



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“Efecto de la proteína SFRP1 sobre la vía WNT y el gen de fusión TMPRSS2-ERG a través del receptor de andrógenos en células de cáncer de próstata”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

JENIE MARIAN CRUZ BURGOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO
RODRÍGUEZ DORANTES

CO-ASESOR INTERNO: Q.F.B. ALEJANDRO
GUTIÉRREZ GARCÍA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



UNAM
CUAUTITLÁN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, autoriza a la alumna:
Jenie Marian Cruz Burgos
Con número de cuenta: 413005498 a presentar el: Trabajo de Tesis

Efecto de la proteína SFRP1 sobre la vía WNT y el gen de fusión Tmprss2-ERG a través del receptor de andrógenos en células de cáncer de próstata.

Bajo la asesoría del: Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García
Para obtener el título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA	FECHA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>		<u>29/08/2017</u>
VOCAL	<u>M en C. Maritere Domínguez Rojas</u>		<u>29/VIII/17</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>		<u>29-VIII-2017</u>
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Ma. Lucero Paniagua García</u>		<u>30.08.17</u>
2do. SUPLENTE	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>		<u>29/Ago/17</u>

Atentamente notificamos su participación en la revisión y evaluación del trabajo para que en un plazo no mayor a 15 días hábiles emita su VOTO APROBATORIO. Si existieran correcciones u observaciones en el trabajo, contaría con 15 días hábiles más a partir del momento en que el pasante entrega el trabajo corregido, para emitir su VOTO APROBATORIO o RECHAZO, todo esto de acuerdo al artículo 21 del Reglamento de Exámenes Profesionales.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CUAUTITLÁN

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Agosto de 2017.

I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
JEFA DEL DEPARTAMENTO
EXÁMENES PROFESIONALES

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

VOCAL: M. en C. Maritere Domínguez Rojas

SECRETARIO: QFB. Alejandro Gutiérrez García

1er. SUPLENTE: M. en C. María Lucero Paniagua García

2° SUPLENTE: LBD. Larisa Andrea González Salcedo

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

CO-ASESOR INTERNO:

Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García

SUSTENTANTE (S):

Jenie Marian Cruz Burgos

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el apoyo, paciencia y amor que me han brindado, por nunca dejar de creer en mí y por alentarme a continuar con mis sueños y metas. Gracias por ayudarme a ser quien soy y darme la fortaleza que necesitaba en los momentos más difíciles.

A mis amigos Isabel, Sara y Osiris por estar conmigo en los momentos de estrés durante la carrera y por enseñarme que la vida siempre puede ser mejor cuando estas con las personas correctas.

A Andrea, Valeria y Brian por brindarme su amistad incondicional por tantos años, gracias por compartir esos pequeños momentos que nos hacen ser quienes somos, únicos y asombrosos.

A mi tía Estela que fue una de mis inspiraciones para estudiar esta carrera y que siempre me ha dado su apoyo incondicional.

Al Doctor Mauricio que me permitió ser parte de su grupo de investigación del que tanto he podido aprender y que me ha permitido crecer, no solo en el ámbito académico, sino también personal. Por creer en mí.

A Carlos por toda la paciencia y los conocimientos que me ha brindado, además de su amistad.

A todos mis compañeros del grupo Angy, Sergio, Marisol, Beto y Susy por compartir momentos de diversión y aprendizaje.

A ti, porque siempre estuviste ahí para calmar mi ansiedad, darme consejos, hacerme compañía y enseñarme que aún tengo muchas cosas que aprender, gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. La próstata.....	2
2.1.1. Fisiología de la próstata.....	3
2.1.2. Anatomía de la próstata.....	3
2.2. Patologías de la próstata.....	5
2.2.1. Prostatitis.....	5
2.2.2. Hiperplasia prostática benigna	6
3. CÁNCER DE PRÓSTATA.....	7
3.1. Historia natural del cáncer de próstata.....	9
3.2. Cáncer de próstata resistente a la castración.....	11
3.3. Diagnóstico del cáncer de próstata.....	12
3.3.1. Antígeno prostático específico.....	12
3.3.2. Tacto rectal.....	13
3.3.3. Ultrasonografía transrectal y biopsias.....	14
3.3.4. Biomarcadores de diagnóstico.....	14
3.4. Tratamiento del cáncer de próstata.....	16
3.4.1. Prostatectomía radical.....	16
3.4.2. Radioterapia.....	17
3.4.3. Terapia hormonal.....	18
3.4.4. Quimioterapia.....	19
4. MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.....	19
4.1. Andrógenos.....	19
4.1.1. Receptor de andrógenos.....	21
4.2. Fusión TMPRSS2-ERG.....	24
4.3. Vía de señalización WNT.....	26
4.3.1. Ruta canónica o WNT/ β -catenina.....	28
4.4. Familia de las proteínas SFRP.....	31
4.4.1. Proteína SFRP1 en cáncer de próstata.....	33

5. JUSTIFICACIÓN.....	34
6. HIPÓTESIS.....	35
7. OBJETIVOS.....	35
7.1. Objetivo general.....	35
7.2. Objetivos particulares.....	35
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
8.1. Cultivo celular.....	35
8.2. Tratamientos con la proteína SFRP1 y la hormona DHT.....	36
8.3. Ensayo de viabilidad celular.....	37
8.4. Ensayo de migración celular por herida.....	38
8.5. Ensayos de expresión de mRNA y proteínas	39
8.6. Ensayos de expresión en un modelo <i>in vivo</i> de xenotransplante murino y medición de PSA.....	41
9. RESULTADOS	
9.1. Los tratamientos con DHT y SFRP1 tienen efectos diferentes sobre la viabilidad celular en LNCaP y VCaP.....	42
9.2. Los tratamientos con DHT y SFRP1 tienen efectos diferentes sobre la mmigración celular en LNCaP y VCaP.....	47
9.3. SFRP1 modifica la expresión de mRNA de elementos de la vía WNT en células LNCaP y VCaP.....	49
9.4. Tratamiento combinado de SFRP1+DHT promueve la expresión de PSA en células LNCaP y la expresión de ERG en las células VCaP.....	50
9.5. SFRP1 no muestra efectos significativos en el modelo de xenotransplante murino de células VCaP.....	53
10.DISCUSIÓN.....	56
11.CONCLUSIONES.....	59
12.PERSPECTIVAS.....	60
13.REFERENCIAS.....	60

GLOSARIO DE TÉRMINOS

CaP: Cáncer de próstata

T-E: TMPRSS2-ERG

HPB: Hiperplasia prostática benigna

PSA: Antígeno prostático específico (*prostate specific antigen*)

CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración

AR: Receptor de andrógenos

TR: Tacto rectal

TRUS: Ultrasonografía transrectal

CCTs: Células circulantes tumorales

LH: Hormona luteinizante

GnRH: Hormona reguladora de gonadotropina

FSH: Hormona folículo estimulante

DHEA: Dehidroepiandrosterona

SHBG: Globulina de unión a hormonas sexuales

DHT: Dihidrotestosterona

5 α R: 5 α -reductasa

NTD: Dominio N-terminal

DBD: Dominio de unión al DNA

LBD: Dominio de unión al ligando

ERAs: Elementos de respuesta a andrógenos

HSP: Proteínas de choque térmico

IGF-1: Factor de crecimiento similar a insulina 1

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos

EGF: Factor de crecimiento epidermal

ETS: Transformación específica de eritoblastos

ERG: Gen relacionado a ETS

UTR: Región no traducida

TEM: Transición epitelial mesenquimal

MMTV: Virus de ratón mamario en ratón

PCP: Polaridad celular planar

SFRP: Proteínas secretadas relacionadas a Frizzled

LRP: Receptores lipoproteicos de baja densidad

CRD: Dominio rico en cisteínas

Fz: Frizzled

NTR: Motivo relacionado a netrina

SFB: Suero fetal bovino

BSA: Albúmina sérica bovina

PBS: Buffer salino de fosfatos

RIPA: Buffer de radioinmunoprecipitación

TBST: Buffer salino Tris, tween

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

HRP: Peroxidasa de rábano

1. RESUMEN

En México, el cáncer de próstata representa el primer tipo de cáncer más común y la primera causa de muerte por tumores malignos en hombres. Algunos tumores tienen características que contribuyen a que las células de cáncer de próstata se propaguen más rápido, se vuelvan invasivas y desarrollen resistencia a la castración aumentando la mortalidad en los pacientes.

Estas características neoplásicas pueden surgir por varios mecanismos, sin embargo las fusiones cromosómicas resaltan como mecanismos comunes en cáncer de próstata.

La fusión TMPRSS2-ERG se expresa en más del 50% de los tumores de cáncer de próstata. En esta fusión el gen TMPRSS2 posee elementos de respuesta a andrógenos en su promotor, por lo que su actividad transcripcional es dependiente del receptor de andrógenos. La fusión TMPRSS2-ERG da como resultado una expresión elevada del gen ERG la cual es regulada por andrógenos, este aumento en la expresión de ERG promueve la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y la progresión tumoral. Además se ha encontrado que ERG es capaz de inducir la transcripción de ligandos de la vía WNT. Esta vía se encuentra comúnmente desregulada en cáncer y su señalización es controlada por proteínas antagonistas SFRPs.

Interesantemente se ha reportado que la proteína SFRP1 puede tener un papel en la regulación de la señalización del receptor de andrógenos y por lo tanto de la fusión TMPRSS2-ERG a causa de los elementos de respuesta a andrógenos que posee dicha fusión.

En el presente trabajo se demostró que la proteína SFRP1 ejerce un efecto sobre células de cáncer de próstata que poseen la fusión TMPRSS2-ERG. En conclusión, se ofrece un acercamiento a los mecanismos moleculares y se propone a SFRP1 como una proteína clave en la progresión del cáncer de próstata mediante la regulación de la expresión del gen de fusión TMPRSS2-ERG.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA PRÓSTATA

La próstata es una glándula que forma parte del sistema reproductor masculino, se encuentra localizada frente al recto, por debajo de la vejiga y rodeando la primer parte de la uretra como se ve en la figura 1. Dicha ubicación permite la examinación de la glándula prostática por palpación digital rectal (Stokes M., 2005). Coloquialmente se describe a la próstata con forma de nuez de castilla y con forma cónica. Está compuesta de elementos glandulares y estromales los cuales se encuentran juntos en una pseudocápsula, la capa interna de la cápsula está compuesta de músculo liso con una capa externa cubierta de colágeno (Lee, Akin-Olugbade, & Kirschenbaum, 2011). Las células glandulares se encargan de producir el fluido prostático, las células musculares controlan el flujo urinario y la eyaculación; y las células fibrosas proveen el soporte de la glándula (Nair, M., & Peate, I., 2015).

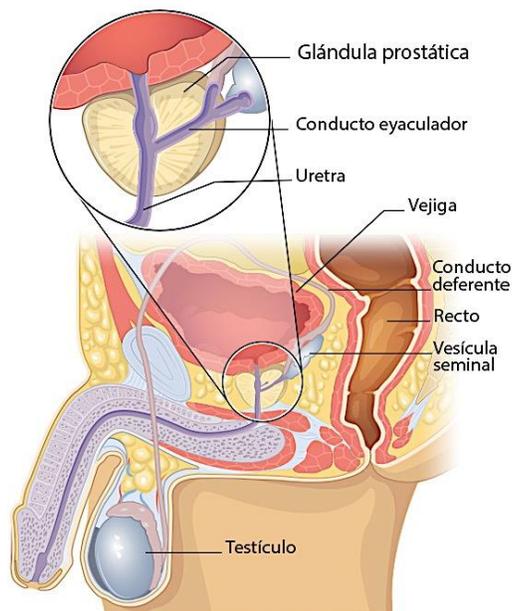


Figura 1. Localización de la próstata. En esta imagen se observa la ubicación de la próstata con respecto a los demás órganos en el aparato reproductor masculino (Modificado de CDC, 2015).

2.1.1. FISIOLÓGÍA DE LA PRÓSTATA

La función clave de la próstata es producir y secretar un fluido ligeramente alcalino que constituye una porción del fluido seminal. Este fluido seminal contiene altas

concentraciones de potasio, zinc, ácido cítrico, fructosa, fosforilcolina, espermina, aminoácidos libres, prostaglandinas y enzimas; la mayoría de estos componentes se originan en la próstata (Plant, Zeleznik, & Prevot, 2015). Este fluido se encarga de ayudar en la motilidad, la supervivencia, el mantenimiento y la nutrición del esperma.

La próstata también controla el flujo urinario, ya que las fibras musculares de la glándula, se encuentran alrededor de la uretra bajo el control involuntario del sistema nervioso. Estas fibras se contraen lentamente y de esta manera detienen el flujo urinario (Nair, M., & Peate, I., 2015).

2.1.2. ANATOMÍA DE LA PRÓSTATA

El proceso de diferenciación sexual está determinado por la influencia de los andrógenos producidos por los testículos del feto. El desarrollo de la próstata comienza durante la semana 10 y 12 de gestación. El epitelio se organiza en dos tipos celulares diferentes: células basales y células lumbales, es en este momento donde el mesénquima prostático se diferencia en una capa de células de músculo liso las cuales rodean los conductos prostáticos. Durante este desarrollo prostático comienza la morfogénesis de ramificación en donde nacen las diferentes zonas de la próstata (Alan, J. *et al.*, 2007).

La nomenclatura utilizada con mayor frecuencia para describir la estructura de la próstata humana es la nomenclatura de McNeal, 1981. McNeal divide la próstata en tres principales áreas que son histológicamente distintas y anatómicamente separadas. Estas áreas son:

- El estroma fibromuscular (no glandular) que rodea a la glándula.
- Dos regiones glandulares:
 1. Zona periférica: representa aproximadamente el 70% del volumen prostático total y es ahí donde se forman la mayoría de los adenocarcinomas prostáticos (70% de todos los casos), esta zona rodea la mayor parte de la zona central (Aaron, Franco, & Hayward, 2016; McNeal, 1981; Theodorescu D., 2001).
 2. Zona central: se encuentra frente a la zona de transición, compuesta de tejido glandular que constituye la mayor parte de la base de la próstata y rodea los

conductos eyaculatorios. Contiene una tercera parte de los conductos eyaculatorios y es la zona más alejada del recto (Nair, M., & Peate, I., 2015). Es en esta zona donde se desarrollan de 15 a 20% de todos los casos de CaP (Theodorescu D., 2001).

McNeal identificó una región glandular adicional más pequeña denominada zona de transición. Dicha zona rodea a la uretra prostática y representa solo el 5% del volumen prostático total, ésta es la zona exclusiva donde se desarrolla la hiperplasia prostática benigna (HPB) (Aaron *et al.*, 2016). La zona de transición es el área media de la próstata localizada entre la zona periférica y la zona central. Hasta la edad de 40 años esta zona solo abarca el 20 % del total de la glándula, pero conforme avanza la edad del hombre, la zona de transición comienza a crecer hasta convertirse en el área más grande de la próstata. Conforme esta zona aumenta de tamaño, comienza a empujar a la zona periférica a través del recto (Nair, M., & Peate, I., 2015), esta expansión resulta en la compresión de la uretra y obstrucción parcial de la vejiga, lo cual está asociado con la HPB (Aaron *et al.*, 2016). La zona de transición es donde se desarrollan cerca del 10 al 15% de todos los casos de CaP (Theodorescu D., 2001).

A la par de la clasificación de McNeal, se ha propuesto que la próstata puede dividirse tanto en componentes internos como externos, reconociendo como anatomía zonal de la próstata cinco componentes, esquematizados en la figura 2:

1. Estroma fibromuscular anterior
2. Tejido glandular peri-uretral
3. Zona de transición
4. Zona central
5. Zona periférica (Bhargava, S., 2012)

Zonas de la Próstata

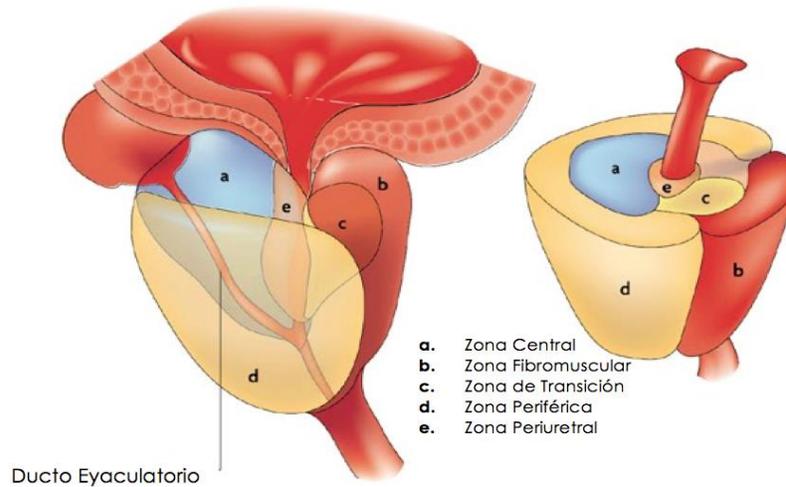


Figura 2. Anatomía de la próstata. En la figura se observan las distintas zonas en las que se divide la glándula prostática. (Modificado de Marzo *et al.*, 2007)

2.2. PATOLOGÍAS DE LA PRÓSTATA

Las tres mayores causas de morbilidad por afecciones de la próstata según el orden de incidencia son:

- Hiperplasia prostática benigna.
- Cáncer de próstata.
- Prostatitis.

2.2.1. PROSTATITIS

La prostatitis es una condición inflamatoria que afecta a la próstata, cerca de un 15% de todos los hombres padecerán prostatitis en algún momento de su vida, teniendo una mayor prevalencia en hombres menores de 50 años. La mayoría de los casos de prostatitis presentan una clara evidencia de infección bacteriana, sin embargo existen casos en los que los hombres diagnosticados no presentan evidencia de este tipo de infección (Roberts *et al.*, 1997; UpToDate, 2017).

Generalmente el diagnóstico de la prostatitis se realiza mediante un cultivo microbiológico y mediante el análisis de la orina, una vez diagnosticada la prostatitis se usan como tratamiento antibióticos o antiinflamatorios (Zegarra Montes, Sanchez Mejia, Loza Munarriz, & Celis Gutierrez, 2008).

2.2.2. HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

La HPB es un crecimiento anormal no maligno de la próstata y se observa comúnmente en hombres de edad avanzada (Roehrborn, 2005), en la figura 3 se muestra una comparación histológica de próstata normal y HPB. En estudios *post-mortem* la incidencia histológica de la HPB incrementa con la edad. La HPB se presenta en 8% de los hombres con una edad entre 31 y 40 años, en 50% de los hombres que se encuentran entre los 51 y 60 años y en el 80% de todos los hombres mayores de 90 años (Patel & Parsons, 2014).

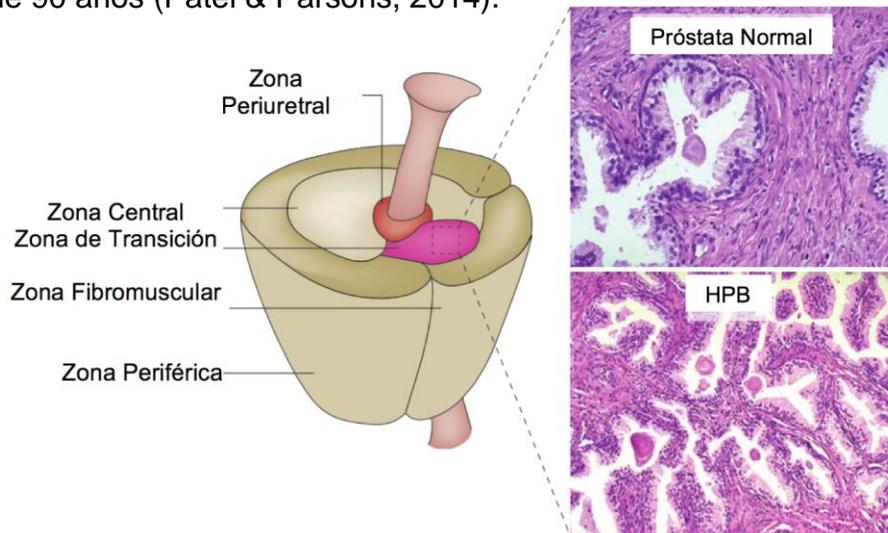


Figura 3. Representación de una comparación histológica de cortes de próstata normal y de próstata con HPB, señalando la zona de transición como el sitio de patogénesis. (Modificado de Chughtai *et al.*, 2016).

El crecimiento en la zona de transición afecta el flujo urinario (Egan, 2016; Ricke, 2011), lo cual contribuye a problemas de micción comúnmente conocidos como síntomas del tracto urinario bajo. Los principales síntomas son un flujo urinario débil, vaciamiento incompleto de la vejiga, urgencia y frecuencia al orinar y nicturia (Egan, 2016; Ricke, 2011).

El diagnóstico de la HPB se basa principalmente en la identificación de los signos y síntomas de la enfermedad (Vuichoud & Loughlin, 2015). Como apoyo para el diagnóstico pueden realizarse: análisis sanguíneos, ultrasonido y la medición del antígeno prostático específico (*PSA* por sus siglas en inglés).

El tratamiento de la HPB está enfocado en ofrecer al paciente un alivio de los síntomas relacionados a las molestias que tiene para orinar. Los fármacos utilizados

con más frecuencia son los antagonistas α -adrenérgicos o α -bloqueadores y los inhibidores de la 5 α -reductasa (5 α R) (Tanguay *et al.*, 2009).

El tratamiento quirúrgico generalmente es recomendado para aquellos pacientes en donde el tratamiento farmacológico y hormonal ha fallado (Praveen, 2013).

3. CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades relacionadas que se caracterizan por una proliferación celular descontrolada, lo cual es el resultado de diversas mutaciones que se acumulan con el paso del tiempo. Estas mutaciones causan cambios en la expresión génica, los cuales contribuyen a la transformación neoplásica. Dicha transformación neoplásica consta de alteraciones en la proliferación, en la muerte y en la diferenciación celular, lo cual favorece el crecimiento de una población celular tumoral (Brenner & Duggan, 2004; Ruddon, 2007). Las mutaciones puntuales, las deleciones e inserciones y las translocaciones cromosómicas pertenecen al amplio rango de mutaciones genéticas que contribuyen a la génesis del cáncer en una célula tumoral (Polinsky, 2007).

En el año 2012 se estimaron 14.1 millones de casos de cáncer a nivel mundial, de los cuales 7.4 millones de casos se reportaron en hombres. Dentro de los tipos de cáncer más comunes en hombres por nivel de incidencia, se encuentran el cáncer de pulmón, de próstata y colorrectal. Mientras que los tipos de cáncer con mayor índice de mortalidad son el cáncer de pulmón, hígado y estómago. En ese mismo año se reportaron 1.1 millones de casos de cáncer de próstata (CaP), colocando al CaP como el segundo tipo de cáncer más común en hombres (Ferlay *et al.*, 2014). El cáncer de próstata es la quinta causa de muerte por cáncer en hombres con un estimado de 307,000 muertes, que representan el 6.6% del total de la mortalidad masculina por cáncer a nivel mundial (Ferlay *et al.*, 2014). En la figura 4 se muestra que en México los datos son similares ya que el CaP representa el primer tipo de cáncer más común y la primer causa de muerte por tumores malignos en hombres, con una incidencia del 16% (IMSS, 2015) (Ferlay *et al.*, 2014).

