



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**Acción de la proteína SFRP1 y silenciamiento de genes de la vía
WNT mediante una quimera aptámero siRNA en cáncer de
próstata**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
CARLOS DAVID CRUZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTORAL
Dra. Elizabeth Langley McCarron
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
Dra. Patricia García López
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DEL 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**Acción de la proteína SFRP1 y silenciamiento de genes de la vía
WNT mediante una quimera aptámero siRNA en cáncer de
próstata**

Vo. Bo. De los sinodales

PRESIDENTE

Dra. Marcela Lizano Soberón

SECRETARIO

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

VOCAL

Dra. Leticia Rocha Zavaleta

VOCAL

Dra. Ana María Salazar Martínez

VOCAL

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Doctorado en Ciencias Biomédicas

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(CONACyT)

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica
(INMEGEN)

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

“Yo no sé qué es la vida, y me lo he cuestionado muchas veces, lo que sí sé es que cada que miro hacia el microcosmos de la célula, asombrado intentando descifrar mensajes tan sofisticados, me encuentro un paso más cerca de la verdad”

“A la música, sin ella nada hubiera sido posible”

“A las VCaP”

“A mis colegas los RATONES, espero que su colaboración valga toda la pena, ya la humanidad les debemos mucho”

ÍNDICE

Glosario de abreviaciones.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
Introducción.....	11
MARCO TEÓRICO.....	15
1. La próstata.....	15
1.1 Fisiología de la próstata.....	15
1.2 Enfermedades de la próstata.....	16
1.2.1 Enfermedades infecciosas (prostatitis).....	17
1.2.2 Hiperplasia prostática benigna (HPB).....	18
2. Cáncer.....	19
2.1 Etiología del cáncer.....	20
2.2 Tipos de cáncer.....	23
3. Cáncer de Próstata (CaP).....	23
3.1 Estadísticas.....	24
3.2 Curso natural de la enfermedad.....	24
3.3 Diagnóstico del CaP.....	25
3.3.1 PSA y otros biomarcadores.....	26
3.4 Manejo clínico de la enfermedad.....	29
3.4.1 Cirugía.....	31
3.4.2 Terapia hormonal.....	32
3.4.3 Quimioterapia.....	33
4. Vías de señalización asociadas a CaP.....	35
4.1 Vía de señalización WNT.....	31
4.1.1 Vía de señalización WNT.....	31
4.1.2 Antagonistas de la vía WNT.....	35
4.1.3 SFRP1 en CaP.....	38
5. Alteraciones genómicas en CaP.....	38
5.1 Estroma-Epitelio.....	38
5.2 Re-arreglos cromosomales (gen de fusión).....	40
5.2.1 Fusión TMPRSS2-ERG en CaP.....	40
6. Terapias dirigidas en CaP.....	43
6.1 Anticuerpos en CaP.....	44
6.2 Aptámeros en CaP.....	46
6.2.1 Selección de aptámeros (SELEX).....	47
6.2.3 cell-SELEX.....	48
6.2.4 Aptámeros en CaP.....	49
Planteamiento del problema.....	53
Hipótesis.....	55

Objetivos.....	55
Materiales y métodos.....	56
Resultados	67
Expresión de SFRP1 en células no malignas y de cáncer de próstata	67
Efecto de la proteína SFRP1 exógena sobre la actividad transcripcional del AR.....	67
Efecto de SFRP1 sobre la viabilidad y el ciclo celular	70
Efecto de SFRP1 sobre la migración y sobre la invasión celular	73
Efecto de SFRP1 sobre un xenotransplante murino de VCaP.....	75
Cell-SELEX y PCR	77
Purificación de las bandas de DNA	78
cell-SELEX (nuevas condiciones)	79
Secuenciación y análisis	80
Discusión.....	84
Conclusiones	90
Perspectivas	90
Referencias	91
ANEXOS	128

Glosario de abreviaciones

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

CaP: Cáncer de Próstata

DHT: Dihidrotestosterona

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

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

FZD: Receptor transmembranal Frizzled

HPB: Hiperplasia Prostática Benigna

KLK3: Peptidasa de la familia de las Kalikreinas tipo 3

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

mAb: Anticuerpo monoclonal

MTT: Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolio (Reactivo colorimétrico para medir viabilidad celular)

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

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

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

WNT: Vía de señalización "Wingless Type"

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es un problema de salud en México y en el mundo, por ejemplo, en nuestro país se reportaron 41.6 casos por cada 100, 000 habitantes en 2018 (Ferlay et al., 2019a). Desafortunadamente no existe un diagnóstico efectivo para detectar la enfermedad a tiempo, las cuantificaciones del antígeno prostático carecen de especificidad (Cabarkapa et al., 2016). En CaP, la vía de señalización de los andrógenos tiene un papel fundamental, la activación de la vía de señalización promueve la translocación del receptor de andrógenos (AR) regulando la expresión de genes involucrados en el crecimiento celular (Antonarakis, 2018). Dentro de estos genes, el gen de fusión TMPRSS2-ERG, se expresa en aproximadamente el 50 % de los tumores de CaP (Tomlins et al., 2005). La expresión de TMPRSS2-ERG puede ser regulada por el AR ya que el gen TMPRSS2 cuenta con elementos de respuesta a andrógenos (ARE's, inglés). Además, se ha reportado que existe una red de señalización en CaP que podría involucrar al AR, el gen de fusión TMPRSS2-ERG y a la vía de señalización WNT (Li et al., 2011). En la vía de señalización WNT, las proteínas WNT, CERBERUS, WIF-1 y SFRP's activan o inhiben la señalización cuando se unen a los receptores Frizzled, LRP's y Ror. Particularmente la proteína SFRP1, ha sido reportada con expresión a la baja en tejidos y líneas celulares de CaP. En algunos casos, la restauración en la expresión de esta proteína ha tenido efectos controversiales en CaP. Por un lado, se ha observado que disminuye la actividad transcripcional del AR en líneas celulares de CaP como LNCaP y 22Rv1; mientras que, en otros casos, SFRP1 modula la comunicación estroma-epitelio promoviendo el avance del CaP (Joesting, Perrin, Elenbaas, Fawell, et al., 2005; Y. Kawano et al., 2009). Hasta donde sabemos, a la fecha, no existen trabajos científicos que evalúen cuál es el efecto que tiene la proteína SFRP1 en modelos de CaP que con la fusión TMPRSS2-ERG. Conocer el efecto que tiene SFRP1 sobre este tipo de CaP, podría ser de utilidad a futuro, para establecer mejores tratamientos farmacológicos.

El desarrollo de terapias farmacológicas dirigidas ha sido un gran reto en CaP. Los fármacos usados actualmente inhiben el efecto de los andrógenos, sin embargo, en

más del 80 % de los casos, la enfermedad avanza hacia un estado resistente a la castración química (Suzman & Antonarakis, 2014). Nuevas estrategias farmacológicas buscan regular o abatir la expresión de TMPRSS2-ERG mediante la modulación de la actividad transcripcional del AR (Lehmusvaara et al., 2012). Sin embargo, este tipo de abordajes no han sido totalmente efectivos y se han comenzado a investigar terapias dirigidas de nueva generación (Graff et al., 2015). Algunas de las herramientas terapéuticas más innovadoras se basan en liposomas, anticuerpos monoclonales, partículas virales, y aptámeros (Asatiani & Gelmann, 2005; Crawford et al., 2019; Kumar & Pacey, 2016). Una característica muy interesante de los aptámeros es que son moléculas altamente maleables y que pueden ser fusionadas con fármacos (Lakhin et al., 2013). Una de estas fusiones son las quimeras aptámero-siRNA, las cuales han mostrado ser capaces de abatir la expresión de genes asociados a cáncer. La mayoría de los aptámeros estudiados actualmente en CaP se unen a la proteína de membrana PSMA, sin embargo, una desventaja importante con este tipo de aptámeros, es que aproximadamente el 50% de los tumores de CaP no expresan PSMA. (Yin et al., 2011). Tomando en cuenta esto, hipotetizamos que sería de gran utilidad la selección y el diseño de un aptámero con la capacidad de reconocer este tipo de células. En línea con esto, y como una segunda etapa de este proyecto de tesis, se comenzaron a realizar ensayos piloto para la selección de un aptámero con estas características. El desarrollo de una herramienta molecular de este tipo, junto con los hallazgos obtenidos previamente sobre el papel de proteínas como SFRP1 en CaP, podría tener utilidad clínica en la terapia de los tumores positivos al gen de fusión TMPRSS2-ERG.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is a health problem in Mexico and in the world, for example, in our country 41.6 cases were reported per 100,000 persons in 2018 (Ferlay et al., 2019a). There is no effective diagnosis to detect the disease on early time, the prostate antigen quantifications lack specificity (Cabarkapa et al., 2016). In PCa, the

signaling of androgens plays a fundamental role, the activation of this signaling promotes the androgen receptor's translocation (AR) to the cell nucleus promoting the expression of genes involved in cell growth (Antonarakis, 2018). As part of these genes, the TMPRSS2-ERG fusion is known expressed at roughly 50% of PCa tumors (Tomlins et al., 2005). The expression of TMPRSS2-ERG can be regulated by the AR since the TMPRSS2 gene has androgen response elements (ARE's). In addition, it has been reported a signaling network in PCa involving AR, TMPRSS2-ERG and the WNT signaling (Li et al., 2011). In the WNT signaling pathway, the WNT, CERBERUS, WIF-1 and SFRP's proteins activate or inhibit signaling when interacting to Frizzled, LRP's and Ror receptors. Particularly tSFRP1 protein has been reported with low expression in PCa tissues and cell lines. In some cases, the restoration in the expression of SFRP1 has had controversial effects. On the one hand, it has been observed that transcriptional activity of AR decreases in PCa cells such as LNCaP and 22Rv1; while on the other hand, SFRP1 modulates the stroma-epithelium communication promoting the progression of PCa (Joesting, Perrin, Elenbaas, Fawell, et al., 2005; Y. Kawano et al., 2009). So far, our knowledge, we know there are no scientific studies that evaluate the effect of the SFRP1 protein in PCa models with TMPRSS2-ERG fusion. To know what the effect of SFRP1 is on this type of PCa could be useful to establish better pharmacological treatments.

The development of targeted therapies has been a great challenge in CaP. Drugs currently used inhibit the effect of androgens, however, in more than 80% of cases, the disease progresses towards a state resistant to chemical castration (Suzman & Antonarakis, 2014). New pharmacological strategies are searching to regulate the expression of TMPRSS2-ERG by modulating the AR's transcriptional activity (Lehmusvaara et al., 2012). This kind of approach has not been totally effective and new generation targeted therapies have been investigated (Graff et al., 2015). Some of the most innovative therapeutic tools are based on liposomes, monoclonal antibodies, viral particles, and aptamers (Asatiani & Gelmann, 2005; Crawford et al., 2019; Kumar & Pacey, 2016). One interesting characteristic of aptamers is that aptamers are highly malleable, and they can be fused with drugs (Lakhin et al.,

2013). This kind of fusions called aptamer-siRNA chimeras, have been shown to be capable of reducing the expression of genes associated with cancer. Most of the aptamers currently studied in PCa bind to the PSMA protein, however, one of the major disadvantages with this type of aptamers is that PCa tumors with TMPRSS2-ERG do not express PSMA. (Yin et al., 2011). Taking this into account, we hypothesized that the selection and design of an aptamer with the ability to recognize this type of cells would be very useful in Pa treatment. In line with this, and as a second stage of this thesis project, pilot tests were carried out to select an aptamer with these characteristics. The development of such molecular tool, together with the findings previously obtained about role the of SFRP1 in PCa, could have clinical utility as the therapy for tumors positive to TMPRSS2-ERG fusion.

Introducción

El cáncer de próstata (CaP) es un problema de salud en México y en el mundo, en nuestro país se reportaron 41.6 casos por cada 100, 000 habitantes en 2018 (Ferlay et al., 2019a). El factor de riesgo más importante relacionado con el desarrollo de CaP es la edad, se ha observado que la incidencia de la enfermedad aumenta en grupos poblacionales con una edad mayor a los 60 años (Leitzmann & Rohrmann, 2012). Un problema importante en CaP, es que no existen pruebas de diagnóstico efectivas que permitan detectar a tiempo la enfermedad, el examen clínico más utilizado es la cuantificación del antígeno prostático en sangre; sin embargo, esta prueba carece de especificidad (Cabarkapa et al., 2016). Además, aún no se conocen por completo, cuáles son los factores moleculares que influyen en el desarrollo del CaP.

La vía de señalización de los andrógenos ha sido la más estudiada en CaP. Los andrógenos tienen un papel fundamental tanto en la homeostasis como en la enfermedad de la próstata. Dentro de la señalización de los andrógenos, la testosterona es metabolizada por las células prostáticas y convertida a su metabolito más activo: la di-hidrotestosterona (DHT). La DHT se une con alta afinidad al receptor de andrógenos (AR) y promueve su translocación al núcleo celular, regulando así la expresión de genes involucrados con el crecimiento celular (Antonarakis, 2018). En CaP, el receptor de andrógenos (AR, en inglés) puede promover la expresión de oncogenes e incluso genes de fusión (Yu et al., 2010). El gen de fusión más estudiado es el gen *TMPRSS2-ERG*, interesantemente esta fusión se expresa en aproximadamente el 50 % de los tumores de CaP (Tomlins et al., 2005). El AR puede regular la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* ya que la secuencia *TMPRSS2* cuenta con elementos de respuesta a andrógenos (ARE's, androgene response elements en inglés). Se ha reportado que existe una importante red de señalización en CaP que involucra al AR, *TMPRSS2-ERG* y a la vía de señalización WNT (Li et al., 2011).

Dentro de la vía de señalización WNT, (la cual se ha reportado desregulada en muchos tipos de cáncer incluyendo CaP), son importantes las proteínas que se encuentran en el espacio extracelular. Por ejemplo, las proteínas WNT, CERBERUS, WIF-1 y SFRP's activan o inhiben a los receptores de membrana: Frizzled, LRP's y Ror. Además, la señalización río debajo de estos receptores, estimula a proteínas sensibles de fosforilación en el citoplasma como APC, Dishville, Axina, GSK3- β y a efectores nucleares como TCF y LEF-1 (Komiya & Habas, 2008). Las proteínas SFRP son importantes reguladores de la señalización WNT en distintos tipos de cáncer. Particularmente la proteína SFRP1, se encuentra expresada a la baja en la mayor parte de los tejidos y líneas celulares de cáncer por lo que se ha hipotetizado que podría ser una posible proteína supresora de tumor (Cooper et al., 2012; Klopocki et al., 2004; Taguchi et al., 2016). Sin embargo, la restauración de la expresión de esta proteína ha mostrado efectos controversiales en CaP. Por un lado, se ha observado que en líneas celulares de CaP como las células LNCaP y 22Rv1, SFRP1 disminuye la actividad transcripcional del AR; mientras que en otros casos, SFRP1 ha modulado la comunicación estroma-epitelio promoviendo la progresión del CaP (Joesting, Perrin, Elenbaas, Fawell, et al., 2005; Y. Kawano et al., 2009). Hasta donde sabemos, no existen reportes científicos que aborden cuál es el efecto que podría tener la proteína SFRP1 en un modelo de CaP que exprese la fusión TMPRSS2-ERG. Tomando en cuenta que los reportes previos han mostrado que la proteína SFRP1 puede regular la actividad transcripcional del AR, y que la fusión TMPRSS2-ERG puede ser regulada por el AR se decidió evaluar el efecto de SFRP1 en un modelo de CaP positivo a TMPRSS2-ERG *in vitro* e *in vivo*. Conocer el efecto que tiene SFRP1 sobre este tipo de células de CaP podría ser de utilidad a futuro para establecer mejores tratamientos farmacológicos.

En general en todos los tipos de cáncer, el desarrollo de terapias farmacológicas dirigidas ha representado un gran reto. La mayoría de los fármacos pueden tener un blanco molecular específico pero dicho blanco también llega a encontrarse en células sanas. En el caso del CaP, los fármacos usados se unen con especificidad al AR; sin embargo después del tratamiento de bloqueo de andrógenos, en más del

80 % de los casos la enfermedad avanza hacia un estado independiente de andrógenos (Suzman & Antonarakis, 2014). Por esta razón se han buscado nuevos blancos terapéuticos como el caso del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* (Font-Tello et al., 2015). Esto se debe a que *TMPRSS2-ERG* parece estar asociado con eventos de migración celular y de transición epitelio-mesénquima (EMT) (Leshem et al., 2011; Tomlins et al., 2005) lo que contribuye a la metástasis. Las nuevas estrategias moleculares que buscan regular o abatir la expresión de *TMPRSS2-ERG* se han enfocado principalmente en disminuir la expresión del gen de fusión a través de la modulación de la actividad transcripcional del AR (Lehmusvaara et al., 2012). La ventaja de este tipo de estrategia es que se podrían usar algunos de los fármacos convencionales que ya se usan actualmente en el tratamiento del CaP. Sin embargo, este tipo de abordajes no han sido totalmente efectivos para curar la enfermedad y se ha optado por buscar terapias de nueva generación (Graff et al., 2015).

Para mejorar el tratamiento farmacológico del CaP, otras terapias moleculares han sido investigadas, las cuales buscan abatir la expresión de genes de manera célula-específico. Esto se ha logrado mediante el uso de RNA's de silenciamiento mejor conocidos como siRNAs (short interferent RNA en inglés), realizando transfecciones estables con plásmidos o infección con agentes virales no patógenos (Dassie et al., 2014). Estas técnicas aún no pueden implementarse con éxito en ensayos clínicos debido a que carecen de una especificidad celular completa. Se ha observado que al usar este tipo de terapias se puede despertar una respuesta inmune exacerbada letal para los pacientes (Xu & Wang, 2015).

Las herramientas terapéuticas más innovadoras hasta ahora se basan en vectores basados en liposomas, anticuerpos monoclonales, partículas virales y hace pocos años se comenzó a evaluar también el uso de aptámeros (Asatiani & Gelmann, 2005; Crawford et al., 2019; Kumar & Pacey, 2016). Un aptámero es una molécula de naturaleza nucleica que reconoce específicamente a un blanco molecular (J. Liu et al., 2011). Los aptámeros suelen tener una longitud relativamente corta que va

de los 20 a los 100 nucleótidos aproximadamente. Su naturaleza de ácidos nucleicos y su alta diversidad dentro de una librería de aptámeros, les permite formar una gran variedad de estructuras tridimensionales que pueden reconocer casi cualquier blanco molecular (Ku et al., 2015). Los aptámeros son seleccionados y diseñados para ser altamente específicos por su blanco molecular *in vitro* e *in vivo*. Se ha reportado que tienen alta biodisponibilidad cuando son administrados por vía sistémica con una presencia de hasta más de 48 horas dentro del organismo (Farokhzad et al., 2004). Una característica muy interesante de estas moléculas es que son altamente maleables y que pueden ser fusionadas con fármacos u otras moléculas como los siRNA's (Lakhin et al., 2013). Un tipo de diseño que usa tanto aptámeros como siRNA's son las quimeras aptámero-siRNA, las cuales pueden abatir la expresión de genes asociados a cáncer. En CaP existen numerosos trabajos que utilizan estos modelos de quimeras aptámero-siRNA, principalmente destacan aquellos dirigidos contra la proteína de membrana PSMA (X. Wu et al., 2011).

Los aptámeros diseñados para reconocer a la proteína de membrana PSMA, han sido altamente específicos de las células de CaP tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*. Sin embargo, una importante desventaja con este tipo de aptámeros, es que existen células de CaP que no expresan a la proteína PSMA. Aproximadamente el 50% de los tumores de CaP no expresan PSMA, esto se debe a que ERG, producto de la fusión TMPRSS2-ERG, abate la expresión de PSMA (Yin et al., 2011). Tomando en cuenta esto, hipotetizamos que sería de gran utilidad la selección y diseño de un aptámero que pudiera reconocer este tipo de células. En ese sentido, como una segunda etapa de este proyecto de tesis, se comenzaron a realizar ensayos piloto para la selección de un aptámero que reconociera específicamente a células de CaP que expresan el gen de fusión TMPRSS2-ERG. El desarrollo de una herramienta molecular de este tipo podría a futuro, tener utilidad clínica en la terapia de los tumores de CaP positivos al gen de fusión TMPRSS2-ERG.

MARCO TEÓRICO

1. La próstata

La próstata es una glándula con función exocrina en el sistema reproductor masculino. Se encuentra ubicada debajo de la vejiga y delante del recto (**Figura 1**) (Martini et al., 2015). Se divide en tres zonas principales: 1) zona de transición, 2) zona central y 3) zona periférica (Shier et al., 2009) (**Figura 2**).

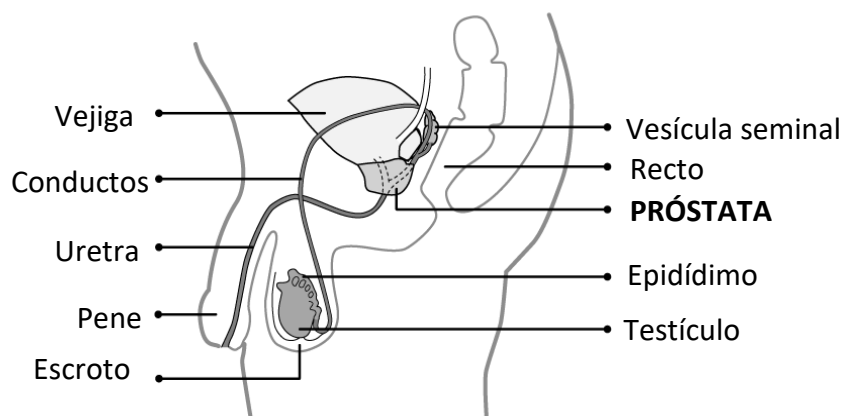


Figura 1. Sistema reproductor masculino. Imagen modificada de Martini *et al.*, 2012. Se muestran los diferentes órganos del sistema reproductor masculino, incluyendo la próstata y su ubicación.

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

1.1 Fisiología de la próstata

En la próstata coexisten diferentes tipos celulares, los cuales se dividen principalmente en dos grupos: 1) epiteliales y 2) estromales. Dentro de las células epiteliales existen tres divisiones: 1) células epiteliales secretoras, 2) células

basales, y 3) células tipo “*stem cells*” (conocidas también como células madre). La organización celular prostática está regulada por una matriz conectiva que organiza a las células y a los residuos celulares. Esta matriz juega un papel importante en la comunicación celular y en el desarrollo de la glándula masculina (Frick & Aulitzky, 1991; Schalken & van Leenders, 2003).

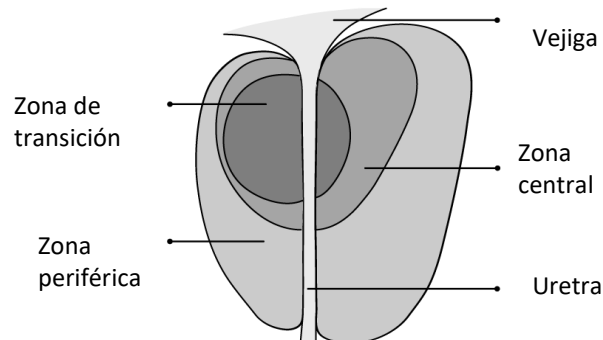


Figura 2. Zonas de la próstata. Imagen modificada de Hammerich *et al.*, (2009). Se muestran las zonas en las que se divide la próstata. Es en la zona periférica donde se desarrollan con mayor frecuencia los tumores de CaP.

La próstata secreta diversos compuestos como el zinc, ácido cítrico, prostaglandinas, colesterol, fosfatasa ácida y la proteína conocida como “antígeno prostático específico” (PSA, por sus siglas en inglés) (Huggins & Sommer, 1953). El PSA tiene un papel importante en el mantenimiento de las funciones normales de la próstata; además, el PSA es el biomarcador más utilizado para el diagnóstico de la salud prostática (Loeb & Catalona, 2007; Stephan *et al.*, 2014).

1.2 Enfermedades de la próstata

La próstata puede padecer diferentes enfermedades que van desde una simple inflamación hasta el desarrollo de cáncer. Por ejemplo, una enfermedad común en hombres mayores a los 60 años es la hiperplasia prostática benigna (HPB), se caracteriza por un crecimiento e inflamación de la glándula prostática. La mayoría

de los pacientes con HPB acuden a revisión después de presentar los síntomas conocidos como LUTS (Síntomas urinarios del tracto inferior, en español). Estos síntomas se encuentran relacionados con el tracto urinario; sin embargo, estos síntomas no siempre son consecuencia de problemas enfermedades como HPB o CaP (Roehrborn et al., 2007). Algunos de los síntomas LUTS son el retraso en el inicio de la micción, mal flujo urinario, sensación de vaciamiento incompleto de la vejiga, goteo post-micción y micción prolongada (Thorpe & Neal, 2003).

1.2.1 Enfermedades infecciosas (prostatitis)

La prostatitis es una combinación de enfermedades infecciosas de la próstata: prostatitis bacteriana aguda y crónica, o prostatitis asintomática (Nickel, 2011). Existe una clasificación hecha por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos que divide a esta enfermedad en cuatro categorías:

Categoría I: prostatitis bacteriana aguda (PAB), asociada con síntomas graves de prostatitis, infección sistémica e infección urinaria bacteriana aguda.

Categoría II: prostatitis bacteriana crónica (CBP), causada por una infección bacteriana crónica de la próstata con o sin síntomas de prostatitis. Generalmente el paciente manifiesta infecciones urinarias recurrentes causadas por la misma cepa bacteriana.

Categoría III: Prostatitis crónica con síndrome de dolor pélvico crónico, caracterizada principalmente por dolor pélvico crónico.

Categoría IV: Prostatitis inflamatoria asintomática, caracterizada por inflamación de la próstata en ausencia de síntomas del tracto genitourinario.

1.2.2 Hiperplasia prostática benigna (HPB)

La HBP es una enfermedad que se caracteriza principalmente por inflamación y agrandamiento de la próstata. El riesgo de padecer HPB aumenta notablemente con la edad avanzada. Por ejemplo, los estudios en autopsias muestran que existe una prevalencia histológica del 8%, del 50% y del 80% en la cuarta, en la sexta y en la novena década de la vida respectivamente. En Europa, EE. UU. y Asia, también se ha demostrado que la edad avanzada es un factor de riesgo importante para el inicio y la progresión de la HPB (Lim, 2017). Para diagnosticar la HPB se puede realizar una palpación de la zona genital para buscar anomalías físicas como organomegalia, asimetría, sensibilidad al tacto o presencia de alguna masa de tejido extraña. Sin embargo, es posible que se requieran exámenes clínicos adicionales para el correcto diagnóstico de este padecimiento. Estos exámenes adicionales incluyen análisis de sangre y orina, evaluación uro-dinámica y, estudios de imagen como un ultrasonido y/o rayos X (Stamey et al., 1987; Tanguay et al., 2009).

El tratamiento de los malestares provocados por la HPB consiste principalmente en disminuir el dolor y la inflamación, así como corregir problemas relacionados con la micción. En algunas ocasiones, la retención urinaria tiene que tratarse con la introducción de un catéter uretral; sin embargo, este procedimiento es evidentemente invasivo y molesto para el paciente. Cuando los síntomas provocados por la HPB no disminuyen, la calidad de vida del paciente empeora, por lo que podría ser factible recurrir a un procedimiento quirúrgico donde se retire la próstata (Lin et al., 2018). La **Figura 3** presenta algunas de las diferencias que existen entre una próstata normal y una próstata con HPB. Además de la HPB, otra enfermedad que afecta a la próstata es el cáncer. Más adelante se describirán con detalle las características del cáncer de próstata (CaP); pero, antes, se abordará de manera breve cuál es la etiología y los tipos de cáncer más frecuentes.

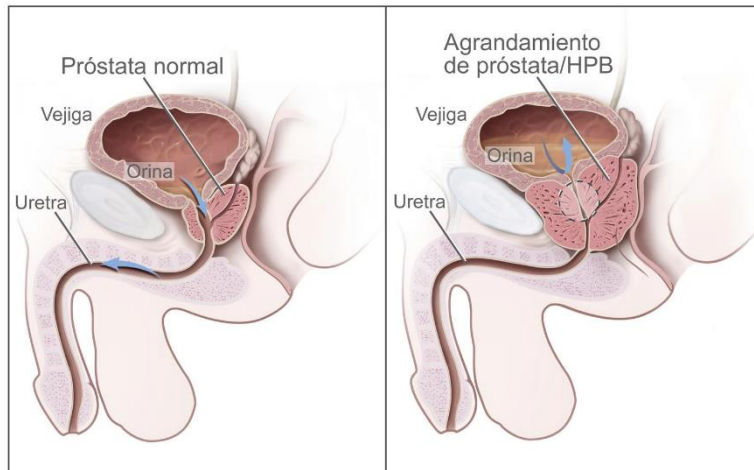


Figura 3. Próstata normal (izquierda) y próstata con HPB (derecha). Imagen tomada de la página de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH). En la imagen de la derecha se puede observar cómo se obstruye el conducto uretral en una próstata con HPB.

2. Cáncer

Definir al cáncer como enfermedad es una tarea compleja hoy en día en incluso tres siglos en el pasado, Nathan Bailey recoge el termino en el Diccionario Etimológico Universal de Inglés pasando por la identificación del término cáncer desde su identificación, su pronóstico, orígenes y estadio (Skuse, 2015). Según los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos, “cáncer” es un término que se usa para las enfermedades en las que las células anormales se dividen sin control y pueden invadir los tejidos cercanos o distantes a través de los sistemas sanguíneo y linfático (*What Is Cancer?*, 2007). Las investigaciones realizadas hasta ahora definen al cáncer como un conjunto de enfermedades que desencadenan una falla celular generalizada en el control del crecimiento, la muerte celular y la reparación del DNA (Wodarz, 2009). El cáncer puede comenzar en cualquier lugar del cuerpo, cuando las células crecen fuera de control y desplazan a las células normales lo que dificulta que el organismo funcione correctamente (*What Is Cancer?*, 2007).

2.1 Etiología del cáncer

El cáncer puede originarse por diversas causas que aún se siguen investigando; sin embargo, la edad, las alteraciones genómicas y los factores ambientales parecen ser los factores más importantes. Desde el enfoque genómico, se han observado y estudiado las mutaciones somáticas, la inestabilidad cromosómica y los cambios epigenéticos. Sin embargo, debido a que el cáncer se considera como una enfermedad multifactorial, se han realizado clasificaciones etiológicas más amplias que consideran el sistema inmune y el metabolismo celular (Hanahan & Weinberg, 2011). En la **Figura 4** se presenta un esquema con la clasificación etiológica del cáncer propuesta por Hanahan y Weinberg, este estudio es conocido en español como “Características del cáncer”.

