



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio de los patrones de metilación de la
familia de genes *SFRP* durante la progresión
del cáncer de próstata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Consuelo del Pilar García Tobilla



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Marisol López López
VOCAL: Prof. Alicia Beatriz Cervantes Peredo
SECRETARIO: Prof. Mauricio Rodríguez Dorantes
1er. SUPLENTE: Prof. María Benita Leonor Fernández Salgado
2° SUPLENTE: Prof. Nancy Monroy Jaramillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

(nombre y firma)

SUSTENTANTE :

Consuelo del Pilar García Tobilla

(nombre (s) y firma)

Agradecimientos

A mis padres Consuelo y René por su infinito apoyo emocional, comprensión, por su confianza depositada en mí y por su preocupación en mi desarrollo personal del cual lo profesional forma parte.

Al Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes por su guía durante el desarrollo de este proyecto, por su apoyo incondicional tanto académico como personal y por sus sabios consejos mostrando siempre interés en mi desarrollo profesional.

A mi hermano por su apoyo emocional en este proceso y por compartir mis alegrías y por darme soporte en los tiempos difíciles.

A la UNAM y a la Facultad de Química por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura y de realizar actividades culturales, deportivas y recreativas que me proporcionaron una formación integral.

A los miembros del jurado M. en C. Alicia Cervantes y Dra. Marisol López por sus atinadas recomendaciones para la elaboración de este trabajo

A todos mis compañeros del INMEGEN por su incondicional amistad, sus consejos y apoyo en las largas horas de trabajo.

A mis familiares, abuelos, tíos y primos por haber siempre estado al pendiente de mi desarrollo profesional y por haberme demostrado su apoyo en este proceso.

A mis amigos que forman parte de mi familia, particularmente a Viri y Leonel, que siempre han mostrado confianza en mí, me apoyaron en los momentos difíciles y también por los momentos memorables que hemos pasado y pasaremos juntos.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Química por hacer de los momentos difíciles situaciones más llevaderas y por esos momentos y experiencias únicas.

ÍNDICE

1.0 INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Generalidades de la próstata.....	6
1.2 Mecanismo de acción de andrógenos.....	8
1.3 Cáncer de próstata.....	9
1.3.1 Cáncer de próstata hacia la independencia de andrógenos.....	11
1.3.2 Cáncer de próstata y regulación de la expresión génica.....	14
1.4 Mecanismos epigenéticos.....	14
1.4.1 Metilación del DNA.....	15
1.4.1.1 Regulación de la transcripción por metilación.....	17
1.4.1.2 Establecimiento de los patrones de metilación.....	18
1.4.1.3 Metilación del DNA y cáncer.....	20
1.5 Represión transcripcional por hipermetilación de los genes <i>SFRP</i> en diferentes tipos de cáncer.....	21
1.6 Familia de Proteínas Secretadas Relacionadas con Frizzled (SFRP).....	22
1.6.1 Estructura y funciones de las proteínas de la familia SFRP.....	24
1.6.2 Proteínas de la familia SFRP y ruta WNT.....	25
1.6.2.1 Ruta Wnt.....	27
1.6.3 Proteínas de la familia SFRP y cáncer de próstata.....	29
2.0 JUSTIFICACIÓN.....	30
3.0 OBJETIVO GENERAL.....	31
4.0 OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
5.0 HIPÓTESIS.....	31
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
7.0 RESULTADOS.....	37
7.1 Cultivo de líneas celulares y NPrEC	37
7.2 Expresión de <i>SFRP1</i>.....	38

7.3 Metilación de <i>SFRP1</i>	39
7.4 Expresión de <i>SFRP2</i>	39
7.5 Metilación de <i>SFRP2</i>	41
7.6 Expresión de <i>SFRP4</i>	41
7.7 Metilación de <i>SFRP4</i>	42
7.8 Expresión de <i>SFRP5</i>	44
7.9 Metilación de <i>SFRP5</i>	45
8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	47
8.1 Metilación de <i>SFRP1</i> y expresión.....	48
8.2 Metilación de <i>SFRP2</i> y expresión	50
8.3 Metilación de <i>SFRP4</i> y expresión	51
8.4 Metilación de <i>SFRP5</i> y expresión	51
8.5 Participación de otros mecanismos en la regulación transcripcional de los genes de la familia <i>SFRP</i>	52
9.0 CONCLUSIONES.....	53
10.0 PERSPECTIVAS.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXO A. Estandarización de los oligonucleótidos de expresión de SFRP.....	61
ANEXO B. Secuencias de los genes de la familia <i>SFRP</i>.....	62

Estudio de los patrones de metilación de la familia de genes SFRP durante la progresión de cáncer de próstata

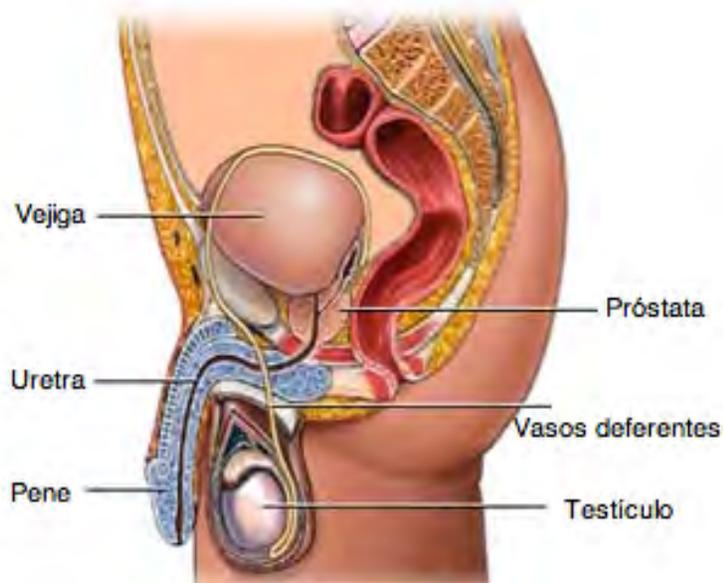
1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la próstata

La próstata es una glándula exocrina que forma parte del sistema reproductivo masculino de mamíferos. En el humano está localizada en la zona pélvica, debajo de la vejiga, delante del recto y se encuentra rodeando la uretra (Figura 1). La función de la próstata es almacenar y secretar un fluido ligeramente alcalino (pH=7.29), de apariencia blanquecina, el cual constituye 25-30% del volumen del semen y que posiblemente proporciona motilidad a los espermatozoides (Kufe, 2003). Anatómicamente se distinguen 4 zonas en la próstata, la zona periférica, la zona central, la zona de transición y el estroma fibromuscular anterior (Figura 1) (McNeal, 1981). Histológicamente la próstata está constituida por el epitelio glandular y el estroma fibromuscular. El primero está compuesto de tres tipos de células principalmente, células basales, células secretoras lumbinales y neuroendócrinas. (DeMarzo et al., 2003). Las células basales secretan componentes hacia la membrana basal, en esta porción hay células madre epiteliales de las cuales algunas se diferencian posteriormente a células epiteliales lumbinales (Figura 2) (Maitland and Collins, 2008).

Las células lumbinales secretan componentes del fluido prostático, expresan el receptor de andrógenos (AR) y secretan el antígeno prostático específico (PSA) y son dependientes de andrógenos. El estroma está compuesto de fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales, células dendríticas, nervios y algunas células infiltradas como mastocitos y linfocitos (Feldman and Feldman, 2001). Algunas células estromales expresan el AR, estas células producen factores de crecimiento que actúan de manera parácrina en las células epiteliales, esta interacción entre el estroma y el epitelio regula el crecimiento, desarrollo y las respuestas hormonales de la próstata (Feldman and Feldman, 2001).

A)



B)

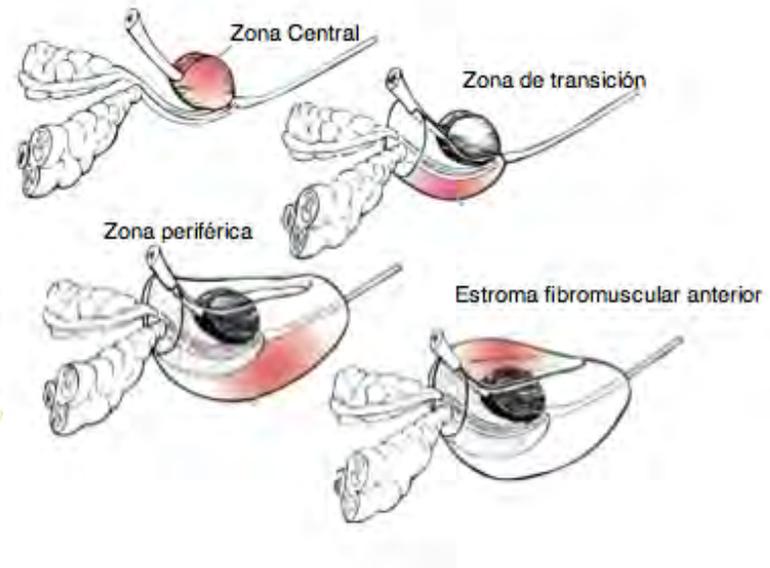


Figura1. Localización y anatomía de la próstata. A) **Localización de la próstata.** La próstata forma parte del aparato reproductor masculino, en humanos se encuentra localizada en la pelvis, debajo de la vejiga y se encuentra rodeando la uretra (Joshi, 2008). B) **Zonas anatómicas de la próstata.** Anatómicamente se distinguen 4 zonas en la próstata zona periférica, la zona central, la zona de transición y el estroma fibromuscular anterior, en la figura se muestra donde se localiza cada una en la glándula prostática. Modificada de (Kufe, 2003)

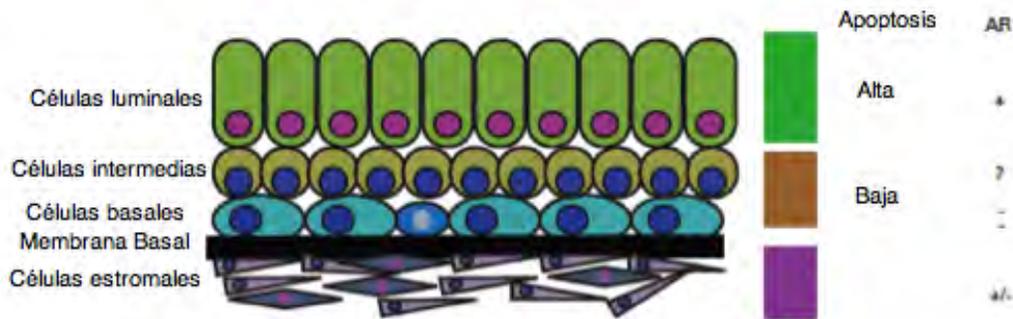


Figura 2. Diferenciación de las células prostáticas. La figura muestra los diferentes subtipos celulares presentes en la próstata humana (excluyendo la población neuroendócrina). Éstos consisten en un epitelio basal localizado deajo de una capa luminal secretora. Los rectángulos a la derecha representan los compartimientos normales presentes en la próstata (Verde luminal, café basal y morado estromal). Los núcleos de las células que expresan el receptor de andrógenos están en rosa. Los niveles relativos de muerte celular se muestran a la derecha de los rectángulos. La capa basal donde se encuentran las células de adulto totipotenciales en la próstata humana, contiene una fracción proliferativa y tiene una tasa de apoptosis muy baja. Modificada de (Maitland and Collins, 2008)

1.2 Mecanismo de acción de andrógenos

La testosterona es el andrógeno que se encuentra en mayor proporción circulando en sangre, es producido principalmente en los testículos, pero también se forma por la conversión periférica de esteroides adrenales. La testosterona circula en la sangre, en donde una porción se une a albúmina o a globulinas de unión a hormonas sexuales (HSBG por sus siglas en inglés), otra porción circula disuelta y libre, la unión a globulinas es reversible por lo que hay un constante recambio entre la fracción unida a proteínas y la fracción libre, ésta última constituye un 2% de la testosterona circulante y es la que tiene la capacidad de entrar a las células prostáticas (Nussey, 2001). En los tejidos blanco el 90% de la testosterona que ingresa es convertida a dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α -reductasa tipo 2 (SRD5AR2), esto ocurre antes de interactuar con el AR (Nussey, 2001).

El AR es un receptor nuclear, en estado basal está unido a proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés), proteínas del citoesqueleto y otras chaperonas, tiene una conformación que impide la unión del receptor al DNA. La unión de andrógenos al AR induce un cambio conformacional, lo que permite la

disociación del AR de las HSP y la unión del receptor a corregluladores como ARA70, estos eventos promueven la homodimerización del receptor, la fosforilación del mismo y la translocación de éste al núcleo en donde se puede unir a las regiones promotoras de los genes blanco en secuencias denominadas elementos responsivos a andrógenos (ARE por sus siglas en inglés), regulando la actividad transcripcional de estos genes que modulan funciones de crecimiento y supervivencia celular (Figura 3)(Bennett et al., 2010). La pérdida de la regulación de la señalización de andrógenos puede presentar diferentes manifestaciones clínicas, las enfermedades más comunes debidas a la pérdida del control de este mecanismo son el síndrome de insensibilidad a andrógenos y cáncer de próstata (CaP).

1.3 Cáncer de próstata (CaP)

El CaP es la segunda causa de muerte a nivel mundial en varones después del cáncer de pulmón, en el año 2010 el 28% de los diagnósticos de cáncer fue CaP (Jemal et al., 2010). En México es la primera causa de muerte por neoplasias en varones (INEGI, 2010). Los signos clínicos que se presentan al inicio de la enfermedad están asociados a problemas urinarios como vaciamiento incompleto de vejiga y nocturia, estos síntomas son muy similares a los que se presentan en otras enfermedades prostáticas como prostatitis e hiperplasia prostática benigna (Kufe, 2003). El CaP es una enfermedad asociada a la edad, después de los 50 años existe una incidencia del 15 al 30 % y después de los 80 años el análisis histopatológico de las próstatas muestran del 60% al 70% de evidencia de carcinomas prostáticos (Rowley and Mason, 1997). También existe influencia étnica y geográfica en la incidencia de la enfermedad, siendo las poblaciones afroamericanas las que poseen mayor riesgo y las poblaciones asiáticas como japoneses y chinos con la menor incidencia. Además de la edad, la dieta se considera un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, en donde la ingesta alta de carne roja, grasa total y grasa animal ha sido asociada con el desarrollo de las neoplasias prostáticas (Pienta and Esper, 1993). Un ejemplo de la influencia de la dieta en el desarrollo de CaP es lo observado en los

varones asiáticos que tienen ingesta alta de soya, en la cual se encuentran isoflavonoides como genisteína y daidzeína, compuestos que han sido asociados con disminución de la proliferación de células de CaP. (Kufe, 2003). Otros factores de riesgo asociados al desarrollo de CaP son la ocupación, factores socioeconómicos, exposición a agentes infecciosos, exposición a agentes químicos, conducta sexual, vasectomía y la historia familiar (Pienta and Esper, 1993).

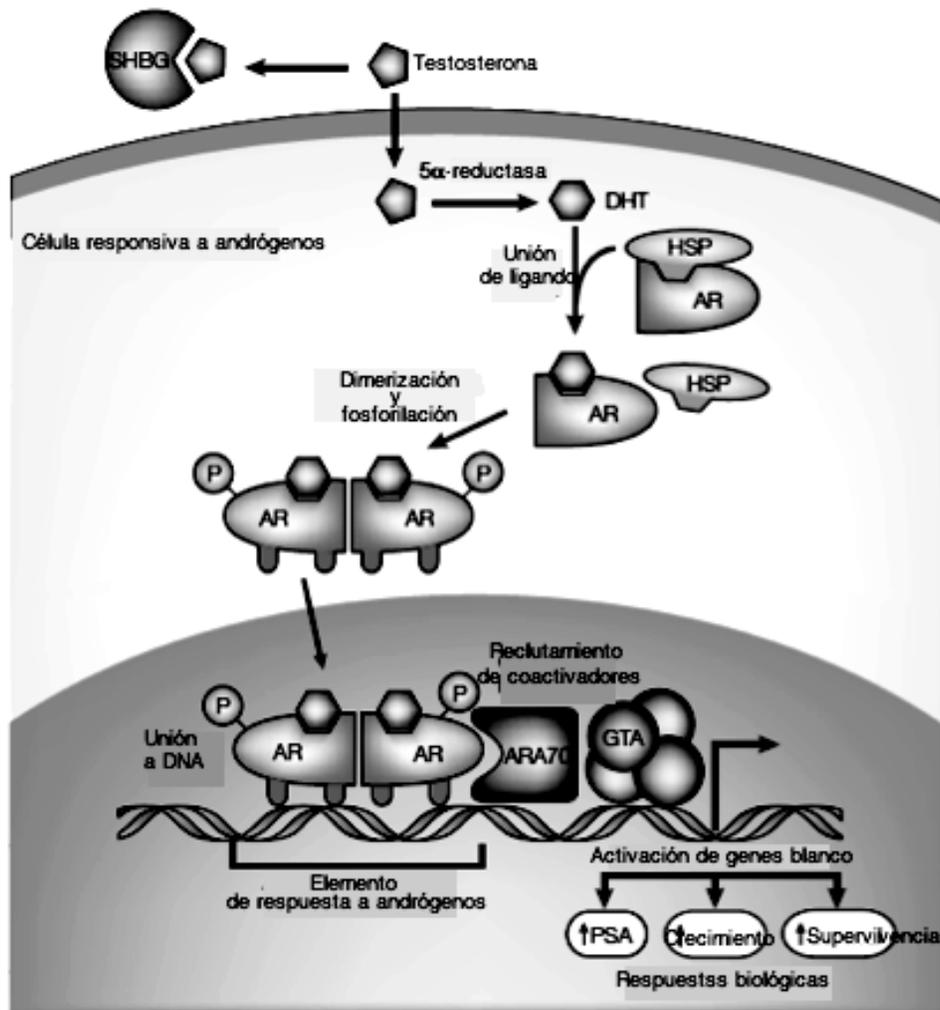


Figura 3. Mecanismo de acción de andrógenos. La testosterona libre en sangre entra a la célula, es transformada por la SRD5A2 a DHT, que interacciona con el receptor de andrógenos (AR) e induce la disociación de este último de las HSP, se induce la homodimerización del AR, la fosforilación del mismo y la translocación del AR al núcleo en donde se une a proteínas correguladoras que permiten la unión del AR a sus genes blanco en los cuales induce o inhibe la transcripción de los mismos, regulando funciones de crecimiento y supervivencia celular así como la producción del antígeno prostático específico (PSA). Modificada de (Feldman and Feldman, 2001)

1.3.1 Cáncer de próstata hacia la independencia de andrógenos

El crecimiento de tumores de cáncer de próstata inicialmente es dependiente de la señalización de andrógenos para el crecimiento y supervivencia de las células tumorales, este estadio se denomina CaP andrógeno dependiente (AD), en esta etapa una terapia antiandrogénica induce la regresión de la enfermedad, sin embargo muchos pacientes presentan recurrencia del CaP. En este último estadio la terapia antiandrogénica ya no es útil y se denomina CaP andrógeno independiente (AI), en el cual el crecimiento y supervivencia de las células tumorales es independiente de la señalización de andrógenos; este tipo de cáncer es letal y actualmente no existen terapias efectivas para su tratamiento (Feldman and Feldman, 2001).