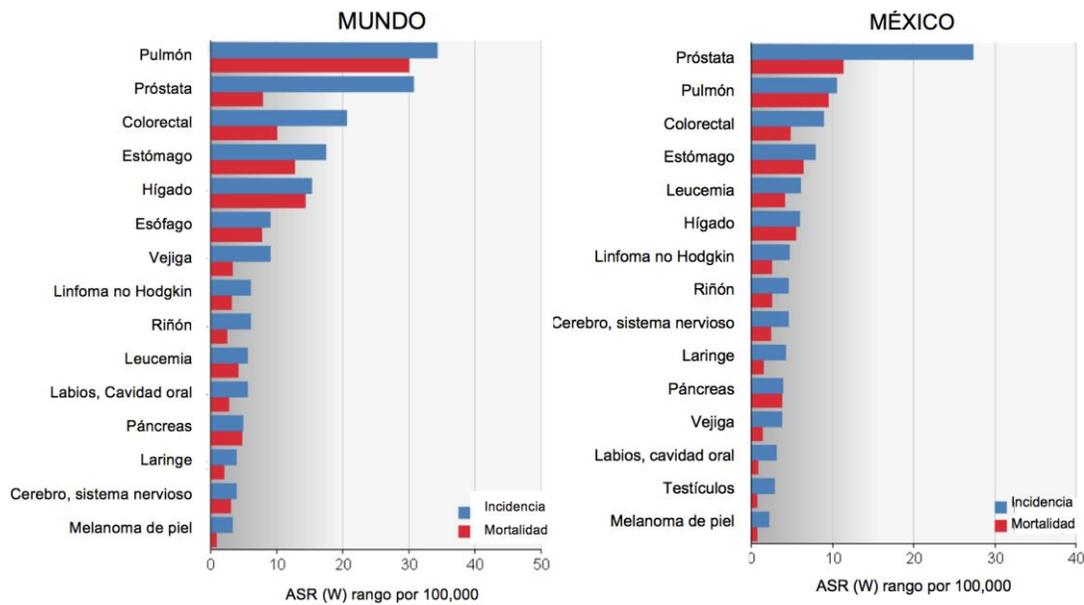


Figura 4. Tasas de incidencia y mortalidad de distintos tipos de cáncer a nivel mundial (izquierda) y en México (derecha). El ASR hace referencia a una media ponderada de las tasas por edad, es decir, es una estandarización de la edad necesaria cuando las poblaciones analizadas difieren en este parámetro (Modificado del GLOBOCAN, 2012).

Durante el año 2013 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), reportó una tasa de mortalidad de 6 defunciones por cada 100,000 hombres con una edad mayor o igual a 20 años en México, en la figura 5 se muestra un esquema de las estadísticas anteriores (IMSS, 2015).

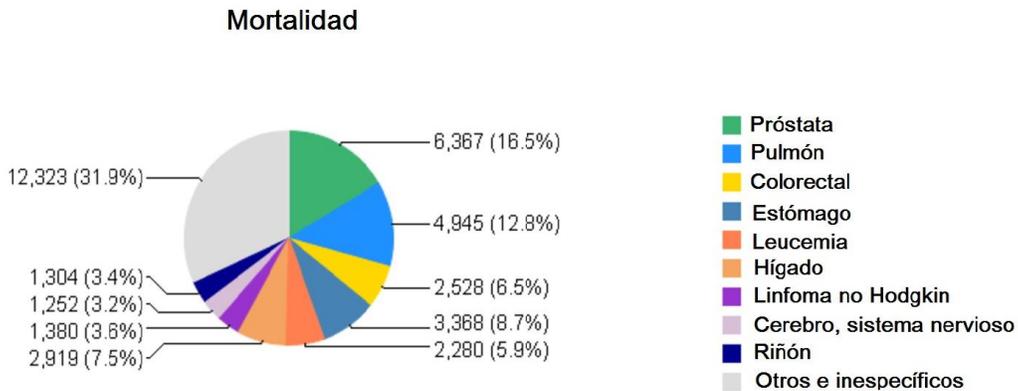


Figura 5. Gráfico de mortalidad por cáncer de próstata estimada por cada 100,000 habitantes en México en el año 2012 (Modificado del GLOBOCAN, 2012).

La incidencia del CaP generalmente incrementa conforme aumenta la edad, un estudio que abarcó un tiempo desde el año 2001 hasta el año 2005 en Estados Unidos, mostró que el 37% de los casos de CaP se diagnosticaron en hombres

menores de 65 años. En dicho estudio, el 8.6% de los casos de CaP se diagnosticaron en hombres entre los 45 y 54 años, el 36% de los casos en hombres de 65 a 74 años, el 22% de los casos de CaP en hombres de 75 a 84 años y solo un 5% de los casos de CaP en hombres mayores de 85 años (Ries L. *et al.*, 2005).

3.1. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata tiene una gran incidencia en la población masculina y aún no se han determinado los mecanismos específicos que conducen al desarrollo y la progresión de la enfermedad (Foley, Hollywood, & Lawler, 2004; Paris *et al.*, 2004; Shi, Gumerlock, & deVere White, 1996). A la fecha todavía existen reportes controversiales sobre los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y la progresión del CaP (Huncharek & Muscat, 1995).

El CaP puede permanecer silencioso durante largos períodos de tiempo, ya que múltiples cambios genéticos son necesarios para que el CaP se desarrolle a un estado clínicamente avanzado, es decir un estado de resistencia a la castración o esparcimiento metastásico (Crawford, 2009). Para determinar el grado de CaP que padece el paciente el sistema más usado es la escala de Gleason, esta escala es usada para determinar qué tan avanzado está el adenocarcinoma y la probabilidad de que se propague.

La escala de Gleason indica el estado de diferenciación que existe en el tejido del tumor con respecto al tejido normal de la próstata. La escala va de uno a cinco, siendo el número más bajo para aquellas células con morfología uniforme bien diferenciadas y el número más elevado para aquellas células con escasa o nula diferenciación. El patólogo busca en el tejido los dos tipos de patrones de crecimiento más comunes en el tumor y la escala se da como la suma de estos dos patrones. Por ejemplo, si un paciente tiene como patrones más comunes el grado tres y el grado cinco, su grado Gleason será $3+5= 8$ (*Canadian Cancer Society*, 2017). En la figura 6 se muestra un ejemplo de los cambios morfológicos según la escala Gleason.

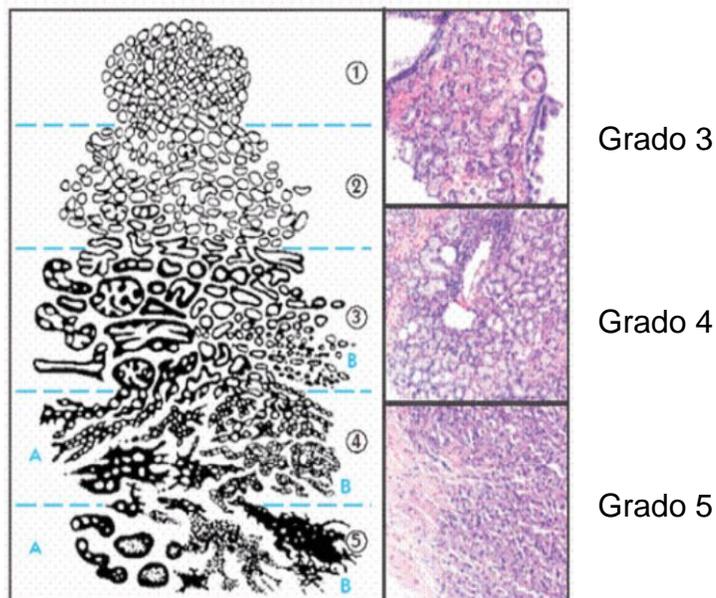


Figura 6. Escala de Gleason según cambios morfológicos en tejido de próstata. Se dan ejemplos del grado 3, 4 y 5 y sus respectivos cortes histológicos (Modificado de AFU, 2014).

Los tumores de bajo grado tienden a evolucionar más lentamente en comparación con los tumores de alto grado, los cuales evolucionan rápidamente hasta una enfermedad metastásica. La *American Cancer Society* estableció un rango de supervivencia a partir de que los hombres son diagnosticados con CaP:

- Rango relativo de supervivencia de 5 años para el 99% de los pacientes.
- Rango relativo de supervivencia de 10 años para el 98% de los pacientes.
- Rango relativo de supervivencia de 15 años para el 96% de los pacientes.

Durante los primeros 10 a 15 años después del diagnóstico del CaP existe un progreso lento de la enfermedad, sin embargo después de ese período los porcentajes de supervivencia libre de enfermedad metastásica disminuyen de un 76.9% a un 51.2% (Chodak, G.W., Thiested, R.A., Gerber, Johansson, & Adolfsson, 1994).

En algunos casos y dependiendo del estado en el que se encuentre el paciente, el médico recomienda la terapia de bloqueo androgénico, la cual consiste en disminuir los niveles de andrógenos o bloquear la actividad del AR. Aunque la terapia es exitosa al inicio, la mayoría de los pacientes tienen una recaída en un período de 2 a 3 años. Durante el tratamiento de bloqueo androgénico los niveles de testosterona

se mantienen bajos y a pesar de esto el CaP progresa hacia un estado denominado como cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) (Scher, Buchanan, Gerald, Butler, & Tilley, 2004; Thoreson, Gayed, Chung, & Raj, 2014). Lo anterior se ilustra en la Figura 7.

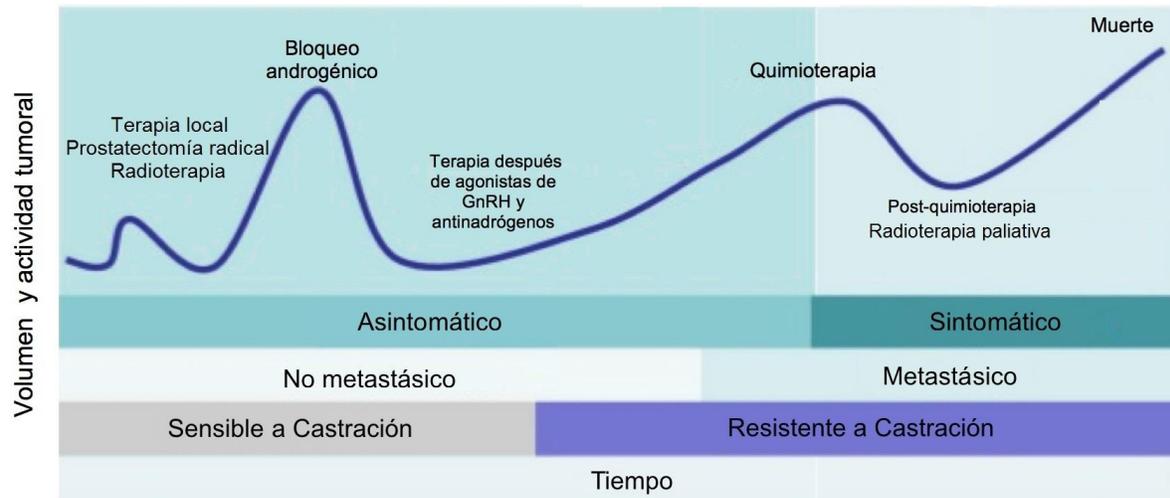


Figura 7. Curva del desarrollo y progresión del CaP en relación al volumen tumoral. En etapas iniciales se administra tratamiento local al tumor como prostatectomía radical o radioterapia, cuando el tumor se encuentra en un estadio de riesgo intermedio se comienza el bloqueo androgénico. Una vez que el tumor ha adquirido resistencia al bloqueo hormonal (resistente a la castración) se comienzan los tratamientos con quimioterapia (Modificado de Srikala, 2013).

3.2. CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN

El cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) es un estado de la enfermedad donde los niveles circulantes de testosterona se encuentran por debajo de 50ng/dL, cuando los niveles normales pueden variar según la edad de entre 250-950ng/dL (Cookson *et al.*, 2013) y existe un incremento continuo en los niveles de PSA con un esparcimiento metastásico, por lo que éste estado de la enfermedad resulta letal en la mayoría de los casos. A pesar de los esfuerzos para tratar el CPRC el tiempo promedio de supervivencia se extiende solo a 3 años (Cookson *et al.*, 2013; Heidenreich *et al.*, 2014; Roviello *et al.*, 2016).

Se proponen los siguientes mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a la castración química, los cuales pueden ser dependientes o no dependientes del receptor de andrógenos (AR):

Mecanismos dependientes del AR:

- Amplificación y sobre-expresión del AR

- Incremento en la sensibilidad del AR ante sus ligandos
- Mutaciones puntuales en el AR
- Variantes de *splicing* en el AR
- Activación del AR independiente del ligando
- Estereidogénesis alterada

Mecanismos no dependientes del AR:

- Activación del receptor de glucocorticoides
- Mecanismos de resistencia mediados por el sistema inmune
- Diferenciación neuroendocrina (Crona & Whang, 2017).

3.3. DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

3.3.1. ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)

La mayoría de los casos de CaP son diagnosticados mediante una evaluación rutinaria de los niveles de PSA o mediante un tacto rectal (TR), esto es ya que los casos de CaP primario usualmente no causan síntomas (*American Cancer Society*, 2016).

El PSA es una proteína con actividad de serín-proteasa producida en el epitelio prostático y en las glándulas periuretrales que se encuentra presente en las secreciones prostáticas. Las concentraciones de PSA en sangre son un marcador específico de la próstata, pero no son un marcador específico de la presencia de cáncer prostático ya que puede existir neoplasia con antígeno normal.

Se debe considerar que los niveles de PSA pueden estar incrementados en hombres con hiperplasia prostática benigna, infecciones y/o inflamaciones en la próstata (Andriole, Djavan, Fleshner, & Schröder, 2006; Bethesda, 2002).

Los niveles normales de PSA pueden variar según la edad, a continuación se presentan algunas estimaciones:

- >49 años: 2.5 ng/dL
- >59 años: 3.5 ng/dL
- >69 años: 4.5 ng/dL
- >79 años: 6.5 ng/dL

Mientras que para estimar el riesgo que existe para padecer CaP, se tienen las siguientes estimaciones:

- Bajo riesgo: Antígeno igual o menor a 10 ng/dL
- Riesgo intermedio: Antígeno de 10 a 20 ng/dL
- Riesgo alto: Antígeno mayor a 20 ng/dL (Amico, Cote, Loffredo, Renshaw, & Schultz, 2002).

En las pruebas clínicas los valores de PSA entre 4 y 10 ng/dL se consideran clínicamente sospechosos, en estos casos se emplean otros parámetros como el porcentaje libre de PSA en sangre y densidad del mismo. Estas pruebas en conjunto con el TR ayudan al médico a mejorar el diagnóstico y tomar la decisión definitiva de realizar o no la biopsia (Ballentine, H., 2007; Han, Potter, & Partin, 2000; Klingler *et al.*, 1998; Ozen *et al.*, 2001).

3.3.2. TACTO RECTAL

El tacto rectal es una prueba que permite la evaluación del estado de la glándula prostática, suele realizarse junto con la prueba de medición de PSA y está indicada para varones con sintomatología del tracto urinario o sospecha de recidiva local después de prostatectomía radical. El TR se realiza para determinar el tamaño, la forma, la simetría y la textura de la glándula prostática (Praveen, 2013; Vuichoud & Loughlin, 2015). Se tiene la sospecha de padecer cáncer de próstata si se la próstata del paciente es dura y/o nodular y además los niveles de PSA se encontraron elevados, entonces se prosigue a realizar la biopsia transrectal guiada con ultrasonido (Ballentine, H., 2007).

En este examen el médico usa guantes e inserta un dedo en el recto del paciente, entonces en la pared del recto (Figura 8), toca la próstata para evaluar los parámetros antes mencionados. La examinación es rápida e indolora a menos que el paciente sufra otro padecimiento en el recto; sin embargo, puede llegar a ser vergonzosa e incómoda para algunos hombres. Esta prueba permite determinar anomalías prostáticas pero nunca debe usarse como herramienta primaria de diagnóstico para CaP (Praveen, 2013; Tanguay *et al.*, 2009).

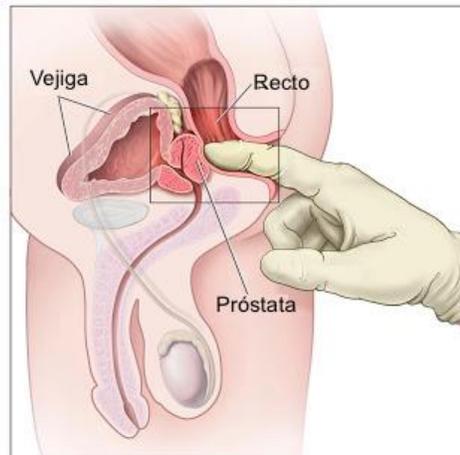


Figura 8. Representación de un tacto rectal.
(Modificado de NIH, 2017).

3.3.3. ULTRASONOGRAFÍA TRANSRECTAL Y BIOPSIAS

La ultrasonografía transrectal (*TRUS*, por sus siglas en inglés) genera una imagen de la próstata y las vesículas seminales. Anteriormente la TRUS se utilizaba para identificar lesiones que aparecían muy oscuras en la ecografía denominadas hipoecoicas, formadas usualmente por tejido blando. Sin embargo tras realizar la biopsia, un porcentaje menor al 20% de las lesiones de este tipo resultaban en cáncer y el 50% de las lesiones que sí eran cáncer eran omitidas (Flanigan *et al.*, 1994). Por esta razón, la TRUS no es recomendable como herramienta de diagnóstico de CaP en estadios tempranos, esta prueba solo se recomienda para determinar el volumen prostático y se utiliza como herramienta de apoyo en el diagnóstico de CaP.

El procedimiento de la TRUS sólo toma de 5 a 10 minutos y se pueden tomar de 10 a 12 biopsias.

Las causas para decidir realizar las biopsias guiadas por la TRUS incluyen un TR con resultado anormal, niveles elevados de PSA o un incremento continuo en las concentraciones del PSA y evidencia de neoplasia intraepitelial en biopsias anteriores (Borley & Feneley, 2009).

3.3.4. BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO

Los biomarcadores han sido introducidos como una herramienta de diagnóstico para diversas enfermedades incluyendo el cáncer.

Un biomarcador se define como una molécula biológica que puede ser medida y evaluada objetivamente en fluidos corporales o tejidos, como un indicador de procesos biológicos normales, patogénicos o respuestas farmacológicas hacia una intervención terapéutica. Los biomarcadores son usados para el diagnóstico y pronóstico de enfermedad y/o predicción y mejoramiento de la respuesta a algún tratamiento (Naylor, 2003).

La FDA establece que un biomarcador ideal debe ser específico, sensible, predictivo, de una detección precisa, accesible y no invasivo (FDA, s.f.).

Los biomarcadores pueden ser proteínas, metabolitos, transcritos de RNA, DNA o modificaciones epigenéticas del DNA (Prensner, Rubin, Wei, & Chinnaiyan, 2012). En la última década se han propuesto diversas moléculas que pueden servir como posibles biomarcadores en CaP (Tabla 1).

Tabla 1. Candidatos a biomarcadores para cáncer de próstata (Prensner *et al.*, 2012).

CANDIDATOS A BIOMARCADORES PARA CÁNCER DE PRÓSTATA		
α-metilacil coenzima A racemasa (AMACR)		Promotor del crecimiento independiente de andrógenos en CaP. Sobre-expresado en tejido de CaP a nivel de proteína y mRNA.
Antígeno de membrana específico de próstata (PSMA)		Proteína integral de membrana tipo II. Se transloca hacia la membrana en células de CaP y se encuentra en el citosol de células normales. Su presencia se ha relacionado con un pobre pronóstico clínico.
PCA3/DD3		Gen que codifica para un RNA largo no codificante (lncRNA) específico de próstata que se encuentra sobre-expresado en tejido de CaP. El lncRNA cuantificado en orina permite determinar la agresividad del CaP, evitando la necesidad de repetir la biopsia. Presenta menor sensibilidad pero mayor especificidad que el PSA. Al medirse junto con AMACR se genera una prueba con sensibilidad y precisión mejorada.
TMPRSS2-ERG		Se encuentra sobre-expresado en epitelio neoplásico de próstata. La fusión del gen TMPRSS2 con el gen ERG (factor de transcripción de la familia ETS), es el re-arreglo cromosómico más frecuente en CaP. Se ha encontrado presente en más del 50% de los pacientes con CaP.
Exosomas		Vesículas secretadas de talla nanométrica. Aquellos exosomas aislados de orina de pacientes con CaP pueden contener PCA3 y/o la fusión TMPRSS2-ERG.

Células circulantes tumorales (CCTs)

Se encuentran en sangre y son específicas de CaP localizado agresivo o de enfermedad metastásica. Se ha demostrado un incremento en la abundancia de las CCTs en sangre de pacientes con CPRC.

3.4. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El CaP es un tipo de cáncer de progresión lenta en etapas iniciales, por esta razón en algunos casos el médico puede recomendar diferentes métodos de tratamiento o seguimiento según los resultados de las pruebas iniciales.

Dentro de las opciones de seguimiento más comunes se encuentra la vigilancia activa, la cual consiste en monitorear el CaP localizado en lugar de tratarlo inmediatamente. El paciente tendrá que someterse a diferentes pruebas (medición de PSA, TR, imagenología y biopsias) para monitorear el cáncer, pero no recibirá tratamiento hasta que exista evidencia de crecimiento en el tumor. El CaP localizado a menudo tiene una evolución lenta por lo que varios hombres con este tipo de tumor pueden no necesitar tratamiento a lo largo de su vida (*Prostate Cancer UK, 2016*).

Otro tipo de seguimiento para el CaP es la espera en observación, la cual suele ser confundida con la vigilancia activa, ambas tienen como objetivo evitar cualquier tipo de tratamiento innecesario, pero la espera en observación se recomienda principalmente para aquellos pacientes que padecen de otros problemas de salud y no pueden hacer frente a tratamientos agresivos como la cirugía o la radioterapia. El propósito de la espera en observación no es curar el cáncer si no, contenerlo y evitar que continúe avanzando. La espera en observación involucra menos pruebas que la vigilancia activa, como medición de PSA cada 6 a 12 meses y TR sin necesidad de biopsias (*Prostate Cancer UK, 2016*).

3.4.1. PROSTATECTOMÍA RADICAL

La prostatectomía radical se recomienda para pacientes con expectativa de vida de diez años o más, con cáncer localmente avanzado, con bajo volumen, con niveles séricos de PSA menores 20 ng/mL y con Gleason menor a siete (*American Cancer Society, 2016; Prostate Cancer UK, 2016; Secretaría de Salud, 2001*).

En este tipo de cirugía se remueve por completo la glándula prostática, las vesículas seminales y los nódulos linfáticos pélvicos para tratar de asegurar que el cáncer no re-aparezca por su esparcimiento a estas zonas (Rockville, 2005).

Dentro de los efectos secundarios que pueden surgir después de la operación se encuentran incontinencia urinaria, disfunción eréctil, cambios en la intensidad del orgasmo, infertilidad, linfedema, disminución en la longitud del pene y hernia inguinal (*American Cancer Society*, 2016).

3.4.2. RADIOTERAPIA

La radioterapia es un tipo de tratamiento en donde la radiación es usada para inhibir el crecimiento de las células cancerosas del tumor. El tratamiento puede darse de dos maneras distintas, mediante radiación con rayos externos o con braquiterapia. La terapia de radiación de rayos externos es usada para tratar el cáncer en estadíos tempranos, el propósito de esta terapia es dirigir la radiación sólo hacia las células tumorales presentes en la glándula prostática y así evitar el daño los tejidos sanos que se encuentran alrededor del cáncer. Como efectos secundarios se pueden presentar problemas intestinales, urinarios, impotencia, cansancio y linfedema.

La braquiterapia también conocida como “implantación de partículas”, se basa en usar una sonda de ultrasonido para guiar unas agujas (que contienen las partículas radioactivas) hacia el interior de la próstata. Estas partículas liberan la radiación gradualmente con el paso del tiempo y una vez que la radiación se ha liberado por completo las partículas pueden quedarse dentro de la próstata para evitar una segunda intervención. Generalmente consta de un único procedimiento y se recomienda para los pacientes con CaP en estadío temprano y con crecimiento tumoral lento (Rockville, 2005).

La radioterapia con radioisótopos está indicada para tratar el CaP avanzado metastásico, los radioisótopos más usados son el estroncio-89 y el radio-223. En este tipo de radioterapia, al paciente se le inyectan radioisótopos que viajan vía sanguínea, acumulándose en cualquier hueso que haya sido dañado por el CaP. Estos radioisótopos son particularmente útiles cuando el paciente presenta dolor en más de un área (*Prostate Cancer UK*, 2016).