La característica del cáncer tal vez más estudiada son los mecanismos involucrados en el aumento de la proliferación celular. Esto se debe a que las células cancerígenas aumentan considerablemente su capacidad proliferativa en comparación con células de tejido sano; aunque esto es debatido ya que tejidos como el intestino también tienen alta capacidad proliferativa. Las células cancerosas proliferan produciendo o asimilando factores de crecimiento secretados por ellas mismas o por células vecinas, y promoviendo así, mecanismos moleculares de proliferación o resistencia a la muerte celular (Cheng et al., 2008). Molecularmente, la muerte celular puede dividirse en varias ramas que incluyen apoptosis intrínseca, apoptosis extrínseca, necrosis impulsada por la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), necroptosis, ferroptosis, piroptosis, parthanatos, muerte celular entóxica, muerte celular NETóxica, muerte celular dependiente de lisosomas, dependiente de la autofagia muerte celular, muerte celular inmunogénica, senescencia celular y catástrofe mitótica (Galluzzi et al., 2018). La apoptosis probablemente sea el mecanismo de muerte celular más estudiado en cáncer, una búsqueda en PUBMED de las palabras: apoptosis + cáncer, arroja 15,186 resultados en el periodo de 2019-2020 (Agosto, 2020). La pérdida del control apoptótico permite que las células cancerosas sobrevivan más tiempo y da más tiempo para la acumulación de mutaciones que pueden aumentar la invasividad

durante la progresión del tumor, estimular la angiogénesis, desregular la proliferación celular e interferir con la diferenciación (Pfeffer & Singh, 2018). La apoptosis es un proceso molecular que puede iniciar con la estimulación de receptores tipo Fas en la membrana celular, y con la activación de proteasas intracelulares conocidas como caspasas. En condiciones normales, la homeostasis entre las señales de los reguladores y los efectores de la apoptosis, es controlada por proteínas de la familia Bcl-2. En muchos tipos de cáncer, estas proteínas se encuentran desreguladas, esto interrumpe el proceso apoptótico y promueve la proliferación descontrolada (Adams & Cory, 2007).

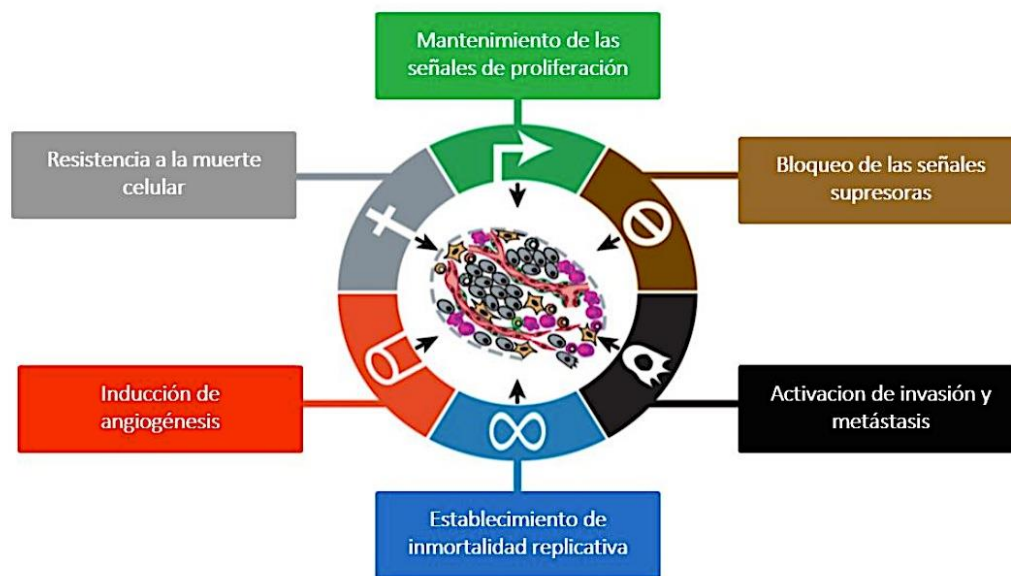


Figura 4. Características del cáncer (Hallmarks of cancer, en inglés). Imagen modificada de Hanahan y Weinberg, 2011. Se muestran las 6 características principales del cáncer involucradas en el desarrollo y la progresión tumoral.

Los tumores se vuelven más agresivos cuando crecen descontroladamente; sin embargo, necesitan de muchos nutrientes para llevar esto a cabo. La angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos que alimenten al tumor es una forma que tiene el tumor de conseguir más nutrientes. De esta forma, las células dentro de los tumores tienen acceso a nutrientes, oxígeno; así como a una vía de entrada y salida que les permite absorber y evacuar desechos metabólicos de manera eficiente. Las

células cancerosas promueven la generación de nuevos vasos sanguíneos que conectan con el tumor, el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A, por sus siglas en inglés) es uno de los factores que permite esto. La expresión de VEGF-A también puede ser inducida cuando se presenta hipoxia celular, la cual ocurre en el interior de los tumores ya que se ha mostrado que VEGF es un objetivo transcripcional directo de HIF-1 α y HIF-2 α , factores transcripcionales inducidos por hipoxia (Ferrara, 2010; Krock et al., 2011).

Dos características del cáncer que se encuentran íntimamente relacionadas son la invasión y la metástasis celular. Estas características del cáncer son fenómenos ampliamente estudiados, y se sabe que participan proteínas estructurales intracelulares como las cadherinas y proteínas de la matriz extracelular las metaloproteasas. Las proteínas de la familia de las E-cadherinas están asociadas con procesos invasivos y metastásicos, y con la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Berx & van Roy, 2009). Las células epiteliales cancerosas adquieren capacidades migratorias e invasivas cuando entran al proceso EMT. En EMT intervienen los factores de transcripción Snail, Slug, Twist y Zeb 1/2 que ayudan a las células cancerosas a perder adherencia y promueven sus capacidades de movimiento e invasión (Micalizzi et al., 2010).

Otras características del cáncer que también son sumamente importantes son la desregulación energética celular, la evasión al sistema inmunológico, la inestabilidad cromosómica, la presencia de mutaciones en el genoma, y el aumento de los procesos inflamatorios (DeBerardinis & Chandel, 2016; Rakoff-Nahoum, 2006; Vargas-Rondón et al., 2017). La mayoría de las investigaciones sobre las características del cáncer han mostrado que exactamente las mismas moléculas tienen mecanismos y efectos diferentes dependiendo del tipo de tejido cáncer y dependiendo del tipo de cáncer.

2.2 Tipos de cáncer

Los diez tipos de cáncer con mayor incidencia en el mundo según los reportes del GLOBOCAN en el 2018 se resumen en el gráfico de la **Figura 5** (Ferlay et al., 2019b). Los valores de incidencia de cada tipo de cáncer pueden variar mucho entre países, esto se debe a que intervienen otros factores de riesgo de tipo étnico y factores de riesgo relacionados con las condiciones socioeconómicas de cada población.

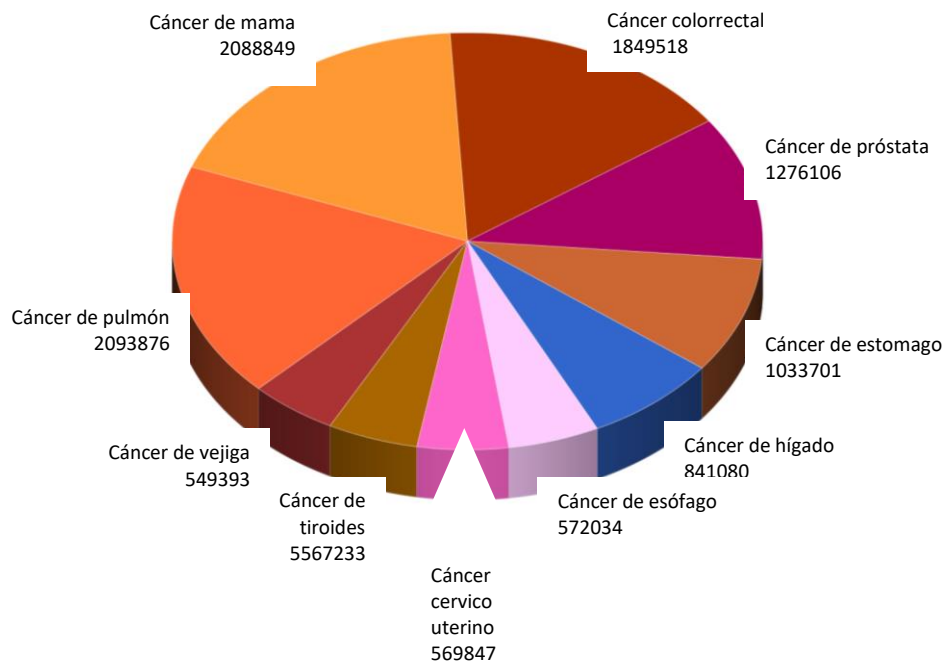


Figura 5. Incidencia global del cáncer. Los datos fueron tomados de la plataforma CANCER TODAY (Ferlay et al., 2019b, acceso: 18/Junio/2020).

3. Cáncer de Próstata (CaP)

El CaP ocupa el cuarto lugar de incidencia en el mundo por debajo del cáncer colorrectal, cáncer de mama y cáncer de pulmón (Ferlay et al., 2019b). En el caso de México, el CaP ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad a nivel general.

3.1 Estadísticas

Las estadísticas del CaP reportadas en 2018 para la población mexicana son de 41.6 casos por cada 100, 000 habitantes (CANCER TODAY, 2020). La tasa de mortalidad en México es muy similar a la mortalidad en USA (11.3 vs. 9.8 muertes por cada 100 mil hombres), sin embargo, en México el CaP es la primera causa de muerte asociada a cáncer mientras que en USA ocupa el cuarto lugar (INSP, México; <https://www.insp.mx/avisos/4189-cancer-prostata-mx.html> acceso: agosto, 2020).

3.2 Curso natural de la enfermedad

En el diagnóstico del CaP, los parámetros clínicos que se miden son las concentraciones de PSA en sangre, el tamaño del tumor, la escala Gleason y la presencia de metástasis regional o distante. La relación entre dichos parámetros y el pronóstico de vida para el paciente pueden modificarse dependiendo del tratamiento que se indique (Holmberg & Van Hemelrijck, 2014). Aunque la cuantificación de las concentraciones de PSA es la prueba clínica más utilizada para definir el estado de salud de la próstata, esta prueba carece de especificidad cuando se trata de diagnosticar el CaP. En la **Figura 6** se muestra un gráfico representativo que muestra los dos estados clínicos más importantes en la progresión del CaP, el gráfico se basa en las concentraciones de PSA en el eje de las “Y” y el tiempo en “X”.

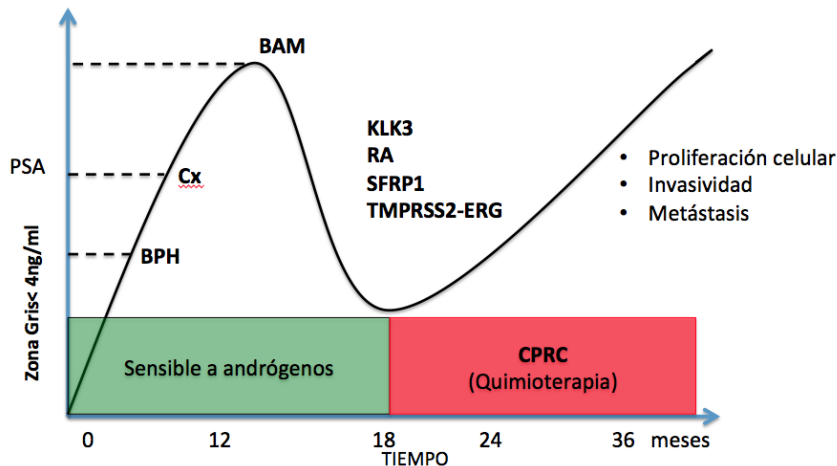


Figura 6. Curso natural de la enfermedad representada como el cambio en las concentraciones de PSA en el tiempo. En el gráfico se muestra la progresión del CaP en meses (eje “X”), respecto a las concentraciones de PSA en sangre (eje “Y”). BAM= Bloqueo androgénico máximo, Cx= cirugía, CPRC= CaP resistente a la castración.

3.3 Diagnóstico del CaP

Cuando un paciente acude al médico porque presenta molestias físicas del tracto urinario como los síntomas LUTS, el médico considera realizar los siguientes exámenes: medir las concentraciones de PSA en sangre y en caso de que el PSA sea elevado (mayor a 4 ng/ml), podría realizar un tacto digital rectal y/u ordenar una biopsia. En este tipo de pruebas de diagnóstico se pueden llegar a incluir un estimado del tamaño de la próstata, estudios de imagenología; así como la consideración de factores de riesgo como la edad avanzada y los antecedentes familiares de CaP (**Figura 7**).

Cuando los niveles de PSA en sangre son elevados: >4 ng/ml (zona gris o zona de sospecha de CaP); y, además se encuentran anomalías físicas en la próstata cuando se realiza el tacto digital rectal, el médico puede sugerir realizar una biopsia. La biopsia servirá para determinar la histología celular y corroborar si se trata de un tumor cancerígeno (Shariat & Roehrborn, 2008). En una biopsia de un tumor de CaP se puede determinar el grado de avance de la enfermedad mediante el uso de la

escala “Gleason”. La escala Gleason se basa en asignar valores numéricos a la arquitectura histológica de las células prostáticas observadas en una biopsia. Se reconocen dos patrones de diferenciación celular a los cuales se les asignan valores numéricos que van del 1 a 5; al sumar el primero y el segundo valor, correspondientes a los dos patrones celulares más prevalentes en la biopsia, se obtendrá el valor final de Gleason (Helpap & Egevad, 2009; Munjal & Leslie, 2020). Esta escala fue desarrollada en 1966 por Gleason, basándose en la tinción de cortes histológicos provenientes de tumores de CaP; los colorantes usados fueron eosina y hematoxilina para facilitar la observación de los tejidos usando un microscopio (Gleason, 1981). La **Figura 8** muestra los 5 patrones celulares utilizados como referencia en la determinación de las dos poblaciones celulares predominantes en una biopsia de CaP.

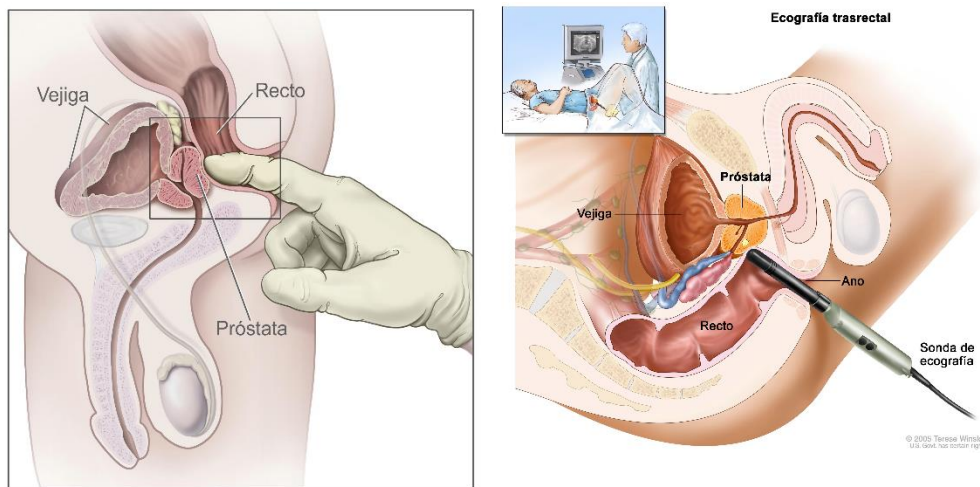


Figura 7. Examen digital rectal y ultrasonido transrectal. Imagen tomada de Winslow, 2005. A la izquierda se muestra una ilustración de un examen digital rectal de la glándula prostática. A la derecha, una ilustración de un ultrasonido transrectal.

3.3.1 PSA y otros biomarcadores

El PSA es una proteína secretada por las células de la próstata y codificada por el gen *KLK3* que pertenece a la familia de las proteínas llamadas kalikreinas. Este gen se localiza en la región cromosómica 19q13.4. La función principal del PSA está

relacionada con la licuefacción del líquido seminal, evitando así su coagulación y mejorando la movilidad de los espermatozoides a través del semen. El PSA es el bio-marcador más utilizado para el diagnóstico del CaP. En 1987 la FDA (*Federal Drug Administration*) aprobó que la cuantificación de las concentraciones de PSA en sangre era una prueba confiable y adyuvante al tacto digital rectal (TDR) para el diagnóstico del CaP (Stamey et al., 1987). Sin embargo, en la actualidad se sabe que la cuantificación de las concentraciones de PSA carece de especificidad en CaP. Por ejemplo algunos procesos como inflamación, infección, HPB e incluso traumatismos leves ocasionados por un golpe (Prensner et al., 2012) pueden alterar las concentraciones de PSA. Se ha investigado cómo se podría mejorar la especificidad de la prueba de PSA, se han propuesto: normalizar las concentraciones de PSA respecto al tamaño de la próstata (densidad de PSA), cuantificar las fracciones libres y acomplexadas del PSA, monitorear los cambios del PSA en suero (velocidad y tiempo de duplicación), y medir las isoformas del PSA.

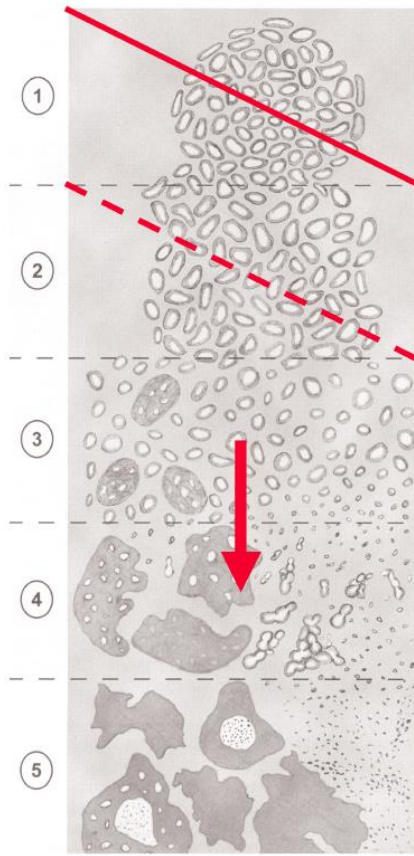


Figura 8. Patrones celulares utilizados como referencia en la determinación de la escala Gleason.

Todas estas estrategias de diagnóstico siguen considerando al PSA como el biomarcador de oro para el diagnóstico del CaP; sin embargo, no han arrojado resultados totalmente satisfactorios. En muchos de los casos existe confusión sobre cuál es la mejor estrategia para un buen diagnóstico de la enfermedad. Por esta razón se han buscado nuevos biomarcadores que ofrezcan una mayor especificidad, y por lo tanto, contribuyan a un mejor diagnóstico y pronóstico del CaP (Preiser *et al.*, 2012). En la **Tabla 1** se describen algunos de los biomarcadores alternativos al PSA, que se están investigando y otros que ya se están usando para el diagnóstico del CaP.

Muchas de las investigaciones enfocadas a mejorar el diagnóstico del CaP se han centrado en encontrar un solo biomarcador; sin embargo, dicha estrategia podría ser incompleta. Por ejemplo, existen trabajos donde se ha reportado que la pérdida del supresor de tumor PTEN y la ganancia en la expresión de la proteína ERG, tienen una relación útil para el pronóstico del paciente con CaP (Carver *et al.*, 2011). En la **Figura 9** se muestra un esquema con las pruebas de diagnóstico de CaP utilizadas con mayor frecuencia (Preiser *et al.*, 2012).

Tabla 1. Biomarcadores utilizados actualmente y biomarcadores candidatos para el diagnóstico del CaP

BIOMARCADOR	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
PCA3 (Prostate Cancer Associated 3, en inglés).	<ul style="list-style-type: none"> • RNA largo no codificante. • Sobre-expresado en más del 90 % de los tejidos de CaP comparado con HPB. • Presente en muestras de orina. 	(Bussemakers et al., 1999).
TMPRSS2-ERG (Transmembrane protease, serine 2-ETS related gene fusion, en inglés).	<ul style="list-style-type: none"> • Fusión de genes presente en aproximadamente el 50% de los casos de CaP. • Posible cuantificación en orina (mRNA). • La asociación con PCA3 mejora la sensibilidad de la prueba. 	(Hessels & Schalken, 2013; Prensner et al., 2012).
AMACR (Alpha-Methylacyl-CoA Racemase, en inglés).	<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad en más del 90 % de las biopsias de CaP. • Asociado a metástasis y recurrencia. • No es específico de CaP y es una prueba invasiva. 	(Rubin et al., 2002).
Células tumorales circulantes (CTC's) y exosomas	<ul style="list-style-type: none"> • Son considerados una fuente de detección de los biomarcadores antes mencionados. 	(Danila et al., 2007; Nilsson et al., 2009).

3.4 Manejo clínico de la enfermedad

Usando las técnicas de diagnóstico descritas anteriormente se puede realizar una clasificación sobre el estado del tumor de CaP. La clasificación puede ir desde un estado I a un estado IV, estos números romanos en forma ascendente son un indicador del grado de severidad del tumor (**Figura 10**). Las células cancerosas comienzan a crecer en la próstata para después expandirse hacia nódulos linfáticos

y órganos adyacentes al tumor. Dependiendo del estado del tumor de CaP, se indicará un tipo de terapia que podría ser más conveniente para el paciente.

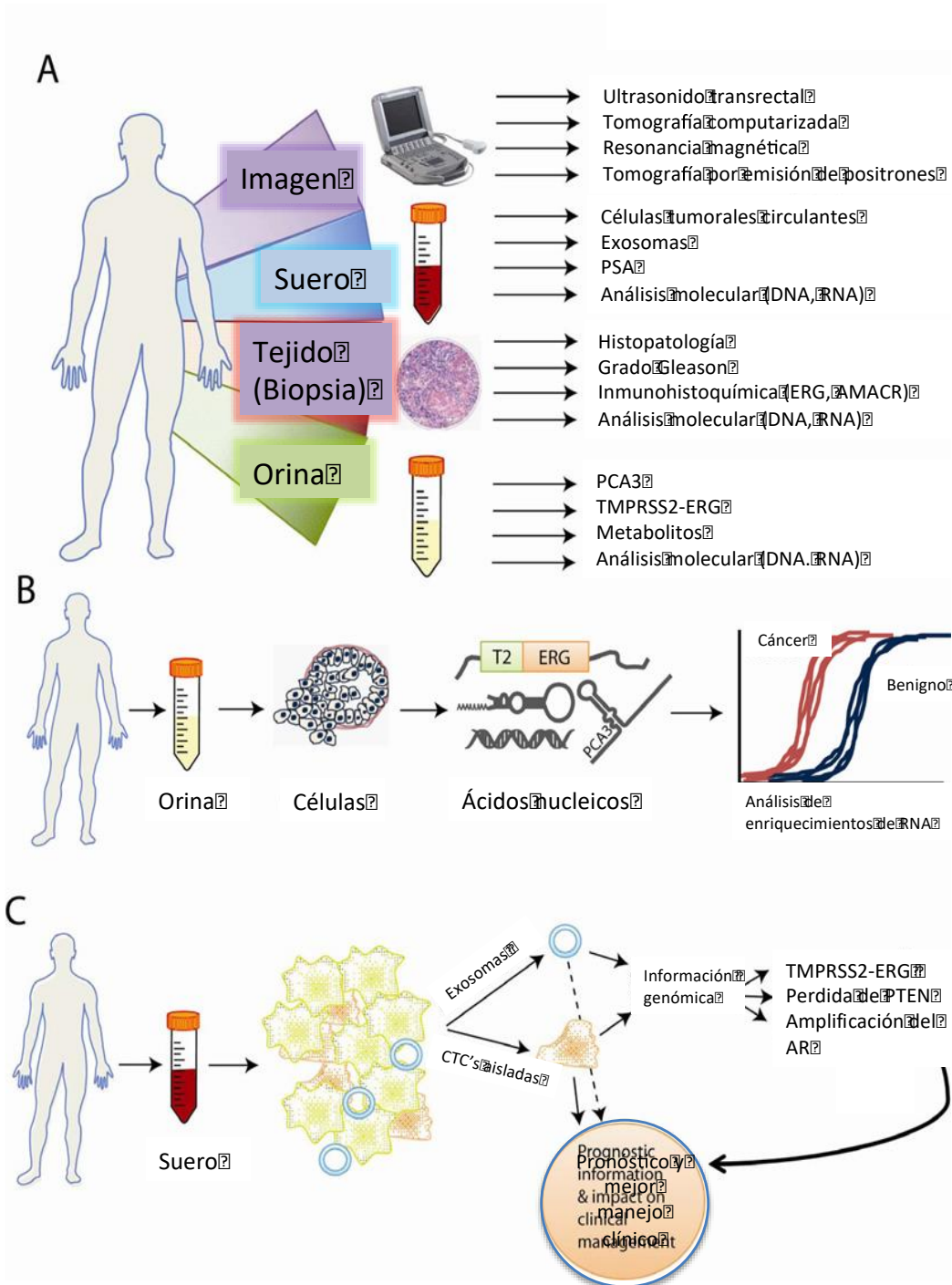


Figura 9. Técnicas de diagnóstico del CaP. Imagen modificada de Prensner *et al.*, (2012). La figura A muestra los métodos de diagnóstico convencionales del CaP. La figura B muestra nuevos métodos que involucran el transcriptoma y el proteoma de las células de CaP. La figura C muestra métodos de diagnóstico en estudio que involucran células tumorales circulantes.

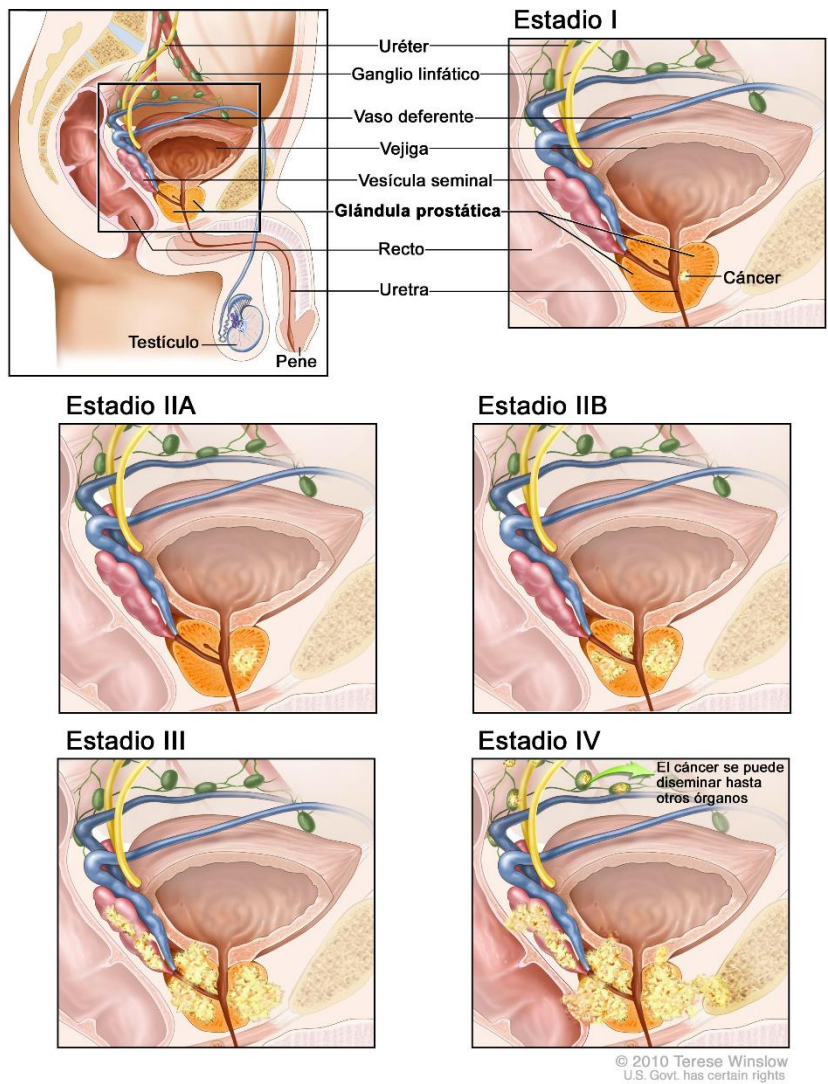


Figura 10. Estados de severidad de un tumor de CaP (I-IV). Imagen tomada de Winslow *et al.*, (2010). Se muestran los diferentes estados por los que puede pasar un tumor de CaP. Los números romanos en forma ascendente son un indicador del grado de severidad del tumor.

3.4.1 Cirugía

Cuando el tumor de CaP se encuentra localizado y el paciente presenta buena salud, el paciente podría ser candidato a una cirugía de resección prostática. Se debe tomar en cuenta que la cirugía puede traer algunos problemas de salud. En

algunos casos, el paciente podría experimentar algún grado de disfunción sexual, fuga de la orina por las heces y hernia inguinal. En la **Tabla 2** se resumen los diferentes tipos de cirugía más frecuentes realizadas en pacientes con CaP (Bill-Axelsson et al., 2014).

Tabla 2. Tipos de cirugía en CaP

TIPO DE CIRUGÍA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Prostatectomía radical	Remueve la próstata, tejidos circundantes y vesículas seminales. Existen dos tipos de prostatectomía: 1) retropúbica y 2) perineal (Figura 10).	Bill-Axelsson <i>et al.</i> , (2014).
Linfadenectomía pélvica	Remueve los nódulos linfáticos de la zona pélvica.	(Link & Morton, 2001)
Resección trans-uretral de la próstata	Procedimiento realizado a través de la próstata para tratar el HPB y los síntomas provocados por el CaP (Figura 10).	(R. D. Smith & Patel, 2011)

3.4.2 Terapia hormonal

Cuando los pacientes de CaP no son candidatos a cirugía porque el tumor no se encuentra localizado, el tratamiento de primera elección es el bloqueo androgénico. Este tratamiento bloquea la acción de los andrógenos interrumpiendo así el crecimiento de las células prostáticas cancerosas. En la **Figura 11** se muestra un esquema general de la producción y la acción de los andrógenos en condiciones normales (Denmeade & Isaacs, 2002). Es importante resaltar que el bloqueo de los andrógenos puede llevarse a cabo a diferentes niveles, que involucran desde la síntesis hasta el bloqueo de los receptores como el AR (**Tabla 3**). En la **Tabla 4** se resumen aquellos fármacos comerciales comúnmente utilizados en la terapia de boqueo hormonal del CaP.

3.4.3 Quimioterapia

Cuando la terapia hormonal fracasa se recurre a la quimioterapia; sin embargo, hay que tomar en cuenta que ambos tipos de terapia podrían indicarse al mismo tiempo. Algunos de los fármacos quimioterapéuticos más utilizados en CaP son la vinblastina, paclitaxel y docetaxel (D. C. Smith & Pienta, 1999). Dentro de la quimioterapia existen otras terapias que están diseñadas para fortalecer el sistema inmune y reducir el daño en huesos producido por la metástasis. Sin embargo, a la par de estas terapias, se pueden realizar procedimientos quirúrgicos como la criocirugía o la radiación por protones (Suzman & Antonarakis, 2014).

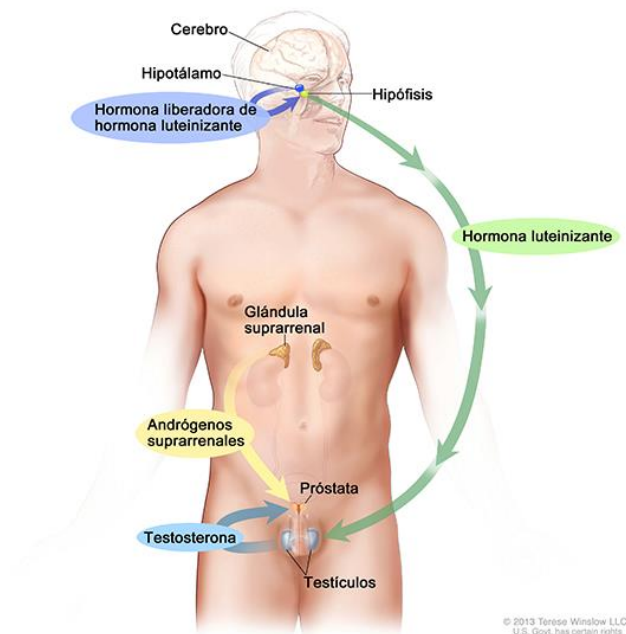


Figura 11. Esquema general de la producción y acción de los andrógenos. Imagen tomada de Winslow, 2013. El esquema muestra la red de señalización “hipotálamo-gónadas-próstata” en la producción y destino de los andrógenos en el cuerpo humano.