Existen muchas hipótesis que podrían explicar la progresión hacia la independencia de andrógenos. Entre los mecanismos propuestos están la amplificación de la expresión del AR, con la cual también se regula a la alta la transcripción de algunos de los genes blanco del AR como el antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés) (Attar et al., 2009). Otro mecanismo propuesto es la mutación del gen que codifica para el AR, estas mutaciones se asocian a la activación aberrante del AR por otras moléculas como precursores androgénicos, estrógenos, progesterona, estradiol, cortisol o incluso agentes antiandrogénicos (Attar et al., 2009). Sin embargo no todos los mecanismos propuestos involucran directamente al AR, existen otros que involucran los coactivadores del AR como TIF2, SIRC1 y TIP60, los cuales en algunas ocasiones se sobreexpresan y acumulan en el núcleo, incrementando la tasa de transcripción de los genes blanco del AR.

También se ha hipotetizado que la activación de algunas rutas de cinasas inducen la fosforilación de los coactivadores, potenciando la actividad del AR (Attar et al., 2009). Otro mecanismo involucra el incremento de la expresión de enzimas involucradas en la esteroidogénesis y finalmente la activación de rutas de transducción de señales que potencian la actividad del AR o de sus

coactivadores a bajos niveles de andrógenos o incluso en ausencia de éstos, como ejemplo están el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento tipo insulina, IL6, y la ruta WNT (Attar et al., 2009). Existen otras teorías completamente independientes del AR para la explicación de la progresión hacia CaP AI, una de ellas postula que se elude por completo la cascada de señalización de andrógenos, lo cual facilita la proliferación celular y evita de la apoptosis. Una última teoría explica que este mecanismo es debido a la existencia de una subpoblación de células tumorales independientes de andrógenos que ya existía posiblemente antes de que se iniciara la terapia. Las células epiteliales pluripotenciales localizadas entre las células basales de la próstata se piensa que son AI ya que su tasa de crecimiento y muerte no se modifica por la ablación de andrógenos. De acuerdo a este modelo, las células epiteliales pluripotenciales transformadas pueden ser el origen del CaP (Figura 4) (Feldman and Feldman, 2001). La comprensión del mecanismo de progresión de CaP AI es importante para el desarrollo de nuevas terapias que contribuyan al tratamiento de esta forma de CaP, así como la búsqueda de marcadores de pronóstico temprano de la enfermedad que permitan determinar la mejor estrategia terapéutica de cada paciente y que éste pueda tener una mejor calidad de vida.

Actualmente los métodos de diagnóstico de CaP son la detección sérica del antígeno prostático específico (PSA), exámen digital rectal y biopsia prostática (Kufe, 2003). El inconveniente del uso de PSA como marcador es su baja especificidad ya que se encuentra elevado en otras condiciones de enfermedad prostática que no son necesariamente CaP como hiperplasia prostática benigna (BPH) y otras prostatitis. El examen digital rectal es un procedimiento incómodo para los pacientes y la biopsia prostática no proporciona un diagnóstico certero de CaP ya que a muchos pacientes se les realiza la biopsia en numerosas ocasiones.

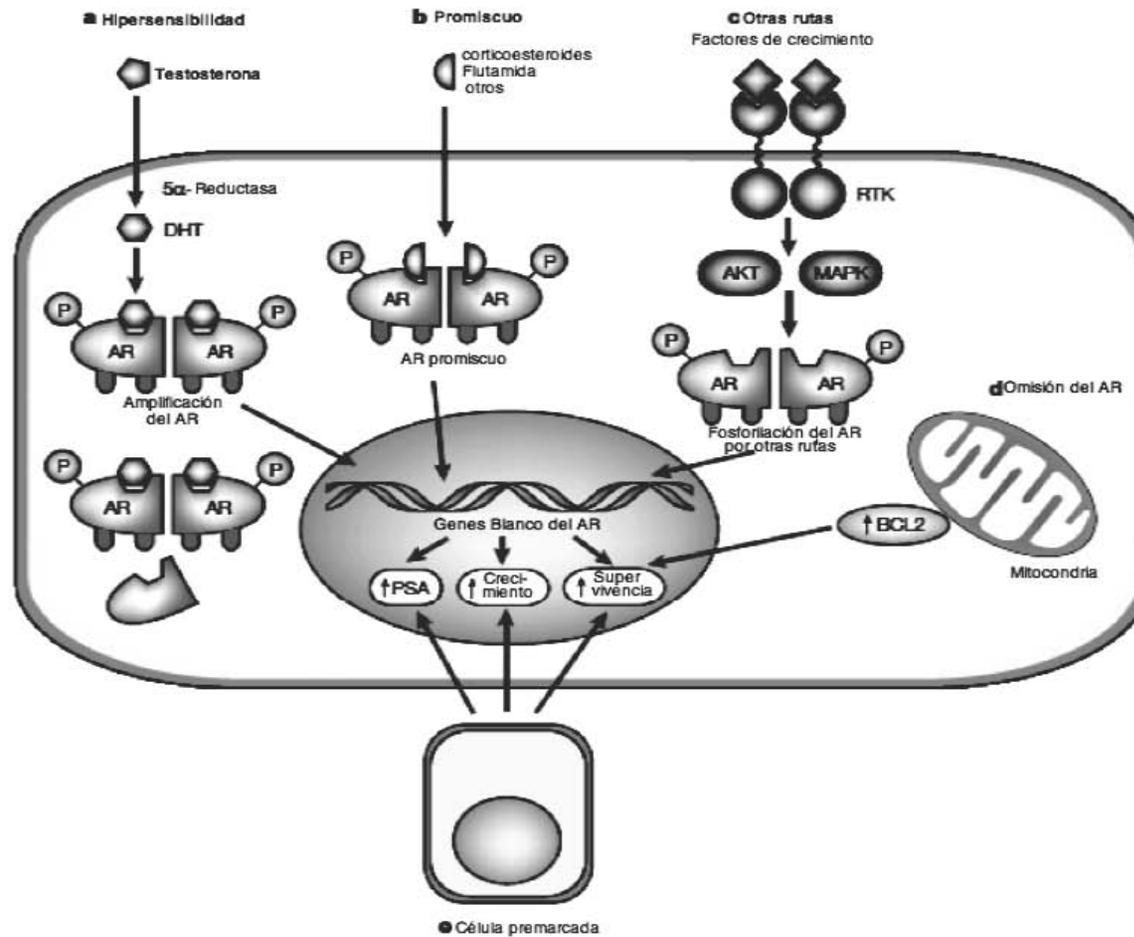


Figura 4. Posibles mecanismos involucrados en el progreso de CaP AI. A) Ruta de hipersensibilidad por amplificación del AR o por mayor sensibilidad del AR. B) Pérdida de especificidad del AR por mutaciones en éste. C) fosforilación del AR por por AKT. D) Activación de otras rutas de supervivencia celular. E) La Presencia de células de CaP AI que forman la próstata particularmente células epiteliales pluripotenciales. Modificada de (Feldman and Feldman, 2001).

1.3.2 Cáncer de próstata y regulación de la expresión génica

El CaP al igual que otros tipos de cáncer está caracterizado por células que son capaces de tener su propia señalización de crecimiento, tienen insensibilidad a los mecanismos que inhiben el crecimiento, evaden los mecanismos de apoptosis, tienen un potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000). Estas características son debidas a la pérdida de la regulación de rutas metabólicas que modulan estos procesos, por lo tanto se destaca la importancia del mantenimiento de los genes que codifican para las proteínas involucradas en estos mecanismos (Hanahan and Weinberg, 2000). En células humanas los mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción génica son la unión de factores proteicos a regiones promotoras de genes como factores de transcripción, coactivadores, correpresores, regiones potenciadoras o de silenciadoras y complejos ribonucleoproteicos que modifican la cromatina (Strachan and Read , 1999; van Wolfswinkel and Ketting, 2010). Las investigaciones se han centrado también en los mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA, las modificaciones covalentes de histonas y los complejos remodeladores de la cromatina, ya que juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica. En cáncer el silenciamiento de algunos genes es una de las alteraciones mas importantes y ocurre debido a la pérdida de la regulación de los mecanismos epigenéticos (Jones and Baylin, 2007). Es por ello que las investigaciones se han centrado en la comprensión de los mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que involucren la modulación de estos mecanismos y finalmente para la búsqueda de nuevos marcadores moleculares de detección temprana (Kelly et al., 2010).

1.4 Mecanismos epigenéticos

El término epigenética significa “fuera de la genética convencional”. La epigenética es el estudio de las modificaciones estables que no alteran

directamente la secuencia de DNA (Bogdanovic and Veenstra, 2009). Estos cambios producen alteraciones en la expresión de los genes, afectando la función de éstos. La pérdida de la regulación de los mecanismos epigenéticos se ha asociado con enfermedades como el cáncer, pero aún falta el desarrollo de nuevos métodos para la detección de las modificaciones epigenéticas y así conocer que factores conducen a estos cambios. Los mecanismos epigenéticos mas estudiados actualmente son la metilación del DNA, las modificaciones covalentes de histonas y la asociación de estos con los complejos remodeladores de la cromatina (Bogdanovic and Veenstra, 2009).

1.4.1 Metilación del DNA

La metilación del DNA se da por la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina formando 5-metilcitosina (5-meC), regula funciones celulares importantes como la estabilidad genómica, supresión de elementos genómicos repetitivos, la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica (Rodríguez-Dorantes M, 2004) (Figura 5).

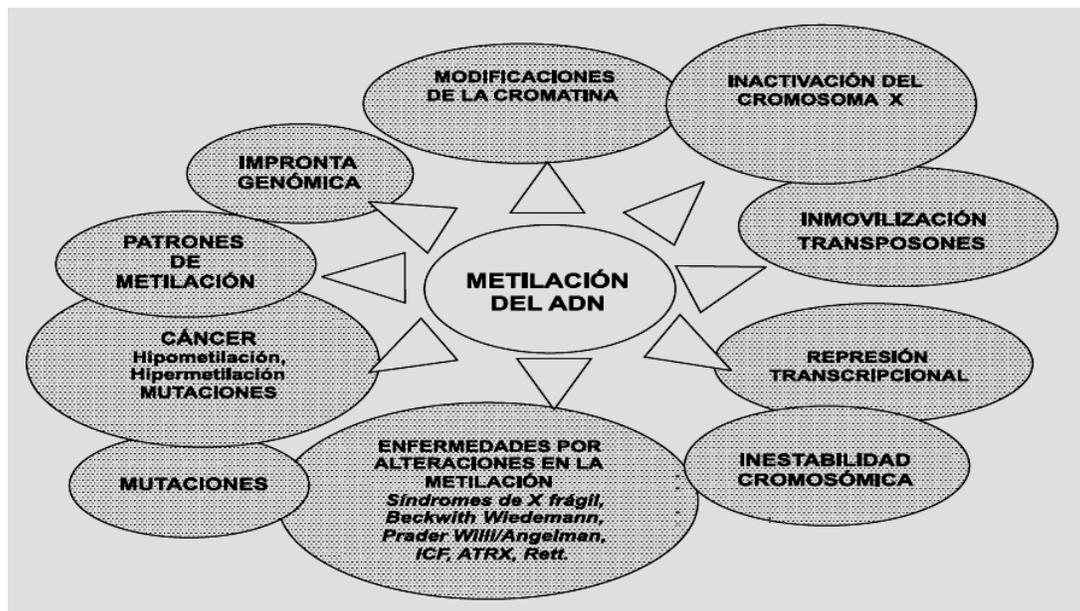


Figura 5. Participación de la metilación del ADN en procesos celulares normales y en diferentes procesos fisiológicos. Tomada de (Rodríguez-Dorantes, 2004)

La metilación ocurre generalmente en citosinas localizadas en dinucleótidos CpG (Figura 6^a), algunos de ellos se encuentran agrupados en regiones llamadas islas CpG (CGI). Una CGI fue definida en 1987 como una secuencia de al menos 200 pb que debe tener un cociente CG de al menos 0.5, y un contenido CpG mayor a 0.6, sin embargo esta definición se ha modificado a lo largo de los años y existen varios autores que han propuesto diferentes definiciones (Gardiner-Garden and Frommer, 1987; Irizarry et al., 2009). En plantas se ha demostrado que este proceso también ocurre pero en menor frecuencia en sitios no CpG como CpNpG, CpA y CpT; aunque la función de la metilación en este contexto no se asocia a la represión transcripcional génica (Dyachenko et al., 2010). Es frecuente que ocurran mutaciones por transición de CpG a TpG en donde la Citosina está metilada (Ho and Tang, 2007). Se han identificado cerca de 38 000 islas CpG en el genoma humano, cerca del 37% de las islas CpG se localizan en las regiones reguladoras 5' de genes (promotores) y en los primeros 2 exones aunque también se sabe que existen 5-meC en regiones 3' o en regiones intergénicas (McCabe et al., 2009).

Las CGI generalmente se encuentran desmetiladas, esto les permite protegerse de sufrir desaminaciones espontáneas y mutaciones. Las excepciones corresponden a las CGI que se encuentran en las regiones promotoras de los genes improntados, genes sujetos a la inactivación del cromosoma X y transposones. Los patrones de metilación son diferentes en algunos genes en diferentes tejidos (McCabe et al., 2009). La mayor parte de las CGI se encuentran traslapadas con el sitio de inicio de la transcripción y están involucradas en la regulación de la expresión génica, se ha propuesto que casi la mitad de las 5'CGI participan en la regulación de la transcripción. Aproximadamente 70% de los genes conocidos tienen una isla CpG en un fragmento de 2 kb a 1 kb del sitio de inicio de la transcripción. La reacción de metilación del DNA en mamíferos es catalizada por DNA-metiltransferasas (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B y DNMT2). El grupo metilo es otorgado por el cofactor S-Adenosil-L-metionina (SAM) (Figura 6B). Dependiendo de su función las DNMT se clasifican en enzimas de

mantenimiento y *de novo*. En mamíferos la DNMT1 lleva acabo la metilación de mantenimiento en los tejidos, ya que esta enzima reconoce preferencialmente sitios hemimetilados. Las enzimas DNMT3A y DNMT3B llevan a cabo la metilación *de novo*, aunque en algunos tejidos el mantenimiento de la metilación lo llevan a cabo estas dos últimas enzimas. La función de la enzima DNMT2 aún no ha sido completamente descrita, aunque se ha sugerido que es una RNA metiltransferasa (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

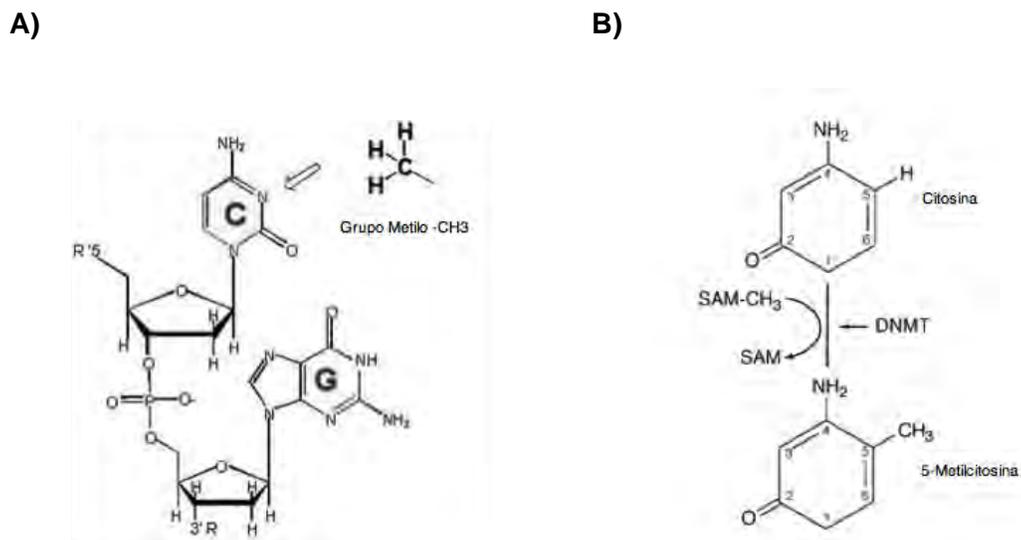


Figura 6. Metilación de dinucleótidos CpG. A) La metilación del DNA se da generalmente en contexto de dinucleótidos CpG. B) La reacción de metilación del carbono 5 de las citosinas es catalizada por DNA metiltransferasas (DNMT) utilizando como cofactor la S.adenosilmetionina (SAM) que es el donador del grupo metilo.

1.4.1.1 Regulación de la transcripción por metilación

En mamíferos la metilación del DNA en regiones promotoras de genes está asociada con represión transcripcional, esto ocurre ya que el grupo metilo de la 5meC se extiende en el surco del DNA y por efectos estéricos inhibe la unión de factores de transcripción (TFs) a sus respectivos sitios de reconocimiento con contenido de CpG. Otro mecanismo de represión transcripcional por metilación del DNA involucra a un grupo de proteínas denominadas proteínas de unión a sitios metilados (MBD por sus siglas en inglés), entre estas proteínas están MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, estas proteínas tienen un dominio que se une específicamente a las CGI metiladas y crean un ambiente estérico que dificulta el

acceso de los factores de transcripción (TF). Además las proteínas MBD reclutan enzimas cuya función es la modificación covalente de histonas, como desacetilasas de histona (HDAC), metiltransferasas de histonas (HMT) así como enzimas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP, llevando a cabo modificaciones en el complejo de histonas y como resultado la estructura de la cromatina se compacta silenciando la transcripción de genes (Figura 7)(Bogdanovic and Veenstra, 2009).

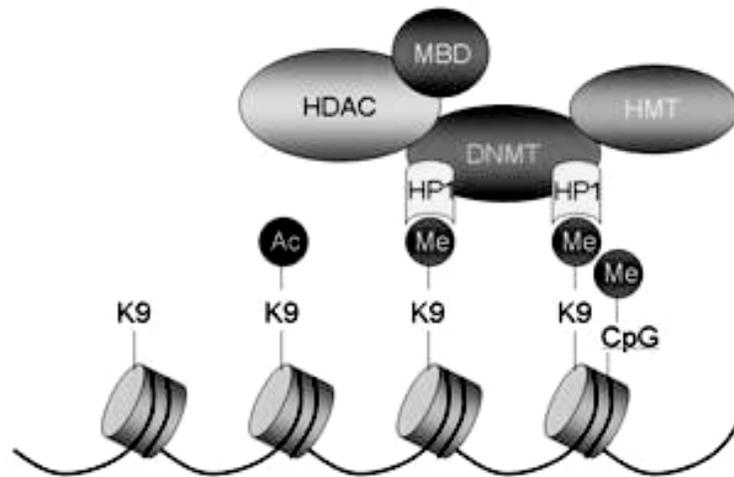


Figura 7. Mecanismo de represión transcripcional por metilación del DNA. Las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT) metilan los dinucleótidos CpG en el DNA. Posteriormente hay unión de proteínas de unión a sitios metilados (MBD), y proteínas que modifican histonas que finalmente desacetilan o metilan las histonas (HDAC y HMT), induciendo un mecanismo de represión transcripcional. Modificada de <http://kapplerlab-munich.de/research.htm>

1.4.1.2 Establecimiento de los patrones de metilación

El patrón de metilación del DNA se establece a través de diferentes fases durante el desarrollo de un organismo. Existen dos ocasiones durante el desarrollo humano en donde se borran por completo dichos patrones, Una de estas etapas ocurre durante la gametogénesis y la segunda durante el estadio 8 de la formación del blastocisto en la implantación embrionaria (Morgan et al., 2005). La metilación del DNA después de este proceso es catalizada por las DNA-metiltransferasas *de novo*. En la etapa adulta los patrones de metilación son tejido y célula específicos (Figura 8). En las células los patrones de metilación no son iguales a lo largo del tiempo.