3.4.3. TERAPIA HORMONAL

La terapia hormonal o terapia de bloqueo androgénico, tiene como objetivo disminuir los niveles de testosterona en el cuerpo del paciente o bloquear los efectos de esta hormona para detener el crecimiento de las células cancerosas (Rockville, 2005).

Cuando el cáncer se ha propagado y la radioterapia o la cirugía no son opciones de tratamiento para el paciente se emplea la terapia hormonal. También se usa esta terapia cuando existe una recaída después de la radioterapia o de la cirugía.

Tabla 2. Tipos de terapia hormonal que pueden utilizarse en la clínica para tratar el cáncer de próstata (American Cancer Society, 2016; Carrizo, 2001).

TERAPIA HORMONAL		
TIPOS	DESCRIPCIÓN	FÁRMACOS
Orquiectomía	Consiste en la extirpación de los testículos los cuales son la fuente principal de andrógenos.	
Agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH)	Los agonistas pueden colocarse como implantes debajo de la piel, generan un aumento breve en los niveles de testosterona seguido de una drástica disminución de testosterona. Los antagonistas bajan los niveles de testosterona más rápido que los agonistas sin causar la elevación previa de los niveles de testosterona.	Agonistas: Leuprolerina, goserelina, triptorelina. Antagonistas: Abarelix, degarelix.
Inhibidor de CYP 17	La enzima CYP17 promueve la producción de testosterona en otras células del cuerpo incluyendo células cancerosas. Bloquean a la enzima inhibiendo la producción de testosterona en las células. Este tipo de tratamiento no detiene la producción de testosterona generada por los testículos.	Abiraterona
Anti-andrógenos	Contrarrestan las acciones de los andrógenos en las células efectoras. Se conocen dos tipos de fármacos anti-andrógenos, los que suprimen a las gonadotrofinas y aquellos que se unen al AR para impedir que los andrógenos lleven a cabo su función.	Esteroides: Ciproterona, megestrol, medroxiprogesterona. No esteroides: Flutamida, nilutamida, bicalutamida.

3.4.4. QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia consiste en la administración de fármacos vía oral o intravenosa, este tipo de tratamiento está indicado en los pacientes con enfermedad metastásica y refractarios al bloqueo androgénico.

El número de sesiones de quimioterapia dependerá de qué tan avanzado se encuentre el cáncer y si el paciente está tomando algún tratamiento hormonal. Pueden ser desde 3 hasta 10 sesiones con algunas semanas de descanso entre cada sesión (*Prostate Cancer UK*, 2016).

Los fármacos usados en la quimioterapia incluyen:

- Docetaxel y Cabazitaxel: Intervienen en la polimerización de los microtúbulos, deteniendo el crecimiento y propagación de las células al inhibir su proceso de división celular.
- Mitoxantron: Fármaco antineoplásico que inhibe la síntesis de DNA y RNA, generalmente no se usa para tratar el CaP, pero el médico puede recetarlo en caso de que el paciente no sea capaz de lidiar con los efectos secundarios del docetaxel (Medline Plus, 2015; *Prostate Cancer UK*, 2006).

Algunos efectos secundarios que se presentan después de la quimioterapia son la pérdida del cabello, infecciones, sangrado, fatiga intensa, náuseas, vómitos, boca seca, aparición de úlceras en la boca, pérdida de apetito, diarrea, disminución de glóbulos blancos y cansancio (*American Cancer Society*, 2016).

4. MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

4.1. ANDRÓGENOS

Los andrógenos son hormonas sexuales masculinas capaces de desarrollar y mantener las características masculinas en los tejidos reproductivos. Los andrógenos controlan la diferenciación y maduración de los órganos reproductivos masculinos, incluyendo la glándula prostática (Quigley *et al.*, 1995).

La testosterona es el principal andrógeno en circulación y es sintetizado por las células de Leydig en los testículos, bajo la regulación de la hormona luteinizante

(LH) que a su vez está regulada por la hormona reguladora de gonadotropina (GnRH). En la figura 9 se representa el eje hipotálamo-pituitaria-gónadas.

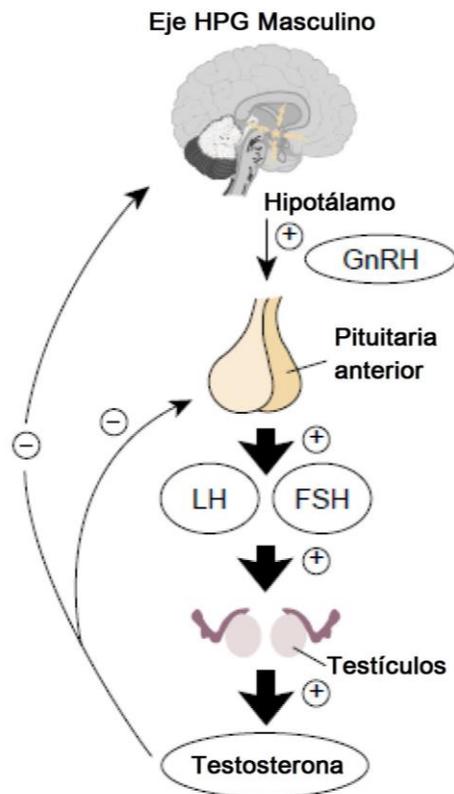


Figura 9. Esquema representativo del eje hipotálamo-glándula pituitaria-gónadas (HPG) en el hombre. Producción de testosterona. (Modificada de Kong *et al.*, 2014)

Las glándulas adrenales también sintetizan pequeñas cantidades de andrógenos como la dehidroepiandrosterona (DHEA) y la androstenediona (Attar, Takimoto, & Gottardis, 2009). LA DHEA y la androstenediona son andrógenos débiles que constituyen una reserva circulante de precursores para su conversión en esteroides sexuales bioactivos en tejidos extragonadales como el hígado, riñón, músculo y tejido adiposo (Oesterling *et al.* 1981).

Una vez que la testosterona ha sido sintetizada, viaja por vía sanguínea unida a la albúmina y a la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) (Feldman & Feldman, 2001), es capaz de entrar a las células por difusión pasiva, ya que es un derivado del colesterol lo que la vuelve una molécula lipofílica. La testosterona es

convertida en dihidrotestosterona (DHT) por acción de la enzima 5 α R una vez dentro de la célula (Evans, 1988). La DHT es un andrógeno que tiene una afinidad 10 veces mayor que la testosterona por el AR (Wilbert & Wilson, 2015).

Los efectos biológicos de los andrógenos son mediados principalmente por su unión al AR, el cual conduce a patrones característicos de expresión génica mediante la regulación transcripcional de genes blanco responsivos a andrógenos (Quigley *et al.*, 1995).

4.1.1. RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El AR es un factor de transcripción nuclear y miembro de la súper familia de receptores de hormonas esteroides. Está localizado en el cromosoma Xq11-12 y posee 8 exones. Codifica a una proteína de 919 aminoácidos con una masa de 110kDa. El AR posee un dominio N-terminal poco conservado (NTD), un dominio de unión al DNA altamente conservado (DBD) y un dominio de unión al ligando medianamente conservado (LBD). Una pequeña secuencia de aminoácidos denominada “*hinge region*” separa el LBD del DBD y contiene parte de la señal de localización nuclear dependiente de ligando para el transporte nuclear del AR (Figura 10) (Lonergan & Tindall, 2011).

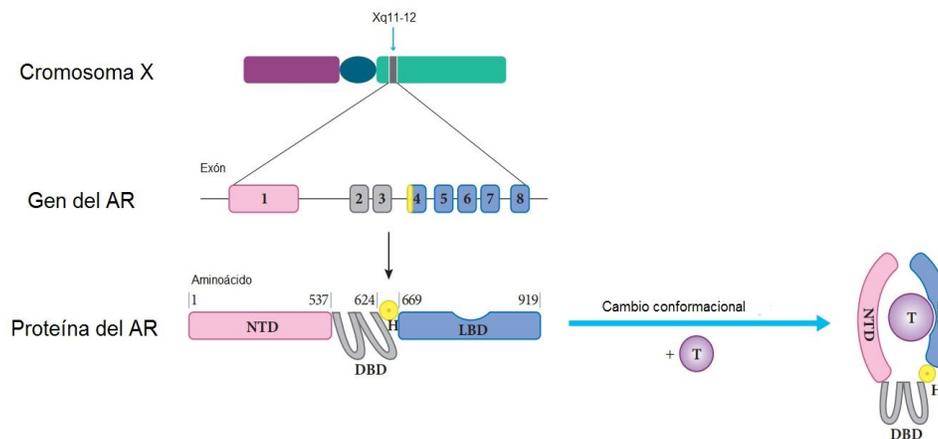


Figura 10. Estructura del gen y de la proteína del receptor de andrógenos. Se muestra el cambio conformacional después de la unión al ligando. Se representa la *hinge region* como H, dominio N-terminal como NTD, dominio de unión al ligando como LBD y la testosterona o DHT como T (Modificado de Lamb, Massie, & Neal, 2014).

Tanto la testosterona como la DHT pueden unirse al AR y activarlo bajo condiciones fisiológicas. En ausencia de ligando, el AR se localiza en el citoplasma donde está

asociado a proteínas de shock térmico (HSP-90, 70, 56), proteínas del citoesqueleto y otras chaperonas. Se ha demostrado que proteínas HSP interactúan con proteínas del citoesqueleto las cuales pueden unirse a la “*hinge region*” del AR modulando su translocación nuclear.

Cuando el ligando (testosterona o DHT) se une al AR, se induce un cambio conformacional donde el AR se dimeriza y se transloca al núcleo. Una vez dentro del núcleo el AR se une a secuencias específicas de reconocimiento conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ERAs) que se encuentran en los promotores y regiones *enhancer* de los genes blanco del AR (Lonergan & Tindall, 2011). En la figura 11 se muestra el mecanismo de acción de la testosterona mediada por el AR.

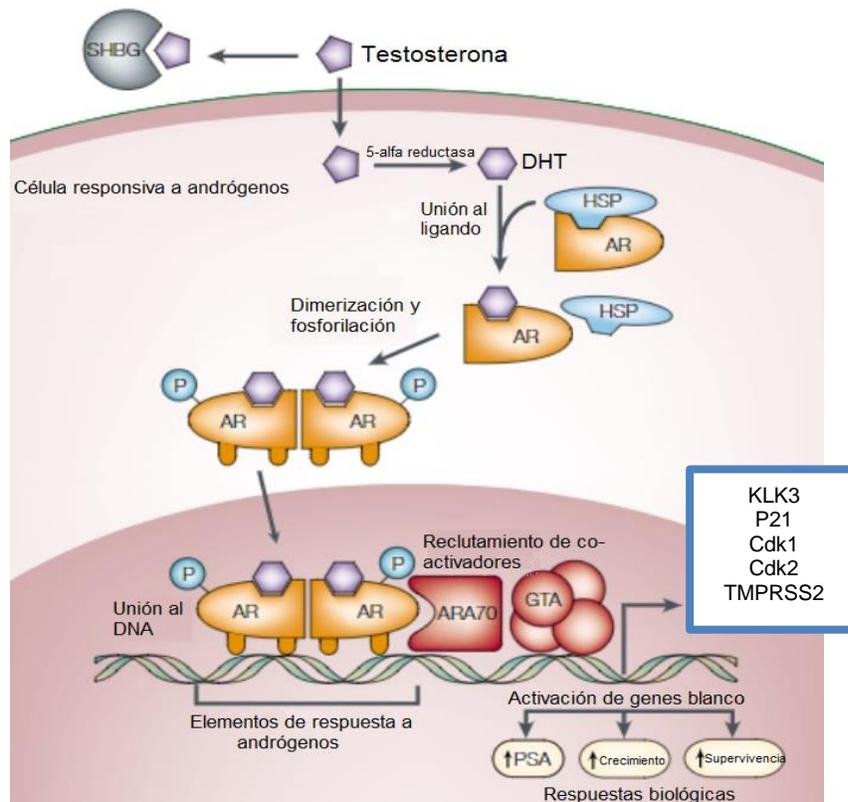


Figura 11. Mecanismo del AR. Se muestra la conversión de la testosterona a DHT catalizada por la enzima 5- α R. Al unirse la DHT al AR, éste se disocia de las proteínas de shock térmico (HSP) y el AR se dimeriza y fosforila para translocarse al núcleo donde al unirse a los ERAs inicia la transcripción de genes blanco (Feldman & Feldman, 2001).

Diversos estudios han establecido que los niveles fisiológicos de andrógenos son importantes tanto para el crecimiento normal, como para el crecimiento maligno de la próstata. Los niveles elevados de andrógenos por sí solos no pueden conducir a

una proliferación celular descontrolada. Sin embargo, la activación de la señalización del AR independiente del ligando tiene un papel crítico en la iniciación y en la progresión del CaP (Wang & Tindall, 2011). Esta activación del AR independiente del ligando puede ser mediada por diferentes mecanismos como los siguientes ilustrados en la figura 12:

- Hipersensibilidad del AR: Generada por amplificación del AR o aumento en los niveles de andrógenos.
- AR promiscuo: El AR se activa ante pseudo-andrógenos, antagonistas de andrógenos o corticoesteroides.
- Activación del AR por factores de crecimiento: Activación del AR independiente de ligando mediada por el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) o el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Feldman & Feldman, 2001).

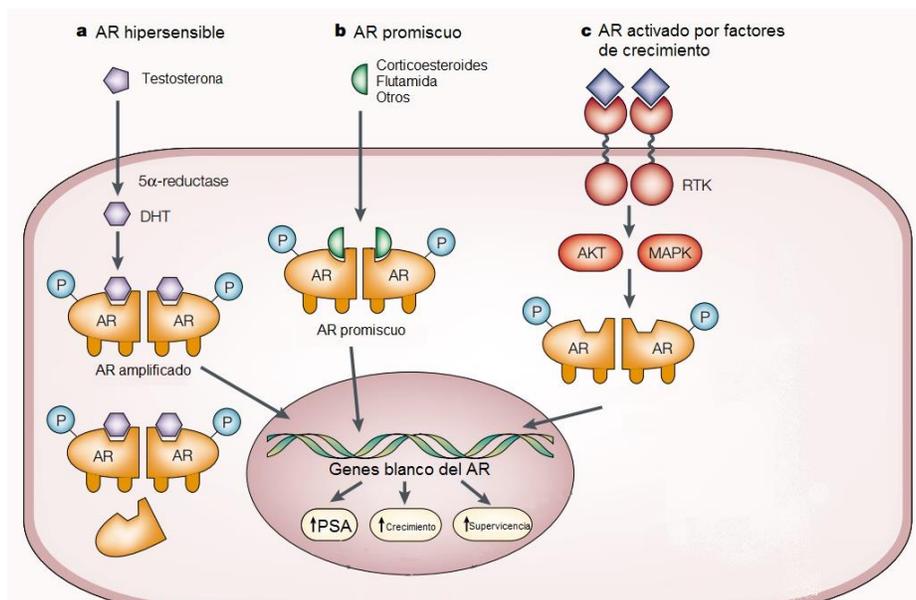


Figura 12. Posibles vías para la independencia a andrógenos. A. En la vía hipersensible se produce más de un AR por amplificación, aumentando su sensibilidad. B. Cuando el AR es promiscuo, el AR pierde su especificidad y puede ser activado por moléculas no androgénicas. C. En la activación por factores de crecimiento los receptores tirosin-quinasa (RTK) son activados lo que genera la fosforilación del AR vía MAPK o AKT, produciendo un AR independiente de ligando (Modificado de (Feldman & Feldman, 2001).

Los andrógenos y el AR son los principales reguladores de la relación entre la proliferación y la muerte celular en CaP, los cuales son los procesos celulares base del desarrollo del cáncer (Huggins, 1978). El AR promueve la transcripción de varios

genes blanco, como aquellos involucrados en la diferenciación y función prostática, regulación de la proliferación y crecimiento celular, apoptosis y supervivencia (Dehm & Tindall, 2006).

Interesantemente uno de los genes regulados por andrógenos es el gen TMPRSS2 el cual es específico de la próstata y posee elementos sensibles a andrógenos en su promotor. El gen TMPRSS2 está involucrado en los re-arreglos cromosómicos más recurrentes en CaP los cuales resultan en la fusión de la región 5' no traducida del gen TMPRSS2 y genes miembros de la familia ETS (transformación específica de eritoblastos). Este tipo de fusiones juegan un papel importante en la tumorigénesis especialmente en CaP (Kumar-sinha, Tomlins, & Chinnaiyan, 2008).

4.2. FUSIÓN TMPRSS2-ERG

Tomlins *et al.*, 2005, fueron los primeros en describir la fusión de genes entre el gen TMPRSS2 y la familia de genes ETS (Figura 13) (ERG, ETV1, ETV4 o ETV5). La fusión TMPRSS2-ERG (T-E) es uno de los eventos genéticos más predominantes en CaP, estudios recientes han indicado que la fusión T-E se encuentra presente aproximadamente en un 50% de los casos de CaP y debido a su prevalencia, la fusión T-E tiene una importancia clínica y biológica en el desarrollo y progresión del CaP (Pettersson *et al.*, 2013; St. John *et al.*, 2012).

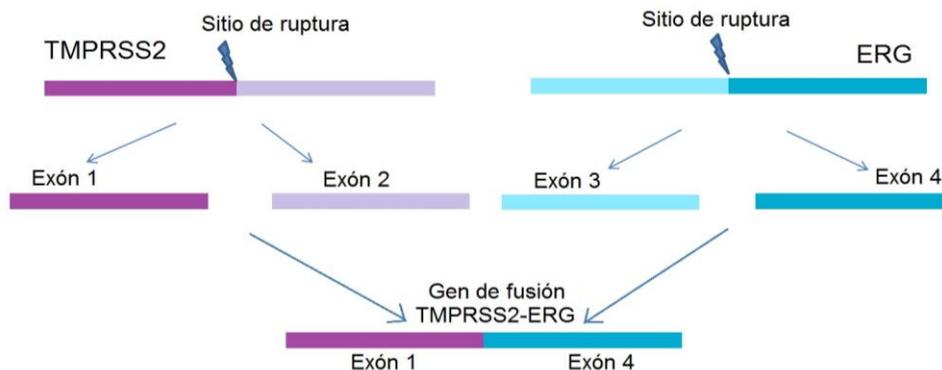


Figura 13. Formación de la fusión involucrando el exón 1 del gen TMPRSS2 y el exón 4 del gen ERG (Modificado de FusionCancer database, 2014).

La fusión T-E más común involucra el exón 1 del gen TMPRSS2 (21q22) y el exón 4 del factor de transcripción ERG (21q22). El gen TMPRSS2 es específico de la glándula prostática, se expresa constitutivamente y su transcripción está controlada

por andrógenos a través de los elementos sensibles a andrógenos que se encuentran en su promotor en la región 5'- UTR.

ERG es miembro de la familia de genes ETS, ésta es una familia de genes de factores de transcripción en donde sus 27 miembros comparten un dominio de unión al DNA altamente conservado, este dominio les permite unirse a secuencias de DNA ricas en purinas que contienen la secuencia 5'-GGAA/T-3' (Burdova, Bouchal, Tavandzis, & Kolar, 2014).

Una vez que ha ocurrido el re-arreglo se produce una importante regulación positiva de ERG en donde su expresión es modulada por el promotor responsivo a andrógenos de TMPRSS2, como se ve en la figura 14. ERG es capaz de regular funciones como el crecimiento, diferenciación y proliferación celular, además juega un papel importante en el proceso de transición epitelial-mesenquimal (TEM) y al ser un oncogén, los cambios en la regulación de estos procesos conduce al desarrollo del cáncer (Klezovitch *et al.*, 2008).

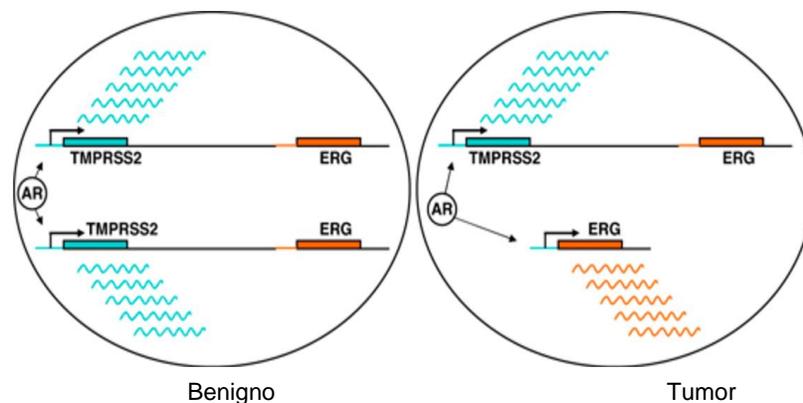


Figura 14. Efecto del AR sobre el promotor regulado por andrógenos del gen TMPRSS2 en un gen sin fusión (Benigno) y en un gen con la fusión que resulta en la sobre-expresión del gen ERG (Tumor) (Mwamukonda *et al.*, 2010).

Las implicaciones del pronóstico en aquellos pacientes que poseen la fusión T-E aún son debatibles ya que, desde su descubrimiento en 2005, han surgido varios estudios en donde se señala una correlación entre la fusión T-E y mal pronóstico. Sin embargo otros estudios han encontrado una correlación entre la fusión T-E y un buen pronóstico y otros estudios en donde no se ha encontrado correlación alguna. A pesar de que se ha encontrado presencia de la fusión en la mayoría de casos de

CaP metastásico, también se han encontrado casos de metástasis sin presencia de la fusión (Delpus R., Delliaux C. *et al.*, 2017).

Lo interesante de esta fusión es que además de involucrar una regulación por parte del AR; algunos de los genes blanco cuya transcripción se ve aumentada como consecuencia de la sobre-expresión de ERG, están asociados a la vía de señalización WNT (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014). Wu *et al.*, 2013 encontraron que la sobreexpresión de ERG es capaz de inducir la expresión de ligandos de la vía WNT como WNT1, WNT2, WNT3A y WNT11, además de demostrar que ERG ejerce una fuerte regulación sobre el factor de transcripción LEF1.

Los componentes de la vía WNT se encuentran altamente conservados en diferentes especies, esta vía WNT se encarga de regular procesos de desarrollo embrionario, diferenciación y proliferación celular además de estar involucrada en la auto-renovación de células madre. Cualquier mutación o cambios en la regulación de esta vía pueden conducir a defectos en el desarrollo y otras patologías como el cáncer (Zhan, Rindtorff, & Boutros, 2016).

Por otro lado, se ha reportado que la activación del AR también puede ser mediada por componentes de la vía WNT como la β -catenina. La importancia de la interacción ente la fusión T-E y la vía WNT, es que la desregulación en esta vía está directamente involucrada en el desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre ellos el CaP (Terry, Yang, Chen, Vacherot, & Buttyan, 2006; Yang *et al.*, 2006a).

4.3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT

La vía de señalización WNT está mediada por glicoproteínas secretadas de una masa aproximada de 40 kDa y contienen cisteínas conservadas, la mayoría del genoma de los mamíferos incluyen 19 genes Wnt que se agrupan en 12 subfamilias conservadas.

El nombre de los genes Wnt proviene de un acrónimo del homólogo *wingless* (wg) e Int-1, los cuales han sido descritos en mosca y ratón respectivamente. En 1982 Nusse y Varmus encontraron que el virus de tumor mamario en ratón (MMTV) promueve la carcinogénesis mamaria en ratón, al insertarse en un gen específico

del genoma hospedero, ellos llamaron a este gen Int-1. Posteriormente en 1987 el gen *wingless* en *Drosophila melanogaster* se identificó como un homólogo de Int-1 (Rijsewijk et al., 1987).

La vía WNT participa en procesos de desarrollo embrionario, procesos de control como especificación celular, proliferación celular, polaridad y migración, además también se encuentra implicada en el mantenimiento de la población de células tipo *stem cells* y se ha reportado desregulada en procesos neoplásicos (Yardy & Brewster, 2005).

Cuando la vía WNT es activada por las proteínas Wnt extracelulares, se pueden activar diferentes cascadas de transducción de señal intracelulares, como:

- Vía canónica o Wnt/ β -catenina.
- Vía no canónica o independiente de β -catenina.
 - Ruta de polaridad celular planar (PCP).
 - Ruta Wnt/ Ca^{2+} (Habas & Dawid, 2005).