Tabla 3. Tipos de terapia en CaP

TERAPIA	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
Agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante	Detienen la producción de testosterona en los testículos. Fármacos: Leuprolida, Goserelina y Buserelina.	(Lepor & Shore, 2012)
Anti-andrógenos	Bloquean la acción de los andrógenos. Fármacos: Flutamida, Bicalutamida, Enzalutamida y Nilutamida.	(Y. Chen et al., 2009)
Orquiectomía	Procedimiento quirúrgico para remover uno u ambos testículos.	(Crawford, 2004)
Estrógenos.	Pueden evitar la producción de la testosterona en los testículos; sin embargo, algunos estudios sugieren que podrían activar de nuevo a la señalización androgénica.	(Nelles et al., 2011)

Tabla 4. Fármacos comerciales indicados en la terapia hormonal del CaP

FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIA
Leuprolida (Eligard®, Lupron Depot®, y Viadur®).	Agonista de la hormona LHRH	(Lepor & Shore, 2012)
Goserelina (Zoladex®)	Agonista de la hormona LHRH	(Wilson, 2009)
Triptorelin (Trelstar®)	Agonista de la hormona LHRH	(Ploussard & Mongiat-Artus, 2013)
Degarelix (Firmagon®)	Antagonista de la hormona LHRH	(Carter & Keam, 2014)
Bicalutamida (Casodex®), flutamida (Eulexin®), y nilutamida (Nilandron®)	Antagonista del AR. Inhibe la acción de la hormona DHT.	(Dole & Holdsworth, 1997)

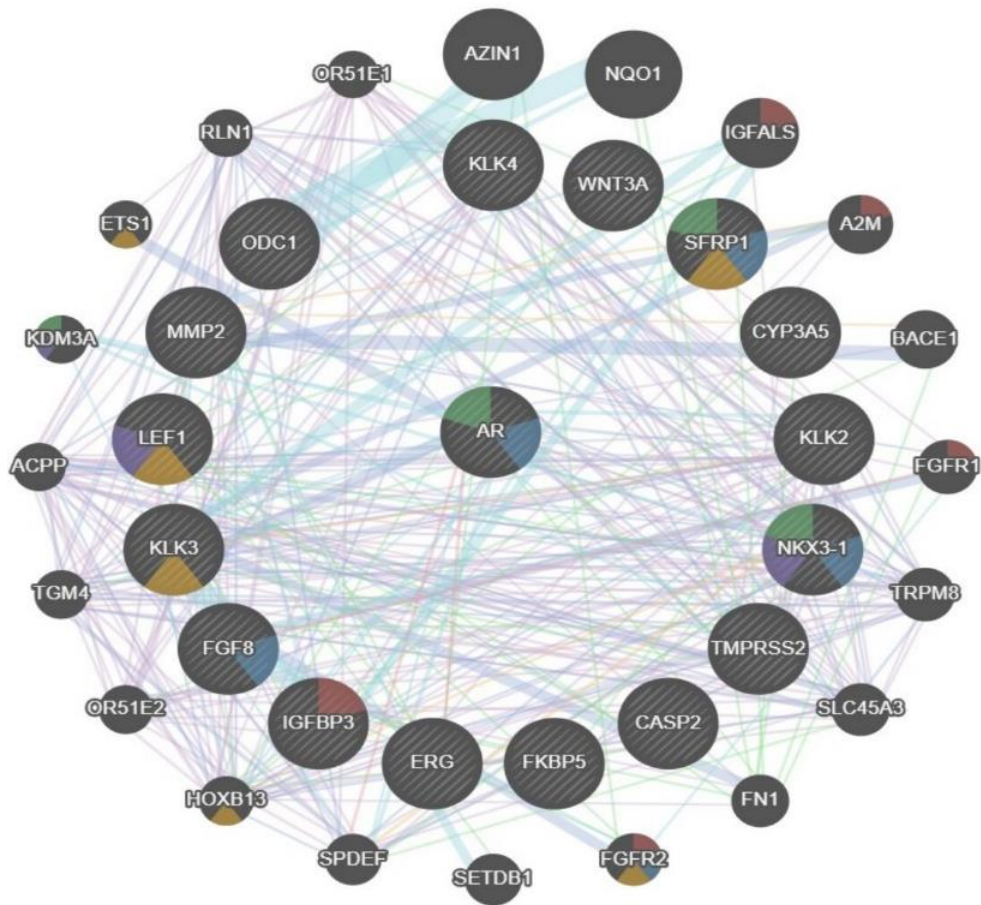
4. Vías de señalización asociadas a CaP

En CaP se han descrito vías de señalización que se encuentran alteradas, y muchas de ellas interactúan en algún punto con la señalización de los andrógenos. La vía de señalización de los andrógenos desempeña un papel importante en CaP; sin embargo, otras vías de señalización también están relacionadas con la progresión de la enfermedad. Algunas de dichas vías de señalización tienen una fuerte interacción con la vía androgénica, por ejemplo, la vía de señalización de los receptores para factores de crecimiento; la señalización MAPK; y la vía de señalización WNT (**Tabla 5**). El presente trabajo se enfoca en la vía de señalización WNT, esta señalización comprende una compleja red de proteínas que participan en la progresión del CaP (Kaarbø et al., 2007). En la **Figura 12** se muestra una red de señalización con los 25 genes que más interactúan con el AR.

Tabla 5. Proteínas que interactúan con el AR

PROTEÍNA	FUNCIÓN	REFERENCIA
CASPASA-2	Regulador apoptótico.	(Taghiyev et al., 2011)
CDK1NA	Inhibidor de cinasas dependiente de ciclina.	(Kim et al., 2015)
c-FLIP	Inhibidor de apoptosis mediado por Fas/FasL.	(McCourt et al., 2012)
CYP3A5	Metaboliza a la testosterona hacia una forma inactiva.	(Mitra & Goodman, 2015)
FGF-8	Factor de crecimiento involucrado en carcinogénesis.	(Gnanapragasam et al., 2002)
FKBP51	Proteína chaperona del receptor esteroideo.	(L. Ni et al., 2010)
IGFBP-3	Inhibe el crecimiento celular e induce apoptosis.	(Kojima et al., 2006)
KLK2	Potencial marcador en CaP.	(Dong et al., 2005)

KLK3	Involucrado en la licuefacción del semen.	(Lai et al., 2007)
KLK4	Involucrado en la proliferación, invasión y metástasis celular.	(Jin et al., 2013)
MMP-2	Involucrado en la progresión del CaP.	(Liao et al., 2003)
NEP	Metalopeptidasa de la superficie celular mediada por Zinc.	(Akita et al., 2013)
NKX3.1	Regulador de crecimiento epitelial y de diferenciación prostática.	(Tan et al., 2012)
ODC	Catalizador en la síntesis de poliaminas.	(Visvanathan et al., 2004)
PAP	Antígeno tumoral de CaP.	(Hsieh et al., 1996)
STAMP2	Involucrado en proliferación celular y obesidad.	(Korkmaz et al., 2005)
TMPRSS2-ERG	Proteína quimérica producto de la fusión de genes en CaP.	(Yu et al., 2010)



RED

- Co-expresión ■
- Asociación de vías ■
- Co-localización ■
- Interacción física ■
- Interacción genética ■

FUNCIONES

- Unión a factores de crecimiento ■
- Desarrollo del sistema reproductivo ■
- Angiogénesis ■
- Señalización regulada por hormonas ■
- Señalización intracelular de receptores hormonales esteroideos ■

Figura 12. Red de genes que interactúan con el AR. Se muestran las líneas de interacción entre genes y las funciones biológicas de cada gen dentro de la red. *La red se construyó usando la plataforma genmania.org*

4.1 Vía de señalización WNT

La vía de señalización WNT fue descrita por el Dr. Nusse cuando trabajaba con genes del virus tumoral mamario en ratones (Nusse & Varmus, 1982). Posteriormente, la vía WNT fue dividida en dos rutas: 1) ruta WNT canónica (dependiente de β -catenina), y 2) ruta WNT no canónica (dependiente de cinasas y WNT/Ca²⁺).

4.1.1 Vía de señalización WNT

La vía WNT canónica se describió por primera vez con el gen *int-1*, denominado más tarde *Wnt1*, porque su alteración se encuentra involucrada con la mutante sin alas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (*Wingless type, inglés*) (Nusse y Varmus, 1982). Los estudios realizados en ese momento indicaron que el regulador clave en esta vía de señalización era la proteína β -catenina. En condiciones normales, la proteína β -catenina ayuda a mantener el contacto célula-célula; pero en cáncer, al acumularse en el citoplasma y después translocarse la β -catenina al núcleo, promueve la expresión de algunos oncogenes como c-myc (Willert & Nusse, 1998). En condiciones normales existe un equilibrio entre la cantidad de β -catenina presente en el citoplasma y la cantidad de β -catenina que se transloca al núcleo. Sin embargo, la activación aberrante de esta vía de señalización altera este equilibrio de β -catenina promoviendo su concentración en el citoplasma y posteriormente su translocación hacia el núcleo celular. La señalización WNT comienza en la matriz extracelular con la unión de las proteínas WNT a los receptores Frizzled, los cuales se encuentran en la membrana celular. Esta unión provoca el reclutamiento de un complejo proteínico llamado Axina-APC, el cual inhibe la degradación de la β -catenina. En el núcleo, β -catenina se une a factores de transcripción de la familia TCF/LEF1 promoviendo la expresión del oncogen c-myc (Kikuchi, 2000). En la **Figura 13** muestra un esquema de la vía de señalización WNT/ β -catenina cuando se activa y cuando se apagada o se encuentra a la baja.

Dentro de la señalización WNT, las proteínas WNT pertenecen a una familia de 19 proteínas altamente conservadas en mamíferos, dichas proteínas tienen un dominio N-terminal rico en cisteína que comprende una extensión de 350 a 400 aminoácidos. Las proteínas WNT forman un complejo con los receptores *Frizzled* (FZD) y los receptores LRP5/6, activando así la vía de señalización (McDonald *et al.*, 2010). Los receptores FZD son receptores transmembranales de siete dominios que comprenden diez miembros en mamíferos y se asocian a los receptores LRP5/6 para activar la señalización WNT (Binnerts *et al.*, 2007).

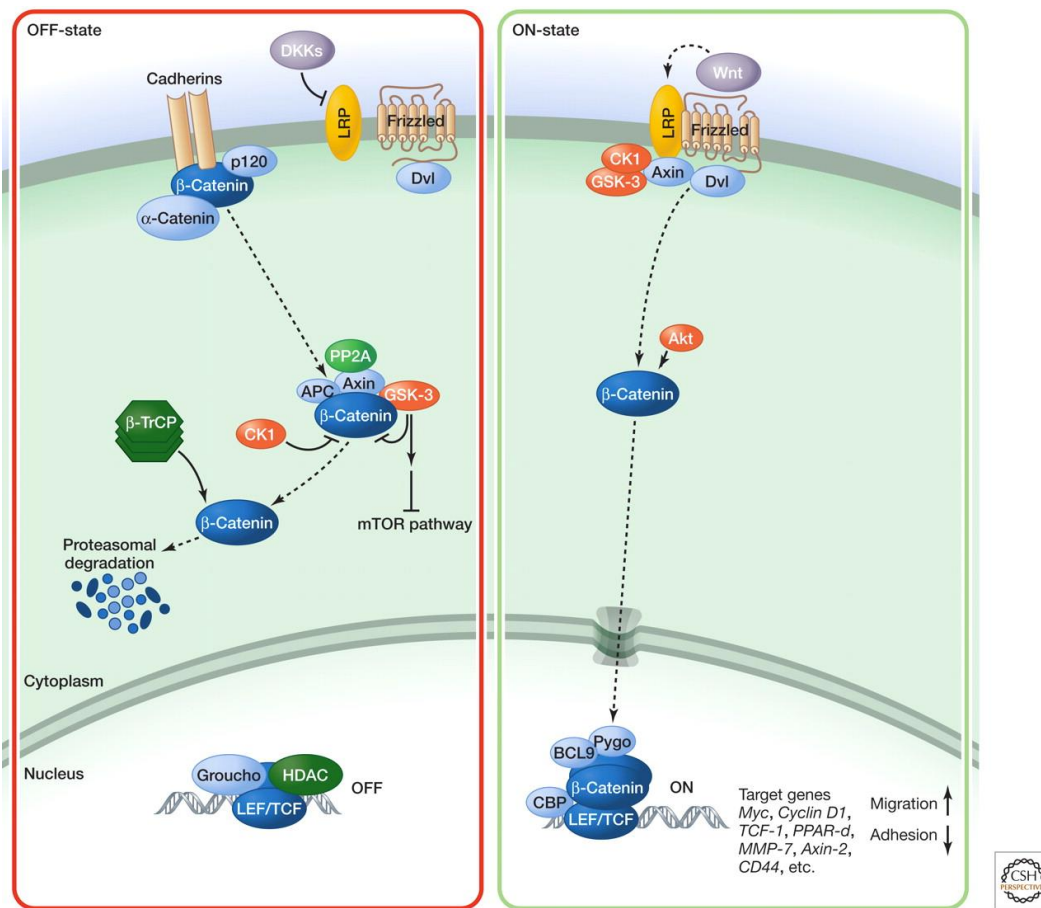


Figura 13. Vía de señalización WNT activa/apagada. Imagen tomada de Nusse, 2012. La figura de la izquierda es una ilustración de la vía WNT apagada. La figura de la derecha muestra una ilustración de la vía WNT activa.

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

Tabla 6. Proteínas de la vía WNT

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

La vía de señalización WNT no canónica, comprende dos posibles rutas: 1) ruta mediada por cinasas y 2) ruta dependiente de Ca^{2+} . Dentro de la vía de señalización WNT no canónica, se encuentra la vía de “Polaridad Celular Planar”. En esta vía de señalización, la activación de los receptores FZD desencadena una señalización en cadena que involucra a los genes de la familia de las GTPasas: RAC1, Ras, RHOA y JNK. La **Tabla 7** describe algunas de las proteínas involucradas en este tipo de señalización (Gómez-Orte et al., 2013). En la vía de señalización WNT no canónica que involucra la liberación de Ca^{2+} intracelular (Kühl et al., 2000), se ha demostrado que existe una inter-conexión entre esta vía con la vía WNT de polaridad celular

planar mediada por la proteína Dvl. La **Figura 14** muestra algunas de las principales proteínas involucradas en la vía WNT dependiente de Ca^{2+} (Veeman et al., 2003).

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

PROTEÍNA	FUNCIÓN	REFERENCIA
RAC1	Regulación del citoesqueleto.	(Lindqvist et al., 2010).
Ras	Involucrada en procesos de migración celular.	(Mayor & Theveneau, 2014)
RHOA	Actúa en la señalización de WNT5 y WNT11.	(Zhu et al., 2006)
JNK	Coopera con GSK3 para regular a la proteína Dvl.	(Ciani & Salinas, 2007)

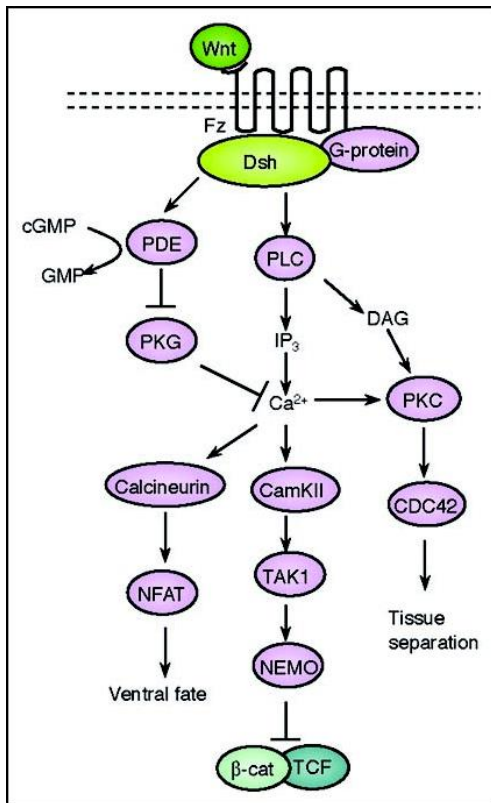


Figura 14. Vía de señalización WNT/ Ca^{2+} . Imagen tomada de (Komiya & Habas, 2008). En esta figura se esquematiza la liberación de Ca^{2+} dentro de la vía WNT no canónica.

4.1.2 Antagonistas de la vía WNT

Para fines de este trabajo se abordará con un poco de más detalle las características de la familia de proteínas SFRP's, las cuales son consideradas antagonistas de esta vía de señalización (MacDonald et al., 2009). Las proteínas "SFRP's" (Secreted Frizzled Related Protein, por sus siglas en inglés), son un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente al receptor transmembranal *Frizzled* (FZD). Actualmente se conocen 5 tipos diferentes de proteínas SFRP que canónicamente funcionan como antagonistas de la vía de señalización WNT. Algunas de las proteínas SFRP presentan actividad supresora de tumor en ciertos tipos de cáncer. De manera canónica, se ha propuesto que las proteínas SFRP's antagonizan a la vía de señalización WNT, ya sea uniéndose a proteínas WNT o uniéndose directamente con los receptores FZD (Yoshiaki Kawano & Kypta, 2003). En CaP, particularmente la proteína SFRP1, se sabe que puede regular negativamente la actividad transcripcional del AR (Kawano *et al.*, 2009). Por otro lado, sin embargo, se ha reportado que el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* podría activar a la vía de señalización WNT. Esto último sucede porque ERG es un factor de transcripción que se une a la región promotora de algunos genes de la vía WNT promoviendo la expresión por ejemplo de proteínas como WNT3a y LEF-1 (L. Wu et al., 2013). Existen diferentes tipos de moléculas que pueden antagonizar a la vía de señalización WNT, estas moléculas antagonistas se dividen en dos grupos principales: 1) proteínas secretadas y 2) proteínas relacionadas al receptor *frizzled* (**Tabla 8**). Además de las proteínas SFRP's, otras proteínas antagonistas de la vía WNT son las proteínas WIF-1 y las proteínas Cerberus, las cuales ejercen su acción antagónica uniéndose ya sea a las proteínas WNT, a los receptores FZD y/o a los receptores de Colipase o receptores Ryk (Kawano y Kypta, 2003) (**Figura 15**).

Tabla 8. Algunos antagonistas de la vía de señalización WNT

PROTEÍNA	ACCIÓN	REFERENCIA
SFRP's	Inhiben la proliferación celular.	(Lavergne et al., 2011)
Dickkopf	Interaccionan con LRP6/Arrow para inhibir a la vía WNT.	(Bafico et al., 2001)
Cerberus	Antagonizan a la vía WNT mediante factores de crecimiento como Activin, Nodal y BMP.	(Cruciat & Niehrs, 2013)
WIF-1	Puede antagonizar a la vía WNT uniéndose a proteínas WNT.	(Ramachandran et al., 2014)

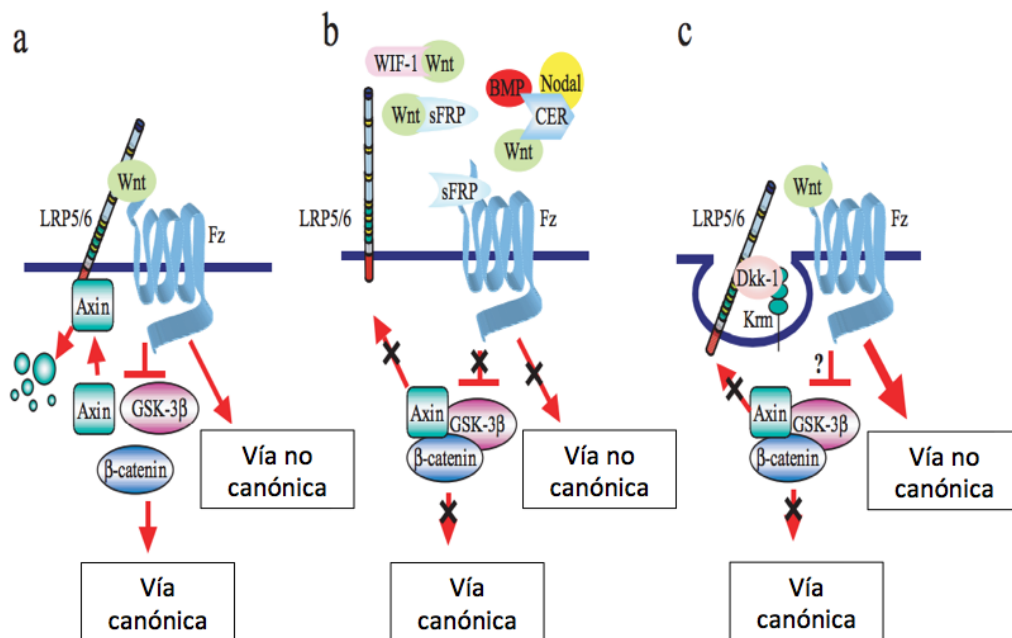


Figura 15. Diferentes tipos de antagonismo en la vía de señalización WNT. Imagen modificada de Kawano y Kypta, 2003. La figura A muestra la activación tradicional de la vía WNT por proteínas WNT. La figura B muestra el antagonismo ejercido sobre la vía WNT por proteínas secretadas como WIF-1 y SFRP's. La figura C muestra el antagonismo sobre la vía WNT por la proteína Dkk-1.

Las proteínas SFRP's fueron los primeros antagonistas descritos dentro de la vía de señalización WNT. Estas proteínas comparten homología estructural con los receptores FZD en su dominio rico en cisteína (CRD, por sus siglas en inglés), el cual se encuentra en el N-terminal de las proteínas WNT y de los receptores FZD (Yoshiaki Kawano & Kypta, 2003; Melkonyan et al., 1997) (**Figura 16**). Las proteínas

SFRP's son secretadas al espacio extracelular donde ejercen su función antagonica. Se ha reportado que su efecto podría depender incluso de un gradiente de concentración, esto quiere decir que dependiendo de la cantidad de SFRP's en la matriz extracelular se observaría ya sea un efecto activador o represor sobre la vía WNT (Uren et al., 2000).

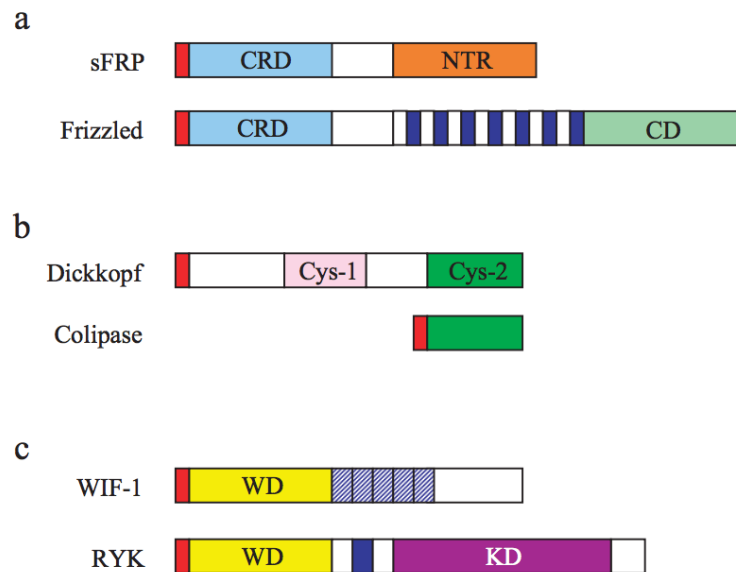


Figura 16. Homología estructural entre las proteínas antagonistas y los receptores de la vía WNT. Imagen tomada de Kawano y Kypta, 2003. Las figuras A, B y C esquematizan la homología estructural que existe entre los antagonistas SFRP's, Dickkopf y WIF-1 con sus respectivos receptores.

En cáncer, muchos estudios han señalado que existe una expresión a la baja de las proteínas que antagonizan a la vía WNT; sin embargo, hay resultados contradictorios (Bovolenta et al., 2008; Surana et al., 2014). Por ejemplo, se ha sugerido que las proteínas SFRP's desempeñan un papel supresor de tumor. Particularmente SFRP1, una proteína que se encuentra sub-expresada (expresión a la baja) en muchos de los tejidos y células de CaP, regula negativamente la actividad transcripcional del AR y disminuye la formación de colonias celulares de las células LNCaP y 22Rv1 (Y. Kawano et al., 2009; Lodygin et al., 2005). Sin embargo en otros trabajos, se ha reportado que SFRP1 participa en la comunicación estroma-epitelio promoviendo la progresión del CaP hacia un estado más avanzado (Joesting, Perrin, Elenbaas, Fawell, et al., 2005).

4.1.3 SFRP1 en CaP

La proteína SFRP1 ejerce un efecto que disminuye el crecimiento de células de CaP; sin embargo, dicho efecto no parece involucrar a las vías de señalización WNT clásicas. Kypta y col. (2009) reportaron que la sobre-expresión de SFRP1 en líneas celulares de CaP disminuye la actividad transcripcional del AR. En dicho trabajo se sugiere que el mecanismo de acción de SFRP1 podría estar mediado por la asociación de SFRP1 sobre receptores de la familia Ror 1 y 2 (Kawano *et al.*, 2009). Sin embargo de manera contradictoria, Joesting y col. (2005) mostraron que existe una comunicación estroma-epitelio entre células de CaP donde SFRP1 participa promoviendo la progresión del CaP (Joesting, Perrin, Elenbaas, Fawell, et al., 2005). A pesar de estos reportes, recientemente se ha reforzado la hipótesis de que SFRP1 es un supresor tumoral en CaP (Baharudin et al., 2020). Acompañado con esto, previamente se publicó un estudio que reportó que el tratamiento con genisteína desregula la expresión del miR-1260b, aumentando la expresión de SFRP1 en células de CaP, este efecto disminuyó las características neoplásicas de las células de CaP (Hirata et al., 2014). Aunado a esto, SFRP1 ha sido propuesto como un posible biomarcador en el diagnóstico y el pronóstico del CaP (García-Tobilla et al., 2016; Zheng et al., 2015a).

5. Alteraciones genómicas en CaP

Alteraciones pueden contribuir a la aparición y a la progresión del CaP, dichas alteraciones involucran factores hereditarios, factores genéticos, factores relacionados con la edad y alteraciones genómicas cromosomales. En este último caso, las células de cáncer suelen presentar una proliferación excesiva, como consecuencia de la aparición de errores cromosomales que conllevan a duplicaciones, deleciones y fusión de genes (Berger et al., 2011).

5.1 Estroma-Epitelio

En cáncer existe una red de apoyo proporcionada por el estroma, la cual es indispensable para promover características neoplásicas como la invasión, el

crecimiento celular y la metástasis. De acuerdo con las últimas investigaciones es evidente que existe un microambiente inflamatorio que contribuye a la progresión del tumor. Dentro de la progresión tumoral, en la invasión celular se dan cambios moleculares que alteran la adherencia de las células tumorales en la matriz extracelular (ECM). En la invasión celular se lleva a cabo una degradación proteolítica del estroma circundante en conjunto con la motilidad para impulsar a la célula tumoral a través del estroma. Para que el proceso invasivo ocurra, se dan cambios en la expresión de las cadherinas de las células tumorales, por ejemplo, disminuye la expresión de E-cadherina, la cual es importante en la adhesión celular. Por otro lado, aumenta la expresión en la N-cadherina, proteína que normalmente se expresa en las células mesenquimales (Furue, 2011).

En CaP, se ha reportado la existencia de una importante comunicación estroma-epitelio, en la cual participan proteínas que se secretan hacia el espacio extracelular provenientes ya sea del estroma hacia el epitelio o del epitelio hacia el estroma. Los principales tipos celulares en el estroma prostático son los fibroblastos, los miofibroblastos y las células musculares lisas (Niu & Xia, 2009). Estas células estromales secretan factores de crecimiento, producen matriz extracelular secretora y también expresan el AR, el receptor de estrógenos, el receptor adrenérgico y la enzima 5- α reductasa (Berry et al., 2008). El AR del estroma, podría tener un papel más importante que el AR de las células tumorales epiteliales. El AR estromal activo afecta a los miofibroblastos estromales a través de los cuales promueve la progresión del CaP y la señalización está presente incluso en los tumores resistentes a andrógenos (Adisetiyo et al., 2014). La expresión autocrina de EGF (Factor de crecimiento epidermal, en español) y TGF- α (Factor de crecimiento transformante, en español) altera el crecimiento celular en CaP. EGF juega un papel importante en la estimulación de la invasión celular del CaP al promover la quimio-migración de las células tumorales. En este proceso, se ha observado que los oncogenes HER-2 / neu, HER-3 y HER-4 se encuentran relacionados con la familia EGFR y además, se expresan diferencialmente en CaP (Krušlin et al., 2015). En cuanto a la señalización WNT, la sobreexpresión de SFRP1 por el estroma tumoral

prostático ha sido estudiada, y se ha observado que la proteína SFRP1 del estroma tumoral prostático proporciona una señal paracrina que aumenta la proliferación de las células epiteliales adyacentes (Joesting, Perrin, Elenbaas, Fawell, et al., 2005). SFRP1 es una proteína que parece tener una relación importante con la señalización de los andrógenos en CaP al igual que *KLK3* o el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*. *TMPRSS2-ERG* se ha encontrado asociado con todos estos factores y con la expresión estromal elevada de PDGFR β y hialuronano; esto se ha observado tanto en el estroma tumoral como en el estroma del tejido no maligno circundante. Estos resultados en conjunto, indican que la presencia de re-arreglos cromosomales como el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* podría estar relacionada con los fenotipos que tienen un mal pronóstico en CaP (Hägglöf et al., 2014).

5.2 Re-arreglos cromosomales (gen de fusión)

En cáncer, los re-arreglos cromosomales tienen como consecuencia principal la aparición de genes de fusión, los cuales son muy frecuentes en algunos tipos de cáncer como leucemias y sarcomas. El porcentaje estimado de estas fusiones en leucemia es muy alto, en contraste, en tumores sólidos las fusiones de genes suelen encontrarse solo en un 15 a un 20% de los casos (Mitelman et al., 2007). En CaP, existe una alta probabilidad de encontrar genes de fusión, principalmente se han reportado fusiones de genes que involucran a factores de transcripción de la familia ETS (E-26 virus Transformation Specific, inglés) (Hessels & Schalken, 2013). La familia de los factores de transcripción ETS comprende a 27 miembros donde la fusión *TMPRSS2-ERG* es la más reportada en CaP (Tomlins et al., 2005).

5.2.1 Fusión *TMPRSS2-ERG* en CaP

La fusión *TMPRSS2-ERG* es un evento común en CaP, se ha reportado en aproximadamente el 50 % de los tumores estudiados de CaP. Esta fusión se forma por una escisión de doble cadena en el DNA que tiene como consecuencia la unión del gen *TMPRSS2* con el gen *ERG*. La proteína ERG en la fusión *TMPRSS2-ERG*,

es una proteína trunca o incompleta pero funcional y con actividad de factor de transcripción (**Figura 17**) (Burdova et al., 2014). La proteína ERG (*ETS Related Gene*, por sus siglas en inglés) proveniente de la fusión TMPRSS2-ERG, tiene actividad de factor de transcripción. En condiciones normales, ERG se expresa en el endotelio y el mesodermo embrionario donde tiene un papel importante en el desarrollo del sistema vascular, el tracto urogenital y el sistema óseo (Birdsey et al., 2008).