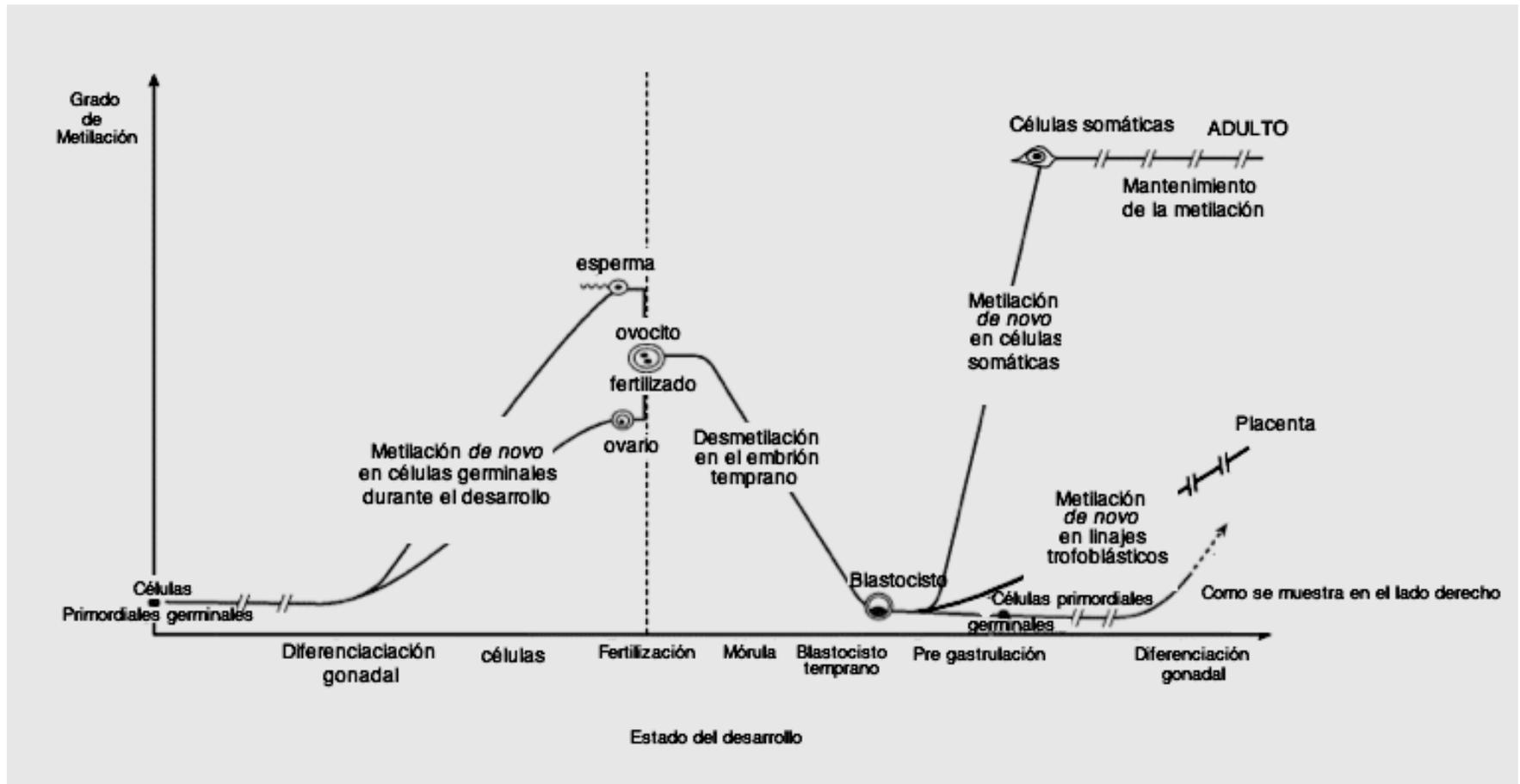


Figura 8. Establecimiento de los patrones de metilación durante el desarrollo. Los patrones de metilación son diferentes durante el desarrollo humano, en esta figura se muestra el grado de metilación en cada etapa del desarrollo embrionario, en la etapa adulta en las células somáticas el patrón de metilación se mantiene. Modificada de (Strachan and Read , 1999).

Se sabe que existen genes que modifican sus patrones de acuerdo a las señalizaciones celulares, tal como los cambios en la metilación en el promotor de *TFF1* en respuesta a *o*-estrógenos (Metivier et al., 2008)(Kangaspeska, 2008 83). La pérdida de la regulación de los patrones se ha ligado a la vejez y al desarrollo de enfermedades en el adulto. Además la desregulación del programa fetal por factores maternos y ambientales modifican la metilación del DNA de genes específicos promoviendo una pérdida de la regulación de la expresión de éstos en la etapa adulta, pudiendo ser causa de diversas enfermedades. Algunas observaciones epidemiológicas y experimentos sugieren que estos cambios también pueden explicar enfermedades como cáncer, obesidad, diabetes, desórdenes cardiovasculares, enfermedades neurológicas y modificaciones del comportamiento (Ho and Tang, 2007).

1.4.1.3 Metilación del DNA y cáncer

En células cancerosas los patrones de metilación son distintos a los establecidos en tejidos sanos, existe hipometilación de regiones intergénicas que normalmente contienen alta cantidad de 5meC, esto induce la activación de transposones, lo cual contribuye a la inestabilidad genómica que se observa en las células cancerosas. También ocurre hipometilación de regiones promotoras de oncogenes, promoviendo la transcripción de éstos y otro mecanismo es la hipermetilación de regiones promotoras de genes supresores de tumores que conlleva a la represión transcripcional de los mismos (Figura 9) (Jones and Baylin, 2007). Los mecanismos que conllevan a la hipermetilación de algunas islas CpG no han sido descritos pero algunas hipótesis sugieren que dichos mecanismos están relacionados con secuencias que tienen susceptibilidad a la metilación *de novo*, la cual puede ser ocasionada por pérdida de la regulación de la maquinaria de metilación del DNA por mal reconocimiento de secuencias blancas por las DNMT (McCabe et al., 2009). En CaP se han encontrado genes hipermetilados asociados a la pérdida de su expresión, estos genes participan en mecanismos

como control del ciclo celular, reparación de daño al DNA, transducción de señales, adhesión celular y respuestas inflamatorias (Cooper and Foster, 2009).

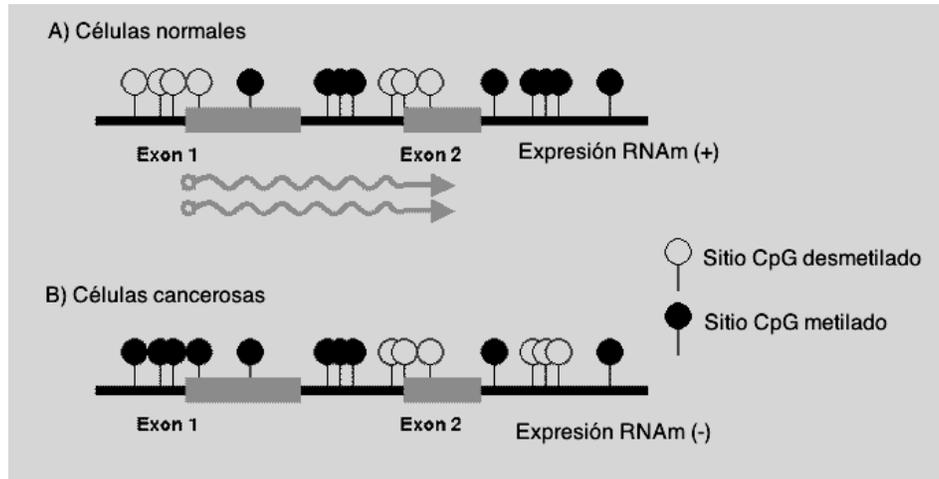


Figura 9. Hipermetilación de genes supresores de tumores en CaP. A) un gen con patrones normales de metilación en células normales, en donde su región promotora no se encuentra metilada y éste gen se puede transcribir. B) se observa el mismo gen en células cancerosas que posee metilación de su región promotora y esto lleva a la represión transcripcional del mismo. Modificada de <http://dnamethylation.net/>

En diferentes tipos de cáncer se ha observado hipermetilación de la región promotora de varios genes supresores de tumores, se ha asociado este estado de metilación a la pérdida de expresión de los mismos. Un grupo de genes que se ha encontrado frecuentemente hipermetilado en su región promotora son los genes de la familia de proteínas secretadas relacionadas con “Frizzled” (*SFRP*) (Bovolenta et al., 2008).

1.5 Represión transcripcional por hipermetilación de los genes *SFRP* en diferentes tipos de cáncer

Hiromu Suzuki y sus colaboradores en el año 2002 encontraron a un grupo de genes que pierden su expresión por un mecanismo epigenético que involucra cambios en los patrones de metilación de sus regiones promotoras en cáncer colorectal y cáncer gástrico, cuatro de éstos genes corresponden a la familia *SFRP*. En tejidos de individuos con cáncer colorectal se encontró metilación de la región promotora de *SFRP1* en 95.1%, *SFRP2* en 89.5%, *SFRP4* en 29% y *SFRP5* en 58.8% de los tejidos. El 24.1% de todos los individuos afectados

presentaron metilación de los 4 genes. También se ha identificado el silenciamiento de genes de la familia *SFRP* asociado a hipermetilación en su región promotora en muchos otros tipos de cáncer. Algunos ejemplos se resumen en la tabla 1.

1.6 Familia de Proteínas Secretadas Relacionadas con Frizzled (SFRP)

Los genes de la familia *SFRP* codifican para proteínas denominadas proteínas secretadas relacionadas con FZ (SFRP). Estos genes se encuentran organizados en diferentes regiones del genoma, la información referente a la estructura de los genes de la familia *SFRP* se condensa en la tabla 2. Aún no existe información suficiente acerca de la regulación de la expresión de los genes de la familia *SFRP*, hasta la fecha sólo se conocen algunas proteínas que regulan la expresión de estos genes que se encuentran en la tabla 3.

Tabla 1. Porcentaje de casos en donde hay hipermetilación de genes de la familia *SFRP* en diferentes tipos de cáncer

Tipo de cáncer	<i>SFRP1</i>	<i>SFRP2</i>	<i>SFRP4</i>	<i>SFRP5</i>	Muestras	Referencia
Colorectal	95.1%	89.5%	29%	58.9%	Muestra de pacientes	(Suzuki et al., 2002)
Cáncer de mama	64%	100%	-	11.91%	Líneas celulares	(Suzuki et al., 2008)
Cáncer de mama	78.4%	78.77%	NR	78.71%	Tumor primario	(Suzuki et al., 2008)
Cáncer de mama	NR	83%	NR	NR	Tejido de pulmón	(Suzuki et al., 2008)
Cáncer de pulmón	52%	NR	NR	NR	NR	(Fukui et al., 2005)
Carcinoma de células	12.9%	39.6%	13.6%	41.1%	Muestras de carcinoma	(Urakami et al., 2006)
Leucemia linfocítica	100%	55%	30%	15%	Muestras de tumor	(Liu et al., 2006)
Cáncer de ovario	34.9%	62.7%	1.7%	44.4%	Muestras de tumor	(Su et al., 2009)
Cáncer cervical	33.9%	80.7%	67.9%	10.1%	Muestras de tumor	(Chung et al., 2009)
Carcinoma hepatocelular	82%	91%	27%	91%	Líneas celulares	(Shih et al., 2007)
Cáncer Gástrico	100%	100%	NR	81%	Líneas Celulares	(Nojima et al., 2007)
Cáncer Gástrico	91%	96%	NR	65%	Muestras de tumor	(Nojima et al., 2007)
Carcinoma de células	35%	32%	35%	29%	Muestras de tumor	(Marsit et al., 2006)
Cáncer de próstata	83%	NR	NR	NR	Muestras de tumor	(Lodygin Dimitri et al.,
Cáncer de próstata	83%	NR	NR	NR	Muestras de tumor	(Lodygin et al., 2005)
Cáncer de próstata	100%	NR	NR	NR	Líneas celulares	(Lodygin et al., 2005)

NR: no se realizó

Tabla 2. Cuadro comparativo entre los genes de la familia SFRP

	SFRP1	SFRP2	SFRP4	SFRP5
Tamaño del gen	47515 bases	8487 bases	10836 bases	5 392 bases
No. de exones	3	3	6	3
Banda citogenética	8p11.21	4q31.3	7p14.1	10q24.2

Información de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Tabla 3. Regulación de la expresión de los genes de la familia SFRP

Proteína	Proteína que regula la expresión de SFRP	Tipo de células en las que se realizó el estudio	Mecanismo
Sfrp1	Efactor de glioblastoma SHH 1 (Gli1)	Fibroblastos de embrión de ratón	Unión a secuencia promotora (activación transcripcional)
SFRP1	factor de transcripción MYC	Células epiteliales de mama humanas	Unión a secuencia promotora (represión transcripcional)
SFRP1 y SFRP2	Barx1	mesenquima estomacal	-
Sfrp1 y Sfrp5	Lhx5	Prosencéfalo de pez cebra	Activación transcripcional
Sfrp1 y Sfrp5	Ci-FoxA	<i>C. intestinales</i>	-

Información de (Bovolenta et al., 2008)

1.6.1 Estructura y funciones de las proteínas de la familia SFRP

Inicialmente las proteínas de la familia SFRP fueron identificadas como proteínas secretadas relacionadas con procesos de apoptosis (SARP). Un ejemplo es la proteína SFRP2 que inhibe la apoptosis al unirse a complejos de Fibronectina-integrina. Se sabe también que participan en procesos de diferenciación celular, como la proteína SFRP1 que inhibe la formación de osteoclastos al unirse al ligando del receptor RANK (RANKL) (Figura 10) (Bovolenta et al., 2008).

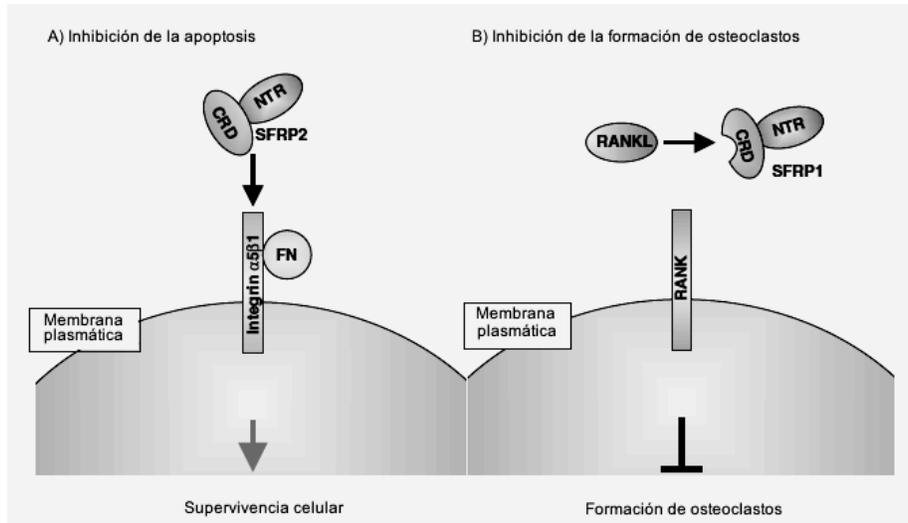


Figura 10. Funciones de las proteínas SFRP en apoptosis y la formación osteoclastos y A) Inhibición de la apoptosis por unión al complejo Fibronectina-integrina. B) Inhibición de la formación de osteoclastos por la unión a RANKL. Modificada de (Bovolenta et al., 2008).

Las proteínas SFRP son solubles y actúan como moduladores de la vía de señalización WNT participando en procesos de proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario. (Bovolenta et al., 2008). En la tabla 4 se resume información acerca de algunas funciones reguladas por las proteínas SFRP. Acerca de la estructura de las proteínas de la familia SFRP se sabe que éstas poseen dos dominios principales e independientes. El primero que se encuentra en la porción N-terminal y se denomina dominio rico en cisteína (CRD) por medio del cual interacciona con el receptor FZ. El segundo dominio está en la porción C-terminal y es el dominio relacionado con netrina (NTR). Estas proteínas se localizan en la membrana o en la matriz extracelular y son liberadas al espacio extracelular por unión a heparina (Bovolenta et al., 2008).

1.6.2 Proteínas de la familia SFRP y ruta WNT

Para regular la activación de la ruta “Wingless type” (WNT por sus siglas en inglés) las proteínas de la familia SFRP se unen a las proteínas WNT o al receptor “Frizzled” (FZ por sus siglas en inglés) directamente. Los estudios iniciales del papel de las proteínas SFRP en la modulación de la ruta WNT indicaron que estas proteínas actúan de manera antagónica, sin embargo en *Drosophila melanogaster*

Tabla 4. Cuadro comparativo de la familia de proteínas SFRP

	SFRP1	SFRP2	SFRP4	SFRP5
Funciones de la proteína	<p>Moduladores de la señalización Wnt</p> <p>Regulación de crecimiento y diferenciación celular.</p> <p>Disminuye los niveles intracelulares de β-catenina.</p> <p>Efectos antiproliferativos en células vasculares in vitro e in vivo.</p> <p>in vivo puede inducir respuestas angiogénicas.</p> <p>Participa en el desarrollo de los órganos sexuales masculinos en ratones (Warr et al., 2009)</p>	<p>Moduladores de la señalización Wnt.</p> <p>Regulación de crecimiento y diferenciación celular</p> <p>Importante durante el desarrollo de retina.</p> <p>Miogénesis.</p> <p>Participa en el desarrollo de los órganos sexuales masculinos en ratones (Warr et al., 2009)</p>	<p>Moduladores de la señalización Wnt.</p> <p>Regulación de crecimiento y diferenciación celular</p> <p>Regular la morfología y función uterina.</p> <p>Induce apoptosis durante la ovulación</p> <p>Efectos fosforilatorios.</p>	<p>Moduladores de la señalización Wnt.</p> <p>Regulación de crecimiento y diferenciación celular</p> <p>Involucrado en la polaridad de fotorreceptores y en otras células de la retina.</p>
Tamaño de la proteína	344 aa	295 aa	346 aa	317 aa
Localización celular	Secretada al espacio extracelular	Secretada al espacio extracelular	Secretada al espacio extracelular pero en citoplasma en tumores de ovario	Secretada al espacio extracelular
Expresión en tejidos	<p>Ausente en algunas células de pulmón, hígado y leucocitos.</p> <p>Altamente expresada en corazón y durante el desarrollo renal.</p> <p>También se expresa en testículos, ovarios, desarrollo del cerebro, células miométriales, células del tejido muscular suave, fibroblastos y qu</p>	<p>Tejido adiposo, corazón, cerebro, músculo esquelético, timo páncreas, próstata, testículo, ovario, intestino delgado y colon.</p> <p>Los niveles mas altos son en tejido adiposo, intestino delgado y colon</p>	<p>Expresada en células mesenquimales.</p> <p>Altamente expresada en el estroma del endometrio proliferativo.</p> <p>Expresada en cardiomiocitos</p> <p>Expresión en tumores de ovario.</p>	<p>Altamente expresada en el epitelio del pigmento de la retina.</p> <p>Baja expresión en corazón, Hígado y músculo esquelético.</p>
Dominios conservados	"Frizzled" (rico en cisteína) y NTR	"Frizzled" (rico en cisteína) y NTR	"Frizzled" (rico en cisteína) y NTR	"Frizzled" (rico en cisteína) y NTR

Información obtenida de <http://www.uniprot.org/uniprot>

existe evidencia de que a bajas concentraciones la proteína Sfrp1 es capaz de potenciar la actividad Wingless (Wg), un ortólogo de WNT (Kawano and Kypta, 2003). En un estudio realizado en embriones de *Xenopus*, las proteínas Frzb y Crescent que son miembros de la familia Sfrp que no se encuentran en humanos, promueven la difusión de Wnt8 y Wnt 11 en el espacio extracelular y la activación de la señalización Wnt (Mii and Taira, 2009). Si esta información se extrapola a humanos podría proporcionar evidencia de la participación de las proteínas de la familia SFRP no solo como antagonistas de la ruta WNT sino también como agonistas.

