T-47D. Entre ellos cabe citarse:

- El aumento progresivo de la forma inmadura de CatD y consecuente disminución de la forma madura. Sin embargo, no podemos descartar que también sea consecuencia de la inactivación de enzimas que intervienen en el procesamiento de CatD, debido al aumento del pH.
- Disminución del contenido intracelular total de CatD a las 24h de incubación con las aminos acidotrópicas, sugiriendo una secreción de la proenzima.

A su vez, los niveles de expresión de los receptores posiblemente involucrados en el transporte de la enzima también se vieron modificados por cloruro de amonio o

cloroquina. En el caso del CD-MPR y del CI-MPR, se observó un aumento en su expresión, mientras que los niveles de expresión de Sort mostraron un efecto opuesto.

A partir de todos estos datos inferimos que estos cambios en la expresión y distribución de proteínas receptoras tienen consecuencias sobre la secreción de CatD. Datos directos sobre el fenómeno de secreción no se pudieron obtener debido a la imposibilidad de detectar la enzima por “inmunoblot” en los medios, y no se logró medir su actividad enzimática por fallas en el kit de medición utilizado para tal fin.

Teniendo presentes los datos de la parte 1 de los resultados, en los cuales las células con niveles de expresión basal muy altos de CatD (MCF-7 y T-47D) presentan niveles basales elevados de sortilina (figura 1.1.3), y considerando que la sobreexpresión de Sort WT en las células MCF-7 y MCF-10A condujo a un aumento en los niveles intracelulares de CatD en ambas líneas celulares, se sugiere la participación de sortilina en el transporte de la enzima, tanto en células tumorigénicas como en no tumorigénicas. A su vez, el efecto opuesto sobre los niveles de expresión del CD-MPR y de Sort frente a los tratamientos con cloruro de amonio y frente a las transfecciones, sugieren un fenómeno de interregulación entre ambos receptores.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

1. Estudios Comparativos entre las Cuatro Líneas Celulares

Si bien se ha reportado que las células MDA-MB-231 secretan niveles elevados de CatD como lo hacen las células estrógeno-dependientes [176], observamos que la expresión intracelular de la enzima en estas células triple negativas es significativamente menor con respecto a la expresión observada en las células MCF-7 y T-47D en condiciones basales (sin estimulación hormonal). Por lo tanto podría pensarse que los mecanismos moleculares que subyacen al transporte y/o secreción de la enzima son diferentes en las tres líneas celulares y/o que la expresión aumentada de catepsina D en las células hormono-dependientes es una capacidad (“hallmark”) que adquirieron estas células en el curso del desarrollo del tumor de origen.

Los elevados niveles de expresión de la forma madura de catepsina D (33 kDa) en las células MCF-7 y T-47D sugieren que la proenzima es conducida a lisosomas a donde finalmente es procesada. En las células MCF-7 este transporte podría ser mediado, al menos en parte, por el CD-MPR, ya que se demostró una alta colocalización entre la enzima y este receptor. Sin embargo, en las células T-47D, la contribución del CD-MPR al transporte de la enzima pareciera ser menor, ya que los niveles de expresión de este receptor son significativamente menores con respecto a las MCF-7. Sin embargo, las células T-47D presentan una expresión alta de sortilina y del CI-MPR, lo que permitiría especular que posiblemente estos receptores sean los que estén mayormente implicados en el transporte de CatD en esta línea celular.

Por otra parte, resulta llamativa la alta expresión del CD-MPR en las células MCF-7 en comparación al resto de las líneas celulares. Si bien los análisis de la región promotora del gen del CD-MPR humano revelan que este receptor se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos humanos [224], también hay estudios cuantitativos que demuestran que sus niveles de expresión varían según el tipo celular y el tejido [225][226][227][228]. Por otro lado, la sobreexpresión del CD-MPR en las células tumorales MCF-7 podría estar confiriéndoles alguna ventaja sobre las células normales. Sustentando esta función pro-tumoral del CD-MPR, Kanamori S. y col. [229] reportaron

que la sobreexpresión del CD-MPR en células PC12 (derivadas de feocromocitoma) previene la muerte celular inducida por la privación de suero.

En el estudio comparativo de las cuatro líneas celulares que hemos realizado, también observamos que sortilina es sobreexpresada en células mamarias tumorigénicas con respecto a la no tumorigénica. Esto concuerda con lo demostrado recientemente por Roselli S y col. [81], quienes observaron una sobreexpresión de este receptor en carcinomas mamarios ductales y lobulillares invasivos, sugiriendo una relación con el potencial metastásico de los mismos. Además, en células provenientes de carcinoma de ovario humano, se reportaron niveles aumentados de sortilina en las células tumorigénicas en comparación con las no tumorigénicas, vinculando a la proteína con el crecimiento y supervivencia de este tipo de tumores [230]. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos protumorales de sortilina aún no han sido completamente dilucidados. En nuestro contexto podría especularse que la sobreexpresión de Sort también tendría relación con el transporte y la secreción de CatD por un mecanismo diferente al del CD-MPR; mediada por exosomas. Los exosomas, son pequeñas vesículas (\approx 30-100 nm) liberadas al microambiente extracelular por células tumorales y no tumorales, incluyendo reticulocitos, enterocitos, células hematopoyéticas, linfocitos y células dendríticas [231]. Su rol principal se ha asociado a la comunicación intercelular, tanto en procesos fisiológicos como en patológicos. Los exosomas secretados por células tumorales también se conocen como oncosomas, debido a que pueden inducir un fenotipo tumoral en las células estromales y porque están involucrados en la invasión tumoral, la angiogénesis, la quimioresistencia y la evasión de la respuesta inmune [232]. A pesar de que la biogénesis de los exosomas aún es tema de debate, en general se acepta que se originan en la vía endocítica, a partir de invaginaciones de la membrana endosomal, las cuales forman vesículas intraluminales. Cuando los endosomas están llenos de este tipo de vesículas, se conocen como cuerpos multivesiculares (CMVs). Los CMVs son compartimientos endosomales intermediarios que pueden dirigir su contenido a los lisosomas para su degradación, o fusionarse con la membrana plasmática y liberar exosomas (figura 1) [233].

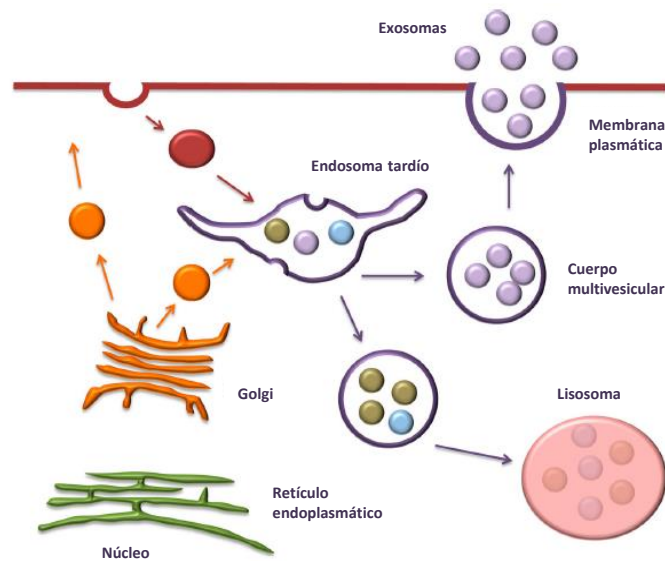


Figura 1: Formación de cuerpos multivesiculares y liberación de exosomas en el microambiente extracelular. Modificado de [232].

Con respecto al CI-MPR, si bien los niveles de expresión del receptor maduro de 300 kDa no presentaron diferencias significativas entre las cuatro líneas celulares, puede observarse una tendencia a una menor expresión en las células MCF-7. En estas células resultó significativamente menor la expresión de la forma soluble del CI-MPR con respecto a las otras tres líneas celulares. En referencia a esta forma soluble del CI-MPR detectada en los medios de cultivo de las cuatro líneas celulares, confirmamos, mediante espectrometría de masas, que se trata de un fragmento del receptor, que se corresponde con el dominio luminal del CI-MPR maduro. Esto había sido sugerido por Kiess y col. [214] cuando detectaron un fragmento del CI-MPR en el suero de ratas con capacidad “binding” para IGF-II, y por Leksa V. y col [217], quienes detectaron un fragmento de 220kDa secretado por células endoteliales y estimaron que se trataba del dominio extracelular del receptor CI-MPR en base a su PM. Si bien Confort C y col. [234] reportaron la secreción del sCI-MPR por células MCF-7, esta es la primera vez que se estudia comparativamente la expresión y secreción del sCI-MPR entre líneas celulares mamarias tumorígenicas y no tumorígenicas. Como se puede observar en la figura IV.1.1.6, los niveles del sCI-MPR varían entre las distintas líneas celulares. Esta forma soluble del receptor podría estar regulando la disponibilidad de ciertos factores solubles extracelulares que podrían incidir

en el desarrollo tumoral mamario (e.g. IGF-II, CatD). En este contexto, Scott y col. [215] proponen que en hepatocitos y fibroblastos, el sCI-MPR se une al IGF-II bloqueando la síntesis de DNA estimulada por dicho factor. También se ha reportado que en líneas celulares mieloides y linfoides el sCI-MPR inhibe la proliferación celular dependiente de LIF (“leukemia inhibitory factor”)[216] y que la liberación del sCI-MPR por células endoteliales modula la angiogénesis tumoral, mediante el bloqueo de la activación del plasminógeno pericelular [217].

Con respecto al mecanismo de secreción del sCI-MPR por células tumorales, especulamos que podría ser el resultado de un clivaje proteolítico del CI-MPR maduro a nivel extracelular, ya que de ser intracelular deberíamos haber detectado dos fragmentos del receptor en los homogenatos celulares. Por otro lado, sustentando la hipótesis del clivaje extracelular del receptor, cabe citar los resultados obtenidos bajo los tratamientos con aminos acidotrópicas. En células MCF-7 y T-47D tratadas con NH_4Cl , aumentaron sustancialmente los niveles intracelulares del CI-MPR de 300 kDa, muy probablemente debido a una menor degradación del receptor como consecuencia de la neutralización de los compartimientos ácidos. Sin embargo, los niveles intracelulares del fragmento de 100 kDa no mostraron cambios importantes en presencia de NH_4Cl . Por lo tanto, proponemos que el clivaje del receptor ocurre a nivel extracelular, tal vez por la acción de metaloproteinasas, provocando la liberación de la porción luminal del receptor en forma soluble al medio de cultivo, mientras que el fragmento transmembrana-citosólico podría ser endocitado por la célula, en el transcurso de movimientos entre la membrana plasmática y compartimientos intracelulares. Apoyando esta hipótesis, Leksa y col. [217] demostraron que la enzima TACE (“tumor necrosis factor α convertase”, también conocida como ADAM-17) media la liberación del sCI-MPR en células HUVEC (células endoteliales de la vena de cordón umbilical).

