UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS EN EL ÁREA FARMACÉUTICA

"ACCIÓN DE LA PROTEÍNA SFRP1, MEDIADA POR EL GEN DE FUSIÓN *TMPRSS2-ERG* EN CÁNCER DE PRÓSTATA"

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q.F.B. CARLOS DAVID CRUZ HERNÁNDEZ
MATRÍCULA: 2141800555

COMITÉ TUTORIAL

Co-Tutor: Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes
Co-Tutora: Dra. Marisol López López
Asesora: Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de investigación:

Estrategias Biológicas en el Área Farmacéutica

"Acción de la proteína SFRP1, mediada por el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en cáncer de próstata"

Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de Maestro en Ciencias Farmacéuticas

Presenta

Q.F.B. Carlos David Cruz Hernández (MATRÍCULA: 2141800555)

Comité Tutoral

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes
Co-Tutor

Dra. Marisol López López
Co-Tutora

Dra. Nancy Monroy Jaramillo
Asesora

Febrero de 2016.

“Acción de la proteína SFRP1, mediada por el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en cáncer de próstata”

Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de Maestro en Ciencias Farmacéuticas

Presenta

Q.F.B. Carlos David Cruz Hernández (MATRÍCULA: 2141800555)

Vo. Bo. De los sinodales

PRESIDENTE

_____

Dra. Elizabeth Langley McCarron

SECRETARIO

_____

Dra. Marisol López López

VOCAL

_____

Dra. Patricia García López

RESUMEN

En México, el cáncer de próstata (CaP) ha pasado a ser la primera causa de muerte por neoplasias malignas en hombres. En el desarrollo de la enfermedad, los andrógenos tienen un papel preponderante ya que regulan la expresión de genes como la fusión *TMPRSS2-ERG,* la cual está presente en 50% de los tumores. Dicha fusión contribuye a que las células tumorales aumenten sus características neoplásicas.

Recientemente, se reportó que la actividad transcripcional del receptor de andrógenos puede ser regulada por la proteína SFRP1. Debido a que el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* responde a la actividad transcripcional dicho receptor, en el presente trabajo se propone que el tratamiento con SFRP1 tendrá un efecto negativo sobre la expresión de la fusión *TMPRSS2-ERG*. Esto no solo contribuye al conocimiento de las vías de señalización asociadas a andrógenos en CaP, sino que también abre la posibilidad de establecer a futuro, un tratamiento farmacólogico para los pacientes con tumores de estas características.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT)

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica
(INMEGEN)

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

“A mis padres: Neopolo Cruz y María Elena Hernández, por apoyarme en todo momento durante este sueño llamado VIDA”

“Al Dr. Mauricio por permitirme formar parte de su grupo de investigación y confiar en este proyecto”

“A la música, que siempre me acompaña en días de frío y sol”

“A mí, que no me rendí y que sigo con el ánimo de conocer más sobre la vida”

“A las VCaP”

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIACIONES **9**

INTRODUCCIÓN **10**

ANTECEDENTES O MARCO DE REFERENCIA **11**

MARCO TEÓRICO **13**

1. La próstata **13**
- **1.1 Fisiología de la próstata** **13**
- **1.2 Enfermedades de la próstata** **14**
  - 1.2.1 Hiperplasia prostática benigna 15

2. Cáncer **16**
- **2.1 Etiología del cáncer** **16**
- **2.2 Tipos de cáncer** **18**

3. Cáncer de Próstata (CaP) **19**
- **3.1 Estadísticas** **19**
- **3.2 Curso natural de la enfermedad** **21**
- **3.3 Diagnóstico del CaP** **22**
  - 3.3.1 PSA y otros bio-marcadores 23
- **1.1 Estrategias terapéuticas** **25**
  - 1.1.1 Cirugía 27
  - 1.1.2 Terapia hormonal 28
  - 1.1.3 Quimioterapia 28

4. Vías de señalización asociadas a CaP **30**
- **4.1 Vía de señalización WNT** **32**
  - 4.1.1 Vía WNT canónica (β-catenina) y no canónica (Cinasas y WNT/Ca++) 33
  - 4.1.2 Antagonistas de la vía WNT 36
  - 4.1.3 SFRP1 en CaP 39

5. Alteraciones genómicas en CaP **39**
- **5.1 Re-arreglos cromosomales** **39**
  - 5.1.1 Fusión TMPRSS2-ERG en CaP 40

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **43**

HIPÓTESIS **44**

OBJETIVOS **44**

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN **45**

MATERIALES Y MÉTODOS **45**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **51**
- ***SFRP1* (mRNA) está sub-expresado en células de CaP positivas a la fusión TMPRSS2-ERG** **51**
- **SFRP1 disminuye la expresión de *TMPRSS2-ERG* en presencia de la hormona DHT** **52**

El efecto indirecto de SFRP1 + DHT sobre el AR está dado a nivel nuclear 57
El efecto del tratamiento SFRP1 + DHT sobre ERG, disminuye la expresión de genes de la vía WNT.....58
El tratamiento combinado SFRP1 + DHT disminuye las características neoplásicas de las células de CaP.....59
SFRP1 tiene un efecto positivo sobre la viabilidad celular en células de CaP 59
SRFP1 disminuye la viabilidad celular en presencia de la hormona DHT..... 61
El tratamiento SFRP1 + DHT induce apoptosis en VCaP..... 64
CONCLUSIONES.....67
REFERENCIAS.....69
ANEXOS 74

GLOSARIO DE ABREVIACIONES

AR: Receptor de andrógenos (*Androgen Receptor*, por sus siglas en inglés)

CaP: Cáncer de Próstata

DHT: Dihidrotestosterona

EMT: Transición mesénquima-epitelio (*Epithelial Mesenchymal Transition*, por sus siglas en inglés)

ETS: Failia de factores de transcripción (*E26 transformation-specific*, por sus siglas en inglés)

FZD: Receptor transmembranal Frizzled

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

KLK3: Peptidasa de la familia de las Kalikreinas tipo 3

LEF1: Factor de transcripción de la vía WNT (*Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1*, por sus siglas en inglés)

MTT: Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio

PSA: Antígeno prostático específico (*Prostate Specific Antigen*, por sus siglas en inglés)

SFRP1: Antagonista de la vía WNT (*Secreted Frizzled Related Protein*, por sus siglas en inglés)

TMPRSS2-ERG: Fusión de genes (*Transmembranal Protein Serin 2-ETS Related Gene*, por sus siglas en inglés)

WNT: Vía de señalización “Wingless Type”

INTRODUCCIÓN

En México, el cáncer de próstata (CaP) ha pasado a ser la primera causa de muerte por neoplasias malignas en hombres. Este tipo de cáncer se presenta habitualmente en pacientes con edades que van de los 65 a los 80 años, por lo que anteriormente se le conocía como una enfermedad de la vejez. Actualmente se diagnostican más casos de CaP en pacientes con un rango de edad menor a los 60 años, lo que ha vuelto a la enfemedad un problema de salud importante.

En el desarrollo del CaP, los andrógenos tienen un papel preponderante ya que regulan la expresión de genes como la fusión *TMPRSS2-ERG,* la cual está sobre-expresada en 50% de los tumores de CaP. Dicha fusión de genes contribuye a que el CaP progrese hacia un estado más avanzado, donde las células tumorales presentan proliferación desmedida, inhibición de la apoptosis, y aumento en la migración e invasión celular.

Recientemente, se reportó que la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés) puede ser regulada por la proteína SFRP1 (un antagonista de la vía WNT), disminuyendo así las características neoplásicas de las células de CaP. Debido a que el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* responde a la actividad transcripcional del AR, en el presente trabajo se propone que el tratamiento con SFRP1 tendrá un efecto negativo sobre la expresión de dicha fusión de genes. Al demostrar que la proteína SFRP1 puede regular la expresión de una fusión de genes que es considerada oncogénica en CaP, se abre la posibilidad de establecer un tratamiento farmacólogico eficaz para los pacientes con tumores de estas características.

ANTECEDENTES O MARCO DE REFERENCIA

El CaP representa un problema de salud en el mundo y en nuestro país, en los últimos años ha pasado a ser la primera causa de muerte relacionada con neoplasias malignas en hombres mexicanos (IMSS, 2015). Se ha descrito que existen diferentes factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad como la dieta, el grupo étnico, la herencia y la edad. El factor más importante es la edad, el CaP se presenta habitualmente en pacientes de entre 65 y 80 años, sin embargo cada vez se diagnostican más casos con una edad menor a los 60 años (SEER, 2015).

Dado que el CaP es una enfermedad indolente, es difícil para el paciente darse cuenta que lo padece, y en muchos casos se puede confundir con una hiperplasia prostática benigna (HPB). La HPB es un agrandamiento de la próstata relacionado a la edad y a factores hormonales, sin embargo no significa que se tenga o que se vaya a desarrollar cáncer (Mc Vary *et al.,* 2003).

Los factores hormonales como los andrógenos, tienen un papel preponderante en el desarrollo del CaP, ya que modulan la actividad del AR y la expresión de una proteína denominada antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés). A la fecha, la cuantificación de las concentraciones de PSA en sangre sigue siendo la prueba de oro para monitorear la próstata, en conjunto con otros exámenes clínicos. Sin embargo, cabe mencionar que el PSA es un bio-marcador que carece de especificidad (NICE, 2014).

El CaP comprende una serie de eventos moleculares complejos que se encuentran íntimamente relacionados entre sí. Los más frecuentes involucran la activación de oncogenes, inhibición de la apoptosis, y el silenciamiento de genes supresores de tumor. Se han establecido diferentes hipótesis para tratar de entender el desarrollo del CaP; sin embargo, no se conoce con exactitud cuales son los mecanismos moleculares que conllevan a la progresión de la enfermedad. Aunado a esto, no existen herramientas clínicas que permitan un diagnóstico temprano y se carece de

un marcador biológico específico y sensible, que ofrezca un mejor pronóstico para el paciente (Holmberg y Hemelrijck, 2014).

Los tratamientos farmacológicos utilizados a la fecha no han demostrado ser efectivos, las células cancerosas encuentran la manera de mantener encendidas vías de señalización importantes como la vía de los andrógenos. En el CaP, la actividad transcripcional del AR promueve la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG,* y el producto de dicha fusión regula positivamente a la vía de señalización WNT (Yu et *al.,* 2013). Se ha descrito que la participación de la vía WNT es importante en CaP, la activación aberrante de esta vía promueve la expresión de genes que contribuyen al progreso de la enfermdad. Interesantemente, un estudio demostró que la proteína SFRP1 es un regulador negativo de la actividad transcripcional del AR. La sobre-expresión de dicha proteína, tuvo efectos negativos sobre la proliferación celular; sin emabrgo, no se concluyó cual es el mecanismo de acción de SFRP1 en CaP (Kawano *et al.,* 2009).

Tomando en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se propone que el tratamiento con la proteína SFRP1 tendrá un efecto negativo sobre la expresión de la fusión TMPRSS2-ERG en células de CaP. El estudio de la asociación SFRP1-*TMRPSS2-ERG*, permitirá entender una parte de la compleja red de señalización WNT en CaP, ayudando a desarrollar nuevas terapias farmacológicas para el tratamiento de esta enfermedad.

MARCO TEÓRICO

1. La próstata

La próstata es una glándula exocrina del sistema reproductor masculino que se encuentra debajo de la vejiga y delante del recto (Figura 1) (Martini *et al.,* 2012). Se divide en tres zonas principales: zona de transición, zona central y zona periférica (Figura 2) (Shier *et al.,* 2008).

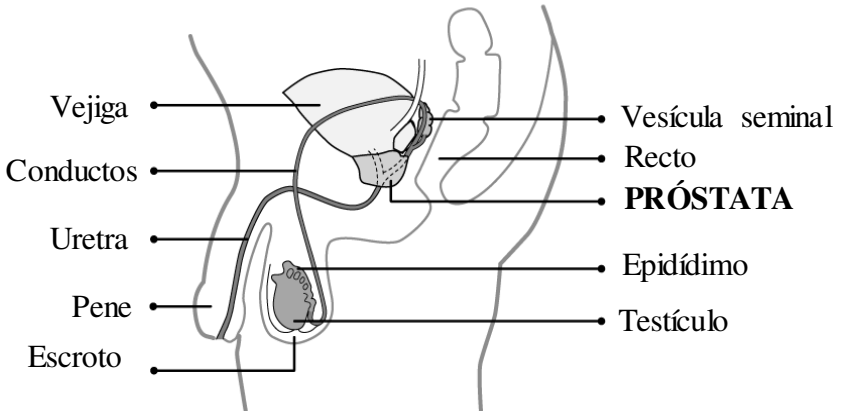


Figura 1. Sistema reproductor masculino. Imagen modificada de Martini *et al.,* 2012. Se muestran los diferentes órganos del sistema reproductor masculino, incluyendo la próstata y su ubicación.

La próstata comienza a desarrollarse en la tercera semana de gestación a partir del seno urogenital, durante la embriogénesis la próstata requiere del metabolito activo de la testosterona embrionaria, la dihidrotestosterona (DHT). La glándula prostática continua creciendo hasta alcanzar un peso aproximado de 20g en un adulto con una edad 25 a 30 años (Hammerich *et al.,* 2009).

1.1 Fisiología de la próstata

En la próstata co-existen diferentes tipos celulares, los cuales se dividen principalmente en dos grupos: epiteliales y estromales. Dentro de las células epiteliales existen tres divisiones: células epiteliales secretoras, células basales, y células tipo "*stem cells*". La organización celular prostática está regulada por una matriz conectiva que organiza células y residuos celulares, esta matriz juega un

papel importante en la comunicación celular y en el desarrollo de la glándula masculina (Frick y Aulitzky, 1991).

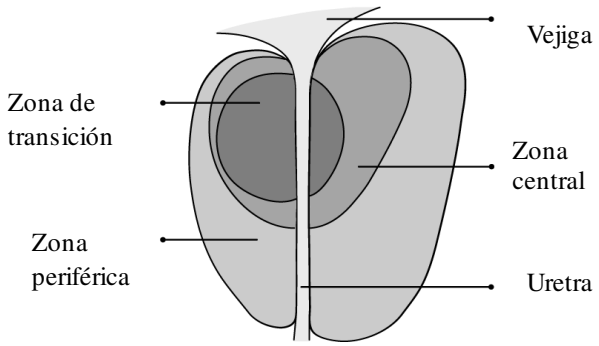


Figura 2. Zonas de la próstata. Imagen modificada de Hammerich *et al.,* 2009. Se muestran las zonas en las que suele dividirse la próstata. Es en la zona periférica donde con mayor frecuencia se desarrollan los tumores de CaP.

La próstata secreta diversas sustancias y compuestos como zinc, ácido cítrico, prostaglandinas, colesterol, fosfatasa ácida y la proteína conocida como " antígeno prostático específico" (PSA, por sus siglan en inglés); este último juega un papel importante en el mantenimiento de las funciones normales de la próstata. Además, el PSA es el biomarcador más utilizado en la clínica para el diagnóstico de afecciones prostáticas como el CaP (Loeb y Catalona, 2007).

1.2 Enfermedades de la próstata

La próstata puede padecer diferentes afecciones que van desde una simple inflamación hasta la aparición de cáncer. La hiperplasia prostática benigna (HPB) es un padecimiento común en hombres de edad avanzada, y se caracteriza por un crecimiento e inflamación de la glándula. La mayoría de los pacientes acuden a revisión después de presentar síntomas relacionados al tracto urinario inferior (*Lower Urinary Tract Symtoms*, LUTS), aunque estos síntomas no siempre representan problemas de HPB o CaP (Claus *et al.,* 2005). Algunos de los síntomas observados en el LUTS son un retraso en el inicio de la micción, mal flujo urinario, sensación de vaciamiento incompleto de la vejiga, goteo post-micción y micción prolongada (Thorpe *et al.,* 2003).

1.2.1 Hiperplasia prostática benigna

El examen de primera elección para diagnosticar HPB, consiste en la palpación de la zona genital para encontrar anormalidades físicas como organomegalia, asimetría, sensibilidad al tacto o presencia de alguna masa de tejido extraña. Exámenes de laboratorio adicionales son recomendados para el diagnóstico de este padecimiento; entre ellos se incluyen análisis de sangre y orina, evaluación uro-dinámica, y estudios de imagen como ultrasonido y rayos X (Stamey *et al.,* 1987).

El tratamiento de los malestares provocados por HPB consiste principalmente en disminuir el dolor, la inflamación y corregir problemas relacionados con la micción. La retención urinaria puede tratarse con la introducción de un catéter uretral; sin embargo es un procedimiento invasivo y molesto para el paciente. Los síntomas provocados por la HPB disminuyen la calidad de vida, por lo que se vuelve factible recurrir a un procedimiento quirúrgico donde se retira la próstata (Mc Vary *et al.,* 2003). La figura 3 presenta las diferencias entre una próstata normal y una con HPB.

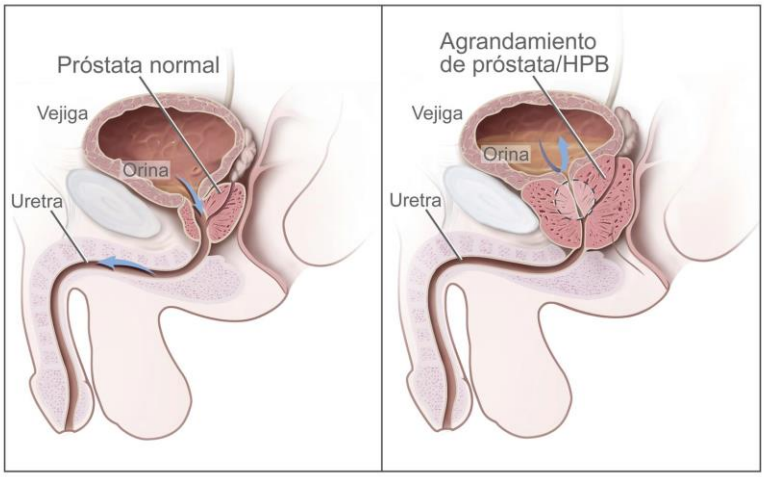


Figura 3. Próstata normal y próstata con HPB. Imagen tomada de la página de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH). La imagen de la izquierda muestra una próstata normal, mientras que la imagen de la derecha muestra una próstata con HPB que obstruye el conducto uretral.

Además de la HPB, otro padecimiento que afecta el órgano prostático es el cáncer. Más adelante se describirán las características del CaP, en primer lugar se abordará de manera breve la etiología y los tipos de cáncer más frecuentes.

2. Cáncer

Las investigaciones realizadas hasta ahora, aunque divergentes entre sí; definen al cáncer como una falla en el control del crecimiento y la muerte celular. En el cáncer se ven afectados mecanismos celulares importantes como la muerte celular, la alteración del ciclo celular y la reparación del DNA. Además, estudios recientes demuestran que la edad es un factor importante en la aparición y la progresión de la enfermedad (Frank *et al.,* 2007).

2.1 Etiología del cáncer

El cáncer puede originarse por diversas causas que involucran la edad y la genómica de las personas. Desde el enfoque genómico, se han propuesto diversos procesos que involucran mutaciones somáticas, inestabilidad cromosomal y cambios epigenéticos. El cáncer es una enfermedad multifactorial, debido a esto se han incluido otras clasificaciones que intentan describir con más detalle la etiología de la enfermedad. La Figura 4 presenta las principales características del cáncer propuestas por Hanahan y Weinberg, 2011.

Una de las características más estudiada es el aumento de la proliferación celular, las células cancerígenas aumentan considerablemente su capacidad proliferativa de distintas maneras: produciendo factores de crecimiento secretados por ellas mismas y promoviendo la resistencia a la muerte celular (Cheng *et al.,* 2008). Particularmente la resistencia a la muerte celular, es un mecanismo en el que participan diversos procesos celulares que se encuentran desregulados, la apoptosis es uno de ellos. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que puede iniciar con la estimulación de receptores tipo Fas en la membrana, y la activación de proteasas intracelulares conocidas como caspasas. La homeostasis entre las señales de reguladores y los efectores de dicho proceso, es controlada por proteínas de la familia Bcl-2. En el cáncer, estas proteínas se encuentran desreguladas, lo que interrumpe el proceso apoptótico y promueve la proliferación celular desmedida (Adams y Cory, 2007).

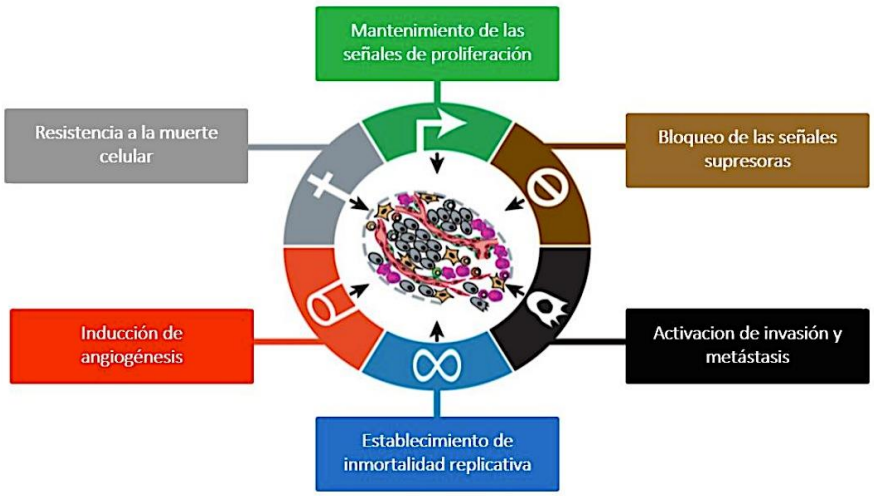


Figura 4. Características del cáncer. Imagen modificada de Hanahan y Weinberg, 2011. Se muestran las 6 características principales involucradas en el desarrollo y la progresión del cáncer.

Otra característica importante en el estudio del cáncer es la angiogenésis, los tumores cancerígenos requieren una vía que les permita el acceso a nutrientes, oxígeno, y al mismo tiempo que les permita evacuar desechos metabólicos de manera eficiente. Para ello, las células cancerígenas promueven la generación de nuevos vasos sanguíneos que conecten con el tumor. Diversos factores han sido relacionados con el proceso de angiogenésis, los cuales estimulan receptores de las células endoteliales del sistema vascular. Uno de los factores angiogénicos más estudiados, es el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, por sus siglas en inglés). La expresión de VEGF-A puede ser regulada por procesos de hipoxia en la señalización oncogénica celular (Ferrara N, 2010).

Por último, dos características íntimamente relacionadas con la progresión del cáncer son la invasión y la metástasis. La invasión y la metástasis son fenómenos ampliamente estudiados en diferentes tipos de cáncer, estos fenómenos involucran proteínas estructurales intracelulares y proteínas de la matriz extracelular. Dentro de dichas proteínas se encuentra la familia de las E-caderinas, las cuales han sido reportadas en procesos invasivos y metastásicos (Berx y van Roy, 2009). El proceso

mediante el cual las células epiteliales adquieren capacidades migratorias e invasivas es conocido como transición mesénquima-epitelio (EMT, por *eptithelial mesenchymal transition*). En dicho proceso los factores de transcripción Snail, Slug, Twist y Zeb 1/2 tienen una participación importante (Micalizzi *et al.,* 2010).