1.6.2.1 Ruta WNT

La familia de proteínas WNT es un grupo de proteínas glicosiladas con dominios ricos en cisteína que pertenecen a una variedad de factores de crecimiento secretados que regulan la diferenciación celular, proliferación, migración, adhesión y organogénesis durante el desarrollo embrionario (Maiese et al., 2008). La ruta WNT se encuentra altamente activa durante el desarrollo embrionario en los procesos de diferenciación y migración celular. En tejidos de adultos la ruta WNT participa en la renovación de células troncales, la formación de hueso y es responsable del mantenimiento de muchos tejidos sanos, se activa en procesos de menstruación e inflamación crónica, la regulación de daño vascular y mecanismos de apoptosis por lo que tiene un impacto en la supervivencia y longevidad celular.

La activación de la ruta ocurre cuando la proteína WNT se une a su receptor transmembranal denominado el receptor FZ. Existen al menos diez isoformas en mamíferos de FZ y dieciséis de WNT, los miembros de esta familia son receptores acoplados a proteína G con un dominio extracelular rico en cisteína (Maiese et al., 2008). Este dominio también existe en muchas otras proteínas que como se había mencionado previamente incluyen a las proteínas SFRP. La activación de la ruta WNT puede ser por medio de la vía canónica. Uno de los puntos en la cascada de señalización WNT es la liberación de β -catenina

de un complejo protéico; cuando esto ocurre la vía de activación es denominada ruta canónica. Cuando la activación de la vía WNT es independiente de la proteína β -catenina y del correceptor LPR5/6 el mecanismo de activación es a través de las rutas no canónicas (Maiese, 2008; Komiya, 2008). Las proteínas de la familia SFRP no se unen a las proteínas WNT de igual forma en términos de especificidad y también se sabe que existen diferentes tipos de interacciones entre éstas. Posiblemente existen moléculas adicionales que modulan estas interacciones *in vivo* (Figura 11) (Uren et al., 2000).

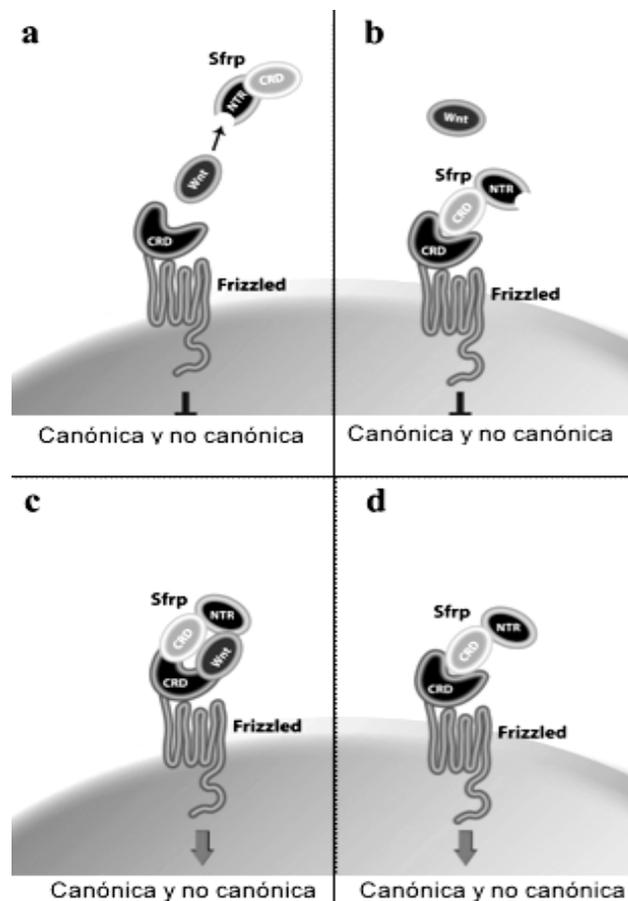


Figura 11. Sitios de unión de SFRP a FZ y a WNT. A) SFRPs antagonizan Wnt uniéndose directamente a Wnt por el dominio relacionado a netrina. B) SFRPs pueden interactuar directamente con FZ a través de CRD y prevenir la transducción de señales C) Frizzled, Wnt y SFRP pueden formar complejos heterotriméricos donde SFRP puede hacer que Wnt Y FZ interaccionen debido a la interacción con ambos dominios CRD y NTR. D) En ausencia de Wnt SFRPs pueden unirse a FZ directamente y promover la señalización canónica y no canónica de Wnt. Modificada de (Lopez-Rios et al., 2008).

1.6.3 Proteínas de la familia SFRP y cáncer de próstata

Los mecanismos moleculares que están involucrados en el desarrollo de CaP están frecuentemente relacionados con la pérdida de control de rutas metabólicas involucradas en mecanismos de apoptosis, inflamación, crecimiento celular, proliferación, adhesión celular, angiogénesis, regulación del ciclo celular, reparación del DNA y receptores de hormonas esteroideas (Perry et al., 2006).

Una de las Rutas que pierde su regulación en CaP es la Ruta WNT que además se ha visto involucrada en el proceso de metástasis a hueso que ocurre en al menos 84% de los pacientes. Algunas de las proteínas WNT son responsables de inducir este proceso (Hall et al., 2006). Además la ruta WNT ha sido relacionada con la progresión hacia CaP AI a través de β -catenina, que es un coactivador del AR. En este sentido también existe información acerca de la actividad de la proteína SFRP1 que inhibe la actividad del AR (Kawano et al., 2009; Robinson et al., 2008).

Las proteínas de la familia SFRP son moduladores de la ruta WNT, por lo tanto estos mecanismos de independencia de andrógenos que involucran β -catenina podrían ser modulados por las proteínas de la familia SFRP (Steve Pilar et al., 2010). Ya que las proteínas de la familia SFRP tienen funciones diferentes en diversos tejidos su papel como genes supresores de tumores actualmente es controversial. En CaP las proteínas SFRP4 y SFRP3 han sido propuestas previamente como supresores tumorales (Horvath et al., 2007; Zi, 2005). El papel de las proteínas de la familia SFRP en CaP no ha sido descrito, sin embargo los mecanismos que modulan son fundamentales para el mantenimiento celular y por lo tanto la pérdida de la función de estas proteínas podría participar en el desarrollo de algunas patologías prostáticas incluyendo CaP.

2.0 JUSTIFICACIÓN

El CaP es una enfermedad con alta incidencia a nivel mundial y en México. Al inicio de la enfermedad el crecimiento tumoral es dependiente de la señalización de andrógenos, sin embargo, existe una transición hacia la independencia de andrógenos para la cual no existe ningún tratamiento, esta forma de cáncer es letal para los pacientes. Los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis son la pérdida del control de rutas que regulan proliferación y muerte celular. Por lo tanto, la regulación de la transcripción de genes que codifican para las proteínas que participan en estos mecanismos es importante para el mantenimiento de las células. La metilación del DNA es un mecanismo epigenético asociado a la represión transcripcional de los genes, y la pérdida de la regulación de este mecanismo forma parte de los procesos de carcinogénesis, tal como el silenciamiento de genes supresores de tumores por hipermetilación del DNA en sus regiones promotoras. Los genes de la familia *SFRP* se han encontrado hipermetilados en muchos tipos de cáncer, lo cual conduce a la pérdida de su expresión. Las proteínas para las que codifican estos genes participan en funciones como la modulación de la ruta WNT, mecanismos de apoptosis y adherencia celular. Por lo tanto es importante la regulación de la expresión de estos genes en los diferentes tipos de cáncer. En el caso particular de CaP no existe hasta la fecha información de la regulación de la expresión de estos genes, por estas razones es que en este trabajo se pretende estudiar el mecanismo de metilación del DNA en estos genes y su correlación con la expresión de los mismos.

3.0 OBJETIVO GENERAL

Determinar el estado de metilación de regiones las promotoras de los genes *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* y *SFRP5* y la correlación con su expresión en líneas celulares de CaP representativas de diferentes estadíos de la carcinogénesis prostática.

4.0 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el estado de metilación de los genes de la familia *SFRP* en líneas celulares de CaP y células normales epiteliales de próstata (NprEC).
- Determinar la expresión de los genes de la familia *SFRP* en líneas celulares de CaP y NprEC.
- Determinar el efecto de la administración de 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC), un agente desmetilante, sobre la expresión de los genes de la familia *SFRP* en las líneas celulares de CaP.
- Correlacionar la metilación de las regiones promotoras de los genes de la familia *SFRP* con su expresión en las líneas celulares de CaP y NprEC.

5.0 HIPÓTESIS

Dado que la metilación de los genes de la familia *SFRP* ha sido asociada con la pérdida de la regulación de su expresión en diferentes tipos de cáncer, entonces es posible que este mecanismo también esté involucrado en la regulación de la expresión de *SFRP* durante las diferentes etapas del cáncer de próstata.

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 12 se muestra el diagrama de flujo que ilustra la metodología experimental que se realizó y en los siguientes párrafos se explica detalladamente cada paso.

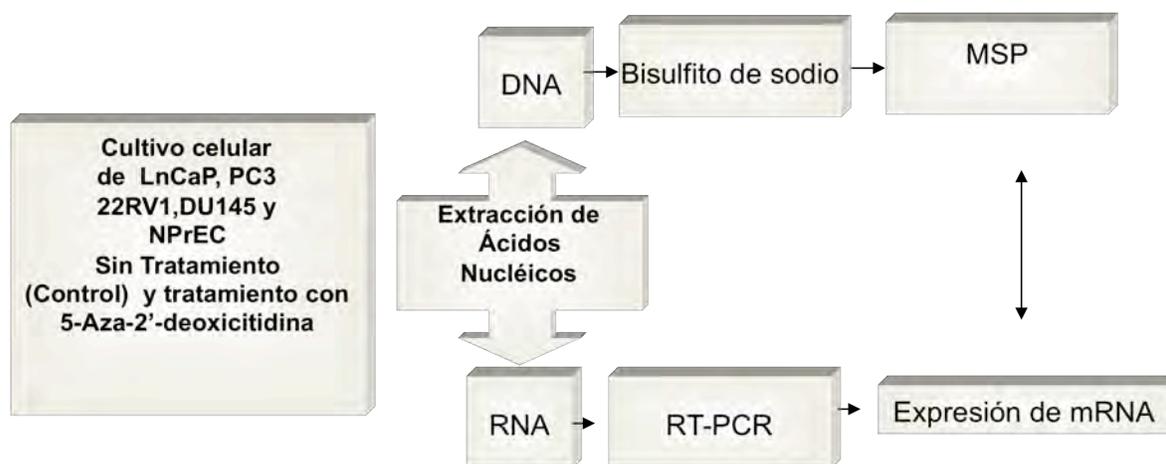


Figura 12. Diagrama de flujo del protocolo experimental. En esta figura se muestra un diagrama de flujo donde se resume el protocolo experimental en este trabajo

EXPERIMENTO 1. Cultivo de líneas celulares de CaP, tratamiento con el agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicidina (DAC).

- **Cultivo de líneas celulares de cáncer de próstata (CaP):** Como control sano se utilizaron células normales epiteliales de Próstata (NPrEC) distribuidas por LONZA y las líneas celulares de CaP LNCaP, PC3, DU145 y 22RV1 distribuidas por American Type Culture Collection (ATCC), cada una de estas líneas corresponden a un estadio diferente de CaP. En la tabla 5 se describe cada línea celular y sus condiciones de cultivo según el proveedor.
- **Tratamiento con 5-Aza-2'-deoxicidina (DAC):** El tratamiento con DAC de Sigma Aldrich de las líneas celulares LNCaP, PC3, DU145 y 22RV1 se

realizó a las concentraciones de 0.5µM, 1.0 µM y 5.0 µM en un volúmen final de 5mL de medio. Al mismo tiempo se cultivó un control de cada línea celular al cual no se le administró DAC. El día 1 y 4 del tratamiento se adicionó DAC con renovación de medio y se recuperó el botón celular el día 8 del tratamiento (Mengchu Wu et al., 2004)

Tabla 5. Características y condiciones de cultivo de cada una de las líneas celulares de CaP utilizadas.

Línea celular	Características	Condiciones de cultivo
NPreC	Células normales epiteliales de próstata	Medio "Epithelial Cell Basal Medium" distribuído por LONZA y adicionado con los siguientes suplementos también distribuídos por LONZA (PrEGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors): BPE, 2 mL, hidrocortisona, 0.5 mL; hEGF, 0.5 mL; Epinefrina, 0.5 mL; Transferrina, 0.5 mL; Insulina, 0.5 mL; Ácido Retinóico, 0.5 mL; triyodotironina, 0.5 mL; GA-1000, 0.5 mL.
LNCaP	Hipotetraploide, extraída de metástasis de carcinoma de próstata a nódulo linfático. Estas células responden a 5-α-dihidrotestosterona, no producen una capa uniforme, son positivas a AR y a ER (Receptor de estrógenos)	Medio RPMI adicionado con L-glutamina 2mM, suero fetal bovino (FBS) al 10%, piruvato de sodio 1mM, HEPES 10mM, glucosa 4.5 g/L y bicarbonato 1.5g/L.
PC3	Línea celular casi triploide, extraída de un adenocarcinoma prostático grado IV con metástasis a hueso, poca actividad de fosfatasa ácida y de 5-α-testosterona reductasa.	Medio F-12K, adicionado con FBS al 10%.
DU145	Línea celular hipotriploide e insensible a hormonas, extraída de carcinoma de próstata con metástasis a cerebro.	Medio mínimo esencial de Eagle, adicionado con FBS al 10%.
22RV1	Línea celular de carcinoma epitelial de próstata humano que fue insertado y propagado serialmente en ratones después de haber sido castrados, esta línea expresa antígeno prostático específico (PSA).	Medio RPMI-1640 adicionado con FBS al 10%.

Información obtenida de los proveedores LONZA para NPreC y ATCC para el resto de las líneas celulares de CaP

- **Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos:** La extracción de ácidos nucleicos (DNA y RNA) se realizó utilizando All Prep DNA/RNA Mini

Kit de Quiagen siguiendo el protocolo del mismo. Al finalizar la extracción se cuantificaron los ácidos nucleicos utilizando el equipo Nanodrop.

EXPERIMENTO 2. Expresión de los genes de la familia *SFRP* en líneas celulares de CaP

- **Retrotranscripción (RT):** a partir del RNA obtenido en la extracción de ácidos nucleicos se utilizó la enzima Super Script II RT de Invitrogen .
- **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** utilizando el cDNA obtenido de la RT se realizó una PCR punto final para la expresión para los genes *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* , *SFRP5* y *18S*. La PCR se realizó utilizando la enzima Taq Gold polimerasa de Applied Biosystems, siguiendo las condiciones que indica el protocolo. Para cada gen se estableció previamente la T_m adecuada y se realizó una curva de ciclos para estandarizar las condiciones de termociclado de cada gen (Ver Anexo B). Las condiciones establecidas se encuentran en la tabla 6. Cada experimento se realizó por triplicado para confirmar la reproducibilidad de los resultados. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2.5% teñidos con bromuro de etidio.
- **Expresión Relativa:** Para cuantificar la expresión de cada uno de los genes se midió la densidad óptica de cada banda utilizando el programa Scion Image. Para hacer los cálculos de expresión relativa se utilizó el gen constitutivo *18S*. Finalmente para el análisis estadístico se determinaron los promedios y los errores estándar de los cocientes de cada gen entre el gen constitutivo *18S*. Para ello se utilizó el programa GraphPad Prism Software y se realizó un análisis de ANOVA de una vía y T de Tukey.

•

EXPERIMENTO 3. Evaluación del estado de metilación de los promotores de los genes de la familia SFRP.

- **Tratamiento con bisulfito:** Para realizar la conversión de citosinas a uracilos, el DNA fue tratado con bisulfito de sodio utilizando el DNA methylation Gold Kit de Zymo researchers, a dicha modificación son resistentes las 5-meC.

- **PCR específica para metilación (MSP):** Se realizó una PCR específica para metilación (MSP) utilizando el DNA modificado con bisulfito de sodio. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para metilación (M) y no metilación (U) utilizando el programa de acceso libre Methprimer (Li and Dahiya, 2002). Para la amplificación de los fragmentos se utilizó la enzima Taq Gold polimerasa de Applied Biosystems. Para cada par de oligonucleótidos se establecieron las condiciones adecuadas mostradas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones establecidas para MSP y RT-PCR

Oligonucleótidos para MSP				
	Secuencia (5'→3')	Tm	Ciclos	Tamaño (pb)
SFRP2UF	TTTTGGGTTGGAGTTTTTTGGAGTTGTGT	54°C	40	142
SFRP2UR	AACCCACTCTCTTCACTAAATACAACCTCA			
SFRP2MF	GGGTCCGAGTTTTTCGGAGTTGCGC	54°C	40	136
SFRP2MR	CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG			
SFRP1UF	GTTTTGTAGTTTTTTGGAGTTAGTGTGTGT	54°C	40	135
SFRP1UR	CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA			
SFRP1MF	TGTAGTTTTTCGGAGTTAGTGTGCGCGC	54°C	40	126
SFRP1MR	CCTACGAYCGAAAACGACGCGAACG			
SFRP4UF	GGGGGTGATGTTATTGTTTTGTATTGAT	54°C	40	116
SFRP4UR	CACCTCCCCTAACATAAACTCAAAACA			
SFRP4MF	GGGTGATGTTATCGTTTTTGTATCGAC	54°C	40	112
SFRP4MR	CCTCCCCTAACGTAACTCGAAACG			
SFRP5UF	GTAAGATTTGGTGTTGGGTGGGATGTTT	54°C	40	141
SFRP5UR	AAAACCTCCAACCCAAACCTCACCATACA			
SFRP5MF	AAGATTTGGCGTTGGGCGGGACGTTT	54°C	40	136
SFRP5MR	ACTCCAACCCGAACCTCGCCGTACG			
Oligonucleótidos para expresión				
SFRP2F	ATGATGATGACAACGACATAATG	60°C	40	316
SFRP2R	ATGCGCTTGAACCTCTCTCTGC			
SFRP1F	CCAGTTTGCATTTGGATGTG	56°C	35	165
SFRP1R	GGTCAGAACGGCCAGTATGT			
SFRP4F	GCCTGGGACAGCCTATGTAA	56°C	35	172
SFRP4R	TCTGTACCAAGGGCAAACC			
SFRP5F	TGGAGCCCAGAAAAGAAGA	56°C	40	246
SFRP5R	GCAGGGGTAGGAGAACATGA			

7.0 RESULTADOS

7.1 Cultivo de líneas celulares de CaP y NPrEC.

El día ocho del tratamiento con DAC, día en que se recolectó el botón celular, se tomaron las fotografías de las líneas celulares tratadas con DAC (Figura 13). No existen cambios en la morfología de las mismas y cualitativamente únicamente en LNCaP se observa menor proliferación al incrementar la concentración de DAC. En el resto de las líneas celulares no existen diferencias en la proliferación inducidos por la administración del tratamiento.