Debido a que estas vías de señalización juegan un papel crucial durante la embriogénesis, las proteínas Wnt están estrictamente reguladas de manera espacial y temporal durante las etapas del desarrollo. Es por eso que la desregulación en la señalización WNT puede tener graves consecuencias en el desarrollo del embrión o patologías pleiotópicas y cáncer (Logan & Nusse, 2004; Yamaguchi, 2001).

La activación de las rutas de señalización de la WNT puede ser controlada por diferentes antagonistas, dentro de los cuales se encuentra el factor 1 inhibidor de Wnt (WIF1), *Cerberus*, *Sclerostin* y miembros de la familia *Dickkopf* y la familia de proteínas secretadas relacionadas a *Frizzled* (SFRP). Las proteínas *Sclerostin* y *Dickkopf* antagonizan la vía WNT al unirse a los co-receptores lipoproteicos de baja densidad (LRP), mientras que WIF, *Cerberus* y SFRP la antagonizan uniéndose directamente a las proteínas Wnt (Elzi, Song, Hakala, Weintraub, & Shiio, 2011).

Dentro de las dos diferentes vías de señalización de la vía WNT, la vía dependiente de β -catenina es de especial interés ya que se ha demostrado que la β -catenina es capaz de interactuar con el AR y promover su actividad transcripcional de manera independiente de andrógenos, por lo que puede tener un papel importante durante

la progresión hacia el estado de resistencia a la castración (G. Wang, Wang, & Sadar, 2009).

4.3.1. RUTA CANÓNICA O WNT/ β -CATENINA

La característica clave de la ruta canónica es la degradación regulada del co-activador transcripcional β -catenina. La β -catenina es una proteína que pertenece a la familia de proteínas armadillo y se encuentra en múltiples localizaciones sub-celulares.

Cuando la β -catenina se encuentra en el citoplasma sus niveles son controlados por el complejo de Axina y cuando se encuentra en el núcleo está involucrada en la regulación transcripcional (Prakash & Swaminathan, 2015).

En ausencia de proteínas Wnt, la β -catenina citoplasmática es degradada por el complejo de Axina (Figura 15) el cual está conformado por la proteína coli de poliposis adenomatosa (APC), la cinasa 3 de glicógeno sintasa (GSK-3), la proteína-fosfatasa 2A (PP2A) y la caseín-cinasa 1 α (CK1 α). La fosforilación de la β -catenina es mediada por GSK-3 y CK1 α , esta fosforilación marca a la β -catenina para su ubiquitinización y subsecuente destrucción proteolítica mediada por el proteosoma (Komiya & Habas, 2008).

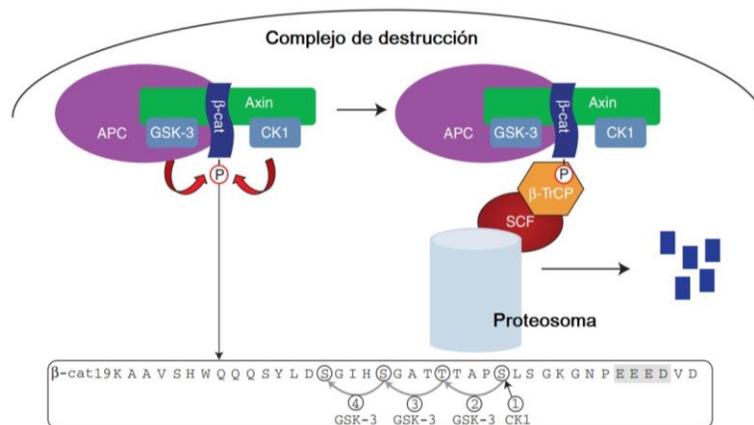


Figura 15. Complejo de degradación de Axina. Se muestra la fosforilación de los residuos de la β -catenina mediado por GSK-3 y CK1 α y su degradación en el proteosoma. (Modificado de Stamos & Weis, 2013).

La cascada de señalización (Figura 16) comienza cuando las proteínas Wnt secretadas al espacio extracelular se unen al dominio extracelular N-terminal rico en cisteínas (CRD, por sus siglas en inglés) de la familia de los receptores *Frizzled*

(Fz). Estos receptores tienen 7 asas transmembranales y están acoplados a proteínas G. Para que esta interacción se lleve a cabo se necesita de la participación de co-receptores lipoproteicos de baja densidad 5/6 (LRP 5/6) los cuales se fosforilan una vez que se forma el complejo ligando-receptor (Bovolenta, Rodriguez, & Esteve, 2006; He, Semenov, Tamai, & Zeng, 2004a; Heuberger & Birchmeier, 2010).

La formación del complejo Wnt-Fz-LRP5/6 activa la proteína homologa a *Dishevelled* (Dvl-1 – Dvl-3) lo cual resulta en el reclutamiento del complejo de Axina hacia la membrana celular donde se encuentran los receptores Fz y LRP5/6. Estos eventos conducen a la inhibición de la fosforilación de la β -catenina mediada por el complejo de Axina. La β -catenina se estabiliza y se acumula en el citoplasma lo cual promueve su translocación hacia el núcleo donde interactúa con el factor de transcripción específico de células T y la familia de proteínas del factor 1 de unión al potenciador linfoide (TCF/LEF1), junto con la proteína de células B linfoma 9 (Bcl-9), CREB y CBP, activan la transcripción de genes como c-myc, c-Jun, fibronectina, ciclina D1, metaloproteinas 7 (MMP7) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) entre otros (He, Semenov, Tamai, & Zeng, 2004b; Heuberger & Birchmeier, 2010; Kang et al., 2014; MacDonald, Tamai, & He, 2010; Stewart, 2014).

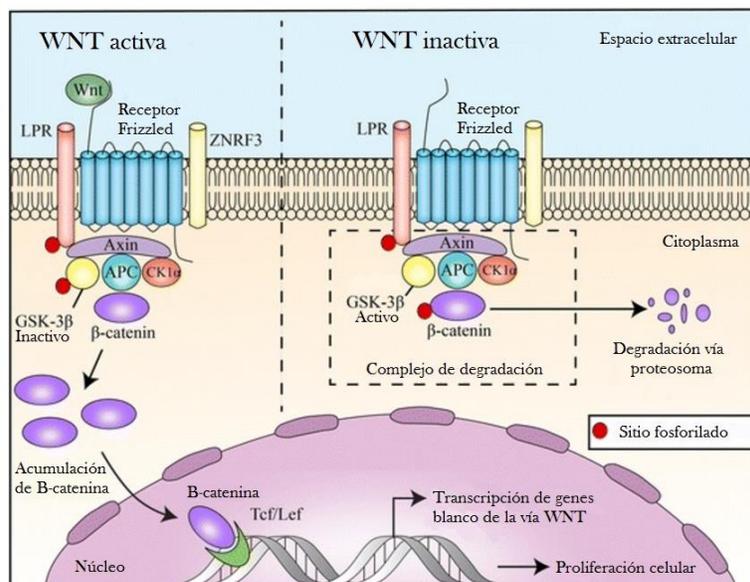


Figura 16. Vía canónica de la WNT, se muestra el complejo de Axina en ausencia de señales Wnt y la acumulación de β -catenina cuando las proteínas Wnt se han unido a los receptores Fz y LRP. (Modificado de Pai et al., 2017).

La ruta canónica de la vía WNT es muy importante en el desarrollo del CaP, ya que se ha demostrado que componentes de esta vía pueden interactuar con el AR afectando su señalización. Algunas interacciones incluyen a la β -catenina que es capaz de formar un complejo con el AR y promover su señalización en células de CaP (Truica, Byers, & Gelmann, 2000). La proteína GSK-3 que forma parte del complejo de degradación de la β -catenina, es capaz de fosforilar al AR disminuyendo así su capacidad de activar la transcripción (Mazor, Kawano, Zhu, Waxman, & Kypka, 2004). Por último, existen tres sitios activos de unión para TCF/LEF1 en la región del promotor del AR, por lo que la vía WNT puede incrementar la transcripción del AR (Yang et al., 2006b).

Los ligandos que están involucrados en la activación de la ruta canónica incluyen a las proteínas Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt8 y Wnt8b (He S *et al.*, 2015). Sin embargo se ha reportado que la Wnt3a se encuentra altamente expresada en células de CaP avanzado (Bonci D *et al.*, 2008).

Dentro de los antagonistas de la vía WNT resaltan las proteínas SFRP ya que se ha reportado una baja expresión de estas proteínas en distintos tipos de cáncer y se sugiere que exista una inactivación específica tumoral de estas proteínas, favoreciendo la progresión del cáncer (Andresen et al., 2012). Por lo anterior es necesario investigar más a fondo sobre el papel de estas proteínas y su papel como reguladoras de la vía WNT en procesos carcinogénicos.

4.4. FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS SFRP

Las proteínas solubles relacionadas a Fz, mejor conocidas como SFRPs, son proteínas que pueden unirse directamente a las proteínas Wnt y a los receptores Fz por sus similitudes estructurales (Finch *et al.*, 1997; Rattner *et al.*, 1997). La familia de las SFRPs está conformada por cinco miembros, los cuales se agrupan en dos diferentes *clusters* según la similitud de sus secuencias; las proteínas SFRP1, 2 y 5 pertenecen al primer grupo que está distantemente relacionado al segundo grupo conformado por las proteínas SFRP3 y 4 (García-hoyos *et al.*, 2004).

La estructura de las proteínas SFRP se representa en la figura 17. Las SFRPs son glicoproteínas de aproximadamente 300 aminoácidos de longitud con una

secuencia señal y un dominio rico en cisteína similar a frizzled (CRD) el cual constituye la región N-terminal y una región de unión a heparina hidrofílica además de un motivo relacionado a netrina (NTR) que constituye el C-terminal. El dominio CRD posee 10 residuos de cisteína conservados los cuales tienen una homología de secuencia con el dominio CRD de la parte extracelular de los receptores Fz (Figura 16) (Dann *et al.*, 2001; K. Lin *et al.*, 1997; Rattner *et al.*, 1997).

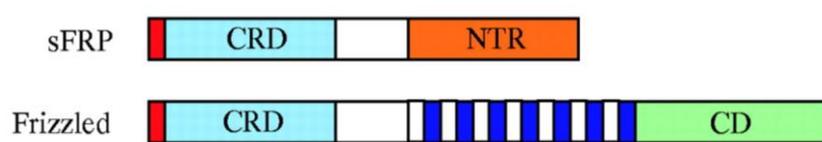


Figura 17. Representación de los dominios en la estructura de las proteínas SFRP y receptores Frizzled (Kawano & Kypta, 2003).

Esta homología permite que las SFRPs inicien la formación de un complejo con los receptores Fz.

Estudios iniciales que se realizaron en *Xenopus* y en *Drosophila* designaron a las SFRPs como antagonistas de la vía WNT/ β -catenina por su habilidad de unirse a las proteínas Wnt (Leyns *et al.*, 2011; X. Lin & Perrimon, 1999; Reichsman *et al.*, 2000).

Recientemente se demostró que el dominio CRD de las SFRPs puede tener una función dual, ya que por una parte es capaz de unirse a las proteínas Wnt e inhibir la vía de señalización WNT dependiente de β -catenina como se ve en la figura 18, pero por otra parte también tiene la habilidad de unirse a los receptores Fz formando homo y heterodímeros que son capaces de estimular la transducción de señal (Bhat, Stauffer, Komm, & Bodine, 2007; Carron *et al.*, 2003; Martin-Manso *et al.*, 2012). Este efecto dual de las proteínas SFRPs es dependiente de su concentración y del contexto celular, es decir es decir, de las condiciones a las que esté expuesta la célula o el proceso que esté llevando a cabo. Un ejemplo son SFRP1 y 2, que han demostrado incrementar o disminuir la estabilización de β -catenina dependiendo del tipo celular y el patrón de expresión de los receptores Fz (Xavier *et al.*, 2015).

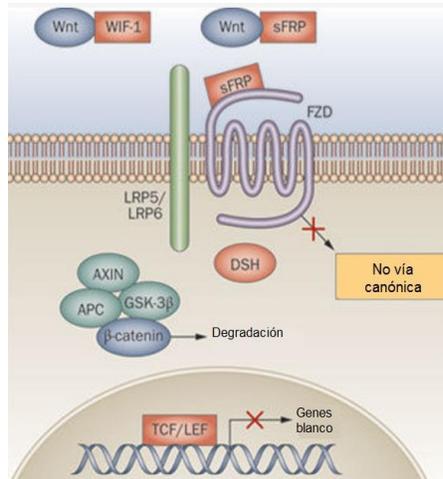


Figura 18. Representación del mecanismo de inhibición de la vía WNT/ β -catenina por la proteína SFRP1 (Modificado de (Saini, Majid, & Dahiya, 2011))

La vía WNT juega un papel importante en la proliferación, diferenciación y apoptosis en tejidos adultos, una activación aberrante de esta vía ocurre en una amplia variación de tumores por lo que una regulación a la baja de las SFRPs es frecuente en carcinomas resaltando la importancia de las SFRPs como reguladores de la actividad Wnt en tejidos sanos (Kawano & Kypta, 2003).

Las SFRPs poseen una función de supresor tumoral, se ha observado que en carcinomas invasivos como cáncer de mama, gástrico, cervical, hepato-celular y de próstata existe una pérdida o significativa regulación a la baja de SFRP1 o SFRP3 (Bovolenta *et al.*, 2008).

Zheng *et al.*, 2015 encontraron que existía una expresión disminuida de SFRP1 en muestras de CaP y que esta expresión se correlacionaba inversamente con la expresión de β -catenina lo que conduce a un pobre pronóstico de supervivencia de los pacientes con CaP, por esta razón SFRP1 ha sido propuesto como un biomarcador predictivo y de pronóstico. (Zheng *et al.*, 2015). Por lo anterior, estudiar el papel de la proteína SFRP1 como regulador de la vía WNT es esencial para comprender los mecanismos de progresión del CaP.

4.4.1. PROTEÍNA SFRP1 EN CÁNCER DE PRÓSTATA

La proteína SFRP1 también conocida como SARP-2, FRP1 o FrzA, se encuentra en el cromosoma 8p21, un sitio frecuente de pérdida de heterocigosidad en tumores humanos (Wright *et al.*, 1998).

SFRP1 es una proteína que es requerida para el desarrollo normal de la próstata y se ha postulado que tiene un papel como modulador paracrino entre la comunicación estroma-epitelio en el crecimiento epitelial, morfogénesis de ramificación y la expresión de genes (Joesting *et al.*, 2008). Se ha encontrado que la proteína SFRP1 esta sub-regulada en distintos tipos de cáncer como el cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de riñones (Bardou *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1998).

Reportes han demostrado que las SFRPs tienen una expresión disminuida por pérdida de heterocigosidad o por metilación en su promotor. Principalmente se ha encontrado que las SFRP1, 2, 4 y 5 se encuentran hipermetiladas en su promotor en cáncer de esófago, colorrectal, de pulmón y mama; sin embargo, en cáncer de próstata los niveles bajos de expresión de SFRP1 además de ser mediados por la hipermetilación también se ha observado una ganancia aberrante de la marca de histona H3K27me3 (García-Tobilla *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2015; Vincent & Postovit, 2017; Zou *et al.*, 2005).

La proteína SFRP1 es de vital importancia para evitar la transcripción de genes que promueven la proliferación celular además de la diferenciación, las cuales son factores importantes para el desarrollo y progresión del cáncer.

SFRP1 es capaz de inhibir la actividad transcripcional del AR así como la proliferación de líneas celulares andrógeno-dependientes como LNCaP y 22Rv1 (Kawano *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2015).

La vía WNT y la fusión T-E están estrechamente relacionadas con la señalización del AR, estos procesos se encuentran desregulados en CaP por lo que determinar si la proteína SFRP1 puede tener algún efecto sobre la interacción de estas tres vías de señalización permitiría conocer más acerca de los mecanismos de progresión en el CaP.

5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata representa el segundo tipo de cáncer más común a nivel mundial, y es la primera causa de muerte por tumores malignos en hombres en México. Algunos tumores tienen características que contribuyen a que las células de CaP se vuelvan más agresivas y desarrollen resistencia a la castración.

Dentro de éstas características neoplásicas se encuentran la sobre-expresión de la fusión T-E, la cual se encuentra presente en más del 50% de los casos de CaP. Esta fusión de genes promueve la activación de vías de señalización como la vía WNT cuyo producto final es la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y la progresión tumoral. A pesar del conocimiento que existe sobre la participación de dichas vías de señalización en el progreso de la enfermedad se conoce poco sobre el efecto de la proteína SFRP1 sobre genes de fusión en CaP.

En el presente trabajo se plantea evaluar el efecto de la proteína SFRP1 en dos líneas celulares que tienen diferente expresión de la fusión T-E, donde una de ellas presenta una mutación en el dominio de unión al ligando del AR. Los mecanismos por los cuales SFRP1 podría ejercer una regulación sobre T-E no han sido establecidos aún y entender dichos mecanismos nos permitirá establecer si la proteína SFRP1 puede servir como un posible tratamiento para los tumores de CaP que expresan la fusión de genes TMPRSS2-ERG.

6. HIPÓTESIS

El tratamiento con la proteína SFRP1 sobre las células de CaP que expresan la fusión TMPRSS2-ERG generará una disminución en su viabilidad celular y migración, así como en la expresión de genes y proteínas relacionados a la vía WNT y el receptor de andrógenos.

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la proteína SFRP1 sobre la vía WNT y el receptor de andrógenos mediante la evaluación de la expresión genes y proteínas relacionados a dichas vías en células VCaP que expresan la fusión TMPRSS2-ERG y células LNCaP que no expresan la fusión, para determinar el papel de la proteína SFRP1 en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata.

7.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Medir el efecto de SFRP1 sobre la viabilidad en células VCaP que expresan expresan la fusión TMPRSS2-ERG y células LNCaP que no expresan la fusión.
- ✓ Medir el efecto de SFRP1 sobre la migración celular mediante un ensayo de sanación
- ✓ Determinar el efecto de SFRP1 sobre la expresión de genes y proteínas de la vía WNT y de la vía del receptor de andrógenos *in vivo* e *in vitro* mediante ensayos de PCR en tiempo real.
- ✓ Determinar los cambios en las concentraciones de PSA en suero de un modelo murino después del tratamiento con la proteína SFRP1.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares utilizadas se obtuvieron de la “*American Tissue Culture Collection*” (ATCC). Se crecieron en medio RPMI 1640 con rojo de fenol (Gibco[®], 31800022), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (BioWest, S1810) al 10%. Se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C con atmósfera de al 5% de CO₂.

Las características generales de las líneas celulares utilizadas son las siguientes:

- LNCaP, ATCC[®] CRL-1740[™]: Células epiteliales adherentes, derivadas de CaP con metástasis a nódulo linfático. Expresa PSA y un AR altamente sensible.
- VCaP ATCC[®] CRL-2876[™]: Células epiteliales adherentes, derivadas de CaP con metástasis a vertebras. Expresa PSA y la fusión Tmprss2-ERG.

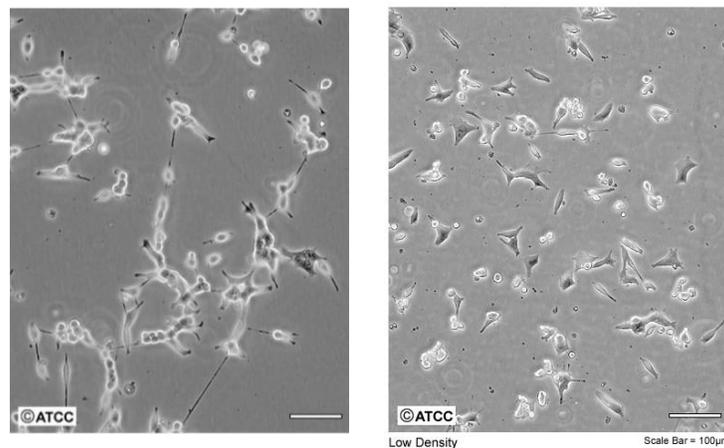


Figura 19. Morfología normal de líneas celulares LNCaP (izquierda) y VCaP (Derecha). (ATCC).

8.2. TRATAMIENTOS CON SFRP1 Y DHT

La aplicación de los tratamientos se llevó a cabo en medio RPMI 1640 sin rojo de fenol (Sigma Aldrich[®], R8755), suplementado con SFB filtrado por carbono (*Charcoal stripped*, en inglés) (Gibco[®], 12676029). Se aplicaron los tratamientos con la hormona DHT (Sigma, D-073) a concentraciones de 0.1-10nM y con la proteína recombinante SFRP1 a concentraciones de 0.1-10nM. Para las preparaciones de DHT se usó como vehículo etanol a una concentración final del 1% y para las

preparaciones de SFRP1 se usó como vehículo BSA a una concentración final del 1%. En los diferentes tratamientos las condiciones control se prepararon con medio RPMI sin rojo de fenol suplementado con SFB filtrado por carbono más BSA y DHT al 1%.

8.3. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)

Se colocaron 1×10^4 células por pozo en 17 placas de 96 pozos. Las células se dejaron crecer por 48hrs. Se sembraron más placas únicamente con células VCaP para verificar resultados.

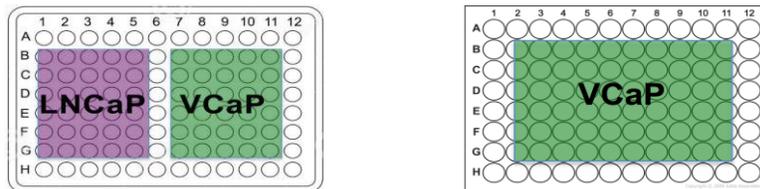
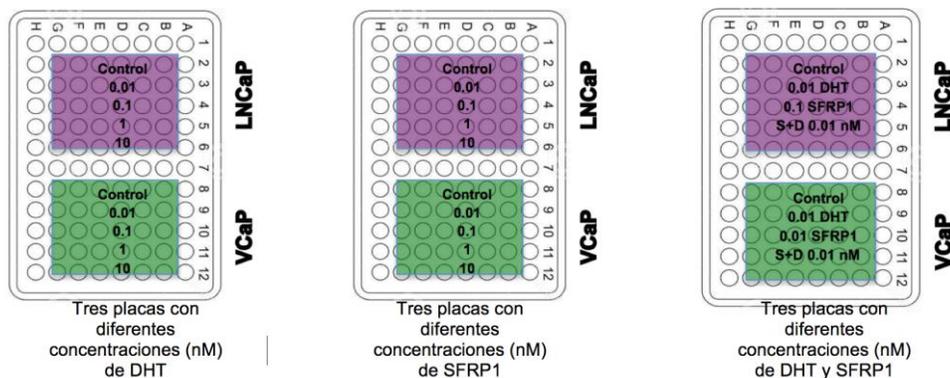


Ilustración 1. Esquema de distribución celular en placas de 96 pozos para ensayo de viabilidad. Figura de elaboración propia.

Posterior a este tiempo se realizó la depleción hormonal cambiando el medio RPMI con rojo de fenol por medio RPMI sin rojo de fenol y SFB filtrado por carbono; y se aplicaron los tratamientos.



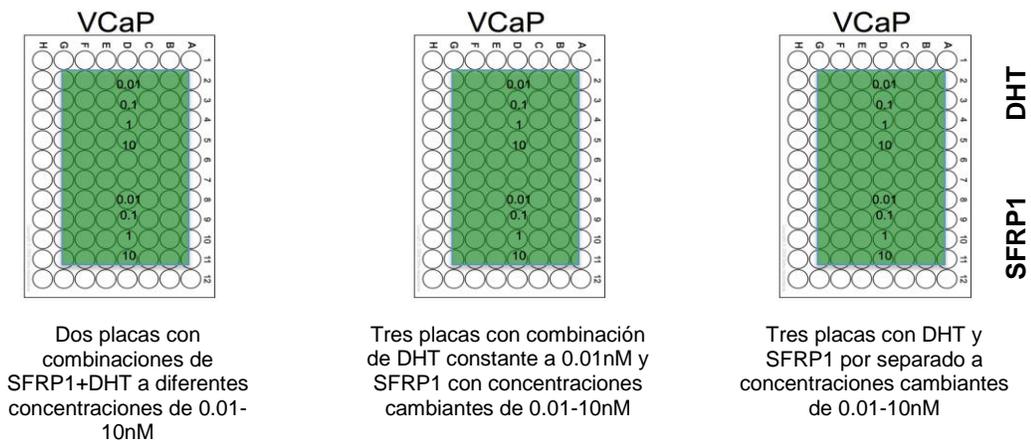


Ilustración 2. Esquema de distribución de tratamientos en placas de 96 pozos para ensayo de viabilidad celular. Figura de elaboración propia.