Las características antes mencionadas se han descrito ampliamente en distintos tipos de cáncer. En cada uno de ellos se encuentran desregulados diferentes genes específicos de cada vía de señalización. Actualmente se conocen otros procesos partcipando en el cáncer, como la desregulación energética celular, la evasión al sistema inmunológico, la inestabilidad y la presencia de mutaciones en el genoma, y el aumento en la inflamación tumorígena. Cada tipo de cáncer presenta diferentes comportamientos moleculares, muchas veces estas moléculas tienen mecanismos de acción contradictorios dependiendo del tipo de neoplasia. Es por esta razón que resulta importante el estudio de dichas moléculas en diferentes escenarios de cáncer (Hanahan y Weienberg, 2011).

2.2 Tipos de cáncer

Los tipos de cáncer con mayor incidencia en el mundo, según los reportes del GLOBOCAN en el 2015 se resumen en la Tabla 1 (Ferlay *et al.,* 2015).

Tabla 1. Tipos de cáncer con mayor incidencia en el mundo.

Tipo de cáncer	% (Incidencia)
1. Cáncer de pulmón	12,9
2. Cáncer de mama	11,9
3. Cáncer colorrectal	9,7
4. Cáncer de próstata	7,9
5. Cáncer de estómago	6,8
6. Cáncer de hígado	5,6
7. Cáncer cérvico-uterino	3,7

Los porcentajes en la incidencia de cada tipo de cáncer pueden variar entre países, esto es porque influyen otros factores de riesgo como la raza y las condiciones socio-económicas de cada población.

3. Cáncer de Próstata (CaP)

El CaP ocupa el cuarto lugar de incidencia en el mundo con un 7.9%, solo por debajo del cáncer de pulmón, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal. En México, el CaP ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad a nivel general, por lo que ha pasado a ser un problema de salud importante en nuestro país (IMSS, 2015).

3.1 Estadísticas

Datos publicados recientemente por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), indican una incidencia del 16%, y 13 defunciones por cada 100,000 habitantes hombres en México (IMSS, 2015). Las estadísticas reportadas en la población mexicana son similares a las reportadas en la población estadounidense, dicha población presenta un 13,3% de incidencia y 21,4 defunciones por cada 100,000 habitantes hombres en el año 2012. Los Institutos Nacionales de Salud en ese país han recopilado información importante y actualizada sobre nuevos casos de CaP. Estos datos presentan tasas de sobrevida, incidencias por edad y raza, así como porcentajes sobre diferentes estados clínicos de los tumores de CaP (Figuras 5-9) (Departamento de vigilancia, epidemiología y resultados finales, SEER por sus siglas en inglés, 2015).

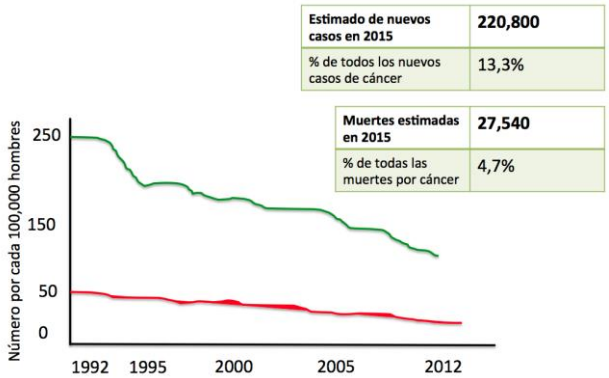


Figura 5. Nuevos casos de CaP. Imagen modificada de la página del SEER, 2015. Se muestra el estimado de nuevos casos y muertes por CaP por cada 100,000 habitantes hombres.

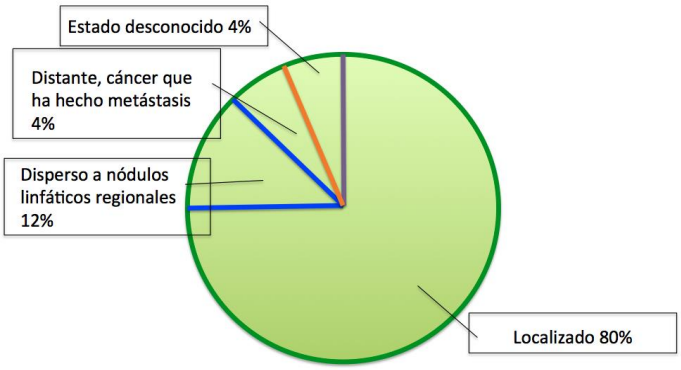


Figura 6. Supervivencia respecto a la localización del tumor. Imagen modificada de la página del SEER, 2015. En el gráfico se muestra el porcentaje de supervivencia respecto a la localización del tumor de CaP.

Figura 7. Incidencia del CaP en relación a otros tipos de cáncer. Imagen modificada de la página del SEER, 2015. Se muestra una tabla ordenada de mayor a menor con el número de nuevos casos y muertes estimadas de diferentes tipos de cáncer.

Tipos de cáncer	Estimado de nuevos casos (2015)	Estimado de muertes (2015)
1. Mama	231,840	40,290
2. Pulmón y bronquios	221,200	158,040
3. Próstata	220,800	27,540
4. Colorrectal	132,700	49,700
5. Vejiga	74,000	16,000
6. Piel	73,870	9,940
7. Leucemia	71,850	19,790
8. Tiroides	62,450	1,950
9. Riñón	61,560	14,080
10. Endometrial	54,870	10,170

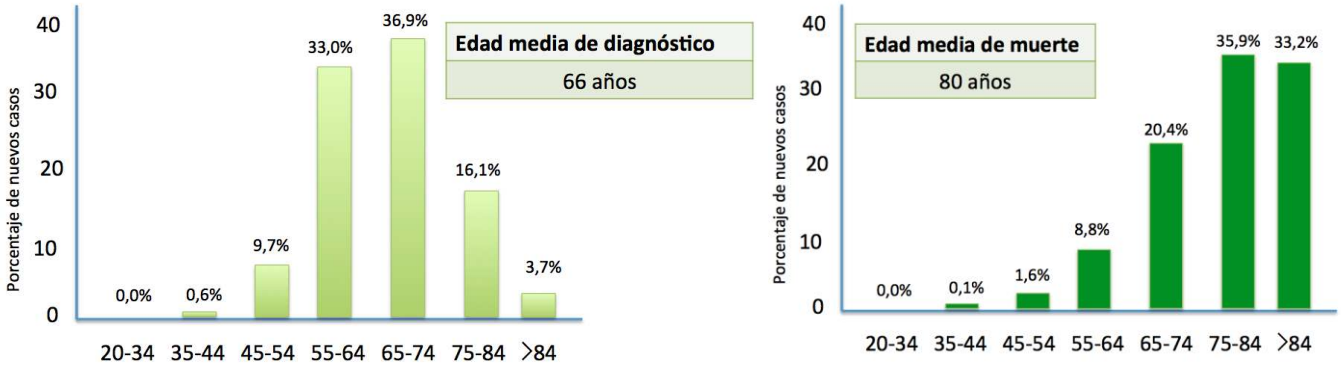


Figura 8. Porcentajes de nuevos casos y muertes de CaP por grupos de edad. Imagen modificada de la página del SEER, 2015. En el gráfico de la izquierda se muestra el porcentaje de nuevos casos de CaP respecto a la edad. En el gráfico de la derecha se muestra el porcentaje de muertes relacionadas a CaP respecto a la edad.

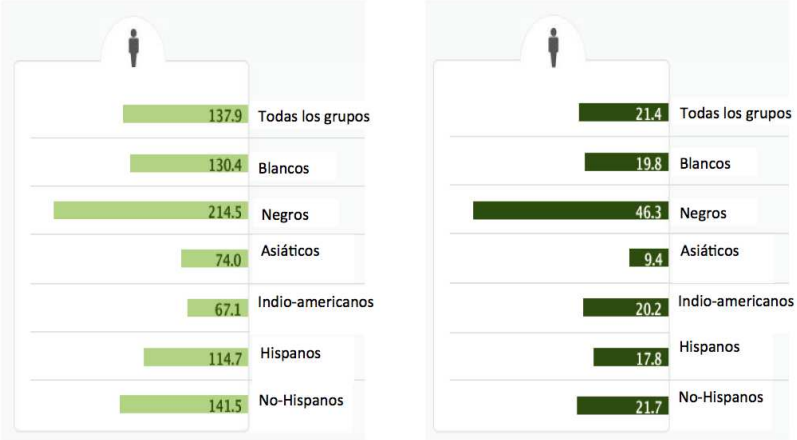


Figura 9. Nuevos casos y muertes de CaP por grupo étnico. Imagen modificada de la página del SEER, 2015. A la izquierda se muestra el número de casos de CaP respecto al grupo étnico. A la derecha se muestra el número de muertes por CaP respecto al grupo étnico.

3.2 Curso natural de la enfermedad

Par el diagnóstico del CaP, los parámetros convencionales que se miden son los niveles de PSA, el tamaño del tumor, la escala Gleason y la presencia de metástasis regional o distante. La relación entre dichos parámetros y el pronóstico de vida para el paciente pueden modificarse dependiendo del tratamiento que se indique (Holmberg y Hemelrijck, 2014). La cuantificación de los niveles de PSA es la prueba más utilizada para definir el estado de la enfermedad, sin embargo carece de especificidad (Figura 10).

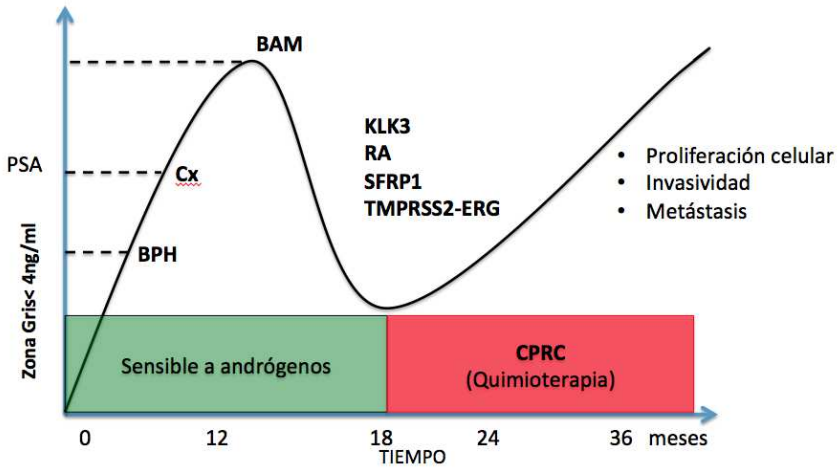


Figura 10. Historia natural de la enfermedad representada con los niveles de PSA. En el gráfico se muestra la progresión del CaP en meses, respecto a las concentraciones de PSA en sangre. BAM= Bloqueo androgénico máximo, Cx= cirugía, CPRC= CaP resistente a la castración.

3.3 Diagnóstico del CaP

Cuando el paciente acude al médico porque presenta las molestias mencionadas anteriormente en HPB, se consideran los siguientes exámenes: niveles de PSA en sangre y el tacto digital rectal (incluyendo un estimado del tamaño de la próstata), imagenología y, factores de riesgo como edad avanzada y origen familiar (Figura 11).

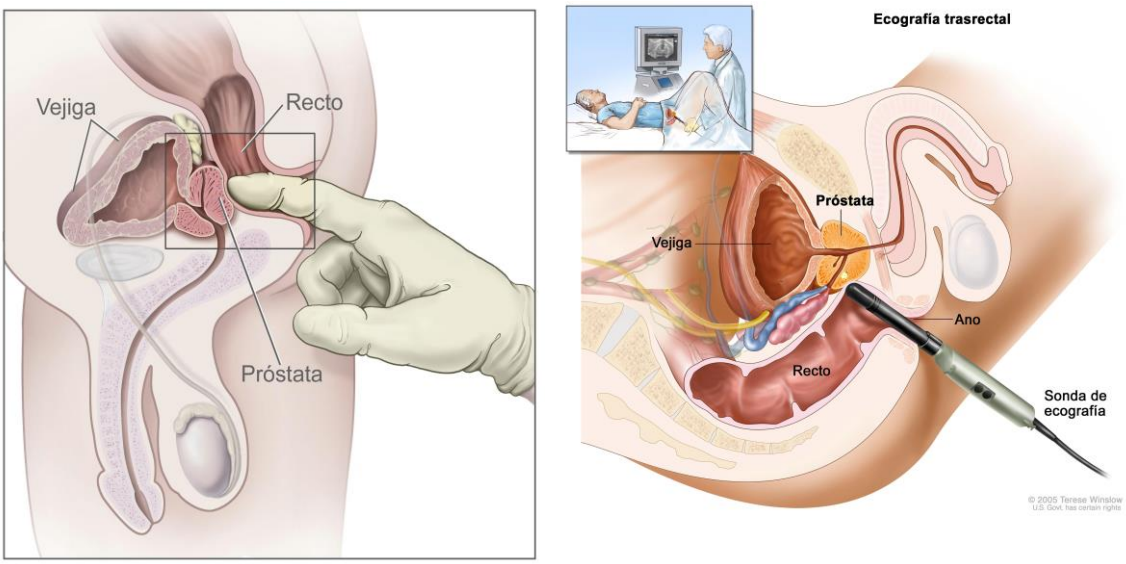


Figura 11. Examen digital rectal y ultrasonido transrectal. Imagen tomada de Winslow, 2005. A la izquierda se muestra una ilustración de un examen digital rectal de la glándula prostática. A la derecha, una ilustración de un ultrasonido trans-rectal.

Cuando los niveles de PSA en sangre son muy altos (> 4ng/ml) y se encuentran anormalidades en la próstata mediante el tacto digital rectal, se procede a realizar una biopsia para determinar la histología del tumor (NICE, 2014). En una biopsia puede determinarse el estado del tumor mediante la escala de “Gleason” que se basa en asignar valores numéricos a la arquitectura glandular de las células tumorígenas. La escala Gleason se divide en cinco patrones de diferenciación o crecimiento glandular, en la cual se suma el primero y el segundo patrón celular más prevalente observado en la biopsia (Helpap y Egevad, 2009).

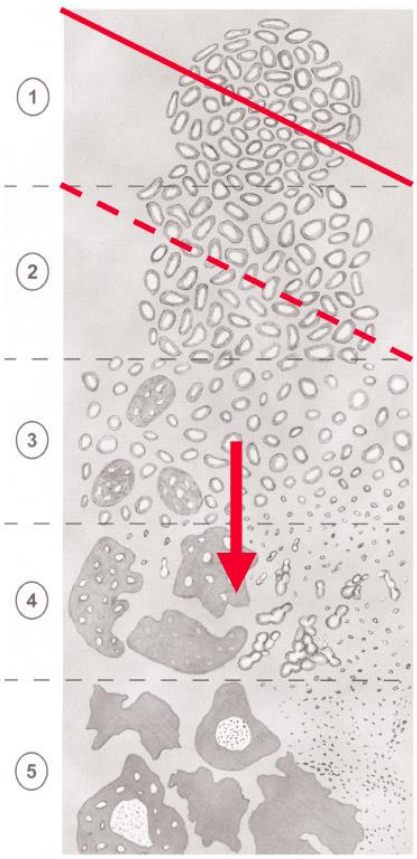


Figura 12. Patrones glandulares utilizados como referencia en la determinación de la escala Gleason.

La técnica fue desarrollada en 1966 por Gleason, basándose en la tinción de cortes histológicos provenientes de tumores de CaP, con los colorantes eosina y hematoxilina y usando lentes microscópicos con un aumento de 4 a 10x (Gleason, 1966). La Figura 12 muestra los 5 patrones glandulares utilizados como referencia en la determinación de la escala Gleason para una biopsia de CaP (Helpap y Egevad, 2009).

3.3.1 PSA y otros bio-marcadores

El PSA es una proteína secretada por las células de la próstata y codificada por el gen de la familia de las kalikreinas (*klk3*), el cual se localiza en el cromosoma 19q13.4. Su función principal está relacionada con la licuefacción del liquido seminal, evitando su coagulación y mejorando la movilidad de los espermatozoides. El PSA es el bio-marcador más utilizado en el diagnóstico del CaP, en 1987 la FDA *(Federal Drug Administration*) determinó que la cuantificación de los niveles de PSA en sangre es una prueba confiable, adyuvante al tacto digital rectal (TDR) para el diagnóstico de CaP. Los niveles de PSA por arriba de los 4 ng/ml son considerados sospechosos de presencia de CaP (zona gris) (Figura 13) (Stamey *et al.,* 1987).

La cuantificación de los niveles de PSA carece de especificidad ya que otros eventos no-cancerosos pueden elevar los niveles de esta proteína en sangre. Algunos de esos eventos son inflamación, infección y traumatismos leves por un golpe o HPB (Prenser *et al.,* 2012). Muchos estudios han sido realizados para mejorar la especificidad de la prueba de PSA y proponen normalizar los niveles de PSA respecto al tamaño de la próstata (densidad de PSA), cuantificar las fracciones

libres y acomplejadas de PSA, monitorear los cambios de PSA en suero (velocidad y tiempo de duplicación) y medir las isoformas del PSA. Todas estas estrategias que proponen al PSA como bio-marcador de oro, no han arrojado resultados satisfactorios y en muchos de los casos provocan confusión sobre cuál es la mejor estrategia para un buen diagnóstico de la enfermedad. Por esta razón se han buscado nuevos bio-marcadores que ofrezcan mayor especificidad en el diagnóstico y pronóstico del CaP (Prenser *et al.,* 2012). En la Tabla 2 se describen brevemente bio-marcadores promisorios que podrían utilizarse en el diagnóstico del CaP.

Tabla 2. Bio-marcadores utilizados en el diagnóstico del CaP

BIOMARCADOR	CARACTERISTICAS	REFERENCIA
PCA3 (Prostate Cancer Associated 3).	• RNA largo no-codificante. • Sobre-expresado en más del 90% de los tejidos de CaP respecto a HPB. • Presente en muestras de orina.	Bussemakers *et al.,* (1999). de Kok *et al.,* (2002).
TMPRSS2-ERG (Transmembrane protease, serine 2-ETS related gene fusion).	• Fusión de genes presente en más del 50% de los casos de CaP. • Posible cuantificación en orina (mRNA). • La asociación con PCA3 mejora la sensibilidad de la prueba.	Prenser y Chinnaiyan (2009). Hessels *et al.,* (2007).
AMACR (Alpha-Methylacyl-CoA Racemase).	• Alta sensibilidad en más del 90% de las biopsias de CaP. • Asociado a metástasis y recurrencia. • No es específico de CaP y es una prueba invasiva.	Rubin *et al.,* (2002).
Células tumorales circulantes (CTC's) **y exósomas.**	• Fuente de detección donde pueden estar los bio-marcadores antes mencionados.	Danila *et al.,* (2007). Nilsson *et al.,* (2009).

La mayoría de los estudios se han enfocado en determinar una técnica de diagnóstico del CaP que use un solo bio-marcador, sin embargo dicha estrategia ha resultado errónea e incompleta. Existen trabajos donde se reporta la pérdida del supresor de tumor PTEN y la ganancia de ERG, como una relación útil en el pronóstico del paciente con CaP (Cavers *et al.,* 2011). Este tipo de abordajes con más de una molécula podría resultar de mayor utilidad a futuro. En la Figura 13 se muestra un esquema con las pruebas de diagnóstico de CaP utilizadas con mayor frecuencia en la clínica (Prenser *et al.,* 2012).

1.1 Estrategias terapéuticas

Mediante las técnicas de diagnóstico antes descritas, se puede realizar una clasificación sobre el estado del tumor de CaP. El CaP puede progresar desde un estado I a un estado IV, el número es un indicador del grado de severidad del tumor. Las células cancerosas comienzan a crecer en la próstata, pero después pueden expandirse hacia nódulos linfáticos y órganos adyacentes al tumor (Figura 14). Dependiendo del estado del tumor de CaP, se indicará un tipo de terapia para el paciente. Los pacientes que no presentan los síntomas antes mencionados, pueden mantenerse en observación, también llamada “vigilancia activa”.

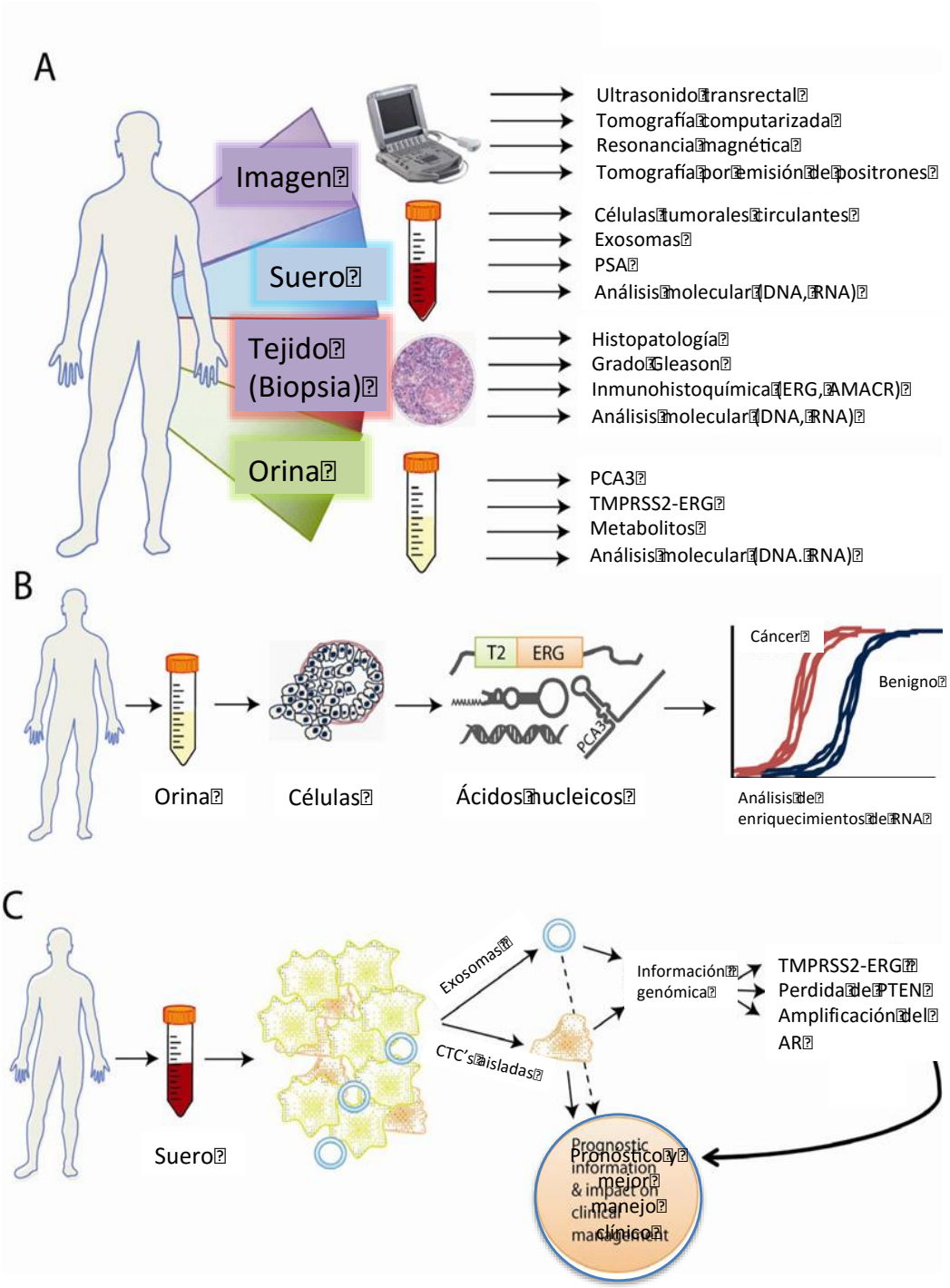


Figura 13. Técnicas de diagnóstico del CaP. Imagen modificada de Prenser *et al.,* (2012). La figura A muestra los métodos de diagnóstico convencionales del CaP. La figura B muestra nuevos métodos que involucran el transcriptoma y proteoma de las células de CaP. La figura C muestra métodos de diagnóstico promisorios que involucran células tumorales circulantes.