2. La Hormono-Dependencia de la Enzima y de los Receptores

En cuanto a la regulación hormonal de los receptores involucrados en el transporte intracelular de CatD, demostramos que la expresión del CD-MPR es inducida por 17- β -estradiol en células MCF-7, con una tendencia similar en las células T-47D. Esta es la primera vez que se establece una hormono-dependencia para este receptor, lo cual puede

tener un impacto en otros modelos celulares fisiológicos y patológicos que respondan a una regulación hormonal. Esto concuerda con antecedentes de nuestro laboratorio en los que demostramos que la expresión y distribución del CD-MPR en el epidídimo de ratas es influenciada por los niveles de testosterona plasmáticos en estos animales [96] [235]. A su vez, confirmamos lo propuesto por Mathieu M y col. [186], quienes demostraron que el otro MPR, el CI-MPR, también es regulado por estradiol, pero negativamente. En este caso la hormona disminuye el contenido intracelular del receptor en células tumorigénicas mamarias que expresan receptores estrogénicos α . Por otro lado, determinamos que los niveles de expresión de sortilina también disminuyen en respuesta a estradiol en células con RE (+). En este contexto, el único antecedente al respecto es el trabajo de Wessels JM y col. [236], donde se propone que las hormonas ováricas inducen cambios en la expresión de factores neurotróficos y sus receptores en el útero de ratones. Por lo tanto, toda esta evidencia nos lleva a pensar que la respuesta a estradiol observada en el CD-MPR, CI-MPR y/o Sort también podría responder a un mecanismo compensatorio ante la disminución de un receptor (o ante el aumento de otro), apoyando la idea de una inter-regulación entre ellos.

El 17- β -estradiol no sólo modificó la expresión del CD-MPR, sino también su distribución en células MCF-7. Por IFI observamos que, frente al estímulo hormonal, el receptor se re-distribuyó hacia la periferia de la célula, en regiones muy próximas a la membrana plasmática. Además, mediante un gradiente de densidades, encontramos que las fracciones celulares livianas están enriquecidas con el CD-MPR bajo el efecto del estradiol. A su vez, la enzima CatD mostró un comportamiento similar al CD-MPR, aumentando su expresión y re-distribuyéndose hacia la periferia celular en presencia de estradiol. Esto sumado al hecho de que ambas proteínas colocalizan, sugiere que la enzima puede ser transportada por el CD-MPR y que éste receptor podría estar involucrado en su secreción. Esto es sustentado por una observación previa de nuestro laboratorio en la cual demostramos que, en el epitelio epididimario, la redistribución del CD-MPR hacia la membrana plasmática inducida por cambios hormonales se correlaciona con una mayor secreción de proCatD por ese órgano [96]. Además, Chao y col. [47] demostraron que parte de la secreción de enzimas lisosomales que ocurre en células L de ratón y en células BHK (derivadas de riñón de hámster) es mediada por el CD-MPR.

El transporte de CatD mediado por el CD-MPR hacia regiones muy próximas a la membrana plasmática podría estar involucrando una vía distinta a la endosomal, algo que no resultaría extraño si consideramos el antecedente de Distel B y col [237], quienes reportaron que el dominio citoplasmático del CD-MPR presenta un motivo que le confiere la capacidad de mediar un transporte específico hacia la membrana basolateral, además del clásico motivo responsable de su transporte a endosomas. Por lo tanto se sugiere la existencia de una maquinaria de selección independiente de clatrina y proteínas AP (AP1 y AP2), la cual mediaría el transporte específico de este receptor y sus ligandos a la membrana basolateral de células MDCK (epiteliales de riñón). Además, Wick y col. [238] reportaron que en células CaCo-2 (línea celular epitelial humana de adenocarcinoma de colon) el CI-MPR participa en el transporte de CatD hacia la región apical y basolateral de esas células, y que el “sorting” basolateral mediado por este receptor depende del reconocimiento de una secuencia localizada en su región citoplasmática que es distinta a aquellos motivos involucrados en el tráfico endosomal.

3. Estudios con Aminas Acidotrópicas (cloruro de amonio/cloroquina)

El aumento de la forma inmadura de CatD debido a las aminas acidotrópicas se puede justificar por un impedimento en la disociación enzima-receptor en el compartimiento ácido, como lo han sugerido otros autores [223]. Como consecuencia, los receptores que la transportan no pueden reciclar al Golgi y la enzima no llega a lisosomas para su procesamiento. A su vez hay que considerar que el pH endosomal/lisosomal es neutralizado por las aminas acidotrópicas, lo cual también desfavorece el procesamiento de la proteasa. Todo esto determina, a su vez, la disminución de la relación CatD madura/CatD inmadura observada en todos los tiempos de incubación. En definitiva, tanto la enzima como el receptor, quedan acumulados en grandes compartimientos endosomales, como se observó por IFI. Esto podría ser confirmado por estudios de microscopía electrónica de transmisión.

Por otro lado, la disminución de las formas madura e inmadura de CatD que se observó a las 24 h de exposición a la amina acidotrópica, sugeriría una secreción de la

pro-enzima al medio extracelular, probablemente por defecto (al no “encontrar” receptores en el Golgi) (figura 3).

En las células T-47D, el efecto que produjo la amina acidotrópica NH_4Cl fue similar al ocurrido en las células MCF-7; un aumento de la forma inmadura de un modo tiempo-dependiente, una consecuente disminución de la relación CatD madura/CatD inmadura, y una disminución del contenido total de CatD intracelular a las 24 h de incubación con la base débil. Sin embargo hay que destacar que la disminución de la relación CatD madura/CatD inmadura en células T-47D a las 6 h es más importante con respecto a la que se observó en las MCF-7. Esto podría tener relación con el defecto de acidificación descrito para las MCF-7 [185]. La menor acidez podría determinar que el procesamiento de CatD sea más lento con respecto a las otras líneas celulares, y por lo tanto el efecto de las bases débiles resultaría más notorio, en las primeras horas de incubación, en células con acidificación normal. A pesar de esta diferencia inicial, ambas líneas celulares mostraron una disminución del contenido total de CatD a las 24 h, sugiriendo una secreción de la proenzima, y que el transporte de la enzima es selectivo, en estas líneas celulares.

Con respecto a los receptores, el aumento que observamos del CD-MPR y del CI-MPR en presencia de cloruro de amonio podría atribuirse a una disminución en la degradación de ambos receptores. Normalmente, cada MPR cumple un número de ciclos entre los endosomas y el Golgi, hasta que es conducido a los lisosomas para su degradación. Al bloquear el reciclaje del receptor con las bases débiles, el MPR no alcanzaría a cumplir el número de ciclos estipulado, y por lo tanto disminuiría su degradación. Además, es posible que se inhiba el tránsito endosoma-lisosoma para la degradación de proteínas y/o que las enzimas implicadas en el proceso de degradación estén inactivas debido al aumento de pH (figura 3).

En cuanto a sortilina, su menor expresión en presencia de las aminas acidotrópicas, podría atribuirse a que el receptor esté siendo secretado, tanto por células MCF-7 como por las T-47D. En este contexto, las bases débiles inducirían la secreción de exosomas, y, junto a ellos, de sortilina. Este efecto ha sido demostrado recientemente por Wilson C y col. [83] en una línea celular de carcinoma de pulmón incubada con monensina, en donde este ionóforo indujo una disminución del contenido intracelular de sortilina debido a un aumento en la secreción de exosomas.

Como se ha mencionado en el capítulo de resultados, los niveles de expresión de los tres receptores estudiados difieren entre las cuatro líneas celulares. Esto podría responder a una mayor demanda de uno u otro receptor dependiendo de sus diferentes funciones intracelulares o a un fenómeno de inter-regulación entre ellos, o a ambos. Sustentando la idea de que podrían interregular su expresión, observamos una disminución en la expresión del CD-MPR en células que sobreexpresan sortilina. En apoyo a la idea de esta interregulación, se ha observado que un “knock-down” de sortilina induce un incremento del CD-MPR en otros modelos celulares (Aguilera AC. Tesis de grado, 2008). Los efectos generados por la sobreexpresión de sortilina también sugieren que ésta es un receptor que transporta CatD en células mamarias tumorigénicas y no tumorigénicas, ya que se observó un aumento en la expresión de CatD (posiblemente atribuido a una retención de la enzima que en condiciones basales debería ser secretada o bien a una disminución del CD-MPR que es el que media la secreción de CatD en condiciones basales), por IFI en células MCF-10A y MCF-7.

En conclusión, sugerimos que parte de la secreción de proCatD podría responder a un mecanismo constitutivo, y otra parte a un mecanismo regulado por hormonas, implicando la participación del CD-MPR en ambos. Esta secreción selectiva puede ser requerida para conducir las proteínas secretoras a una región específica de la superficie celular, que en células polarizadas podría corresponderse a la zona apical o basolateral. Este tipo de distribución bilateral ocurre fisiológicamente en la glándula mamaria lactante [239], aunque el mecanismo de señalización y la participación de MPRs no han sido determinados. En células tumorigénicas mamarias el direccionamiento de la secreción podría permitir la secreción de enzimas por ejemplo en el frente de avance de las células durante su migración, favoreciendo la proteólisis de la MEC. En osteoclastos, la secreción polarizada de enzimas lisosomales mediada por MPRs ha sido descrita [90], en donde el CI-MPR conduciría las enzimas lisosomales de forma específica hacia la membrana plasmática apical. Una característica común entre los osteoclastos y las células tumorigénicas, es que el microambiente que las rodea posee un pH acidificado, muy bajo en el caso del compartimiento de resorción óseo ($\text{pH} \approx 2$) [90] y hasta 5.2 en el microambiente tumoral [158]. En ambos casos, el pH ácido proveería las condiciones

óptimas para la disociación enzima/MPR en la superficie celular, permitiendo el posterior reciclaje del MPR al interior celular para su re-utilización.

El mecanismo de secreción selectivo propuesto, mediado por el CD-MPR, podría sustentar lo observado por Capony F y col [189], quienes demostraron que el estradiol estimulaba la secreción de varias pro-enzimas lisosomales en células MCF-7 y sugirieron que un mecanismo general sería el responsable de tal secreción y no una alteración específica en la estructura de CatD. Varios años más tarde, Kokkoken y col [185] propusieron que un defecto de acidificación en las células MCF-7 podría ser la causa de tal secreción, aunque los resultados de nuestro trabajo contradicen de algún modo esta hipótesis. Demostramos que de existir dicha alteración no sería lo suficientemente importante como para impedir el procesamiento enzimático ni la disociación enzima-receptor, ya que las células MCF-7 respondieron al efecto de las bases débiles.

Chao H. y col. [47] han propuesto que al menos parte de la secreción basal de polipéptidos que contienen M6P involucra la unión al CD-MPR, en células BHK y células L de ratón. Este grupo demostró que aquellas células que sobreexpresaban el CD-MPR tenían una secreción basal mayor de polipéptidos con M6P comparada a la de las células con expresión normal del CD-MPR. A su vez, sugieren que la secreción incrementada resultaría de un desbalance entre el CD-MPR y el CI-MPR ya que el efecto estimulador de la sobreexpresión del CD-MPR sobre la secreción es revertido por la co-expresión del CI-MPR. En nuestro modelo de trabajo, la secreción incrementada de CatD por células MCF-7 también podría estar respondiendo a un desbalance entre ambos receptores, ya que la expresión del CD-MPR es muy alta, mientras que la del CI-MPR es la más baja de todas las líneas celulares estudiadas.