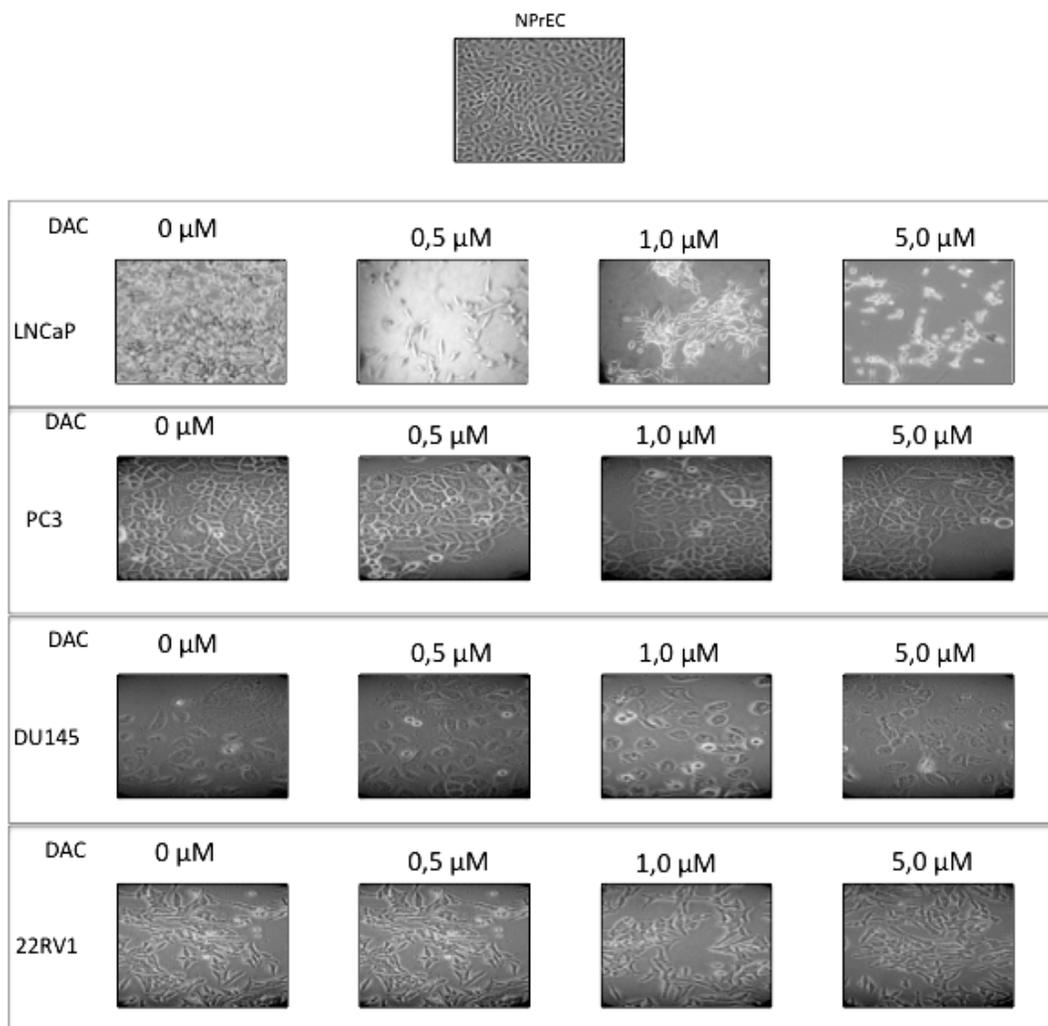


Figura 13 Líneas celulares de CaP y NPrEC tratadas con DAC al día 8 del tratamiento En la imagen se observan las células al día 8 del tratamiento, antes de la recolección. No hay cambios en la morfología celular ni en la proliferación celular

Al final de esta sección se resumen todos los resultados de expresión y metilación de este trabajo (Tablas 7, 8 y 9).

7.2 Expresión de *SFRP1*

El gen *SFRP1* se expresa en todas las líneas celulares sin tratamiento de CaP y en la línea control NPrEC (Figura 14A). En las líneas celulares tratadas con DAC *SFRP1* incrementa su expresión al incrementar la concentración de DAC desde 0.5 μ M en LNCaP y PC3 (Figura 14B y C). En DU145 incrementa la expresión a partir del tratamiento con con 1.0 μ M de DAC, y en 22RV1 incrementa su expresión a partir de la concentración 0.5 μ M (Figura 15). Estos cambios únicamente son significativos en LNCaP.

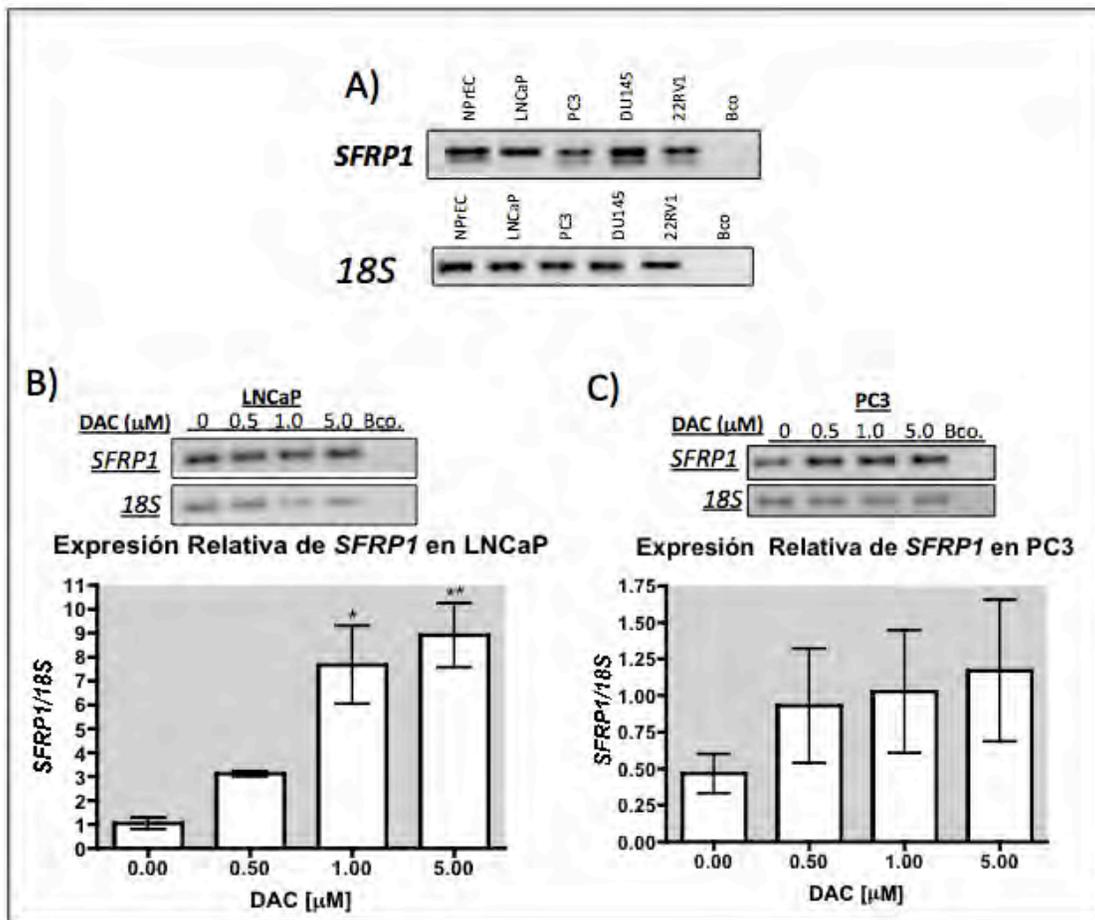


Figura 14. Análisis de expresión de *SFRP1*. A) Expresión de *SFRP1* y *18S* en líneas celulares de CaP y NPrEC. B) (*)Diferencia significativa de la expresión relativa de *SFRP1* en LNCaP tratadas con 5.0 mM respecto al control ($P < 0.01$). (**) Diferencia significativa de LNCaP tratadas con 5.0 mM de DAC respecto al control ($P < 0.01$) y respecto al tratamiento con 0.5 mM de DAC ($P < 0.05$). C) No hay diferencia significativa de la expresión de *SFRP1* en PC3 tratada con diferentes concentraciones de DAC.

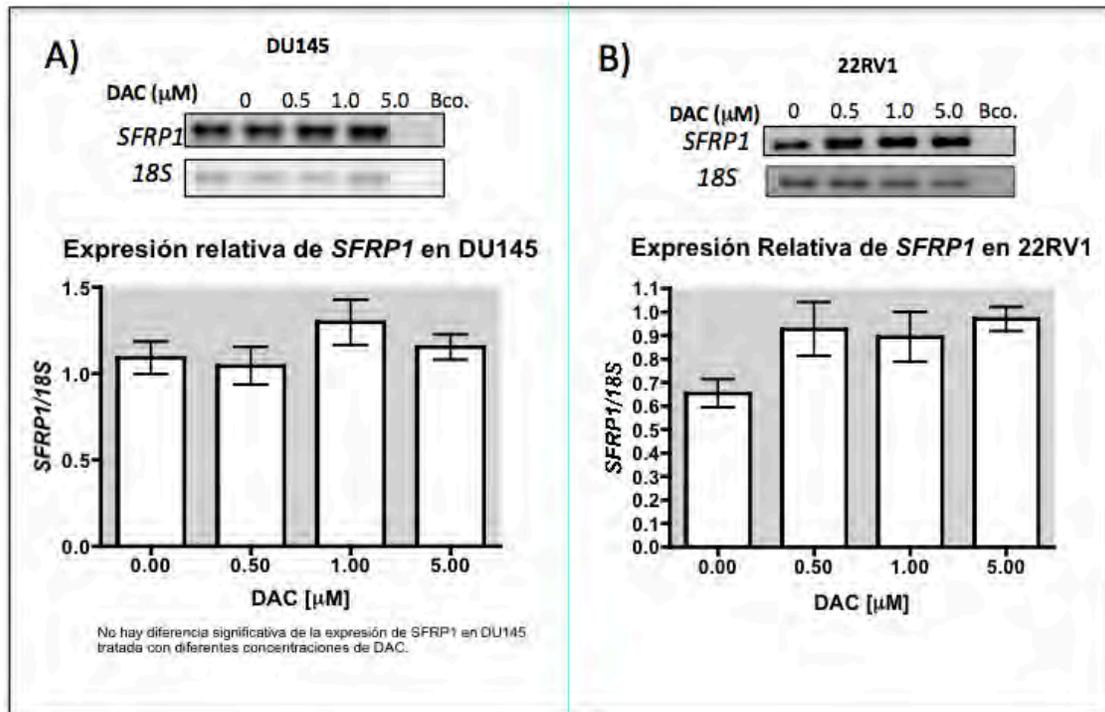


Figura 15. Expresión de *SFRP1* en DU145 y 22RV1 tratadas con DAC. A) No hay diferencia significativa de la expresión de *SFRP1* en DU145 tratada con diferentes concentraciones de DAC. B) No hay diferencia significativa de la expresión de *SFRP1* en 22RV1 tratada con diferentes concentraciones de DAC.

7.3 Metilación de *SFRP1*

Se encontraron tres CGI localizadas en la región promotora de *SFRP1* y el exón1. Los oligonucleótidos se diseñaron en regiones cercanas al sitio del inicio de la transcripción en el exón 1 (Figura 16A). La región promotora de *SFRP1* está desmetilada en NPrEC y LNCaP y la metilación incrementa en las líneas celulares Al PC3, DU145 y 22RV1 (Figura 16B).

7.4 Expresión de *SFRP2*

El gen *SFRP2* no se expresa en ninguna línea celular sin tratamiento ni en la línea control NPrEC (Figura 17A). *SFRP2* únicamente se expresa en PC3 tratada con 1.0 μM y 5.0 μM de DAC (Figura 17C). En el resto de las líneas celulares no hay expresión de *SFRP2* ni en el control sin tratamiento ni en las líneas celulares tratadas con diferentes concentraciones de DAC (Figura 17B y 17C).

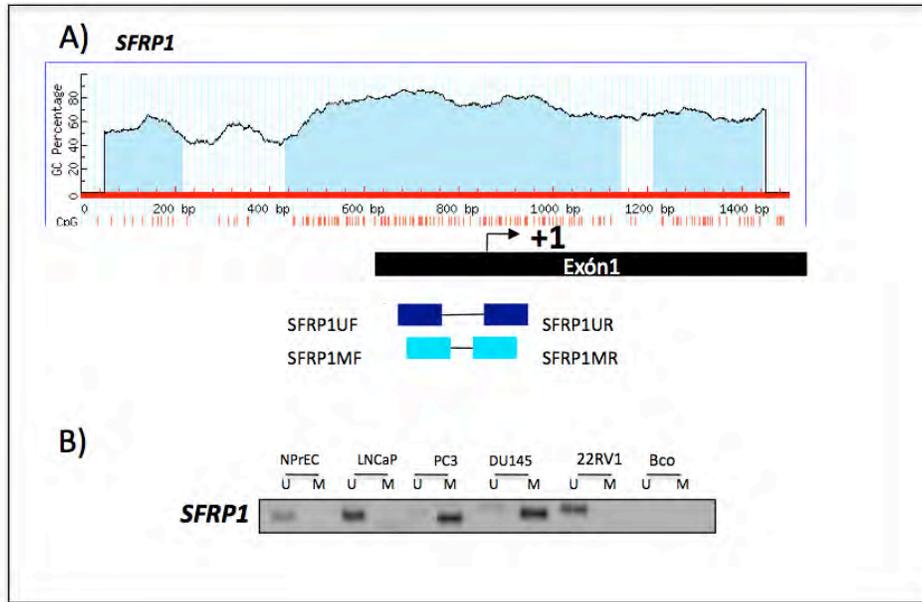


Figura 16. Análisis del estado de metilación de *SFRP1*. A) Análisis de CGI para la región promotora de *SFRP1*. Los oligonucleótidos para la PCR sensible a metilación (MSP) amplifican una región en el exón 1, en azul fuerte se muestran los que amplifican el fragmento no metilado y en azul claro los que amplifican el fragmento metilado. B) Análisis de metilación de la región promotora de *SFRP1* por MSP.

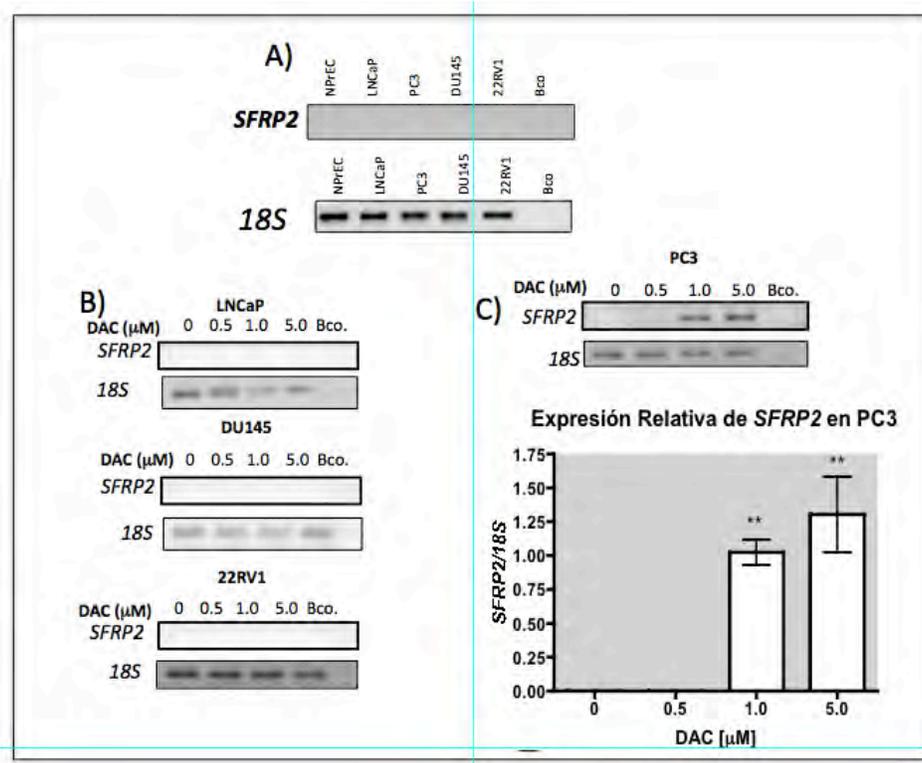


Figura 17. Expresión de *SFRP2* en líneas celulares de CaP. A) No hay expresión de *SFRP2* ni en NPrEC, LNCaP, PC3, DU145 y 22RV1. B) No hay expresión de *SFRP2* en LNCaP, DU145 ni en 22RV1 tratadas con DAC. C) (**) Diferencia significativa de la expresión de *SFRP2* en PC3 tratada con 1.0 μM y 5.0 μM de DAC respecto al control sin tratamiento y respecto al tratamiento con 0.5 μM de DAC ($P < .01$)

7.5 Metilación de *SFRP2*

En la región promotora de *SFRP2* se encontraron dos CGI una antes del exón 1 y la segunda en el exón 1. Los oligonucleótidos se diseñaron en el exón 1 antes del sitio de inicio de la transcripción (Figura 18A). El gen *SFRP2* se encuentra desmetilado únicamente en NPrEC, en el resto de las líneas celulares hay incremento del alelo metilado. También hay amplificación del alelo no metilado pero en menor proporción (Figura 18B).