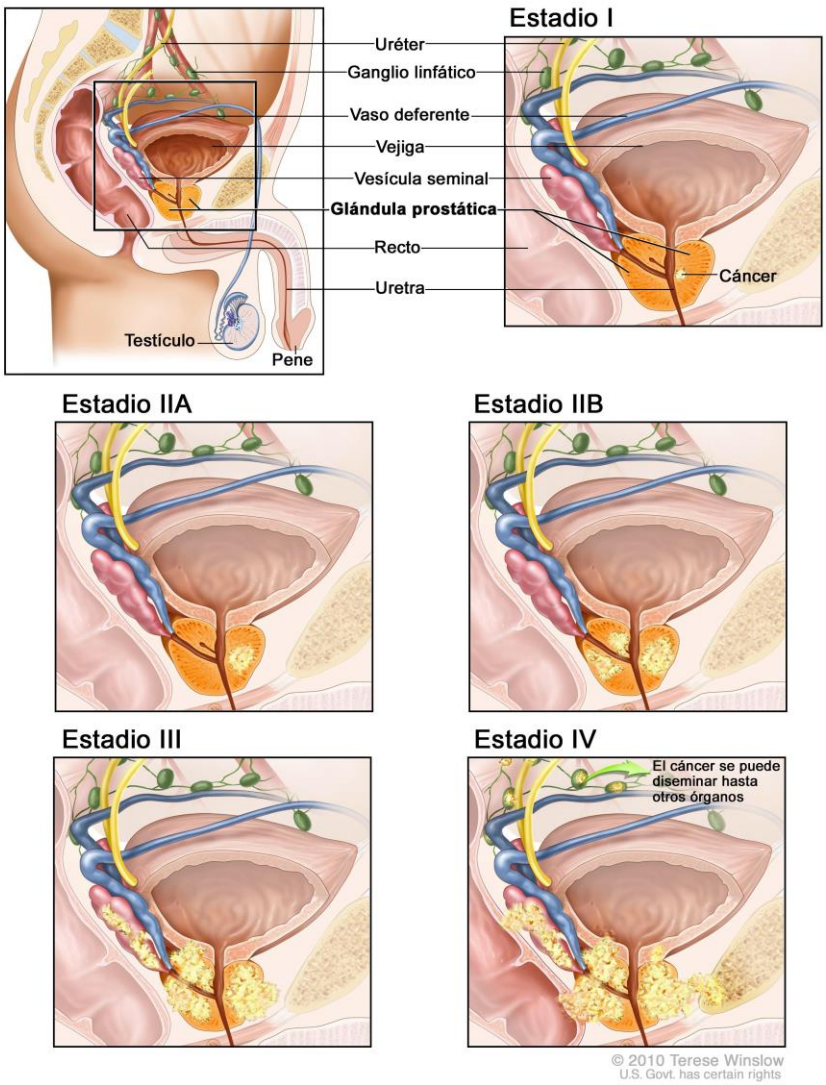


Figura 14. Estados I-IV de un tumor de CaP. Imagen tomada de Winslow *et al.,* (2010). Se muestran los diferentes estados por los que puede pasar un tumor de CaP, el número es indicativo del grado de severidad del tumor.

1.1.1 Cirugía

Cuando el tumor se encuentra localizado y el paciente presenta buena salud, es candidato a una cirugía de resección de la próstata. La cirugía puede traer algunos problemas secundarios para el paciente, como impotencia sexual, fuga de orina por las heces y hernia inguinal. En la Tabla 3 se resumen los diferentes tipos de cirugía frecuentes en CaP (Bill-Axelxon *et al.,* 2014).

Tabla 3. Tipos de cirugía en CaP

Tipo de cirugía	Descripción	Referencia
Prostatectomía radical	Remueve la próstata, tejidos circundantes y vesículas seminales. Existen dos tipos de prostatectomía: retropúbica y perineal (figura 15).	Bill-Axelxon *et al.,* (2014).
Linfadenectomía pélvica	Remueve los nódulos linfáticos de la zona pélvica.	Link y Morton, 2001.
Resección trans-uretral de la próstata	Procedimiento realizado a través de la próstata para tratar el HPB y los síntomas provocados por el CaP (figura 15).	Smith y Patel, 2011.

1.1.2 Terapia hormonal

Cuando los pacientes de CaP no son candidatos a cirugía porque el tumor ya no se encuentra localizado, el tratamiento de primera elección es la privación androgénica. Dicho tratamiento bloquea la acción de los andrógenos interrumpiendo el crecimiento de las células cancerosas de la próstata. La Figura 16 muestra un esquema general del proceso de producción y acción de los andrógenos en el cuerpo humano (Denmeade e Issacs, 2002). En la Tabla 4 se resumen los diferentes tipos de terapia hormonal utilizados con mayor frecuencia en el tratamiento del CaP.

1.1.3 Quimioterapia

Cuando la terapia hormonal fracasa se recurre a la quimioterapia, sin embargo ambas pueden indicarse al mismo tiempo en ciertos casos. Algunos de los fármacos quimioterapéuticos comúnmente utilizados son vinblastina, paclitaxel y docetaxel (Pienta y Smith, 2005). Otras terapias están diseñadas para fortalecer el sistema inmune, reducir el daño en huesos producido por la metástasis, a la par de terapias que involucran la criocirugía y la radiación por protón (Drake y Antonarakis, 2012).

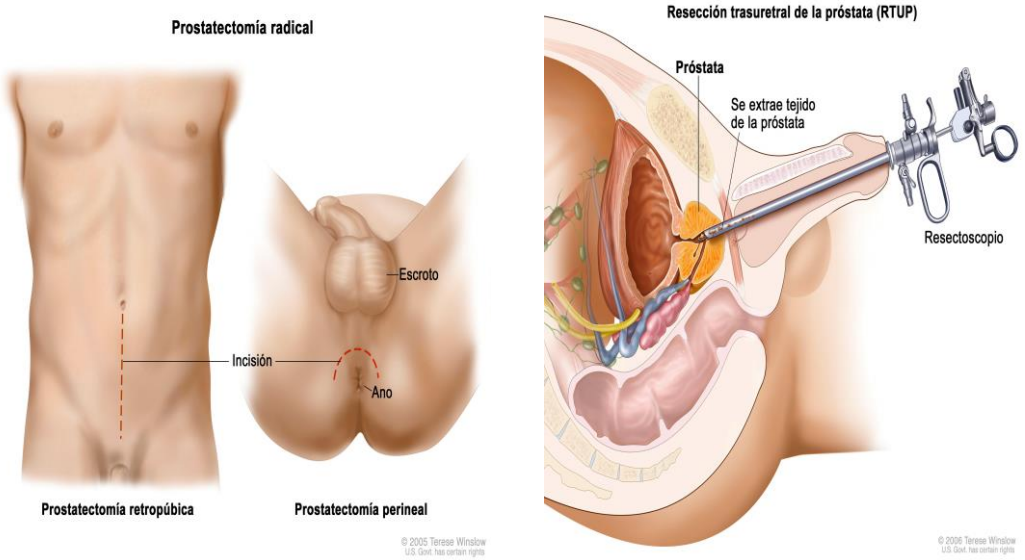


Figura 15. Prostatectomía y resección trans-uretral de la próstata. Imagen tomda de Winslow *et al.,* 2006. La imagen de la izquierda muestra dos tipos de prostatectomía radical. La imagen de la derecha muestra una resección trans-uretral de la próstata.

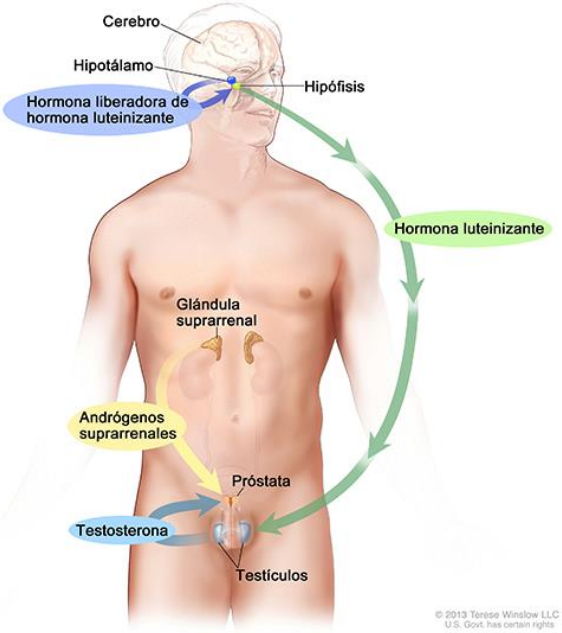


Figura 16. Esquema general de la producción y acción de los andrógenos. Imagen tomada de Winslow, 2013. El esquema muestra la red "hipotálamo-gónadas-próstata" en la producción y acción de los andrógenos a nivel molecular.

Tabla 4. Tipos de terapia hormonal en el CaP

Terapia	Características	Referencia
Agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante.	Detienen la producción de testosterona en los testículos. Fármacos: Leuprolida, Goserelina y Buserelina.	Moreau *et al.,* (2006).
Anti-andrógenos.	Bloquean la acción de andrógenos. Fármacos: Flutamida, Bicalutamida, Enzalutamida y Nilutamida.	Ricci *et al.,* (2014).
Orquiectomía.	Procedimiento quirúrgico para remover uno u ambos testículos.	Crawford *et al.,* (2004).
Estrógenos.	Pueden evitar la producción de testosterona en los testículos, sin embargo algunos estudios sugieren que podrían activar la vía androgénica.	Nelles *et al.,* (2011).

4. Vías de señalización asociadas a CaP

En CaP se han descrito diferentes vías de señalización involucradas en la progresión de la enfermedad hacia un estado más agresivo. Estas vías de señalización se encuentran alteradas, y muchas de ellas interaccionan de alguna manera con la vía androgénica. En la Tabla 5 se muestra una lista de genes regulados por el AR. Aunque la vía androgénica desempeña un papel importante en CaP, otras vías de señalización han sido implicadas en la progresión de la enfermedad. Dichas vías de señalización han mostrado una fuerte interacción con la vía androgénica, como la vía de señalización de receptores para factores de crecimiento, la señalización MAPK, la señalización de citosinas, y la señalización de la vía WNT (Tabla 5).

Tabla 5. Genes regulados por el AR.

Gen	Función	Referencia
Caspasa-2	Regulador apoptótico.	Taghiyev *et al.,* (2011).
CDK1NA	Inhibidor de cinasas dependiente de ciclina.	Kim *et al.,* (2005).
c-FLIP	Inhibidor de apoptosis mediado por Fas/FasL.	McCourt *et al.,* (2012).
CYP3A5	Metaboliza testosterona a una forma inactiva.	Mitra y Goodman 2015.
FGF-8	Factor de crecimiento involucrado en carcinogénesis.	Gnanapragasam *et al.,* (2012).
FKBP51	Chaperona del receptor esteroideo.	Ni *et al.,* (2010).
IGFBP-3	Inhibe crecimiento celular e induce apoptosis.	Kojima *et al.,* (2006).
KLK2	Potencial marcador en CaP.	Dong *et al.,* (2005).
KLK3	Marcador involucrado en licuefacción del semen.	Lai *et al.,* (2003).
KLK4	Involucrado en proliferación celular, invasión y metástasis.	Jin *et al.,* (2013).
MMP-2	Involucrado en progresión maligna del CaP.	Liao *et al.,* (2003).
NEP	Metalopeptidasa de la superficie celular mediada por Zinc.	Akita *et al.,* (2013).
NKX3.1	Regulador de crecimiento epitelial y diferenciación prostática.	Peck *et al.,* (2012).
ODC	Cataliza la síntesis de poliaminas.	Visvanathan *et al.,* (2004).
PAP	Antígeno de tumor de CaP.	Hsieh *et al.,* (1996).
STAMP2	Involucrado en proliferación celular y obesidad.	Korkmaz *et al.,* (2005).
TMPRSS2-ERG	Fusión incidente en CaP.	Yu *et al.,* (2010).

El presente trabajo se enfoca en la vía WNT, la cual comprende una compleja red de proteínas relacionadas que participan en la progresión del CaP (Kaarb *et al.,* 2007).

4.1 Vía de señalización WNT

Dentro de la vía WNT existe un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente al receptor transmembranal *Frizzled* (FZD), conocidas como "SFRP's" por sus siglas en inglés. Actualmente se conocen 5 tipos diferentes que fungen como antagonistas de la vía de señalización y presentan actividad supresora de tumor. Aunque existen diferentes mecanismos por los cuales las proteínas SFRP's antagonizan la vía de señalización WNT, el más común es de tipo competitivo uniéndose a los receptores FZD (Kawano *et al.,* 2003).

La vía WNT está implicada en diversos procesos celulares presentes desde el desarrollo embrionario. Esta vía de señalización comenzó a describirse en la década de los ochenta por Nusse y colaboradores cuando trabajaban con genes del virus tumoral mamario en ratones (Nusse y Varmus, 2012). La vía WNT se ha subdividido en vía WNT canónica (β-catenina) y vía WNT no canónica (cinasas y WNT/Ca2+). En cada una de estas sub-divisiones aparecen diferentes actores moleculares que serán descritos de manera breve más delante. Para fines de este trabajo, se abordará con más detalle las características de la familia de proteínas SFRP's, las cuales son antagonistas de esta vía de señalización (McDonald *et al.,* 2009).

Recientemente se reportó que la proteína SFRP1 puede regular negativamente la actividad transcripcional del AR en CaP (Kawano *et al.,* 2009). Por otro lado, el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* puede activar la vía de señalización WNT ya que ERG es un factor de transcripción que promueve la expresión de genes de dicha vía. (Wu *et al.,* 2013). La fusión TMPRSS2-ERG está presente en más del 50% de los tumores de CaP y responde a la actividad transcripcional del AR, su sobre-expresión se encuentra asociada al proceso oncogénico EMT (Gupta *et al.,* 2010).

4.1.1 Vía WNT canónica (β-catenina) y no canónica (Cinasas y WNT/Ca++).

La vía de señalización WNT es una red de eventos moleculares complejos que puede seguir dos caminos: canónico y no canónico. La vía WNT canónica se describió por primera vez con el gen *int-1,* denominado más tarde *Wnt1*, por su participación en la formación de las alas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (mutante *Wingless*) (Nusse y Varmus, 1982).

El regulador clave en esta vía de señalización hasta ese momento era la proteína β-catenina. Algunas de las funciones principales de la proteína β-catenina son mantener el contacto célula-célula y translocarse al núcleo promoviendo la expresión de oncogenes (Willert y Nusse 1996). En condiciones normales existe un equilibrio entre la cantidad de β-catenina presente en el citoplasma y aquella que se transloca al núcleo. La activación aberrante de esta vía, comienza con la unión de proteínas WNT a receptores Frizzled en la membrana plasmática, lo que provoca el reclutamiento del complejo proteínico Axina-APC inhibiendo así la degradación de β-catenina. Esto permite que β-catenina se estabilice en el citoplasma y posteriormente se transloque al núcleo, donde promueve la expresión de oncogenes y se une a factores de transcripción de la familia TCF/LEF1 (Kikuchi, 2000). La Figura 16 muestra un esquema de la vía de señalización WNT/β-catenina cuando se encuentra activa y cuando se encuentra apagada.

Las proteínas WNT pertenecen a una familia de 19 proteínas altamente conservadas en mamíferos, dichas proteínas tienen un dominio N-terminal rico en cisteína que comprende de 350 a 400 aminoácidos. Las proteínas Wnt forman un complejo con los receptores *frizzled* (FZD) y los receptores LRP5 y 6, activando así la vía (McDonald *et al*., 2010). Los receptores FZD son transmembranales de siete dominios que comprenden diez miembros en mamíferos (Binners et al., 2007); mientras que los receptores LRP5 y 6 son receptores de membrana de un solo dominio que participan de diferente manera en la regulación de eventos celulares de cáncer (He *et al.,* 2004).

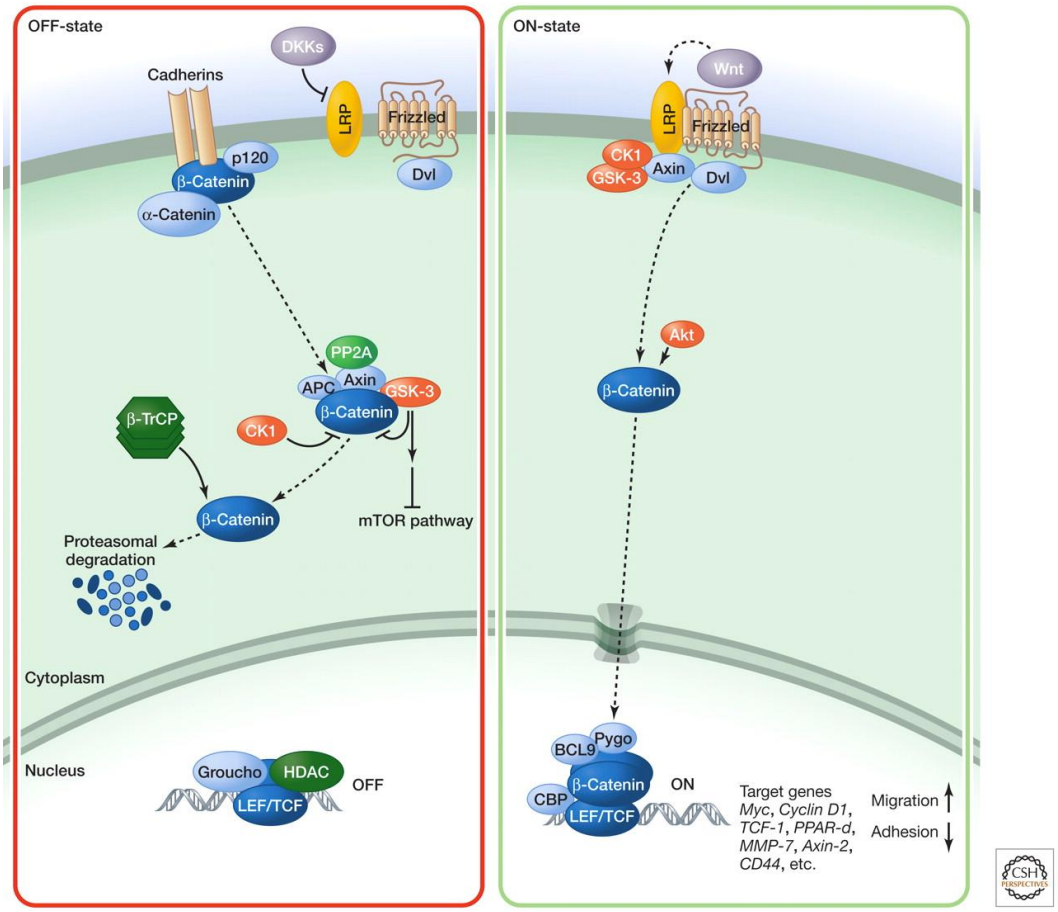


Figura 16. Vía de señalización WNT activa/apagada. Imagen tomada de Nusse, 2012. La figura de la izquierda es una ilustración de la vía WNT apagada. La figura de la derecha muestra una ilustración de la vía WNT encendida.

Tras la unión de las proteínas Wnt a los receptores FZD, se desencadena una serie de eventos moleculares intracelulares donde intervienen otras proteínas importantes como la proteína Axina (Axin), Dishevelled (Dvl), GSK3-β, CK1-α y APC. La Tabla 6 resumen las funciones de dichas proteínas en la vía de señalización WNT.

Tabla 6. Proteínas involucradas en la vía WNT canónica

Proteína	Función	Referencia
Axina	Coordina la formación del complejo APC-(GSK3-CK1)-Dvl.	Luo y Lin *et al.,* (2004).
APC	Se une a β-catenina facilitando su fosforilación y posteriormente su destrucción.	Xing *et al.,* (2003).
GSK3-β	Recluta β-catenina facilitando su fosforilación y posteriormente su destrucción.	Wu y Pan, 2010.
Dvl	Participa tanto en la vía WNT canónica como la no canónica. Interacciona con receptores FZD en la membrana citoplasmática reclutando al complejo APC-(GSK3-CK1).	Tauriello *et al.,* (2012).

Otra ruta que pertenece a la vía de señalización WNT es la vía no canónica, dicha vía comprende dos posibles caminos; uno mediado por cinasas y otro dependiente de Ca^{2+}. Dentro de la vía de señalización WNT no canónica, se encuentra la vía de "Polaridad Celular Planar". En esta vía de señalización, la activación de los receptores FZD desencadena una respuesta río abajo que involucra genes de la familia de las GTPasas: RAC1, Ras, RHOA y JNK. La tabla 7 describe brevemente las proteínas involucradas en este tipo de señalización (Gómez-Orte *et al.,* 2013).

Por último, se encuentra la vía de señalización WNT no canónica que involucra la liberación de Ca^{2+} intracelular (Kuhl *et al.,* 2000). Se ha demostrado que en está vía de señalización participa la proteína Dvl, lo que demuestra una interacción de esta vía con la vía WNT de polaridad celular planar (Kinoshita *et al.,* 2003). La figura 17 muestra las principales proteínas involucradas en la vía WNT de Ca^{2+} (Veeman *et al.,* 2003).

Tabla 7. Proteínas involucradas en la vía WNT de Polaridad Celular Planar

Proteína	Función	Referencia
RAC1	Regulación del citoesqueleto.	Lindgvist *et al.,* (2010).
Ras	Involucrada en procesos de migración celular.	Mayor y Theveneau, 2014.
RHOA	Actúa río-abajo de la señalización de WNT5 y WNT11.	Zhu *et al.,* (2006).
JNK	Coopera con GSK3 para regular Dvl.	Ciani y Salinas, 2007.

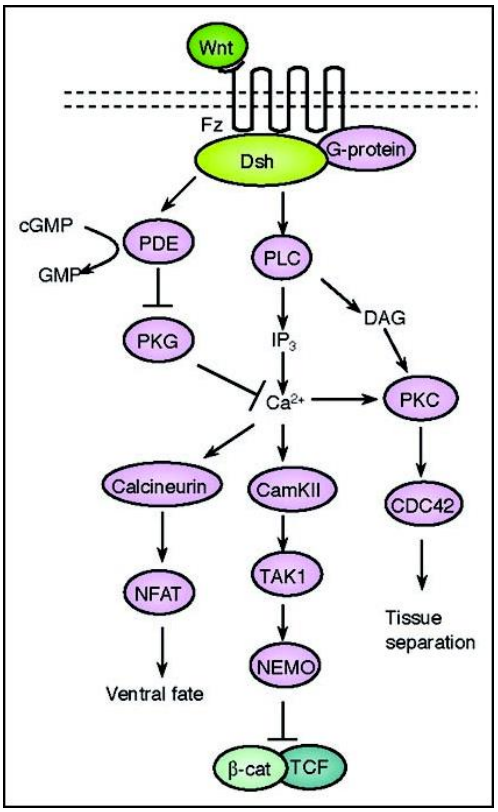


Figura 17. Vía de señalización WNT/Ca^{2+}. Imagen tomada de Komiya y Habas, 2008. En esta figura se esquematiza la liberación de Ca^{2+} dentro de la vía WNT no canónica.