Por lo tanto, nuestras observaciones sugieren que el CD-MPR podría participar no sólo del transporte específico de CatD a compartimientos intracelulares, sino también del transporte específico de la proenzima para su secreción. A partir de los resultados presentados en esta tesis, proponemos el siguiente modelo:

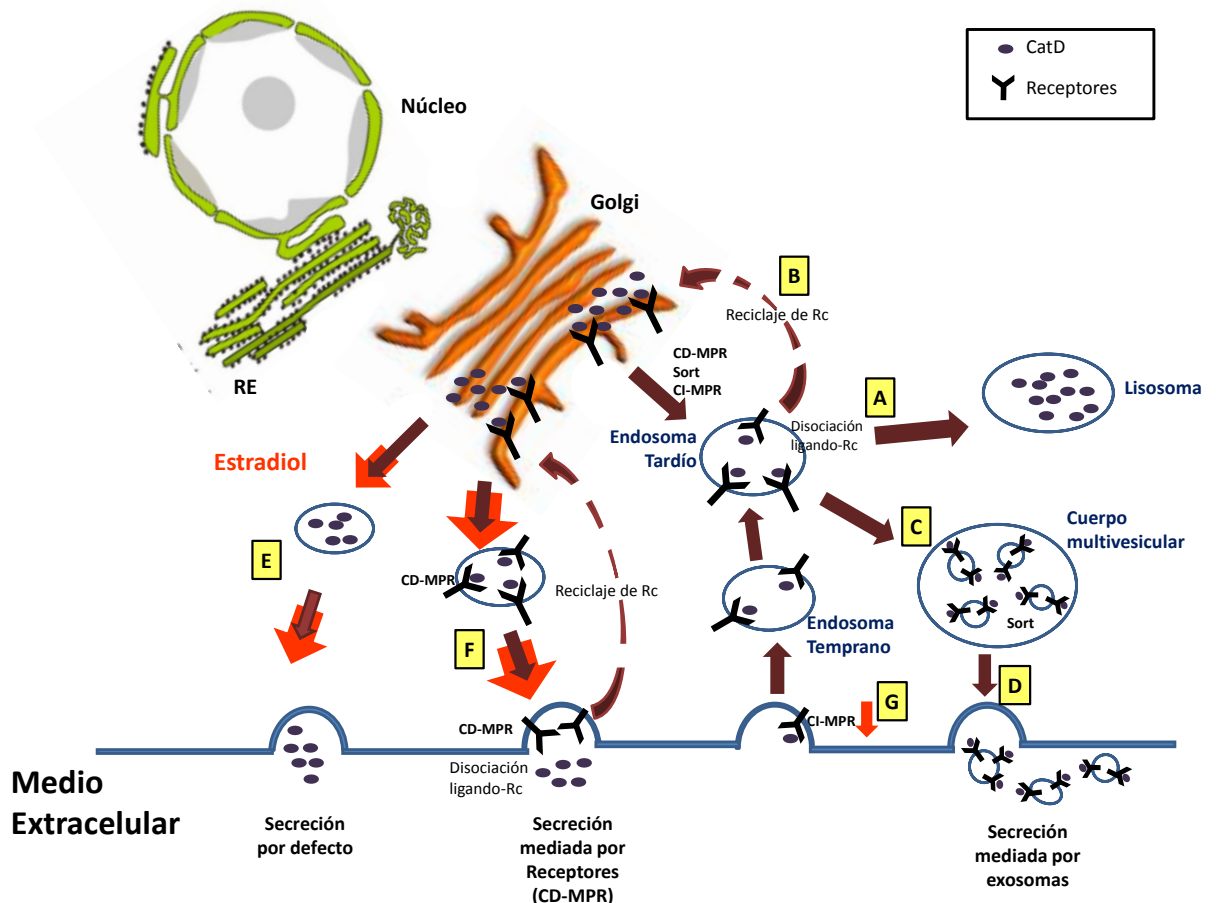


Figura 2: Modelo de transporte de catepsina D en células mamarias tumorales MCF-7 que justifica la secreción de la enzima. Las células MCF-7 tienen una alta expresión de CatD y del CD-MPR en condiciones basales. Del total de CatD sintetizada, (A) una parte sería transportada intracelularmente por el CD-MPR, CI-MPR y sortilina, desde el Golgi hacia endosomas tardíos, desde donde es conducida a lisosomas. Esta vía de transporte involucraría proteínas adaptadoras (AP) y clatrina. (B) Los receptores se disocian de la enzima gracias al pH ácido de los endosomas tardíos, pudiendo reciclar al TGN. (C) Pequeñas invaginaciones de la membrana de los endosomas tardíos dan lugar a la formación de los cuerpos multivesiculares, desde donde se produciría la (D) secreción de exosomas, conteniendo sortilina y CatD. (E) Otra parte de la enzima sintetizada sería secretada por defecto, tal como ocurre en modelos celulares fisiológicos que secretan una mínima cantidad de enzimas lisosomales mediante esta vía. (F) Otro porcentaje de la enzima sintetizada por estas células sería transportado por el CD-MPR hacia la membrana plasmática. En este caso, el reclutamiento de los complejos ligando-receptor desde el Golgi se realizaría por un mecanismo distinto al que media el transporte de los complejos hacia los endosomas. Una vez en la superficie celular, los complejos CatD/CD-MPR se disociarían gracias al pH ácido del microambiente

tumoral y la enzima sería secretada. El estradiol (naranja) exacerbaría la secreción de CatD constitutiva por defecto y mediada por el CD-MPR. A su vez, la hormona disminuiría la expresión del CI-MPR (G), lo que, junto a la acidez del microambiente tumoral desfavorecerían la recaptura de la enzima mediada por este receptor.

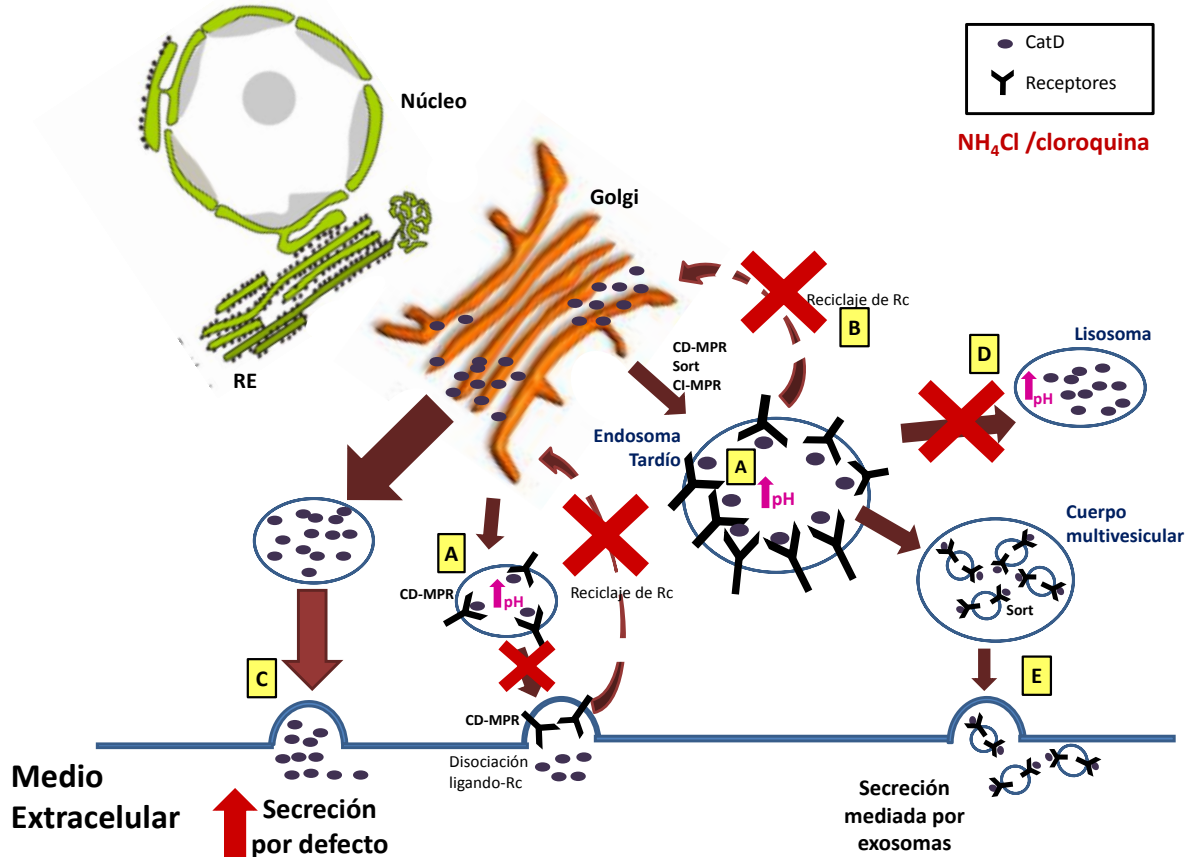


Figura 3: Redireccionamiento de enzimas y receptores inducido por aminas acidotrópicas. Las aminas acidotrópicas aumentan el pH de los compartimentos ácidos intracelulares (A). Esto imposibilita la disociación ligando-receptor en los endosomas tardíos por lo que se imposibilita el reciclaje de los receptores (B), disminuyendo su disponibilidad en el TGN. Esto conduciría a una secreción de CatD por defecto (C). A su vez, se impediría el tránsito endosoma-lisosoma (D) y la actividad de las enzimas lisosomales estaría disminuída o ausente, disminuyendo la degradación del CD-MPR. Las aminas acidotrópicas inducirían la secreción de exosomas y con ellos de sortilina (E).

CAPÍTULO VI

PROYECCIONES

Proyecciones Futuras

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis queremos profundizar el conocimiento en aspectos relacionados al transporte intracelular y secreción en el modelo de líneas celulares utilizado y en modelos “in vivo”.

Con respecto al modelo celular con el que hemos venido trabajando pretendemos:

- Identificar los compartimientos (vesículas) que estarían dirigiendo al CD-MPR y CatD hacia la membrana plasmática, para su secreción en células MCF-7.
- Estudiar si el CD-MPR puede estar implicado en la secreción de otras catepsinas (catepsina B, catepsina L) vinculadas al proceso tumorigénico.
- Estudiar si cambios en la expresión del CD-MPR en células MCF-7 influyen en la expresión de CatD y de los otros dos receptores, CI-MPR y Sort, y a su vez, si esos cambios impactan en algunas capacidades adquiridas por las células tumorales (e.g. proliferación y migración).
- Evaluar si la sobreexpresión del CD-MPR inducida por estradiol responde a un mecanismo mediado por la hormona o es desencadenado por el exceso de CatD. Se estudiaría entonces el efecto de la sobreexpresión de CatD sobre los niveles de expresión del CD-MPR, en las células MCF-7 y T-47D en comparación con otras líneas celulares no tumorigénicas.
- Determinar el mecanismo por el cual el sCI-MPR es liberado por las células tumorales. Si se trata de un clivaje extracelular, la forma de estudiarlo sería mediante la utilización de distintos inhibidores de proteasas (inhibidores de CatD y de metaloproteinasas).
- Estudiar si la sortilina participa en la secreción de CatD mediante la liberación en forma de exosomas. Para esto se obtendrían los exosomas por medio de centrifugaciones sucesivas controladas.