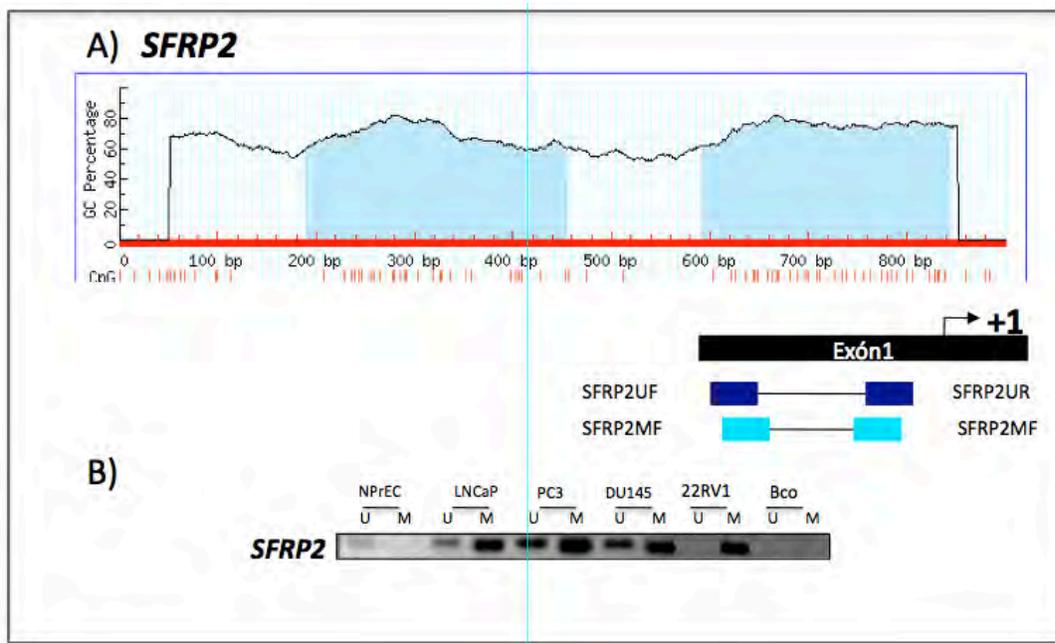


Figura 18. Análisis del estado de metilación de *SFRP2*. A) Análisis de CGI para la región promotora de *SFRP2*. Los oligonucleótidos para la PCR sensible a metilación amplifican una región en el exón 1, en azul fuerte se muestran los que amplifican el fragmento no metilado y en azul claro los que amplifican el fragmento metilado. B) Análisis de metilación de la región promotora de *SFRP2* por MSP.

7.6 Expresión de *SFRP4*

El gen *SFRP4* se expresa en todas las líneas celulares de CaP sin tratamiento y en NPrEC (Figura 19A). Tanto en LNCaP como en PC3 hay incremento gradual de la expresión de *SFRP4* al incrementar la concentración de DAC. Estos cambios son significativos únicamente para LNCaP tratada con 1.0 μ M y 5.0 μ M. Respecto al tratamiento con 0.5 μ M de DAC y respecto al control no tratado (Figura 19B y 19C). La expresión de *SFRP4* en DU145 se incrementa al administrar el tratamiento con DAC 1.0 μ M, aunque ningún cambio es significativo (Figura 20A). En 22RV1 *SFRP4* se expresa más al administrar el tratamiento con 0.5 μ M y 5.0 μ M que respecto al control no

tratado. Sólomente este último cambio es significativo. Estos resultados demuestran el incremento de la expresión de *SFRP4* al agregar el agente desmetilante (Figura 20B).

7.7 Metilación de *SFRP4*

No se encontraron CGI en la región promotora de *SFRP4* cercanas al sitio del inicio de la transcripción, se encontró una isla CpG en el exón 3 y fue la región en la cual se diseñaron los oligonucleótidos para el análisis de metilación (Figura 21A). El gen *SFRP4* se encuentra desmetilado en todas las líneas celulares y únicamente en PC3 hay también amplificación del alelo metilado aunque en menor proporción que el no metilado (Figura 21B).

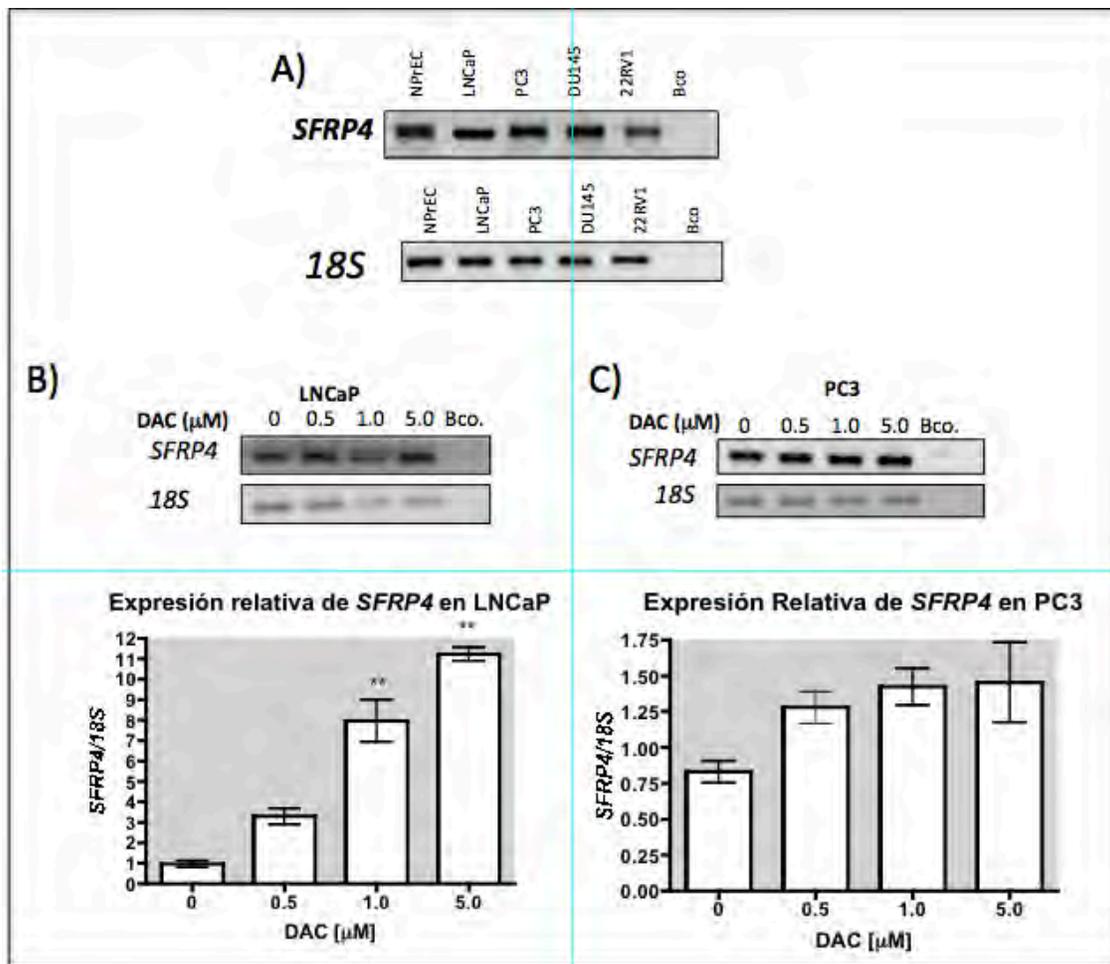


Figura 19. Expresión de *SFRP4* en LNCaP y PC3 tratadas con DAC. A) Expresión de *SFRP4* y *18S* en todas las líneas celulares de CaP y NPrEC. B) (**Diferencia significativa de la expresión de *SFRP4* en LNCaP tratada con 1.0mM y 5.0mM de DAC respecto al control sin tratamiento ($P < 0.001$) y respecto al tratamiento con 0.5mM de DAC ($P < 0.01$ para 1.0mM de DAC; $P < 0.001$ para 5.0 mM de DAC). C) No hay diferencia significativa de la expresión relativa de *SFRP4* en PC3 tratada con diferentes concentraciones de DAC.

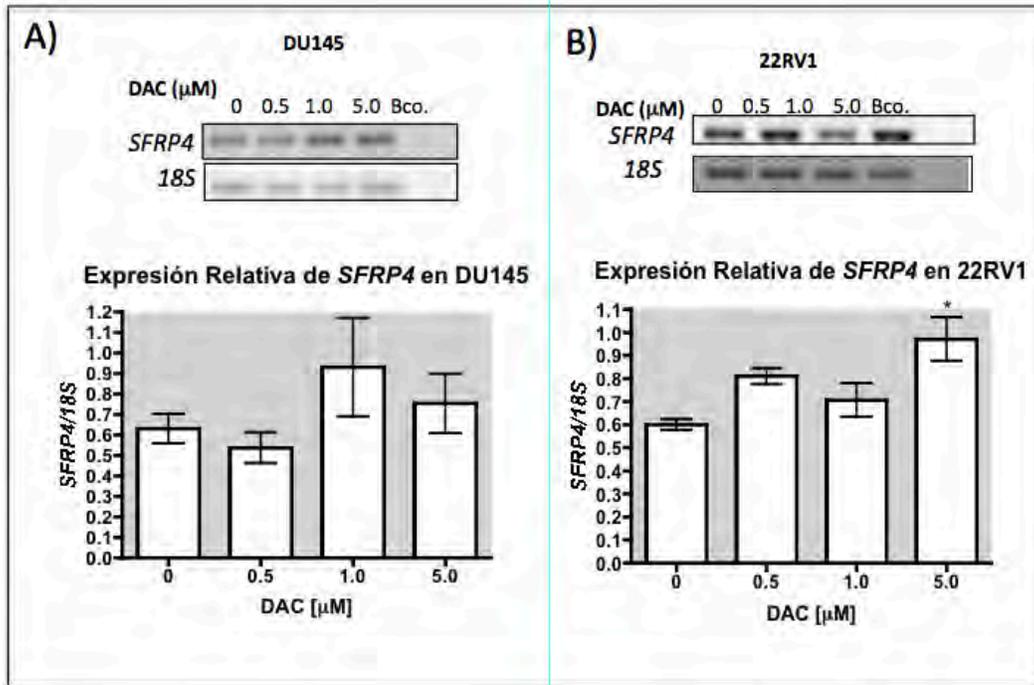


Figura 20. Expresión de *SFRP4* en DU145 y 22RV1 tratadas con DAC. A) No hay diferencia significativa de la expresión de *SFRP4* en DU145 tratada con diferentes concentraciones de DAC. B) (*)Diferencia significativa de la expresión de *SFRP4* en 22RV1 tratada con 5.0mM de DAC respecto al control no tratado ($P < 0.05$)

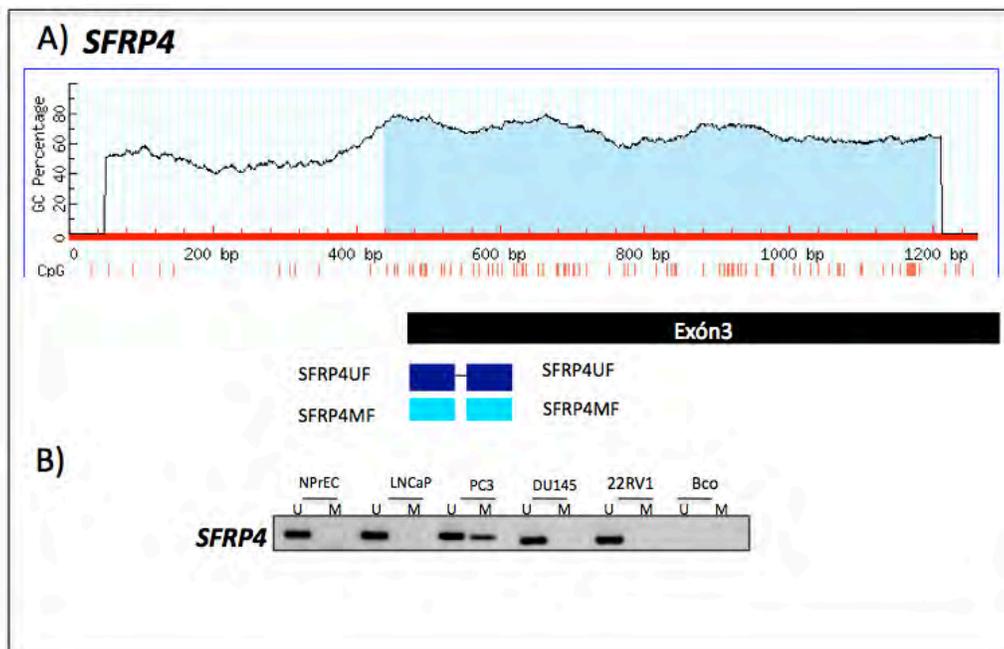


Figura 21. Análisis del estado de metilación de *SFRP4*. A) Análisis de CGI para la región promotora de *SFRP4*. Los oligonucleótidos para la PCR sensible a metilación (MSP) amplifican una región en el exón 3, en azul fuerte se muestran los que amplifican el fragmento no metilado y en azul claro los que amplifican el fragmento metilado. B) Análisis de metilación de la región promotora de *SFRP4* por MSP.

7.8 Expresión de *SFRP5*

El gen *SFRP5* se expresa en todas las líneas celulares de CaP no tratadas y en NPrEC (Figura 22A). Hay incremento de la expresión de *SFRP5* en LNCaP tratada con 1.0 μ M y 5.0 μ M de DAC en el medio de cultivo, estos cambios son significativos respecto al control no tratado y respecto a LNCaP tratada con 0.5 μ M (Figura 22B). En PC3 hay incremento de la expresión de *SFRP5* al incrementar la concentración de DAC administrada al medio de cultivo, ninguno de estos cambios son significativos (Figura 22C). La expresión de *SFRP5* aumenta significativamente respecto al control no tratado al adicionar el tratamiento de DAC 1.0 μ M en el medio de cultivo de DU145 (Figura 23A). En 22RV1 hay incremento de la expresión de *SFRP5* al administrar los tratamientos de DAC a las concentraciones 0.5 μ M, 1.0 μ M y 5.0 μ M, respecto al control no tratado (Figura 23B).

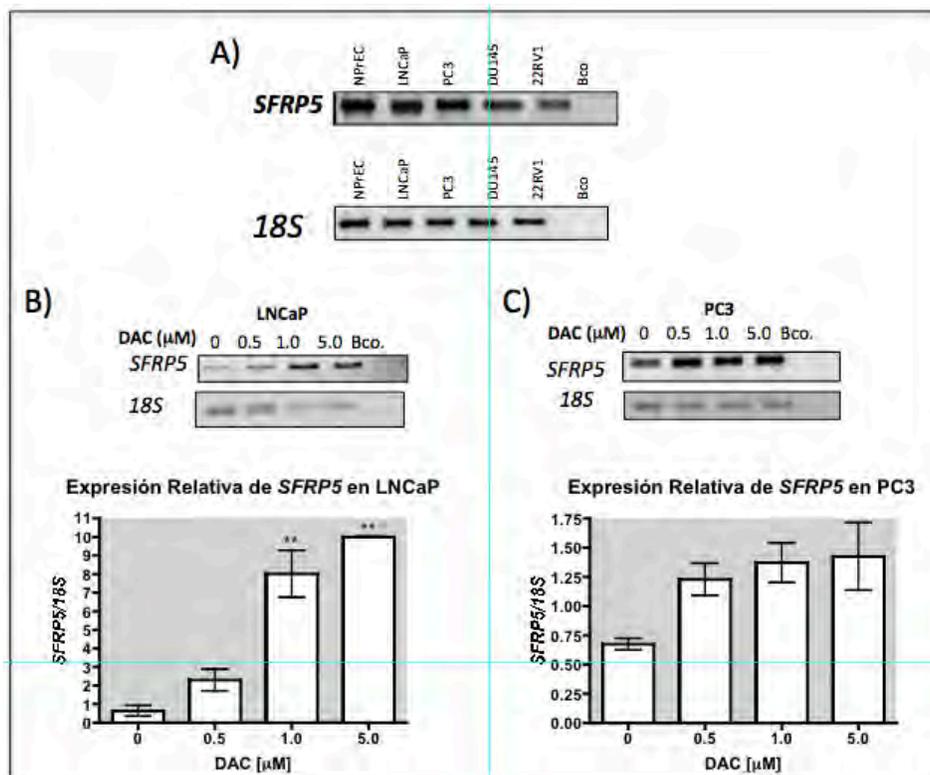


Figura 22. Expresión de *SFRP5* en LNCaP y PC3 tratadas con DAC. A) (**Diferencia significativa de la expresión de *SFRP5* en LNCaP tratadas con 1.0 μ M y 5.0 μ M de DAC respecto al control no tratado ($P < 0.001$) y respecto a 22RV1 tratada con 0.5 μ M de DAC ($P < 0.001$ para el tratamiento con 1.0 μ M de DAC; $P < 0.01$ para el tratamiento con 0.5 μ M de DAC). B) No existe diferencia significativa de la expresión de *SFRP5* en PC3 tratada con diferentes concentraciones de DAC.

7.9 Metilación de *SFRP5*

Se encontró una CGI que abarca la región promotora y parte del exón 1 del gen *SFRP5*, los oligonucleótidos se diseñaron en una región río arriba del inicio del exón 1 (Figura 24A). La región promotora de *SFRP5* está desmetilada en NPrEC, en el resto de las líneas celulares hay amplificación de ambos alelos. En LNCaP y DU145 hay mayor proporción del alelo metilado a diferencia de PC3 y 22RV1 en las cuales *SFRP5* se encuentra desmetilado en mayor proporción (Figura 24B).

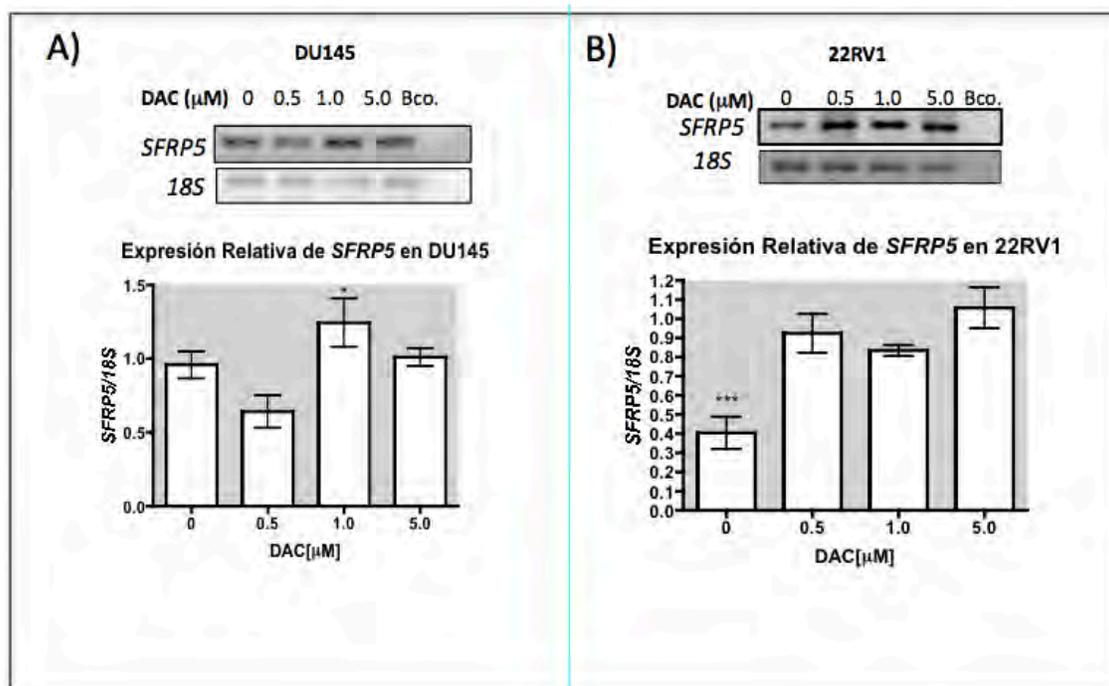


Figura 23. Expresión de *SFRP5* en DU145 y 22RV1 tratadas con DAC. A) (*)Diferencia significativa de la expresión de *SFRP5* en DU145 tratada con 1.0 μM de DAC respecto al tratamiento con 0.5 μM de DAC ($P < 0.05$). B) (***) Diferencia significativa de la expresión de *SFRP5* en 22RV1 tratada con 0.5 μM , 1.0 μM y 5.0 μM de DAC respecto al control sin tratamiento ($P < 0.05$ para 22RV1 tratada con 0.5 μM y 1.0 μM ; $P < 0.01$ para 22RV1 tratada con 5.0 μM de DAC).