4.1.2 Antagonistas de la vía WNT

Existen diferentes tipos de moléculas que pueden antagonizar la vía de señalización WNT, algunas de las clasificaciones propuestas para estos antagonistas los dividen en dos grupos: proteínas secretadas y relacionadas a *frizzled* (SFRP) y, miembros de la familia Dickkopf (Tabla 8) (Kawano y Kypta, 2003). Los antagonistas de la

familia SFRP incluyen a las proteínas WIF-1 y Cerberus, los cuales ejercen su acción antagónica enlazando ya sea a proteínas WNT, a receptores FZD y receptores Colipase o receptores Ryk (figura 18) (Kawano y Kypta, 2003).

Tabla 8. Principales antagonistas de la vía WNT

Proteína	Acción	Referencia
SFRP's	Inhiben la proliferación celular.	Lavergne *et al.,* (2011).
Dickkopf	Interaccionan con LRP6/Arrow para inhibir la vía WNT.	Bafico *et al.,* (2005).
Cerberus	Antagonizan la vía mediante factores de crecimiento como Activin, Nodal y BMP.	Cruciat y Niehrs 2013.
WIF-1	Puede antagonizar la vía uniéndose a proteínas Wnt .	Ramachandran *et al.,* (2014).

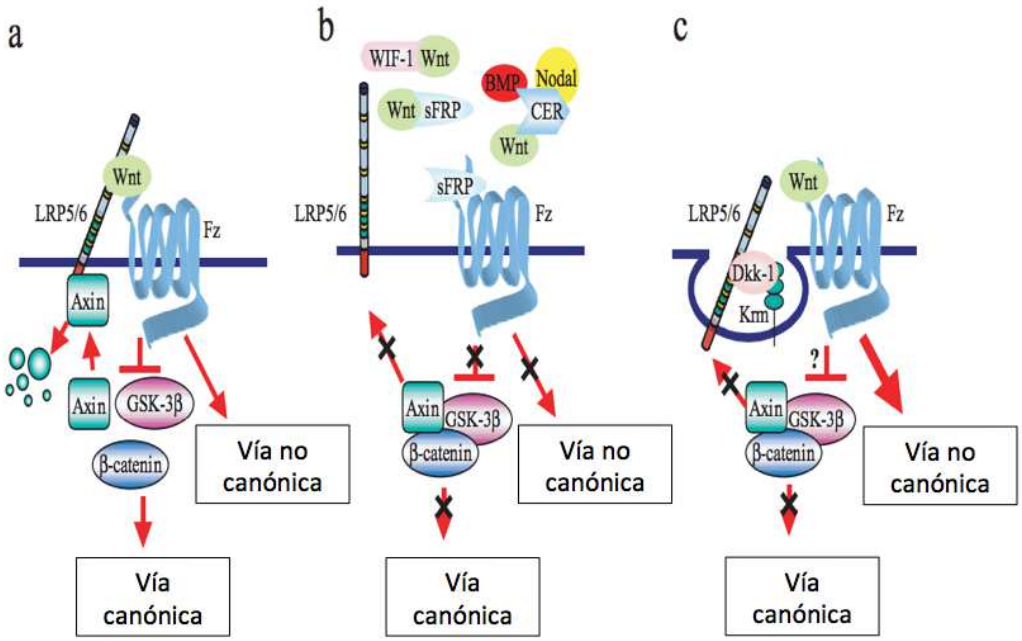


Figura 18. Diferentes tipos de antagonismo en la vía WNT. Imagen modificada de Kawano y Kypta, 2003. La figura A muestra la activación tradicional de la vía WNT por proteínas Wnt. La figura B muestra el antagonismo ejercido sobre la vía WNT por proteínas secretadas tipo WIF-1 y SFRP's. La figura C muestra el antagonismo sobre la vía WNT por Dkk-1.

Las proteínas SFRP's fueron los primeros antagonistas descritos en la vía WNT, estas proteínas comparten homología estructural en su dominio rico en cisteína (CRD, por sus siglas en inglés), N-terminal de las proteínas WNT y los receptores FZD (Melkonyan *et al.,* 1997) (figura 19) (Kawano y Kypta, 2003). Las proteínas SFRP's son secretadas al espacio extracelular donde ejercen su función antagónica, se ha reportado que su efecto puede depender de un gradiente de concentración que incluso llega a activar la vía WNT (Uren *et al.,* 2000).

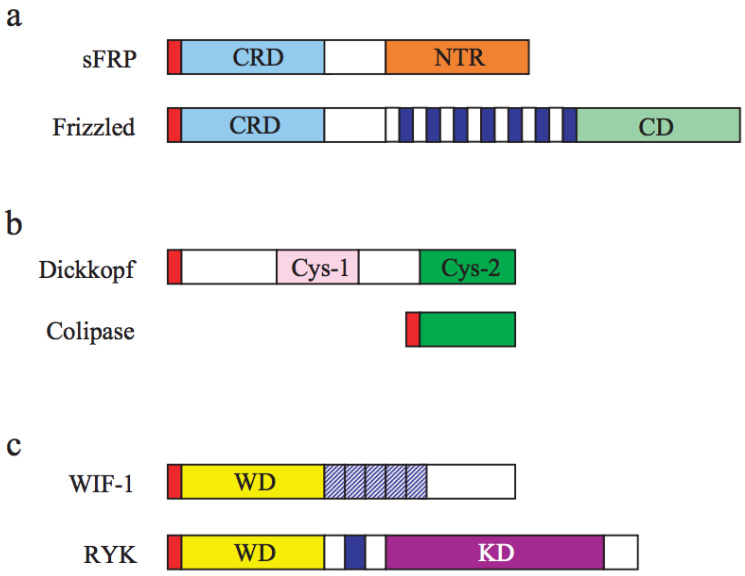


Figura 19. Homología estructural entre proteínas antagonistas y receptores de la vía WNT. Imagen tomada de Kawano y Kypta, 2003. Las figuras A, B y C esquematizan la homología estructural existente entre los antagonistas SFRP's, Dickkopf y WIF-1 con sus respectivos receptores.

Muchos estudios han señalado que existe una expresión a la baja de las proteínas que antagonizan la vía WNT en cáncer, sin embargo existen resultados contradictorios (Bovolenta *et al.,* 2008; Surana *et al.,* 2013). En CaP se sugiere que las proteínas SFRP's desempeñan un papel supresor de tumor. Particularmente SFRP1 ha mostrado estar sub-expresada (a la baja) en tejidos y células de CaP; además esta proteína regula negativamente la actividad transcripcional del AR (Lodygin *et al.,* 2005; Kawano *et al.,* 2009).

4.1.3 SFRP1 en CaP

La proteína SFRP1 ejerce un efecto que disminuye el crecimiento de células de CaP. Interesantemente, dicho efecto no involucra las vías de señalización WNT clásicas. Kypta y col. (2009) reportaron que la sobre-expresión de SFRP1 en líneas celulares de CaP disminuyó la actividad transcripcional del AR. En dicho trabajo se sugirió que el mecanismo de acción podría estar mediado por la asociación con receptores de la familia Ror 1 y 2 (Kawano *et al.,* 2009). Contradictoriamente, Joesting y col. (2005) muestran una comunicación estroma reactivo-epitelio en células de CaP donde SFRP1 contribuye a la progresión del CaP hacia un estado más avanzado (Joesting *et al.,* 2005). A pesar de estos reportes, recientemente se ha reforzado la hipótesis de que SFRP1 es un supresor tumoral en CaP. Un estudio publicado en el año 2014, muestra que el tratamiento con genisteína desregula la expresión del miR-1260b, aumentando la expresión de SFRP1 en células de CaP, este efecto disminuyó las características neoplásicas de dichas células cancerígenas (Hirata *et al.,* 2014). Aunado a esto, SFRP1 se propone como un bio-marcador candidato para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Zheng *et al.,* 2015).

5. Alteraciones genómicas en CaP

Como se ha mencionado hasta ahora, diversas alteraciones promueven la aparición y la progresión del CaP. Dichas alteraciones comprenden factores hereditarios, factores genéticos, factores relacionados a la edad y, alteraciones genómicas cromosomales. Las células de cáncer se encuentran sometidas a una proliferación excesiva, esto tiene como consecuencia la aparición de errores cromosomales que conllevan a duplicaciones, deleciones y fusión de genes (Berger *et al.,* 2011).

5.1 Re-arreglos cromosomales

Los re-arreglos cromosomales tienen como consecuencia principal la aparición de genes de fusión, los cuales son muy frecuentes en tumores de leucemias y sarcomas. El porcentaje estimado de estas fusiones en leucemia es de 100%, 20%

en leucemia mieloide aguda, y de 15 a 20% en tumores de otros tipos tejido cancerígeno (Mitelman et al., 2007).

En CaP, los reportes muestran una frecuencia alta de genes de fusión principalmente aquellos que involucran factores de transcripción de la familia ETS (E-26 virus Transformation Specific, inglés) (Hessels y Schalken, 2013). La familia de los factores de transcripción ETS, comprende 27 miembros donde la fusión *TMPRSS2-ERG* es la más reportada en CaP (Tomlins *et al.,* 2005).

5.1.1 Fusión TMPRSS2-ERG en CaP

La fusión TMPRSS2-ERG es un evento común en CaP, se ha reportado en más del 50% de los pacientes con esta enfermedad. Dicha fusión es una ecisión de doble cadena en el DNA que tiene como consecuencia la unión del gen *ERG* con el promotor del gen *TMPRSS2*; cabe mencionar que la proteína ERG es funcional pero de manera trunca, los aminoácidos del 1 al 44 son eliminados del producto final (Figura 20) (MacGarty *et al.,* 2014).

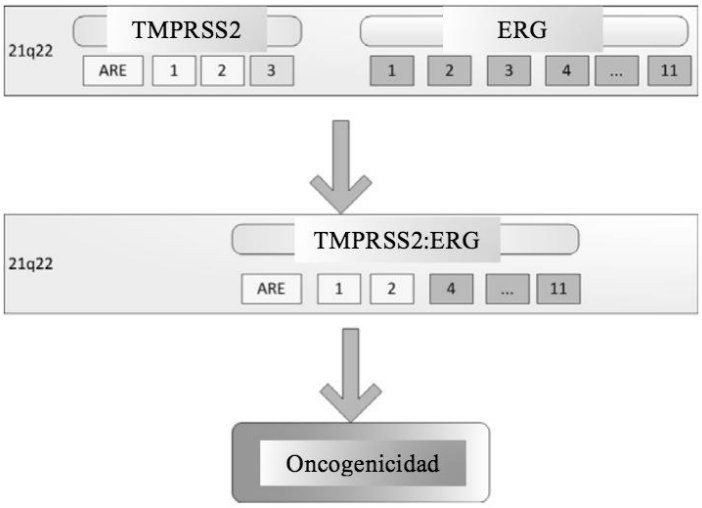


Figura 20. Fusión TMPRSS2-ERG. Imagen modificada de McGarty, 2014. Se ilustra como es que se fusionan los genes *TMPRSS2* y *ERG* originando un producto donde ERG es funcional pero de manera trunca.

ERG (*ETS Related Gene*, por sus siglas en inglés), es un factor de transcripción producto de la fusión *TMPRSS2-ERG* en CaP. En condiciones normales, ERG se encuentra sobre-expresado en el endotelio y el mesodermo embrionario, donde tiene un papel importante en el desarrollo del sistema vascular, el tracto urogenital y el sistema óseo (Birdsey *et al.,* 2008). La proteína ERG tiene una longitud de 486 aminoácidos, pesa 56 KDa (Rao *et al.,* 1987) y posee un dominio de reconocimiento a DNA que enlaza a secuencias del tipo GGA(A/T) (Shore *et al.,* 1996). Se han realizado diferentes clasificaciones de los factores de transcripción ETS de acuerdo a su similitud de secuencia con el dominio de enlace a DNA. En este tipo de clasificación, ERG pertenece a la clase I, dentro de esta clasificación se encuentran otros factores de transcripción como ETS 1 y 2, ETV 1-5, ELK 1, 3 y 4, ERF, FEV, FLI 1 y GABPα (Wei *et al.,* 2010).

En CaP, ERG ha sido reportado en más del 50% de los pacientes con la enfermedad como producto de la fusión de genes *TMPRSS2-ERG* (Tomlins et al., 2005). La sobre-expresión de ERG está relacionada con la respuesta a andrógenos que tiene el promotor del gen que codifica para la proteína TMPRSS2 (*Transmembranal Protein Serin type 2*). ERG está relacionado con la progresión de la neoplasia prostática intraepitelial a CaP (Carver *et al.,* 2009). La sobre-expresión de ERG ha sido involucrada también con el proceso neoplásico EMT que modifica la adhesión celular y promueve la migración e invasividad (Leshem *et al.,* 2011). La Figura 21 muestra un esquema de la participación de la fusión de TMPRSS2-ERG en la progresión del CaP (Squire, 2009).

Recientemente se han estudiado los mecanismos moleculares por los cuales la fusión *TMPRSS2-ERG* promueve la progresión del CaP. Interesantemente ERG ejerce una acción positiva sobre la vía de señalización WNT/LEF1 (Wu *et al.,* 2013) en CaP, dicha activación involucra la sobre-expresión de los genes *LEF1* y *FZD4* (Gupta *et al.,* 2010).

Claramente existe una asociación entre la fusión *TMPRSS2-ERG* y la vía androgénica en CaP. ERG logra esta regulación interaccionando directamente con el promotor del gen que codifica para el AR y promoviendo la expresión de genes que son responsivos a andrógenos (Yu *et al.,* 2010). En este sentido, se ha buscado la manera de inhibir esta red de señalización, Li y col. (2011) lo lograron mediante fármacos que antagonizan la actividad transcripcional del AR (Li *et al.,* 2011).

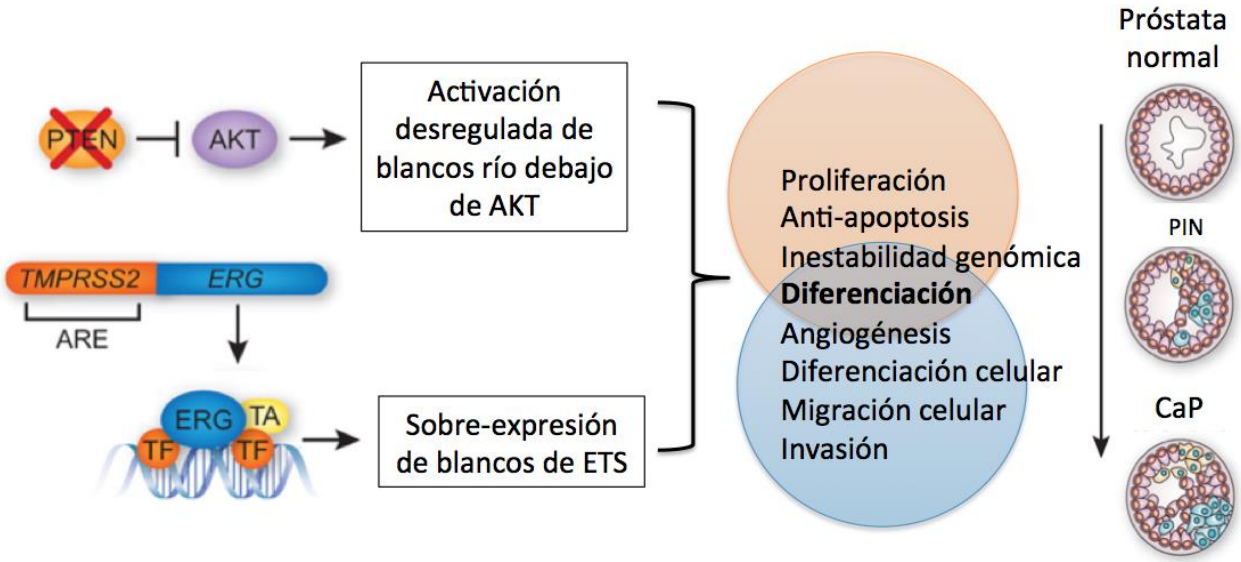


Figura 21. Participación de la fusión TMPRSS2-ERG en la progresión del CaP. Imagen modificada de Squire, 2009. Se muestra una ilustración de la asociación entre la perdida de PTEN y la sobre-expresión de ERG en el aumento de las características neoplásicas de las células de CaP.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CaP es un problema de salud importante en el mundo y en México, en nuestro país ocupa el primer lugar por muertes relacionadas a neoplasias en hombres. La enfermedad puede ser tratada si se detecta a tiempo; sin embargo, no existen bio-marcadores específicos que ayuden a realizar un buen diagnóstico. Los pacientes que se presentan con CaP en un estado avanzado, son tratados con una terapia de privación hormonal que disminuye los niveles y la acción de los andrógenos en el organismo. Dicha terapia tiene buenos resultados en un principio; sin embargo, al paso de unos meses las células CaP se vuelven resistentes al tratamiento y la enfermedad reaparece con mayor agresividad.

Diversos reportes han mostrado que la actividad transcripcional del AR tiene un papel importante en la resistencia que muestran las células de CaP al tratamiento de privación hormonal. Dichos trabajos demuestran que existe una relación entre el AR, el gen de fusión *TMPRSS2- ERG* y la vía WNT. Particularmente esta fusión de genes, la cual responde a la actividad andrógenica del AR; se encuentra sobre-expresada en 50% de los pacientes con CaP. Además, ERG (producto de la fusión TMPRSS2-ERG) activa la vía WNT, promoviendo la expresión de oncogenes como *LEF1, WNT3A* y *FZD4*. Interesantemente, se reportó que la proteína SFRP1 (un antagonista de la vía de señalización WNT) disminuye la actividad transcripcional del AR y la viabilidad celular en CaP; sin embargo se desconoce su mecanismo de acción y no se ha descrito el efecto que dicha proteína podría ejercer sobre células que expresan la fusión *TRMPRSS2-ERG*.

HIPÓTESIS

El tratamiento con la proteína SFRP1 disminuye la actividad transcripcional del AR, lo que resulta en una regulación negativa de la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y en una disminución de las características neoplásicas de las células de CaP.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de la proteína SFRP1 sobre el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en CaP.

Particulares

- Medir el efecto de la proteína SFRP1 sobre la viabilidad en células de CaP.
- Determinar la actividad transcripcional del AR tras el tratamiento con SFRP1.
- Analizar la acción que tiene SFRP1 sobre la fusión *TMPRSS2-ERG*, y la expresión de genes de la vía WNT.
- Determinar a qué nivel (citoplasmático o nuclear), se da la regulación del AR por SFRP1.
- Determinar el posible mecanismo por el cual la proteína SFRP1 ejerce su efecto sobre la viabilidad celular (apoptosis o arresto del ciclo celular).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo tiene como objetivo demostrar que existe un efecto de regulación negativa por parte de la proteína SFRP1 sobre el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*. Para cumplir dicho objetivo, se ha planteado un eje que comprende tres preguntas principales. La Figura 22 es un esquema que representa dichas preguntas y el orden en que se ha planteado resolverlas.

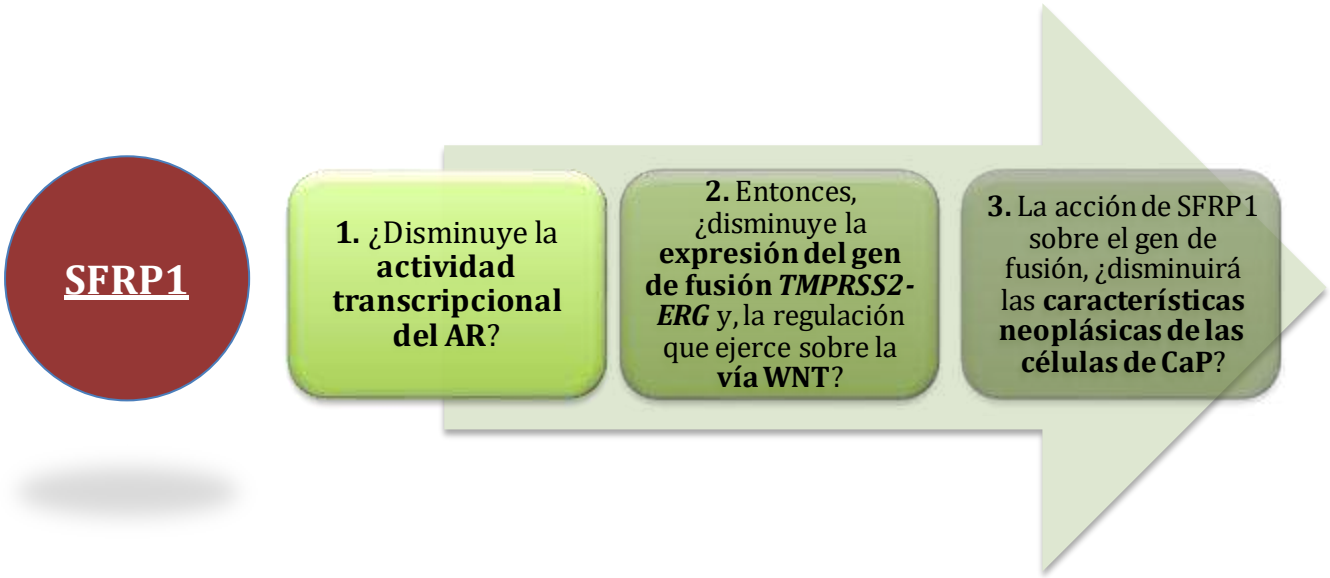


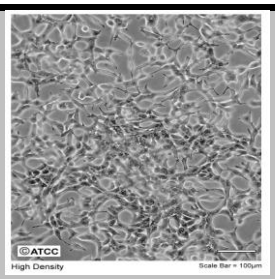
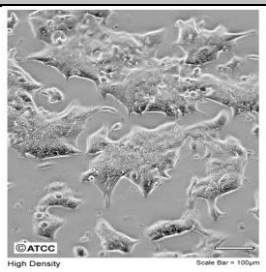
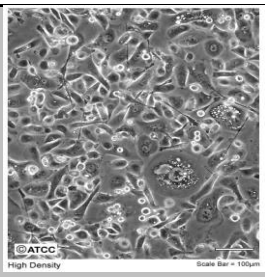
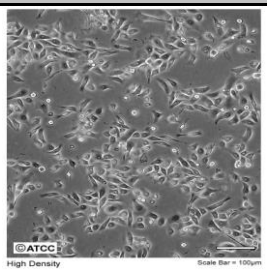
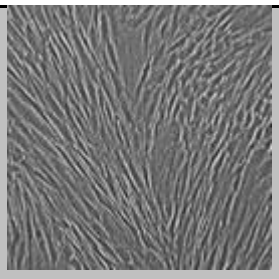
Figura 22. Preguntas centrales a resolver en este proyecto. Se esquematizan 3 preguntas centrales que se relacionan con la metodología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y reactivos

Se utilizaron las líneas celulares de CaP: LNCaP, VCaP y PC3, y las células normales de próstata: RWPE-1 adquiridas en la compañía ATCC. También se utilizaron las células estromales de próstata PrSC, adquiridas en la compañía LONZA. La Tabla 9 resume las características morfológicas y moleculares de dichas células.