Como modelo “in vivo”, proyectamos utilizar muestras de tumores mamarios humanos (carcinomas ductales y lobulillares in situ e invasivos, positivos para RE) y evaluar en ellas la expresión del CD-MPR para determinar si se correlacionan con algún factor pronóstico ya establecido. También proyectamos trabajar en modelos animales con tumores mamarios inducidos, y estudiar en ellos la expresión del CD-MPR, CatD, Sort y CI-MPR.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. Watson, *Biología molecular de la célula*, Tercera ed. 1996.
- [2] M. H. Ross and W. Pawlina, *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular*, 5ta edició. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2012.
- [3] S. Robbins and R. Cotran, *Patología estructural y funcional*. Madrid, 2005.
- [4] F. Gago, *Ginecología en Atención Primaria*, 1a Ed. Buenos Aires, 2008.
- [5] C. M. Perou, T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lønning, A. L. Børresen-Dale, P. O. Brown, and D. Botstein, "Molecular portraits of human breast tumours.," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–52, Aug. 2000.
- [6] S. J. Schnitt, "Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy," *Mod. Pathol.*, vol. 23, pp. S60–S64, May 2010.
- [7] I. Mitrus, E. Bryndza, A. Sochanik, and S. Szala, "Evolving models of tumor origin and progression.," *Tumour Biol.*, vol. 33, no. 4, pp. 911–7, Aug. 2012.
- [8] R. A. Weinberg, *Biology of the Cancer*, 2nd ed. New York: Garland Science, 2014.
- [9] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5. pp. 646–674, 2011.
- [10] R. Perona, "Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors.," *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 8, no. 2, pp. 77–82, Feb. 2006.
- [11] N. E. Hynes and G. MacDonald, "ErbB receptors and signaling pathways in cancer.," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 21, no. 2, pp. 177–84, Apr. 2009.
- [12] B. Jiang and L. Liu, "Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis," 2009, pp. 19–65.
- [13] L. Yang, Y. Pang, and H. L. Moses, "TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression," *Trends Immunol.*, vol. 31, no. 6, pp. 220–227, Jun. 2010.
- [14] G. Berx and F. van Roy, "Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 6, pp. a003129–a003129, Dec. 2009.
- [15] M. W. Klymkowsky and P. Savagner, "Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe.," *Am. J. Pathol.*, vol. 174, no. 5, pp. 1588–93, May 2009.
- [16] R. Kalluri and M. Zeisberg, "Fibroblasts in cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 5, pp. 392–401, May 2006.
- [17] Z. Castaño, K. Tracy, and S. S. McAllister, "The tumor macroenvironment and systemic regulation of breast cancer progression," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 55, no. 7-8-9, pp. 889–897,

- 2011.
- [18] J. S. Bonifacino and B. S. Glick, "The mechanisms of vesicle budding and fusion.," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 153–66, Jan. 2004.
- [19] J. E. Rothman and F. T. Wieland, "Protein sorting by transport vesicles.," *Science*, vol. 272, no. 5259, pp. 227–34, Apr. 1996.
- [20] C. Peters and K. von Figura, "Biogenesis of lysosomal membranes.," *FEBS Lett.*, vol. 346, no. 1, pp. 108–14, Jun. 1994.
- [21] X. Ni, M. Canuel, and C. R. Morales, "The sorting and trafficking of lysosomal proteins," *Histol. Histopathol.*, vol. 21, no. 7–9, pp. 899–913, 2006.
- [22] D. Dian, S. Heublein, I. Wiest, L. Barthell, K. Friese, and U. Jeschke, "Significance of the tumor protease cathepsin D for the biology of breast cancer," *Histol. Histopathol.*, vol. 29, no. 4, pp. 433–438, 2014.
- [23] T. Braulke and J. S. Bonifacino, "Sorting of lysosomal proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1793, no. 4, pp. 605–614, 2009.
- [24] D. A. Lazzarino and C. A. Gabel, "Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides.," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 9, pp. 5015–23, Mar. 1989.
- [25] D. Reczek, M. Schwake, J. Schröder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds, and P. Saftig, "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase.," *Cell*, vol. 131, no. 4, pp. 770–83, Nov. 2007.
- [26] M. Canuel, A. Korkidakis, K. Konnyu, and C. R. Morales, "Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 373, no. 2, pp. 292–297, 2008.
- [27] A. Wähe, B. Kasmapour, C. Schmaderer, D. Liebl, K. Sandhoff, A. Nykjaer, G. Griffiths, and M. G. Gutierrez, "Golgi-to-phagosome transport of acid sphingomyelinase and prosaposin is mediated by sortilin.," *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 14, pp. 2502–11, Jul. 2010.
- [28] E. C. Dell'Angelica and G. S. Payne, "Intracellular cycling of lysosomal enzyme receptors: Cytoplasmic tails' tales," *Cell*, vol. 106, no. 4, pp. 395–398, 2001.
- [29] C. Kienzle and J. Von Blume, "Secretory cargo sorting at the trans -Golgi network," *Trends Cell Biol.*, vol. 24, no. 10, pp. 584–593, 2014.
- [30] U. Sandholzer, K. Von Figura, and R. Pohlmann, "Function and properties of chimeric MPR 46-MPR 300 mannose 6-phosphate receptors," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 19, pp. 14132–14138, 2000.
- [31] P. Lobel, K. Fujimoto, R. D. Ye, G. Griffiths, and S. Kornfeld, "Mutations in the cytoplasmic

- domain of the 275 kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis.," *Cell*, vol. 57, no. 5, pp. 787–96, Jun. 1989.
- [32] A. Hille-Rehfeld, "Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1241, no. 2, pp. 177–94, Jul. 1995.
- [33] R. Le Borgne and B. Hoflack, "Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1404, no. 1–2, pp. 195–209, Aug. 1998.
- [34] N. M. Dahms, P. Lobel, J. Breitmeyer, J. M. Chirgwin, and S. Kornfeld, "46 kd mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor.," *Cell*, vol. 50, no. 2, pp. 181–92, Jul. 1987.
- [35] J. E. Bleekemolen, M. Stein, K. von Figura, J. W. Slot, and H. J. Geuze, "The two mannose 6-phosphate receptors have almost identical subcellular distributions in U937 monocytes.," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 47, no. 2, pp. 366–72, Dec. 1988.
- [36] D. O. Morgan, J. C. Edman, D. N. Standring, V. A. Fried, M. C. Smith, R. A. Roth, and W. J. Rutter, "Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein.," *Nature*, vol. 329, no. 6137, pp. 301–7.
- [37] S. J. York, L. S. Arneson, W. T. Gregory, N. M. Dahms, and S. Kornfeld, "The rate of internalization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is enhanced by multivalent ligand binding.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 2, pp. 1164–71, Jan. 1999.
- [38] J. C. Byrd, J. H. Park, B. S. Schaffer, F. Garmroudi, and R. G. MacDonald, "Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 25, pp. 18647–56, Jun. 2000.
- [39] "Mechanisms for high affinity mannose 6-phosphate ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. - PubMed - NCBI." [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Mechanisms+for+high+affinity+mannose+6-phosphate+ligand+binding+to+the+insulin-like+growth+factor+II%2Fmannose+6-phosphate+receptor>.
- [40] G. Bobek, C. D. Scott, and R. C. Baxter, "Radioimmunoassay of soluble insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor: developmental regulation of receptor release by rat tissues in culture.," *Endocrinology*, vol. 130, no. 6, pp. 3387–94, Jun. 1992.
- [41] M. Costello, R. C. Baxter, and C. D. Scott, "Regulation of soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in human serum: measurement by enzyme-linked immunosorbent assay.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 84, no. 2, pp. 611–7, Feb. 1999.
- [42] K. von Figura and A. Hasilik, "Lysosomal enzymes and their receptors.," *Annu. Rev.*

- Biochem.*, vol. 55, pp. 167–93, 1986.
- [43] N. M. Dahms and S. Kornfeld, “The cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Structural requirements for mannose 6-phosphate binding and oligomerization.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 19, pp. 11458–67, Jul. 1989.
- [44] P. Ghosh, N. M. Dahms, and S. Kornfeld, “MANNOSE 6-PHOSPHATE RECEPTORS : NEW TWISTS IN THE TALE,” vol. 4, no. March, pp. 202–212, 2003.
- [45] P. Y. Tong and S. Kornfeld, “Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 14, pp. 7970–5, May 1989.
- [46] M. Qian, D. E. Sleat, H. Zheng, D. Moore, and P. Lobel, “Proteomics analysis of serum from mutant mice reveals lysosomal proteins selectively transported by each of the two mannose 6-phosphate receptors.,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 7, no. 1, pp. 58–70, Jan. 2008.
- [47] H. H. Chao, a Waheed, R. Pohlmann, a Hille, and K. von Figura, “Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes.,” *EMBO J.*, vol. 9, no. 11, pp. 3507–3513, 1990.
- [48] E. van Meel and J. Klumperman, “Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system.,” *Histochem. Cell Biol.*, vol. 129, no. 3, pp. 253–66, Mar. 2008.
- [49] H. Lodish, A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, *Biología celular y molecular*, 4ta edición. 2002.
- [50] M. Stein, T. Braulke, C. Krentler, A. Hasilik, and K. von Figura, “46-kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology.,” *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, vol. 368, no. 8, pp. 937–47, Aug. 1987.
- [51] S. Godár, V. Horejsi, U. H. Weidle, B. R. Binder, C. Hansmann, and H. Stockinger, “M6P/IGFII-receptor complexes urokinase receptor and plasminogen for activation of transforming growth factor-beta1.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 29, no. 3, pp. 1004–13, Mar. 1999.
- [52] B. Motyka, G. Korbitt, M. J. Pinkoski, J. A. Heibin, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C. F. Holmes, J. Gaudie, and R. C. Bleackley, “Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis.,” *Cell*, vol. 103, no. 3, pp. 491–500, Oct. 2000.
- [53] F. Blanchard, L. Duplomb, S. Raheer, P. Vusio, B. Hoflack, Y. Jacques, and A. Godard, “Mannose 6-Phosphate/Insulin-like growth factor II receptor mediates internalization and degradation of leukemia inhibitory factor but not signal transduction.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 35, pp. 24685–93, Aug. 1999.
- [54] J. X. Kang, J. Bell, A. Leaf, R. L. Beard, and R. A. Chandraratna, “Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor