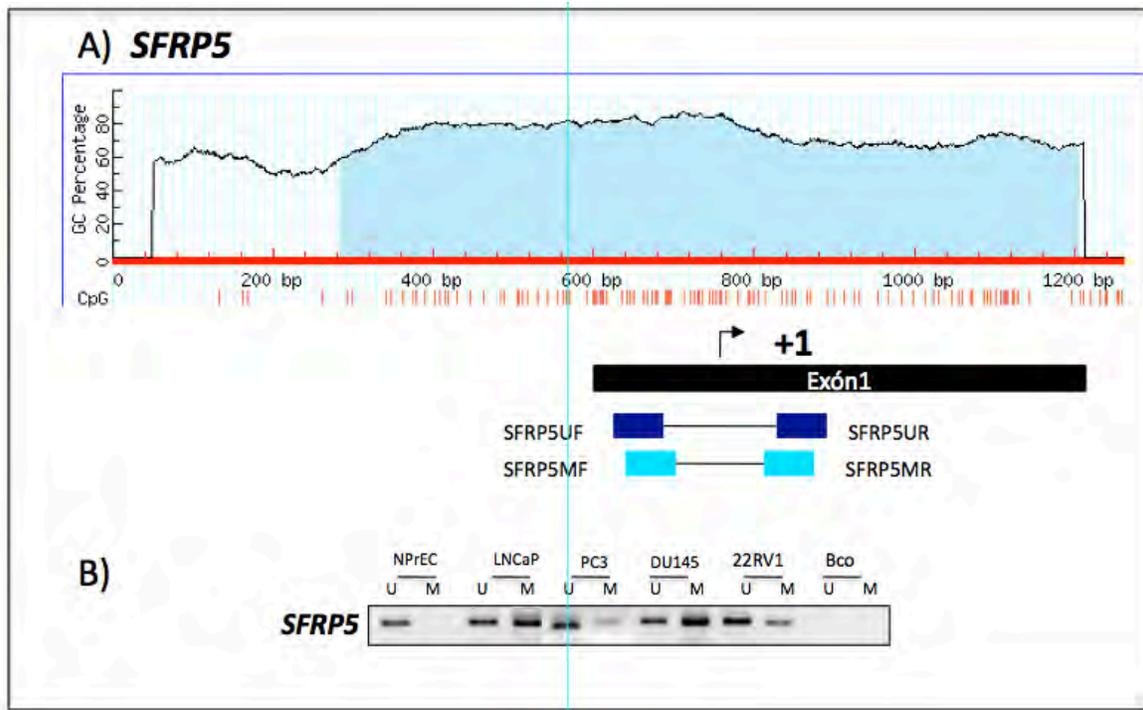


Figura 24. Análisis del estado de metilación de *SFRP5*. A) Análisis de CGI para la región promotora de *SFRP5*. Los oligonucleótidos para la PCR sensible a metilación amplifican una región en el exón 1, en azul fuerte se muestran los que amplifican el fragmento no metilado y en azul claro los que amplifican el fragmento metilado. B) Análisis de metilación de la región promotora de *SFRP5* por MSP.

En las tablas 7, 8 y 9 se resumen todos los resultados de metilación y expresión de los genes de la familia SFRP en las líneas celulares de CaP y NPrEC.

Tabla 7. Expresión de los genes de la familia *SFRP* en líneas celulares de CaP y NPrEC

	NPrEC	LNCaP	PC3	DU145	22RV1
<i>SFRP1</i>	+	+	+	+	+
<i>SFRP2</i>	-	-	-	-	-
<i>SFRP4</i>	+	+	+	+	+
<i>SFRP5</i>	+	+	+	+	+

(+) Sí hay expresión del gen; (-) No hay expresión del gen.

Tabla 8. Expresión de los genes de la familia SFRP al añadir el tratamiento de DAC

	LNCaP	PC3	DU145	22RV1
SFRP1	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (S)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (NS)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (NS)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (NS)
SFRP2	No hay efecto por la administración de DAC	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (S)	No hay efecto por la administración de DAC	No hay efecto por la administración de DAC
SFRP4	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (S)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (NS)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (NS)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (S)
SFRP5	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (S)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (NS)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (S)	Incremento de la expresión al añadir el tratamiento con DAC (S)

S: cambio significativo; NS: cambio no significativo.

Tabla 9. Metilación de los genes de la familia SFRP

	NPrEC	LNCaP	PC3	DU145	22RV1
SFRP1	U	U	M	U/M	U
SFRP2	U	U/M	U/M	U/M	M
SFRP4	U	U	U/M	U	U
SFRP5	U	U/M	U/M	U/M	U/M

U: No metilado; M: Metilado; Nota: En negritas se marca el alelo con mayor proporción

8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La expresión del gen constitutivo *18S* se ve afectada en la línea celular LNCaP, ya que al incrementar la concentración de DAC disminuye su expresión. Esto correlaciona con la disminución en la proliferación de esta línea celular por el tratamiento con DAC. Este gen se empleó para realizar los cálculos de expresión

relativa. Los resultados de la expresión de los genes de la familia *SFRP* en la línea celular LNCaP se ven afectados por el empleo del constitutivo *18S*, ya que pareciera que los cambios en la expresión de los genes de la familia *SFRP* son muy drásticos. Estos cambios en la expresión del gen constitutivo *18S* inducidos por el tratamiento con DAC han sido recientemente demostrados en otros estudios (Kastl et al., 2010).

8.1 Metilación de *SFRP1* y expresión

En todas las líneas celulares de CaP y NPrEC hay expresión del gen *SFRP1*. Al incrementar la concentración de DAC hay incremento de la expresión del gen con diferencia significativa en la línea celular LNCaP (AD). En el resto de las líneas celulares se observa la misma tendencia sin embargo estos cambios no son significativos. Estos resultados en conjunto sugieren que la metilación del DNA es un mecanismo involucrado en la regulación transcripcional de *SFRP1*. Existen estudios previos en líneas celulares de CaP en los cuales la expresión del gen *SFRP1* ya ha sido reportada. En uno de estos estudios reportan que hay disminución de la expresión del gen *SFRP1* en las líneas celulares de CaP respecto al control sano.

La administración de DAC y Tricostatina A (TSA) en el medio de cultivo de estas líneas celulares indujo la expresión de *SFRP1* y la disminución de la proliferación de las líneas celulares PC3 y DU145 (líneas celulares AI). (Lodygin et al., 2005). En otro estudio la expresión del gen *SFRP1* inhibió la proliferación de líneas celulares de CaP AD pero no las AI, resultado opuesto al mostrado por Lodygin D. y sus colaboradores en el 2005, siendo controversial la participación de *SFRP1* en la proliferación celular de las líneas celulares de CaP de CaP (Kawano et al., 2009). La expresión del gen *SFRP1* es diferencial durante el desarrollo de la próstata en ratones, en donde durante el inicio del desarrollo se expresa en mayor cantidad y disminuye en el tejido prostático de ratones adultos. En humanos en el estroma y epitelio de tumores prostáticos hay mayor expresión de este gen que en el estroma asociado a tejido sano (Joesting et al., 2005). Aunque estos estudios revelan la importancia de la expresión del gen *SFRP1* en tejido prostático, aún es controversial el nivel de expresión de este gen y su participación en el desarrollo de CaP.

En las líneas celulares de CaP AI hay metilación de *SFRP1*, pero no en LNCaP (AD) ni en NPrEC (control sano). Por lo que el estado de metilación de *SFRP1* podría

ser evaluado como un posible marcador temprano de carcinogénesis e incluso en la transición AD hacia AI. Los resultados de metilación obtenidos en este trabajo concuerdan con los reportadas previamente para las líneas celulares de CaP (Costa et al., 2010; Lodygin et al., 2005). Estos mismos estudios se han realizado en muestras de tumores. En un estudio realizado con muestras de pacientes con CaP y HPB se reportó hipermetilación del DNA en la región promotora de *SFRP1* con una frecuencia del 83%, el estado de metilación fue asociado a la represión transcripcional del gen. (Lodygin et al., 2005). Contrario a lo publicado por Lodygin *et al.* en el 2005 y a la hipótesis planteada en este trabajo, en un estudio realizado recientemente se encontró mayor grado de metilación en muestras de tejido normal de próstata que en muestras de carcinoma prostático (Costa et al., 2010). Las diferencias entre ambos estudios podrían deberse a factores metodológicos o diferencias poblacionales. En el estudio de Lodygin *et al.* 2005 únicamente se evalúan casos de hiperplasia prostática benigna mas no de tejido sano, además que el tejido fue obtenido de la zona central y no de la zona periférica epitelial que es donde se originan la mayor parte de los tumores de CaP (Costa et al., 2010). Estos estudios demuestran que la metilación del DNA en la región promotora del gen *SFRP1* podría ser evaluada como un posible marcador de desarrollo de CaP, pero aún se debe determinar como son los patrones de metilación de este gen en el tejido prostático sano comparado con el de tumores de CaP.

No existe una relación directa entre el grado de metilación de las líneas celulares con el de su expresión, esto sugiere la existencia de mecanismos alternos de la regulación de la expresión de *SFRP1*. Entre estos mecanismos pueden estar incluidos las modificaciones covalentes de histonas. Tal como fue demostrado previamente al incrementar la expresión de *SFRP1* después de un tratamiento con TSA, un agente que promueve la desacetilación de histonas (Lodygin et al., 2005).

La expresión de la proteína *SFRP1* no se asocia exclusivamente a la regulación de la activación de la ruta Wnt, también existe una interacción directa con el receptor de andrógenos ya que se sabe que disminuye la actividad transcripcional del mismo por un mecanismo aún desconocido. Esta información destaca la importancia de esta

proteína en la patogénesis del CaP. (Kawano et al., 2009). Además se sabe que esta proteína también participa en la comunicación estroma-epitelio prostático y que la pérdida de esta comunicación es un mecanismo muy importante que participa en el desarrollo de CaP (Joesting et al., 2005).

8.2 Metilación de *SFRP2* y expresión

No hay expresión de *SFRP2* en ninguna de las líneas celulares de CaP ni en NPrEC. Al realizar el tratamiento con DAC únicamente en PC3 se observa expresión de *SFRP2* a las concentraciones de 1.0 μ M y 5.0 μ M, estos cambios son significativos, estos resultados confirman la participación de la metilación del DNA en la región promotora de *SFRP2* en la regulación transcripcional del mismo. En un estudio anterior se reportó que la proteína *SFRP2* y el gen *SFRP2* se expresan altamente al inicio del desarrollo prostático en ratones y que en la etapa adulta disminuye. Extrapolando estas observaciones a la próstata humana, los resultados de este trabajo sugieren que el gen *SFRP2* no se expresa o se expresa en cantidades muy bajas en las células prostáticas epiteliales normales y no hay cambios de la expresión del gen *SFRP2* en CaP (Warr et al., 2009).

Los resultados de metilación del DNA en la región promotora del gen *SFRP2* indican que hay incremento de la metilación de *SFRP2* desde el inicio de la carcinogénesis sin importar la transición hacia la independencia de andrógenos, siendo la metilación de *SFRP2* un posible candidato a ser evaluado como un marcador de carcinogénesis temprana. Aunque los resultados del tratamiento con DAC en líneas celulares de CaP sugieren que la expresión de *SFRP2* es regulada por mecanismos de metilación en su región promotora, existen mecanismos alternos que inducen la represión transcripcional de *SFRP2* en la próstata.

8.3 Metilación de *SFRP4* y expresión

Hay expresión de *SFRP4* en las diferentes líneas celulares de CaP y en NPrEC. Al añadir el tratamiento con DAC existe incremento de la expresión del gen *SFRP4* al aumentar las concentraciones del agente desmetilante. Únicamente existe diferencia significativa en la línea celular 22RV1 a la concentración de 5.0 μ M respecto al control

no tratado y en LNCaP. En el resto de las líneas celulares se observa la misma tendencia al tratar las líneas celulares con DAC, aunque estos cambios no son significativos. Estos resultados sugieren que la metilación del DNA participa en la regulación de la expresión de este gen. En todas las líneas celulares de CaP y NPrEC, el gen *SFRP4* se encuentra desmetilado. Únicamente en PC3 hay también amplificación del alelo metilado aunque en menor proporción. Los resultados de metilación del gen *SFRP4* indican que la región evaluada localizada en el exón 3 del gen *SFRP4* no cambia hasta un estadio de CaP mas avanzado como el que representa PC3, una línea celular de CaP AI con metástasis a hueso. Esta región fue seleccionada ya que no se encontró una CGI mas cercana al sitio de inicio de la transcripción, sin embargo podrían existir otras regiones mas cercanas al sitio de inicio de la transcripción cuyos patrones de metilación se modifiquen desde el inicio del desarrollo de la enfermedad.

La participación de la proteína *SFRP4* en la carcinogénesis prostática ha sido demostrada previamente. Al incrementar su expresión en LNCaP y PC3, existen cambios morfológicos en las líneas celulares y disminuye la velocidad de proliferación celular así como la invasividad de las mismas. La expresión de *SFRP4* promueve la localización membranal de β -catenina y cadherinas, moléculas que están involucradas en la adhesión celular (Horvath et al., 2007).

8.4 Metilación de *SFRP5* y expresión

Los resultados de expresión del gen *SFRP5* al añadir el tratamiento con DAC en todas las líneas celulares de CaP sugieren que la expresión de *SFRP5* es regulada por mecanismos de metilación en su región promotora, ya que incrementa la expresión del gen significativamente en LNCaP, DU145 y 22RV1 sin embargo deben existir mecanismos alternos que regulen la transcripción de *SFRP5*. A la fecha no existen estudios de la regulación epigenética ni de la expresión de *SFRP5* en CaP ni en tejido de próstata normal de adulto, ni de su posible participación en CaP, al ser *SFRP5* regulador de la activación de WNT podría tener una influencia importante en la patogénesis de CaP como se ha estudiado para otros miembros de la familia *SFRP*. En

NPrEC no hay metilación de *SFRP5*. En las líneas celulares CaP hay incremento del alelo metilado de *SFRP5*. Habiendo mayor proporción de este en las líneas celulares LNCaP y DU145 respecto al alelo no metilado, este último se encuentra en mayor proporción en las líneas celulares PC3 y 22RV1. Estos resultados proporcionan evidencia de que la metilación del gen *SFRP5* en su región promotora puede ser un marcador de calcinogénesis temprana de la próstata.

8.5 Participación de otros mecanismos en la regulación transcripcional de los genes de la familia *SFRP*

La participación de la metilación del DNA en la regulación transcripcional está directamente asociada a las modificaciones covalentes de histonas, este mecanismo epigenético afecta la transcripción de los genes de la familia *SFRP* en diferentes tipos de cáncer, en donde la administración de TSA y DAC tienen un efecto sinérgico en el incremento de la expresión de estos genes (Suzuki et al., 2002), lo cual fue evaluado para *SFRP1* en líneas celulares de CaP, pero no para ningún otro gen de la familia en CaP. Aunado a estos mecanismos es necesario evaluar la participación de otros factores reguladores de la transcripción que inducen la expresión de los genes *SFRP1*, *SFRP4* y *SFRP5* aunque estén metilados. No es raro encontrar resultados así ya que los mecanismos de regulación transcripcional son muy complejos e involucran la participación de potenciadores, silenciadores de la transcripción, modificaciones de histonas, complejos ribonucleoprotéicos y complejos remodeladores de la cromatina (Strachan and Read , 1999).

9.0 CONCLUSIONES

SFRP1, *SFRP4* y *SFRP5* se expresan en todas las líneas celulares de CaP y NPrEC. *SFRP2* no se expresa ni en NPrEC ni en el resto de las líneas celulares de CaP. Los cuatro genes de la familia *SFRP* evaluados están desmetilados en las células NPrEC, en las líneas celulares de CaP la metilación en las regiones promotoras de estos genes se incrementa. En líneas celulares de CaP AD no hay metilación de *SFRP1* a diferencia de las líneas AD. En todas las líneas celulares de CaP hay metilación de la región promotora de *SFRP2*. Únicamente en la línea celular PC3 hay metilación de *SFRP4*, en el resto de las líneas celulares la región del exón 3 de *SFRP4* está desmetilado. Únicamente en las líneas celulares de CaP LNCaP y DU145 hay metilación de *SFRP5*. Al tratar las líneas celulares de CaP con diferentes concentraciones del agente desmetilante DAC. La expresión de los genes de la familia *SFRP* se incrementa, lo que sugiere que la metilación del DNA participa en la regulación de la expresión de los genes de la familia *SFRP*.

10.0 PERSPECTIVAS

- Evaluar el estado de metilación de cada sitio CpG en las regiones promotoras de los genes de la familia *SFRP*.
- Determinar la expresión de los genes de la familia *SFRP* en muestras de tumor con CaP y compararla con la expresión de los mismos en tejido sano adyacente.
- Determinar el estado de metilación de los genes de la familia *SFRP* en muestras de tumor con CaP y compararla con la expresión de los mismos en tejido sano adyacente.
- Determinar si existen diferencias en la expresión de los genes de la familia *SFRP* en estroma y epitelio de muestras de tumor con CaP y tejido sano adyacente.
- Determinar si existen diferencias en los patrones de metilación de los genes de la familia *SFRP* en estroma y epitelio de muestras de tumor con CaP y tejido sano adyacente.

11.0 BIBLIOGRAFÍA

- Attar, R.M., Takimoto, C.H., and Gottardis, M.M. (2009). Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clin Cancer Res* 15, 3251-3255.
- Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., Johnson, D.W., and Gobe, G.C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 813-827.
- Bogdanovic, O., and Veenstra, G.J. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549-565.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121, 737-746.
- Chung, M.T., Sytwu, H.K., Yan, M.D., Shih, Y.L., Chang, C.C., Yu, M.H., Chu, T.Y., Lai, H.C., and Lin, Y.W. (2009). Promoter methylation of SFRPs gene family in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 112, 301-306.
- Cooper, C.S., and Foster, C.S. (2009). Concepts of epigenetics in prostate cancer development. *Br J Cancer* 100, 240-245.
- Costa, V.L., Henrique, R., Ribeiro, F.R., Carvalho, J.R., Oliveira, J., Lobo, F., Teixeira, M.R., and Jeronimo, C. (2010). Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer. *Epigenetics* 5.
- DeMarzo, A.M., Nelson, W.G., Isaacs, W.B., and Epstein, J.I. (2003). Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 361, 955-964.
- Dyachenko, O., Shevchuk, T., Kretzner, L., Buryanov, Y., and Smith, S. (2010). Human non-CG methylation: Are human stem cells plant-like? *Epigenetics* 5.
- Feldman, B.J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.