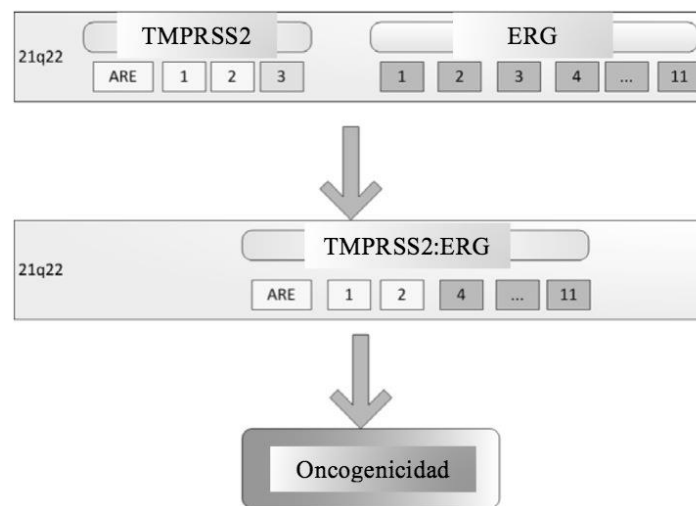


Figura 17. Fusión TMPRSS2-ERG. Imagen modificada de McGarty, 2014. Se ilustra como se fusionan los genes *TMPRSS2* y *ERG* dando como resultado un producto proteínico trunco pero funcional.

La proteína ERG tiene una extensión de 486 aminoácidos y pesa 56 KDa (Rao et al., 1987). Posee un dominio de reconocimiento a DNA que enlaza a secuencias del tipo GGA (A/T) (Shore et al., 1996). Se han realizado diferentes clasificaciones de los factores de transcripción ETS de acuerdo con su similitud de secuencia en el dominio de DNA en los genes a los que se unen. En este tipo de clasificaciones, la proteína ERG pertenece a la clase I, donde se encuentran otros factores de transcripción como los factores ETS 1 y 2, ETV 1 a 5, ELK 1, 3 y 4, ERF, FEV, FLI 1 y GABP α (Wei et al., 2010). En CaP, la expresión elevada de ERG está relacionada con la respuesta a andrógenos, ya que la fusión TMPRSS2-ERG tiene

el promotor del gen que codifica para la proteína *TMPRSS2* (*Transmembranal Protein Serin type 2*) y el cual cuenta con secuencias ARE's. *ERG* ha sido una proteína relacionada con la progresión de la neoplasia prostática intraepitelial hacia CaP (Carver et al., 2011). La expresión elevada de *ERG* también se asocia con el proceso EMT, la cual ocurre durante el desarrollo embrionario normal, la regeneración de tejidos, la fibrosis de órganos y la cicatrización de heridas. Sin embargo, el proceso EMT también participa en la progresión tumoral con expansión metastásica (Nieto et al., 2016). En algunos tumores de CaP, la sobreexpresión de *ERG* promueve el proceso EMT modificando la adhesión celular, y promoviendo la migración y la invasión celular (Leshem et al., 2011). En la **Figura 18** se muestra un esquema sobre la relación que existe entre la fusión de *TMPRSS2-ERG* y la progresión del CaP así como la dependencia por la supresión de *AKT* en la progresión tumoral (Squire, 2009).

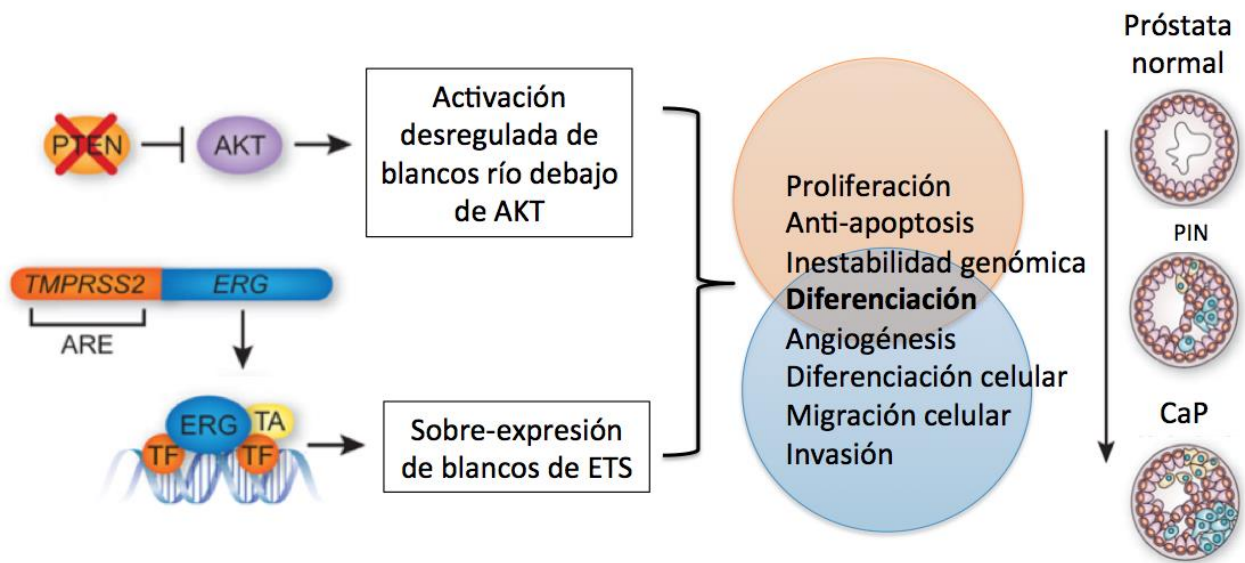


Figura 18. Relación de la fusión *TMPRSS2-ERG* en la progresión del CaP. Imagen modificada de Squire, 2009. Se muestra una ilustración de la asociación que existe entre la pérdida de *PTEN* y la expresión elevada de *ERG* con el aumento de las características neoplásicas de las células de CaP.

Se han estudiado los mecanismos moleculares por los cuales la fusión *TMPRSS2-ERG* promueve la progresión del CaP; *ERG* ejerce una acción de activación sobre

la vía de señalización WNT/LEF1 (L. Wu et al., 2013). Dicha activación involucra la expresión elevada de los genes *LEF1* y *FZD4* en CaP (Gupta et al., 2010). Por otro lado, claramente existe una asociación entre la fusión *TMPRSS2-ERG* y la vía de señalización androgénica en CaP. ERG interacciona directamente con el promotor del gen que codifica para el AR y promueve la expresión de genes que son responsivos a andrógenos (Yu et al., 2010). En este sentido, se ha buscado la manera de inhibir esta red de señalización, lo que se ha indagado usando fármacos que antagonizan con la actividad transcripcional del AR pero con resultados no concluyentes aún (Li et al., 2011).

6. Terapias dirigidas en CaP

El desarrollo de nuevas terapias farmacológicas ha sido un reto en CaP, si bien existen fármacos que son específicos del AR, la enfermedad en más del 80 % de los casos evoluciona hacia un estado en el cual el CaP ya no necesita completamente de los andrógenos. En años recientes, el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* ha despertado cada vez más interés por parte de los investigadores, quienes exploran la posibilidad de utilizarlo como un blanco molecular para el desarrollo de nuevos fármacos que sirvan para el tratamiento de este tipo de CaP (Neves et al., 2017). Como se mencionó arriba, *TMPRSS2-ERG* se expresa en aproximadamente el 50 % de los tumores de CaP y participa en eventos de migración celular y de transición epitelio-mesénquima (EMT) (Tomlins et al., 2005). Las nuevas estrategias farmacológicas que buscan regular o abatir la expresión de *TMPRSS2-ERG* se han enfocado principalmente en disminuir su expresión a través de la modulación de la actividad transcripcional del AR. Este enfoque se fundamenta en que *TMPRSS2* tiene elementos ARE's en su secuencia de DNA y su expresión puede ser modulada por la activación del AR. Si bien este enfoque tendría la ventaja de usar los fármacos que actualmente se administran en el tratamiento del CaP, dichos fármacos no han sido totalmente efectivos para curar la enfermedad, y las células cancerosas progresan hacia un estado de resistencia a la castración química (Graff et al., 2015).

Por estas razones, en cuanto al tratamiento farmacológico del CaP, han sido exploradas nuevas terapias moleculares que buscan abatir la expresión de genes y buscan que los fármacos tengan un reconocimiento de tipo célula-específico. Esto se ha logrado en la investigación básica mediante el uso de RNA's de silenciamiento, transfecciones estables o silenciamientos estables con agentes virales no patógenos (Dassie et al., 2014). Estas técnicas todavía no han podido implementarse con éxito en todos los ensayos clínicos debido a que no presentan mucha especificidad y en muchos de los casos pueden despertar una respuesta inmune exagerada. Actualmente, las herramientas terapéuticas más innovadoras son los vectores a base de liposomas, anticuerpos monoclonales, partículas virales y recientemente los aptámeros. Estos últimos han despertado gran interés científico, sin embargo, se siguen investigando para demostrar que los aptámeros pueden ser “los fármacos del futuro”.

6.1 Anticuerpos en CaP

En CaP, los factores de crecimiento, mediadores de la angiogénesis, señales del microambiente óseo y las vías de evasión al sistema inmune, se han convertido en áreas de investigación para el uso terapéutico de anticuerpos monoclonales (mAb's, en inglés). En CaP, el mayor éxito hasta ahora es el desarrollo de mAb's contra el antígeno de membrana PSMA, lo que ha ayudado a mejorar el diagnóstico y mejorar el tratamiento de la metástasis. Es posible que la combinación de mAb's acoplados o en combinación con otros tratamientos mejore las respuestas y la supervivencia del paciente (Vlachostergios et al., 2017). Los mAb's se unen a receptores específicos para producir una respuesta terapéutica de las siguientes maneras: a) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), b) bloqueo de la señalización de activación del receptor al que se unen (terapia dirigida), c) mejoran la respuesta inmune antitumoral alterando la producción de citocinas (inmunoterapia), y d) señalización molecular que conduce a la muerte celular (Redman et al., 2015). Algunos de los anticuerpos más usados en la investigación y en la clínica para tratar el CaP se resumen en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Anticuerpos en CaP

mAb	MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIA
Indium-111 Capromab Pendetide (ProstaScint)	Anti-PSMA. Mejora la imagen para la detección de metástasis local y distante.	(Petronis et al., 1998)
PSMA- ADC	Conjugado de fármaco-anti PSMA. Induce citotoxicidad en células de CaP.	(Niaz et al., 2020)
PSCA, AGS-PSCA	mAb dirigido contra el antígeno de células madre en CaP.	(M. J. Morris et al., 2012)
STEAP-1	mAb contra el antígeno epitelial humano de seis pasos transmembranales en próstata.	(Kleven et al., 2015)
Vacuna Sipuleucel-T (Provenge)	Estimula el sistema inmune e induce muerte celular en CaP resistente a la castración.	(Gardner et al., 2012)
Ipilimumab	mAb que se une a la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) evitando la inhibición de la respuesta inmune.	(Alaia et al., 2018)
Nivolumab	mAb que se une a la proteína PD-1 en células T, y evita el bloqueo de la respuesta inmune en el sistema PD-1/PDL-1	(Picardo & Hansen, 2019)
Urelumab	Estimula co-receptores de linfocitos T como el antígeno CD-173.	(Chu et al., 2019)
Bevacizumab	mAb que se une al factor de crecimiento endotelial vascular y disminuye la angiogénesis.	(Cereda et al., 2018)
TRC105	mAb quimérico que se une al receptor endgolin (CD 105) disminuyendo la angiogénesis.	(Kelsey, 2015)

Siltuximab	mAb quimérico que inhibe el efecto de IL-6 en CaP resistente a la castración.	(R. Chen & Chen, 2015)
------------	---	------------------------

Los anticuerpos proteicos se han utilizado en estos ensayos durante los últimos 40 años, sin embargo, no han podido ser totalmente eficaces en el campo de la terapéutica del cáncer. Buscando ligandos de direccionamiento "específico" surgieron hace casi 30 años los anticuerpos químicos, también conocidos como aptámeros, los cuales han mostrado importantes ventajas químicas y biológicas sobre los anticuerpos. Su introducción en la clínica ha sido lenta, más investigaciones serán necesarias para demostrar si los aptámeros sustituirán a los anticuerpos en la terapia del cáncer.

6.2 Aptámeros en CaP

Los aptámeros son oligonucleótidos de ácidos nucleicos que son seleccionados y diseñados para reconocer objetivos específicos como fármacos (Neves et al., 2017), proteínas (Deng et al., 2014), carbohidratos (Jing et al., 2018), células (Ohuchi, 2012) e incluso virus (Percze et al., 2017). Desde 1990, varios grupos de investigación usaron esta propiedad de los oligonucleótidos para seleccionar y aislar aptámeros específicos. Tuerk, G., Gold, L., (1990) aislaron dos ligandos de ARN de alta afinidad por la ADN polimerasa T4 usando una biblioteca con una región aleatoria de 8 nucleótidos (Tuerk & Gold, 1990). Los aptámeros a menudo son comparados con los anticuerpos; sin embargo, los aptámeros tienen algunas ventajas importantes sobre los anticuerpos en cuanto a aspectos biológicos y de producción (Hori et al., 2018). En el aspecto biológico, dado su pequeño tamaño y naturaleza nucleica, los aptámeros son poco inmunogénicos, lo que les permite tener una mayor capacidad de penetración en los tejidos en comparación con los anticuerpos. En cuanto a la producción, los aptámeros no requieren de organismos

vivos para producirlos, los aptámeros pueden producirse y modificarse fácilmente *in vitro* tan solo agregando o quitando algunos grupos funcionales o marcarlos con sondas usando la técnica de PCR (Alkhamis et al., 2019). En el campo de la salud, las aplicaciones terapéuticas de los aptámeros son amplias, estas moléculas se han convertido en una interesante alternativa a las terapias actuales con anticuerpos monoclonales. Algunas de las aplicaciones son: administración dirigida de fármacos, diagnóstico molecular, mejoramiento de imágenes de diagnóstico, exploración e identificación de nuevos biomarcadores y el descubrimiento de nuevos biomarcadores solo por mencionar algunas (Kaur et al., 2018).

6.2.1 Selección de aptámeros (SELEX)

Los aptámeros generalmente se seleccionan *in vitro* partiendo de una gran biblioteca de oligonucleótidos monocatenarios que comprende una diversidad de hasta 1×10^{16} moléculas diferentes. Una vez que los aptámeros han sido seleccionados a través de algunos ciclos de selección, generalmente de 4 a 12 ciclos, pueden modificarse para la optimización dependiendo de las aplicaciones deseadas, a esto se le conoce como ingeniería de aptámeros (**Figura 19**) (Veedu, 2017). La técnica más usada para seleccionar aptámeros se conoce como SELEX (Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, en español). SELEX es un procedimiento experimental que implica la selección progresiva de complejos “APTÁMERO-MOLÉCULA BLANCO”, partiendo de grandes bibliotecas de oligonucleótidos monocatenarios que tienen regiones centrales con secuencias de nucleótidos ordenadas aleatoriamente. Al final del proceso SELEX, se obtienen aptámeros con afinidades y especificidades variables, esto se logra a partir de rondas repetidas de partición y amplificación (Chai et al., 2011). En el paso final del SELEX, los aptámeros con alta afinidad se amplifican utilizando la técnica de PCR lo que produce varias copias de los aptámeros seleccionados. Todo el proceso SELEX se repite de 4 a 12 veces hasta que los aptámeros con alta afinidad se enriquecen. Este enriquecimiento se puede evaluar mediante citometría de flujo o incluso de manera más específica con secuenciación de nueva generación (Mallikaratchy, 2017).

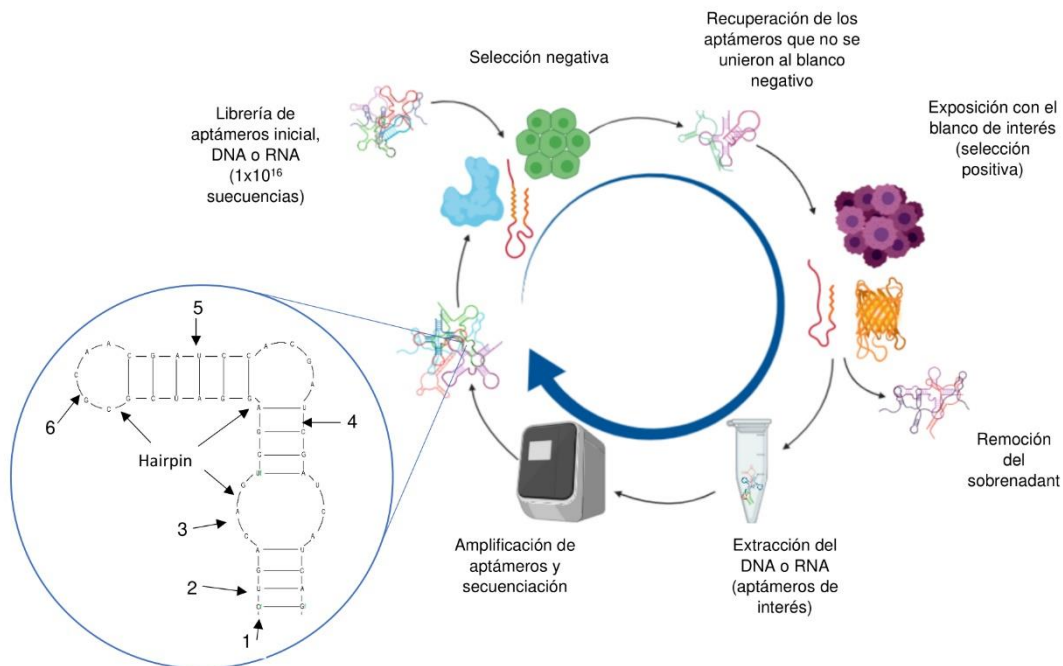


Figura 19. Esquema general de la selección e ingeniería de aptámeros. 1. 5 'final PEG (polietilenglicol) para resistir el aclaramiento renal. 2. Modificación de las nucleobases para mejorar la afinidad y la especificidad de unión. 3. Modificaciones en el esqueleto fosfodiéster para resistir a la degradación ocasionada por nucleasas. 4. Modificaciones en el anillo de azúcar para resistir la degradación de nucleasas. 5. Estrategia de límite de extremo 3' que permite la resistencia a la degradación por nucleasas. 6. La imagen especular de L-desoxiionucleótido que resiste la degradación por acción de las nucleasas.

6.2.3 cell-SELEX

Las proteínas son los blancos moleculares más usados en SELEX; sin embargo, es difícil y costoso obtener y mantener una alta pureza de las proteínas humanas en su conformación nativa para realizar ensayos *in vitro* (X. Liu et al., 2016). Para resolver este problema, K. N. Morris et al., 1998 desarrollaron un método novedoso que permitió usar el SELEX con una mezcla compleja de membranas de glóbulos rojos humanos. Este nuevo método fue llamado cell-SELEX, y es una técnica que permite identificar varias proteínas en su conformación nativa en las células. Otra ventaja de este tipo de SELEX es el hecho de que permite identificar proteínas de las cuales no se tenía un conocimiento previo, lo que hace que esta metodología sea adecuada para la detección de nuevos marcadores moleculares (Rong et al., 2016). En general, el cell-SELEX es muy similar al SELEX convencional, pero en la

técnica de cell-SELEX es de suma importancia incluir células negativas o control (selección negativa), así como mantener el cultivo celular en óptimas condiciones todo el tiempo para evitar ligeras variaciones en la selección propias de cambios en el cultivo celular. El proceso cell-SELEX tiene múltiples aplicaciones, entre ellas la identificación de microorganismos patógenos (Hamula et al., 2011), el descubrimiento de biomarcadores (Berezovski et al., 2008), la identificación de células de mamíferos (Iwagawa et al., 2012), y el diagnóstico y la terapia del cáncer (Rong, Y., et al., 2016; Chen, M., et al., 2016).

6.2.4 Aptámeros en CaP

El uso de aptámeros en CaP se ha reportado previamente principalmente con el diseño de aptámeros dirigidos contra el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, en inglés). Debido a la complejidad y a la variedad molecular de cada tumor de CaP, existe la necesidad de diseñar aptámeros dirigidos contra diferentes tipos de tumores. Por ejemplo, el aptámero A10 es un aptámero que se une específicamente al PSMA de las células de CaP; sin embargo, por razones obvias no es capaz de reconocer células que no expresan PSMA. Esto es un problema importante ya que este es el caso de las células de CaP que expresan el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, ósea aproximadamente el 50% de los tumores de CaP. Sin embargo, los aptámeros de PSMA siguen siendo hasta la fecha los aptámeros más estudiados en CaP. A continuación, se describe con más detalle algunas de las aplicaciones que se han reportado usando aptámeros dirigidos contra el PSMA en CaP (Lupold, 2018). Por otro lado, en la **Tabla 10** se resumen diferentes tipos de aptámeros usados en la investigación del CaP para el reconocimiento de diferentes blancos moleculares.

Tabla 10. Aptámeros usados en la investigación del CaP

TRABAJO	REFERENCIA	TIPO DE APTÁMERO	MÉTODO DE SELECCIÓN	APLICACIÓN
Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer	(Díaz-Fernández et al., 2019)	(PSA-1) Librería de ssDNA	SELEX (6 ciclos)	Unión de un aptámero al glicano del PSA para la detección del CaP
In vivo SELEX of bone targeting aptamer in prostate cancer bone metastasis model	(L. Chen et al., 2019)	(PB) librería de ssDNA	<i>In vivo</i> SELEX (10 ciclos)	Aptámero para abatir la metástasis
Tunable cytotoxic aptamer–drug conjugates for the treatment of prostate cancer	(Powell Gray et al., 2018)	(E3) librería de RNA	Cell-SELEX (9 ciclos)	Conjugación de un aptámero-fármaco: MMAF-E3 para inhibir el crecimiento tumoral
Doxorubicin Loaded DNA Aptamer Linked Myristilated Chitosan Nanogel for Targeted Drug Delivery to Prostate Cancer	(Atabi et al., 2017)	Librería de dsDNA	Cell-SELEX (10 ciclos)	Conjugación de un aptámero-MCS en CaP
Development of a Single Stranded DNA Aptamer as a Molecular Probe for LNCap Cells Using Cell-SELEX	(Almasi et al., 2016)	Librería de ssDNA	Cell-SELEX (10 ciclos)	Aptámero específico contra el PSMA en células LNCaP
Co-targeting EGFR and survivin with a bivalent aptamer-dual siRNA chimera effectively suppresses prostate cancer.	(H. Y. Liu et al., 2016)	Aptámeros de RNA	Secuencia conocida de un aptámero bivalente que forma una quimera aptámero-siRNA	Quimera aptámero-siRNA contra PSMA
Aptamer-mediated delivery of docetaxel to prostate cancer through polymeric nanoparticles for enhancement of antitumor efficacy.	(Z. Chen et al., 2016)	Aptámero de RNA anclado a nano partículas (apt-NPs)	Técnica de difusión de solventes usando PLGA- <i>b</i> -PEG funcional y oleato de sodio	Aptámero anclado a nanopartículas contra CaP que sobre-expresa el PSMA
Antiproliferative effect of a synthetic aptamer mimicking androgen response elements in the LNCaP cell line.	(Kouhpayeh et al., 2016)	Aptámero que mimifica HRE (AMH) ssDNA	Usando el reactive comercial PolyFect (Qiagen, Valencia, CA,	Aptámero (AMH) para reconocer al elemento de respuesta a hormona (HRE)

			USA) to transfect AMH	
Aptamer-modified PLGA nanoparticle delivery of triplex forming oligonucleotide for targeted prostate cancer therapy.	(Jiao et al., 2016)	Aptámero A10	Síntesis de un c-polímero PLGA-PEG-Apt cargado con TFO usando el método de evaporación usando solvente de doble emulsión	Terapia dirigida en CaP
Label-free electrochemical aptasensing of the human prostate-specific antigen using gold nanoparticles.	(Rahi et al., 2016)	Aptámero de DNA	Técnica basada en electroquímica	Aptámero libre de marcaje para hacer una detección directa de PSA
Selection and characterization of DNA aptamer for metastatic prostate cancer recognition and tissue imaging.	(Duan et al., 2016)	Aptámero de ssDNA	Cell-Selex (18 ciclos)	Selección de un aptámero de DNA contra la línea celular de CaP DU145
A RNA-DNA Hybrid Aptamer for Nanoparticle-Based Prostate Tumor Targeted Drug Delivery.	(Leach et al., 2016)	Aptámero híbrido de RNA-DNA	Fabricación de una super nanopartícula paramagnética de óxido de hierro- aptámero contra doxorubicina (SPIO-Apt-Dox)	Herramienta para la entrega dirigida de fármacos
3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line.	(Souza et al., 2016)	Aptámeros de RNA	Cell-SELEX con PC3, para seleccionar aptámeros contra esferoides de CaP	Ensayos de búsqueda de aptámeros en CaP
Systemic Administration and Targeted Radiosensitization via Chemically Synthetic Aptamer-siRNA Chimeras in Human Tumor Xenografts.	(X. Ni et al., 2015)	Aptámero de RNA-siRNA	Síntesis de una quimera aptámero sensible a la radiación-siRNA que permita el silenciamiento de DNA-PK en CaP	Terapia de radiación para tumores que expresan PSMA
Tumor targeting with a (99m) Tc-labeled AS1411 aptamer in prostate tumor cells.	(Noaparast et al., 2015)	Aptámero de DNA	Conjugación y marcaje con 99mTc De un aptámero que se une nucleolin	Agente que mejora la imagen de tumores

Screening and characterization of a novel RNA aptamer that specifically binds to human prostatic acid phosphatase and human prostate cancer cells.	(Kong & Byun, 2015)	Aptámero de RNA modificado en 2'-fluoropiirimidina (FY)-aptámeros que se unen a PAP)	SELEX (6 ciclos)	Se une específicamente a la fosfatasa ácida prostática
DNA aptamer evolved by cell-SELEX for recognition of prostate cancer.	(Wang et al., 2014)	Aptámero de DNA (Wy-5a)	Cell-Selex (17 ciclos)	Contra la línea celular PC3
Targeted inhibition of prostate cancer metastases with an RNA aptamer to prostate-specific membrane antigen.	(Dassie et al., 2014)	Aptámero de RNA (A9g)	Aptámero de RNA truncado usando modelaje estructural computacional	Inhibe la actividad enzimática del PSMA
RNA aptamer-conjugated liposome as an efficient anticancer drug delivery vehicle targeting cancer cells <i>in vivo</i>.	(Baek et al., 2014)	Liposoma-RNA	SELEX	Liposomas encapsulando fármacos conjugados con aptámero de RNA que reconoce PSMA
Diagnosis of prostate cancer using anti-PSMA aptamer A10-3.2-oriented lipid nanobubbles.	(Fan et al., 2016)	RNA	Nanoburbujas acopladas a aptámeros con DSPE-PEG modificado, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para mejorar imagen	Entrega de nanoburbujas con aptámeros para el diagnóstico del CaP

Planteamiento del problema

La comunicación ESTROMA-EPITELIO tiene un papel importante en la progresión tumoral del CaP ya que se secretan factores de crecimiento y proteínas que modulan vías de señalización de manera autocrina y/o paracrina. Dentro de estas proteínas secretadas, la proteína SFRP1 participa en la comunicación ESTROMA-EPITELIO promoviendo la progresión tumoral del CaP (Joesting, Perrin, Elenbaas, Joesting, et al., 2005). Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que SFRP1 podría modular indirectamente la expresión de TMPRSS2-ERG y que SFRP1 podría participar en la progresión de la enfermedad. Sin embargo, más estudios son necesarios para determinar por completo cuál es el mecanismo de acción de SFRP1 sobre la fusión TMPRSS2-ERG.

En cuanto al desarrollo de nuevas terapias farmacológicas, el gen de fusión TMPRSS2-ERG se ha convertido en un blanco molecular de interés en la investigación. Esto se debe a que se expresa en aproximadamente el 50 % de los tumores de CaP y participa en eventos de migración celular y de transición epitelio-mesénquima (EMT) (Tomlins et al., 2005). Las estrategias farmacológicas que buscan regular o abatir la expresión de TMPRSS2-ERG han sido desarrolladas enfocándose principalmente en disminuir la expresión de este gen de fusión a través de la modulación de la actividad del AR. Este enfoque se basa en que el gen *TMPRSS2* tiene elementos de respuesta a andrógenos y a que su expresión puede ser modulada por la activación del AR. Si bien este enfoque tiene la ventaja de que se podrían usar los fármacos convencionales para el tratamiento del CaP, dichos fármacos no han sido totalmente efectivos para curar la enfermedad (Graff et al., 2015). Para mejorar el tratamiento farmacológico del CaP, otras terapias moleculares han sido investigadas buscando ser célula-específicas. Esto se ha logrado mediante el uso de RNA's de silenciamiento, transfecciones estables o infección con agentes virales no patógenos (Dassie et al., 2014). Las herramientas terapéuticas más innovadoras actualmente son los vectores a base de liposomas, anticuerpos monoclonales, partículas virales, CRISPR-Cas9, y recientemente los aptámeros. La naturaleza nucleica de los aptámeros les permite formar diversas

estructuras tridimensionales que son útiles para acoplarse a casi cualquier tipo de molécula. En CaP, los aptámeros diseñados para reconocer y unirse a la proteína de membrana PSMA han mostrado ser altamente específicos tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*. Sin embargo, existen células de CaP que no expresan PSMA; aproximadamente el 50 % de los tumores de CaP no expresan PSMA (Yin et al., 2011). Tomando en cuenta que existe una población de aproximadamente el 50 % de los tumores de CaP que son positivos a la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*; es necesario desarrollar un fármaco inteligente que pueda reconocer a este tipo de células cancerosas. Un aptámero podría contribuir al desarrollo de dicho fármaco, para acoplarse a un fármaco o a un sistema de silenciamiento dirigido contra *TMPRSS2-ERG*. En la segunda etapa de esta tesis, comenzamos a realizar ensayos piloto como parte de un proyecto para obtener una quimera APTÁMERO-siRNA que reconozca específicamente a las células VCaP que expresan el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*. El desarrollo de esta herramienta molecular podría ser de gran utilidad en el tratamiento farmacológico de los tumores de CaP positivos al gen de fusión *TMPRSS2-ERG*. Los resultados que se presentan en esta tesis ayudarán a entender nuevos mecanismos moleculares en la progresión tumoral del CaP, contribuyendo posiblemente, tanto al diagnóstico como al desarrollo de nuevas terapias farmacológicas en CaP.

Hipótesis

La proteína SFRP1 regulará la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* *in vitro* e *in vivo* en CaP.

Objetivos

General

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

Particulares

- Determinar la expresión y correlación entre SFRP1 y *TMPRSS2-ERG* en CaP.
- Medir el efecto de la proteína SFRP1 sobre la viabilidad en células de CaP.
- Determinar la actividad transcripcional del AR después del tratamiento con SFRP1.
- Analizar la acción que tiene SFRP1 sobre el ciclo celular y la apoptosis.
- Determinar el efecto que tiene SFRP1 sobre la migración y la invasión celular.
- Determinar el efecto de la proteína SFRP1 sobre el crecimiento celular de un xenotransplante murino de CaP.
- Seleccionar un aptámero que se una y se internalice específicamente en células de CaP que expresan el gen de fusión *TMPRSS2- ERG*.