- and lysosomal enzymes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 23, pp. 13687–91, Nov. 1998.
- [55] T. Braulke, "Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein.," *Horm. Metab. Res. = Horm. und Stoffwechselforsch. = Horm. métabolisme*, vol. 31, no. 2–3, pp. 242–6.
- [56] R. Stöger, P. Kubicka, C. G. Liu, T. Kafri, A. Razin, H. Cedar, and D. P. Barlow, "Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal.," *Cell*, vol. 73, no. 1, pp. 61–71, Apr. 1993.
- [57] J. S. Lee, J. Weiss, J. L. Martin, and C. D. Scott, "Increased expression of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor in breast cancer cells alters tumorigenic properties in vitro and in vivo.," *Int. J. cancer*, vol. 107, no. 4, pp. 564–70, Nov. 2003.
- [58] W. Kiess, G. D. Blickenstaff, M. M. Sklar, C. L. Thomas, S. P. Nissley, and G. G. Sahagian, "Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor.," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 19, pp. 9339–44, Jul. 1988.
- [59] S. Kornfeld, "Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors.," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 61, pp. 307–30, 1992.
- [60] S. Wang, R. F. Souza, D. Kong, J. Yin, K. N. Smolinski, T. T. Zou, T. Frank, J. Young, K. C. Flanders, H. Sugimura, J. M. Abraham, and S. J. Meltzer, "Deficient transforming growth factor-beta1 activation and excessive insulin-like growth factor II (IGFII) expression in IGFII receptor-mutant tumors.," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 13, pp. 2543–6, Jul. 1997.
- [61] A. Hasilik, A. Waheed, and K. von Figura, "Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in the presence of UDP-N-acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell fibroblasts.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 98, no. 3, pp. 761–7, Feb. 1981.
- [62] A. L. Miller, B. C. Kress, R. Stein, C. Kinnon, H. Kern, J. A. Schneider, and E. Harms, "Properties of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase from isolated normal and I-cell lysosomes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 256, no. 17, pp. 9352–62, Sep. 1981.
- [63] A. Waheed, R. Pohlmann, A. Hasilik, K. von Figura, A. van Elsen, and J. G. Leroy, "Deficiency of UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase in organs of I-cell patients.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 105, no. 3, pp. 1052–8, Apr. 1982.
- [64] M. Owada and E. F. Neufeld, "Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 105, no. 3, pp. 814–20, Apr. 1982.
- [65] L. Little, M. Alcouloumre, A. M. Drotar, S. Herman, R. Robertson, R. Y. Yeh, and A. L. Miller, "Properties of N-acetylglucosamine 1-phosphotransferase from human lymphoblasts.,"

- Biochem. J.*, vol. 248, no. 1, pp. 151–9, Nov. 1987.
- [66] J. N. Glickman and S. Kornfeld, “Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts,” *J. Cell Biol.*, vol. 123, no. 1, pp. 99–108, 1993.
- [67] S. Rijnboutt, H. M. Aerts, H. J. Geuze, J. M. Tager, and G. J. Strous, “Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 8, pp. 4862–8, Mar. 1991.
- [68] A. Velayati, J. DePaolo, N. Gupta, J. H. Choi, N. Moaven, W. Westbroek, O. Goker-Alpan, E. Goldin, B. K. Stubblefield, E. Kolodny, N. Tayebi, and E. Sidransky, “A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease,” *Hum. Mutat.*, vol. 32, no. 11, pp. 1232–8, Nov. 2011.
- [69] C. M. Petersen, M. S. Nielsen, A. Nykjaer, L. Jacobsen, N. Tommerup, H. H. Rasmussen, H. Roigaard, J. Gliemann, P. Madsen, and S. K. Moestrup, “Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 6, pp. 3599–605, Feb. 1997.
- [70] M. S. Nielsen, P. Madsen, E. I. Christensen, A. Nykjaer, J. Gliemann, D. Kasper, R. Pohlmann, and C. M. Petersen, “The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein,” *EMBO J.*, vol. 20, no. 9, pp. 2180–90, May 2001.
- [71] T. E. Willnow, C. M. Petersen, and A. Nykjaer, “VPS10P-domain receptors - regulators of neuronal viability and function,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 9, no. 12, pp. 899–909, Dec. 2008.
- [72] C. Munck Petersen, M. S. Nielsen, C. Jacobsen, J. Tauris, L. Jacobsen, J. Gliemann, S. K. Moestrup, and P. Madsen, “Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 3, pp. 595–604, Feb. 1999.
- [73] M. Canuel, Y. Libin, and C. R. Morales, “The interactomics of sortilin: an ancient lysosomal receptor evolving new functions,” *Histol. Histopathol.*, vol. 24, no. 4, pp. 481–92, Apr. 2009.
- [74] J. Tauris, L. Ellgaard, C. Jacobsen, M. S. Nielsen, P. Madsen, H. C. Thøgersen, J. Gliemann, C. M. Petersen, and S. K. Moestrup, “The carboxy-terminal domain of the receptor-associated protein binds to the Vps10p domain of sortilin,” *FEBS Lett.*, vol. 429, no. 1, pp. 27–30, Jun. 1998.
- [75] E. G. Marcusson, B. F. Horazdovsky, J. L. Cereghino, E. Gharakhanian, and S. D. Emr, “The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene,” *Cell*, vol. 77, no. 4, pp. 579–86, May 1994.
- [76] S. Lefrancois, J. Zeng, A. J. Hassan, M. Canuel, and C. R. Morales, “The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin,” *EMBO J.*, vol. 22, no. 24, pp. 6430–7, Dec. 2003.
- [77] J. Shi and K. V. Kandror, “The luminal Vps10p domain of sortilin plays the predominant role

- in targeting to insulin-responsive Glut4-containing vesicles.," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 12, pp. 9008–16, Mar. 2007.
- [78] J. Shi and K. V KandrOr, "Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes.," *Dev. Cell*, vol. 9, no. 1, pp. 99–108, Jul. 2005.
- [79] A. Nykjaer and T. E. Willnow, "Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function.," *Trends Neurosci.*, vol. 35, no. 4, pp. 261–70, Apr. 2012.
- [80] E. J. Mufson, J. Wu, S. E. Counts, and A. Nykjaer, "Preservation of cortical sortilin protein levels in MCI and Alzheimer's disease.," *Neurosci. Lett.*, vol. 471, no. 3, pp. 129–33, Mar. 2010.
- [81] S. Roselli, J. Pundavela, Y. Demont, S. Faulkner, J. Attia, C. C. Jiang, X. D. Zhang, M. M. Walker, and H. Hondermarck, "Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion," *Oncotarget*, vol. 6, no. 12, 2015.
- [82] H. Akil, A. Lie Perraud, C. Mé Lin, M.-O. Jauberteau, and M. Mathonnet, "Fine-Tuning Roles of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB and Sortilin in Colorectal Cancer Cell Survival," *PLoS One*, vol. 6, no. 9, 2011.
- [83] C. M. Wilson, T. Naves, F. Vincent, B. Melloni, F. Bonnaud, F. Lalloué, and M.-O. Jauberteau, "Sortilin mediates the release and transfer of exosomes in concert with two tyrosine kinase receptors.," *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. Pt 18, pp. 3983–97, 2014.
- [84] R. Tanimoto, A. Morcavallo, M. Terracciano, S.-Q. Xu, M. Stefanello, S. Buraschi, K. G. Lu, D. H. Bagley, L. G. Gomella, K. Scotlandi, A. Belfiore, R. V Iozzo, and A. Morrione, "Sortilin regulates progranulin action in castration-resistant prostate cancer cells.," *Endocrinology*, vol. 156, no. 1, pp. 58–70, Jan. 2015.
- [85] F. Truzzi, A. Marconi, R. Lotti, K. Dallaglio, L. E. French, B. L. Hempstead, and C. Pincelli, "Neurotrophins and Their Receptors Stimulate Melanoma Cell Proliferation and Migration," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 128, no. 10, pp. 2031–2040, 2008.
- [86] S. A. Igdoura, A. Rasky, and C. R. Morales, "Trafficking of sulfated glycoprotein-1 (prosaposin) to lysosomes or to the extracellular space in rat Sertoli cells.," *Cell Tissue Res.*, vol. 283, no. 3, pp. 385–94, Mar. 1996.
- [87] C. Devader, S. Béraud-Dufour, T. Coppola, and J. Mazella, "The Anti-Apoptotic Role of Neurotensin," *Cells*, vol. 2, no. 1, pp. 124–135, 2013.
- [88] A. Nykjaer, R. Lee, K. K. Teng, P. Jansen, P. Madsen, M. S. Nielsen, C. Jacobsen, M. Kliemannel, E. Schwarz, T. E. Willnow, B. L. Hempstead, and C. M. Petersen, "Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death.," *Nature*, vol. 427, no. 6977, pp. 843–8, Feb. 2004.
- [89] Y. Demont, C. Corbet, A. Page, Y. Ataman-Önal, G. Choquet-Kastylevsky, I. Fliniaux, X. Le Bourhis, R. A. Toillon, R. A. Bradshaw, and H. Hondermarck, "Pro-nerve growth factor

- induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 3, pp. 1923–1931, 2012.
- [90] R. Baron, L. Neff, W. Brown, P. J. Courtoy, D. Louvard, and M. G. Farquhar, "Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway.," *J. Cell Biol.*, vol. 106, no. 6, pp. 1863–72, Jun. 1988.
- [91] L. S. Mayorga and F. Bertini, "The origin of some acid hydrolases of the fluid of the rat cauda epididymidis.," *J. Androl.*, vol. 6, no. 4, pp. 243–5.
- [92] M. D. Skudlarek and M. C. Orgebin-Crist, "Glycosidases in cultured rat epididymal cells: enzyme activity, synthesis and secretion.," *Biol. Reprod.*, vol. 35, no. 1, pp. 167–78, Aug. 1986.
- [93] D. R. Tulsiani, M. D. Skudlarek, Y. Araki, and M. C. Orgebin-Crist, "Purification and characterization of two forms of beta-D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein(s).," *Biochem. J.*, pp. 41–50, Jan. 1995.
- [94] L. S. Mayorga and F. Bertini, "Effect of androgens on the activity of acid hydrolases in rat epididymis.," *Int. J. Androl.*, vol. 5, no. 3, pp. 345–52, Jun. 1982.
- [95] A. A. Moura, D. A. Chapman, H. Koc, and G. J. Killian, "Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls.," *J. Androl.*, vol. 27, no. 4, pp. 534–41.
- [96] L. F. Carvelli, N. Bannoud, C. A. Aguilera, C. R. Morales, and M. A. Sosa, "Castration induces changes in the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor in rat epididymis: Possible implications in secretion of lysosomal enzymes," *J. Cell. Biochem.*, vol. 110, no. 5, pp. 1101–1110, Apr. 2010.
- [97] S. A. Belmonte, P. Romano, T. Sartor, and M. A. Sosa, "Compartmentalization of lysosomal enzymes in cauda epididymis of normal and castrated rats.," *Arch. Androl.*, vol. 48, no. 3, pp. 193–201.
- [98] M. M. Mohamed and B. F. Sloane, "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 764–775, 2006.
- [99] T. Nomura and N. Katunuma, "Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells," *J. Med. Investig.*, vol. 52, no. February, pp. 1–9, 2005.
- [100] J. Faulhaber, A. Fensom, and A. Hasilik, "Abnormal lysosomal sorting with an enhanced secretion of cathepsin D precursor molecules bearing monoester phosphate groups.," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 77, no. 2, pp. 134–40, Oct. 1998.
- [101] M. L. Anson, "THE PURIFICATION OF CATHEPSIN.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 23, no. 6, pp. 695–704, Jul. 1940.