Tabla 9. Características morfológicas y moleculares de las líneas celulares de Próstata.

LINEA CELULAR	MORFOLOGIA	CARACTERISTICAS
LNCaP **(ATCC® CRL-1740™).**		• Células de CaP. • Epiteliales, adherentes. • Sensibles a andrógenos. • Expresan PSA. • Tiempo de duplicación: 36 horas.
VCaP **(ATCC® CRL-2876™).**		• Células de CaP. • Epiteliales, adherentes. • Sensibles a andrógenos. • Expresan PSA. • Expresan la fusión TMPRSS2-ERG. • Tiempo de duplicación: 58 horas.
PC3 **(ATCC® CRL-1435™).**		• Células de CaP. • Epiteliales, adherentes. • No expresan AR y PSA. • Tiempo de duplicación: >24 horas.
RWPE-1 **(ATCC® CRL-11609™).**		• Células normales de próstata. • Epiteliales, adherentes. • Expresan AR y PSA. • Tiempo de duplicación: 3-5 días aproximadamente.
PrSC **(LONZA CC-2508 PrSC).**		• Células normales de próstata. • Estromales, adherentes. • Tiempo de duplicación: 6-9 días aproximadamente.

Equipos.

Campana de flujo laminar (SAFEAIRE, Fisher Hamilton Clase II), incubadora (ULTIMA II), equipo para PCR (VIIA7 Real-Time PCR system, Thermo Fisher Scientific), microscopio (Nikon Eclipse TS100), citómetro (FACSaria II BD bioscience), espectrofotómetro para micro-placas (EPOCH, Biotek).

Cultivo celular.

Las células se descongelaron y se propagaron según lo recomendado por los manuales SOP de ATCC para cada línea celular. Todas las líneas celulares fueron crecidas a una temperatura de 37ºC y una atmósfera de CO_2 al 5%. Para crecer las células LNCaP, VCaP y PC3, se utilizó medio RPMI 1640 con rojo de fenol (Sigma, R7388), suplementado con suero fetal bovino (SFB, Bio west S0960) al 10%, glutamina al 1% (Sigma, G3126) y piruvato de sodio al 0.1% (Sigma, P2256). Para los ensayos con dihidrotestosterona (DHT), se utilizó medio RPMI 1640 sin rojo de fenol (Sigma, R8755), suplementado con SFB "*charcoal stripped*" (SFBcs) tratado con carbón activado para eliminar las hormonas (Biowest, S181F) al 10%. Para crecer las células RWPE-1 se utilizó medio KSFM (Thermo Fisher, 17005-042) suplementado con SFB al 10%; y para las células estromales PrSC se utilizó medio SCBM suplementado con SFB al 10% (LONZA, CC-3204).

Tratamientos.

La hormona DHT fue donada por la Dra. Langley del INCan. Los tratamientos se realizaron con diferentes concentraciones de DHT que fueron de 0 a 100 nM y con la proteína recombinante SFRP1 (Sigma, SRP-3154) de 0 a 1 nM. Se realizó una curva de viabilidad celular con dichas concentraciones y se seleccionaron aquellas que presentaron el mejor efecto. Se utilizó la concentración 0.01 nM de ambas moléculas para realizar los diferentes tratamientos: control (medio de cultivo + vehículo), DHT (0.01 nM) y SFRP1 + DHT (0.01 nM). En la preparación de las alícuotas de DHT se utilizó etanol al 100% como vehículo y para las alícuotas de SFRP1 se utilizó BSA al 0.1% en agua desionizada.

Viabilidad celular.

Se sembraron 1-2 x 10^4 células por pozo en placas de 96 pozos, se dejaron adaptar entre 24 y 48 horas en medio con rojo de fenol, dependiendo del tipo de línea celular. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio de cultivo por medio libre de rojo de fenol, suplementado con SFBcs al 10%. A las 24 horas, se realizaron los tratamientos con DHT, y con SFRP1.

La viabilidad celular se midió mediante la técnica de MTT (Mossman, 1983). Cumplido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo en todas las líneas celulares excepto en VCaP, se añadió 10µL de MTT a cada pozo, y se incubó la placa de a 37 ºC, de 2 a 4 horas. Transcurrido ese tiempo, los cristales de formazan (color púrpura) producidos por la reacción, fueron solubilizados con dimetilsulfóxido (DMSO, AppliChem. A3672) grado biología molecular. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 575 nm. Cada condición se realizó por sextuplicado y se contó con al menos un replicado biológico para cada placa.

Ensayos de expresión (RT-qPCR).

Se sembraron 1 x 10^5 células por pozo en placas de 12 pozos, posteriormente se realizaron los tratamientos descritos arriba. A las 24 horas se realizó la extracción de RNA con el *kit RNAeasy* (QIAGEN, 740104) según lo establecido por el fabricante. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro (Thermo Fisher, Nano-Drop 1000) para ácidos nucleicos tomando en cuenta la relación 260/230. A la par se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para determinar la integridad del RNA. Cada muestra de RNA se sometió a una reacción de retro-transcripción (RT) utilizando *el kit Reverte Aid Synthesis* (Thermo Fisher, K1691) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de la reacción fueron: 42 ºC por 60 minutos y, 70 ºC por 5 minutos en un solo paso. Con el cDNA obtenido se realizó un ensayo RT-PCR (*Real Time-Polymerase Chain Reaction*), las concentraciones de los reactivos y las sondas TaqMan utilizadas para cada gen blanco se muestran en la Tabla 10. Las condiciones de temperatura para esta reacción se muestran en la Figura 23. Los resultados se cuantificaron en el equipo viiA7, y fueron

normalizados mediante la técnica de $2^{-deltaCt}$ (Livak y Schmittgen 2001). Las sondas TaqMan utilizadas para medir los genes blanco fueron adquiridas en Applied Biosystems: *AR* (Hs00171172_m1), *KLK3* (Hs02576345_m1), *TMPRSS2-ERG* (Hs01120965_m1), *ERG 3* (Hs01554629_m1), *LEF1* (Hs01547250_m1), *FZD4* (Hs00201853_m1), *WNT3A* (Hs00263977_m1), *SFRP1* (Hs00610060_m1). *GAPDH* (Hs02758991_g1) se utilizó para normalizar la expresión de dichos genes.

Tabla 10. Reactivos y concentraciones para la reacción de RT-PCR

Reactivos	X1 (µL)
***Master mix* universal de PCR TaqMan, (2x) (Applied, 4369016).**	5.0
H2O DEPC*.	4.5
Sonda TaqMan	0.5
cDNA	1.0

*DEPC, dietilpirocarbonato

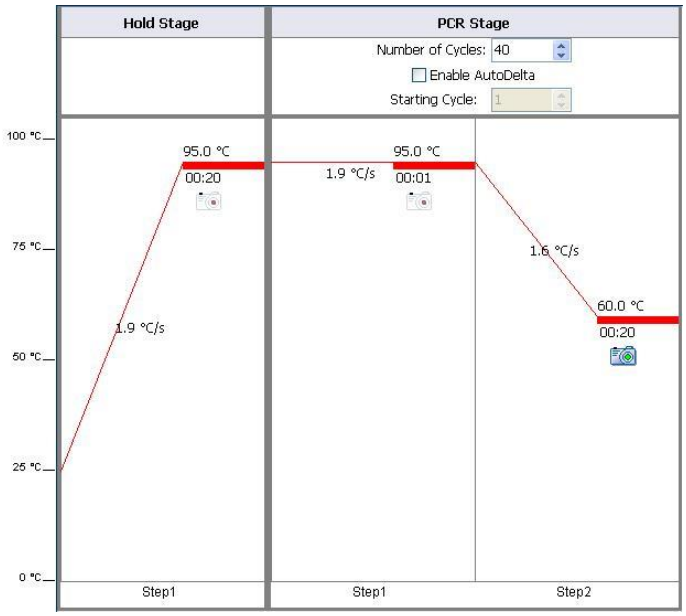


Figura 23. Condiciones de la reacción de RT-PCR. Imagen tomada del software viia7 versión 1.2 de Thermo Scientific.

Inmunofluorescencia.

Se sembraron $3X10^5$ células por pozo en placas de 6 pozos tratadas previamente con el polímero poli-L-lisina para fomentar la adherencia celular. Después de realizar los tratamientos con SFRP1 y DHT, las células se entregaron en el área de microscopía confocal del INMEGEN donde se realizó todo el proceso de fijado y marcado con los anticuerpos primario y secundario.

Ensayos de citometría de flujo.

Se sembraron 5×10^5 células por pozo en placas de 6 pozos, después de los tratamientos se procedió a realizar los ensayos de ciclo celular y apoptosis según las instrucciones del fabricante. El ensayo de ciclo celular se realizó con el paquete Cycle test (BD, Bioscience) y, el ensayo de apoptosis con el paquete comercial ANEXIN V/FITC (Thermo Fisher). Las reacciones de cada ensayo se realizaron en el área de citometría de flujo del INMEGEN con el equipo FACSaria de BD bioscience, los resultados se analizaron con el programa FACSDiva versión 6.1.3.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos se analizaron con el paquete estadístico Graphpad Prism 6. Las pruebas estadísticas y el nivel de significancia se especifican en el pie de figura de cada experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SFRP1 (mRNA) está sub-expresado en células de CaP positivas a la fusión TMPRSS2-ERG

El mensajero de la proteína SFRP1, está sub-expresado en las células de CaP VCaP, LNCaP y PC3 respecto a las células normales de próstata RWPE-1 (epitelio) y PrSC (estroma) (Figura 24). Esto concuerda con lo reportado por Lodygin *et al.,* (2005), sin embargo en dicho trabajo no se utilizó ningún modelo que albergara la fusión *TMPRSS2-ERG*. En el presente trabajo, se observó que *SFRP1* se expresa 500 veces menos que *ERG 3* y 200 veces menos que *TMPRSS2-ERG 1a (T-E 1a)* en VCaP (Figura 25), lo que refuerza la hipótesis de una posible asociación negativa entre la proteína SFRP1 y la expresión de la fusión *TMPRSS2-ERG*. Esto también se fundamenta en el trabajo realizado por Kawano *et al.,* (2009), donde la proteína SFRP1 regula negativamente la actividad transcripcional del AR.

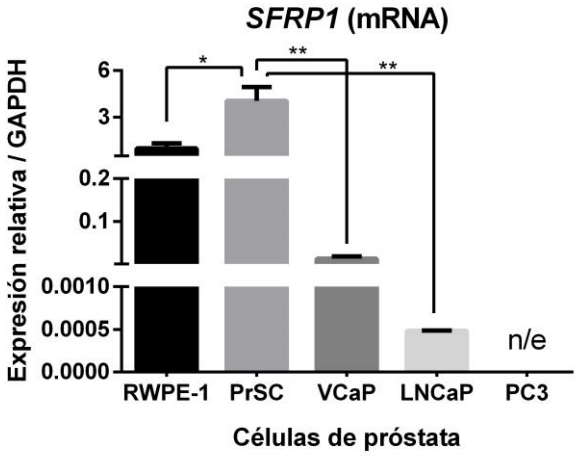


Figura 24. Expresión de *SFRP1* en células de próstata. Se graficó la razón de cambio (fold change, en inglés) de la expresión relativa/*GAPDH* de *SFRP1* en cada línea celular contra la expresión relativa/*GAPDH* de *SFRP1* normalizada a la unidad en RWPE-1. ANOVA, IC 95%, *p ≤0.0122, **p ≤0.0020. Comparaciones múltiples con la prueba de Holm-Sidak. n/e = no se detectó expresión.

T-E 1a es la variante de la fusión TMPRSS2-ERG que se expresa con mayor frecuencia en CaP, sin embargo existen otros tipos de fusiones que también involucran al gen *ERG.* Algunas de ellas son *HERPUD1-ERG*, *SLC45A3-ERG* y

NDRG1-ERG, las cuales conforman el 45% de los eventos de fusión con factores de transcripción ETS en CaP (Rubin, 2012). ERG 3 es una de las isoformas con mayor expresión en CaP, en la Figura 25 se observa que bajo condiciones basales dicha variante se expresó más que la fusión *T-E 1a*. En lo que sigue del texto *T-E 1a* será referido como *TMPRSS2-ERG* y *ERG 3* como *ERG*.

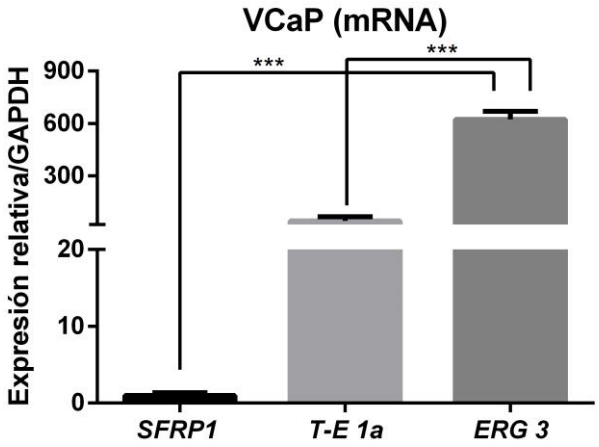


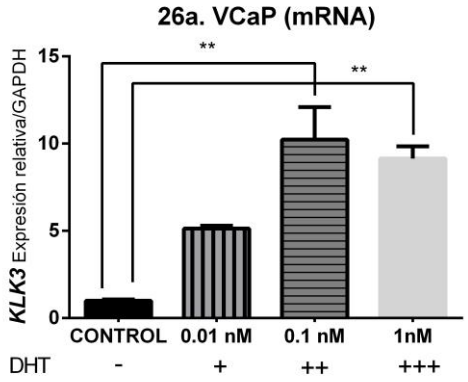
Figura 25. Expresión de *SFRP1, T-E 1a* y *ERG 3* en VCaP. La expresión relativa/*GAPDH* de *T-E 1a* y *ERG 3* se comparó contra la expresión relativa/*GAPDH* de *SFRP1* normalizada a la unidad. ANOVA, IC 95%, ***p ≤0.0007. Comparaciones múltiples con la prueba de Tukey.

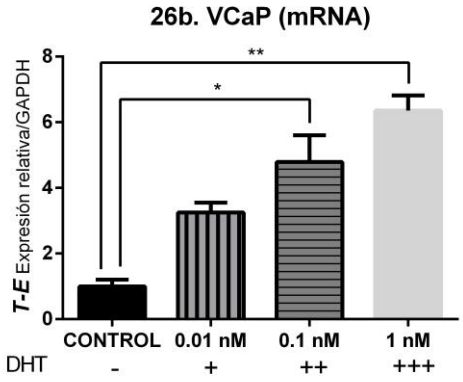
SFRP1 disminuye la expresión de *TMPRSS2-ERG* en presencia de la hormona DHT

Las células de CaP son sensibles a la actividad androgénica, el gen que codifica para la proteína PSA definido en la literatura científica como *KLK3,* es uno de los genes utilizados para medir dicha actividad (Levina *et al.,* 2015). Está reportado que la expresión de *KLK3* aumenta bajo el estímulo de la hormona DHT en LNCaP (Petrow V, 1986); en VCaP, los reportes muestran resultados similares (Loberg *et al.,* 2006; Li *et al.,* 2011).

Para medir la respuesta que tienen las células VCaP bajo el estímulo con DHT, se probaron diferentes concentraciones de la hormona y se midió la expresión del gen *KLK3* (figura 26). A partir de una concentración 0.1 nM, este gen comienzó a expresarse significativamente (figura 26a), el efecto positivo de DHT sobre la

expresión de *KLK3* resultó similar para el gen de fusión *T-E* y para el gen *ERG* (figuras 26b y 26c). Este efecto se debe a que estructuralmente, dicha fusión cuenta con "elementos de respuesta a andrógenos" (ARE's, por sus siglas en inglés) en la región promotora del gen que codifica para *TMPRSS2* (Clark *et al.,* 2007). Esta característica estructural, convierte al gen de fusión en un blanco terapéutico candidato para el tratamiento del CaP (Li *et al.,* 2011).





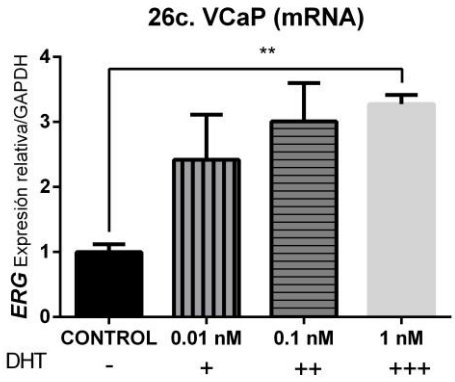


Figura 26. Expresión de los genes *KLK3, T-E* y *ERG* en VCaP tratada con DHT durante 24 horas. Se graficó la razón de cambio para cada concentración de DHT comparada con la expresión relativa/GAPDH del control. a) *KLK3*, **p ≤0.0032 b) *T-E* *p ≤0.0473, **p ≤0.0033 y c) *ERG* **p ≤0.0098. ANOVA, IC 95%. Comparaciones múltiples con la prueba de Dunnett.

Se probó si el tratamiento con la proteína SFRP1 podría disminuir la actividad transcripcional del AR en un modelo celular previamente reportado. Se realizó el tratamiento sólo con SFRP1 y con la combinación SFRP1 + DHT a una concentración 0.01 nM en LNCaP. Se utilizaron estas concentraciones ya que como se mostrará más adelante, fueron la concentraciones que presentaron el mejor efecto sobre la viabilidad celular. En la Figura 27 se observa que el tratamiento combinado DHT + SFRP1 disminuye significativamente la expresión del gen *KLK3*

en LNCaP. Esto corrobora los resultados obtenidos por Kawano *et al.,* (2009), donde la proteína SFRP1 recombinante disminuyó la actividad transcripcional del AR en esa misma línea celular.

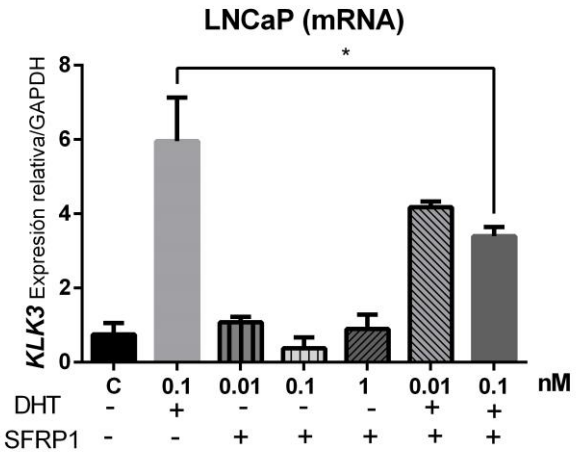
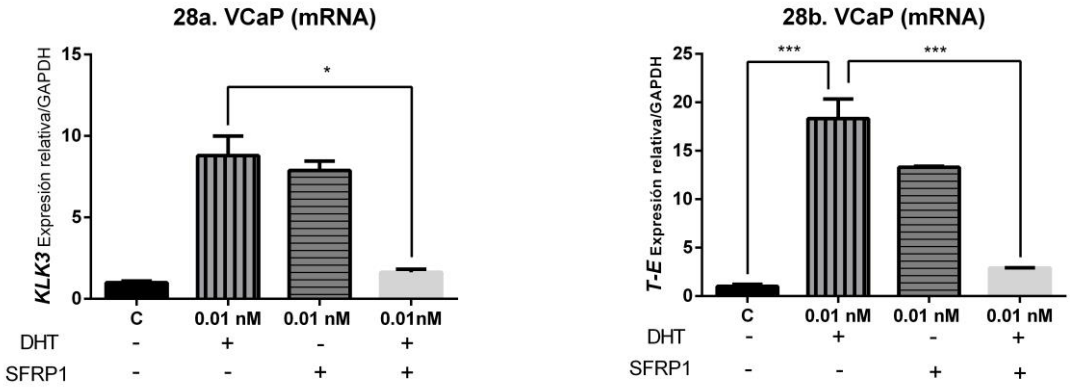


Figura 27. Expresión de *KLK3* en LNCaP tratada con DHT y SFRP1 durante 24 horas. Se graficó la razón de cambio de la expresión relativa/GAPDH del gen *KLK3* para cada concentración comprada con el control. ANOVA, IC 95%, *p ≤0.0227. Comparaciones múltiples con la prueba de Holm-Sidak.

En las células VCaP se seleccionaron las mismas concentraciones y se observó una disminución significativa en la expresión de *KLK3* con el tratamiento combinado SFRP1 + DHT (0.01 nM), interesantemente en esta línea celular la proteína SFRP1 pudo activar por sí sola la transcripción del gen *KLK3* (figura 28a). El mismo efecto se observó en los genes que conforman la fusión *TMPRSS2-ERG* (figura 28b y 28c), este resultado es interesante aunque contradictorio a lo observado en las células LNCaP. El estatus que tiene el AR en ambas líneas celulares puede provocar dicho resultado; por un lado VCaP cuenta con un AR íntegro, mientras que en LNCaP el AR tiene una mutación que afecta la forma en que responde a los ligandos (Veldscholte *et al.,* 1992).

La combinación SFRP1 + DHT disminuyó los niveles de expresión de *ERG*, lo que confirma la hipótesis planteada al principio de este trabajo. Dicho efecto sobre la expresión de *ERG* por parte de SFRP1, podría tener como consecuencia una disminución de las características neoplásicas de estas células. Cabe mencionar

que el efecto negativo de SFRP1 sobre la actividad transcripcional del AR en VCaP, depende de la presencia de la hormona DHT. Más delante se demuestra que la viabilidad celular también se ve afectada por la combinación SFRP1 + DHT en ambas líneas celualres, lo que demuestra que la presencia de la hormona juega un papel importante en el efecto "supresor de tumor" que ejerce SFRP1. Este efecto puede representar una ventaja para el tratamiento de los pacientes con CaP resistente a la castración, ya que el tratamiento de castración química no elimina al 100% la producción de los andrógenos. Además, las células de CaP presentan transformaciones moleculares que mantienen la actividad de la vía androgénica (Khan *et al.,* 2014).



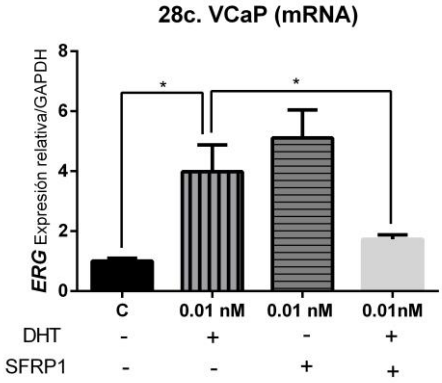


Figura 28. Expresión de los genes *KLK3, T-E* y *ERG* en VCaP tratada con DHT y SFRP1 durante 24 horas. Se graficó la razón de cambio para cada tratamiento comparada con la expresión relativa/GAPDH del control. a) *KLK3*, *p ≤0.0368 b) *T-E* ***p ≤0.0002 y c) *ERG* **p ≤0.0401. ANOVA, IC 95%. Comparaciones múltiples con la prueba de Dunnett.