Materiales y métodos

Análisis de las bases de datos

El análisis interactivo de perfiles de expresión génica se utilizó para identificar la expresión del perfil SFPR1 entre tejidos normales y de cáncer de próstata (28). Se utilizó el portal cBioPortal para determinar la posible correlación entre los niveles de expresión de ERG y SFPR1 en tumores de cáncer de próstata (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013).

Cultivo celular

Las células LNCaP (células sensibles a andrógenos derivadas de una lesión metastásica en nódulo linfático supraclavicular), VCaP (células sensibles a andrógenos derivadas de una lesión metastásica en vertebra, expresan el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*) y PC3 (células insensibles e independientes de andrógenos derivadas de una lesión metastásica a hueso, no expresan AR) se adquirieron en ATCC (Manassas, Estados Unidos). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (BioWest, origen sudamericano), al 10 % en una atmósfera de 37 °C y 5 % de CO₂. La línea celular RWPE-1 (células derivadas de tejido epitelial prostático no canceroso) se adquirió de ATCC y se cultivó en medio libre de suero de queratinocitos (Lonza, Allendale, NJ, EE. UU.). La línea celular PrSC (células derivadas de tejido estromal prostático no canceroso) se adquirió de LONZA y se cultivó en medio basal de células estromales (LONZA). Cuando las células se trataron con la hormona DHT se usó medio RPMI sin rojo fenol (Sigma) suplementado con 5 % de SFB filtrado por carbón (LONZA).

Tratamientos

Se realizaron tratamientos con la proteína SFRP1 (SIGMA) a una concentración de 0.01 nM y con 0.1 % de una solución amortiguadora de BSA usada como vehículo.

La hormona DHT se usó a una concentración de 0.01 nM (SIGMA) diluida en etanol grado biológico al 0.1 %. El vehículo en las condiciones CONTROL se preparó con 0.1 % de BSA y 0.1 % de etanol v / v en medio de cultivo.

RT-qPCR

Las células se sembraron en frascos de cultivo de cuello angulado de 25 cm² a 1 x 10⁶ células, excepto las células VCaP las cuales fueron sembradas a 1,5 x 10⁶ células. 25 horas después de los tratamientos, las células se colectaron de los matraces para extraer el ARN y las proteínas. La extracción de ARN se realizó con el kit RNAeasy (Qiagen, Hilden Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se obtuvo ADNc (ADN complementario) mediante un ensayo de retro-transcripción utilizando el kit de síntesis (Thermofisher, EE. UU.). Para los ensayos de RT-qPCR se utilizaron las siguientes sondas tipo taqman: GAPDHH (Hs02758991_g1), KLK3 (Hs02576345_m1), AR (Hs00171172_m1), TMPRSS2 (Hs03063375_ft), HG0553131m1, H1 (Massachusetts, Estados Unidos).

Western Blot

La extracción de proteínas se realizó con buffer comercial RIPA (SIGMA). Las proteínas se cuantificaron con el sistema EZQ (BioRad, California, EE. UU.). Los ensayos de transferencia Western Blot se realizaron siguiendo los pasos canónicos para esta técnica, excepto por ligeras modificaciones que se indican a continuación. Las proteínas se procesaron en geles de poliacrilamida al 12% y la electroforesis se realizó a 100 V durante 1,5 h. Se usó un sistema semiseco para la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF a 15 V durante 30 minutos. Luego, se bloqueó la membrana con leche al 5 % durante 2 horas. Después de los lavados, se agregaron los anticuerpos primarios usando leche al 1 % e incubando durante toda la noche en un agitador a 4 °C. Al día siguiente, la membrana se incubó con los anticuerpos secundarios en leche al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Al final, se realizaron lavados con buffer TBST 1X con tween y se tomaron

fotografías de la membrana después de incubarla con el sistema de revelado de proteínas HRP Luminata Forte (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 3 minutos. Los anticuerpos primarios fueron: AR 1: 1000 (Abcam, ab9474), ERG 1: 1000 (Santa Cruz, sc-354) y GAPDH 1: 1000 (Abcam, ab8245).

Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en placas de 8 pozos Millicell EZSlide (Millipore, Massachusetts, EE.UU.) a 1×10^5 células por pozo. Después de los tratamientos, los portaobjetos EZ con las células se incubaron con el anticuerpo primario AR (ab9474) durante toda la noche. Después, se añadió el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo ALEXA. Finalmente, se tomaron fotografías en un microscopio confocal usando al menos tres campos diferentes a un aumento de 40X y 10X para cada tratamiento.

Viabilidad celular

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a 1×10^4 células por pozo. 48 horas después del tratamiento en las células LNCaP y, 96 horas después del tratamiento en las células VCaP, se añadieron 10 μ l del reactivo MTT (SIGMA) por pozo, y las células se incubaron a 37 °C y a 5% de CO₂ durante 2 horas. Después se retiró el medio de cultivo con MTT y se añadieron 100 μ l de DMSO (Applichem, Darmstadt) para solubilizar los cristales de formazán, esto en las células LNCaP. En las células VCaP, el medio RPMI no se retiró después de agregar e incubar con el MTT. En VCaP se agregaron 100 μ l de SDS al 10% por pozo para solubilizar los cristales de formazán durante toda la noche. En ambos casos, después de solubilizar los cristales de formazán, la absorbancia se leyó a 575 nm.

Ensayos de citometría

Se sembraron 1×10^6 células en frascos de cultivo de cuello angulado de 25 cm², excepto en las células VCaP ($1,5 \times 10^6$ células). 48 y 72 horas después de los tratamientos, las células se tripsinizaron suavemente cuidando evitar la lisis celular. La citometría se realizó con el kit comercial de ciclo celular (BD Biosciences, California, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó nocodazol (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) a 1 μ M para detener el ciclo celular en la fase G2. Se utilizó la mitad de la población celular para realizar los ensayos de apoptosis. En este caso, las células se procesaron usando el kit comercial Annexin V-FITC (Thermo Fisher Scientific, V13242) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó el reactivo 2-amino-N-quinolin-8-il-bencenosulfonamida (QBS) (SIGMA) como inductor de la apoptosis. Las lecturas se realizaron en el equipo Attune (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) tanto para los ensayos de ciclo celular como para los ensayos de apoptosis.

Ensayo de migración celular

Los ensayos de migración o de sanación de la herida se realizaron usando 1×10^6 células por pozo en placas de 6 pozo pre-tratadas con poli-L-Lisina para fomentar la adherencia celular. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se rasgó la monocapa celular en el fondo de cada pozo de la placa usando una punta de pipeta de 10 μ l. Después, tratamos a las células y se dio seguimiento al cierre de la herida cada 24 horas. Se tomaron fotos y se realizó un análisis de las imágenes utilizando el software Image J (versión 1.52j).

Invasión celular (sistema xCELLigance)

Se sembraron 4×10^4 células VCaP con 150 μ l de medio DMEM y 10% de SFB. Es importante anotar que previamente se realizó la calibración de la placa del equipo con 30 μ l de DMEM y SFB durante 30 minutos. Se añadieron 20 μ l de una matriz comercial que simula la matriz extracelular y se conoce como matrigel. Se usó una

proporción 1:1 durante 30 minutos hasta que la matriz se polimerizó. Posteriormente, se realizó una lectura inicial para establecer la señal de fondo, y luego se procedió a sembrar las células. Esto se realizó 2 horas antes de comenzar la lectura para permitir la adherencia de las células en la matriz, y en seguida se iniciaron los tratamientos. Las lecturas se realizaron en tiempo real en el cultivo celular cada 15 minutos durante 72 horas utilizando el quipo xCELLigence RTA (ACEA Biosciences, San Diego, California, EE. UU.).

Modelo murino de xenotransplante (VCaP)

Se inocularon $3,5 \times 10^5$ células VCaP en la parte posterior del lomo en doce ratones BALB/c nu/nu con una edad de 4 a 6 semanas. Se colectó sangre de la cola de los ratones por goteo para medir las concentraciones de PSA humano mediante un ensayo de ELISA. Cuando los ratones desnudos desarrollaron tumores con un tamaño de 250 mm^3 , se dividieron en dos grupos de tratamiento (3 ratones en cada grupo): 1) Vehículo y 2) SFRP1, después de la cirugía de castración. Una semana después de la castración, los ratones se aleatorizaron en dos grupos: 1) grupo control (tratados con PBS como vehículo) y 2) grupo problema (tratados con $50 \mu\text{l}$ de SFRP1 0.01 nM). La proteína SFRP1 y el vehículo se administraron por vía subcutánea alrededor del tejido tumoral una vez por semana durante 10 semanas. Cumplido ese tiempo, se sacrificaron los ratones y se colectaron los tejidos tumorales para analizar la expresión del ARN mensajero por RT-qPCR, y las proteínas por W.B. e inmunohistoquímica (IHC). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las pautas de uso y cuidado de animales de los NIH (EE. UU.) y el comité institucional local: Comité Interno de Cuidados de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Cancerología (CICUAL-INCan) con respecto al uso ético de animales experimentales.

Cuantificación del PSA por ELISA

La sangre de la cola se recogió frotando y goteando suavemente la cola de los ratones hasta obtener un volumen aproximado de 400 µl. La recolección de la sangre se realizó en tubos microtainer amarillos (BD, Nueva Jersey, EE. UU.). Una vez que se obtuvo el suero por centrifugación, se almacenaron las muestras en un tubo nuevo a -70 °C hasta que se recolectaron todas las muestras. Para realizar el ensayo de ELISA se utilizó el kit comercial de ELISA para PSA (ABNOVA, China) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

Inmunohistoquímica (IHC)

Secciones de los tejidos de los tumores de los xenotransplantes murinos fueron previamente embebidos en bloques de parafina. La desparafinación se llevó a cabo a 65 °C (temperatura de fusión de la parafina) durante 15 minutos, seguido de dos pasos a través de xilol durante 15 minutos, etanol al 100 % (dos veces) y etanol al 70% durante 5 minutos. Posteriormente, los tejidos se rehidrataron con dos lavados usando PBS 1X durante 5 minutos. Los tejidos se incubaron en buffer amortiguador de citrato durante 10 minutos en una olla a presión para recuperar el antígeno. Se dejaron enfriar los tejidos durante 15 minutos, y luego se bloqueó la peroxidasa endógena con la solución de bloqueo de peroxidasa (Bio BS) en una cámara húmeda (dos veces) durante 30 minutos. Los tejidos se lavaron con PBS 1X y se incubaron con la solución de bloqueo general (Bio BS) en una cámara húmeda durante 40 minutos. Los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes a 4 °C en una cámara húmeda durante toda la noche. Posteriormente, los tejidos se lavaron con PBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo primario, y se incubaron con el anticuerpo secundario y, posteriormente con el polímero (MACH 3 Rabbit HRP Polymer Detection, BIOCARE) en una cámara húmeda durante 10 minutos. Los tejidos se lavaron con PBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo secundario. Los tejidos se incubaron con diamino-bencidina (DAB) diluida en buffer amortiguador de diamino-bencidina (1: 100) y se realizó la

detección de proteínas. Una vez que se detectó la señal, la reacción se detuvo con PBS 1X. Los tejidos se contra-tiñeron con hematoxilina y se dejaron secar. Los tejidos se montaron con medio de montaje (permount) para después visualizarlos en un microscopio (Olympus BX51). Los anticuerpos usados fueron anti-ERG (SANTACRUZ, sc-354) y anti-Ki-67 (ABCAM, ab16655).

Diseño de una librería de aptámeros

Se diseñó una librería de aptámeros de RNA con una extensión total de 76 nucleótidos la cual tuvo secuencias conocidas en los extremos 5' y 3'. Previo al diseño, se consultó la literatura para obtener referencias que tuvieran abordajes similares a lo propuesto en este trabajo.

Librería de aptámeros

Secuencia: 5'rUrArG rGrGrA rArGrA rGrArA rGrGrA rCrArU rArUrG rArU rN30 rUrUrGrA rCrUrA rGrUrA rCrArU rGrArC rCrArC rUrUrG rA3'

Características: 76 bases de RNA; r: RNA; N: nucleótidos aleatorios; 30: 30 bases de RNA; escala: 250 nmol, purificación DST.

Oligonucleótido para la retro-transcripción (RV):

5' TCAA GTG GTC ATG TAC TAG TCA A 3'

Oligonucleótidos usados en la PCR:

1. **T7-B213:**

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGATAGGGAAGAGAAGGACATATGAT3'
BIOTILNILADO (46 nucleótidos); escala: 200 nmol, purificación HPLC.

2. **RV (RV):** 5' TCA AGT GGT CAT GTA CTA GTC AA 3':

Características: ambos oligos fueron BIOTINILADOS (23 nucleótidos); escala: 200 nmol, purificación HPLC.

cell-SELEX (variante de internalización)

El esquema general del proceso de selección se presenta en la **Figura 20**. Se sembró en una placa de 6 pocillos con 3×10^5 células VCaP en un pozo y 3×10^5 células no cancerosas RWPE-1 (para la selección negativa) en otro pozo de la misma placa, y se les permitió alcanzar una confluencia superior al 70 %. Posteriormente, se agregaron 2 μ l de la biblioteca de aptámeros a una concentración 1 μ M para que la concentración final por pozo fuera de 100 nM (prepararlo en 2 ml de medio DMEM sin suero fetal bovino). Se incubó a 95 °C antes de agregarlo a las células, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó a las células no cancerosas incubando en agitación suave durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante (aptámeros que no se unieron a las células de CaP y se almacenaron a -20 °C). Se agregó el sobrenadante a las células de CaP y se incubaron las células durante 30 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 2 ml de NaCl 0,5 M (en PBS 1X) incubando durante 5 segundos, se retiró inmediatamente el sobrenadante para evitar la lisis celular. Este último paso fue para eliminar los aptámeros unidos a la membrana y para recuperar solo los aptámeros que lograron internalizarse a las células. Se agregó 1 ml de trizol a cada pozo de la placa y se procedió con la extracción de ARN usando el método de trizol-cloroformo. Una vez finalizada la extracción, se cuantificó el RNA y se realizó un ensayo de retro-transcripción (RT) usando 500 ng de RNA. La RT se llevó a cabo con el kit comercial de alta capacidad (High-Capacity cDNA Reverse Transcription) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el oligo RV-T7. Posteriormente, la PCR se realizó a partir de 2 microlitros del producto RT utilizando el kit comercial Gold Taq (ADN polimerasa AmpliTaq Gold™), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los oligos FWD-PCR-SEQ y RVD-PCR-SEQ. Las concentraciones de cada uno de los componentes de la mezcla de la reacción se pueden consultar a continuación en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Componentes de la mezcla de reacción de PCR

COMPONENTE	VOLUMEN POR REACCIÓN (µl)
Agua	22
Buffer PCR Gold 10X	5
MgCl ₂ 25 mM	3
dNTP's 10 mM	4
T7 B213 (10 µM)	5
RV (10 µM)	5
Templado (cDNA)	5
Enzima AmpliTaq GOLD	1
Volumen final	50

Las condiciones del termociclado se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Temperaturas del termociclado

PASOS	TEMPERATURA °C	TIEMPO (MIN)
Inicio	94	10
Desnaturalización (25 ciclos)	94	1
Alineamiento (25 ciclos)	60	1
Elongación (25 ciclos)	72	1
Final de la reacción	72	10

El producto de PCR se evaluó mediante un gel de electroforesis con las siguientes condiciones:

- 10 microlitros de producto de PCR

- Concentración de gel a 2,5 %
- Voltaje: 75 V
- Tiempo: 2 horas

Los 40 microlitros restantes del producto de PCR se purificaron con el kit comercial (MiniElute PCR Purification). Una vez realizado esto, se procedió a la secuenciación, para ello se requirió de al menos 10 ng/μl de la muestra.

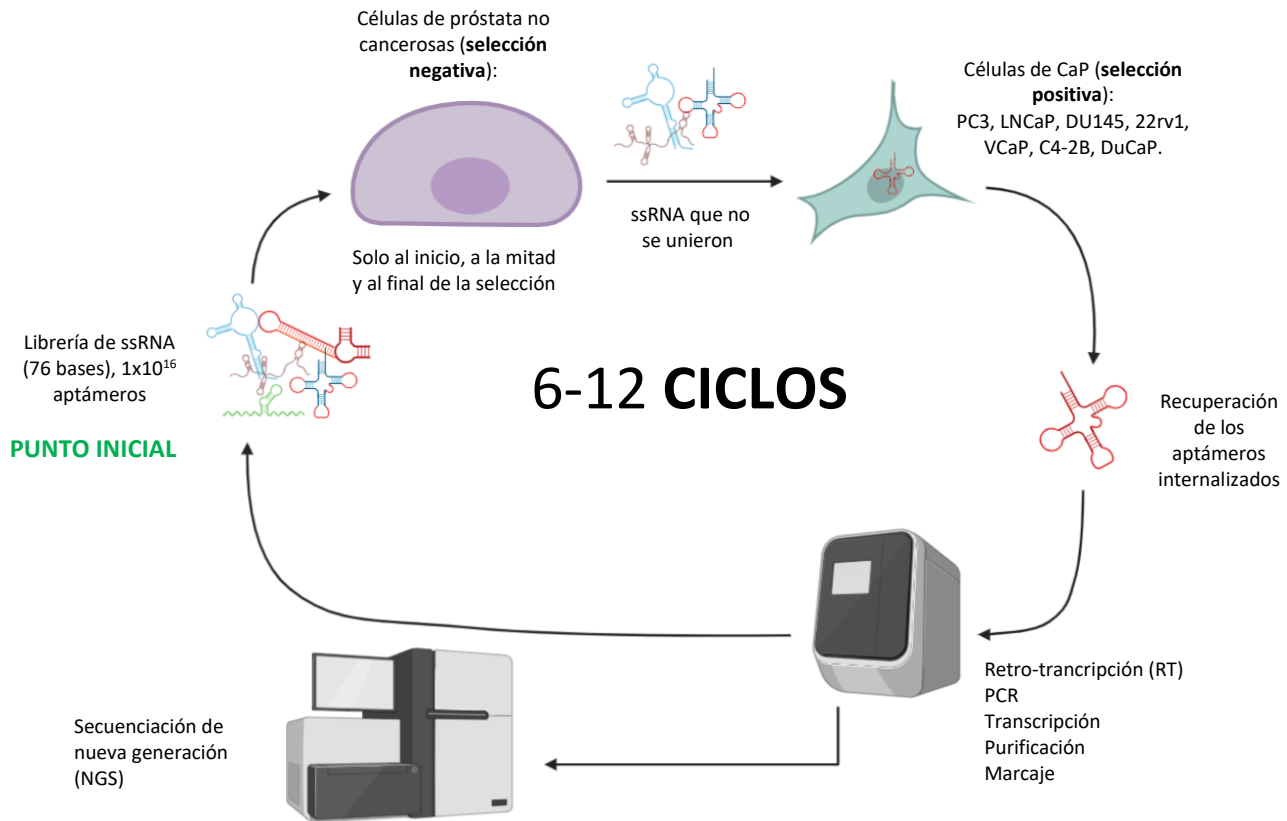


Figura 20. Esquema general del proceso de selección de aptámeros mediante la técnica de cell-SELEX (variante de internalización).

Determinación de la secuencia del aptámero

Se realizó un análisis piloto de la identificación de las secuencias obtenidas antes de realizar un análisis global de todas las secuencias de aptámeros. Para esto, se realizó una secuenciación de nueva generación a partir de los productos de PCR

provenientes del cell-SELEX. Posteriormente, la información obtenida fue filtrada, ordenada, y agrupada para realizar un análisis de homología de secuencias. Se seleccionaron los candidatos de las secuencias homólogas entre sí, y se realizó un análisis para evaluar la termodinámica y las conformaciones estructurales 2D y 3D. Aquellos aptámeros con menor energía libre y con mayor número de plegamientos serían los candidatos para la síntesis y las pruebas de validación. La cuantificación de los productos de PCR se realizó por fluorometría. Se realizó electroforesis automatizada y lectura de fluorescencia capilar. Se prepararon las librerías de DNA. Se realizó secuenciación MySeq por síntesis a 30 ciclos y con una profundidad de 70, 000 lecturas por muestra. Se realizó el filtrado de los datos provenientes de las lecturas R1 y R2 de la secuenciación, y se convirtieron a formatos tipo FASTA. Se realizó la depuración de las secuencias con el software PSPad. Las secuencias se almacenaron en un nuevo archivo TXT para realizar el alineamiento. El alineamiento de las secuencias se realizó mediante la herramienta Clustal Omega/DNA/OUTPUTSELEX. Esta plataforma realiza cladogramas que permiten ordenar las secuencias e identificar si existían agrupamientos por familias de secuencias homólogas. Se seleccionaron ejemplos de secuencias candidato de cada familia y se realizó un modelamiento de estructuras en 2D usando el programa RNAfold Web Server. Se tomó una de las secuencias con mejor relación de energía libre y plegamientos para realizar un modelo en 3D con la plataforma RNA composer.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada ensayo fueron analizados y graficados en el software GraphPad Prism 5 (Software GraphPad, Versión 5.01, La Jolla, CA, EE. UU.). El análisis de los datos de RT-qPCR se realizó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. El análisis estadístico de los niveles relativos de expresión génica se realizó mediante un análisis ANOVA unidireccional seguido de una prueba post-hoc de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Expresión de SFRP1 en células no malignas y de cáncer de próstata

Se evaluó el perfil de expresión de SFRP1 entre tejidos normales y cancerosos de CaP usando la plataforma GEPIA la cual comprende en total una fuente de datos de 9,736 tejidos tumorales y 8,587 muestras de tejidos normales provenientes de los proyectos TCGA y GTEx (Tang et al., 2017). Se observaron niveles altos de SFRP1 en tejidos de próstata normales, pero niveles bajos en muestras de cáncer de próstata (**Figura 21 A**). Posteriormente, se investigó la expresión de ARNm de SFRP1 en células de próstata no malignas y células de CaP (**Figura 21 B**). Las células de CaP expresaron niveles más bajos de SFRP1 en comparación con las células normales de próstata: RWPE-1 (epitelial) y PrSC (estromal). Sin embargo, se observó una expresión diferencial entre las células VCaP (positivas a TMPRSS2-ERG) y las células LNCaP (negativas a TMPRSS2-ERG). Aunque ambas líneas celulares tienen baja expresión de SFRP1, las células VCaP presentaron una mayor expresión de SFRP1 en comparación con las células LNCaP (**Figura 21 B**). Se realizó un análisis de co-expresión de SFRP1 y ERG en 494 muestras de adenocarcinomas de próstata usando la base de datos en internet TCGA (Feronjy et al., 2010). Como se esperaba, se confirmó una baja correlación positiva entre SFRP1 y la expresión de ERG (Spearman (0, 26) y Pearson (0, 24) (**Figura 21 C**). Solo el 1.8 % (9 biopsias) de las muestras tuvieron amplificación de SFRP1, y 3.5 % tuvieron delección de SFRP1. Estos datos abrieron la puerta para evaluar el efecto de la proteína SFRP1 exógena.

Efecto de la proteína SFRP1 exógena sobre la actividad transcripcional del AR

Para determinar si la proteína SFRP1 exógena podría tener algún efecto sobre las células de CaP positivas a TMPRSS2-ERG, se realizaron ensayos para medir indirectamente la actividad transcripcional del AR a través de genes que cuentan con secuencias ARES (Elementos de Respuesta a Andrógenos, en español). Se

trataron a las células con 5 α -dihidrotestosterona (DHT) como control positivo y con la proteína recombinante exógena SFRP1. La concentración de SFRP1 se eligió con respecto a la concentración más baja de DHT que tuviera un aumento significativo en la viabilidad celular; esto para representar el contexto fisiológico donde las concentraciones más bajas de proteína podrían contrarrestar o potenciar el efecto de la hormona DHT. Después, se evaluó la expresión de los genes que responden a andrógenos como *KLK3* (gen que codifica para PSA) y *ERG* (producto funcional de fusión TMPRSS2-ERG) en células LNCaP y VCaP, respectivamente. En las células LNCaP, el tratamiento con SFRP1 no modificó la expresión de *KLK3* tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel de la proteína, pero en combinación con DHT, SFRP1 parece contrarrestar el efecto de DHT (**Figuras 22 A-C**). De manera interesante, en las células VCaP; contrariamente a lo observado en las células LNCaP, la adición de la proteína SFRP1 aumentó la expresión de ERG (**Figuras 22 D-F**). Para determinar si SFRP1 promueve la expresión de ERG a través de la translocación de AR, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y se observó que SFRP1 promueve la translocación de AR al núcleo celular de manera similar al efecto ejercido por la hormona DHT (**Figura 22 G**). Para demostrar si este efecto se debía a la translocación de AR o a la expresión de AR, también se determinó la expresión de AR después del tratamiento con SFRP1. Se encontró que SFRP1 disminuyó la expresión de AR en las células VCaP de la misma forma que en reportes científicos publicados anteriormente (**Figura 22 H**).

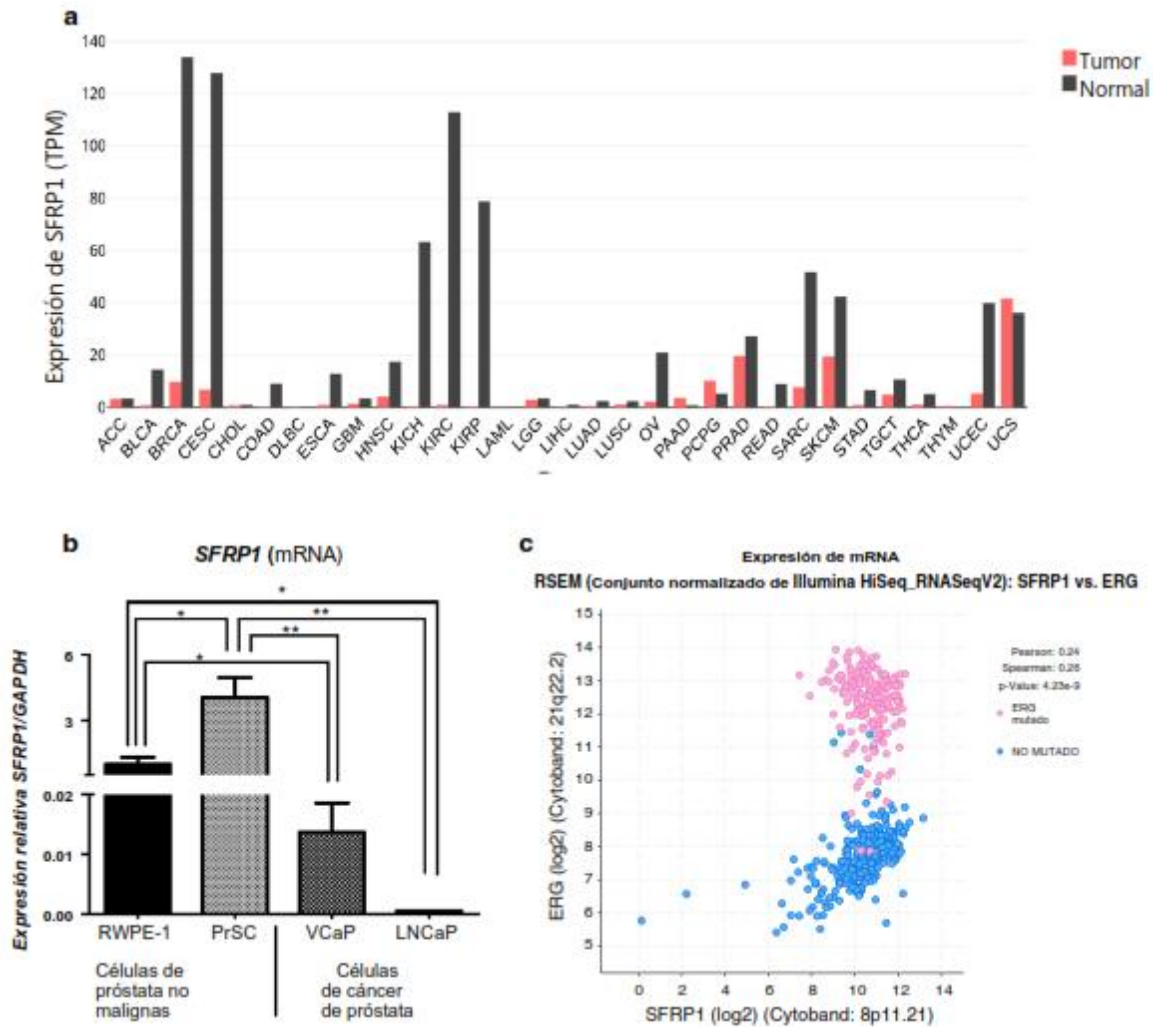


Figura 21. Expresión de SFRP1 en células no cancerosas de próstata y en células de cáncer de próstata. A) El nivel de expresión de SFRP1 es más bajo en el tumor de cáncer de próstata (PRAD, rojo), pero aumenta en los tejidos normales (PRAD, negro). B) Expresión diferencial de SFRP1 en diferentes líneas celulares de próstata. La expresión de SFRP1 en células VCaP (positivas al gen de fusión TMPRSS2-ERG) fue mayor que en las células LNCaP (fusión negativa) en condiciones basales, * $p < 0.0122$, ** $p < 0.0019$. C) Análisis de co-expresión de ERG y SFRP1 en 494 muestras de adenocarcinomas de próstata obtenidos de la plataforma cBioPortal.