Las placas se dejaron incubar otras 24 horas y posterior a este tiempo se colocaron 10µL del reactivo MTT y se incubaron por 2 horas a 37°C en atmósfera con CO₂. Pasadas las 2 horas se agregaron 100µL de SDS al 10%, las placas se cubrieron con papel aluminio y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente. La lectura se realizó al día siguiente en un equipo Epoch™ (Biotek, Microplate Spectrophotometer) a una absorbancia de 570nm.

8.4. ENSAYO DE MIGRACIÓN POR HERIDA

Se colocaron 5×10^5 células VCaP y 5×10^5 células LNCaP en cada pozo en 6 placas de 6 pozos.

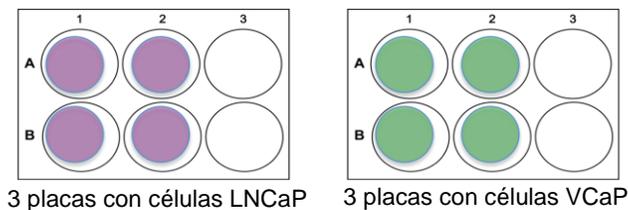


Ilustración 3. Esquema de distribución celular en placas de 6 pozos para ensayos de herida. Figura de elaboración propia.

Las placas se incubaron por 48 horas, al terminar éste tiempo se realizó cambio de medio ya las 24 horas las células se lavaron con 1mL de PBS por 1 minuto, posteriormente se aplicaron los tratamientos y se realizó una herida sobre la

monocapa de células con una punta de micropipeta de 200µL en el centro de cada pozo de cada placa, cuando se encontraban a un 100% de confluencia. Se tomaron fotografías cada 24 horas a partir de las 0 horas y hasta las 96 horas. Las placas se dejaron incubaron a 37°C en atmósfera con CO₂ hasta las 96 horas

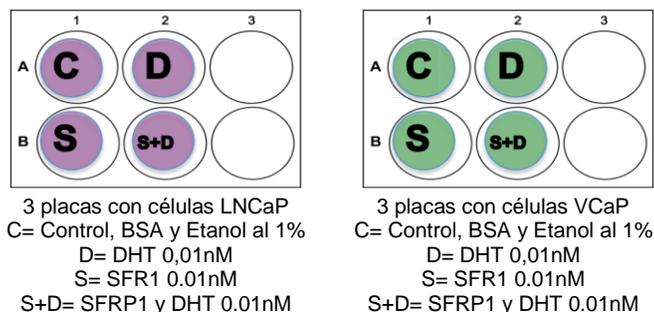


Ilustración 4. Esquema de distribución de tratamientos en placas de 6 pozos para ensayo de herida. Figura de elaboración propia.

8.5. ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE mRNA Y PROTEÍNAS

Se utilizaron 16 matraces para cultivo celular de 25 cm², 8 matraces para células LNCaP y 8 matraces para células VCaP.

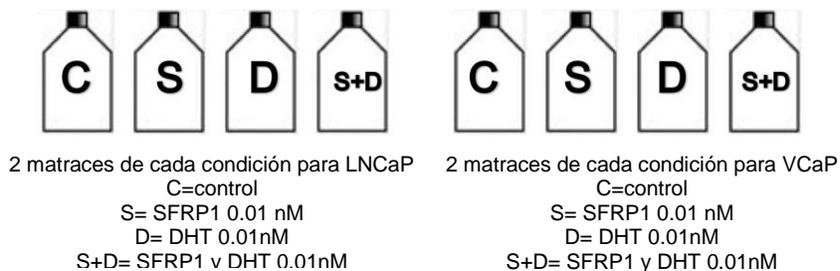


Ilustración 5. Esquema de distribución celular en matraces de 25cm² para extracción de proteínas. Figura de elaboración propia.

Los matraces se incubaron por 24 horas hasta un 80-90% de confluencia. Un matraz de cada condición se destinó para extracción de RNA y otro matraz de cada condición se destinó para extracción de proteínas.

A continuación, las células se lavaron con PBS y después se agregaron 250 µL de buffer RIPA a cada botella, las células se fueron removiendo con un raspador o *scraper* y el lisado se transfirió a tubos estériles de 1.5 ml. Se realizaron tres alícuotas de suspensión celular tanto para la extracción de RNA como para la extracción de proteínas del apartado siguiente.

Para la extracción de RNA se utilizó el RNeasy Mini Kit (250) (Qiagen, 74106) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se guardó a -80°C.

Se realizó una retrotranscripción (RT) con 500 ng de RNA utilizando el kit Revert Aid Synthesis (ThermoFisher, K1691), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de reacción fueron 42 °C por 60 minutos, 70 °C por 5 minutos y finalmente 4 °C a tiempo indeterminado como seguridad hasta guardar las muestras a 4 °C. Con este ensayo se obtuvo DNA complementario (cDNA) del cual se utilizaron 2 µL para realizar una PCR en tiempo real utilizando un equipo de la compañía Life Technologies: Sistema QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System. Para la PCR se utilizaron sondas TaqMan® prediseñadas para medir la expresión de los siguientes genes: AR (Hs00171172_m1), KLK3 (PSA) (Hs02576345_m1), WNT3A (Hs00263977_m1), FZD4 (Hs00201853_m1) y LEF1 (Hs00610060_m1); se usó GAPDH (Hs02758991_g1) como control interno. Todas las sondas fueron adquiridas en Applied Biosystems. Los datos se analizaron por el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Al lisado celular obtenido en los pasos anteriores después, se le agregaron 250 µL de buffer RIPA (Sigma Aldrich®, R0278), las muestras se dejaron 2 horas a 4°C y enseguida se centrifugaron a 13,000 rpm (11300 g) por 30 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se depositó en un tubo estéril de 1.5 ml. Se agregó 1 µL de inhibidor de proteasas por cada 100 µL de lisado obtenido.

Las proteínas se guardaron a -20°C hasta la cuantificación.

Para la extracción de proteínas de citoplasma y núcleo se utilizó el kit NE-PER™ *Nuclear and cytoplasmic extraction reagents* (ThermoFisher, 78833), según las instrucciones del fabricante. Los extractos de proteínas nucleares se guardaron a -80°C hasta la cuantificación.

La cuantificación se realizó con el kit de cuantificación EZQ™ (ThermoFisher Scientific, #R33200), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las proteínas se visualizaron en un transiluminador UV a 300 nm con un tiempo de exposición de 0.05 segundos.

Para obtener la cuantificación en concentración de µg, los resultados se analizaron con el programa *Image Studio Lite* (LICOR Biosciences).

Para el ensayo de Western Blot se utilizaron 20 µg de proteína, y se corrieron electroforesis en geles SDS-PAGE al 12 % (15-60 kDa) y al 8% (30-120 kDa). Los

geles se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PDVF, por sus siglas en inglés) (BioRad, #1620177) las cuales se activaron previamente en metanol y buffer de transferencia frío. La transferencia se realizó en un equipo Semi-Dry de Bio-Rad, para proteínas de LNCaP a 15 volts por 30 minutos y la transferencia para proteínas de VCaP se realizó a 15 Volts por 1 hora. Las membranas se bloquearon con leche al 5% en buffer TBST/Tween 1 % por 2 horas a 4 °C, después se agregaron los anticuerpos primarios en leche al 1 % en buffer TBST/Tween al 1 % y se dejaron incubando en agitación toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con buffer TBST/Tween al 1% y se colocaron los anticuerpos secundarios en leche al 1% en buffer TBST/Tween al 1% y se dejaron incubando en agitación a temperatura ambiente por 2 horas. Al terminar la agitación, las membranas se lavaron 3 veces con buffer TBST/Tween al 1%, y se incubaron con el sustrato Luminanta TM Forte Western HRP (Merck Millipore, WBLUF0100) 4 minutos. Las membranas se visualizaron en un fotodocumentador, tomando en promedio 10 fotografías cada dos o cinco segundos por tres minutos

Tabla 3. Diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron durante el ensayo de Western Blot.

Proteína	Anticuerpo Primario		Anticuerpo Secundario	
	Dilución	Datos del Anticuerpo	Dilución	Datos del Anticuerpo
GAPDH	1:40,000	Monoclonal Anti-GAPDH (Abcam, ab8245)	1:20,000	Anti-mouse IgG, HRP linked Antibody (Cell Signaling, 7076)
PSA	1:5,000	Monoclonal PSA/KLK3 Rabbit mAb (Cell signaling, 2475)	1:10,000	Monoclonal Anti-Rabbit IgG HRP (Abcam, ab99697)
ERG	1:1,000	Monoclonal Anti ERG-1/2/3 (Santa Cruz, sc-376293)	1:2,000	Anti-mouse IgG, HRP linked Antibody (Cell Signaling, 7076)
AR	1:5,000	Rabbit Monoclonal Anti-AR (Abcam, ab108341)	1:10,000	Monoclonal Anti-Rabbit IgG HRP (Abcam, ab99697)

8.5.1. ENSAYOS DE EXPRESIÓN EN UN MODELO *IN VIVO* DE XENOTRANSPLANTE MURINO Y MEDICIÓN DE PSA

Se realizaron xenotransplantes de células VCaP que se inocularon en ratones de la cepa *nu/nu*. Se inyectaron 80 μ L de una suspensión celular con 5×10^6 células/ μ l en matrigel. La inoculación se realizó en el lomo del ratón vía subcutánea.

De nuestra población piloto de estudio, dos ratones desarrollaron tumor, éstos se identificaron como 2A y 2V. El peso de los ratones y las medidas del tumor se monitorearon cada tercer día. Se realizó toma de muestra sanguínea de la cola de los ratones cada semana, tomando 400 μ L de sangre para medir las concentraciones de PSA en suero con el kit PSA (Human) ELISA Kit (Abnova, KA0208) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los ratones fueron castrados a la semana 2 (ratón 2A) y a la semana 5 (ratón 2V). Se realizó aplicación de tratamiento con la proteína SFRP posterior a la castración, inyectando directamente en el tumor 50 μ L de la proteína recombinante durante 10 días.

Para asemejar la terapia de bloqueo de los andrógenos utilizada en la clínica, realizamos una cirugía de castración entre la segunda y quinta semana posteriores a la aparición del tumor. El tejido tumoral se extrajo en la semana 13 cuando tenía un volumen aproximado de 450-480 mm³. El RNA del tejido se obtuvo mediante el método de trizol y se guardó a -80 °C. Se realizó un ensayo de retrotranscripción (RT) con 500 ng de RNA utilizando el kit Reverse Aid Synthesis (ThermoFisher, K1691), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó un ensayo de PCR con las mismas condiciones utilizadas previamente para los modelos celulares *in vitro*.

9. RESULTADOS

9.1. Los tratamientos con DHT y SFRP1 tienen efectos diferentes sobre la viabilidad celular en LNCaP y VCaP.

Para este ensayo se probaron diferentes tratamientos con DHT y SFRP1 a diferentes concentraciones y en diferentes combinaciones para determinar si estos tratamientos pudieran tener algún efecto sobre la viabilidad celular tanto en las células LNCaP como en las células VCaP. En este ensayo los tratamientos con concentraciones crecientes de DHT y SFRP1 no mostraron tener efectos significativos en las líneas celulares. Sin embargo en la línea celular LNCaP se puede observar un efecto positivo a la concentración de 0.01nM como se ve en el gráfico 1. La línea celular VCaP muestra un ligero aumento en la viabilidad a una concentración de DHT 0.01nM siendo no significativo. En el gráfico 2 observamos un efecto positivo en la viabilidad de LNCaP y VCaP con SFRP1 a concentración de 0.01nM y una disminución a concentraciones de 10nM en LNCaP y de 1nM en VCaP.

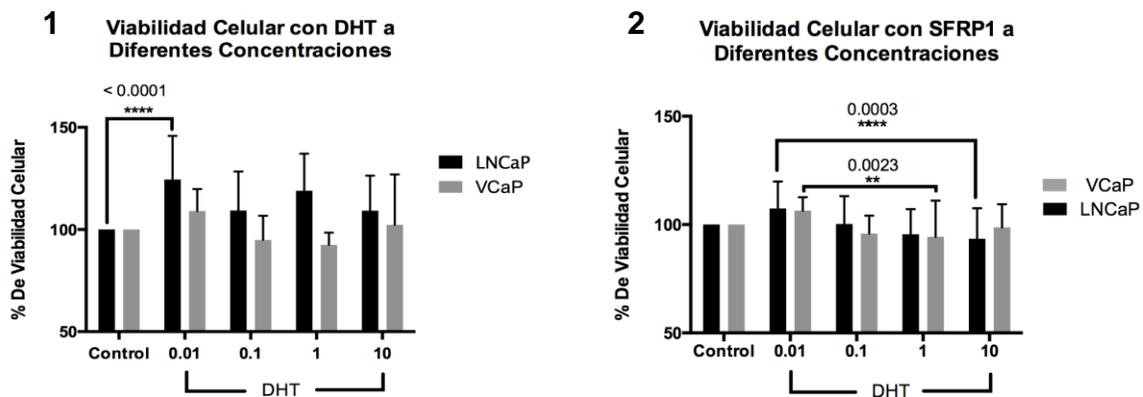


Gráfico 1 y 2. Viabilidad celular en células LNCaP y VCaP con tratamientos de DHT y SFRP1 a diferentes concentraciones (0.01 nM, 0.1 nM, 1 nM y 10 nM). 1. **Tratamiento con DHT.** Se puede observar que no existe una tendencia en ninguna de las líneas celulares, sin embargo, en LNCaP se observa que con cualquier concentración de DHT la viabilidad se mantiene superior al control, teniendo un aumento significativo a una concentración de 0.01nM. 2. **Tratamiento con SFRP1.** Ambas líneas celulares experimentan aumento con la concentración SFRP1 0.01nM. En LNCaP se observa una tendencia a la baja cuando se aumenta la concentración de SFRP1, con una disminución significativa en 10nM vs. 0.01nM. En VCaP la disminución más notable se observa en 1nM vs. 0.01nM. Mayor significancia=****

En ambas líneas celulares observamos un aumento en la viabilidad a concentraciones de 0.01nM de DHT y 0.01nM de SFRP1, por lo cual se decidió realizar un ensayo realizando una combinación de DHT y SFRP1 a dichas concentraciones para ver si juntas tenían un efecto sinérgico en la viabilidad o sucedía lo contrario. Lo que se encontró fue que nuevamente con DHT la línea celular LNCaP muestra un aumento significativo. Con el tratamiento combinado de S+D no se observaron cambios significativos sin embargo se ve que ambas líneas aumentan un poco su viabilidad siendo el efecto más notable en la línea celular LNCaP, como se ve en el gráfico 3.

3 Viabilidad Celular con DHT y SFRP1 0.01nM

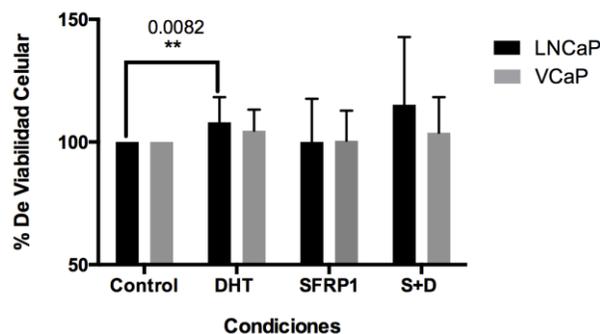


Gráfico 3. Viabilidad celular en células LNCaP y VCaP tratadas con DHT y SFRP1 a concentraciones de 0.01 nM. Aumento significativo con DHT únicamente en LNCaP, no se observan cambios significativos cuando se aplica SFRP1 sola. Ligero aumento no significativo con tratamiento S+D.

Debido a que en los ensayos anteriores observamos que la línea celular LNCaP mostraba mayores efectos con los tratamientos decidimos tomar como referencia el tiempo de duplicación de esta línea celular (40 a 60h) y aplicar tratamientos a diferentes tiempos, desde antes de su tiempo de duplicación hasta un poco después. Puesto que los ensayos anteriores se habían realizado a 48h. En estos ensayos la concentración de DHT fue constante de 0.01nM y se probaron concentraciones de 0.01nM y 1nM de SFRP1.

En el gráfico 4, observamos que antes del tiempo de duplicación que es a las 24 horas, existe un aumento de la viabilidad con los tratamientos de SFRP1 0.01nM y

la combinación S+D. A las 72 horas existe una disminución en la viabilidad con la combinación S+D y al llegar a las 96 horas la viabilidad se recupera pero no muestra diferencias significativas. En el gráfico 5 observamos que al aumentar la concentración de SFRP1 a 1nM, la disminución de la viabilidad se mantiene desde las 24 horas hasta las 72 horas con la combinación S+D. Nuevamente a las 96 horas la viabilidad se recupera.

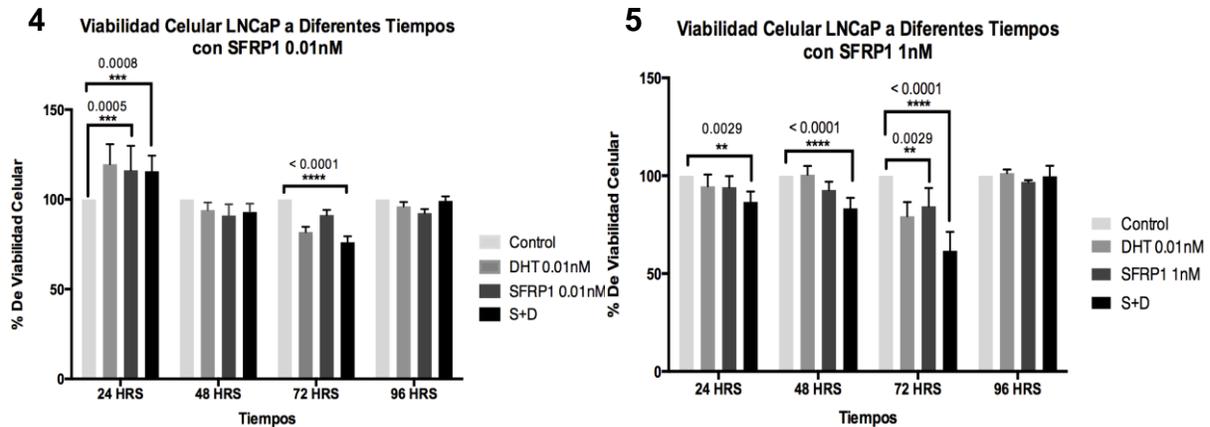


Gráfico 4. Viabilidad celular en células LNCaP con DHT constante a 0.01nM y SFRP1 con concentración de 0.01nM probando diferentes tiempos (24hrs, 48hrs, 72hrs y 96hrs). Aumento de viabilidad celular con un tratamiento de S+D a las 24hrs y disminución de viabilidad celular con tratamiento de S+D a las 72hrs. **Gráfico 5. Viabilidad celular en células LNCaP con DHT constante a 0.01nM y SFRP1 a una concentración 1nM probando diferentes tiempos (24hrs, 48hrs, 72hrs y 96hrs).** Disminución de viabilidad celular con tratamiento de S+D a las 24, 48 y 72hrs.

Posteriormente decidimos aplicar diferente número de tratamientos con DHT 0.01nM constante y de nuevo dos concentraciones de SFRP1, 0.01nM y 1nM en la línea celular LNCaP, cada 24 horas.

En el gráfico 6 observamos que el efecto negativo sobre la viabilidad de LNCaP se potencia usando de dos a tres tratamientos cada 24hrs con SFRP1 y S+D 0.01nM y que cuando la concentración aumenta a 1nM la viabilidad aumenta a partir de los 3 tratamientos como se ve en el gráfico 7. Lo anterior indica que en la línea celular LNCaP, existe una disminución en la viabilidad usando SFRP1 y S+D a concentraciones bajas de 0.01nM y que se tiene un aumento en la viabilidad cuando la concentración de SFRP1 se eleva a 1nM.

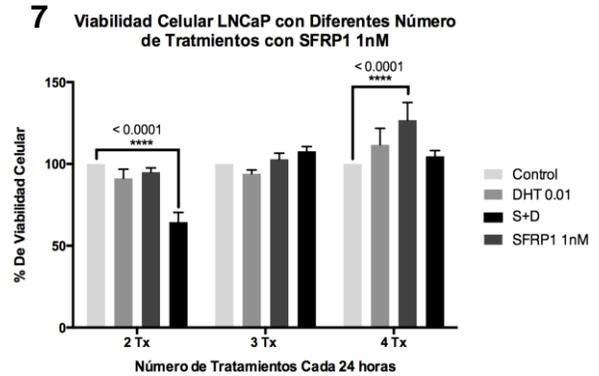
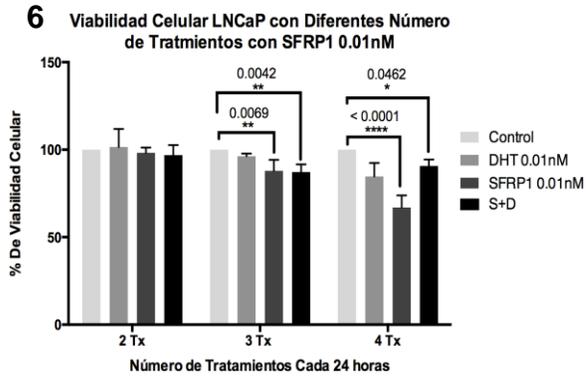


Gráfico 6. Viabilidad celular en células LNCaP con dos, tres o cuatro tratamientos de DHT y SFRP1 ambos a una concentración de 0.01nM, aplicados cada 24hrs. Disminución de la viabilidad cuando se aplican 3 o 4 tratamientos de SFRP1 sola o con DHT. **Gráfico 7. Viabilidad celular en células LNCaP con dos, tres o cuatro tratamientos de DHT 0.01nM y SFRP1 a una concentración de 1nM, aplicados cada 24hrs.** Disminución de la viabilidad con dos tratamientos cuando se usa SFRP1 más DHT. Aumento de viabilidad cuando se aplican 4 tratamientos de SFRP1 sola.

En la línea celular VCaP se encontró que SFRP1 no afecta su viabilidad hasta alcanzar concentraciones elevadas de 10nM en donde la proteína SFRP1 genera un aumento de ésta como se ve en el gráfico 8.

8 Viabilidad Celular de VCaP con Tratamientos de SFRP1 y DHT por separado

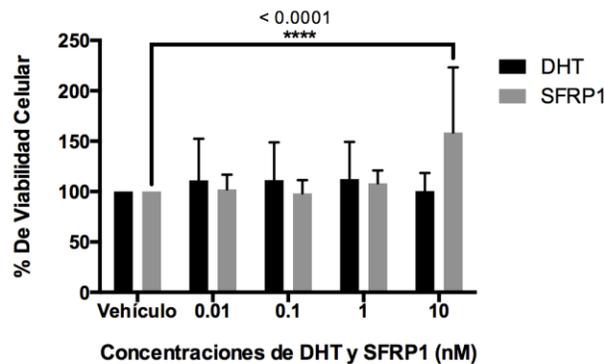


Gráfico 8. Viabilidad celular en células VCaP con un solo tratamiento de DHT y SFRP1 por separado a diferentes concentraciones (0.01nM, 0.1nM, 1nM y 10nM). Aumento significativo de viabilidad con tratamiento de SFRP1 a una concentración de 10nM con respecto al control y las otras concentraciones probadas. No se observan cambios importantes con el tratamiento de DHT.