Después de observar que el tratamiento combinado SFRP1 + DHT disminuyó la expresión de los genes responsivos a andrógenos en LNCaP y VCaP, surgió una pregunta enfocada sobre si dicho efecto era la consecuencia de la disminución de la actividad transcripcional del AR, o como tal de la expresión del mismo receptor.

Los reportes muestran que existe una regulación negativa por parte de los andrógenos sobre la expresión del *AR* (mRNA), aunque muchos de ellos son contradictorios. El tratamiento con concentraciondes crecientes de DHT disminuye la expresión del AR en células de CaP (Yeap *et al.,* 1999). Particularmente en VCaP, está reportado que ERG regula negativamente la expresión del AR, disminuyendo así su expresión cuando ERG es sobre-expresado (Yu *et al.,* 2010).

El tratamiento combinado SFRP1 + DHT no afectó la expresión del gen *AR* en LNCaP y en VCaP respecto al tratamiento con DHT (Figura 29a). Esto demuestra que el efecto observado por parte de SFRP1 está dado a nivel de la actividad transcripcional y no de la expresión del AR. En VCaP, el factor de transcripción ERG regula la expresión del *AR*, ya que la sobre-expresión de ERG disminuye la expresión del AR (YU *et al.,* 2010). Si el tratamiento SFRP1 + DHT disminuye la expresión de ERG, entonces se esperaría que la expresión del *AR* aumentara con dicho tratamiento. El tratamiento con DHT disminuyó la expresión del *AR* significativamente, y el tratamiento combindao SFRP1 + DHT provocó que el AR aumentara su expresión aunque no de manera significativa (Figura 29b).

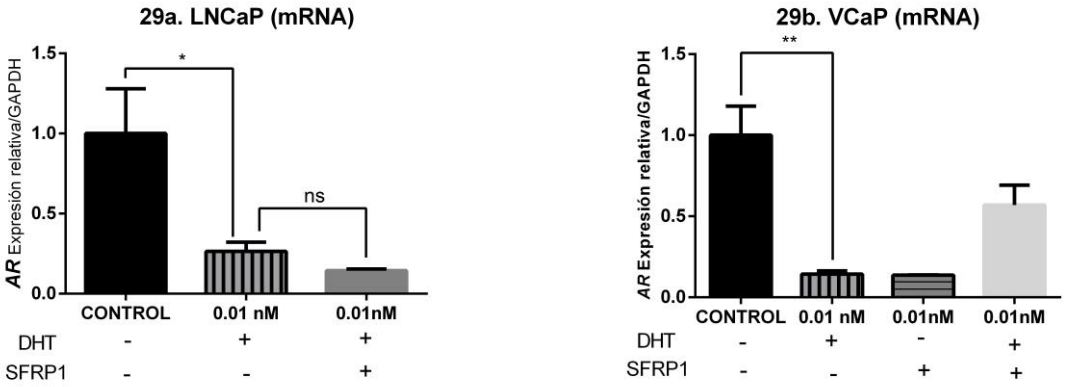


Figura 29. Expresión del *AR* en LNCaP y VCaP. Se graficó la expresión relativa/GAPDH del gen *AR* en cada tratamiento comparada con la expresión relativa/ GAPDH del control. Se midió la expresión del gen a las 24 horas del tratamiento. ANOVA, IC 95%, LNCaP *p ≤0.0344, VCaP **p ≤0.0087. Comparaciones múltiples con Holm-Sidak.

El efecto indirecto de SFRP1 + DHT sobre el AR está dado a nivel nuclear

Al determinar que el tratamiento combinado SFRP1 + DHT regula negativamente la actividad transcripcional del AR, surgió la pregunta de cuáles podrían ser los mecanismos involucrados en dicha regulación. El AR es un factor de transcripción que se encuentra en el citoplasma y al ser activado por el ligando DHT se transloca al núcleo para promover la transcripción de genes (Tan *et al.,* 2015). Si el tratamiento con SFRP1 + DHT disminuye la actividad transcripcional del AR, es posible que ese efecto sea porque se inhibe la translocación del receptor al núcleo (Powell *et al.,* 2006). Para contestar esta pregunta, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia que determinara la localización del AR en la célula después de los tratamientos (Figura 30).

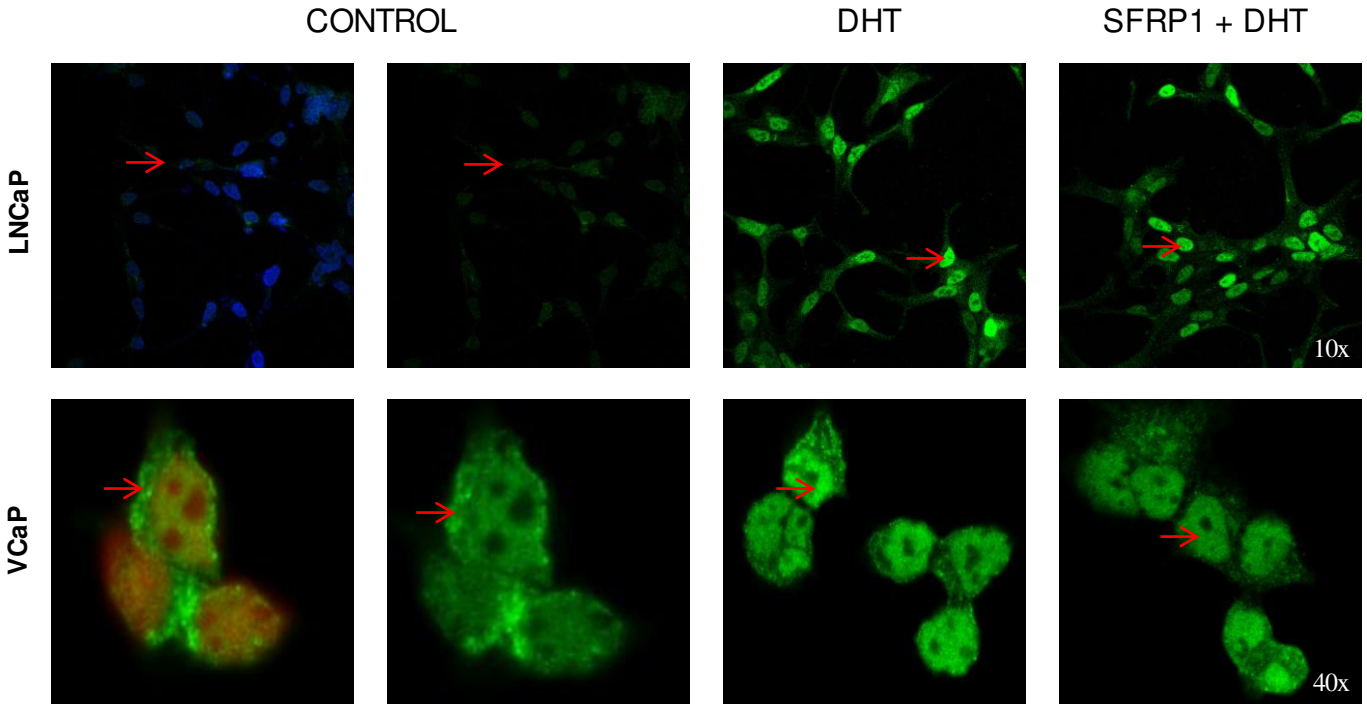


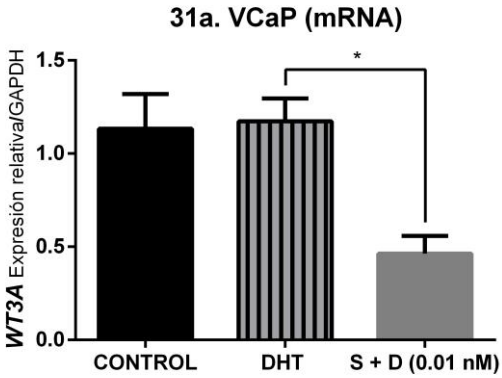
Figura 30. Localización del AR en LNCaP y VCaP. Se tomaron 3 fotografías por cada tratamiento en 3 campos diferentes. DAPI/AZUL/ROJO para los núcleos. Las flechas en rojo indican la ubicación del AR en cada condición. Las imágenes se analizaron en el software ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy.

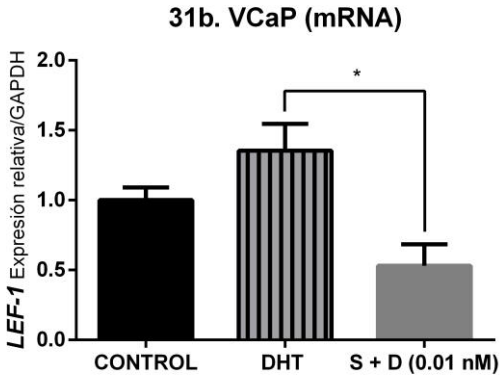
El AR se encuentra en mayor proporción en los núcleos de las células LNCaP y VCaP a pesar del tratamiento combinado SFRP1 + DHT. Esto sugiere que el efecto

negativo de SFRP1 sobre los genes responsivos a andrógenos, está dado indirectamente en el núcleo. En el núcleo celular existen mecanismos que regulan la actividad transcripcional, el AR puede ser co-regulado negativa o positivamente por proteínas coactivadoras o correpresores (Cheng *et al.,* 2012).

El efecto del tratamiento SFRP1 + DHT sobre ERG, disminuye la expresión de genes de la vía WNT

ERG es un factor de transcripción que regula positivamente a la vía de señalización WNT (Wu *et al.,* 2013). Promueve la expresión de genes como *Wnt3a, LEF-1* y *FZD4*, particularmente el receptor FZD4 es un regulador importante en el proceso EMT en VCaP (Gupta *et al.,* 2010). La expresión de los genes *Wnt3a, LEF-1* y *FZD4* disminuyó después de realizar el tratamiento con SFRP1 + DHT, por lo que el efecto de SFRP1 sobre ERG también afecta a la vía de señalización WNT en VCaP (Figura 31).





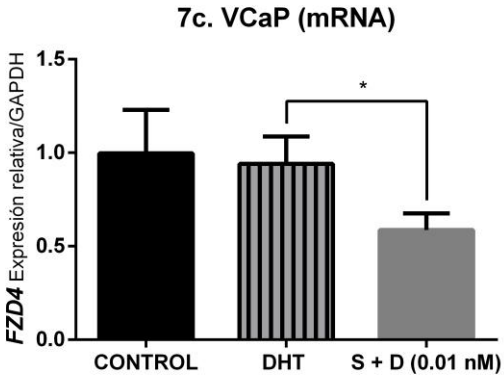


Figura 31. Expresión de los genes *WNT3ALK3, LEF-1* y *FZD4* en VCaP tratada con DHT y SFRP1 durante 24 horas. Se graficó la razón de cambio para cada tratamiento comparada con la expresión relativa/GAPDH del control. a) *WNT3A* *p ≤0.0220 b) *LEF-1* *p ≤0.0354 y c) *ERG* *p ≤0.0382. ANOVA, IC 95%. Comparaciones múltiples con la prueba de Dunnett.

WNT3a es una proteína importante de la vía de señalización WNT canónica, se ha mostrado que existe una asociación entre dicha molécula y el AR para promover la proliferación celular (Schweizer *et al.,* 2008). Por otro lado, la misma proteína y el factor de transcripción LEF-1 se sobre-expresan cuando ERG está presente; en ese mismo trabajo se demostró que dicha regulación depende de la actividad transcripcional de ERG (Wu *et al.,* 2013). Las implicaciones que tiene la vía WNT en CaP han sido descritas ampliamente, la activación aberrante de esta vía de señalización promueve el progreso de la enfermedad hacia un estado más avanzado (Yardi *et al.,* 2005). Por esta razón, los resultados obtenidos aquí son de relevancia ya que el tratamiento SFRP1 + DHT tiene un efecto negativo sobre la red oncogénica AR-ERG-WNT.

El tratamiento combinado SFRP1 + DHT disminuye las características neoplásicas de las células de CaP

Se ha reportado que la proteína SFRP1 es un posible supresor de tumor en diferentes tipos de cáncer incluyendo el CaP (Bovolenta *et al.,* 2008). En el presente trabajo se ha demostrado que el tratamiento con dicha proteína disminuye la actividad transcripcional del AR y la expresión del oncogen ERG en células de CaP. El siguiente objetivo del trabajo fue demostrar que el efecto de SFRP1 sobre los genes involucrados en la progresión del CaP, disminuye también las características neoplásicas de estas células.

SFRP1 tiene un efecto positivo sobre la viabilidad celular en células de CaP

La proteína SFRP1 se encuentra sub-expresada en CaP, el silenciamiento de SFRP1 está asociado con la activación de la vía WNT y el aumento de las características neoplásicas de las células de cáncer (Lodiying *et al.,* 2005). Dichas características involucran proliferación excesiva, migración, invasión y metástasis.

En el presente trabajo se ha demostrado que el tratamiento combinado de SFRP1 + DHT disminuye la actividad transcripcional del AR, esto disminuyó la expresión

del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*en las células VCaP. Se midió la viabilidad celular con dicho tratamiento en las células de CaP, pero previamente se estandarizó la técnica de MTT para estas células. En los ANEXOS (I, II y III) se muestran las diferentes condiciones que se probaron: número de células, tipo de medio de cultivo, y concentración de MTT y DMSO. Ya que las células de CaP son sensibles a la actividad androgénica del AR, en primer lugar se midió la respuesta de LNCaP y VCaP al tratamiento hormonal (Figura 32). En LNCaP el efecto de la hormona DHT se ve disminuido conforme aumenta la concentración (Figura 32a), este efecto se describe en la literatura científica como "crecimiento tipo campana" (bell-shapped growth, inglés) (Kassen *et al.,* 2000).

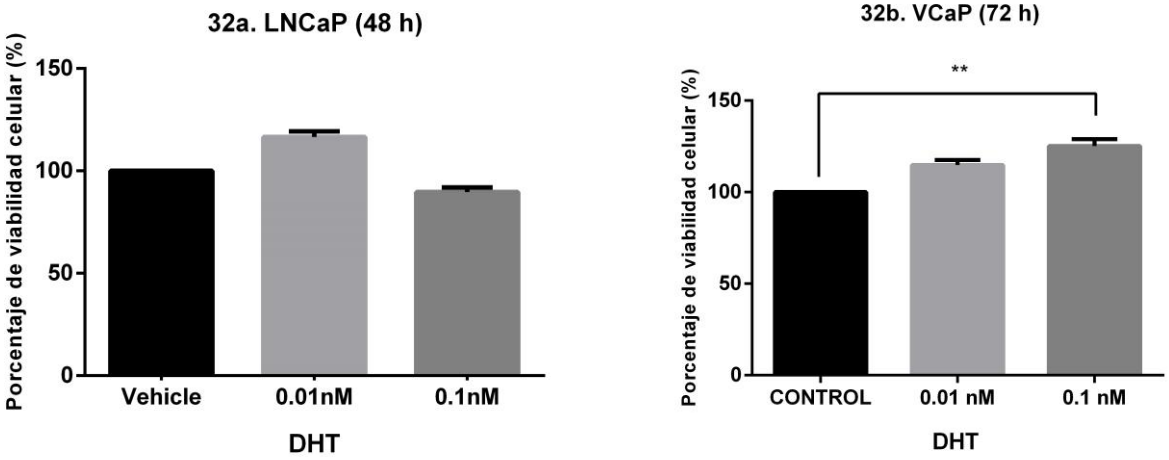


Figura 32. Viabilidad celular en LNCaP y VCaP tratadas con DHT. ANOVA, IC 95%, **p= ≤0.0023 en VCaP. Comparaciones múltiples con la prueba de Dunnett.

Kawano *et al*., (2009) reportaron que SFRP1 disminuye la formación de colonias en las células LNCaP y 22Rv1; en el presente trabajo se realizó el tratamiento con la proteína recombinante utilizando concentraciones crecientes de SFRP1 (0-1 nM) con resultados contradictorios. Interesantemente se observó un efecto positivo sobre la viabilidad celular a una concentración 0.01 nM de SFRP1 en LNCaP (figura 33a), dicho efecto fue muy similar en VCaP con una concentración de 0.1 nM (figura 33b).

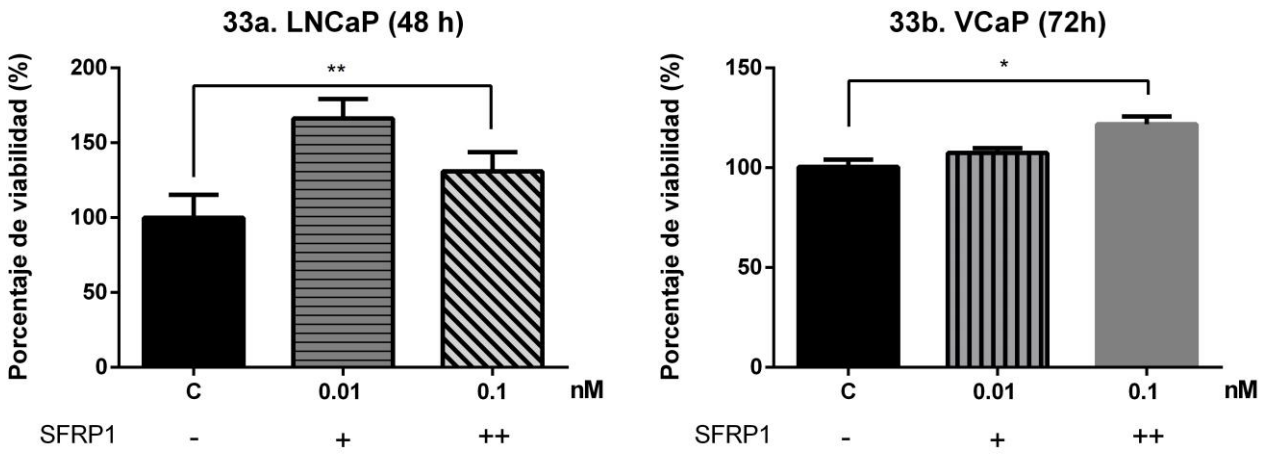


Figura 33. Viabilidad celular en LNCaP y VCaP tratadas con SFRP1. ANOVA, IC 95%, **p= 0.0061 en LNCaP y *p= 0.0420 en VCaP. Comparaciones múltiples con la prueba de Dunnett.

Resultó muy interesante observar que la proteína SFRP1 tiene un efecto positivo sobre la viabilidad celular en células de CaP, un resultado similar fue reportado por Joesting *et al.,* (2005) donde se presenta una comunicación estroma-epitelio mediante SFRP1.

SRFP1 disminuye la viabilidad celular en presencia de la hormona DHT

Ya que la combinación DHT + SFRP1 (0.01 nM) tuvo un efecto negativo sobre la actividad transcripcional del AR y la expresión de ERG; la pregunta fue si dicho tratamiento también afectaría la viabilidad celular. Al realizar este tratamiento, se observó que SFRP1 + DHT (0.01 nM) disminuye la viabilidad celular en LNCaP (Figura 34), lo que demuestra el papel de los andrógenos en el efecto que ejerce esta proteína. Cabe mencionar que resultó difícil obtener resultados de viabilidad en VCaP, debido a que el tratamiento con MTT afectó la adherencia de los cristales de formazan en dicha reacción. Sin embargo, más adelante se demuestra que el tratamiento SFRP1 + DHT induce apoptosis en estas células.

Las células normales de estroma prostático sobre-expresan la proteína SFRP1, dicha proteína es excretada al espacio extracelular donde ejerce un efecto de modulación autocrina y paracrina (Joesting *et al.,* 2005). Para demostrar aún más que el efecto observado previamente sobre la viabilidad celular está dado por la

proteína SFRP1 y la hormona DHT, se realizó un ensayo con medio condicionado proveniente de las células de estroma prostático PrSC. Se utilizaron diferentes porcentajes de este medio; y a una concentración del 25% (CM 25%) + DHT se observó una disminución significativa de la viabilidad celular en LNCaP (Figura 35). Este resultado demuestra que SFRP1 ejerce un efecto negativo sobre la viabilidad celular en CaP cuando está presente la hormona DHT. Además, abre la posibilidad de estudiar la participación que tiene el estroma normal sobre la progresión del CaP en células epiteliales tumorígenas.

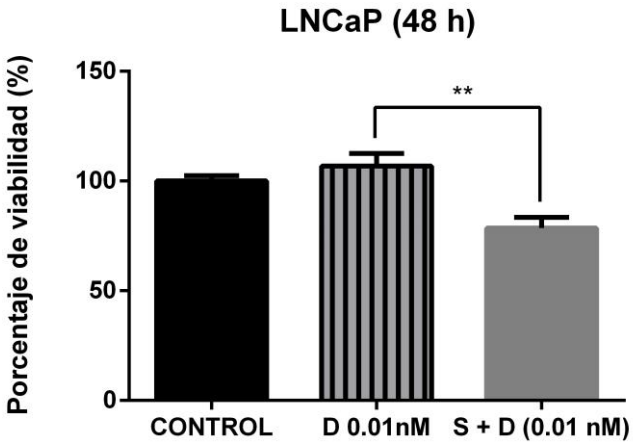


Figura 34. Viabilidad celular en LNCaP tratada con DHT + SFRP1. ANOVA, IC 95%, **p= 0.0011. Comparaciones múltiples con la prueba de Dunnett.

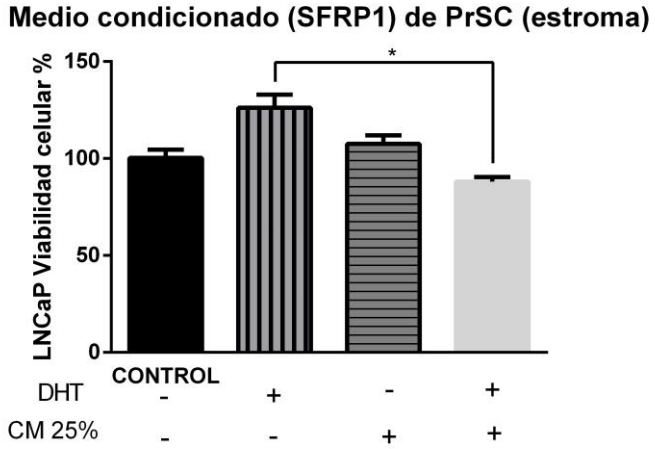


Figura 35. Efecto de la proteína SFRP1 de las células PrSC sobre la viabilidad celular en LNCaP. 48 horas del tratamiento con medio condicionado de las células PrSC. ANOVA, IC 95%, *p= 0.0463. Comparaciones múltiples con Dunnett. CM = conditionated médium, en inglés.

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que el efecto negativo que ejerce SFRP1 sobre células de CaP está regulado por concentraciones bajas de DHT. Para demostrar que el AR de las células de CaP tiene un papel importante en la acción de la proteína SFRP1, se realizó un ensayo de viabilidad celular en células PC3 con los mismos tratamientos utilizados hasta ahora. Se utilizaron estas células porque PC3 no expresa el AR a nivel de proteína (Figura 36a); se corroboró dicha información con un ensayo que midió la expresión de *AR* (mRNA) en estas células (Alimirah *et al.,* 2006). Con el tratamiento combinado SFRP1 + DHT se observa un aumento en la expresión de dicho gen aunque no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 36b).