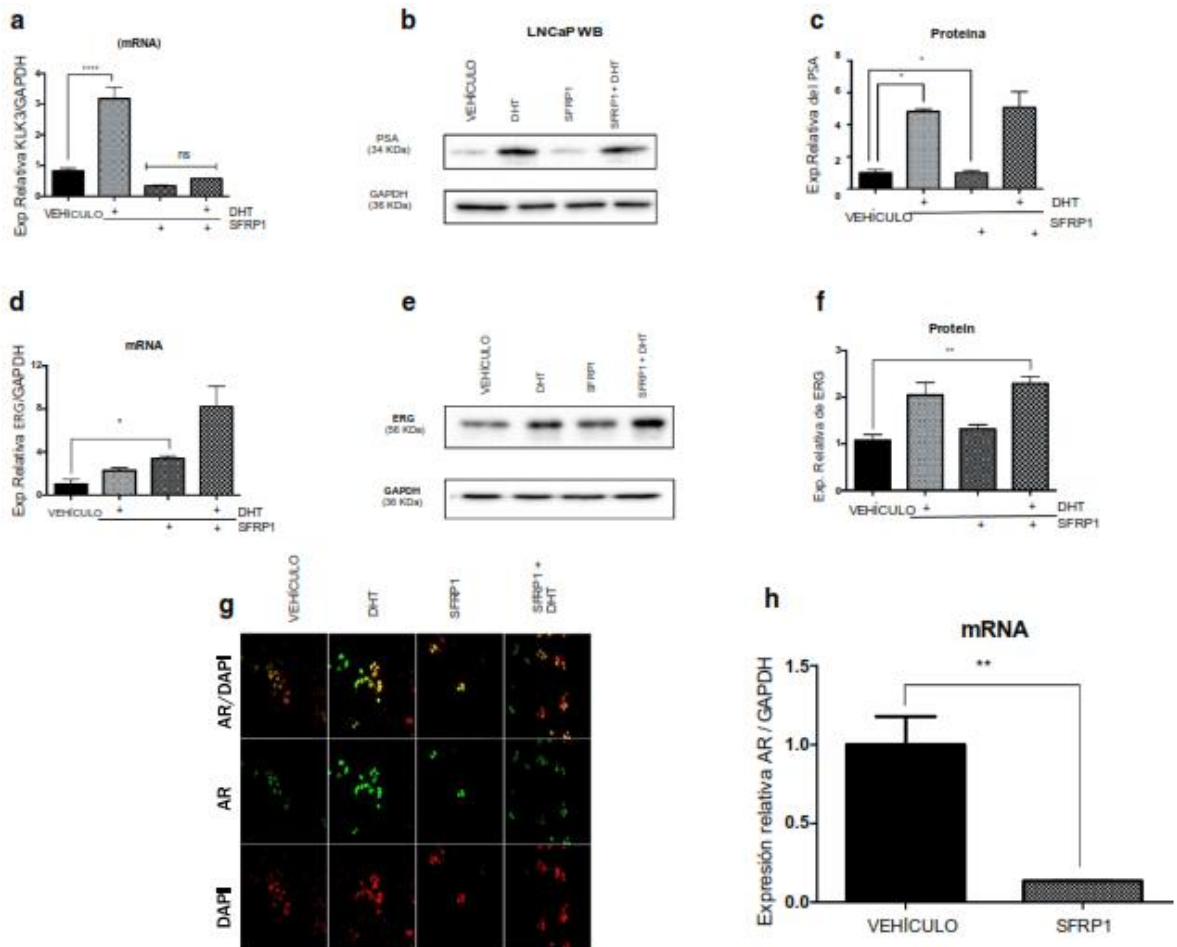


Figura 22. Efecto de SFRP1 sobre la actividad y la expresión del gen AR. Expresión de KLK3 (PSA) después del tratamiento con SFRP1, **** $p \leq 0.0001$, * $p \leq 0.01$, (A-C). Efecto de SFRP1 exógeno sobre la expresión de ERG * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$ (D-F). Localización de AR por inmunofluorescencia. rojo (DAPI) y verde (AR), (G). Expresión del AR, ** $p \leq 0.01$ (H). Las células fueron tratadas con DHT y SFRP1 durante 24 horas (0.01 nM).

Efecto de SFRP1 sobre la viabilidad y el ciclo celular

En las células LNCaP, el tratamiento con SFRP1 disminuyó la viabilidad celular al 88,9 % y cuando se trató en conjunto con DHT, la viabilidad celular disminuyó un 22% (**Figura 23 A**). En línea con eso, SFRP1 disminuyó el número de células en fase S de 25.6 % a 8.8 % y aumentó el número de células en fase G1 de 65.5 % a 74.2 % (**Figura 23 B** y **Tabla 13**). Sin embargo, en las células VCaP, no se observaron cambios significativos ni en la viabilidad celular ni en el ciclo celular después del tratamiento con SFRP1. Solo se observó un aumento significativo en la viabilidad celular con el tratamiento de la hormona DHT, en este caso la viabilidad

celular al 100 % representa a las células vivas en condiciones normales sin ningún tratamiento (**Figuras 23 C-D y Tabla 14**). También se evaluó mediante ensayos FACS si SFRP1 pudiera proteger a las células de la apoptosis; sin embargo, no se observaron cambios significativos en comparación con el vehículo. Por lo tanto, se realizó un ensayo de viabilidad celular para investigar el efecto potencial de SFRP1 en las células de CaP que no expresan AR o TMPRSS2-ERG. Como se esperaba, no se observó ningún efecto sobre las células PC3 (AR negativo) y sobre las células RWPE-1 (células epiteliales no cancerosas) (**Figuras 23 E y 23 F**). Estos resultados sugieren que SFRP1 podría estar afectando a otro tipo de característica neoplásica como la migración celular, y dicho efecto podría ser exclusivo de las células VCaP positivas a AR y a TMPRSS2-ERG.

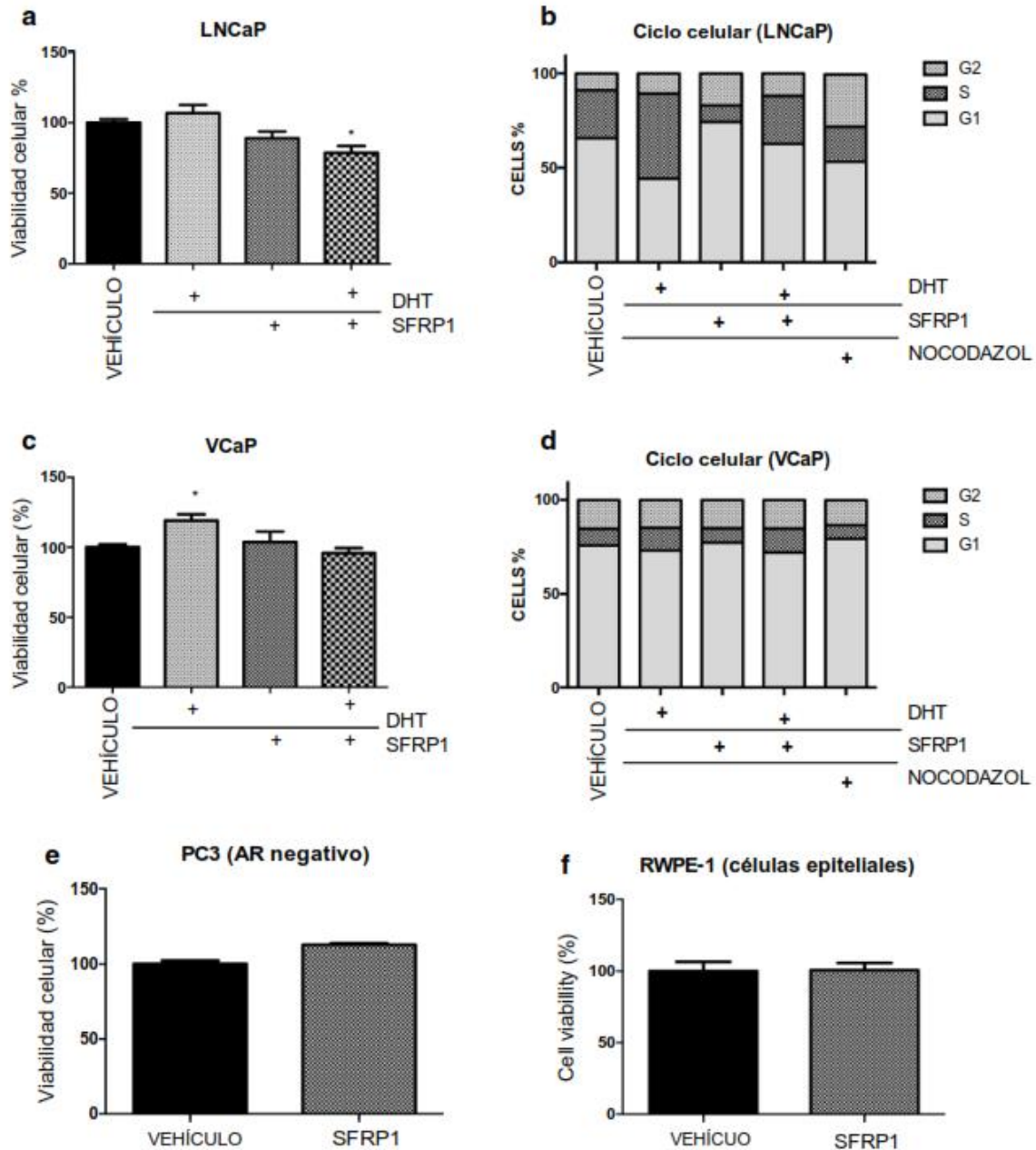


Figura 23. Efectos de SFRP1 sobre la viabilidad celular y sobre el ciclo celular. Las células fueron tratadas con DHT (0.01 nM) y SFRP1 (0.01 nM). La viabilidad celular se midió con el ensayo de MTT y el ciclo celular se determinó por citometría de flujo con Ioduro de Propidio IP. A) Células LNCaP, * $p \leq 0.01$ vs vehículo (A-D). Efectos de SFRP1 sobre la viabilidad celular en células PC3 y RWPE-1 (E-F). En los ensayos de citometría, las células LNCaP, PC3 y RWPE-1 fueron tratadas durante 48 horas y VCaP durante 72 horas. Se utilizó nocodazol como agente de arresto del ciclo celular en la fase G2 a 1 μ M.

Tabla 13. Ciclo celular en las células LNCaP

Fase (ciclo celular)	Vehicle	DHT	SFRP1	SFRP1 + DHT	Nocodazole
G1	65.5% ± 3.8	45.1% ± 8.5 **	74.2% ± 0.47	62.6% ± 2.8	53.6% ± 1.69
S	25.6% ± 2.6	45.1% ± 11.5 *	8.8% ± 0.81	25.4% ± 2.4	18.8% ± 1.35
G2	8.9% ± 1.7	10.7% ± 3.05	17% ± 0.45	12% ± 0.60	27.6% ± 0.23 *

Los datos son el promedio ± s.d. de un experimento representativo realizado por triplicado (*p <0,005; prueba t de Student de los tratamientos en comparación con el vehículo).

Tabla 14. Ciclo celular en las células VCaP

Fase (ciclo celular)	Control	DHT	SFRP1	SFRP1 + DHT	Nocodazole
G1	75.6% ± 0.2	73.05% ± 2.2	77.21% ± 0.5	71.95% ± 3.1	79.31% ± 0.2
S	9.0 % ± 0.1	12.04% ± 3.2	7.66% ± 0.3	12.76% ± 2.4	7.36% ± 0.2
G2	15.3% ± 0.3	14.91% ± 1.1	15.12% ± 0.1	15.29% ± 1.6	13.34% ± 0.07

Los datos son el promedio ± s.d. de un experimento representativo realizado por triplicado (*p <0,005; prueba t de Student de los tratamientos en comparación con el vehículo).

Efecto de SFRP1 sobre la migración y sobre la invasión celular

Se decidió continuar evaluando si SFRP1 pudiera tener un efecto sobre la migración en las células VCaP (positivas a TMPRSS2-ERG) midiendo la sanación de herida durante 96 h. Después de realizar el ensayo, se observó un aumento en la migración celular en las células tratadas con SFRP1 en comparación con el vehículo (**Figuras 24 A-B**). Para evaluar si el efecto de la proteína SFRP1 sobre la migración celular podría también promover la invasión celular, se utilizó un sofisticado sistema de medición en tiempo real llamado xCELLigence, y se encontró que SFRP1 también aumentó la invasión de las células VCaP. Se registró la invasión celular en tiempo real cada 15 minutos durante 72 horas, y se observó un aumento de la invasión desde las primeras horas del experimento (**Figura 24 C**). Además, SFRP1 aumentó 10 veces la expresión del gen LEF-1 el cual pertenece a la vía de señalización WNT y que está relacionado con la transición epitelio-mesénquima EMT (**Figura 24 D**). Finalmente, se realizaron experimentos de W.B. para evaluar dos marcadores EMT y se observó una tendencia elevada en la expresión de la proteína N-cadherina y

disminuir la proteína E-cadherina después de 24 horas del tratamiento con SFRP1 (Figura 24 E).

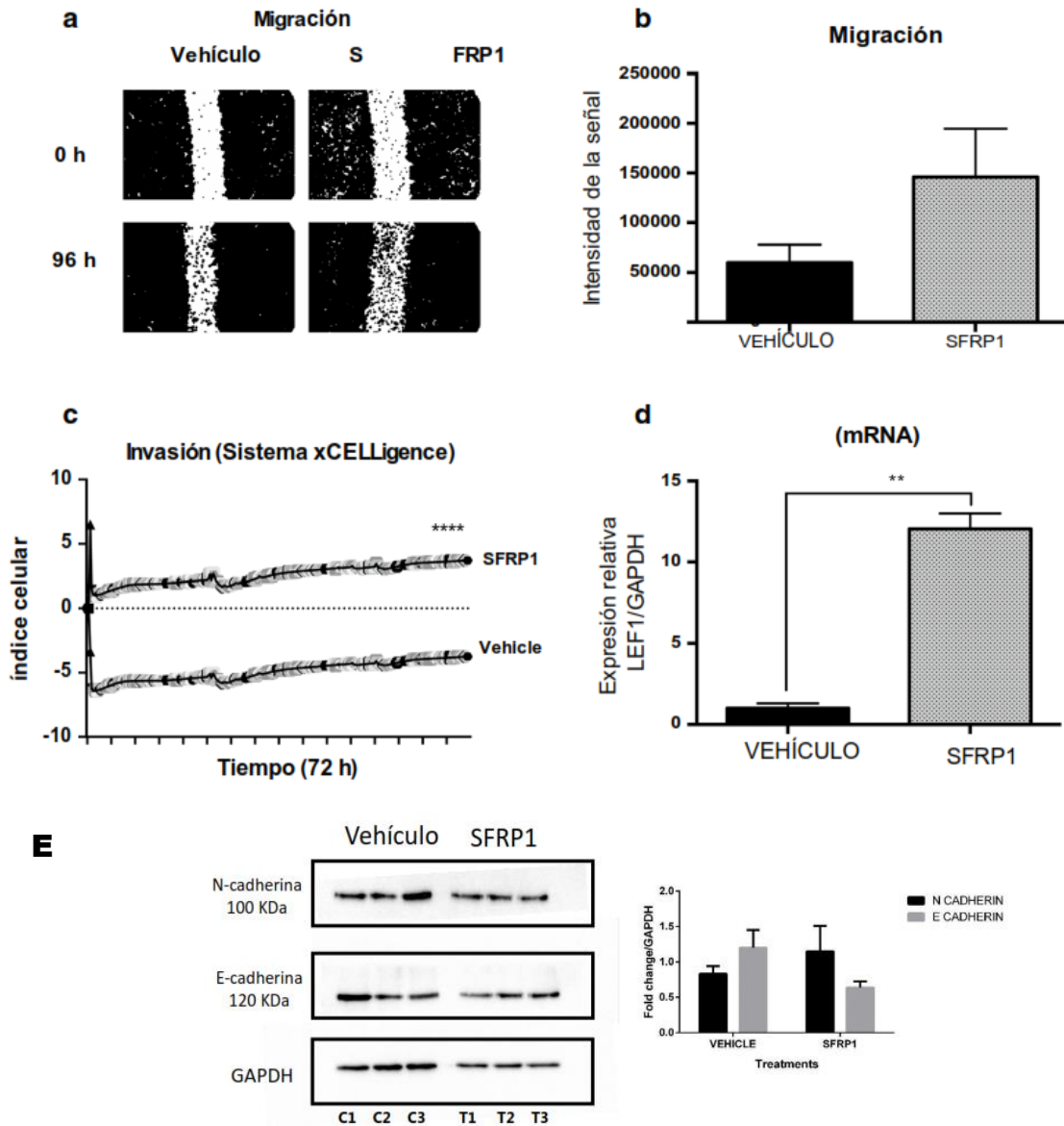


Figura 24. Efecto de SFRP1 sobre la migración y sobre la invasión celular. La migración celular se evaluó mediante un ensayo de sanación de la herida, las células VCaP se trataron durante 96 horas, y se observó un aumento de la migración (A-B). La invasión celular fue evaluada por el sistema xCELLigence, las células VCaP se trataron durante 72 horas y la invasión se cuantificó en tiempo real cada 15 minutos, **** $p \leq 0,0001$ (C). Expresión de LEF-1 en células VCaP, ** $p \leq 0,0045$ (D). Se muestran los W.B. para N-cadherina y E-cadherina, (C1-C3 y T1-T3 indican las réplicas para cada tratamiento) (E). Las células fueron tratadas durante 24 horas con DHT y SFRP1 (0,01 nM).

Efecto de SFRP1 sobre un xenotransplante murino de VCaP

Realizamos una prueba piloto usando un modelo de xenotransplante murino castrado, el cual se lleva a cabo usando células VCaP. Se evaluó el efecto de SFRP1 *in vivo* en condiciones de depleción hormonal. Se inocularon células VCaP por vía subcutánea en los ratones y cuando los xenotransplantes alcanzaron cerca de 300 mm³ se extrajeron los testículos de los ratones. Después, se comenzó el tratamiento con SFRP1 administrado por vía subcutánea rodeando el tumor, una vez por semana durante diez semanas. Se observó que la proteína SFRP1 promovió el crecimiento de los xenotransplantes hasta aproximadamente 1000 mm³. Además, en los xenotransplantes tratados con la proteína SFRP1 se observaron cambios significativos para el marcador de proliferación celular Ki67. Tanto la cuantificación de la señal como el IRS (puntaje de inmunoreactividad) se calcularon según lo descrito por Parashar et al. (2019) y Fedchenko et al. (2014) (**Figuras 25 A y B**) (Fedchenko & Reifenrath, 2014; Parashar et al., 2019). Además, durante las diez semanas de tratamiento, se recolectó sangre de la cola de los ratones y se cuantificaron los niveles de PSA humano del tumor. En este caso, solo se observó una tendencia hacia niveles más altos de PSA en los ratones tratados con la proteína SFRP1, pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (PSA en el grupo no tratado: 18.1 ng / ml \pm 11.04 vs PSA en el grupo tratado: 61.6 \pm 48.5) (**Figura 25 C**). Después del tratamiento, se sacrificaron los ratones y se recolectó el tejido de cada xenotransplante para medir ERG por IHC. Se observaron mayores cantidades de proteína ERG en los tumores de los animales que recibieron la proteína SFRP1 (**Figura 25 D**). También se observó un aumento significativo de ERG después del tratamiento con SFRP1 en los niveles de ARN mensajero y proteína (**Figuras 25 E-G**).

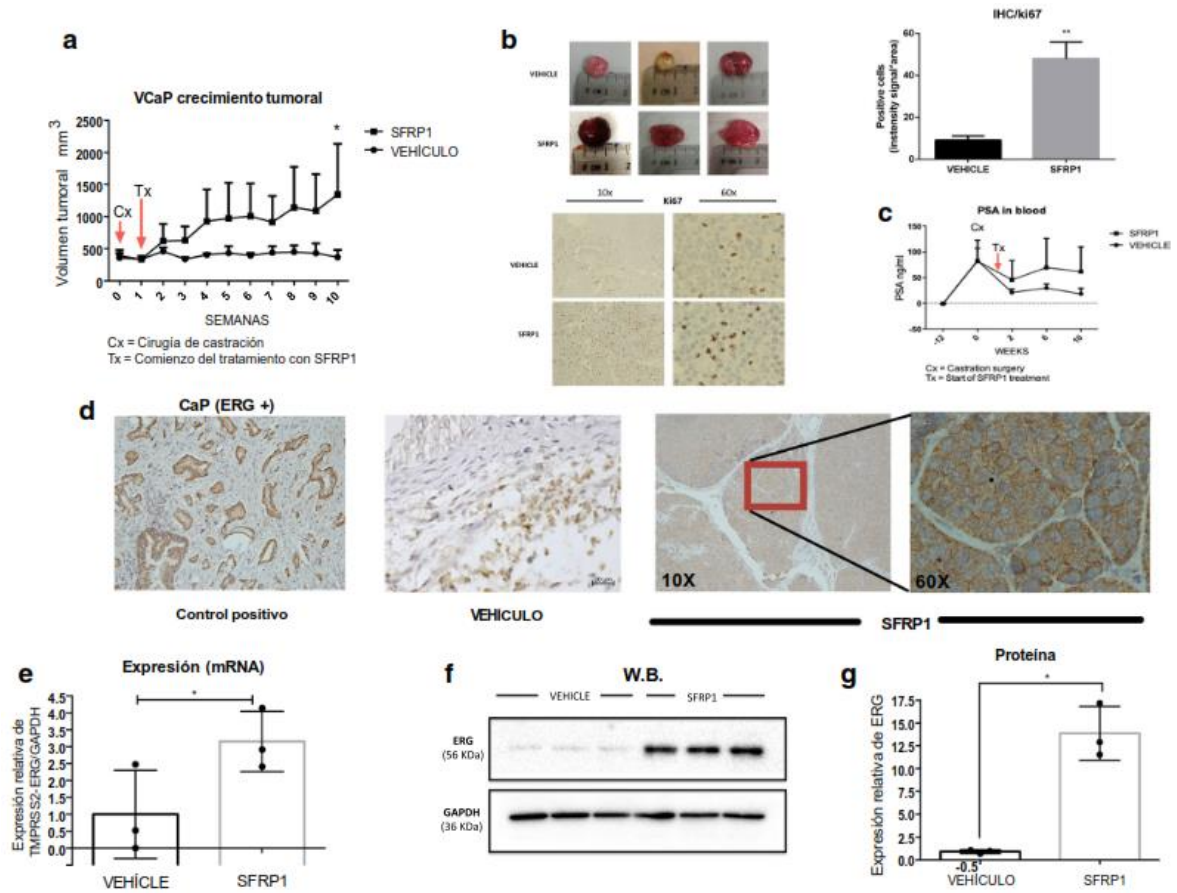


Figura 25. Efecto de la proteína SFRP1 en xenotrasplantes de VCaP. El tratamiento con SFRP1 se realizó cada semana durante 10 semanas. SFRP1 se aplicó vía subcutánea alrededor del tumor (50 μ l a 0.01 nM) (A). Foto representativa de cada xenotrasplante en cada tratamiento. En IHC, se usó Ki67 como marcador indicativo de la proliferación, el cual mostró un aumento en un aumento de 10X y 60X. La cuantificación de Ki67 a 10X se graficó como la señal de las células positivas * área, ** $p \leq 0.008$ (B). El PSA humano se cuantificó por ELISA (C). Inmunohistoquímica de los xenotrasplantes de VCaP, los tejidos se recolectaron en formalina, luego se embebieron en parafina y se realizó una IHC para cuantificar ERG (D). Expresión de TMPRSS2-ERG (ARN mensajero) y ERG (proteína) en los xenotrasplantes de VCaP, * $p \leq 0.03$ (ARNm) y * $p \leq 0.01$ (proteína) (E-G).

Cell-SELEX y PCR

Se realizaron ensayos piloto de SELEX los cuales servirán para desarrollar a futuro una quimera aptámero-siRNA para reconocer células de CaP que expresan la fusión TMPRSS2-ERG. En primer lugar, se realizó una PCR en punto final con diferentes temperaturas de T_m para determinar así cuál podría ser la temperatura ideal para realizar la amplificación de los aptámeros de la librería que se usaría en los ensayos posteriores. Se realizó un gel de agarosa con los productos de PCR y se observó una mejor amplificación cuando se usó una T_m de 58 °C (**Figura 26**).

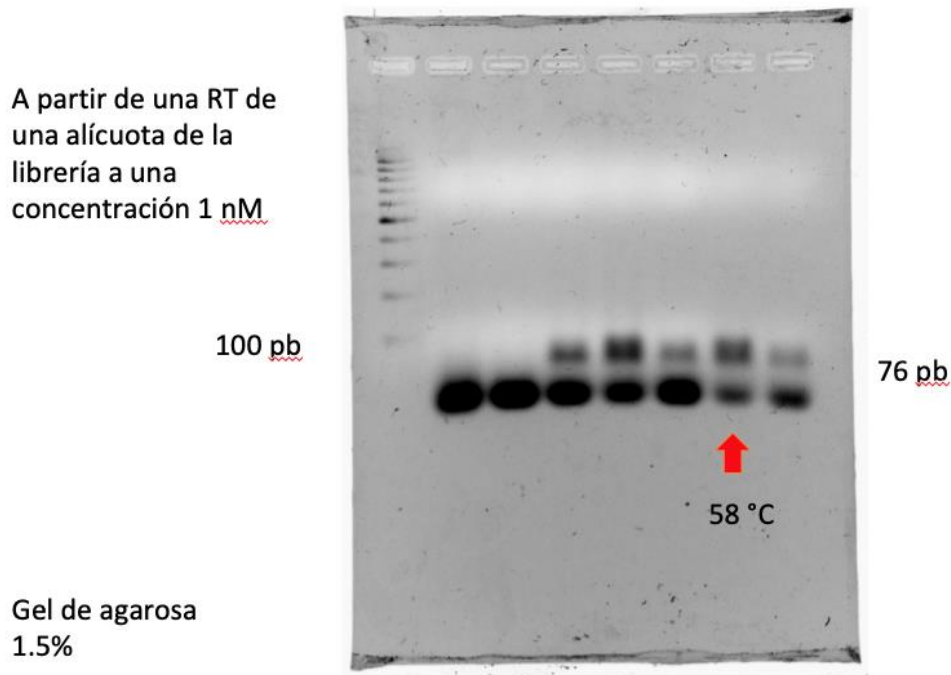


Figura 26. Gel de agarosa de los productos de PCR a diferentes T_m . Se evaluaron diferentes temperaturas de T_m desde 52 °C hasta 60 °C. La flecha roja indica los productos de PCR a una temperatura de 58 °C.

Se seleccionó la T_m de 58 °C y se realizó la PCR con los cDNA obtenidos de los productos del cell-SELEX; sin embargo, no se observó amplificación en los fragmentos correspondientes a los aptámeros que debieron unirse a las células VCaP y LNCaP (**Figura 27**).

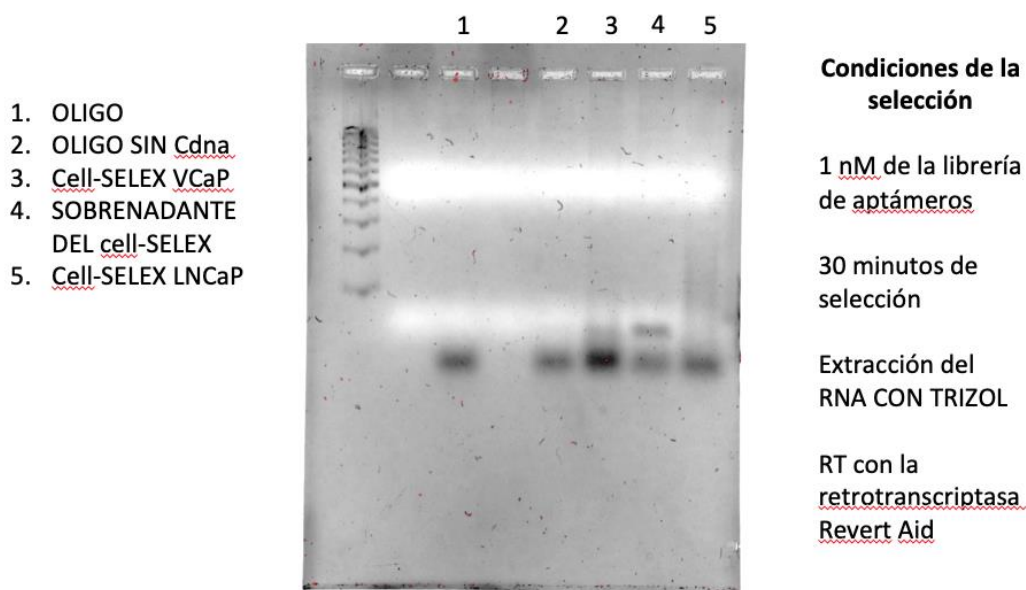


Figura 27. Gel de agarosa de los productos de PCR del cell-SELEX. Se evaluaron los productos de amplificación de PCR de la selección de aptámeros en células VCaP (línea 3), células LNCaP (línea 5).

Para mejorar el proceso de cell-SELEX se repitió el ensayo modificando las condiciones de concentración de la librería y modificando el tiempo de exposición de la librería con las células. Se colocaron dos concentraciones de la librería, una a 1 nM y la otra a 10 nM. Además, se aumentó el tiempo de exposición de la librería con las células pasando de 30 a 45 minutos en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂ y en agitación suave.

Purificación de las bandas de DNA

Una vez que se logró la amplificación de los aptámeros producto del cell-SELEX, se purificaron del gel aquellas bandas cuyo peso molecular correspondía con el tamaño de los aptámeros (76 nucleótidos). Para esto, se utilizó el kit comercial (MiniELUTE Gel de Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

cell-SELEX (nuevas condiciones)

Se realizaron cambios a las condiciones de concentración y tiempo de incubación del cell-SELEX, esto fue con la finalidad de obtener la amplificación de los aptámeros que se unieron a las células VCaP.

Condiciones que se modificaron:

- Mayor tiempo de incubación con la librería: 45 min.
- No se realizó selección negativa con LNCaP
- Se probaron 2 concentraciones de la librería: 1 nM y 10 nM.

Después de realizar los cambios, se observaron bandas que podrían corresponder a los aptámeros; sin embargo, en este ensayo no se realizó una selección negativa (**Figura 28**).

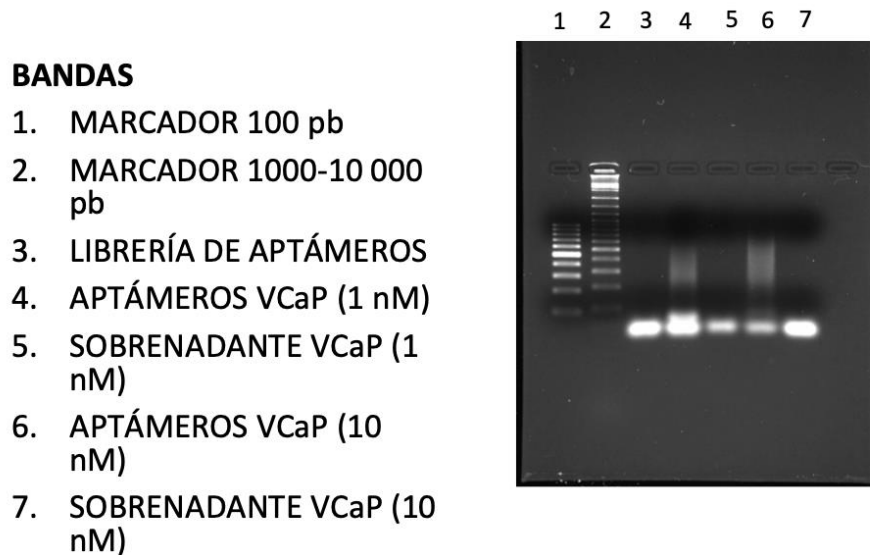


Figura 28. Gel de los productos de cell-SELEX con cambio en las condiciones en VCaP. Se evaluaron diferentes muestras de la selección SELEX a concentraciones 1nM y 10nM. En la línea 3 se muestra el perfil de bandeo de la librería de aptámeros sin amplificación.

Secuenciación y análisis

Una alícuota de los aptámeros obtenidos a una concentración de 90 ng/ul se entregó al área de secuenciación del INMGEN. Después de la lectura de secuenciación, se obtuvieron 2 archivos: el archivo R1 y el archivo R2. Los datos de secuenciación fueron analizados de la siguiente manera:

1. Los archivos de secuenciación pueden o no estar comprimidos, de estar descomprimidos, es necesario descomprimirlos para tener acceso a los formatos FASTq.
2. Se descargó el programa PSPad, el cual pudo obtenerse de manera gratuita desde el siguiente enlace de internet: <https://en.softonic.com/download/pspad/windows/post-download>
3. Una vez instalado el programa, se abrió el archivo desde la carpeta y no desde el programa. Se realizó siguiendo la siguiente ruta: EQUIPO/UNIDAD C/ARCHIVOS DE PROGRAMA/PSPAD.
4. El programa abre un texto en el que se pueden las identificar diferentes secuencias, con las siguientes etiquetas:
 - a. IDENTIFICADOR
 - b. SECUENCIA
 - c. +
 - d. CALIDAD
5. Se buscaron en todo el documento las secuencias que corresponden a las secuencias de los aptámeros.
6. Se copiaron todas las secuencias y se pegaron en un archivo nuevo TXT para realizar el alineamiento.