En el gráfico 9 se decidió utilizar DHT a una concentración constante de 0.01nM y combinarlo con concentraciones crecientes de SFRP1 y en el gráfico 10 se combinó DHT y SFRP1, ambos a concentraciones crecientes. En ninguno de los dos ensayos se encontraron cambios en la viabilidad de VCaP.

Esto indica que VCaP responde a SFRP1 de manera contraria a como responde LNCaP a los mismos tratamientos.

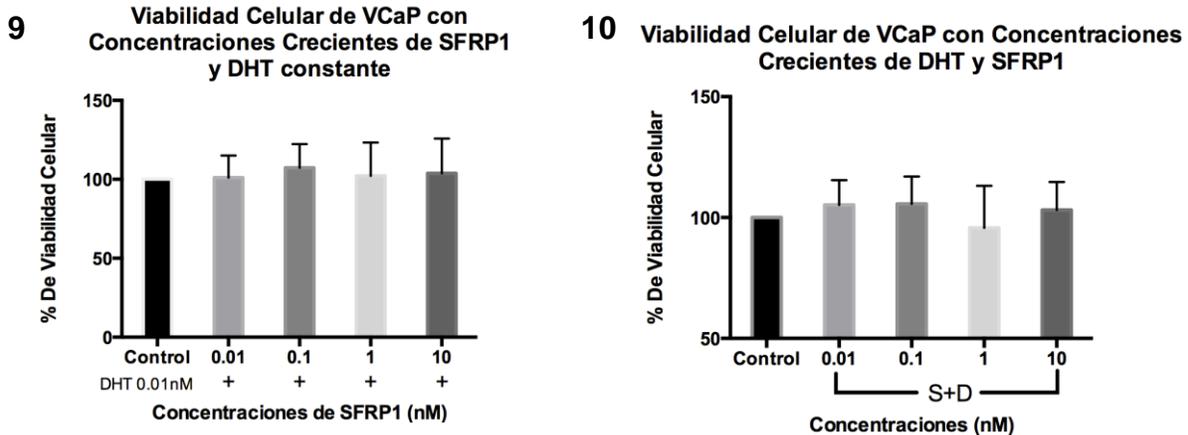


Gráfico 9. Tratamientos combinados con DHT constante a una concentración de 0.01nM y diferentes concentraciones de SFRP1 (0.01nM, 0.1nM, 1nM y 10nM). No se observan diferencias entre los tratamientos. **Gráfico 10. Tratamientos combinados de DHT y SFRP1 donde la concentración de ambos es creciente (0.01nM, 0.1nM, 1nM y 10nM).** No se observan diferencias significativas.

9.2. Los tratamientos con DHT y SFRP1 tienen efectos diferentes sobre la migración celular en LNCaP y VCaP.

Al no observar cambios en la viabilidad celular de VCaP pero sí en LNCaP con los tratamientos de SFRP1, la siguiente pregunta era saber qué pasaba con otras características del cáncer en estos dos tipos celulares cuando se trataban con SFRP1 y decidimos evaluar la migración celular por herida.

Para el ensayo de herida se aplicaron tratamientos con DHT 0.01nM, SFRP1 0.01nM y SFRP1 + DHT ambos a una concentración de 0.01nM después de que se realizó la herida. Los resultados se presentan en función de la capacidad de las células para cerrar la herida, es decir su migración y proliferación.

En este ensayo se encontró que cuando se aplica el tratamiento de SFRP1 más DHT las características de migración se ven afectadas de maneras opuestas en las

líneas celulares, teniendo que en LNCaP esta capacidad se ve disminuida, contrario a lo que sucede con las células VCaP las cuales son capaces de cerrar la herida casi un 200% comparado con el control, como se ve en las gráficas 11 y 12.

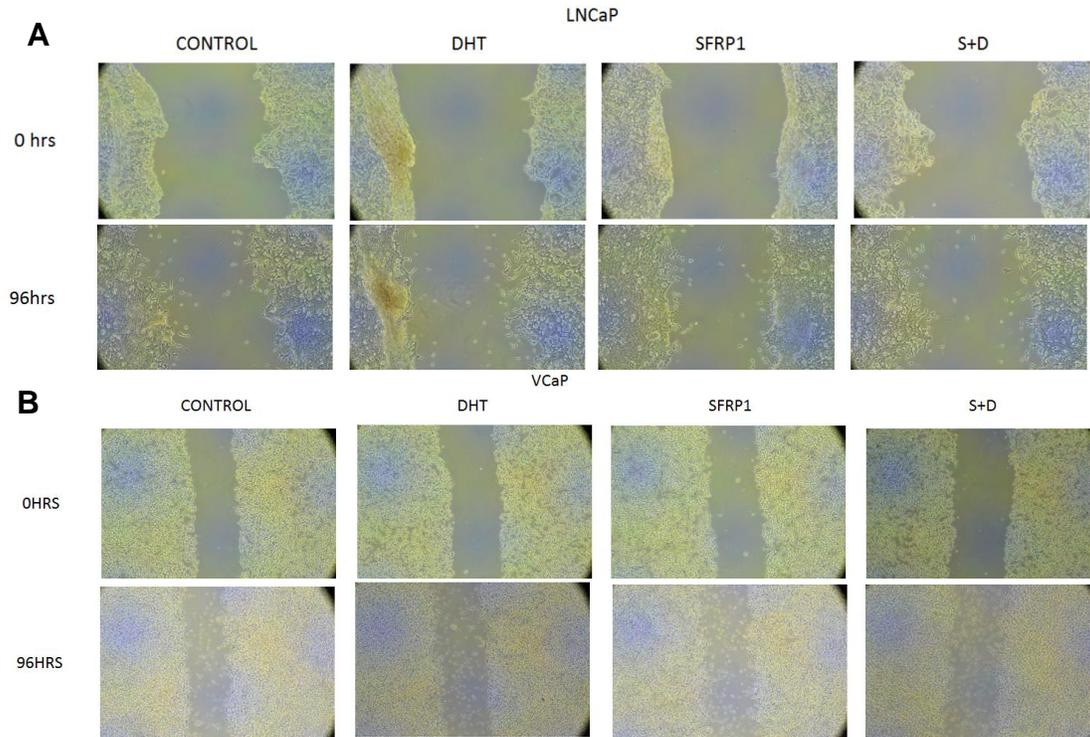
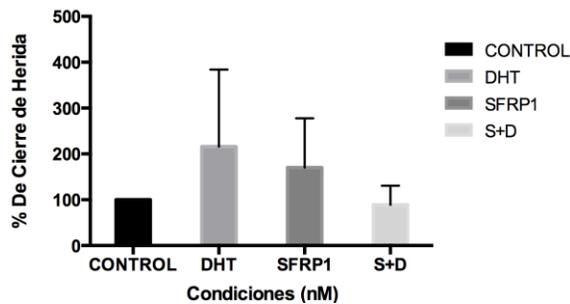
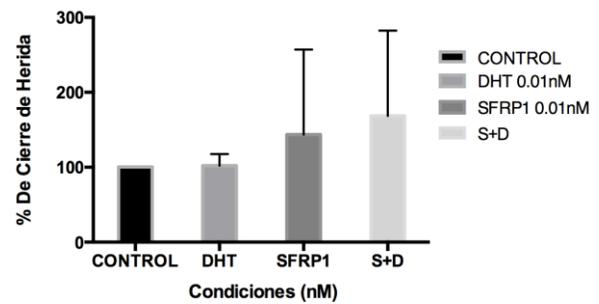


Figura 20. Fotografías representativas del ensayo de herida con tratamientos de DHT, SFRP1 y S+D 0.01nM a las 0hrs y 96hrs. A. Comparación de la primera y la última fotografía de las células LNCaP. Se observa que con los tratamientos con SFRP1 sola o combinada la cantidad de células que cierran la herida es menor comparado con el control y DHT. B. Comparación de la primera y la última fotografía de células VCaP. Se observa un efecto opuesto a LNCaP, ya que con los tratamientos con SFRP1 sola o combinada se ve una mayor cantidad de células que cierran la herida.

11 Cierre de Herida en LNCaP**12 Cierre de Herida en VCaP**

Gráficos 11 y 12. Porcentaje de cierre de herida en células LNCaP y VCaP con tratamientos de DHT, SFRP1 y S+D 0.01nM. 11. Células LNCaP, porcentaje de cierre de herida disminuido en tratamientos donde se aplica S+D 12. Células VCaP, porcentaje de cierre de herida elevado en tratamientos donde se aplica S+D, indicando que la proteína tiene efectos opuestos según la línea celular.

9.3. SFRP1 modifica la expresión de mRNA de elementos de la vía WNT en células LNCaP y VCaP.

El RNA se obtuvo de células tratadas con DHT, SFRP1 y S+D a concentración 0.01nM. Una vez que sabíamos que los tratamientos afectaban la migración celular quisimos determinar qué genes estaban siendo expresados para dar lugar a estas características fenotípicas por lo que se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. Principalmente se evaluaron genes de la vía WNT y del AR ya que estas vías se encuentran relacionadas a la acción de la proteína SFRP1 y promueven la proliferación y migración celular.

Cabe mencionar que estos ensayos no son concluyentes debido a que el RNA obtenido poseía absorbancias $260/280=1.5$ y $260/230=1.3$ indicando contaminación con proteínas y otros componentes, además en los geles de integridad se mostraba ligeramente degradado. Es por eso que en el laboratorio se continúa trabajando en mejorar la técnica de extracción de RNA.

Lo que se pudo obtener de los ensayos realizados fue que con los tratamientos de S+D en LNCaP se detectó un aumento en el mRNA de KLK3 que codifica para el PSA, y una disminución en los mensajeros de WNT3A y LEF1 como se ve en el gráfico 13, lo cual concuerda con lo observado en los ensayos de migración ya que

los genes WNT3A y LEF1 son efectores de la vía WNT la cual está implicada en procesos de migración celular.

En VCaP observamos que con el tratamiento de S+D aumenta el mRNA del AR, además de aumentar el mRNA de LEF1 y FZD que también participan en la vía WNT, gráfico 14.

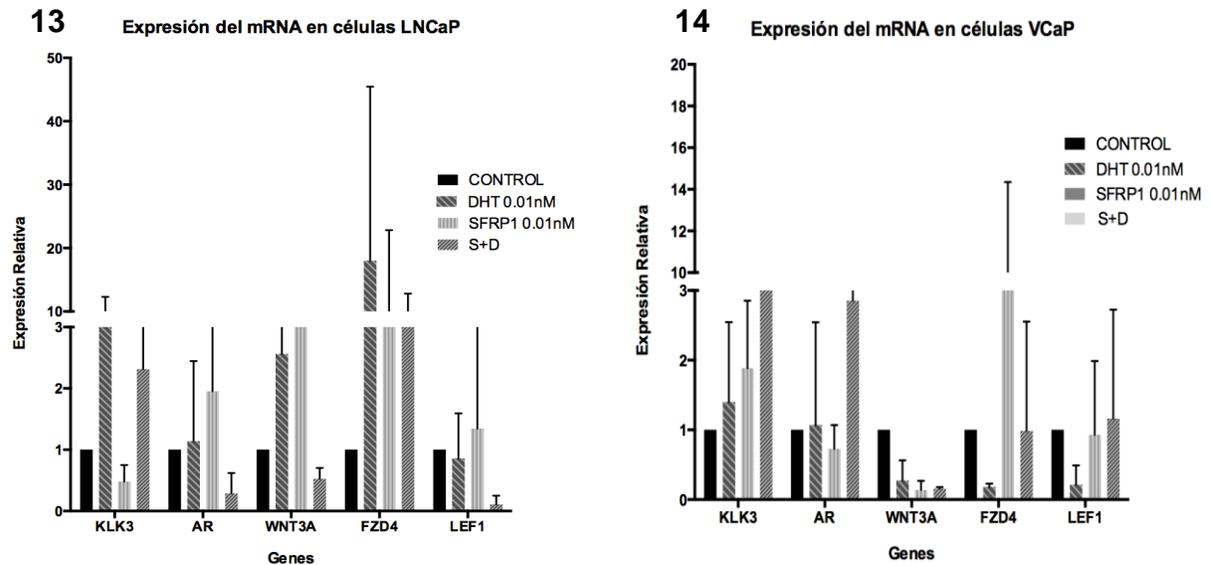


Gráfico 13. Expresión relativa del mRNA en células LNCaP tratadas con SFRP1 y DHT 0.01nM. Aumento en la expresión del mRNA de KLK3 con el tratamiento de S+D. mRNA de WNT3A y LEF1 muestran un disminución con tratamiento de S+D.

Gráfico 14. Expresión relativa del mRNA en células VCaP tratadas con SFRP1 y DHT 0.01nM. Aumento en la expresión del mRNA de AR, FZD4 y LEF1 con tratamiento de S+D. mRNA de WNT3A muestra disminución con tratamiento S+D.

Una vez más, las dos líneas celulares muestran efectos contrarios entre sí, ya que en LNCaP podemos observar que la combinación de S+D es capaz de disminuir la expresión de los mensajeros de genes involucrados en la vía WNT así como el mRNA del AR, contrario a lo que pasa en VCaP

Ya que se encontró que los tratamientos con S+D generan cambios en la expresión del mRNA de genes involucrados en la vía WNT y el AR, era necesario saber si

estos cambios se mantenían a nivel de proteína, por lo que se realizaron ensayos de western blot.

9.4. Tratamiento combinado de SFRP1+DHT aumenta la expresión de PSA en células LNCaP y la expresión de ERG en las células VCaP.

En los ensayos de western blot lo que se encontró fue que en LNCaP se genera un aumento en la proteína del PSA, lo cual está ligado directamente a la actividad del AR, dicha actividad es estimulada por la DHT, figura A. Para estar seguros de esto decidimos evaluar la translocación del AR, para lo cual se realizó una extracción de proteínas de núcleo y citoplasma. Encontrando que entre más se estimule al AR con DHT más proteína de AR se transloca al núcleo, figuras B y C.

Por otro lado, en la línea celular VCaP se decidió evaluar la expresión de la proteína ERG, la cual es el producto de la fusión T-E. Se encontró que ésta expresión aumenta de manera similar al PSA, ya que cuando se administra DHT solo o en combinación con SFRP1, la expresión de ERG es casi el doble con respecto al control, figura D. Cuando medimos la expresión del AR, encontramos que entre más se expresa ERG menor es la expresión del AR., figura E.

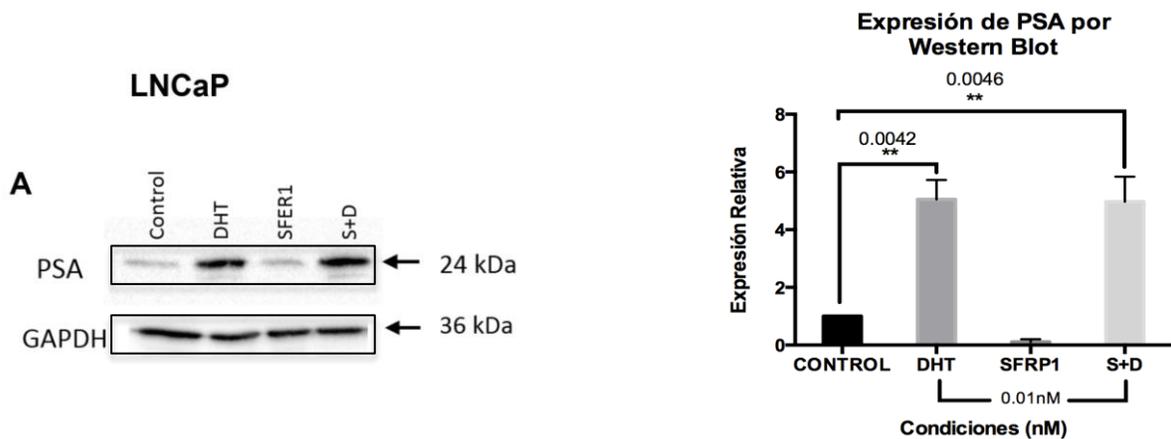


Figura 21. A. Blots y nivel de expresión relativa de proteínas extraídas de células LNCaP después de tratamiento con DHT, SFRP1 Y S+D a una concentración 0.01nM. Expresión de PSA en LNCaP, aumento en la expresión con tratamiento de DHT solo y en combinación con SFRP1.

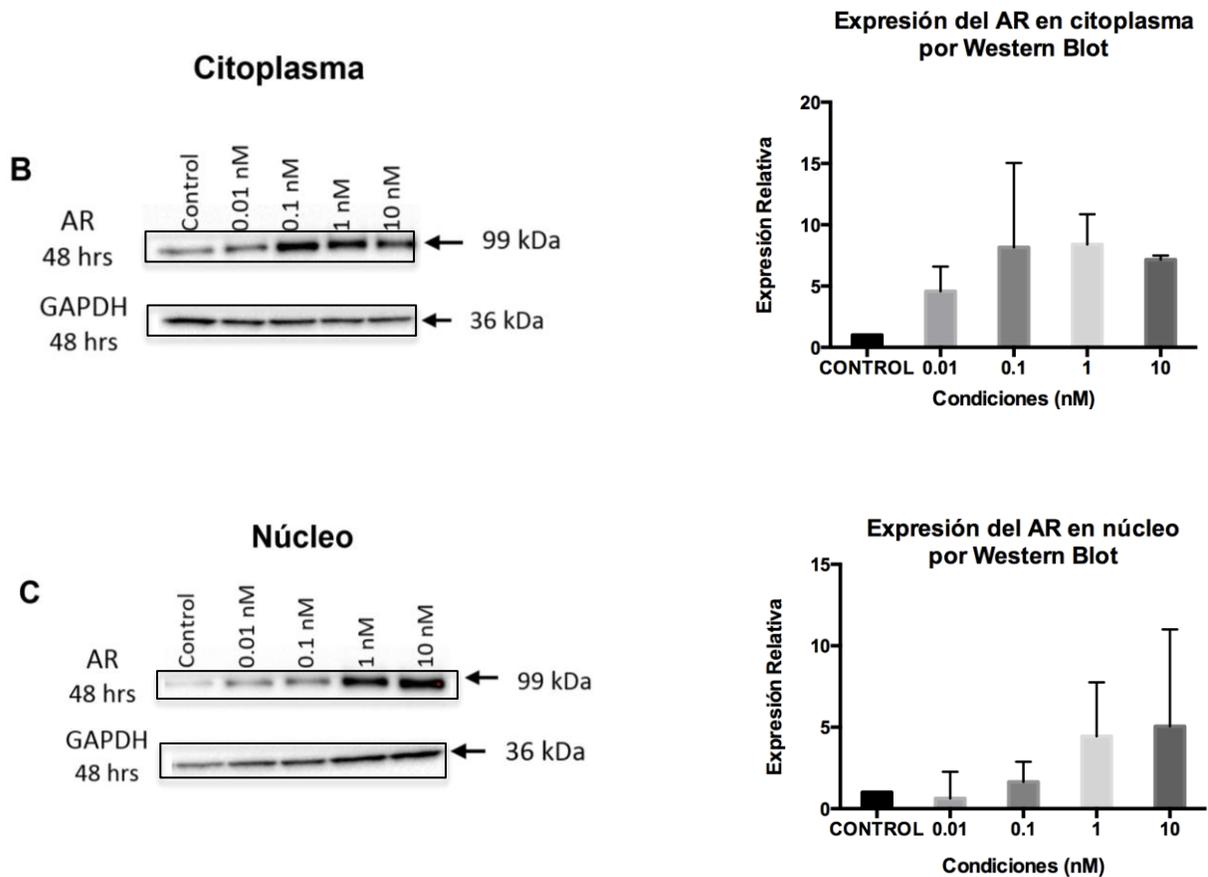


Figura 22. B-C. Blots y nivel de expresión relativa de proteínas extraídas de células LNCaP después de tratamiento con DHT, SFRP1 Y S+D a una concentración 0.01nM. B. Expresión en citoplasma del AR en LNCaP, comportamiento tipo campana en la expresión del receptor de andrógenos. **C.** Expresión en núcleo del AR en LNCaP, aumento en la expresión del receptor de andrógenos de manera proporcional a la concentración de DHT administrada.

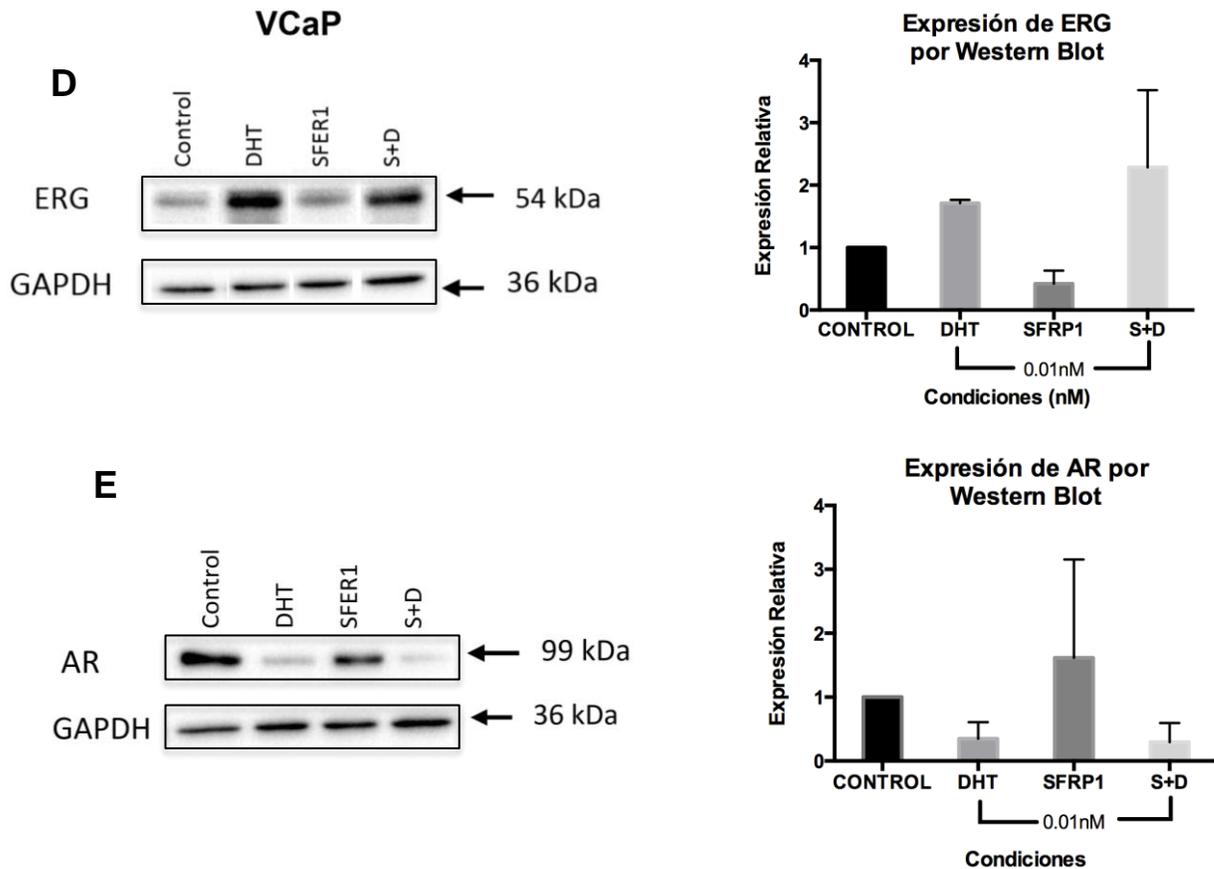


Figura 23. D-E. Blots y nivel de expresión relativa de proteínas extraídas de células VCaP después de tratamiento con DHT, SFRP1 Y S+D a una concentración 0.01nM. D. Expresión de ERG en VCaP, aumento en la expresión cuando se administra DHT solo o en combinación con SFRP1. E. Expresión de AR en VCaP, disminución en la expresión del AR con tratamiento de DHT sola y en combinación con SFRP1.

9.5. SFRP1 no muestra efectos significativos en el modelo de xenotransplante murino de células VCaP.

Con los experimentos anteriores observamos que la combinación de SFRP1+DHT tiene un efecto sobre el AR y sobre ERG que es el producto de la fusión T-E en las líneas celulares, por lo que decidimos realizar una prueba piloto para evaluar dicho efecto en un modelo *in vivo*.