- Fukui, T., Kondo, M., Ito, G., Maeda, O., Sato, N., Yoshioka, H., Yokoi, K., Ueda, Y., Shimokata, K., and Sekido, Y. (2005). Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 24, 6323-6327.
- Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-282.
- Hall, C.L., Kang, S., MacDougald, O.A., and Keller, E.T. (2006). Role of Wnts in prostate cancer bone metastases. *J Cell Biochem* 97, 661-672.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Ho, S.M., and Tang, W.Y. (2007). Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: an emphasis on fetal-based adult diseases. *Reprod Toxicol* 23, 267-282.
- Horvath, L.G., Lelliott, J.E., Kench, J.G., Lee, C.S., Williams, E.D., Saunders, D.N., Grygiel, J.J., Sutherland, R.L., and Henshall, S.M. (2007). Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer. *Prostate* 67, 1081-1090.
- INEGI (2010). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer INEGI pp. www.inegi.org.mx.
- Irizarry, R.A., Wu, H., and Feinberg, A.P. (2009). A species-generalized probabilistic model-based definition of CpG islands. *Mamm Genome* 20, 674-680.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E. (2010). Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*.
- Joesting, M.S., Perrin, S., Elenbaas, B., Fawell, S.E., Rubin, J.S., Franco, O.E., Hayward, S.W., Cunha, G.R., and Marker, P.C. (2005). Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. *Cancer Res* 65, 10423-10430.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.

- Joshi, M. (2008). <http://www.topnews.in/health/diseases/prostate-cancer>.
- Kastl, L., Brown, I., and Schofield, A.C. (2010). Effects of decitabine on the expression of selected endogenous control genes in human breast cancer cells. *Mol Cell Probes* 24, 87-92.
- Kawano, Y., Diez, S., Uysal-Onganer, P., Darrington, R.S., Waxman, J., and Kypta, R.M. (2009). Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *Br J Cancer* 100, 1165-1174.
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627-2634.
- Kelly, T.K., De Carvalho, D.D., and Jones, P.A. (2010). Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* 28, 1069-1078.
- Kufe, D.W.P., Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F. (2003). *Cancer Medicine*, Vol 1 (Canada, Hamilton).
- Li, L.C., and Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427-1431.
- Liu, T.H., Raval, A., Chen, S.S., Matkovic, J.J., Byrd, J.C., and Plass, C. (2006). CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 66, 653-658.
- Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Diebold, J., and Hermeking, H. (2005). Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 65, 4218-4227.
- Lopez-Rios, J., Esteve, P., Ruiz, J.M., and Bovolenta, P. (2008). The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate. *Neural Dev* 3, 19.
- Maiese, K., Li, F., Chong, Z.Z., and Shang, Y.C. (2008). The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist? *Pharmacol Ther* 118, 58-81.

- Maitland, N.J., and Collins, A.T. (2008). Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol* 26, 2862-2870.
- Marsit, C.J., McClean, M.D., Furniss, C.S., and Kelsey, K.T. (2006). Epigenetic inactivation of the SFRP genes is associated with drinking, smoking and HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 119, 1761-1766.
- McCabe, M.T., Brandes, J.C., and Vertino, P.M. (2009). Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res* 15, 3927-3937.
- McNeal, J.E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* 2, 35-49.
- Metivier, R., Gallais, R., Tiffocche, C., Le Peron, C., Jurkowska, R.Z., Carmouche, R.P., Ibberson, D., Barath, P., Demay, F., Reid, G., *et al.* (2008). Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452, 45-50.
- Mii, Y., and Taira, M. (2009). Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* 136, 4083-4088.
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1, R47-58.
- Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M., Watanabe, Y., Maruyama, R., Sasaki, S., Sasaki, Y., Mita, H., Nishikawa, N., Yamaguchi, K., *et al.* (2007). Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 26, 4699-4713.
- Nussey, S.S.a.W., S.A. (2001). *Endocrinology: An Integrated Approach* (London).
- Perry, A.S., Foley, R., Woodson, K., and Lawler, M. (2006). The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 13, 357-377.

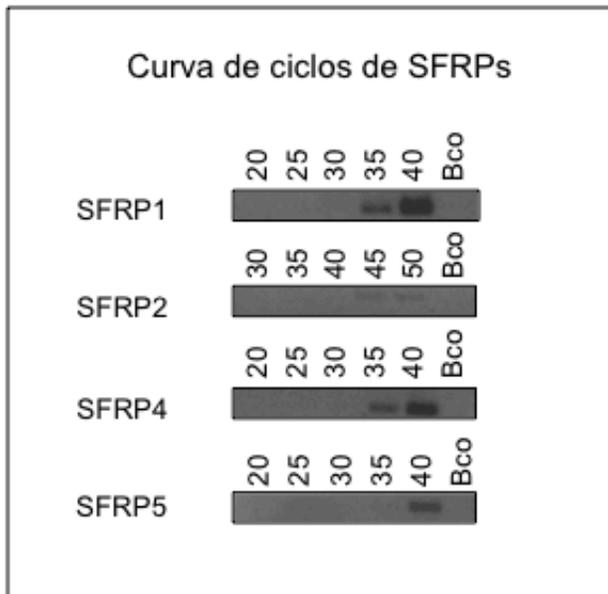
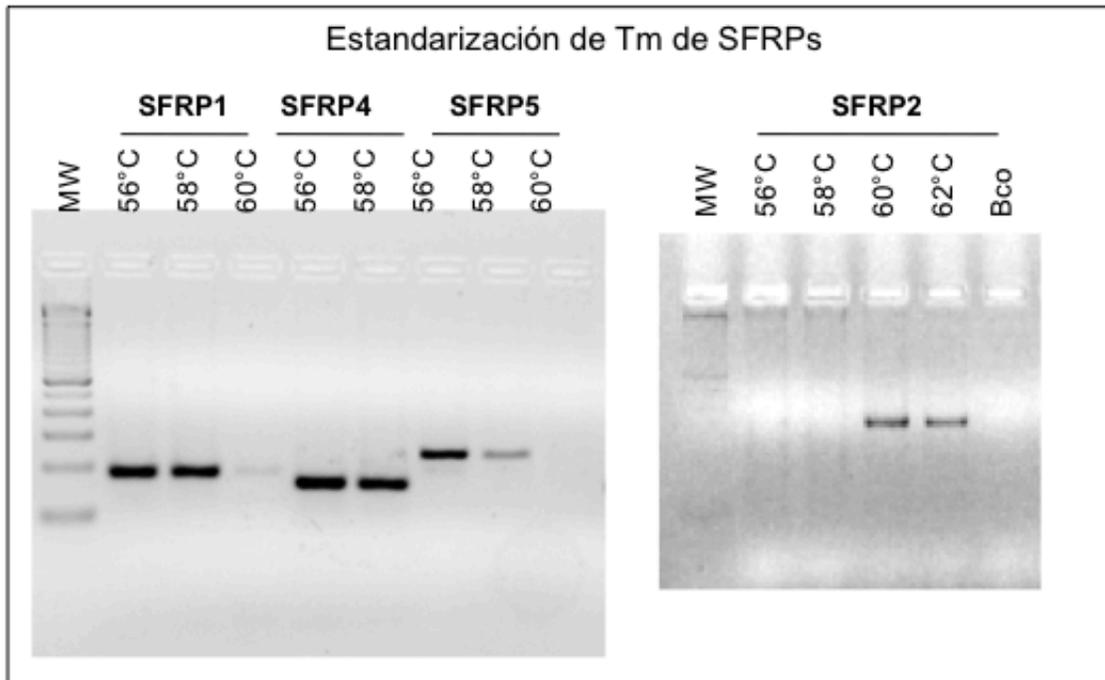
- Pienta, K.J., and Esper, P.S. (1993). Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med* 118, 793-803.
- Robinson, D.R., Zylstra, C.R., and Williams, B.O. (2008). Wnt signaling and prostate cancer. *Curr Drug Targets* 9, 571-580.
- Rodríguez-Dorantes M, T.-A.N., Cerbón MA, López M, Cervantes A. (2004). [DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]. *Rev Invest Clin* 56, 56-71.
- Rowley, K.H., and Mason, M.D. (1997). The aetiology and pathogenesis of prostate cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 9, 213-218.
- Shih, Y.L., Hsieh, C.B., Lai, H.C., Yan, M.D., Hsieh, T.Y., Chao, Y.C., and Lin, Y.W. (2007). SFRP1 suppressed hepatoma cells growth through Wnt canonical signaling pathway. *Int J Cancer* 121, 1028-1035.
- Strachan T. And Read A. (1999). *Human Molecular Genetics*, BIOS Scientific Publishers edn.
- Su, H.Y., Lai, H.C., Lin, Y.W., Chou, Y.C., Liu, C.Y., and Yu, M.H. (2009). An epigenetic marker panel for screening and prognostic prediction of ovarian cancer. *Int J Cancer* 124, 387-393.
- Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Anbazhagan, R., van Engeland, M., Weijnenberg, M.P., Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 31, 141-149.
- Suzuki, H., Toyota, M., Carraway, H., Gabrielson, E., Ohmura, T., Fujikane, T., Nishikawa, N., Sogabe, Y., Nojima, M., Sonoda, T., *et al.* (2008). Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br J Cancer* 98, 1147-1156.
- Turek-Plewa, J., and Jagodzinski, P.P. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 10, 631-647.
- Urakami, S., Shiina, H., Enokida, H., Hirata, H., Kawamoto, K., Kawakami, T., Kikuno, N., Tanaka, Y., Majid, S., Nakagawa, M., *et al.* (2006). Wnt

antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin Cancer Res* 12, 6989-6997.

- Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W.G., Muraiso, K., Bottaro, D.P., Cumberledge, S., and Rubin, J.S. (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem* 275, 4374-4382.
- van Wolfswinkel, J.C., and Ketting, R.F. (2010). The role of small non-coding RNAs in genome stability and chromatin organization. *J Cell Sci* 123, 1825-1839.
- Warr, N., Siggers, P., Bogani, D., Brixey, R., Pastorelli, L., Yates, L., Dean, C.H., Wells, S., Satoh, W., Shimono, A., *et al.* (2009). *Sfrp1* and *Sfrp2* are required for normal male sexual development in mice. *Dev Biol* 326, 273-284.

ANEXO A. Estandarización de los oligonucleótidos de expresión de SFRPs.

Se llevó a cabo en la línea celular LNCaP. Para la determinación de la T_m se realizó la reacción de la PCR a 40 ciclos, en el caso del gen *SFRP2* se tuvo que elevar hasta 50 ciclos debido a su poca expresión



Condiciones establecidas para los cebadores para PCR de expresión de los genes de la familia SFRP

Gen	T_m	No. de ciclos	Tamaño (pb)
SFRP1	56°C	35	172
SFRP2	60°C	40	316
SFRP4	56°C	35	165
SFRP5	56°C	40	246

ANEXO B. Secuencias de los genes de la familia *SFRP*. Los números están dados tomando como referencia las secuencias aquí mostradas.

La terminación U es para los oligonucleótidos del alelo no metilado.

La terminación M es para los oligonucleótidos del alelo metilado.

ATG: Sitio de inicio de la transcripción.

Secuencia SFRP1

GGCCAAGGCAGGAGCATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCTAACATGGTG
 AAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCGGGGGCATGGTGGCACGCGGCTGTA
 ATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTG
 CAGTCAGCGGAGATAGCGCCATTGCACTCCAGCTTAGGCAACAAGAGCGAAACTGTCTCA
 AAAAAAAAAAGTCTTCATAAATTCATGGGTTTGCAAGTATGATCCAGGCTCCCCGCTTCT
 CTGCAAGCCAATGCGAGTTAATTACAGCGTCCGCCCTGGTCTCTCTCCACCCACGCGCT
 GATCCATTCCCCTTCTTTTTCTCCCTTGTCTCTTTCCCTCCTCCCCTTTTATTTATGTA
 TTTTTGGTTTTGTTTTTTAAGGGGTGTTGAGCCGCGTCTGGTTCTAGTAAACCGAACCCG
 CTCGCGAGGGAGGCGATTGGCTCCCGCGCCGGTGACGGACGTGGTAACGAGTGCGGCTCG
 CCCC GCCGGGAGCTGATTGGCTGCGCGGGGCGGCTCCGAGGGCTCGGCCGTAGGAGCCCC
 GCGCACTCCA**GCCCTGAGGCTCGAGTGAAGTGCAGCGCCCGCCCGCGCCTTC**
 CTGCT**CGCGCACCTCCGGGAGCCGGGGCGCACCCAGCCCGCAGCGCGCCTCCC****CGCC**
CGCGCCTCCGACCGAGCGGAGGGCCGAGGGCCGCCACTGGCCGGGGGACCGGGCAGCAGCTT
 GCGGCCGCGGAGCCGGGCAACGCTGGGGACTGCGCCTTTTGTCCCCGAGGTCCCTGGAA
 GTTTGCGGCAGGACGCGCGCGGGGAGGCGGCGGAGGCAGCCCCGACGTGCGGAGAACAG
 GGCGCAGAGCCGGC**ATG**GGCCTCGGGCGCAGCGAGGGGGGCGCCGCGGGGCGAGCCCTGG
 GCGTGCTGCTGGCGCTGGGCGCGGCGCTTCTGGCCGTGGGCTCGGCCAGCGAGTACGACT
 ACGTGAGCTTCCAGTCGGACATCGGCCCCGTACCAGAGCGGGCGCTTCTACACCAAGCCAC
 CTCAGTGCGTGGACATCCCCGCGGACCTGCGGCTGTGCCACAACGTGGGCTACAAGAAGA
 TGGTGCTGCCAACCTGCTGGAGCACGAGACCATGGCGGAGGTGAAGCAGCAGGCCAGCA
 GCTGGGTGCCCTGCTCAACAAGAACTGCCACGCCGGCACCCAGGTCTTCTCTGCTCGC
 TCTTCGCGCCCGTCTGCCTGGACCGGCCATCTACCCGTGTGCTGGCTCTGCGAGGCCG
 TGCGCGACTCGTGCAGCCGGTCATGCAGTTCTTCGGCTTCTACTGGCCCGAGATGCTTA
 AGTGTGACAAGTTCCCCGAGGGGGACGTCTGCATCGCCATGACGCCGCCCAATGCCACCG
 AAGCCTCCAAGCCCCAAGGTAAGGCTGCCTCCTCCCACGTGCGGAGCCGCCCTCCAT

	Tamaño	Localización
SFRP1U	135 pb	610 pb
SFRP1M	126 pb	614 pb
ATG	-	915 pb
EXÓN 1	-	540 pb

Secuencia SFRP2

TTCTTCCTCTGTGCCATGTACGCGCCCATTTGCACCCCTGGAGTTCCTGCACGACCCTATC
 AAGCCGTGCAAGTCCGTGTGCCAACGCGCGCGACACTGCGAGCCCCCATGAAGATG
 TACAACCACAGCTGGCCCCGAAAGCCTGGCCTGCGACGAGCTGCCTGTCTATGACCCTGGC
 GTGTGCATCTCGCCTGAAGCCATCGTACCGGACCTCCCGGAGG GTGAGGCCGTAGGAAGG
 ATGGAGGGAGGCGAGGAGGCGCCCGGGGCTGTGGCTGCCAATCGAGAAC TGGGCGGCCAC
 ACCTAAGGCTGCCAGGGGCGTCTGAGGCTTGTAGGAGGTGGGAAAGAATGGGGGAAACAT
 TTTCTTCAGAAAAAGTCTGGTTTCTCCCATAGGAATTTTAGGAGCTAGCGGAGAGCACTG
 CACCCATAAAGAAAAAAAAAAGATTTTGTCTACAAAGGGAGCCTTCGATGATGTTTGC
 ATTTATAGTAATAACAGAAATGATAATAGCAGTAAACAGGTGTGTAGGTGCTGAGCA
 AGTGTAAACACATTACACGTTATTGACTCATTTAATGCCAAAAATAATCTACCAAGCA
 GGTGCCAATACTCGTTCCATTTAGCGCTACTTCTTAAAAAGTTTTTTTTTTTCTGAAAAA
 GCAGTAACGGTCAATTGCTTCCCACCAGGAGTGAGATTTGTAATTGCAGTTTCCCTGAAAA
 ATTGTGAGGTCTGTTTCATAGTCA

	Tamaño	Inicio
SFRP4U	116 pb	503 pb
SFRP4M	112 pb	499 pb
ATG	-	-1819 pb
EXÓN 3	-	480 pb

Secuencia SFRP5

TAGACTATCCTGGCCCTGGAGGTGGGTTCTGGGTCATATCCATCTTTGATTCCCCAGCAG
 CCAGCATGGGGCTGGCACCAAGCTCAATGAAGACCTGCCAGGAGGACCAGAAGATCCAG
 GGTGTGGGGTGGCACGAGCCTCCCACCAGGGAGAAAGAGGAACCGAGGTGTCGGGGAAAG
 AAAACAGAGCAGAGGGAGAAAAAGCCAAGGCAGAGAGATAAGCAAGTGAAGTGAGTGAGAA
 AAGGAACAGGAGAGGCTGTGGCGGAGAGAGATAAGGAGGAAGGATGGAGAAGCGGAGGGT
 CGAGGAAAAATGCCAGGGAGGCAGGGAGCCCTGGGGAGAAACGCTGGGCGAGGCGAGGGC
 TGCGGCAGGGGAGCCGAGCCGGGAGAGGGGC **GC AAGACCTGGCGCTGGGCGGGA CGCTCG**
 GGCAGGGTGC GGGAGGGGCTGAGGGCCGCCCTGCTCCCGCCTTGGAGCTGGGGC
 CAGGCGGCCGAGATTGGCTGGGG **CGCA CGGCGAGGGCCGGGCTGGAGCCCG** GAGGTGGG
 AGGCGCCAGGATCAGTCGGGGCGCCCGCAGCGCAGGCTGCCACCCACCTGGGCGACCTCC
GCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTGGGTAGAGTCAGGGCCGGGGGCGCACGCCGGAACACCTG
GGCCGCCGGGCACCAGCGTCGGGGGGCTGCGCGGCGCGCACCTGGAGAGGGCGCAGCCA
TGCGGGCGGCGGCGGCGGGGGGGGCGTGGGACGGCCGCGCTGGCGCTGCTGCTGGGGG
CGCTGCACTGGGCGCCGCGCGCTGCGAGGAGTACGACTACTATGGCTGGCAGGCCGAGC
CGCTGCACGCCGCTCCTACTCCAAGCCGCCGAGTGCCCTTGACATCCCTGCCGACCTGC
CGCTTGCCACACGFTGGGCTACAAGCGCATGCGGCTGCCAACCTGCTGGAGCACGAGA
GCCTGGCCGAAGTGAAGCAGCAGGCGAGCAGCTGGCTGCCGCTGCTGGCCAAGCGCTGCC
ACTCGGATACGCAGGTCTTCTGTGCTCGCTCTTTGCGCCGCTGTCTCGACCGGCCCA
TCTACCCGTGCCGCTCGCTGTGCGAGGCCGTGCGCGCCGGCTGCGCGCCGCTCATGGAGG
CCTACGGCTTCCCTGGCCTGAGATGCTGCACTGCCACAAGTTCCCCCTGGACAACGACC
TCTGCATCGCCGTGCAGTTCCGGCACCTGCCCGCCACCGCGCTCCAGGTAGCGCCGCCG

	Tamaño	Inicio
SFRP5U	141pb	392 pb
SFRP5M	136 pb	394 pb
ATG	-	823pb
EXÓN 1	-	600 pb