- [102] E. M. PRESS, R. R. PORTER, and J. CEBRA, "The isolation and properties of a proteolytic enzyme, cathepsin D, from bovine spleen.," *Biochem. J.*, vol. 74, pp. 501–14, Mar. 1960.
- [103] P. Augereau, M. Garcia, M. G. Mattei, V. Cavailles, F. Depadova, D. Derocq, F. Capony, P. Ferrara, and H. Rochefort, "Cloning and sequencing of the 52K cathepsin D complementary deoxyribonucleic acid of MCF7 breast cancer cells and mapping on chromosome 11.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 2, no. 2, pp. 186–92, Feb. 1988.
- [104] Z. Khalkhali-Ellis and M. J. C. Hendrix, "Two Faces of Cathepsin D: Physiological Guardian Angel and Pathological Demon.," *Biol. Med. (Aligarh)*, vol. 6, no. 2, Jul. 2014.
- [105] N. Zaidi, A. Maurer, S. Nieke, and H. Kalbacher, "Cathepsin D: A cellular roadmap," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 376, no. 1, pp. 5–9, 2008.
- [106] V. Cavailles, P. Augereau, and H. Rochefort, "Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter, and estrogens stimulate only TATA-dependent transcription in breast cancer cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 1, pp. 203–7, Jan. 1993.
- [107] B. Westley and H. Rochefort, "A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. - PubMed - NCBI," *Cell*, 1980. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+secreted+glycoprotein+induced+by+estrogen+in+human+breast+c%3%A1ncer+cell+lines.+Westley+B+1980>.
- [108] F. Wang, R. Duan, J. Chirgwin, and S. H. Safe, "Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by growth factors.," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 24, no. 2, pp. 193–202, Apr. 2000.
- [109] T. Saku, H. Sakai, Y. Shibata, Y. Kato, and K. Yamamoto, "An immunocytochemical study on distinct intracellular localization of cathepsin E and cathepsin D in human gastric cells and various rat cells.," *J. Biochem.*, vol. 110, no. 6, pp. 956–64, Dec. 1991.
- [110] A. H. Erickson and G. Blobel, "Early events in the biosynthesis of the lysosomal enzyme cathepsin D.," *J. Biol. Chem.*, vol. 254, no. 23, pp. 11771–4, Dec. 1979.
- [111] A. Hasilik, K. von Figura, E. Conzelmann, H. Nehr Korn, and K. Sandhoff, "Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of beta-hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 125, no. 2, pp. 317–21, Jul. 1982.
- [112] Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K, and Morales CR, "Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. - PubMed - NCBI," *Biochem Biophys Res Commun*, 2008.
- [113] V. Gieselmann, R. Pohlmann, A. Hasilik, and K. Von Figura, "Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts.," *J. Cell Biol.*, vol. 97, no. 1, pp. 1–5, Jul. 1983.
- [114] V. Laurent-Matha, D. Derocq, C. Prébois, N. Katunuma, and E. Liaudet-Coopman, "Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B.," *J. Biochem.*, vol. 139, no. 3, pp. 363–71, Mar. 2006.

- [115] V. Gieselmann, A. Hasilik, and K. von Figura, "Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro.," *J. Biol. Chem.*, vol. 260, no. 5, pp. 3215–20, Mar. 1985.
- [116] G. E. Conner and G. Richo, "Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D.," *Biochemistry*, vol. 31, no. 4, pp. 1142–7, Feb. 1992.
- [117] O. Masson, A. S. Bach, D. Derocq, C. Prébois, V. Laurent-Matha, S. Pattingre, and E. Liaudet-Coopman, "Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity?," *Biochimie*, vol. 92, no. 11, pp. 1635–1643, 2010.
- [118] A. Vashishta, S. Saraswat Ohri, J. Vetvickova, M. Fusek, J. Ulrichova, and V. Vetvicka, "Procathepsin D secreted by HaCaT keratinocyte cells - A novel regulator of keratinocyte growth.," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 86, no. 6, pp. 303–13, Jun. 2007.
- [119] M. Zühlsdorf, M. Imort, A. Hasilik, and K. von Figura, "Molecular forms of beta-hexosaminidase and cathepsin D in serum and urine of healthy subjects and patients with elevated activity of lysosomal enzymes.," *Biochem. J.*, vol. 213, no. 3, pp. 733–40, Sep. 1983.
- [120] V. Větvička, J. Vágner, M. Baudys, J. Tang, S. I. Foundling, and M. Fusek, "Human breast milk contains procathepsin D--detection by specific antibodies.," *Biochem. Mol. Biol. Int.*, vol. 30, no. 5, pp. 921–8, Aug. 1993.
- [121] N. V. Margaryan, D. A. Kirschmann, A. Lipavsky, C. M. Bailey, M. J. C. Hendrix, and Z. Khalkhali-Ellis, "New insights into cathepsin D in mammary tissue development and remodeling.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 10, no. 5, pp. 457–66, Sep. 2010.
- [122] M. Lkhider, R. Castino, E. Bouguyon, C. Isidoro, and M. Ollivier-Bousquet, "Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions.," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 21, pp. 5155–64, Oct. 2004.
- [123] A. M. Corbacho, G. Martínez De La Escalera, and C. Clapp, "Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis.," *J. Endocrinol.*, vol. 173, no. 2, pp. 219–38, May 2002.
- [124] I. Struman, F. Bentzien, H. Lee, V. Mainfroid, G. D'Angelo, V. Goffin, R. I. Weiner, and J. A. Martial, "Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 4, pp. 1246–51, Feb. 1999.
- [125] D. A. Sorrell, M. Szymanowska, M. Boutinaud, C. Robinson, R. W. E. Clarkson, T. Stein, D. J. Flint, and A. F. Kolb, "Regulation of genes encoding proteolytic enzymes during mammary gland development.," *J. Dairy Res.*, vol. 72, no. 4, pp. 433–41, Nov. 2005.
- [126] R. Castino, S. Delpal, E. Bouguyon, M. Demoz, C. Isidoro, and M. Ollivier-Bousquet, "Prolactin

- promotes the secretion of active cathepsin D at the basal side of rat mammary acini," *Endocrinology*, vol. 149, no. 8, pp. 4095–4105, 2008.
- [127] L. Yuan, F. L. Carvelli, and C. R. Morales, "Dynamic Microscopy : Reconstructing a Novel Lysosomal Trafficking Pathway 2 . Eukaryotic Cell and Cellular Compartments 3 . Prosaposin Overview . Evidence for a MPR Independent Trafficking," pp. 1–16.
- [128] M. M. Gopalakrishnan, H.-W. Grosch, S. Locatelli-Hoops, N. Werth, E. Smolenová, M. Nettersheim, K. Sandhoff, and A. Hasilik, "Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation.," *Biochem. J.*, vol. 383, no. Pt. 3, pp. 507–15, Nov. 2004.
- [129] A. M. Vaccaro, R. Salvioli, M. Tatti, and F. Ciaffoni, "Saposins and their interaction with lipids.," *Neurochem. Res.*, vol. 24, no. 2, pp. 307–14, Feb. 1999.
- [130] Y. Sun, D. P. Witte, H. Ran, M. Zamzow, S. Barnes, H. Cheng, X. Han, M. T. Williams, M. R. Skelton, C. V Vorhees, and G. A. Grabowski, "Neurological deficits and glycosphingolipid accumulation in saposin B deficient mice.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 17, no. 15, pp. 2345–56, Aug. 2008.
- [131] R. Salvioli, L. Ricci-Vitiani, M. Tatti, S. Scarpa, R. De Maria, and A. M. Vaccaro, "The secretion and maturation of prosaposin and procathepsin D are blocked in embryonic neural progenitor cells.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1783, no. 8, pp. 1480–9, Aug. 2008.
- [132] K. Sandhoff and T. Kolter, "Topology of glycosphingolipid degradation.," *Trends Cell Biol.*, vol. 6, no. 3, pp. 98–103, Mar. 1996.
- [133] S. A. Igdoura and C. R. Morales, "Role of sulfated glycoprotein-1 (SGP-1) in the disposal of residual bodies by Sertoli cells of the rat.," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 40, no. 1, pp. 91–102, Jan. 1995.
- [134] A. L. Rosenthal, S. A. Igdoura, C. R. Morales, and L. Hermo, "Hormonal regulation of sulfated glycoprotein-1 synthesis by nonciliated cells of the efferent ducts of adult rats.," *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 40, no. 1, pp. 69–83, Jan. 1995.
- [135] Q. Zhao and C. R. Morales, "Identification of a novel sequence involved in lysosomal sorting of the sphingolipid activator protein prosaposin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 32, pp. 24829–39, Aug. 2000.
- [136] V. Vetvicka, J. Vetvickova, and M. Fusek, "Role of procathepsin D activation peptide in prostate cancer growth.," *Prostate*, vol. 44, no. 1, pp. 1–7, Jun. 2000.
- [137] M. Glondu, E. Liaudet-Coopman, D. Derocq, N. Platet, H. Rochefort, and M. Garcia, "Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells.," *Oncogene*, vol. 21, no. 33, pp. 5127–34, Aug. 2002.

- [138] G. Leto, F. M. Tumminello, M. Crescimanno, C. Flandina, and N. Gebbia, "Cathepsin D expression levels in nongynecological solid tumors: clinical and therapeutic implications.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 21, no. 2, pp. 91–106, 2004.
- [139] T. L. DAO, F. G. BOCK, and M. J. GREINER, "Mammary carcinogenesis by 3-methylcholanthrene. II. Inhibitory effect of pregnancy and lactation on tumor induction.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 25, pp. 991–1003, Nov. 1960.
- [140] W. A. Reid, M. J. Valler, and J. Kay, "Immunolocalization of cathepsin D in normal and neoplastic human tissues.," *J. Clin. Pathol.*, vol. 39, no. 12, pp. 1323–30, Dec. 1986.
- [141] F. Capony, C. Rougeot, P. Montcourrier, V. Cavailles, G. Salazar, and H. Rochefort, "Increased Secretion, Altered Processing, and Glycosylation of Pro-Cathepsin D in Human Mammary Cancer Cells Increased Secretion, Altered Processing, and Glycosylation of Pro-Cathepsin D in Human Mammary Cancer Cells1," no. 44, pp. 3904–3909, 1989.
- [142] H. Rochefort, "Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis.," *Eur. J. Cancer*, vol. 28A, no. 11, pp. 1780–3, 1992.
- [143] G. Ferrandina, G. Scambia, F. Bardelli, P. Benedetti Panici, S. Mancuso, and A. Messori, "Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis.," *Br. J. Cancer*, vol. 76, no. 5, pp. 661–6, 1997.
- [144] J. A. Foekens, M. P. Look, J. Bolt-de Vries, M. E. Meijer-van Gelder, W. L. van Putten, and J. G. Klijn, "Cathepsin-D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients.," *Br. J. Cancer*, vol. 79, no. 2, pp. 300–7, Jan. 1999.
- [145] J. P. Brouillet, F. Dufour, G. Lemamy, M. Garcia, N. Schlup, J. Grenier, J. C. Mani, and H. Rochefort, "Increased cathepsin D level in the serum of patients with metastatic breast carcinoma detected with a specific pro-cathepsin D immunoassay.," *Cancer*, vol. 79, no. 11, pp. 2132–6, Jun. 1997.
- [146] V. Cavailles, P. Augereau, M. Garcia, and H. Rochefort, "Estrogens and growth factors induce the mRNA of the 52K-pro-cathepsin-D secreted by breast cancer cells.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 16, no. 5, pp. 1903–19, Mar. 1988.
- [147] C. Giamarchi, M. Solanas, C. Chailleux, P. Augereau, F. Vignon, H. Rochefort, and H. Richard-Foy, "Chromatin structure of the regulatory regions of pS2 and cathepsin D genes in hormone-dependent and -independent breast cancer cell lines.," *Oncogene*, vol. 18, no. 2, pp. 533–41, Jan. 1999.
- [148] Z. Kyselova, Y. Mechref, P. Kang, J. A. Goetz, L. E. Dobrolecki, G. W. Sledge, L. Schnaper, R. J. Hickey, L. H. Malkas, and M. V Novotny, "Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles.," *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 7, pp. 1166–75, Jul. 2008.