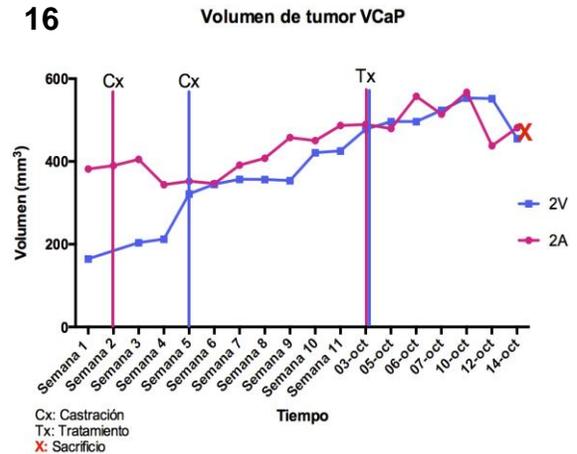
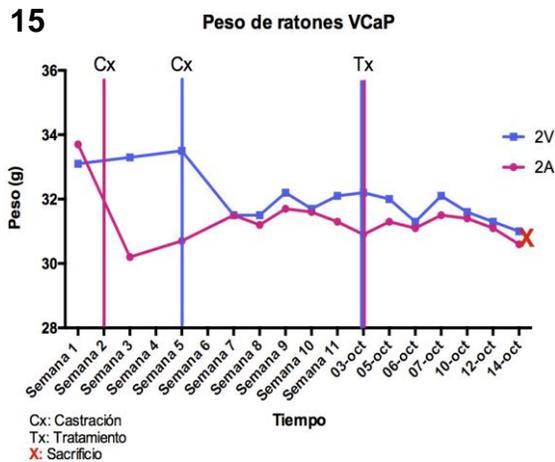
De los 10 animales inoculados solo 2 de ellos desarrollaron tumor. Al ser un ensayo preliminar se decidió trabajar con estos dos ratones y evaluar el comportamiento al

tratarlos con SFRP1. Para ello realizamos un seguimiento del volumen tumoral en los ratones. Se realizó una cirugía de castración para disminuir al máximo los niveles de andrógenos sin embargo las glándulas adrenales continúan produciendo una pequeña cantidad de andrógenos simulando las concentraciones de DHT aplicadas en los modelos *in vitro*.

Observamos que después de la cirugía el peso de los ratones disminuyó un poco pero se estabilizó con el tiempo como se ve en el gráfico 15, lo mismo ocurrió con el volumen tumoral, el cual disminuye por aproximadamente 4 semanas para después continuar aumentando hasta el momento de la aplicación del tratamiento con SFRP1 el cual no generó ningún efecto sobre el volumen tumoral, gráfico 16.

Las mediciones del PSA mostraron un comportamiento similar al que se observa en pacientes con CaP puesto que disminuye drásticamente después de la cirugía de castración para luego continuar aumentando. No observamos efectos en los niveles de PSA con el tratamiento de la proteína, gráfico 17.

Con el tejido tumoral extraído se realizó un ensayo de tiempo real en donde encontramos resultados similares a los obtenidos en los ensayos *in vitro*, ya que observamos un aumento en la transcripción de genes como KLK3, LEF1 y FZD4 (gráfico 18), sin embargo estos ensayos no son concluyentes ya que la n del estudio es muy pequeña y es necesario aumentar el número de animales con tumor para tener resultados estadísticamente significativos.



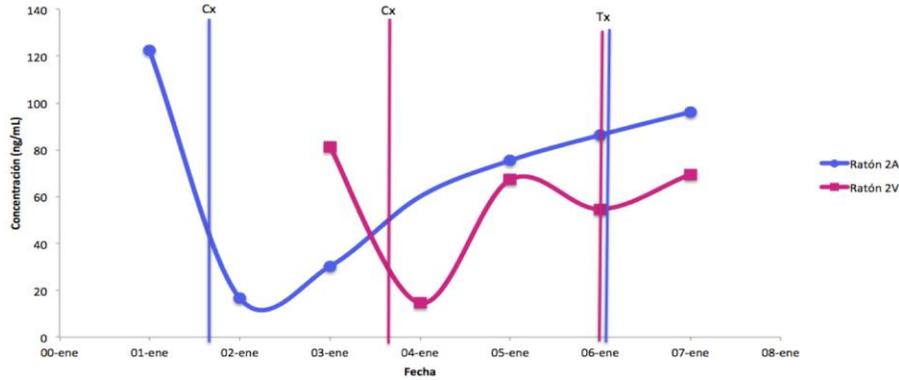
Gráfica 15. Peso de los ratones en gramos. Se muestran los cambios en el peso de los ratones que generaron tumor a través del tiempo en el cual se realizó cirugía de castración y tratamiento con SFRP1. Disminución de peso posterior a castración. **Gráfica 16. Volumen tumoral.** Se muestran los cambios generados en el volumen tumoral a través del tiempo en el cual se realizó cirugía de castración y tratamiento con SFR1. Disminución de volumen tumoral después de castración. Tratamiento con SFRP1 no mostró efectos sobre crecimiento tumoral.



Figura 24. Ratón 2A (izquierda), ratón 2V (centro) y tumores extraídos (derecha). Ratones con desarrollo tumoral posterior a la implantación de células VCaP. Extracción de tumores y su medición.

17

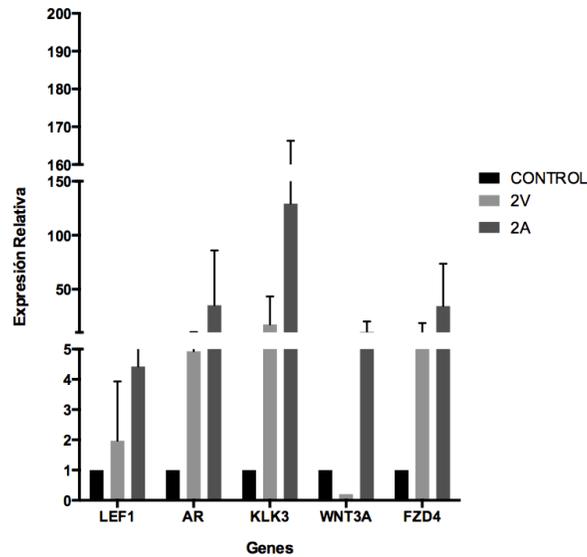
Concentración de PSA en suero de ratones con tumor de células VCaP en modelo de xenotransplante murino



Gráfica 17, Niveles de PSA en suero de ratones en modelo de xenotransplante murino. Disminución de niveles de PSA al día siguiente después de la castración. Aumento en los niveles de PSA entre el día tres y cuatro después de la castración. El tratamiento con SFRP1 no muestra tener efecto sobre estos niveles.

18

Expresión de mRNA en tumores de células VCaP



Gráfica 18. Expresión relativa del mRNA en tumores de xenotransplante murino de células VCaP, tratados con SFRP1. Aumento en la expresión del mRNA de todos los genes evaluados excepto de WNT3A donde los resultados fueron inconclusos.

10. DISCUSIÓN

En este estudio evaluamos el efecto de la proteína SFRP1 sobre dos líneas celulares de CaP que son sensibles a la acción de los andrógenos. Una de dichas líneas celulares expresa el gen de fusión TMPRSS2-ERG, el cual se encuentra en más del 50% de los tumores de CaP. Observamos que en las líneas celulares existen diferencias en la respuesta al tratamiento con la proteína SFRP1, nuestros resultados muestran que la fusión T-E podría jugar un papel importante en la regulación de la viabilidad celular modificando el papel regulador negativo de la proteína SFRP1, específicamente con la combinación de SFRP1+DHT, ya que es el principal factor diferencial entre las dos líneas celulares utilizadas.

La proteína SFRP1 es un antagonista de la vía WNT y se ha reportado que puede reprimir la actividad transcripcional del AR (Kawano et al., 2009). Nosotros pensamos que la proteína SFRP1 tiene un efecto sinérgico con la hormona DHT (S+D) sobre las células LNCaP; ya que es en esta combinación en donde vemos una mayor disminución en la viabilidad de esta línea celular. Se podría pensar que la hormona DHT facilita la interacción de la proteína SFRP1 con el AR mediante un mecanismo que aún es desconocido para nosotros. Para poder estar seguros de la existencia de este tipo de interacción es necesario saber si SFRP1 es capaz de internalizarse y si realmente tiene una interacción física con el AR. Para poder contestar estas preguntas, los ensayos de fluorescencia y co-inmunoprecipitación podrían ser útiles, sin embargo para este estudio no se abarcaron dichas técnicas.

Por otro lado la proteína SFRP1 provoca una disminución de la actividad en el metabolismo celular mediante su inhibición de la vía WNT, además es capaz de interactuar con el AR y disminuir su actividad transcripcional. Lo anterior se ve reflejado en la disminución de la viabilidad de las células LNCaP puesto que, el AR promueve la transcripción de genes involucrados en vías metabólicas requeridas para el mantenimiento de la síntesis de lípidos y proteínas (Yuan, Cai, Chen, Yu, & Balk, 2016).

Otro de los hallazgos que encontramos en estos ensayos de viabilidad en la línea celular LNCaP es que el efecto de la proteína SFRP1 es dependiente del tiempo y

de la cantidad de proteína presente, ya que a concentración de 0.01nM la viabilidad celular disminuye a partir de las 72hrs y comienza a recuperarse a las 96 horas; y cuando aumentamos la concentración a 1nM la viabilidad comienza a disminuir a partir de las 48 horas y de igual manera, el efecto inhibitorio de la viabilidad disminuye a las 96 horas. Con estos datos se podría pensar que el efecto máximo de la proteína realmente se pierde a este tiempo (96h) y que entre mayor cantidad de proteína exista en el medio, la intensidad de la cascada de señalización efectuada será mayor; aunque como se mencionó anteriormente, aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual sucede esta inhibición de la viabilidad celular.

De manera similar, esto se observa en el ensayo de migración por sanación de herida, donde el tratamiento S+D es capaz de inhibir la migración celular en las células LNCaP probablemente bajo los mismos mecanismos. A pesar de los resultados obtenidos se debe tomar en cuenta que en el ensayo de migración no se colocó ningún inhibidor de la proliferación, por lo que el efecto observado en el cierre de la herida es resultado de estos dos procesos celulares, migración y proliferación celular.

Nosotros pensamos que el tratamiento puede inhibir tanto migración como proliferación ya que la herida se registró hasta por 96 horas sobrepasando el límite de duplicación de esta línea celular y aún así el tratamiento evito el cierre de la herida. Se ha demostrado que ligandos de la vía canónica de la WNT como Wnt1 o Wnt3a son responsables de la activación de moléculas estimuladoras del citoesqueleto promoviendo la migración celular (Endo et al., 2005; Habas, Kato, & He, 2001; Jones & Chen, 2007). Al aplicar el tratamiento, la proteína SFRP1 interactúa con los ligandos Wnt y receptores Fz, lo que bloquea la vía WNT y por lo tanto disminuye las características de migración en las células de CaP.

Estos efectos lo explicamos con lo obtenido en los ensayos de tiempo real, en donde con S+D existe una disminución en los mRNA de WNT3A, y LEF1. WNT3A es un ligando específico de la vía canónica de la WNT y LEF1 es el factor de transcripción encargado de activar la transcripción de los genes blanco de la vía WNT incluidos aquellos involucrados en migración, proliferación y diferenciación celular. Lo cual

explica porque en LNCaP estas características se ven disminuidas cuando se aplica el tratamiento S+D.

Por otro lado, nosotros observamos que los tratamientos con DHT y S+D aumentan los niveles de PSA. Esto es principalmente mediado por la hormona DHT ya que es responsable de activar la señalización del AR lo que da como resultado una transcripción aumentada del gen KLK3, lo cual fue confirmado cuando encontramos niveles elevados de la proteína del AR en el núcleo celular que es donde se da la transcripción de sus genes blanco, de manera proporcional a las concentraciones de DHT administradas. En este caso el efecto inhibitorio de la proteína SFRP1 es abatido por la acción de DHT.

Con respecto a la línea celular VCaP, encontramos que ningún tratamiento con la proteína SFRP1 o la combinación S+D, tiene efectos sobre su viabilidad celular, pero sí tiene efectos sobre su migración y proliferación, ya que los tratamientos con SFRP1 combinados con DHT son capaces de aumentar esta característica celular. Lo anterior es debido a que las células VCaP poseen la fusión T-E lo cual les confiere características como aumento en la migración y proliferación celular, las cuales generan una respuesta diferente a la generada por las células LNCaP. La presencia de esta fusión da como resultado una sobre-expresión de ERG dependiente del AR. ERG es un oncogén que puede regular el crecimiento y la diferenciación celular, estudios *in vitro* han reportado que ERG es capaz de incrementar la migración e invasión en líneas celulares (St. John et al., 2012; S. a Tomlins et al., 2008).

ERG también tiene un papel importante en la regulación de la expresión de genes que codifican para algunos ligandos de la vía WNT, entre ellos los genes: WNT1, WNT2, WNT3A y WNT11 (Wu et al., 2013). En los ensayos de tiempo real no observamos aumento en el mRNA de WNT3A sin embargo, en los ensayos de western blot podemos ver que el tratamiento S+D aumenta la expresión de ERG y que a su vez disminuye la expresión de la proteína del AR. Esto es ya que se ha reportado que ERG es capaz de apagar la señalización del AR lo cual inhibe el

desarrollo normal de la próstata y activa un *switch* regulatorio maligno en donde activa la expresión de EZH2 (histona-lisina metiltransferasa) la cual induce un programa de des-diferenciación similar al de las células embrionarias (Chen & Sawyers, 2010; Yu et al., 2011), permitiendo adquirir a las células de CaP características más invasivas y contribuye al desarrollo del fenotipo resistente a la castración al apagar la señalización del AR.

Por lo anterior, nosotros podríamos decir que ERG bloquea al AR pero el tratamiento con la hormona DHT favorece que la proteína SFRP1 interactúe con el AR, por un mecanismo aún desconocido y esto es lo que permite que las células con la fusión tengan más capacidad migratoria debido a la activación del AR que se ve favorecido por SFRP1 en los ensayos realizados *in vitro*.

Por otro lado, en este estudio nosotros ofrecemos evidencia de que es SFRP1 no tiene efecto en el volumen tumoral ni en los niveles de PSA, sin embargo al ser un ensayo preliminar se deben tener algunas consideraciones como el número de animales con tumor para poder obtener resultados concluyentes.

Lo que se puede decir de estos ensayos *in vivo*, es que el modelo de xenotransplante es viable para estudiar al CaP ya que con las mediciones que se realizaron del PSA se observa claramente que en ambos ratones se sigue el mismo comportamiento que los pacientes tienen en la clínica con estos valores de PSA. Si recordamos la Figura 7, en donde se ve el desarrollo y progresión de la enfermedad, los pacientes experimentan una disminución en los niveles de PSA después de la castración y tiempo después un repunte en dichos niveles; lo mismo se observó en ambos ratones después de la cirugía de castración y se confirmó con los ensayos de tiempo real en donde el gen con mayor aumento en su expresión fue KLK3 que codifica al PSA. Esta proteína comienza a aumentar independientemente de la presencia de andrógenos posterior al proceso de castración.

Algo interesante es que encontramos una elevada expresión de LEF1 y FZD4 indicando que la vía WNT se encontraba activa, es decir, que el tratamiento no tuvo efecto en la inhibición de esta vía y posiblemente por esta razón no vimos una disminución en el volumen tumoral. Sin embargo en el ligando WNT3A se encontraron discrepancias en los resultados obtenidos de cada ratón.

En los tumores de ratón solo se realizaron ensayos de tiempo real, debido a la falta de tiempo para terminar este estudio, sin embargo parte del tejido se guardó para realizar ensayos posteriores de inmunohistoquímica y extracción de proteínas para la evaluación de su expresión.

Basado en los resultados obtenidos y la literatura que existe sobre el tema proponemos el siguiente mecanismo de acción de la proteína SFRP1 sobre la línea celular VCaP.

En donde pensamos que la proteína SFRP1 tiene un efecto dual, por una parte es capaz de inhibir la vía WNT al unirse a las proteínas Wnt y los receptores Fzd, pero por otra parte la proteína SFRP1 puede interactuar con el AR promoviendo de alguna manera la actividad del AR provocando su translocación al núcleo celular y promover la transcripción de sus genes blanco y promover la transcripción de ERG producto de la fusión T-E. ERG además de promover la proliferación y migración celular también es capaz de inducir la expresión de ligando de la vía WNT como Wnt3a, los cuales activan la vía que también aumenta la proliferación, migración y diferenciación celular.

VCaP al ser una línea celular de cáncer metastásico a vertebras, se trata de una línea celular de CaP en estado avanzado. Como nosotros no vimos inhibición de la vía WNT como consecuencia de los tratamientos con SFRP1 pensamos que este efecto de inhibición ya no es factible cuando las células cancerosas se encuentran en un estado avanzado del cáncer y han acumulado varias mutaciones, por esta razón pensamos que es en este estado cuando la proteína SFRP1 en lugar de inhibir la vía WNT, la promueve mediante su interacción con el AR. El AR en esta etapa del cáncer es capaz de responder antes otro tipo de moléculas diferentes a testosterona y DHT por lo que es factible que pudiera interactuar con SFRP1 u otro componente derivado de la acción de SFRP1. De cualquier manera, es necesario realizar más ensayos para elucidar este mecanismo que podría guiar las investigaciones hacia el hallazgo de nuevos blanco terapéuticos involucrados en estas vías moleculares.

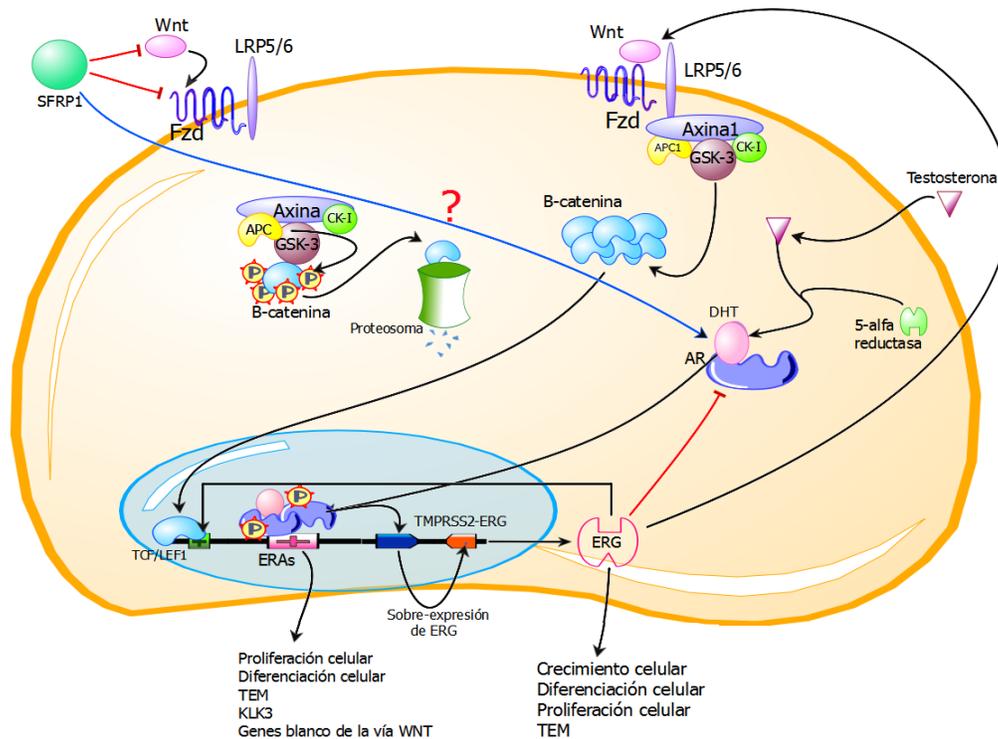


Figura 24. Mecanismo de acción propuesto para SFRP1 en línea celular VCaP. a. SFRP1 bloquea la vía WNT interactuando con las proteínas Wnt y el receptor Fzd (Bhat et al., 2007), en el complejo de Axina, GSK-3 fosforila a la β -catenina para su degradación en proteosoma (Komiya & Habas, 2008). b. Los tratamientos con DHT simulan los niveles de andrógenos después de la castración, la unión del AR a los ERAs promueven la transcripción de sus genes blanco (Lonergan & Tindall, 2011b). c. El AR promueve la transcripción de ERG mediante su unión a los elementos responsivos a andrógenos del promotor del gen TMPRSS2 (Burdova et al., 2014). d. La sobre-expresión de ERG promueve la expresión de ligandos Wnt y la transcripción de genes blanco de LEF1 (Wu et al., 2013). e. SFRP1 promueve de manera aún desconocida la expresión del AR. (Figura de elaboración propia, 2017)

11. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró evaluar el efecto de la proteína SFRP1 sobre la expresión de genes y proteínas relacionados a la vía WNT y a la vía del AR que se encuentran asociados a la fusión T-E en líneas celulares de CaP así como en un modelo de xenotransplante murino de células VCaP.

Se encontró que la combinación de SFRP1+DHT tiene efectos opuestos según la línea celular, en LNCaP se observan efectos de represión y en VCaP se observan efectos de promoción en las características de viabilidad, migración y proliferación.

En conjunto los resultados de este trabajo nos indican que SFRP1+DHT promueve las características neoplásicas de las células VCaP e inhibe estas características en las células LNCaP *in vitro*, en los ensayos *in vivo* se encontró que la proteína SFRP1 no disminuye el volumen tumoral y que no tiene efectos importantes en los niveles del PSA en este ensayo piloto.

12.PERSPECTIVAS

- Aumentar el número de animales con desarrollo tumoral en el modelo de xenotransplante murino.
- Evaluar otros genes involucrados en la señalización de la vía WNT como β -catenina.
- Realizar más ensayos donde se evalúa el estado de fosforilación de las proteínas así como ensayos de co-inmunoprecipitación para determinar si existen interacciones físicas proteicas entre SFRP1 y AR.
- Evaluar del ciclo celular y apoptosis para complementar los resultados obtenidos.
- Pensar en ensayos de silenciamiento de la fusión TMPRSS2-ERG y observar el comportamiento celular del AR con los tratamientos de SFRP1.