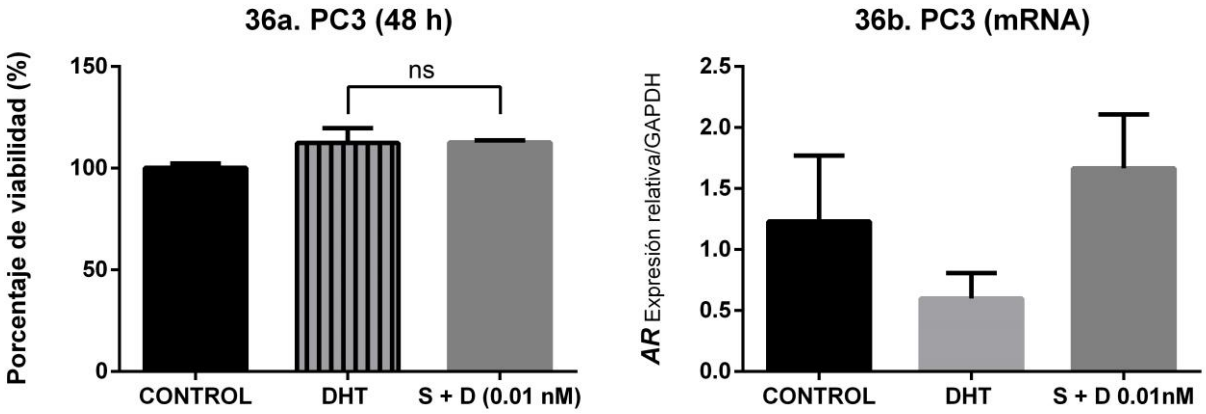


Figura 36. Viabilidad celular y expresión del AR en PC3. A) Viabilidad celular en PC3 a las 48 horas del tratamiento y B) expresión del gen *AR* a las 24 horas del tratamiento. ANOVA, IC 95%.

Está reportado que el tratamiento con DHT abate la expresión del AR en células de CaP, en este trabajo se demostró el mismo comportamiento en LNCaP y VCaP (Figura 29). Aunque no se observaron diferencias significativas sobre la viabilidad celular en PC3, el *AR* disminuye su expresión con la hormona DHT, y se expresa un poco más con el tratamiento combinado SFRP1 + DHT.

Es importante garantizar que cualquier tratamiento farmacológico es seguro y específico, para determinar que el tratamiento combinado SFRP1 + DHT es específico para células de CaP y que no afecta a células normales de próstata, se realizó un ensayo de viabilidad celular sobre las células de epitelio prostático

RWPE-1. En la figura 37 se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. Los tumores de CaP se forman con mayor frecuencia en el epitelio prostático, es aquí donde las células tumorales sufren una serie de transformaciones que las llevan a obtener características neoplásicas más agresivas (Taylor *et al.,* 2012). Tanto en CaP como en otros tipos de cáncer, se busca que los tratamientos sean dirigidos y que no afecten células normales, por esta razón es importante que la combinación SFRP1 + DHT no afecte células epiteliales (Denmeade e Isaacs, 2002). Otros enfoques que buscan una mayor especificidad farmacológica, han echado mano de estrategias moleculares modernas que utilizan aptámeros. Los aptámeros son pequeñas moleculas de ácidos nucleicos que enlazan específicamente a proteínas de la membrana de células cancerosas. Dichas moléculas pueden fusionarse con RNA's de interferencia para el silenciamiento específico de genes de interés, además presentan baja inmunogenicidad (Dassie *et al.,* 2014).

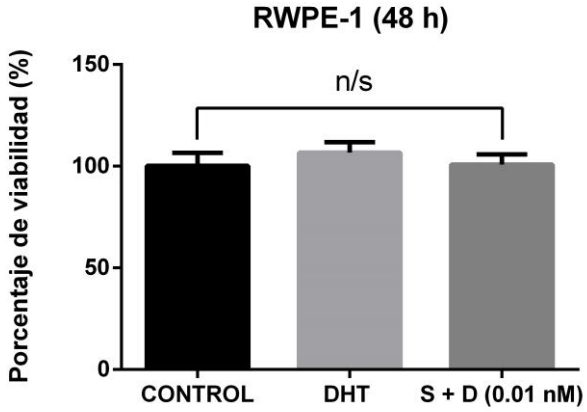


Figura 37. Viabilidad celular en células normales RWPE-1. Viabilidad celular en RWPE-1 a las 48 horas del tratamiento. ANOVA, IC 95%.

El tratamiento SFRP1 + DHT induce apoptosis en VCaP

Se ha demostrado que el tratamiento combinado de la proteína SFRP1 con la hormona DHT afecta la viabilidad de las células de CaP. Para conocer cuál podría ser el mecanismo involucrado en dicho efecto, se realizaron dos ensayos de cartometría de flujo en las células LNCaP y VCaP. En primer lugar se realizó un

ensayo de ciclo celular para determinar si el tratamiento combinado arresta el ciclo en alguna de sus fases. Kaur *et al.,* (2012) reportaron que SFRP1 puede arrestar el ciclo celular en la fase G_1, en el presente trabajo no se observaron diferencias entre los tratamientos para ninguna de las dos líneas celulares (Figura 38 y ANEXO IV). Es posible que el tratamiento combinado SFRP1 + DHT si detenga el ciclo celular en la fase G_1, pero se necesita un control positivo con el que no se contaba en el momento que se realizó el ensayo. Estudios posteriores utilizando dicho control (nocodazol) permitirán determinar con exactitud si el tratamiento SFRP1 + DHT detiene el ciclo celular en la fase G_1 en LNCaP y VCaP.

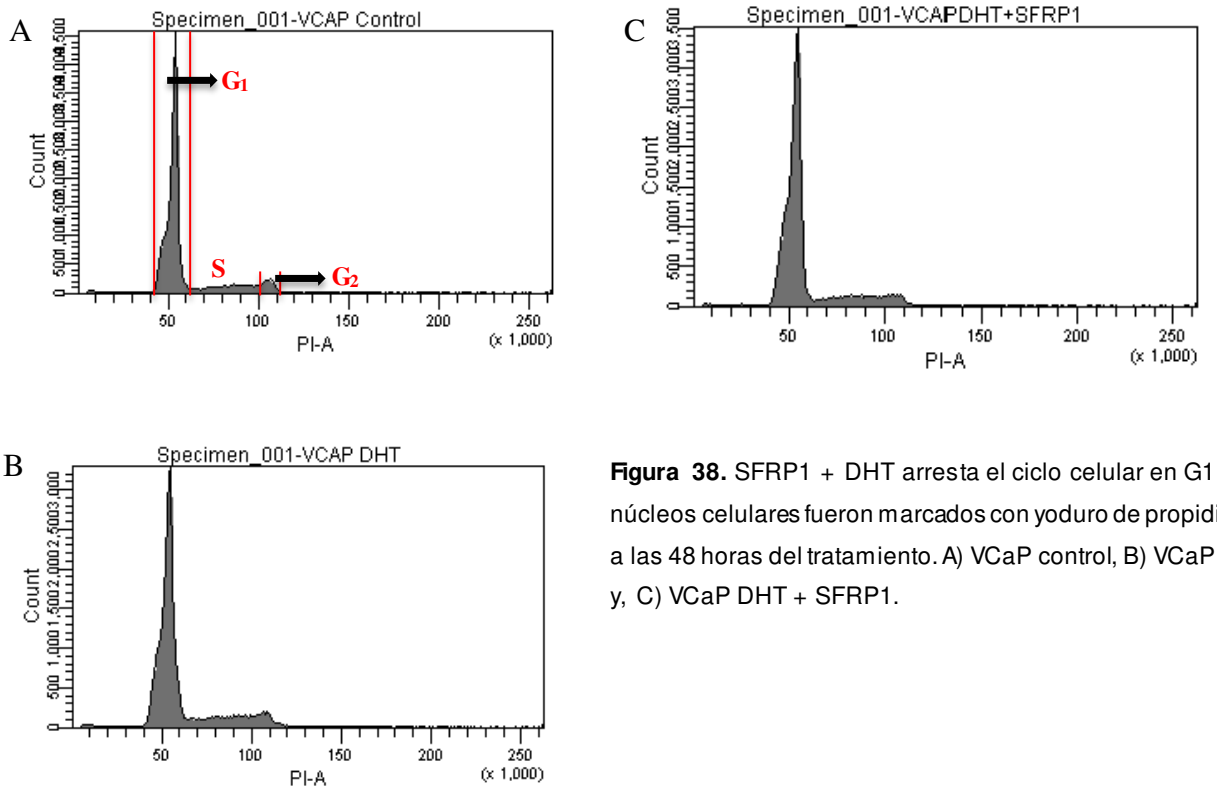


Figura 38. SFRP1 + DHT arresta el ciclo celular en G1. Los núcleos celulares fueron marcados con yoduro de propidio (PI) a las 48 horas del tratamiento. A) VCaP control, B) VCaP DHT y, C) VCaP DHT + SFRP1.

Un trabajo realizado por Hirata *et al.,* (2014) mostró que SFRP1 desregula la expresión del *miR-1260b,* lo que provoca que comience a sobre-expresarse SFRP1; dicha regulación afectó el ciclo celular en LNCaP.

A la par del ensayo de ciclo celular, se realizó un ensayo con ANEXINA V/FITC para determinar si la disminución en la viabilidad celular y la disminución en la expresión de ERG observada en LNCaP y VCaP respectivamente, estaba dada por algún mecanismo relacionado con la apoptosis. En LNCaP no se encontraron diferencias entre los tratamientos, sin embargo en la línea celular VCaP que alberga la fusión TMPRSS2-ERG, se observó un aumento en la población de células apoptóticas con el tratamiento combinado SFRP1 + DHT (Figura 39). Gauger y Schneider reportaron un resultado similar para SFRP1 en cáncer de mama, en dicho trabajo se demostró que la regulación negativa de dicha proteína induce apoptosis en células cancerígenas epiteliales, y que el efecto está mediado por p53.

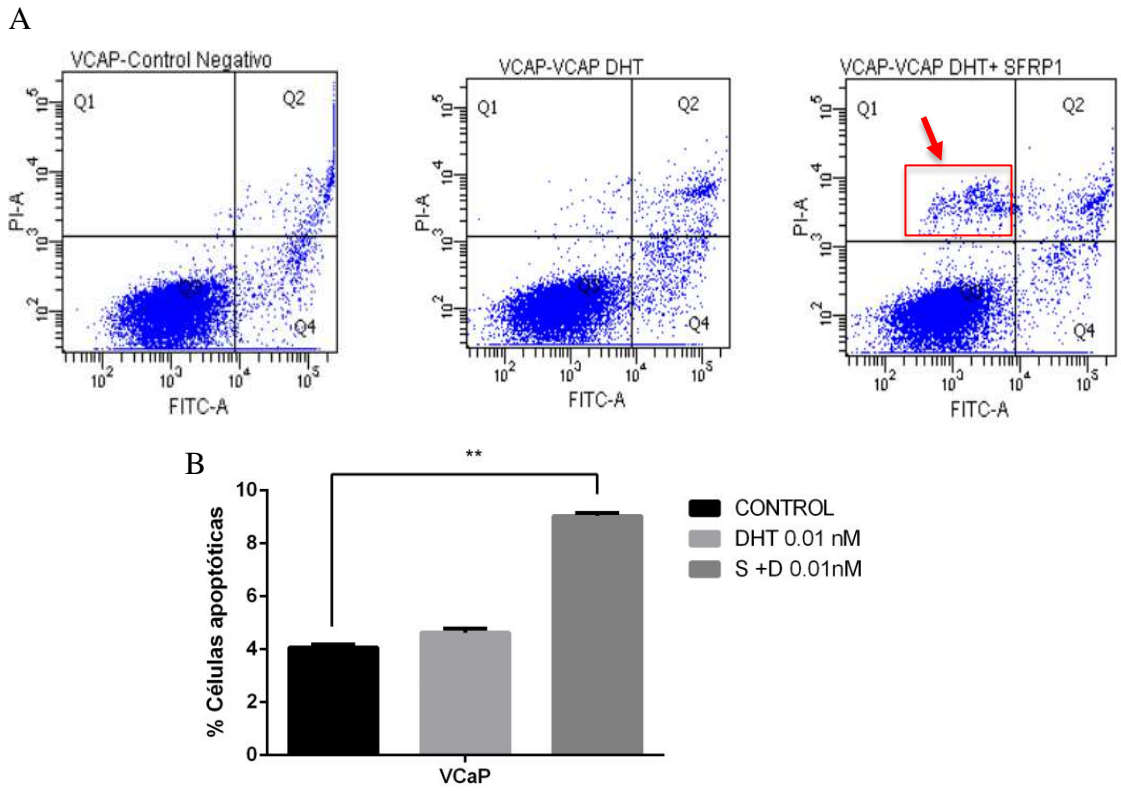


Figura 39. SFRP1 + DHT induce apoptosis. A. Las células fueron marcadas con ANEXINA V/FITC e IP a las 48 horas del tratamiento. B. Porcentaje de células apoptóticas: CONTROL = 4,0%, DHT = 4,6% y, SFRP1 + DHT = 9.1%.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se planteó la hipótesis de que el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* podría ser regulado indirectamente por el tratamiento con la proteína SFRP1 en células de CaP. Esto se fundamentó en los reportes previos que demostraron que dicha proteína puede disminuir la actividad transcripcional del AR. Ya que el gen de fusión responde a la actividad transcripcional del AR, se realizaron tratamientos con SFRP1 para evaluar la expresión de dicho gen. Interesantemente, se observó que sólo el tratamiento combinado SFRP1 + DHT tiene un efecto negativo sobre la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y sobre la viabilidad celular. Con estos resultados, surgió la pregunta de si dicho efecto de SFRP1 sobre el AR estaba dado a nivel citoplasmático o a nivel nuclear. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia contra el AR para determinar su localización celular después del tratamiento combinado SFRP1 + DHT y se observó que se encuentra en mayor proporción en el núcleo tanto en LNCaP y VCaP. Esto quiere decir que el efecto de SFRP1 observado sobre la actividad transcripcional del AR está dado de manera indirecta en el núcleo celular.

Por otro lado, se demostró que el tratamiento combinado SFRP1 + DHT no sólo disminuye la expresión de *ERG* (mRNA), sino también la expresión de los genes de la vía WNT: *WNT3A, FZD4* y *LEF-1*. Está reportado que ERG regula positivamente la expresión de genes de la vía de señalización WNT en CaP (Wu *et al.,* 2013), dichos genes promueven la progresión del CaP hacia un estado más avanzado donde se ven aumentadas las características neoplásicas de proliferación, invasión y metastásis (Gupta *et al.,* 2010).

Se demostró que el tratamiento SFRP1 + DHT ejerce un efecto negativo sobre genes relacionados con la progresión del CaP; y se evaluó si dicho tratamiento disminuye las características neoplásicas de estas células. Se observó que este tratamiento disminuye la viabilidad celular en las células LNCaP. Aunque el mecanismo por el cual SFRP1 logra este efecto no está claro todavía, es posible que detenga el ciclo celular en la fase G_1. En VCaP, se observó que SFRP1 + DHT

aumenta la población de células apoptóticas, lo que refuerza la hipótesis de su acción como proteína supresora de tumor en CaP; y en este caso en células que albergan la fusión TMPRSS2-ERG.

Es importante mencionar que las células de los tumores de CaP continúan siendo sensibles a la actividad androgénica aún después de la recurrencia. Se sabe que las terapias que utilizan fármacos antagonistas de la vía del AR no son efectivas al paso del tiempo. El hecho de que SFRP1 presente actividad antineoplásica en combinación con la hormona DHT, abre la posibilidad de establecer un tratamiento terapéutico que aproveche los niveles remanentes de andrógenos en el organismo de los pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración.

La comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la asociación entre la vía de señalización WNT y el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, permitirá desarrollar a futuro terapias farmacológicas específicas y eficaces para el tratamiento del CaP.

REFERENCIAS

1. Adams J.M. and Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. Oncogene 26, 1324–1337.
2. Akita K, Harada K, Ichihara J, Takata N, Takahashi Y, Saito K. 2013. A novel selective androgen receptor modulator, NEP28, is efficacious in muscle and brain without serious side effects on prostate. Eur J Pharmacol 720, 107-14.
3. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. 2006. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. FEBS Lett 580, 2294-300.
4. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. 2001. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. Nat Cell Biol 3, 683-6.
5. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, Sboner A, Esgueva R, Pflueger D, Sougnez C, Onofrio R, Carter SL, Park K, Habegger L, Ambrogio L, Fennell T, Parkin M, Saksena G, Voet D, Ramos AH, Pugh TJ, Wilkinson J, Fisher S, Winckler W, Mahan S, Ardlie K, Baldwin J, Simons JW, Kitabayashi N, MacDonald TY, Kantoff PW, Chin L, Gabriel SB, Gerstein MB, Golub TR, Meyerson M, Tewari A, Lander ES, Getz G, Rubin MA, Garraway LA. 2011. The genomic complexity of primary human prostate cancer. Nature 470, 214-20.
6. Berx G and van Roy F. 2009. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 1, a003129.
7. Bill-Axelson A, Holmberg L, Garmo H, Rider JR, Taari K, Busch C, Nordling S, Häggman M, Andersson SO, Spångberg A, Andrén O, Palmgren J, Steineck G, Adami HO, Johansson JE. 2014. Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. N Engl J Med 370, 932-42.
8. Binnerts ME, Kim KA, Bright JM, Patel SM, Tran K, Zhou M, Leung JM, Liu Y, Lomas WE, Dixon M 3rd, et al. 2007. R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 14700-5.
9. Birdsey GM1, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F, Sahnan K, Haskard DO, Dejana E, Mason JC, Randi AM. 2008. Transcription factor ERG regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. Blood111, 3498–3506.
10. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. J Cell Sci 121, 737-46.
11. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB. 1999. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. Cancer Res 59, 5975–5979.
12. Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, Arora VK, Le C, Koutcher J, Scher H, Scardino PT, Rosen N, Sawyers CL. 2011. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. Cancer Cell 19, 575–586.
13. Carver BS, Tran J, Chen Z, Carracedo-Perez A, Alimonti A, Nardella C, Gopalan A, Scardino PT, Cordon-Cardo C, Gerald W, Pandolfi PP. 2009. ETS rearrangements and prostate cancer initiation. Nature 457 (7231):E1; discussion E2-3.
14. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, and Moses, H.L. 2008. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. Mol Cancer Res 6, 1521–1533.
15. Cheng S, Brzostek S, Lee SR, Hollenberg AN, Balk SP. 2002. Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. Mol Endocrinol 16, 1492-501.
16. Ciani L and Salinas PC. 2007. c-Jun N-terminal kinase (JNK) cooperates with Gsk3beta to regulate Dishevelled-mediated microtubule stability. BMC Cell Biol 3, 27.
17. Clark J, Merson S, Jhavar S, Flohr P, Edwards S, Foster CS, Eeles R, Martin FL, Phillips DH, Crundwell M, Christmas T, Thompson A, Fisher C, Kovacs G, Cooper CS. 2007. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. Oncogene 26, 2667-73.
18. Claus G Roehrborn, MD, FACS. (2005). Benign Prostatic Hyperplasia: An Overview. Rev Urol 7(Suppl 9): S3–S14.
19. Crawford ED, MD. 2004. Hormonal Therapy in Prostate Cancer: Historical Approaches. Rev Urol 6, S3–S11.
20. Cruciat CM and Niehrs C. 2013. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. Cold Spring Harb Perspect Biol 5(3):a015081.
21. Danila DC, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, Lilja H, Schwartz L, Larson S, Fleisher M, Scher HI. 2007. Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. Clin Cancer Res 13, 7053–7058.
22. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeney LA, Aalders TW, Swinkels DW, Schalken JA. 2002. DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. Cancer Res 62, 2695–2698.
23. Denmeade SR Y Isaacs JT. 2002. A history of prostate cancer treatment. Nat Rev Cancer 2, 389–396.
24. Denmeade SR, Isaacs JT. 2002. A history of prostate cancer treatment. A history of prostate cancer treatment. Nat Rev Cancer 2, 389-96.
25. Dong Y, Zhang H, Gao AC, Marshall JR, Ip C. 2005. Androgen receptor signaling intensity is a key factor in determining the sensitivity of prostate cancer cells to selenium inhibition of growth and cancer-specific biomarkers. Mol Cancer Ther 4, 1047-55.
26. Drake CG and Antonarakis ES. 2012. Current status of immunological approaches for the treatment of prostate cancer. Curr Opin Urol 22, 197-202.

27. Ferrara N. 2010. Pathw ays mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. Cytokine Grow th Factor Rev 21, 21–26.
28. Frank Steven A. 2007. Dynamics of cancer. Princeton University Press. USA.
29. Frick J and Aulitzky W. (1991). Physiology of the prostate. Infection 3:S115-8.
30. Gauger KJ y Schneider SS. 2014. Tumour supressor secreted frizzled related protein 1 regulates p53-mediated apoptosis. Cell Biol Int 38, 124-30.
31. Gleason DF. 1977. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Urologic pathology. The prostate. Tannenbaum M. (ed). Lea and Felbiger. Philadelphia 171-198.
32. Gnanapragasam VJ, Robson CN, Neal DE, Leung HY. 2002. Regulation of FGF8 expression by the androgen receptor in human prostate cancer. Oncogene 21, 5069-80.
33. Gómez-Orte E, Sáenz-Narciso B, Moreno S, Cabello J. 2013. Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. Trends Genet 29, 545-53.
34. Gupta S, Iljin K, Sara H, Mpindi JP, Mirtti T, Vainio P, Rantala J, Alanen K, Nees M, Kallioniemi O. 2010. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. Cancer Res 70, 6735-45.
35. Hammerich, Kai H., Ayala Gustavo E., and Wheeler Thomas M. (2009). Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. Cambridge University Press.
36. Hanahan D and Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646-74.
37. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrow s point the w ay. Development 131, 1663–1677.
38. Helpap B and Egevad L. 2009. Modified Gleason grading. An updated review . Histol Histopathol 24, 661-6.
39. Hessels D and Schalken JA. 2013. Recurrent gene fusions in prostate cancer: their clinical implications and uses. Curr Urol Rep 14, 214-22.
40. Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA. 2007. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. Clin Cancer Res 13, 5103–5108.
41. Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Dahiya R1. 2014. Genistein dow nregulates onco-miR-1260b and upregulates sFRP1 and Smad4 via demethylation and histone modification in prostate cancer cells. Br J Cancer 110, 1645-54.
42. Hirata H, Hinoda Y, Shahryari V, Deng G, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Dahiya R. 2014. Genistein dow nregulates onco-miR-1260b and upregulates sFRP1 and Smad4 via demethylation and histone modification in prostate cancer cells. Br J Cancer 110, 1645-54.
43. Holmberg L, Van Hemelrijck M. 2014. The biology and natural history of prostate cancer: a short introduction. Recent Results Cancer Res 202, 1-7.
44. Hsieh TY, Ng CY, Mallouh C, Tazaki H, Wu JM. 1996. Regulation of grow th, PSA/PAP and androgen receptor expression by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in the androgen-dependent LNCaP cells. Biochem Biophys Res Commun 223, 141-6.
45. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). 2015. Fuente electrónica: http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata.
46. Jin Y, Qu S, Tesikova M, Wang L, Kristian A, Mælandsmo GM, Kong H, Zhang T, Jerónimo C, Teixeira MR, Yuca E, Tekedereli I, Gorgulu K, Alpay N, Sood AK, Lopez-Berestein G, Danielsen HE, Ozpolat B, Saatcioglu F. 2013. Molecular circuit involving KLK4 integrates androgen and mTOR signaling in prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 110(28):E2572-81.
47. Joesting MS, Perrin S, Elenbaas B, Faw ell SE, Rubin JS, Franco OE, Hayw ard SW, Cunha GR, Marker PC. 2005. Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. Cancer Res 65, 10423-30.
48. Kaarbø M, Klokk TI, Saatcioglu F. 2007. Androgen signaling and its interactions w ith other signaling pathw ays in prostate cancer. Bioessays 29, 1227-38.
49. Kahn B, Collazo J, Kyprianou N. 2014. Androgen receptor as a driver of therapeutic resistance in advanced prostate cancer. Int J Biol Sci 10, 588-95.
50. Kassen AE, Sensibar JA, Sintich SM, Pruden SJ, Kozlow ski JM, Lee C. 2000. Autocrine effect of DHT on FGF signaling and cell proliferation in LNCaP cells: role of heparin/heparan-degrading enzymes. Prostate 44, 124-32.
51. Kaur P, Mani S, Cros MP, Scoazec JY, Chemin I, Hainaut P, Herceg Z. 2012. Epigenetic silencing of sFRP1 activates the canonical Wnt pathw ay and contributes to increased cell grow th and proliferation in hepatocellular carcinoma. Tumour Biol 33, 325-36.
52. Kaw ano Y and Kypta R. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathw ay. J Cell Sci 116, 2627-34.
53. Kaw ano Y, Diez S, Uysal-Onganer P, Darrington RS, Waxman J, Kypta RM. 2009. Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. Br J Cancer 100, 1165-74.
54. Kikuchi A. 2000. Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathw ay. Biochem Biophys Res Commun 268, 243-8.
55. Kim YC, Chen C, Bolton EC. 2015. Androgen Receptor-Mediated Grow th Suppression of HPr-1AR and PC3-Lenti-AR Prostate Epithelial Cells. PLoS One 10(9):e0138286.
56. Kojima S, Mulholland DJ, Ettinger S, Fazli L, Nelson CC, Gleave ME. 2006. Differential regulation of IGFBP-3 by the androgen receptor in the lineage-related androgen-dependent LNCaP and androgen-independent C4-2 prostate cancer models. Prostate 66, 971-86.