- [149] V. Větvicka, J. Věktvicková, and M. Fusek, "Effect of human procathepsin D on proliferation of human cell lines.," *Cancer Lett.*, vol. 79, no. 2, pp. 131–5, May 1994.
- [150] G. Berchem, M. Glondu, M. Gleizes, J.-P. Brouillet, F. Vignon, M. Garcia, and E. Liaudet-Coopman, "Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis.," *Oncogene*, vol. 21, no. 38, pp. 5951–5, Aug. 2002.
- [151] M. Garcia, D. Derocq, P. Pujol, and H. Rochefort, "Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency.," *Oncogene*, vol. 5, no. 12, pp. 1809–14, Dec. 1990.
- [152] L. A. Liotta, C. N. Rao, and S. H. Barsky, "Tumor invasion and the extracellular matrix.," *Lab. Invest.*, vol. 49, no. 6, pp. 636–49, Dec. 1983.
- [153] A. Noël, C. Gilles, K. Bajou, L. Devy, F. Kebers, J. M. Lewalle, E. Maquoui, C. Munaut, A. Remacle, and J. M. Foidart, "Emerging roles for proteinases in cancer.," *Invasion Metastasis*, vol. 17, no. 5, pp. 221–39, 1997.
- [154] J. E. Koblinski, M. Ahram, and B. F. Sloane, "Unraveling the role of proteases in cancer.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 291, no. 2, pp. 113–35, Feb. 2000.
- [155] M. Sameni, E. Elliott, G. Ziegler, F. P. H. C. Dennisom, and B. F. Sloane, "Cathepsin B and D are Localized at the Surface of Human Breast Cancer Cells," *Pathology Oncology Research*, vol. 1. pp. 43–53, 1995.
- [156] T. T. Lah, M. R. Buck, K. V Honn, J. D. Crissman, N. C. Rao, L. A. Liotta, and B. F. Sloane, "Degradation of laminin by human tumor cathepsin B.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 7, no. 4, pp. 461–8.
- [157] M. R. Buck, D. G. Karustis, N. A. Day, K. V Honn, and B. F. Sloane, "Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues.," *Biochem. J.*, pp. 273–8, Feb. 1992.
- [158] C. Ward, S. P. Langdon, P. Mullen, A. L. Harris, D. J. Harrison, C. T. Supuran, and I. H. Kunkler, "New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer.," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 39, no. 2, pp. 171–179, Apr. 2013.
- [159] P. Montcourrier, I. Silver, R. Farnoud, I. Bird, and H. Rochefort, "Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism.," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 15, no. 4, pp. 382–92, Jul. 1997.
- [160] P. J. Coopman, D. M. Thomas, K. R. Gehlsen, and S. C. Mueller, "Integrin alpha 3 beta 1 participates in the phagocytosis of extracellular matrix molecules by human breast cancer cells.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 7, no. 11, pp. 1789–804, Nov. 1996.
- [161] P. Montcourrier, P. H. Mangeat, G. Salazar, M. Morisset, A. Sahuquet, and H. Rochefort, "Cathepsin D in breast cancer cells can digest extracellular matrix in large acidic vesicles.,"

- Cancer Res.*, vol. 50, no. 18, pp. 6045–54, Sep. 1990.
- [162] P. Montcourrier, P. H. Mangeat, C. Valembois, G. Salazar, A. Sahuquet, C. Duperray, and H. Rochefort, “Characterization of very acidic phagosomes in breast cancer cells and their association with invasion,” *J. Cell Sci.*, pp. 2381–91, Sep. 1994.
- [163] P. Roger, P. Montcourrier, T. Maudelonde, J. P. Brouillet, A. Pages, F. Laffargue, and H. Rochefort, “Cathepsin D immunostaining in paraffin-embedded breast cancer cells and macrophages: correlation with cytosolic assay,” *Hum. Pathol.*, vol. 25, no. 9, pp. 863–71, Sep. 1994.
- [164] S. Koop, R. Khokha, E. E. Schmidt, I. C. MacDonald, V. L. Morris, A. F. Chambers, and A. C. Groom, “Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth,” *Cancer Res.*, vol. 54, no. 17, pp. 4791–7, Sep. 1994.
- [165] S. S. Ohri, A. Vashishta, M. Proctor, M. Fusek, and V. Vetvicka, “The propeptide of cathepsin D increases proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells,” no. 23, pp. 491–498, 2008.
- [166] M. Glondu, P. Coopman, V. Laurent-Matha, M. Garcia, H. Rochefort, and E. Liaudet-Coopman, “A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells,” *Oncogene*, vol. 20, no. 47, pp. 6920–9, 2001.
- [167] V. Vetvicka, J. Vetvickova, and M. Fusek, “Effect of procathepsin D and its activation peptide on prostate cancer cells,” *Cancer Lett.*, vol. 129, no. 1, pp. 55–9, Jul. 1998.
- [168] V. Vetvicka, J. Vetvickova, and P. Benes, “Role of enzymatically inactive procathepsin D in lung cancer,” *Anticancer Res.*, vol. 24, no. 5A, pp. 2739–43.
- [169] Z. Khalkhali-Ellis and M. J. Hendrix, “Elucidating the Function of Secreted Maspin: Inhibiting Cathepsin D-Mediated Matrix Degradation,” *Cancer Res.*, vol. 67, pp. 3535–3539, 2007.
- [170] V. Laurent-Matha, P. F. Huesgen, O. Masson, D. Derocq, C. Prébois, M. Gary-Bobo, F. Lecaille, B. Rebiere, G. Meurice, C. Orear, R. E. Hollingsworth, M. Abrahamson, G. Lalmanach, C. M. Overall, and E. Liaudet-Coopman, “Proteolysis of cystatin C by cathepsin D in the breast cancer microenvironment,” *FASEB J.*, vol. 26, no. 12, pp. 5172–5181, 2012.
- [171] P. Briozzo, J. Badet, F. Capony, I. Pieri, P. Montcourrier, D. Barritault, and H. Rochefort, “MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D,” *Exp. Cell Res.*, vol. 194, no. 2, pp. 252–9, Jun. 1991.
- [172] E. Liaudet, D. Derocq, H. Rochefort, and M. Garcia, “Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors,” *Cell Growth Differ.*, vol. 6, no. 9, pp. 1045–52, Sep. 1995.

- [173] P. Nirdé, D. Derocq, M. Maynadier, M. Chambon, I. Basile, M. Gary-Bobo, and M. Garcia, "Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells.," *Oncogene*, vol. 29, no. 1, pp. 117–27, Jan. 2010.
- [174] M. Wolf, I. Clark-Lewis, C. Buri, H. Langen, M. Lis, and L. Mazzucchelli, "Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer.," *Am. J. Pathol.*, vol. 162, no. 4, pp. 1183–90, Apr. 2003.
- [175] E. S. Radisky, "Cathepsin D: Regulation in mammary gland remodeling, misregulation in breast cancer," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 10, no. 5, pp. 467–470, 2010.
- [176] S. S. Ohri, A. Vashishta, J. Vetvickova, M. Fusek, and V. Vetvicka, "Procathepsin D expression correlates with invasive and metastatic phenotype of MDA-MB-231 derived cell lines," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 41, no. 2, pp. 204–209, 2007.
- [177] M. Fusek and V. Vetvicka, "Mitogenic function of human procathepsin D: the role of the propeptide.," *Biochem. J.*, pp. 775–80, Nov. 1994.
- [178] P. Benes, V. Vetvicka, and M. Fusek, "Cathepsin D-Many functions of one aspartic protease," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 68, no. 1, pp. 12–28, 2008.
- [179] L. Hu, J. M. Roth, P. Brooks, J. Luty, and S. Karparkin, "Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 12, pp. 4666–73, Jun. 2008.
- [180] M. Mathieu, H. Rochefort, B. Barenton, C. Prebois, and F. Vignon, "Interactions of cathepsin-D and insulin-like growth factor-II (IGF-II) on the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in human breast cancer cells and possible consequences on mitogenic activity of IGF-II.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 4, no. 9, pp. 1327–35, Sep. 1990.
- [181] J. S. Faridi, S. Mohan, and D. D. De León, "Modulation of cathepsin D routing by IGF-II involves IGF-II binding to IGF-II/M6P receptor in MCF-7 breast cancer cells.," *Growth Factors*, vol. 22, no. 3, pp. 169–77, Sep. 2004.
- [182] B. P. Himelstein, R. Canete-Soler, E. J. Bernhard, and R. J. Muschel, "Induction of fibroblast 92 kDa gelatinase/type IV collagenase expression by direct contact with metastatic tumor cells.," *J. Cell Sci.*, pp. 477–86, Feb. 1994.
- [183] V. Cavailles, M. Garcia, and H. Rochefort, "Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF7 human breast cancer cells.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 3, no. 3, pp. 552–8, Mar. 1989.
- [184] M. K. Schwartz, "Tissue cathepsins as tumor markers.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 237, no. 1–2, pp. 67–78, Jun. 1995.
- [185] N. Kokkonen, A. Rivinoja, A. Kauppila, M. Suokas, I. Kellokumpu, and S. Kellokumpu,

- “Defective acidification of intracellular organelles results in aberrant secretion of cathepsin D in cancer cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 38, pp. 39982–39988, 2004.
- [186] M. Mathieu, F. Vignon, F. Capony, and H. Rochefort, “Estradiol down-regulates the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor gene and induces cathepsin-D in breast cancer cells: a receptor saturation mechanism to increase the secretion of lysosomal proenzymes,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 5, no. 6, pp. 815–22, Jun. 1991.
- [187] J. C. Byrd, G. R. Devi, A. T. de Souza, R. L. Jirtle, and R. G. MacDonald, “Disruption of ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor by cancer-associated missense mutations,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 34, pp. 24408–16, Aug. 1999.
- [188] M. Sameni, E. Elliott, G. Ziegler, P. H. Fortgens, C. Dennison, and B. F. Sloane, “Cathepsin B and D are Localized at the Surface of Human Breast Cancer Cells,” *Pathol. Oncol. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 43–53, 1995.
- [189] F. Capony, C. Rougeot, V. Cavailles, and H. Rochefort, “Estradiol increases the secretion by MCF7 cells of several lysosomal pro-enzymes,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 171, no. 3, pp. 972–8, Sep. 1990.
- [190] M. Fusek and V. Vetvicka, “Dual role of cathepsin D: ligand and protease,” *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*, vol. 149, no. 1, pp. 43–50, 2005.
- [191] S. Conus, R. Perozzo, T. Reinheckel, C. Peters, L. Scapozza, S. Yousefi, and H.-U. Simon, “Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation,” *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 3, pp. 685–98, Mar. 2008.
- [192] C. Dash, A. Kulkarni, B. Dunn, and M. Rao, “Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 38, no. 2, pp. 89–119, 2003.
- [193] G. Riccioni, N. Vitulano, N. D’Orazio, and F. Bellocchi, “Aliskiren, the first approved renin inhibitor: Clinical application and safety in the treatment of hypertension,” *Adv. Ther.*, vol. 26, no. 7, pp. 700–10, Jul. 2009.
- [194] C. Björklund, S. Oscarson, K. Benkestock, N. Borkakoti, K. Jansson, J. Lindberg, L. Vrang, A. Hallberg, A. Rosenquist, and B. Samuelsson, “Design and synthesis of potent and selective BACE-1 inhibitors,” *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 4, pp. 1458–64, Feb. 2010.
- [195] K. E. Estes, S. R. Penzak, K. A. Calis, and T. J. Walsh, “Pharmacology and antifungal properties of anidulafungin, a new echinocandin,” *Pharmacotherapy*, vol. 29, no. 1, pp. 17–30, Jan. 2009.
- [196] A. J. Barrett and P. M. Starkey, “The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism,” *Biochem. J.*, vol. 133, no. 4, pp. 709–24, Aug. 1973.
- [197] M. Gacko, A. Minarowska, A. Karwowska, and Ł. Minarowski, “Cathepsin D inhibitors,” *Folia*