13. REFERENCIAS

1. Aaron, L., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.012>
2. AFU, Asociación Francesa de Urología. (2014). Recuperado el 3 de febrero de 2017 de:
3. <http://www.urofrance.org/nc/science-et-recherche/base-bibliographique/article/html/prostatectomie-radicate-de-sauvetage-apres-echec-de-curietherapie-etude-preliminaire.html>
4. Alan J., Louis R., Alan W., & Andrew C. (2007). Campbell-Walsh Urologia/ Campbell-Walsh Urology. Vol. 4. (9 ed.). Médica Panamericana: Argentina. Pág.: 3136-3119.
5. Amico, B. A. V. D., Cote, K., Loffredo, M., Renshaw, A. A., & Schultz, D. (2002). Determinants of Prostate Cancer – Specific Survival After Radiation Therapy for Patients With Clinically Localized Prostate Cancer, 20(23), 4567–4573. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.03.061>
6. American Cancer Society. (2016). Factores de Riesgo del Cáncer de Próstata. Recuperado el 28 de febrero de 2017, de: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>
7. Andresen, K., Boberg, K. M., Vedeld, H. M., Hektoen, M., Wadsworth, C. A., Clausen, O. P., ... Lind, G. E. (2012). Novel target genes and a valid biomarker panel identified for cholangiocarcinoma. *Epigenetics*, 7(11), 1249–1257. <https://doi.org/10.4161/epi.22191>
8. Andriole, G., Djavan, B., Fleshner, N., & Schröder, F. (2006). The Case for Prostate Cancer Screening with Prostate-Specific Antigen. *European Urology, Supplements*. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2006.06.013>
9. Attar, R. M., Takimoto, C. H., & Gottardis, M. M. (2009). Castration-resistant prostate cancer: Locking up the molecular escape routes. *Clinical Cancer Research*, 15(10), 3251–3255. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1171>
10. Ballentine H. Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Allaf ME, Carter HB, editors. Textbook of urology. Wein-Campbell-Walsh Urology. Philadelphia: Saunders Company; 2007. p. 291231.
11. Bardou, Â., Geneix, J., Ugolini, È., Charafe-jau, E., Ade, Â., De, Â., ... Birnbaum, D. (2001). WNT pathway and mammary carcinogenesis : Loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type, 5810–5817.
12. Bethesda (2002). Screening and Prevention Editorial Board. Prostate Cancer Screening (PDQ®): Patient Version. Recuperado el 17 de febrero de 2017 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65867/>
13. Bhargava, S. (2012). Libro de la Imagen Doppler Color. (2ª ed.). Jaypee-Highlights Medical Publishers, Inc. Pág.: 129.
14. Bhat, R. A., Stauffer, B., Komm, B. S., & Bodine, P. V. N. (2007). Structure – Function Analysis of Secreted Frizzled-Related Protein-1 for its Wnt Antagonist Function, 1528, 1519–1528. <https://doi.org/10.1002/jcb.21372>
15. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med*. 2008;14(11):1271–1277. doi: 10.1038/nm.1880.
16. Borley, N., & Feneley, M. R. (2009). Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian Journal of Andrology*, 11(1), 74–80. <https://doi.org/Doi 10.1038/Aja.2008.19>
17. Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E., & Lopez-rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition : new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and

- disease. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.026096>
18. Bovolenta, P., Rodriguez, J., & Esteve, P. (2006). Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development (Cambridge, England)*, 133(22), 4399–4408. <https://doi.org/10.1242/dev.02592>
 19. Brenner, C., & Duggan, D. (2004). Oncogenomics: Molecular Approaches to Cancer. En C. Brenner, & D. Duggan, *Oncogenomics: Molecular Approaches to Cancer* (págs. 4-6). New Jersey: John & Wiley Sons, Inc.,.
 20. Burdova, A., Bouchal, J., Tavandzis, S., & Kolar, Z. (2014). TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 158(4), 502–510.
 21. Canadian Cancer Society. (2017). Gleason classification for prostate cancer. Recuperado el 28 de febrero de 2017, de: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/prostate/grading/gleason-classification/?region=on>
 22. Carrizo, F. E. (2001). *Farmacología clínica*, 10–16.
 23. Carron, C., Pascal, A., Djiane, A., Boucaut, J., Shi, D., & Umbhauer, M. (2003). Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt / β -catenin pathway. <https://doi.org/10.1242/jcs.00451>
 24. CDC (2015). Recuperado el 6 de julio de 2017 de: https://www.cdc.gov/cancer/prostate/basic_info/what-is-prostate-cancer.htm
 25. Chen, Y., & Sawyers, C. L. (2010). Coordinate Transcriptional Regulation by ERG and Androgen Receptor in Fusion-Positive Prostate Cancers. *Cancer Cell*, 17(5), 415–416. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.04.022>. Coordinate
 26. Chodak, G. W., Thisted, R. A., Gerber, G. S., Johansson, J.-E., & Adolphson, J. (1994). Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 330, 242–248.
 27. Chughtai, B., Forde, J. C., Thomas, D. D. M., Laor, L., Hossack, T., Woo, H. H., ... Kaplan, S. A. (2016). Benign prostatic hyperplasia. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16031. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.31>
 28. Cookson, M. S., Roth, B. J., Dahm, P., Engstrom, C., Freedland, S. J., Hussain, M., ... Kibel, A. S. (2013). Castration-resistant prostate cancer: AUA guideline. *Journal of Urology*, 190(2), 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.05.005>
 29. Crawford, E. D. (2009). Understanding the Epidemiology, Natural History, and Key Pathways Involved in Prostate Cancer. *Urology*, 73(5 SUPPL.), S4–S10. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.03.001>
 30. Crona, D. J., & Whang, Y. E. (2017). Androgen Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms Involved in Prostate Cancer Therapy Resistance. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers9060067>
 31. Dann, C. E., Hsieh, J., Rattner, A., & Sharma, D. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains, 412(July).
 32. Deplus R, Delliaux C, Marchand N, *et al.* (2017). TMPRSS2-ERG fusion promotes prostate cancer metastases in bone. *Oncotarget*. (8):11827–11840.
 33. Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2006). Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.20794>
 34. Egan, K. B. (2016). The Epidemiology of Benign Prostatic Hyperplasia Associated with Lower Urinary Tract Symptoms. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.04.001>
 35. Elzi, D. J., Song, M., Hakala, K., Weintraub, S. T., & Shiio, Y. (2011). Abstract A16: Wnt antagonist SFRP1 functions as secreted mediator of senescence. *Cancer Research*, 71(18 Supplement), A16–A16. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.FBCR11-A16>
 36. Endo, Y., Wolf, V., Muraiso, K., Kamijo, K., Soon, L., Üren, A., ... Rubin, J. S. (2005). Wnt-3a-dependent cell motility involves RhoA activation and is specifically regulated by

- dishevelled-2. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 777–786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406391200>
37. Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240, 889–895. <https://doi.org/10.1126/science.3283939>
38. FDA. (s.f.). Recuperado el 6 de julio de 2017, de: https://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3798b1_04_holt/sld005.htm
39. Feldman, B. J., & Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(October), 34–45.
40. Ferlay, J., Soerjomataram I, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 136(5), E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
41. Finch, P. W., Kelley, M. J., Üren, A., Schaudies, P. R., Popescu, N. C., Rudikoff, S., ... Rubin, J. S. (1997). Purification and molecular cloning of a secreted , Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(June), 6770–6775.
42. Flanigan, R. C., Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., ... Dalkin, B. L. (1994). Accuracy of digital rectal examination and transrectal ultrasonography in localizing prostate cancer. *The Journal of urology* (Vol. 152).
43. Foley, R., Hollywood, D., & Lawler, M. (2004). Molecular pathology of prostate cancer: The key to identifying new biomarkers of disease. *Endocrine-Related Cancer*. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00699>
44. FusionCancer database (2014). Recuperado el 19 de julio de 2017, de: <http://donglab.ecnu.edu.cn/databases/FusionCancer/>
45. Garcia-hoyos, M., Cantalapiedra, D., Arroyo, C., Esteve, P., Rodríguez, J., Riveiro, R., ... Ayuso, C. (2004). Evaluation of SFRP1 as a candidate for human retinal dystrophies, (January 2003).
46. García-Tobilla, P., Solórzano, S. R., Salido-Guadarrama, I., González-Covarrubias, V., Morales-Montor, G., Díaz-Otañez, C. E., & Rodríguez-Dorantes, M. (2016). SFRP1 repression in prostate cancer is triggered by two different epigenetic mechanisms. *Gene*, 593(2), 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.030>
47. Habas, R., & Dawid, I. B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of Biology*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/jbiol22>
48. Habas, R., Kato, Y., & He, X. (2001). Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1. *Cell*, 107(7), 843–854. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00614-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00614-6)
49. Han, M., Potter, S. R., & Partin, a W. (2000). The role of free prostate-specific antigen in prostate cancer detection. *Current Urology Reports*, 1(1), 78–82.
50. He S, Lu Y, Liu X, Huang X, Keller ET, Qian CN, et al. Wnt3a: functions and implications in cancer. *Chin J Cancer* (2015) 34(12):554–62. [10.1186/S40880-015-0052-4](https://doi.org/10.1186/S40880-015-0052-4)
51. He, X., Semenov, M., Tamai, K., & Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development (Cambridge, England)*, 131(8), 1663–77. <https://doi.org/10.1242/dev.01117>
52. Heidenreich, A., Bastian, P. J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Van Der Kwast, T., ... Mottet, N. (2014). EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *European Urology*, 65(2), 467–479. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.11.002>
53. Heuberger, J., & Birchmeier, W. (2010). Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002915>
54. Huggins, C. (1978). Endocrine-induced regression of cancers. *The American Journal of*

- Surgery*, 136(2), 233–238. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(78\)90235-0](https://doi.org/10.1016/0002-9610(78)90235-0)
55. Huncharek, M., & Muscat, J. (1995). Genetic characteristics of prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 4(6), 681–687.
56. 3
57. Joesting, M. S., Cheever, T. R., Volzing, K. G., Yamaguchi, T. P., Wolf, V., Naf, D., ... Marker, P. C. (2008). Secreted frizzled related protein 1 is a paracrine modulator of epithelial branching morphogenesis, proliferation, and secretory gene expression in the prostate. *Developmental Biology*, 317(1), 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.021>
58. Jones, C., & Chen, P. (2007). Planar cell polarity signaling in vertebrates. *Bioessays*, 29(February), 120–132. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>.Plastid
59. Kang, P., Wan, M., Huang, P., Li, C., Wang, Z., Zhong, X., ... Cui, Y. (2014). The Wnt antagonist sFRP1 as a favorable prognosticator in human biliary tract carcinoma. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090308>
60. Kawano, Y., Diez, S., Uysal-Onganer, P., Darrington, R. S., Waxman, J., & Kypta, R. M. (2009). Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 100(7), 1165–1174. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604976>
61. Kawano, Y., & Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 13), 2627–2634. <https://doi.org/10.1242/jcs.00623>
62. Klezovitch, O., Risk, M., Coleman, I., Lucas, J. M., Null, M., True, L. D., ... Vasioukhin, V. (2008). A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2105–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711711105>
63. Klingler, H. C., Woo, H., Rosario, D., Cutinha, P. E., Anderson, J., Ward, A. M., & Chapple, C. R. (1998). The value of prostate specific antigen (PSA) density and free: Total PSA ratio in selecting patients with a normal digital rectal examination and intermediate total PSA levels for further investigation. *British Journal of Urology*, 82(3), 393–397. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410X.1998.00761.x>
64. Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75. <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5851>
65. Kong, L., Tang, M., Zhang, T., Wang, D., Hu, K., Lu, W., & Wei, C. (2014). Nickel Nanoparticles Exposure and Reproductive Toxicity in Healthy Adult Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 21253–21269. <https://doi.org/10.3390/ijms151121253>
66. Kumar-sinha, C., Tomlins, S. A., & Chinnaiyan, A. M. (2008). Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(july). <https://doi.org/10.1038/nrc2402>
67. Lamb, A. D., Massie, C. E., & Neal, D. E. (2014). The transcriptional programme of the androgen receptor (AR) in prostate cancer. *BJU International*, 358–366. <https://doi.org/10.1111/bju.12415>
68. Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–96. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
69. Lee, C. H., Akin-Olugbade, O., & Kirschenbaum, A. (2011). Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 565–575. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.012>
70. Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.-H., Piccolo, S., & De Robertis, E. M. (2011). Frzb-1 Is a Secreted Antagonist of Wnt Signaling Expressed in the Spemann Organizer. *Cell*, 88(6), 747–756.
71. Liang, J., Kang, X., Halifu, Y., Zeng, X., Jin, T., Zhang, M., & Luo, D. (2015). Secreted frizzled-related protein promoters are hypermethylated in cutaneous squamous carcinoma compared with normal epidermis. *BMC Cancer*, 0–6.

- <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1650-x>
72. Lin, K., Wang, S., Julius, M. A., Kitajewski, J., Moos, M. J., & Luyten, F. P. (1997). The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(October), 11196–11200.
 73. Lin, X., & Perrimon, N. (1999). letters to nature Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signalling, (3), 281–284.
 74. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*, *25*, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 75. Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *20*(1), 781–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>
 76. Lonergan, P. E., & Tindall, D. J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of Carcinogenesis*, *10*, 20. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.83937>
 77. MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2010). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, *17*(1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016.Wnt/>
 78. Martin-Manso, G., Calzada, M. J., Chuman, Y., Sipes, J. M., Xavier, C. P., Wolf, V., ... Roberts, D. D. (2012). sFRP-1 binds via its netrin-related motif to the N-module of thrombospondin-1 and blocks thrombospondin-1 stimulation of MDA-MB-231 breast carcinoma cell adhesion and migration. *Journal of Cellular Biochemistry*, *509*(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.03.004.sFRP-1>
 79. Marzo, A. M. De, Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., ... Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, *7*(4), 256–69. <https://doi.org/10.1038/nrc2090>
 80. Mazor, M., Kawano, Y., Zhu, H., Waxman, J., & Kypta, R. M. (2004). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene*, *23*(47), 7882–7892. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208068>
 81. McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, *2*(1), 35–49. <https://doi.org/10.1002/pros.2990020105>
 82. Medline Plus (2015). Recuperado el 7 de julio de 2017, de: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a611009-es.html>
 83. Mwamukonda, K., Chen, Y., Ravindranath, L., Furusato, B., Sterbis, J., Osborn, D., ... David, G. (2010). Quantitative Expression of TMPRSS2 Transcript in Prostate Tumor Cells Reflects TMPRSS2-ERG Fusion Status. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, *13*(1), 47–51. <https://doi.org/10.1038/pcan.2009.28.Quantitative>
 84. Nair, M., & Peate, I. (2015). *Pathophysiology for Nurses*. Wiley Blackwell (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
 85. Naylor, S. (2003). Biomarkers : current perspectives, 525–529.
 86. Oesterling JE, Epstein JI, Walsh PC (1986) The inability of adrenal androgens to stimulate the adult human prostate: an autopsy evaluation of men with hypogonadotropic hypogonadism and panhypopituitarism. *Journal of Urology*. 136(5): 1030-1034
 87. Ozen, H., Aygun, C., Ergen, A., Sozen, S., Aki, F. T., & Uygur, M. C. (2001). Combined use of prostate-specific antigen derivatives decreases the number of unnecessary biopsies to detect prostate cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, *24*(6), 610–613. <https://doi.org/10.1097/00000421-200112000-00017>
 88. Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., ... Giles, F. J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology*, *10*(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13045-017->

89. Paris, P. L., Andaya, A., Fridlyand, J., Jain, A. N., Weinberg, V., Kowbel, D., ... Van Dekken, H. (2004). Whole genome scanning identifies genotypes associated with recurrence and metastasis in prostate tumors. *Human Molecular Genetics*, 13(13), 1303–1313. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh155>
90. Patel, N. D., & Parsons, J. K. (2014). Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India*, 30(2), 170–6. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.126900>
91. Pettersson, A., Graff, R. E., Bauer, S. R., Pitt, M., Rosina, T., Stack, E. C., ... Loda, M. (2013). The TMPRSS2-ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: A cohort study and meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1–20. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0042>.THE
92. Plant, T. M., Zeleznik, A. J., & Prevot, V. (2015). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00030-2>
93. Polinsky, K. R. (2007). Tumor Suppressor Genes. En K. R. Polinsky, *tumor suppressor Genes* (pág. 20). New York: Nova Science Publishers, Inc. .
94. Prakash, S., & Swaminathan, U. (2015). β catenin in health : A review. *Journal of Oral Maxillofacial Pathology*, 19(2), 230–238. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.164537>
95. Praveen, R. (2013). Benign Prostatic Hyperplasia: Updated Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(8), 45–51. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04808>
96. Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M. (2012). Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Science Translational Medicine*, 4(127), 127rv3. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003180>
97. Prostate Cancer UK. (2016). Recuperado el 25 de junio de 2017, de: <http://prostatecanceruk.org/prostate-information/treatments>
98. Quigley, C. A., Bellis, A. D. E., Marschke, K. B., El-awady, M. K., Wilson, E. M., French, F. S., & Introduction, I. (1995). Androgen Receptor Defects : Historical , Clinical , and Molecular Perspectives *, 16(3).
99. Rattner, A., Hsieh, J.-C., Smallwood, P. M., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Nathans, J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(April), 2859–2863.
100. Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W. G., Muraiso, K., Bottaro, D. P., Cumberledge, S., & Rubin, J. S. (2000). Secreted Frizzled-related Protein-1 Binds Directly to Wingless and Is a Biphasic Modulator of Wnt Signaling *, 275(6), 4374–4382.
101. Ricke, T. M. N. and W. A. (2011). Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation*, 82, 184–199. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.04.006>.Androgens
102. Ries L, Melbert D, Drapcho M, et al. SEER cancer statistics review (based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER Web site, 2008). Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/.
103. Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., & Nusse, R. (1987). The Drosophila homology of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, 50(4), 649–657. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90038-9)
104. Roberts, R. O., Lieber, M. M., Rhodes, T., Girman, C. J., Bostwick, D. G., & Jacobsen, S. J. (1997). PREVALENCE OF A PHYSICIAN-ASSIGNED DIAGNOSIS OF PROSTATITIS : THE OLMSTED COUNTY STUDY OF URINARY SYMPTOMS AND HEALTH STATUS AMONG MEN, 4295(98).

105. Rockville, MD. (2016). Treating Localized Prostate Cancer: A Review of the Research for Adults. Agency for Healthcare Research and Quality (US); disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK344400/>
106. Roehrborn, C. G. (2005). Benign Prostatic Hyperplasia: An Overview. *Reviews in Urology*, 7(Suppl 9), S3–S14. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(98\)00532-9](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(98)00532-9)
107. Roviello, G., Sigala, S., Sandhu, S., Bonetta, A., Cappelletti, M. R., Zanotti, L., ... Generali, D. (2016). Role of the novel generation of androgen receptor pathway targeted agents in the management of castration-resistant prostate cancer: A literature based meta-analysis of randomized trials. *European Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.04.002>
108. Ruddon, R. W. (2007). No Title. In *Cancer Biology* (pp. 4–7). New York: Oxford University Press, Inc.
109. Saini, S., Majid, S., & Dahiya, R. (2011). The complex roles of Wnt antagonists in RCC. *Nature Reviews Urology*, 8(12), 690–699. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.146>
110. Secretaría de Salud. (2001). Programa de Acción: Cáncer de Próstata. Recuperado el 2 de marzo de 2017, de: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/cancer_prostata.pdf
111. Scher, H. I., Buchanan, G., Gerald, W., Butler, L. M., & Tilley, W. D. (2004). Targeting the androgen receptor: Improving outcomes for castration-resistant prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 11(3), 459–476. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00525>
112. Shi, X. B., Gumerlock, P. H., & deVere White, R. W. (1996). Molecular biology of prostate cancer. *World Journal of Urology*, 14(5), 318–328. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500697>
113. Srikala, Q., Sridhar, S., Freedland, S. J., Gleave, M. E., Higano, C., Mulders, P., ... Saad, F. (2013). Castration-Resistant Prostate Cancer : From New Pathophysiology to New Treatment. *European Urology*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.08.008>
114. St. John, J., Powell, K., Conley-LaComb, M. K., & Chinni, S. R. (2012). TMPRSS2-ERG Fusion Gene Expression in Prostate Tumor Cells and Its Clinical and Biological Significance in Prostate Cancer Progression. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 4(4), 94–101. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000119>.TMPRSS2-ERG
115. Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2013). The b -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1–16.
116. Stewart, D. J. (2014). Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt356>
117. Stokes M. (2005). Prostate Cancer: Current and emerging trends in detection and treatment. The Rosen Publishing Group, Inc.: New York. Pp: 8.
118. Tanguay, S., Awde, M., Brock, G., Casey, R., Kozak, J., Lee, J., ... Saad, F. (2009). Diagnosis and management of benign prostatic hyperplasia in primary care. *Canadian Urological Association Journal = Journal de l'Association Des Urologues Du Canada*, 3(3 Suppl 2), S92–S100. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2698785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
119. Terry, S., Yang, X., Chen, M. W., Vacherot, F., & Buttyan, R. (2006). Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(2), 402–410. <https://doi.org/10.1002/jcb.20983>
120. Theodorescu D. (2001). *Prostate cancer, clinical oncology*. In: Schwab M, editor. *Encyclopedic Reference of Cancer*. (1st ed.). New York: Springer Verlag.
121. Thoreson, G. R., Gayed, B. A., Chung, P. H., & Raj, G. V. (2014). Emerging therapies in castration resistant prostate cancer. *The Canadian Journal of Urology*.
122. Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X.,

- ... Rubin, M. A. (2005). Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science*, 310(October), 644–649.
123. Tomlins, S. a, Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B. E., ... Chinnaiyan, A. M. (2008). Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 10(2), 177–188. <https://doi.org/10.1593/neo.07822>
124. Truica, C. I., Byers, S., & Gelmann, E. P. (2000). Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res*, 60(17), 4709–4713. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/17/4709.full.pdf>
125. ha[Whttp://www.uptodate.com/contents/acute-bacterial-prostatitis?source=search_result&search=prostatitis&selectedTitle=1~95
126. Vincent, K. M., & Postovit, L. (2017). A pan-cancer analysis of secreted Frizzled-related proteins: re-examining their proposed tumour suppressive function. *Nature Publishing Group*, (January), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep42719>
127. Vuichoud, C., & Loughlin, K. R. (2015). Benign prostatic hyperplasia: epidemiology, economics and evaluation. *The Canadian Journal of Urology*, 22(October), 1–6.
128. Wang, D., & Tindall, D. J. (2011). Androgen action during prostate carcinogenesis. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-243-4_2
129. Wang, G., Wang, J., & Sadar, M. D. (2009). Crosstalk between the Androgen Receptor and β -Catenin in Castrate Resistant Prostate Cancer Gang. *Cancer Research*, 68(23), 9918–9927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1718>.Crosstalk
130. Wilbert, D. M., & Wilson, J. D. (2015). Characterization of the Cytosol Androgen Receptor of the Human Prostate *, 56(1).
131. Wright, K., Wilson, P. J., Kerr, J., Do, K., Hurst, T., Khoo, S., & Ward, B. (1998). Frequent loss of heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas, 1994–1997.
132. Wu, L., Zhao, J. C., Kim, J., Jin, H. J., Wang, C. Y., & Yu, J. (2013). ERG is a critical regulator of Wnt/LEF1 signaling in prostate cancer. *Cancer Research*, 73(19), 6068–6079. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0882>
133. Xavier, C. P., Melikova, M., Chuman, Y., Üren, A., Baljinnyam, B., & Rubin, J. S. (2015). Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of WNT3a/ β -catenin signaling. *Cell Signal*, 26(1), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.09.016>.Secreted
134. Yamaguchi, T. P. (2001). Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Current Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00417-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00417-1)
135. Yang, X., Chen, M.-W., Terry, S., Vacherot, F., Bemis, D. L., Capodice, J., ... Buttyan, R. (2006a). Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells. *Oncogene*, 25(24), 3436–44. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209366>
136. Yang, X., Chen, M.-W., Terry, S., Vacherot, F., Bemis, D. L., Capodice, J., ... Buttyan, R. (2006b). Complex regulation of human androgen receptor expression by Wnt signaling in prostate cancer cells. *Oncogene*, 25(24), 3436–44. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209366>
137. Yardy, G. W., & Brewster, S. F. (2005). Wnt signalling and prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 8(2), 119–126. <https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500794>
138. Yu, J., Yu, J., Mani, R., Cao, Q., Brenner, C. J., Cao, X., ... Chinnaiyan, A. M. (2011). An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. *Cancer Cell*, 17(5), 443–454. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.03.018>.An
139. Yuan, X., Cai, C., Chen, S., Yu, Z., & Balk, S. (2016). Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. *Oncogene*, 33(22), 2815–2825.

<https://doi.org/10.1038/onc.2013.235>. Androgen

140. Zegarra Montes, L. R., Sanchez Mejia, A. A., Loza Munarriz, C. A., & Celis Gutierrez, E. (2008). Semen and urine culture in the diagnosis of chronic bacterial prostatitis. *International Braz J Urol*, 34(1), 30–40.
141. Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2016). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
142. Zheng, L., Sun, D., Fan, W., Zhang, Z., Li, Q., & Jiang, T. (2015). Diagnostic value of SFRP1 as a favorable predictive and prognostic biomarker in patients with prostate cancer. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118276>
143. Zhou, Z., Wang, J., Han, X., Zhou, J., & Linder, S. (1998). Up-regulation of human secreted frizzled homolog in apoptosis and its down-regulation in breast tumors, *International Journal of Cancer*, 99(February), 95–99.
144. Zou, H., Molina, J. R., Harrington, J. J., Osborn, N. K., Klatt, K. K., Romero, Y., ... Ahlquist, D. A. (2005). Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett ' s esophagus. *International Journal of Cancer*, 591(April), 584–591. <https://doi.org/10.1002/ijc.21045>