57. Komiya and Habas. 2008. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis 4, 68–75.
58. Korenchuk S, Lehr JE, MClean L, Lee YG, Whitney S, Vessella R, Lin DL, Pienta KJ. 2001. VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. In Vivo 15, 163-8.
59. Korkmaz CG, Korkmaz KS, Kurys P, Elbi C, Wang L, Klokk TI, Hammarstrom C, Troen G, Svindland A, Hager GL, Saatcioglu F. 2005. Molecular cloning and characterization of STAMP2, an androgen-regulated six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer. Oncogene 24, 4934-45.
60. Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. 2000. The Wnt/Ca2_ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. Trends Genet 16, 279–283.
61. Lai J, Kedda MA, Hinze K, Smith RL, Yaxley J, Spurdle AB, Morris CP, Harris J, Clements JA. 2007. PSA/KLK3 AREI promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility. Carcinogenesis 28, 1032-9.
62. Lavergne E, Hendaoui I, Coulouarn C, Ribault C, Leseur J, Eliat PA, Mebarki S, Corlu A, Clément B, Musso O. 2011. Blocking Wnt signaling by SFRP-like molecules inhibits in vivo cell proliferation and tumor growth in cells carrying active β-catenin. Oncogene 30, 423-33.
63. Leshem O, Madar S, Kogan-Sakin I, Kamer I, Goldstein I, Brosh R, Cohen Y, Jacob-Hirsch J, Ehrlich M, Ben-Sasson S, Goldfinger N, Loewenthal R, Gazit E, Rotter V, Berger R. 2011. TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model. PLoS One 6(7):e21650.
64. Levina E, Ji H, Chen M, Baig M, Oliver M, Ohouo P, Lim C, Schools G, Carmack S, Ding Y, Broude V,[1] Roninson I, Buttyan R, Shtutman M. 2015. Identification of novel genes that regulate androgen receptor signaling and growth of androgen-deprived prostate cancer cells. Oncotarget 6, 13088–13104.
65. Li Y, Kong D, Wang Z, Ahmad A, Bao B, Padhye S, Sarkar FH. 2011. Inactivation of AR/TMPRSS2-ERG/Wnt signaling networks attenuates the aggressive behavior of prostate cancer cells. Cancer Prev Res (Phila) 4, 1495-506.
66. Liao X, Thrasher JB, Pelling J, Holzbeierlein J, Sang QX, Li B. 2003. Androgen stimulates matrix metalloproteinase-2 expression in human prostate cancer. Endocrinology 144, 1656-63.
67. Lindqvist M, Horn Z, Bryja V, Schulte G, Papachristou P, Ajima R, Dyberg C, Arenas E, Yamaguchi TP, Lagercrantz H, Ringstedt T. 2010. Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions. J Cell Sci 123, 472-83.
68. Link RE and Morton RA. 2001. Indications for pelvic lymphadenectomy in prostate cancer. Urol Clin North Am 28, 491-8.
69. Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25, 402-8.
70. Loberg RD, St John LN, Day LL, Neeley CK, Pienta KJ. 2006. Urol Oncol 24, 161-8.
71. Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J, Hermeking H. 2005. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. Cancer Res 65, 4218-27.
72. Loeb S and Catalona WJ. (2007). Prostate-specific antigen in clinical practice. Cancer Lett 28, 30-9.
73. Luo W and Lin SC. 2004. Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. Neurosignals 13, 99-113.
74. MacDonald BT, Keiko Tamai, and Xi He. 2009. Wnt/β-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev Cell 17, 9–26.
75. MacDonald BT, Tamai K, He X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev Cell 17, 9-26.
76. McGarty P. (2014). Erg, Tmprss2 and Prostate Cancer. Draft White paper 110.
77. Martini, F. H., Timmons, M. J., and Tallitsch, R. B. (2012). Human Anatomy. (7th Edition). San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
78. Mayor R and Theveneau E. 2014. The role of the non-canonical Wnt-planar cell polarity pathway in neural crest migration. Biochem J 457, 19-26.
79. McCourt C, Maxwell P, Mazzucchelli R, Montironi R, Scarpelli M, Salto-Tellez M, O'Sullivan JM, Longley DB, Waugh DJ. 2012. Elevation of c-FLIP in castrate-resistant prostate cancer antagonizes therapeutic response to androgen receptor-targeted therapy. Clin Cancer Res 18, 3822-33.
80. McVary Kevin T, MD, FACS. 2003. Clinical Evaluation of Benign Prostatic Hyperplasia. Rev Urol 5(Suppl 4): S3–S11.
81. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR. 1997. SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 13636-41.
82. Micalizzi DS, Farabaugh SM, and Ford HL. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia 15, 117–134.
83. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 2007. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. Nat Rev Cancer 7, 233-45.
84. Mitra R and Goodman OB Jr. 2015. CYP3A5 regulates prostate cancer cell growth by facilitating nuclear translocation of AR. Prostate 75, 527-38.
85. Moreau JP, Delavault P, Blumberg J. 2006. Luteinizing hormone-releasing hormone agonists in the treatment of prostate cancer: a review of their discovery, development, and place in therapy. Clin Ther 28, 1485-508.
86. Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65, 55-63.
87. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). 2014. Prostate cancer: diagnosis and treatment. USA.
88. Nelles JL, Hu WY, Prins GS. 2011. Estrogen action and prostate cancer Expert Rev Endocrinol Metab 6, 437–451.
89. Ni L, Yang CS, Gioeli D, Frierson H, Toft DO, Paschal BM. 2010. FKBP51 promotes assembly of the Hsp90 chaperone complex and regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. Mol Cell Biol 30,1243-53.

90. Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, Widmark A. 2009. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. Br J Cancer 100, 1603–1607.
91. Noriyuki Kinoshita, Hidekazu Iioka, Akira Miyakoshi, Naoto Ueno. 2003. PKCδ is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates Xenopus convergent extension movements. Genes Dev 17, 1663–1676.
92. Nusse R and Varmus H. 2012. Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. EMBO J 31, 2670-84.
93. Nusse R and Varmus HE. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell 31, 99-109.
94. Peck Yean Tan,a Cheng Wei Chang,a,b Kern Rei Chng,a K. D. Senali Abayratna Wansa,a Wing-Kin Sung,b,c and Edwin. 2012. Integration of Regulatory Networks by NKX3-1 Promotes Androgen-Dependent Prostate Cancer Survival. Mol Cell Biol 32, 399–414.
95. Petrow V. 1986. The dihydrotestosterone (DHT) hypothesis of prostate cancer and its therapeutic implications. Prostate 9, 343-61.
96. Pienta KJ and Smith DC. 2005. Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins. CA Cancer J Clin 55, 300-18.
97. Powell SM, Brooke GN, Whitaker HC, Reebye V, Gamble SC, Chotai D, Dart DA, Belandia B, Bevan CL. 2006. Mechanisms of androgen receptor repression in prostate cancer. Biochem Soc Trans 34, 1124-7.
98. Prensner JR, Chinnaiyan AM. 2009. Oncogenic gene fusions in epithelial carcinomas. Curr Opin Genet Dev 19, 82–91.
99. Prensner JR, Rubin MA, Wei JT, Chinnaiyan AM. 2012. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. Sci Transl Med 4(127):127rv3.
100. Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E, Fonseca I, Sureban SM, Houchen CW, Reis A, Queimado L. 2014. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. Cell Death Dis 5:e1246.
101. Rao VN, Papas TS, Reddy ES. 1987. Erg, a human ets-related gene on chromosome 21: alternative splicing, polyadenylation, and translation. Science 237, 635-9.
102. Ricci F, Buzzatti G, Rubagotti A, Boccardo F. 2014. Safety of antiandrogen therapy for treating prostate cancer. Expert Opin Drug Saf 13, 1483-99.
103. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, Pienta KJ, Ghosh D, Chinnaiyan AM. 2002. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. JAMA 287, 1662–1670.
104. Schweizer L, Rizzo C,1 Spires T, Platero SJ, Wu Q, Lin T, Gottardis MM, Attar RM. 2008. The androgen receptor can signal through Wnt/β-Catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens. BMC Cell Biol 9: 4.
105. Shier, D., Butler, J., and Lewis, R. (1998). Hole's Essentials of Human Anatomy and Physiology. (6th Edition). Boston: WCB McGraw-Hill.
106. Shore P, Whitmarsh AJ, Bhaskaran R, Davis RJ, Waltho JP, Sharrocks AD. 1996. Determinants of DNA-binding specificity of ETS-domain transcription factors. Mol Cell Biol. 1996 Jul; 16(7): 3338–3349.
107. Smith RD and Patel A. 2011. Transurethral resection of the prostate revisited and updated. Curr Opin Urol 21, 36-41.
108. Squire JA. 2009. TMPRSS2-ERG and PTEN loss in prostate cancer. Nat Genet 41, 509-10.
109. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. 1987. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. N Engl J Med 8, 909-16.
110. Surana R, Sikka S, Cai W, Shin EM, Warrier SR, Tan HJ, Arfuso F, Fox SA, Dharmarajan AM, Kumar AP. 2014. Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. Biochim Biophys Acta 1845, 53-65.
111. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER). 2015. Fuente electrónica: http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html.
112. Taghiyev AF, Rokhlin OW, Glover RB. 2011. Caspase-2-Based Regulation of the Androgen Receptor and Cell Cycle in the Prostate Cancer Cell Line LNCaP. Genes Cancer 2, 745-52.
113. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. 2015. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. Acta Pharmacol Sin 36, 3-23.
114. Tauriello DV, Jordens I, Kirchner K, Slootstra JW, Kruitwagen T, Bouwman BA et al. 2012. Wnt/beta-catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 812-820.
115. Taylor RA, Toivanen R, Frydenberg M, Pedersen J, Harewood L, Australian Prostate Cancer Bioresource, Collins AT, Maitland NJ, Risbridger GP. 2012. Human epithelial basal cells are cells of origin of prostate cancer, independent of CD133 status. Stem Cells 30, 1087-96.
116. Thorpe A, Neal D. 2003. Benign prostatic hyperplasia. Lancet 19, 1359-67.
117. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science 310, 644-8.
118. Uren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, Cumberledge S, Rubin JS. 2000. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. J Biol Chem 275, 4374-82.

119. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. 2003. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. Dev Cell 5, 367-77.
120. Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. 1992. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. J Steroid Biochem Mol Biol 41, 665-9.
121. Visvanathan K, Helzlsouer KJ, Boorman DW, Strickland PT, Hoffman SC, Comstock GW, O'Brien TG, Guo Y. 2004. Association among an ornithine decarboxylase polymorphism, androgen receptor gene (CAG) repeat length and prostate cancer risk. J Urol 171, 652-5.
122. Wei GH, Badis G, Berger MF, Kivioja T, Palin K, Enge M, Bonke M, Jolma A, Varjosalo M, Gehrke AR, Yan J, Talukder S, Turunen M, Taipale M, Stunnenberg HG, Ukkonen E, Hughes TR, Bulyk ML, Taipalea J. 2008. Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. EMBO J 29, 2147–2160.
123. Willert K and Nusse R. 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. Curr Opin Genet Dev 8, 95-102.
124. Wu D and Pan W. 2010. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. Trends Biochem Sci 35, 161–168.
125. Wu L, Zhao JC, Kim J, Jin HJ, Wang CY, Yu J. 2013. ERG is a critical regulator of Wnt/LEF1 signaling in prostate cancer. Cancer Res 73, 6068-79.
126. Xing Y, Clements WK, Kimelman D, Xu W. 2003. Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the betacatenin destruction complex. Genes Dev 17, 2753-2764.
127. Yardy GW y Brewster SF. 2005. Wnt signalling and prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis 8, 119-26.
128. Ye F, McCoy SC, Ross HH, Bernardo JA, Beharry AW, Senf SM, Judge AR, Beck DT, Conover CF, Cannady DF, Smith BK, Yarrow JF, Borst SE. 2014. Transcriptional regulation of myotrophic actions by testosterone and trenbolone on androgen-responsive muscle. Steroids 87, 59-66.
129. Yeap BB, Krueger RG, Leedman PJ. 1999. Differential posttranscriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells. Endocrinology 140, 3282-91.
130. Yu J, Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, Wang X, Wu L, Li J, Hu M, Gong Y, Cheng H, Laxman B, Vellaichamy A, Shankar S, Li Y, Dhanasekaran SM, Morey R, Barrette T, Lonigro RJ, Tomlins SA, Varambally S, Qin ZS, Chinnaiyan AM. 2010. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. Cancer Cell 17, 443-54.
131. Zheng L, Sun D, Fan W, Zhang Z, Li Q, Jiang T. 2015. Diagnostic value of SFRP1 as a favorable predictive and prognostic biomarker in patients with prostate cancer. PLoS One 10(2):e0118276.
132. Zhu S, Liu L, Korzh V, Gong Z, Low BC. 2006. RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. Cell Signal 18, 359-72.

ANEXOS

ANEXO I.

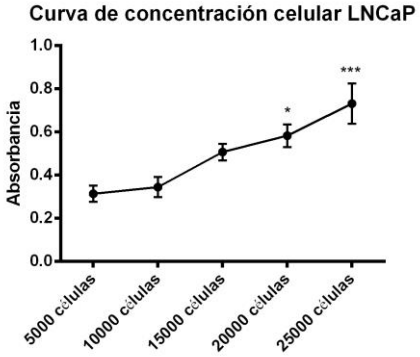


Figura suplementaria 1. Concentración celular con MTT. Se sembraron diferentes concentraciones de células LNCaP por sextuplicado en placas de 96 pozos. A las 24 horas se midió la viabilidad celular con la técnica de MTT. ANOVA, IC 95%. Comparaciones múltiples con Tukey.

ANEXO II.

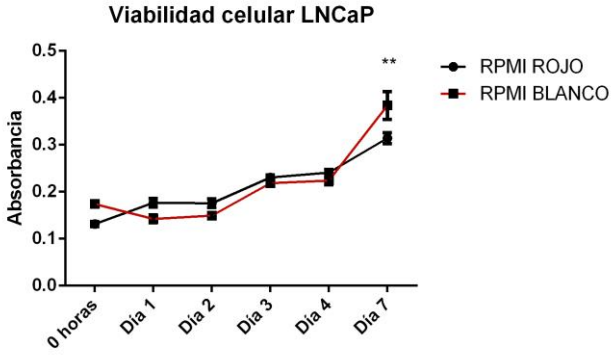


Figura suplementaria 2. Viabilidad celular en LNCaP con diferentes medios de cultivo. Se sembraron $1x10^3$ células LNCaP por sextuplicado en placas de 96 pozos. A las 24 horas se midió la viabilidad celular y se tomó como el tiempo de 0 horas. ANOVA, IC 95%. Comparaciones múltiples por Sidak.

ANEXO III.

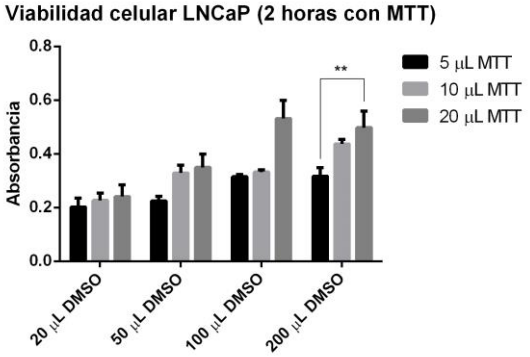
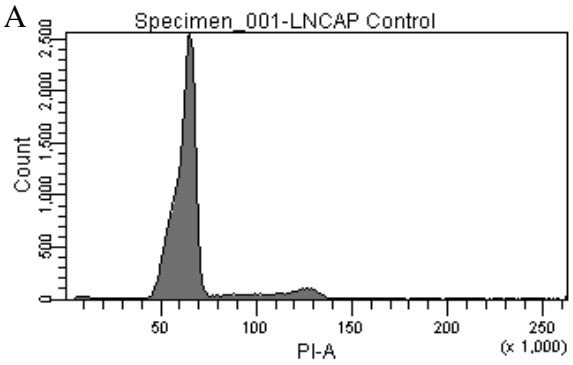
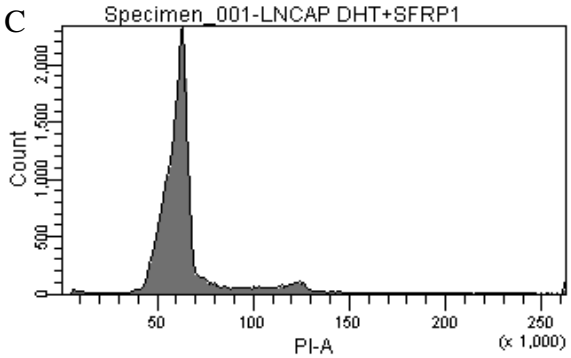


Figura suplementaria 3. Evaluación de la técnica de MTT en LNCaP. Se sembraron $1x10^3$ células LNCaP por sextuplicado en placas de 96 pozos. A las 24 horas se midió la viabilidad celular con diferentes concentraciones de MTT y DMSO. ANOVA, IC 95%. Comparaciones múltiples por Sidak.

ANEXO IV.





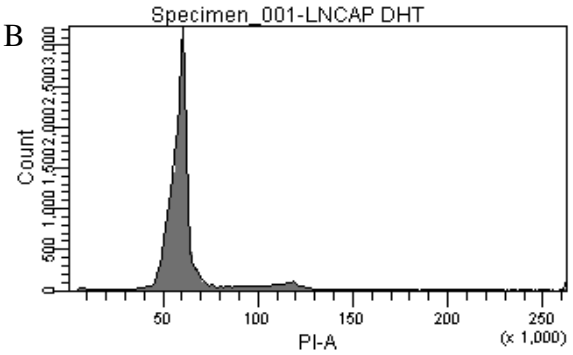


Figura suplementaria 4. SFRP1 + DHT arresta el cicio celular en G_1 en LNCaP. Los núcleos celulares fueron marcados con ioduro de propidio a las 48 horas del tratamiento. A) LNCaP control, B) LNCaP DHT y, C) LNCaP DHT + SFRP1.

APENDICE. Reconocimientos por participación en congresos

ASOCIACIÓN MEXICANA DE GENÉTICA HUMANA, A.C.

Directiva 2013-2015
Presidente
-Dr. Diego Arenas Aranda †
Vice-Presidente
-Dra. Doris Pinto Escalante
Secretaria
-Dra. Haydeé Rosas Vargas
Tesorera
-Dra. Petra Yescas Gómez

XL Congreso Nacional de Genética Humana

Monterrey, Nuevo León, 11-14 Noviembre de 2015

La Asociación Mexicana de Génetica Humana.
Otorga la presente

CONSTANCIA

a

M en C Carlos David Cruz Hernández

Por su participación como:

ASISTENTE

DRA. DORIS PINTO ESCALANTE
Vicepresidente AMGH

Asociación Mexicana de Genética Humana A. C.

www.amg.org.mx

Directiva 2013-2015

Presidente
Dr. Diego Arenas Aranda †

Vice-Presidente
Dra. Doris Pinto Escalante

Secretaria
Dra. Haydeé Rosas Vargas

Tesorera
Dra. Petra Yescas Gómez

VOCALES

Región Norte
Dra. Beatriz Elizabeth de la Fuente Cortez

Región Centro I
Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Región Centro II
Dra. Gildardo Zafra de la Rosa

Región Occidente
Dr. Patricio Barros Núñez

Región Sur
Dra. Verónica Olvera Sumano

XL Congreso Nacional de Genética Humana
11 al 14 de noviembre, 2015
Monterrey, Nuevo León
Hotel Crowne Plaza

Mérida, Yucatán, septiembre 20 de 2015

Dr. Carlos David Cruz Hernández
Universidad Autónoma Metropolitana
México, DF
PRESENTE

Estimada Dr. Cruz:

Por medio de la presente le informamos que su trabajo titulado:

SFRP1 REGULA INDIRECTAMENTE AL GEN DE FUSIÓN *TMPRSS2-ERG*, MEDIANTE EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA

de los autores:

Carlos David Cruz Hernández, Mauricio Rodríguez Dorantes

ha sido aceptado para presentarse en el XL Congreso Anual de nuestra Asociación, a celebrarse del 11 al 14 de noviembre del presente año en la ciudad de Monterrey, Nuevo León.

A partir del 15 de octubre podrá consultar en nuestra página www.amgh.org el programa detallado del mismo para ver la forma y sesión en que se presentará su trabajo.

Atentamente:

MC Doris del Carmen Pinto Escalante
Vice Presidente AMGH

Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO
El Instituto Nacional de Medicina Genómica
otorga el presente Diploma a
Carlos David Cruz Hernández
por haber obtenido el SEGUNDO LUGAR en el
1er Encuentro
Estudiantil
Con el proyecto "SFRP1 regula indirectamente al gen de fusión TMPRSS2-ERG,
mediante el receptor de andrógenos en cáncer de próstata"
México, D.F. a 18 de diciembre de 2015.
Dr. Francisco Xavier Soberón Mainero
Director General