- Histochem. Cytophiol.*, vol. 45, no. 4, pp. 291–313, 2007.
- [198] C. G. Knight and A. J. Barrett, “Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin,” *Biochem. J.*, vol. 155, no. 1, pp. 117–25, Apr. 1976.
- [199] F. M. Tumminello, G. Leto, N. Gebbia, L. Rausa, and R. J. Bernacki, “Evaluation of antitumor and antimetastatic activity of pepstatin A in some experimental tumor models,” *J. Chemother.*, vol. 1, no. 4 Suppl, pp. 1135–8, Jul. 1989.
- [200] S. A. Cater, W. E. Lees, J. Hill, J. Brzin, J. Kay, and L. H. Phylip, “Aspartic proteinase inhibitors from tomato and potato are more potent against yeast proteinase A than cathepsin D,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1596, no. 1, pp. 76–82, Apr. 2002.
- [201] B. Lenarcic and V. Turk, “Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 2, pp. 563–6, Jan. 1999.
- [202] V. Vetvicka, J. Vetvickova, and M. Fusek, “Anti-human procathepsin D activation peptide antibodies inhibit breast cancer development,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 57, no. 3, pp. 261–9, Oct. 1999.
- [203] B. M. Dunn and S. Hung, “The two sides of enzyme-substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1477, no. 1–2, pp. 231–40, Mar. 2000.
- [204] H. D. Soule, T. M. Maloney, S. R. Wolman, E. C. Line, W. D. Peterson, R. Brenz, C. M. Mcgrath, J. Russo, R. J. Pauley, R. F. Jones, and S. C. Brooks, “Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast,” *Cancer*, pp. 6075–6086, 1990.
- [205] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, and M. Brennan, “A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 51, no. 5, pp. 1409–16, Nov. 1973.
- [206] S. Chekhun, N. Bezdenezhnykh, J. Shvets, and N. Lukianova, “Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines,” vol. 2013, pp. 174–179, 2013.
- [207] Y. Berthois, J. A. Katzenellenbogen, and B. S. Katzenellenbogen, “Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture,” *Cell Biol.*, vol. 83, pp. 2496–2500, 1986.
- [208] S. Top, A. Vessières, P. Pigeon, M.-N. Rager, M. Huché, E. Salomon, C. Cabestaing, J. Vaissermann, and G. Jaouen, “Selective Estrogen-Receptor Modulators (SERMs) in the Cyclopentadienylrhenium Tricarbonyl Series: Synthesis and Biological Behaviour,” *ChemBioChem*, vol. 5, no. 8, pp. 1104–1113, Aug. 2004.
- [209] C. K. Osborne, H. Zhao, and S. A. Fuqua, “Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 17, pp. 3172–86, Sep. 2000.

- [210] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–5, Aug. 1970.
- [211] W. N. Burnette, "Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A," *Anal. Biochem.*, vol. 112, no. 2, pp. 195–203, Apr. 1981.
- [212] J. Massague and M. P. Czech, "The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, pp. 5038–5045, 1982.
- [213] S. Kellokumpu, R. Sormunen, and I. Kellokumpu, "Abnormal glycosylation and altered Golgi structure in colorectal cancer: Dependence on intra-Golgi pH," *FEBS Lett.*, vol. 516, no. 1–3, pp. 217–224, 2002.
- [214] W. Kiess, L. A. Greenstein, R. M. White, L. Lee, M. M. Rechler, and S. P. Nissley, "Type II insulin-like growth factor receptor is present in rat serum.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 21, pp. 7720–4, Nov. 1987.
- [215] C. D. Scott and J. Weiss, "Soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor inhibits DNA synthesis in insulin-like growth factor II sensitive cells.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 182, no. 1, pp. 62–8, Jan. 2000.
- [216] L. Duplomb, B. Chaigne-Delalande, P. Vusio, S. Raher, Y. Jacques, A. Godard, and F. Blanchard, "Soluble mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II (IGF-II) receptor inhibits interleukin-6-type cytokine-dependent proliferation by neutralization of IGF-II.," *Endocrinology*, vol. 144, no. 12, pp. 5381–9, Dec. 2003.
- [217] V. Leksa, R. Loewe, B. Binder, H. B. Schiller, P. Eckerstorfer, F. Forster, A. Soler-Cardona, G. Ondrovicova, E. Kutejova, E. Steinhuber, J. Breuss, J. Drach, P. Petzelbauer, B. R. Binder, and H. Stockinger, "Soluble M6P/IGF2R Released by TACE Controls Angiogenesis via Blocking Plasminogen Activation," *Circ. Res.*, vol. 108, no. 6, pp. 676–685, Mar. 2011.
- [218] J. Harper, "Soluble IGF2 Receptor Rescues ApcMin/+ Intestinal Adenoma Progression Induced by Igf2 Loss of Imprinting," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 4, pp. 1940–1948, Feb. 2006.
- [219] G. Jofré, L. Carvelli, C. Aguilera, T. Sartor, A. Gonzalez-Jatuff, and M. A. Sosa, "The distribution of mannose-6-phosphate receptors changes from newborns to adults in rat liver," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, no. May, pp. 4–7, 2011.
- [220] N. Altan, Y. Chen, M. Schindler, and S. M. Simon, "Tamoxifen inhibits acidification in cells independent of the estrogen receptor.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 8, pp. 4432–4437, 1999.
- [221] Y. Chen, M. Schindler, and S. M. Simon, "A Mechanism for Tamoxifen-mediated Inhibition of

- Acidification *," vol. 274, no. 26, pp. 18364–18373, 1999.
- [222] F. Capony, T. Braulke, C. Rougeot, S. Roux, P. Montcourrier, and H. Rochefort, "Specific mannose-6-phosphate receptor-independent sorting of pro-cathepsin D in breast cancer cells," *Exp Cell Res*, vol. 215, no. 1, pp. 154–163, 1994.
- [223] A. Gonzalez-noriega, J. H. Grubb, V. Talkad, and W. S. Sly, "Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling," vol. 85, no. June, 1980.
- [224] J. Wenk, A. Hille, and K. von Figura, "Quantitation of Mr 46000 and Mr 300000 mannose 6-phosphate receptors in human cells and tissues.," *Biochem. Int.*, vol. 23, no. 4, pp. 723–31, Mar. 1991.
- [225] U. Matzner, K. von Figura, and R. Pohlmann, "Expression of the two mannose 6-phosphate receptors is spatially and temporally different during mouse embryogenesis.," *Development*, vol. 114, no. 4, pp. 965–72, Apr. 1992.
- [226] P. S. Romano, L. Carvelli, A. C. López, G. Jofré, T. Sartor, and M. A. Sosa, "Developmental differences between cation-independent and cation-dependent mannose-6-phosphate receptors in rat brain at perinatal stages," *Dev. Brain Res.*, vol. 158, no. 1–2, pp. 23–30, Aug. 2005.
- [227] P. S. Romano, G. Jofré, L. Carvelli, A. C. López, T. Sartor, and M. A. Sosa, "Changes in phosphomannosyl ligands correlate with cation-dependent mannose-6-phosphate receptors in rat liver during perinatal development," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 344, no. 2, pp. 605–611, Jun. 2006.
- [228] G. F. Jofré, V. Balmaceda, T. Sartor, L. Carvelli, P. Barrera, and M. A. Sosa, "Organ-Specific Changes in the Expression of Mannose-6-Phosphate Receptors during Postnatal Development in Rats," *Cells Tissues Organs*, vol. 190, no. 1, pp. 27–33, 2009.
- [229] S. Kanamori, S. Waguri, M. Shibata, K. Isahara, Y. Ohsawa, A. Konishi, S. Kametaka, T. Watanabe, S. Ebisu, E. Kominami, and Y. Uchiyama, "Overexpression of cation-dependent mannose 6-phosphate receptor prevents cell death induced by serum deprivation in PC12 cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 251, no. 1, pp. 204–208, 1998.
- [230] F. Ghaemimanesh, G. Ahmadian, S. Talebi, A.-H. Zarnani, M. Behmanesh, S. Hemmati, R. Hadavi, M. Jeddi-Tehrani, M. Farzi, M. M. Akhondi, and H. Rabbani, "The effect of sortilin silencing on ovarian carcinoma cells.," *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, vol. 6, no. 3, pp. 169–77, Jul. 2014.
- [231] S. Keller, M. P. Sanderson, A. Stoeck, and P. Altevogt, "Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function," *Immunol. Lett.*, vol. 107, no. 2, pp. 102–108, Nov. 2006.
- [232] A. Villagrasa, P. J. Álvarez, A. Osuna, J. M. Garrido, A. Aránega, and F. Rodríguez-Serrano,

- “Exosomes Derived from Breast Cancer Cells, Small Trojan Horses?,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 19, no. 3–4, pp. 303–13, 2014.
- [233] M. Simons and G. Raposo, “Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 21, no. 4, pp. 575–581, Aug. 2009.
- [234] C. Confort, H. Rochefort, and F. Vignon, “Insulin-like growth factors (IGFs) stimulate the release of alpha 1-antichymotrypsin and soluble IGF-II/mannose 6-phosphate receptor from MCF7 breast cancer cells.,” *Endocrinology*, vol. 136, no. 9, pp. 3759–3766, Sep. 1995.
- [235] L. Carvelli, N. Bannoud, A. C. Aguilera, T. Sartor, E. Malossi, and M. A. Sosa, “Testosterone influences the expression and distribution of the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor in rat epididymis. Implications in the distribution of enzymes,” *Andrologia*, vol. 46, no. 3, pp. 224–230, Apr. 2014.
- [236] J. M. Wessels, N. A. Leyland, S. K. Agarwal, and W. G. Foster, “Estrogen induced changes in uterine brain-derived neurotrophic factor and its receptors,” *Hum. Reprod.*, vol. 30, no. 4, pp. 925–936, Apr. 2015.
- [237] B. Distel, U. Bauer, R. Le Borgne, and B. Hoflack, “Basolateral sorting of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor in Madin-Darby canine kidney cells. Identification of a basolateral determinant unrelated to clathrin-coated pit localization signals.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 1, pp. 186–93, Jan. 1998.
- [238] D. A. Wick, B. Seetharam, and N. M. Dahms, “Basolateral sorting signal of the 300-kDa mannose 6-phosphate receptor,” *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 282, no. 1, pp. G51–G60, Jan. 2002.
- [239] Z. Khalkhali-Ellis, D. E. Abbott, C. M. Bailey, W. Goossens, N. V. Margaryan, S. L. Gluck, M. Reuveni, and M. J. C. Hendrix, “IFN- γ regulation of vacuolar pH, cathepsin D processing and autophagy in mammary epithelial cells,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 105, no. 1, pp. 208–218, Sep. 2008.