Se obtuvieron más de 60,000 secuencias de aptámeros después del filtrado de los datos. Posteriormente, se seleccionaron 10 secuencias para los ensayos piloto, y se analizaron mediante la herramienta por internet Clustal Omega/DNA/OUTPUTSELEX (**Figura 29**).


```

#=SQ 10      -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 1       -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 8       -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 9       -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 4       -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 7       -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 5       -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 3       -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 2       -1.0000 - - 0..0::0 -
#=SQ 6       -1.0000 - - 0..0::0 -

10      -----AAACCAACTAGTCGCTGCCTTGCGGCAGAC
1        -----GTACACAGAACGGCACACCCCTGGTTGCGGC-
8        -----TTCGCAAAACCTCACTTACTGATACCGAAG
9        -ATCGTTGGTTGATCACCTTAGCGTGTGTTG-----
4        -----C---GGCCACCCTAGAGTCCCGAGCAACCCAA-
7        ---GCA----AAAGTACTTGTGGGAGTAAAATGCGCC---
5        ---GCTA---AGGTAACCATAAGCCATAAAGTTAGC----
3        CATTTTCT--GTTAACCCCTCCGTACATACAGC-----
2        -----GGCCAACGTGCGGGGATACAGTTTACCGCC
6        -----G--CGCTGCTACAAGGGCGTCCAGCTTGAGGC-

```

Figura 29. Alineamiento de 10 secuencias de aptámeros. Se muestran las regiones aleatorias de los aptámeros compuestas de 30 nucleótidos. El análisis se realizó con la plataforma Clustal Omega la cual permite alinear hasta 4,000 secuencias en un acorrida. Fuente: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Mediante un análisis por cladograma se ordenaron las secuencias para identificar los agrupamientos por familias y se seleccionaron dos secuencias (10 y 9) para ser modeladas en 2D y 3D (**Figura 30**).

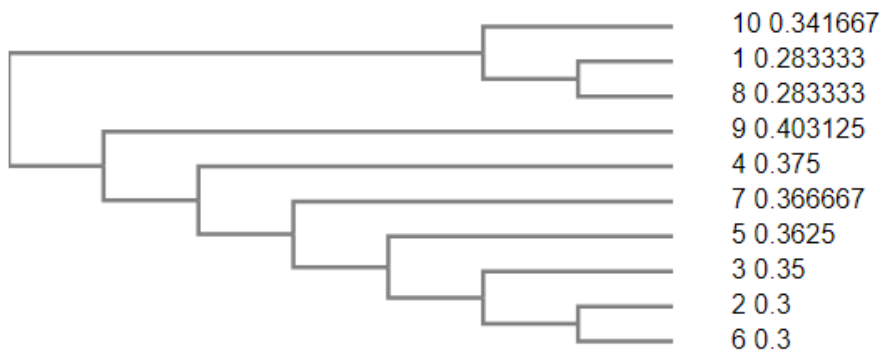


Figura 30. Cladograma de 10 secuencias de aptámeros. Se observa la formación de dos grupos de familias: 1) en la parte superior las secuencias 10, 1 y 8; y 2) en la parte inferior 9, 4 7, 5, 3, 2, y 6.

El modelamiento 2D de las estructuras secundarias se llevó a cabo mediante el programa RNAfold Web Server (**Figura 31**).

Ejemplo 2D con la secuencia 9:

La energía libre del conjunto termodinámico es: **-3.53 kcal / mol**

La frecuencia de la estructura MFE en el conjunto es: **30,57 %**

La diversidad del conjunto es: **4.93**

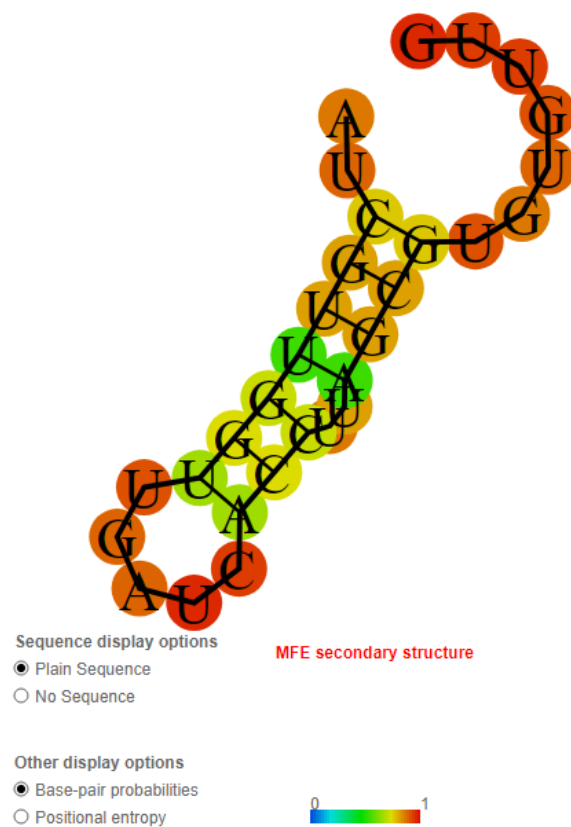


Figura 31. Modelamiento 2D de la secuencia del aptámero (secuencia número 9). Los colores indican la intensidad de la energía mínima libre (MFE, inglés). Cuando los colores se acercan más al rojo indica un MFE más bajo y mayor formación de auto-plegamientos.

El modelamiento 3D se realizó en la plataforma “RNA composer” (**Figura 32**) como se describe a continuación:

Task identifier: d9798812-d749-4116-b4cf-6b54585615ac
Task description: secuencia9
Sequence: AUCGUUGGUUGAUCACCUUAGCGUGUGUUG
Secondary structure:..(((((((.....)))..)))).....



Figura 32. Modelamiento 3D de la secuencia 9 de los aptámeros. Se muestra la figura final compuesta de cadenas STEM y LOOPS a partir de un análisis de fragmentación 2D usando la base de datos RNA FRABASE.
<http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>

Discusión

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la proteína SFRP1 exógena en las células CaP que expresan la fusión TMPRSS2-ERG. La proteína SFRP1 pertenece a la vía de señalización de WNT y regula la señalización junto con otras proteínas relacionadas a la vía WNT como las proteínas WNT3a, WIF-1 y Cerberus (Foronjy et al., 2010; Morin, 1999). Hasta donde sabemos, no hay trabajos a la fecha que evalúen el papel de la proteína SFRP1 en CaP positivo a TMPSS2-ERG. Reportes científicos anteriores han mostrado que SFRP1 se expresa a bajo nivel en tumores de CaP y en líneas celulares; sin embargo, no hay reportes sobre esto en modelos de CaP con la fusión TMPRSS2-ERG (García-Tobilla et al., 2016; Lodygin et al., 2005). Primero, se realizó una exploración *in silico* utilizando bases de datos y ratificamos que SFRP1 se encuentra expresado a la baja en muestras tumorales que expresan TMPRSS2-ERG. Se observó también una pobre correlación positiva entre la expresión de SFRP1 y ERG en muestras de CaP, esto era esperado. La expresión de SFRP1 fue baja en las células CaP en comparación con la expresión elevada en las células prostáticas no malignas del estroma y del epitelio. Esto se encuentra en línea con los reportes anteriores; sin embargo, estos informes no tuvieron en cuenta la presencia de TMPRSS2-ERG (Ghoshal & Ghosh, 2015; Lodygin et al., 2005; Thiele et al., 2011; Zheng et al., 2015). Es importante destacar que trabajos anteriores han demostrado que la proteína SFRP1 podría ser un modulador importante en la comunicación estroma-epitelial promoviendo la progresión del CaP (Joesting et al., 2008; Joesting, Perrin, Elenbaas, Joesting, et al., 2005). Recientemente, se ha mostrado que SFRP1 podría tener efectos bifásicos dependiendo de la concentración a la que se administra o a la concentración que se encuentra en el espacio extracelular, teniendo en cuenta esto, se evaluó en nuestro trabajo el efecto de SFRP1 a bajas concentraciones; esto con el objetivo de asemejarlo a las posibles concentraciones que tiene la proteína exógena cuando es secretada por el estroma (Liang et al., 2019; Xavier et al., 2014)

En las células LNCaP y 22RV1, SFRP1 ha sido reportado como un regulador negativo de la actividad transcripcional del AR (Y. Kawano et al., 2009), el mismo

efecto se observó en nuestro estudio en las células LNCaP cuando se midió la expresión de *KLK3* (ARNm) y PSA (proteína). Sin embargo, en las células VCaP (positivas a TMPRSS2-ERG); a diferencia de LNCaP, SFRP1 promovió la expresión de ERG y se observó la translocación del AR hacia el núcleo celular. Además, usando inmunofluorescencia y RT-qPCR, se corroboró que el efecto de SFRP1 depende de la translocación del AR, pero no de cambios en su expresión. Esto se encuentra en línea con reportes anteriores donde ERG disminuye la expresión de AR (Yu et al., 2010). Estos resultados indican que el AR aumenta su actividad transcripcional en presencia de la proteína SFRP1, activando genes sensibles a los andrógenos como ERG. No está claro por qué la proteína SFRP1 tiene efectos opuestos entre las células LNCaP y VCaP, pero esto podría explicar de alguna manera, las diferencias que existen entre diferentes pacientes con tumores que tienen diferentes características moleculares asociadas a la heterogeneidad tumoral. Por ejemplo, se ha observado que los receptores AR de LNCaP y de VCaP comparten cerca del 61 % de las regiones de unión al AR; sin embargo, en las células VCaP superpuestas a los sitios de unión a ERG en estos sitios, se observan diferencias significativas en la actividad del AR entre VCaP y LNCaP (Barneda-Zahonero & Parra, 2012; Y. Kawano et al., 2009; Medici et al., 2006; Thiele et al., 2011; Yu et al., 2010). Evidentemente las células LNCaP son células de CaP negativas para la fusión TMPRSS2-ERG y representan una etapa de la enfermedad que no es resistente a la castración. Las células LNCaP se aislaron de una lesión metastásica en el ganglio linfático supraclavicular y el paciente no recibió terapia de bloqueo de andrógenos (Steele et al., 2006; van Steenbrugge et al., 1991). Por el contrario, las células VCaP son positivas para la fusión TMPRSS2-ERG, y se aislaron de una lesión metastásica al hueso vertebral, además de que el paciente recibió terapia de bloqueo de andrógenos (Loberg et al., 2006).

Se realizaron ensayos de viabilidad celular y de ciclo celular para evaluar el impacto funcional de la proteína SFRP1 exógena sobre las células de CaP. En las células LNCaP tratadas con SFRP1 solo se observó una disminución no significativa en el porcentaje de células en la fase S y un aumento en la fase G1 del ciclo celular. Esto

podría estar en línea con los reportes previos donde se ha observado que SFRP1 afecta la viabilidad celular mediante la formación de colonias (Y. Kawano et al., 2009). En el caso de las células VCaP, no se observaron diferencias significativas y/o alguna tendencia de cambio tanto en la viabilidad como en el ciclo celular después de ser tratadas con la proteína SFRP1. Es importante tener en cuenta que se ha reportado que las células VCaP tienen una baja tasa de duplicación, y que ERG se ha asociado principalmente con eventos de migración e invasión celular (Gupta et al., 2010; Qu et al., 2013). Se evaluaron estas dos características neoplásicas, se observó que la proteína SFRP1 promueve tanto la migración como la invasión celular. La migración celular se midió realizando un ensayo de cicatrización de la herida y la invasión celular usando el sofisticado sistema xCELLigance, simulando una matriz extracelular con matrigel. Una gran ventaja del sistema xCELLigance es que este tipo de sistema usa placas de microtitulación ultrasensibles con microelectrodos de oro que monitorean en tiempo real a las células que migran desde la superficie hacia al fondo de la placa. Se registraron los cambios en la invasión celular en tiempo real cada 15 minutos durante 72 horas y se observó un aumento significativo en la invasión celular desde las primeras horas del experimento. Dado que LEF-1 ha sido relacionado con la progresión tumoral y la metástasis, y se ha reportado que este gen está regulado por ERG, medimos su expresión en las células VCaP después del tratamiento con la proteína SFRP1 exógena (Gupta et al., 2010; Kobayashi & Ozawa, 2013; Qu et al., 2013). El tratamiento promovió la expresión de LEF-1, un gen involucrado en la parte final de la cascada señalización WNT; sin embargo, esto necesita más investigación para establecer en este caso, si existe una activación completa de la señalización de WNT o solo parcial en las células positivas a TMPRSS2-ERG. Finalmente, para determinar el efecto de la proteína SFRP1 en las células CaP *in vivo*, realizamos un modelo piloto de xenotransplante murino utilizando células VCaP. Solo hay pocos estudios de xenotransplantes establecidos a partir de células VCaP en modelos murinos; y de ellos, pocos evalúan el efecto de SFRP1 en ausencia de andrógenos (Steele et al., 2006). Se realizó una cirugía de castración cuando el tumor alcanzó los 300 mm³ y después de diez semanas de tratamiento con SFRP1 administrada

subcutáneamente se evaluó el crecimiento tumoral. Se observó que la proteína SFRP1 aumentó el tamaño de los tumores al parecer por un aumento en la proliferación celular ya que aumentaron los niveles de Ki-67. También se observó una tendencia hacia altos niveles de PSA humano en suero de ratones. Los tejidos de los xenotransplantes tuvieron un aumento significativo en la expresión de ERG tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel de proteína por IHC, RT-qPCR y W.B. Anteriormente, los reportes científicos han descrito cómo SFRP1 puede interactuar con receptores Frizzled, LRP5 / 6, Ror; con las proteínas WNT; e incluso con proteínas antagonistas como las proteínas SFRP's. En este trabajo mostramos que bajas concentraciones de la proteína SFRP1 exógena tienen efectos neoplásicos en las células de CaP (VCaP) que expresan la fusión TMPRS2-ERG. Si bien dichas células expresan bajas concentraciones de SFRP1 es posible que el estroma contribuya con proteína SFRP1 promoviendo indirectamente la activación del AR y la expresión elevada de ERG. Para enriquecer este trabajo sería bueno realizar experimentos de comunicación estroma-epitelio in vitro a diferentes gradientes de concentración SFRP1 para establecer si el efecto de SFRP1 se mantiene o cambia en estas condiciones. A la fecha se sabe que el 50 % de los tumores de CaP tienen la fusión TMPRSS2-ERG, la cual les confiere capacidades neoplásicas dependientes de la actividad del AR. Aunque ERG es un regulador negativo de la expresión del AR, y el AR promueve a su vez la expresión de ERG; podrían existir otros mecanismos moleculares exógenos como la proteína SFRP1 que podrían desregular la red AR-ERG promoviendo la progresión del CaP. Sin embargo, más investigación es necesaria para aclarar con exactitud qué receptores podrían unirse a SFRP1, así como las moléculas de señalización río abajo del AR en las células VCaP positivas a TMPRSS2-ERG (**Figura 33**) (Chandran et al., 2009; Yoshiaki Kawano & Kypta, 2003). Aunque se ha propuesto a TMPRSS2-ERG como un marcador de CaP, actualmente casi no se realizan estudios de rutina en la clínica para evaluar la expresión del gen de fusión, y prácticamente son inexistentes para evaluar la expresión de proteínas como SFRP1 (Sanguedolce et al., 2016; Zheng et al., 2015). Se ha mostrado cada vez más evidencia de que TMPRSS2-ERG contribuye a la progresión del CaP. Sin embargo hasta donde sabemos,

actualmente no hay un fármaco de uso en la clínica que se dirija específicamente hacia la fusión TMPRSS2-ERG (Butler et al., 2017; Urbinati et al., 2016). Los fármacos que podrían usarse comprenden los fármacos actualmente usados bloquear la acción de los andrógenos, sin embargo, estos fármacos dejan de ser efectivos al paso del tiempo. Como parte de este trabajo se realizaron experimentos piloto para obtener una herramienta de tratamiento del CaP dirigida hacia la fusión de TMPRSS2-ERG basada en aptámeros. Si bien los aptámeros son una herramienta molecular que actualmente es muy estudiada en cáncer, su diseño y obtención presenta algunas variables importantes que deben ser tomadas en cuenta como: la presión de selección, ultra-purificación en los pasos de amplificación y, seguimiento del enriquecimiento por citometría o secuenciación (Ruiz Ciancio et al., 2018). Se realizaron experimentos de selección y amplificación de aptámeros mediante la técnica de SELEX y se obtuvieron posibles candidatos de aptámeros que podrían unirse a las células VCaP. Posterior a la selección se mostraron ejemplos del análisis de los aptámeros obtenidos después de la secuenciación. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos que consideren las variables antes señaladas para mejorar la selección. Una vez mejoradas estas variables se podrá realizar la síntesis de los aptámeros candidatos (2 o más aptámeros) para su validación en un modelo de CaP. Dichos aptámeros pueden ser acoplados a fármacos o incluso siRNA's para abatir la expresión de TMPRSS2-ERG.

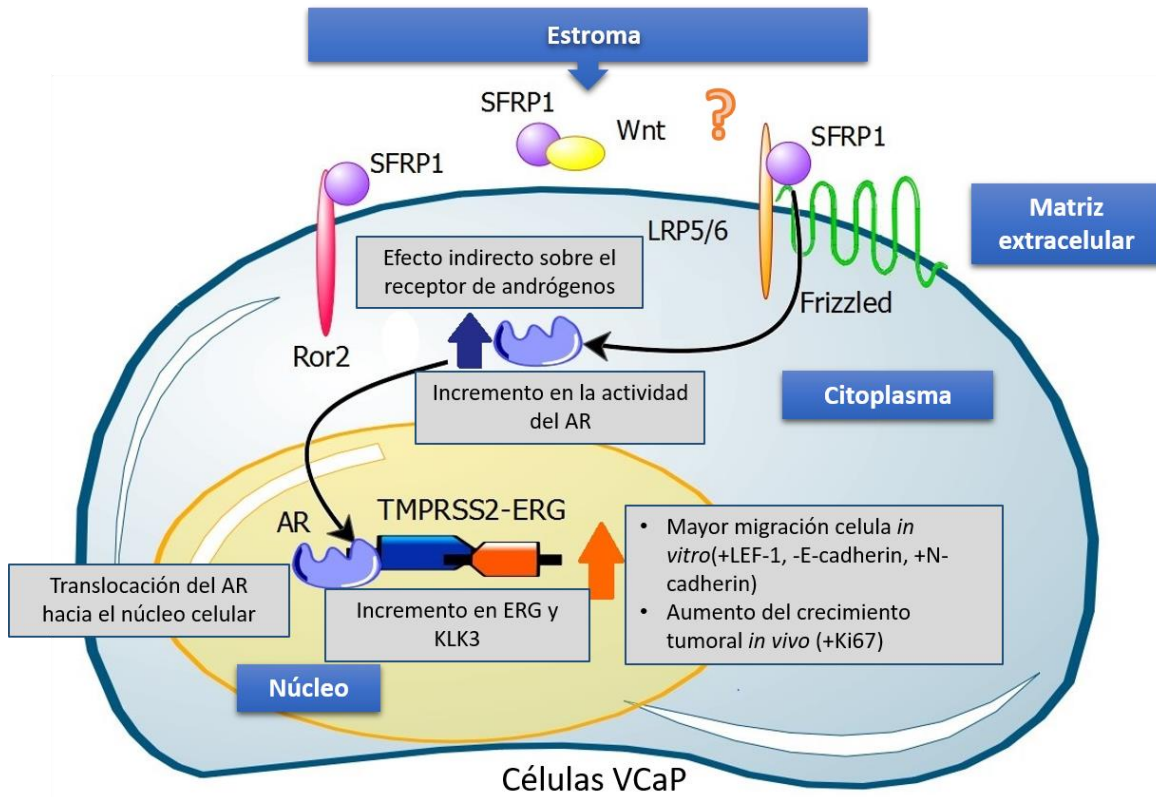


Figura 33. Esquema del efecto de la proteína SFRP1 en células VCaP. La proteína SFRP1 exógena induce un efecto indirecto sobre la actividad transcripcional del receptor de andrógenos lo que promueve la migración celular *in vitro* y el crecimiento celular *in vivo*.

Conclusiones

La proteína SFRP1 tiene efectos divergentes entre las células LNCaP (negativas a TMPRSS2-ERG) y las células VCaP (positivas a TMPRSS2-ERG). En las células VCaP, SFRP1 promueve la actividad transcripcional del AR y aumenta la expresión de la fusión TMPRSS2-ERG. Este efecto aumenta la migración y la invasión celular *in vitro* y el crecimiento celular en xenotransplantes murinos *in vivo*. Esto podría explicarse por la participación de moléculas exógenas del estroma como la proteína SFRP1 la cual podría estar activando la señalización del AR en tumores que expresan TMPRSS2-ERG. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que evalúa el papel de la proteína SFRP1 exógena sobre células VCaP; sin embargo, se necesitan más experimentos para establecer por completo cuáles son los mecanismos moleculares que tiene la proteína SFRP1 en el cáncer de próstata positivo a la fusión TMPRSS2-ERG.

El diseño de una quimera APTÁMERO-siRNA podría servir a futuro para el silenciamiento célula-específico de genes que promueven el desarrollo tumoral en diferentes tipos de cáncer. Los resultados de aptámeros obtenidos en este trabajo corresponden a ensayos piloto de cell-SELEX, secuenciación y modelamiento 3D. Sin embargo, es necesario dar seguimiento a estos resultados para demostrar que es posible obtener un aptámero funcional que se una a células de CaP, se internalice y pueda entregar un siRNA para disminuir la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*.

Perspectivas

- Investigar con detalle a qué receptores se une la proteína SFRP1 y qué cascadas de señalización podría desencadenar en las células de CaP.
- A futuro, podría ser útil determinar la co-expresión de SFRP1 (en el estroma) y TMPRSS2-ERG (en el epitelio) para mejorar el pronóstico y el tratamiento de los pacientes con CaP. Realizar más experimentos para enriquecer a los aptámeros y lograr demostrar que son específicos de este tipo de células.

Referencias

- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. En *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Adisetiyo, H., Liang, M., Liao, C.-P., Jeong, J. H., Cohen, M. B., Roy-Burman, P., & Frenkel, B. (2014). Dependence of castration-resistant prostate cancer (CRPC) stem cells on CRPC-associated fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, *229*(9), 1170–1176. <https://doi.org/10.1002/jcp.24546>
- Akita, K., Harada, K., Ichihara, J., Takata, N., Takahashi, Y., & Saito, K. (2013). A novel selective androgen receptor modulator, NEP28, is efficacious in muscle and brain without serious side effects on prostate. *European Journal of Pharmacology*, *720*(1–3), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.042>
- Alaia, C., Boccellino, M., Zappavigna, S., Amler, E., Quagliuolo, L., Rossetti, S., Facchini, G., & Caraglia, M. (2018). Ipilimumab for the treatment of metastatic prostate cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *18*(2), 205–213. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1420777>
- Alkhamis, O., Canoura, J., Yu, H., Liu, Y., & Xiao, Y. (2019). Innovative engineering and sensing strategies for aptamer-based small-molecule detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *121*, 115699. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115699>
- Almasi, F., Mousavi Gargari, S. L., Bitaraf, F., & Rasoulinejad, S. (2016). Development of a Single Stranded DNA Aptamer as a Molecular Probe for LNCap Cells Using Cell-SELEX. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, *8*(3), 104–111.

- Antonarakis, E. S. (2018). AR Signaling in Human Malignancies: Prostate Cancer and Beyond. *Cancers*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/cancers10010022>
- Asatiani, E., & Gelmann, E. P. (2005). Targeted therapies for prostate cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *9*(2), 283–298.
<https://doi.org/10.1517/14728222.9.2.283>
- Atabi, F., Mousavi Gargari, S. L., Hashemi, M., & Yaghmaei, P. (2017). Doxorubicin Loaded DNA Aptamer Linked Myristilated Chitosan Nanogel for Targeted Drug Delivery to Prostate Cancer. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, *16*(1), 35–49.
- Baek, S. E., Lee, K. H., Park, Y. S., Oh, D.-K., Oh, S., Kim, K.-S., & Kim, D.-E. (2014). RNA aptamer-conjugated liposome as an efficient anticancer drug delivery vehicle targeting cancer cells in vivo. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, *196*, 234–242.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.018>
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., & Aaronson, S. A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nature Cell Biology*, *3*(7), 683–686. <https://doi.org/10.1038/35083081>
- Baharudin, R., Tieng, F. Y. F., Lee, L.-H., & Ab Mutalib, N. S. (2020). Epigenetics of SFRP1: The Dual Roles in Human Cancers. *Cancers*, *12*(2).
<https://doi.org/10.3390/cancers12020445>
- Barneda-Zahonero, B., & Parra, M. (2012). Histone deacetylases and cancer. *Molecular Oncology*, *6*(6), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.07.003>

- Berezovski, M. V., Lechmann, M., Musheev, M. U., Mak, T. W., & Krylov, S. N. (2008). Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBiD). *Journal of the American Chemical Society*, *130*(28), 9137–9143. <https://doi.org/10.1021/ja801951p>
- Berger, M. F., Lawrence, M. S., Demichelis, F., Drier, Y., Cibulskis, K., Sivachenko, A. Y., Sboner, A., Esgueva, R., Pflueger, D., Sougnez, C., Onofrio, R., Carter, S. L., Park, K., Habegger, L., Ambrogio, L., Fennell, T., Parkin, M., Saksena, G., Voet, D., ... Garraway, L. A. (2011). The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*, *470*(7333), 214–220. <https://doi.org/10.1038/nature09744>
- Berry, P. A., Maitland, N. J., & Collins, A. T. (2008). Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *288*(1–2), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.024>
- Berx, G., & van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. En *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003129>
- Bill-Axelson, A., Holmberg, L., Garmo, H., Rider, J. R., Taari, K., Busch, C., Nordling, S., Häggman, M., Andersson, S. O., Spaňgberg, A., Andreń, O., Palmgren, J., Steineck, G., Adami, H. O., & Johansson, J. E. (2014). Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311593>
- Binnerts, M. E., Kim, K.-A., Bright, J. M., Patel, S. M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J. M., Liu, Y., Lomas, W. E., Dixon, M., Hazell, S. A., Wagle, M., Nie, W.-S., Tomasevic, N.,

- Williams, J., Zhan, X., Levy, M. D., Funk, W. D., & Abo, A. (2007). R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(37), 14700–14705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702305104>
- Birdsey, G. M., Dryden, N. H., Amsellem, V., Gebhardt, F., Sahnan, K., Haskard, D. O., Dejana, E., Mason, J. C., & Randi, A. M. (2008). Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood*, *111*(7), 3498–3506. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-105346>
- 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*, *121*(Pt 6), 737–746. <https://doi.org/10.1242/jcs.026096>
- 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. <https://doi.org/10.5507/bp.2014.065>
- Bussemakers, M. J. G., Van Bokhoven, A., Verhaegh, G. W., Smit, F. P., Karthaus, H. F. M., Schalken, J. A., Debruyne, F. M. J., Ru, N., & Isaacs, W. B. (1999). DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*.
- Butler, M. S., Roshan-Moniri, M., Hsing, M., Lau, D., Kim, A., Yen, P., Mroczek, M., Nouri, M., Lien, S., Axerio-Cilies, P., Dalal, K., Yau, C., Ghaidi, F., Guo, Y., Yamazaki, T., Lawn, S., Gleave, M. E., Gregory-Evans, C. Y., McIntosh, L. P., ... Cherkasov, A.

- (2017). Discovery and characterization of small molecules targeting the DNA-binding ETS domain of ERG in prostate cancer. *Oncotarget*, 8(26), 42438–42454. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17124>
- Cabarkapa, S., Perera, M., McGrath, S., & Lawrentschuk, N. (2016). Prostate cancer screening with prostate-specific antigen: A guide to the guidelines. *Prostate International*, 4(4), 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.pnil.2016.09.002>
- Carter, N. J., & Keam, S. J. (2014). Degarelix: A review of its use in patients with prostate cancer. *Drugs*, 74(6), 699–712. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0211-y>
- Carver, B. S., Chapinski, C., Wongvipat, J., Hieronymus, H., Chen, Y., Chandarlapaty, S., Arora, V. K., Le, C., Koutcher, J., Scher, H., Scardino, P. T., Rosen, N., & Sawyers, C. L. (2011). Reciprocal Feedback Regulation of PI3K and Androgen Receptor Signaling in PTEN-Deficient Prostate Cancer. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.04.008>
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., Jacobsen, A., Byrne, C. J., Heuer, M. L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A. P., Sander, C., & Schultz, N. (2012). The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discovery*, 2(5), 401–404. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
- Cereda, V., Formica, V., & Roselli, M. (2018). Issues and promises of bevacizumab in prostate cancer treatment. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 18(6), 707–717. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1479737>

- Chai, C., Xie, Z., & Grotewold, E. (2011). SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment), as a powerful tool for deciphering the protein-DNA interaction space. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 754, 249–258.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-154-3_14
- Chandran, D., Bergmann, F. T., & Sauro, H. M. (2009). TinkerCell: Modular CAD tool for synthetic biology. *Journal of Biological Engineering*, 3(1), 19.
<https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-19>
- Chen, L., He, W., Jiang, H., Wu, L., Xiong, W., Li, B., Zhou, Z., & Qian, Y. (2019). In vivo SELEX of bone targeting aptamer in prostate cancer bone metastasis model. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 149–159.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S188003>
- Chen, R., & Chen, B. (2015). Siltuximab (CNTO 328): A promising option for human malignancies. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3455–3458.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S86438>
- Chen, Y., Clegg, N. J., & Scher, H. I. (2009). Antiandrogens and androgen depleting therapies in prostate cancer: Novel agents for an established target. *The lancet oncology*, 10(10), 981–991. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70229-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70229-3)
- Chen, Z., Tai, Z., Gu, F., Hu, C., Zhu, Q., & Gao, S. (2016). Aptamer-mediated delivery of docetaxel to prostate cancer through polymeric nanoparticles for enhancement of antitumor efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 107, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.07.007>

- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2203>
- Chu, D.-T., Bac, N. D., Nguyen, K.-H., Tien, N. L. B., Thanh, V. V., Nga, V. T., Ngoc, V. T. N., Anh Dao, D. T., Hoan, L. N., Hung, N. P., Trung Thu, N. T., Pham, V.-H., Vu, L. N., Pham, T. A. V., & B. Thimiri Govinda Raj, D. (2019). An Update on Anti-CD137 Antibodies in Immunotherapies for Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081822>
- Ciani, L., & Salinas, P. C. (2007). C-Jun N-terminal kinase (JNK) cooperates with Gsk3beta to regulate Dishevelled-mediated microtubule stability. *BMC Cell Biology*, *8*, 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-27>
- Cooper, S. J., von Roemeling, C. A., Kang, K. H., Marlow, L. A., Grebe, S. K., Menefee, M. E., Tun, H. W., Colon-Otero, G., Perez, E. A., & Copland, J. A. (2012). Re-expression of tumor suppressor, sFRP1, leads to antitumor synergy of combined HDAC and methyltransferase inhibitors in chemoresistant cancers. *Molecular cancer therapeutics*, *11*(10), 2105–2115. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0873>
- Crawford, E. D. (2004). Hormonal Therapy in Prostate Cancer: Historical Approaches. *Reviews in Urology*, *6*(Suppl 7), S3–S11.
- Crawford, E. D., Heidenreich, A., Lawrentschuk, N., Tombal, B., Pompeo, A. C. L., Mendoza-Valdes, A., Miller, K., Debruyne, F. M. J., & Klotz, L. (2019). Androgen-targeted

therapy in men with prostate cancer: Evolving practice and future considerations.

Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 22(1), 24–38.

<https://doi.org/10.1038/s41391-018-0079-0>

Cruciat, C.-M., & Niehrs, C. (2013). Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), a015081.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015081>

Danila, D. C., Heller, G., Gignac, G. A., Gonzalez-Espinoza, R., Anand, A., Tanaka, E., Lilja, H., Schwartz, L., Larson, S., Fleisher, M., & Scher, H. I. (2007). Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1506>

Dassie, J. P., Hernandez, L. I., Thomas, G. S., Long, M. E., Rockey, W. M., Howell, C. a, Chen, Y., Hernandez, F. J., Liu, X. Y., Wilson, M. E., Allen, L.-A., Vaena, D. a, Meyerholz, D. K., & Giangrande, P. H. (2014). Targeted inhibition of prostate cancer metastases with an RNA aptamer to prostate specific membrane antigen (PSMA). *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(11), 1910–1922.

<https://doi.org/10.1038/mt.2014.117>

DeBerardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>

Deng, B., Lin, Y., Wang, C., Li, F., Wang, Z., Zhang, H., Li, X.-F., & Le, X. C. (2014). Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example--a review. *Analytica Chimica Acta*, 837, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.055>

- Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (2002). A history of prostate cancer treatment. En *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc801>
- Díaz-Fernández, A., Miranda-Castro, R., de-Los-Santos-Álvarez, N., Rodríguez, E. F., & Lobo-Castañón, M. J. (2019). Focusing aptamer selection on the glycan structure of prostate-specific antigen: Toward more specific detection of prostate cancer. *Biosensors & Bioelectronics*, *128*, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.040>
- Dole, E. J., & Holdsworth, M. T. (1997). Nilutamide: An antiandrogen for the treatment of prostate cancer. *The Annals of Pharmacotherapy*, *31*(1), 65–75. <https://doi.org/10.1177/106002809703100112>
- Dong, Y., Zhang, H., Gao, A. C., Marshall, J. R., & Ip, C. (2005). Androgen receptor signaling intensity is a key factor in determining the sensitivity of prostate cancer cells to selenium inhibition of growth and cancer-specific biomarkers. *Molecular Cancer Therapeutics*, *4*(7), 1047–1055. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0124>
- Duan, M., Long, Y., Yang, C., Wu, X., Sun, Y., Li, J., Hu, X., Lin, W., Han, D., Zhao, Y., Liu, J., Ye, M., & Tan, W. (2016). Selection and characterization of DNA aptamer for metastatic prostate cancer recognition and tissue imaging. *Oncotarget*, *7*(24), 36436–36446. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9262>
- Fan, X., Guo, Y., Wang, L., Xiong, X., Zhu, L., & Fang, K. (2016). Diagnosis of prostate cancer using anti-PSMA aptamer A10-3.2-oriented lipid nanobubbles. *International Journal of Nanomedicine*, *11*, 3939–3950. <https://doi.org/10.2147/IJN.S112951>

Farokhzad, O. C., Jon, S., Khademhosseini, A., Tran, T. T., Lavan, D. a, & Langer, R. (2004).

Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates: A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates: A New Approach for Targeting Prostate Cancer Cells. 7668–7672. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2550>

Fedchenko, N., & Reifenrath, J. (2014). Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—A review.

Diagnostic Pathology, 9, 221. <https://doi.org/10.1186/s13000-014-0221-9>

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2019a). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. En *International Journal of Cancer*.

<https://doi.org/10.1002/ijc.31937>

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2019b). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. En *International Journal of Cancer*.

<https://doi.org/10.1002/ijc.31937>

Ferrara, N. (2010). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.003>

Font-Tello, A., Juanpere, N., De Muga, S., Lorenzo, M., Lorente, J. A., Fumado, L., Serrano, L., Serrano, S., Lloreta, J., & Hernández, S. (2015). Association of ERG and TMPRSS2-ERG with grade, stage, and prognosis of prostate cancer is dependent on

their expression levels. *Prostate*, 75(11), 1216–1226.

<https://doi.org/10.1002/pros.23004>

Foronjy, R., Imai, K., Shiomi, T., Mercer, B., Sklepkiwicz, P., Thankachen, J., Bodine, P., & D'Armiento, J. (2010). The divergent roles of secreted frizzled related protein-1 (SFRP1) in lung morphogenesis and emphysema. *The American Journal of Pathology*, 177(2), 598–607. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090803>

Frick, J., & Aulitzky, W. (1991). Physiology of the prostate. *Infection*.

<https://doi.org/10.1007/BF01643679>

Furue, M. (2011). Epithelial Tumor, Invasion and Stroma. *Annals of Dermatology*, 23(2), 125–131. <https://doi.org/10.5021/ad.2011.23.2.125>

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Science signaling*, 6(269), pl1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>

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>

Gardner, T. A., Elzey, B. D., & Hahn, N. M. (2012). Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(4), 534–539. <https://doi.org/10.4161/hv.19795>

Ghoshal, A., & Ghosh, S. S. (2015). Expression, purification, and therapeutic implications of recombinant sFRP1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(4), 2087–2103. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1354-8>

Gleason, D. F. (1981). Histologic Grading and Staging of Prostatic Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. <https://doi.org/10.1097/00000478-198103000-00008>

Gnanapragasam, V. J., Robson, C. N., Neal, D. E., & Leung, H. Y. (2002). Regulation of FGF8 expression by the androgen receptor in human prostate cancer. *Oncogene*, 21(33), 5069–5080. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205663>

Gómez-Orte, E., Sáenz-Narciso, B., Moreno, S., & Cabello, J. (2013). Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends in Genetics: TIG*, 29(9), 545–553. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.003>

Graff, R. E., Pettersson, A., Lis, R. T., DuPre, N., Jordahl, K. M., Nuttall, E., Rider, J. R., Fiorentino, M., Sesso, H. D., Kenfield, S. a., Loda, M., Giovannucci, E. L., Rosner, B., Nguyen, P. L., Sweeney, C. J., Mucci, L. a., & Transdisciplinary Prostate Cancer Partnership ToPCaP. (2015). The TMPRSS2:ERG fusion and response to androgen

deprivation therapy for prostate cancer. *The Prostate*, 75(9), 897–906.

<https://doi.org/10.1002/pros.22973>

Gupta, S., Iljin, K., Sara, H., Mpindi, J. P., Mirtti, T., Vainio, P., Rantala, J., Alanen, K., Nees, M., & Kallioniemi, O. (2010). FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 70(17), 6735–6745. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0244>

Hägglöf, C., Hammarsten, P., Strömvall, K., Egevad, L., Josefsson, A., Stattin, P., Granfors, T., & Bergh, A. (2014). TMPRSS2-ERG Expression Predicts Prostate Cancer Survival and Associates with Stromal Biomarkers. *PLoS ONE*, 9(2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086824>

Hamula, C. L. A., Le, X. C., & Li, X.-F. (2011). DNA aptamers binding to multiple prevalent M-types of *Streptococcus pyogenes*. *Analytical Chemistry*, 83(10), 3640–3647.

<https://doi.org/10.1021/ac200575e>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. En *Cell*.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Helpap, B., & Egevad, L. (2009). Modified gleason grading. An updated review. En

Histology and Histopathology. <https://doi.org/10.14670/HH-24.661>

Hessels, D., & Schalken, J. A. (2013). Recurrent gene fusions in prostate cancer: Their clinical implications and uses. *Current Urology Reports*.

<https://doi.org/10.1007/s11934-013-0321-1>

- Hirata, H., Hinoda, Y., Shahryari, V., Deng, G., Tanaka, Y., Tabatabai, Z. L., & Dahiya, R. (2014). Genistein downregulates onco-miR-1260b and upregulates sFRP1 and Smad4 via demethylation and histone modification in prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*, *110*(6), 1645–1654. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.48>
- Holmberg, L., & Van Hemelrijck, M. (2014). The biology and natural history of prostate cancer: A short introduction. En *Recent Results in Cancer Research*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45195-9_1
- Hori, S.-I., Herrera, A., Rossi, J. J., & Zhou, J. (2018). Current Advances in Aptamers for Cancer Diagnosis and Therapy. *Cancers*, *10*(1). <https://doi.org/10.3390/cancers10010009>
- Hsieh, T. Y., Ng, C. Y., Mallouh, C., Tazaki, H., & Wu, J. M. (1996). Regulation of growth, PSA/PAP and androgen receptor expression by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in the androgen-dependent LNCaP cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *223*(1), 141–146. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0859>
- Huggins, C., & Sommer, J. L. (1953). QUANTITATIVE STUDIES OF PROSTATIC SECRETION. *The Journal of Experimental Medicine*, *97*(5), 663–680.
- Iwagawa, T., Ohuchi, S. P., Watanabe, S., & Nakamura, Y. (2012). Selection of RNA aptamers against mouse embryonic stem cells. *Biochimie*, *94*(1), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.10.017>
- Jiao, J., Zou, Q., Zou, M. H., Guo, R. M., Zhu, S., & Zhang, Y. (2016). Aptamer-modified PLGA nanoparticle delivery of triplex forming oligonucleotide for targeted prostate

cancer therapy. *Neoplasma*, 63(4), 569–575.

https://doi.org/10.4149/neo_2016_410

Jin, Y., Qu, S., Tesikova, M., Wang, L., Kristian, A., Mælandsmo, G. M., Kong, H., Zhang, T., Jerónimo, C., Teixeira, M. R., Yuca, E., Tekedereli, I., Gorgulu, K., Alpay, N., Sood, A. K., Lopez-Berestein, G., Danielsen, H. E., Ozpolat, B., & Saatcioglu, F. (2013).

Molecular circuit involving KLK4 integrates androgen and mTOR signaling in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), E2572-2581.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1304318110>

Jing, Y., Cai, M., Xu, H., Zhou, L., Yan, Q., Gao, J., & Wang, H. (2018). Aptamer-recognized carbohydrates on the cell membrane revealed by super-resolution microscopy.

Nanoscale, 10(16), 7457–7464. <https://doi.org/10.1039/c8nr00089a>

Joesting, M. S., Cheever, T. R., Volzing, K. G., Yamaguchi, T. P., Wolf, V., Naf, D., Rubin, J. S., & 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>

Joesting, M. S., Perrin, S., Elenbaas, B., Fawell, S. E., Rubin, J. S., Franco, O. E., Hayward, S. W., Cunha, G. R., & Marker, P. C. (2005). Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. *Cancer Research*, 65(22), 10423–10430. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0824>

- Joesting, M. S., Perrin, S., Elenbaas, B., Joesting, M. S., Perrin, S., Elenbaas, B., Fawell, S. E., Rubin, J. S., Franco, O. E., Hayward, S. W., Cunha, G. R., Marker, P. C., Joesting, M. S., Perrin, S., Elenbaas, B., Fawell, S. E., Rubin, J. S., Franco, O. E., Hayward, S. W., ... Marker, P. C. (2005). *Identification of SFRP1 as a Candidate Mediator of Stromal-to-Epithelial Signaling in Prostate Cancer*. *22*, 10423–10430.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0824>
- Kaarbø, M., Klokk, T. I., & Saatcioglu, F. (2007). Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *29*(12), 1227–1238.
<https://doi.org/10.1002/bies.20676>
- Kaur, H., Bruno, J. G., Kumar, A., & Sharma, T. K. (2018). Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics*, *8*(15), 4016–4032.
<https://doi.org/10.7150/thno.25958>
- 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>
- Kawano, Yoshiaki, & 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>
- Kelsey, R. (2015). Prostate cancer: Phase I study shows potential of TRC105 in mCRPC. *Nature Reviews. Urology*, *12*(1), 6. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.336>

- Kikuchi, A. (2000). Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(2), 243–248.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1860>
- Kim, Y.-C., Chen, C., & Bolton, E. C. (2015). Androgen Receptor-Mediated Growth Suppression of HPr-1AR and PC3-Lenti-AR Prostate Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138286>
- Kleven, M. D., Dlakic, M., & Lawrence, C. M. (2015). Characterization of a Single b-type Heme, FAD and Metal Binding Sites in the Transmembrane Domain of Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate (STEAP) Family Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.M115.664565.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.664565>
- Klopocki, E., Kristiansen, G., Wild, P. J., Klamann, I., Castanos-Velez, E., Singer, G., Stöhr, R., Simon, R., Sauter, G., Leibiger, H., Essers, L., Weber, B., Hermann, K., Rosenthal, A., Hartmann, A., & Dahl, E. (2004). Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors. *International Journal of Oncology*, 25(3), 641–649.
- Kobayashi, W., & Ozawa, M. (2013). The transcription factor LEF-1 induces an epithelial-mesenchymal transition in MDCK cells independent of β -catenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 442(1–2), 133–138.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.031>
- Kojima, S., Mulholland, D. J., Ettinger, S., Fazli, L., Nelson, C. C., & Gleave, M. E. (2006). Differential regulation of IGFBP-3 by the androgen receptor in the lineage-related

- androgen-dependent LNCaP and androgen-independent C4-2 prostate cancer models. *The Prostate*, 66(9), 971–986. <https://doi.org/10.1002/pros.20420>
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75.
- Kong, H. Y., & Byun, J. (2015). Screening and characterization of a novel RNA aptamer that specifically binds to human prostatic acid phosphatase and human prostate cancer cells. *Molecules and Cells*, 38(2), 171–179. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.2272>
- Korkmaz, C. G., Korkmaz, K. S., Kurys, P., Elbi, C., Wang, L., Klok, T. I., Hammarstrom, C., Troen, G., Svindland, A., Hager, G. L., & Saatcioglu, F. (2005). Molecular cloning and characterization of STAMP2, an androgen-regulated six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer. *Oncogene*, 24(31), 4934–4945. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208677>
- Kouhpayeh, S., Einizadeh, A. R., Hejazi, Z., Boshtam, M., Shariati, L., Mirian, M., Darzi, L., Sojoudi, M., Khanahmad, H., & Rezaei, A. (2016). Antiproliferative effect of a synthetic aptamer mimicking androgen response elements in the LNCaP cell line. *Cancer Gene Therapy*, 23(8), 254–257. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.26>
- Krock, B. L., Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-Induced Angiogenesis. *Genes & Cancer*, 2(12), 1117–1133. <https://doi.org/10.1177/1947601911423654>
- Krušlin, B., Ulamec, M., & Tomas, D. (2015). Prostate cancer stroma: An important factor in cancer growth and progression. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(2), 1–8. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2015.449>

- Ku, T.-H., Zhang, T., Luo, H., Yen, T. M., Chen, P.-W., Han, Y., & Lo, Y.-H. (2015). Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *15*(7), 16281–16313. <https://doi.org/10.3390/s150716281>
- Kühl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R., & Moon, R. T. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: A new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends in Genetics: TIG*, *16*(7), 279–283. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)02028-x](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02028-x)
- Kumar, S. S., & Pacey, S. (2016). The role of chemotherapy and new targeted agents in the management of primary prostate cancer. *Journal of Clinical Urology*, *9*(2 Suppl), 30–37. <https://doi.org/10.1177/2051415816685211>
- Lai, J., Kedda, M.-A., Hinze, K., Smith, R. L. G., Yaxley, J., Spurdle, A. B., Morris, C. P., Harris, J., & Clements, J. A. (2007). PSA/KLK3 ARE1 promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, *28*(5), 1032–1039. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl236>
- Lakhin, A. V., Tarantul, V. Z., & Gening, L. V. (2013). Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae*, *5*(4), 34–43.
- Lavergne, E., Hendaoui, I., Coulouarn, C., Ribault, C., Leseur, J., Eliat, P.-A., Mebarki, S., Corlu, A., Clément, B., & Musso, O. (2011). Blocking Wnt signaling by SFRP-like molecules inhibits in vivo cell proliferation and tumor growth in cells carrying active β -catenin. *Oncogene*, *30*(4), 423–433. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.432>

- Leach, J. C., Wang, A., Ye, K., & Jin, S. (2016). A RNA-DNA Hybrid Aptamer for Nanoparticle-Based Prostate Tumor Targeted Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3), 380. <https://doi.org/10.3390/ijms17030380>
- Lehmusvaara, S., Erkkilä, T., Urbanucci, A., Waltering, K., Seppälä, J., Larjo, A., Tuominen, V. J., Isola, J., Kujala, P., Lähdesmäki, H., Kaipia, A., Tammela, T. L., & Visakorpi, T. (2012). Chemical castration and anti-androgens induce differential gene expression in prostate cancer. *The Journal of Pathology*, *227*(3), 336–345. <https://doi.org/10.1002/path.4027>
- Leitzmann, M. F., & Rohrmann, S. (2012). Risk factors for the onset of prostatic cancer: Age, location, and behavioral correlates. *Clinical Epidemiology*, *4*, 1–11. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S16747>
- Lepor, H., & Shore, N. D. (2012). LHRH Agonists for the Treatment of Prostate Cancer: 2012. *Reviews in Urology*, *14*(1–2), 1–12.
- Leshem, O., Madar, S., Kogan-Sakin, I., Kamer, I., Goldstein, I., Brosh, R., Cohen, Y., Jacob-Hirsch, J., Ehrlich, M., Ben-Sasson, S., Goldfinger, N., Loewenthal, R., Gazit, E., Rotter, V., & Berger, R. (2011). TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model. *PloS One*, *6*(7), e21650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021650>
- Li, Y., Kong, D., Wang, Z., Ahmad, A., Bao, B., Padhye, S., & Sarkar, F. H. (2011). Inactivation of AR/TMPRSS2-ERG/Wnt signaling networks attenuates the aggressive behavior of prostate cancer cells. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *4*(9), 1495–1506. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0077>

- Liang, C.-J., Wang, Z.-W., Chang, Y.-W., Lee, K.-C., Lin, W.-H., & Lee, J.-L. (2019). SFRPs Are Biphasic Modulators of Wnt-Signaling-Elicited Cancer Stem Cell Properties beyond Extracellular Control. *Cell Reports*, *28*(6), 1511-1525.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.023>
- Liao, X., Thrasher, J. B., Pelling, J., Holzbeierlein, J., Sang, Q.-X. A., & Li, B. (2003). Androgen stimulates matrix metalloproteinase-2 expression in human prostate cancer. *Endocrinology*, *144*(5), 1656–1663. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0157>
- Lim, K. B. (2017). Epidemiology of clinical benign prostatic hyperplasia. *Asian Journal of Urology*, *4*(3), 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2017.06.004>
- Lin, Y.-H., Hou, C.-P., Chen, T.-H., Juang, H.-H., Chang, P.-L., Yang, P.-S., Chen, C., & Tsui, K.-H. (2018). Transurethral resection of the prostate provides more favorable clinical outcomes compared with conservative medical treatment in patients with urinary retention caused by benign prostatic obstruction. *BMC Geriatrics*, *18*.
<https://doi.org/10.1186/s12877-018-0709-3>
- Lindqvist, M., Horn, Z., Bryja, V., Schulte, G., Papachristou, P., Ajima, R., Dyberg, C., Arenas, E., Yamaguchi, T. P., Lagercrantz, H., & Ringstedt, T. (2010). Vang-like protein 2 and Rac1 interact to regulate adherens junctions. *Journal of Cell Science*, *123*(Pt 3), 472–483. <https://doi.org/10.1242/jcs.048074>
- Link, R. E., & Morton, R. A. (2001). Indications for pelvic lymphadenectomy in prostate cancer. *Urologic Clinics of North America*. [https://doi.org/10.1016/S0094-0143\(05\)70157-9](https://doi.org/10.1016/S0094-0143(05)70157-9)

- Liu, H. Y., Yu, X., Liu, H., Wu, D., & She, J.-X. (2016). Co-targeting EGFR and survivin with a bivalent aptamer-dual siRNA chimera effectively suppresses prostate cancer. *Scientific Reports*, *6*, 30346. <https://doi.org/10.1038/srep30346>
- Liu, J., You, M., Pu, Y., Liu, H., Ye, M., & Tan, W. (2011). Recent Developments in Protein and Cell-Targeted Aptamer Selection and Applications. *Current medicinal chemistry*, *18*(27), 4117–4125.
- Liu, X., Li, H., Jia, W., Chen, Z., & Xu, D. (2016). Selection of aptamers based on a protein microarray integrated with a microfluidic chip. *Lab on a Chip*, *17*(1), 178–185. <https://doi.org/10.1039/c6lc01208f>
- Loberg, R. D., St John, L. N., Day, L. L., Neeley, C. K., & Pienta, K. J. (2006). Development of the VCaP androgen-independent model of prostate cancer. *Urologic Oncology*, *24*(2), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2005.11.005>
- Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Diebold, J., & Hermeking, H. (2005). Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Research*, *65*(10), 4218–4227. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4407>
- Loeb, S., & Catalona, W. J. (2007). Prostate-specific antigen in clinical practice. *En Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.022>
- Luo, W., & Lin, S.-C. (2004). Axin: A master scaffold for multiple signaling pathways. *Neuro-Signals*, *13*(3), 99–113. <https://doi.org/10.1159/000076563>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, *17*(1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>

- Mallikaratchy, P. (2017). Evolution of Complex Target SELEX to Identify Aptamers against Mammalian Cell-Surface Antigens. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(2).
<https://doi.org/10.3390/molecules22020215>
- Martini, F. H., Timmons, M. J., & Tallitsch, R. B. (2015). Human Anatomy Eighth Edition. En *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1136/jech-2014-205171>
- Mayor, R., & Theveneau, E. (2014). The role of the non-canonical Wnt–planar cell polarity pathway in neural crest migration. *Biochemical Journal*, 457(1), 19–26.
<https://doi.org/10.1042/BJ20131182>
- McCourt, C., Maxwell, P., Mazzucchelli, R., Montironi, R., Scarpelli, M., Salto-Tellez, M., O’Sullivan, J. M., Longley, D. B., & Waugh, D. J. J. (2012). Elevation of c-FLIP in Castrate-Resistant Prostate Cancer Antagonizes Therapeutic Response to Androgen Receptor–Targeted Therapy. *Clinical Cancer Research*, 18(14), 3822–3833. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3277>
- Medici, D., Hay, E. D., & Goodenough, D. A. (2006). Cooperation between Snail and LEF-1 Transcription Factors Is Essential for TGF- β 1-induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), 1871–1879.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E05-08-0767>
- Melkonyan, H. S., Chang, W. C., Shapiro, J. P., Mahadevappa, M., Fitzpatrick, P. A., Kiefer, M. C., Tomei, L. D., & Umansky, S. R. (1997). SARPs: A family of secreted apoptosis-related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America, 94(25), 13636–13641.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13636>

Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. En *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>

Mitelman, F., Johansson, B., & Mertens, F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 233–245.

<https://doi.org/10.1038/nrc2091>

Mitra, R., & Goodman, O. B. (2015). CYP3A5 regulates prostate cancer cell growth by facilitating nuclear translocation of AR. *The Prostate*, 75(5), 527–538.

<https://doi.org/10.1002/pros.22940>

Morin, P. J. (1999). Beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 21(12), 1021–1030.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199912\)22:1<1021::AID-BIES6>3.0.CO;2-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199912)22:1<1021::AID-BIES6>3.0.CO;2-P)

P

Morris, K. N., Jensen, K. B., Julin, C. M., Weil, M., & Gold, L. (1998). High affinity ligands from in vitro selection: Complex targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 2902–2907.

<https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2902>

Morris, M. J., Eisenberger, M. A., Pili, R., Denmeade, S. R., Rathkopf, D., Slovin, S. F.,

Farrelly, J., Chudow, J. J., Vincent, M., Scher, H. I., & Carducci, M. A. (2012). A phase

- I/IIA study of AGS-PSCA for castration-resistant prostate cancer. *Annals of Oncology*, 23(10), 2714–2719. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds078>
- Munjal, A., & Leslie, S. W. (2020). Gleason Score. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553178/>
- Nelles, J. L., Hu, W.-Y., & Prins, G. S. (2011). Estrogen action and prostate cancer. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 6(3), 437–451. <https://doi.org/10.1586/eem.11.20>
- Neves, M. A. D., Slavkovic, S., Churcher, Z. R., & Johnson, P. E. (2017). Salt-mediated two-site ligand binding by the cocaine-binding aptamer. *Nucleic Acids Research*, 45(3), 1041–1048. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1294>
- Ni, L., Yang, C.-S., Gioeli, D., Frierson, H., Toft, D. O., & Paschal, B. M. (2010). FKBP51 promotes assembly of the Hsp90 chaperone complex and regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 30(5), 1243–1253. <https://doi.org/10.1128/MCB.01891-08>
- Ni, X., Zhang, Y., Zennami, K., Castanares, M., Mukherjee, A., Raval, R. R., Zhou, H., DeWeese, T. L., & Lupold, S. E. (2015). Systemic Administration and Targeted Radiosensitization via Chemically Synthetic Aptamer-siRNA Chimeras in Human Tumor Xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(12), 2797–2804. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0291-T>
- Niaz, M. O., Sun, M., Ramirez-Fort, M. K., & Niaz, M. J. (2020). Prostate-specific Membrane Antigen Based Antibody-drug Conjugates for Metastatic Castration-resistance Prostate Cancer. *Cureus*, 12(2). <https://doi.org/10.7759/cureus.7147>

- Nickel, J. C. (2011). Prostatitis. *Canadian Urological Association Journal*, 5(5), 306–315.
<https://doi.org/10.5489/cuaj.11211>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X. O., & Widmark, A. (2009). Prostate cancer-derived urine exosomes: A novel approach to biomarkers for prostate cancer. *British Journal of Cancer*.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605058>
- Niu, Y.-N., & Xia, S.-J. (2009). Stroma–epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 11(1), 28–35. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.39>
- Noaparast, Z., Hosseinimehr, S. J., Piramoon, M., & Abedi, S. M. (2015). Tumor targeting with a (99m)Tc-labeled AS1411 aptamer in prostate tumor cells. *Journal of Drug Targeting*, 23(6), 497–505. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1009075>
- Nusse, R., & Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1), 99–109. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90409-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90409-3)
- Ohuchi, S. (2012). Cell-SELEX Technology. *BioResearch Open Access*, 1(6), 265–272.
<https://doi.org/10.1089/biores.2012.0253>
- Parashar, D., Geethadevi, A., Aure, M. R., Mishra, J., George, J., Chen, C., Mishra, M. K., Tahiri, A., Zhao, W., Nair, B., Lu, Y., Mangala, L. S., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Camara, A. K. S., Liang, M., Rader, J. S., Ramchandran, R., You, M., ... Chaluvally-Raghavan, P. (2019). MiRNA551b-3p Activates an Oncostatin Signaling

- Module for the Progression of Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Reports*, 29(13), 4389-4406.e10. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.085>
- Percze, K., Szakács, Z., Scholz, É., András, J., Szeitner, Z., Kieboom, C. H. van den, Ferwerda, G., Jonge, M. I. de, Gyurcsányi, R. E., & Mészáros, T. (2017). Aptamers for respiratory syncytial virus detection. *Scientific Reports*, 7, 42794. <https://doi.org/10.1038/srep42794>
- Petronis, J. D., Regan, F., & Lin, K. (1998). Indium-111 capromab pendetide (ProstaScint) imaging to detect recurrent and metastatic prostate cancer. *Clinical Nuclear Medicine*, 23(10), 672–677. <https://doi.org/10.1097/00003072-199810000-00005>
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>
- Picardo, S. L., & Hansen, A. R. (2019). The PD-1/PD-L1 pathway in advanced prostate cancer—Have we milked this cow? *Annals of Translational Medicine*, 7(14). <https://doi.org/10.21037/atm.2019.05.86>
- Ploussard, G., & Mongiat-Artus, P. (2013). Triptorelin in the management of prostate cancer. *Future Oncology (London, England)*, 9(1), 93–102. <https://doi.org/10.2217/fon.12.158>
- Powell Gray, B., Kelly, L., Ahrens, D. P., Barry, A. P., Kratschmer, C., Levy, M., & Sullenger, B. A. (2018). Tunable cytotoxic aptamer-drug conjugates for the treatment of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(18), 4761–4766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717705115>

- Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M. (2012). Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. En *Science Translational Medicine*.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003180>
- Qu, Y., Ray, P. S., Li, J., Cai, Q., Bagaria, S. P., Moran, C., Sim, M.-S., Zhang, J., Turner, R. R., Zhu, Z., Cui, X., & Liu, B. (2013). High levels of secreted frizzled-related protein 1 correlate with poor prognosis and promote tumourigenesis in gastric cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 49(17), 3718–3728.
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.07.011>
- Rahi, A., Sattarahmady, N., & Heli, H. (2016). Label-free electrochemical aptasensing of the human prostate-specific antigen using gold nanospears. *Talanta*, 156–157, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.029>
- Rakoff-Nahoum, S. (2006). Why Cancer and Inflammation? *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 79(3–4), 123–130.
- Ramachandran, I., Ganapathy, V., Gillies, E., Fonseca, I., Sureban, S. M., Houchen, C. W., Reis, A., & Queimado, L. (2014). Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death & Disease*, 5, e1246.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2014.219>
- Rao, V. N., Papas, T. S., & Reddy, E. S. (1987). *erg*, a human ets-related gene on chromosome 21: Alternative splicing, polyadenylation, and translation. *Science*, 237(4815), 635–639. <https://doi.org/10.1126/science.3299708>

- Redman, J., Hill, E., AlDeghaither, D., & Weiner, L. (2015). Mechanisms of Action of Therapeutic Antibodies for Cancer. *Molecular immunology*, *67*(200), 28–45.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.002>
- Roehrborn, C. G., Nuckolls, J. G., Wei, J. T., & Steers, W. (2007). The benign prostatic hyperplasia registry and patient survey: Study design, methods and patient baseline characteristics. *BJU International*. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2007.07061.x>
- Rong, Y., Chen, H., Zhou, X.-F., Yin, C.-Q., Wang, B.-C., Peng, C.-W., Liu, S.-P., & Wang, F.-B. (2016). Identification of an aptamer through whole cell-SELEX for targeting high metastatic liver cancers. *Oncotarget*, *7*(7), 8282–8294.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.6988>
- Rubin, M. A., Zhou, M., Dhanasekaran, S. M., Varambally, S., Barrette, T. R., Sanda, M. G., Pienta, K. J., Ghosh, D., & Chinnaiyan, A. M. (2002). α -methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.287.13.1662>
- Ruiz Ciancio, D., Vargas, M. R., Thiel, W. H., Bruno, M. A., Giangrande, P. H., & Mestre, M. B. (2018). Aptamers as Diagnostic Tools in Cancer. *Pharmaceuticals*, *11*(3).
<https://doi.org/10.3390/ph11030086>
- Sanguedolce, F., Cormio, A., Brunelli, M., D'Amuri, A., Carrieri, G., Bufo, P., & Cormio, L. (2016). Urine TMPRSS2: ERG Fusion Transcript as a Biomarker for Prostate Cancer: Literature Review. *Clinical Genitourinary Cancer*, *14*(2), 117–121.
<https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.12.001>

- Schalken, J. A., & van Leenders, G. (2003). Cellular and molecular biology of the prostate: Stem cell biology. *Urology*, *62*(5 Suppl 1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(03\)00758-1](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(03)00758-1)
- Shariat, S. F., & Roehrborn, C. G. (2008). Using Biopsy to Detect Prostate Cancer. *Reviews in Urology*, *10*(4), 262–280.
- Shier, D., Butler, J., & Lewis, R. (2009). Hole's essentials of Human Anatomy & Physiology. *McGraw-Hill Higher Education*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Shore, P., Whitmarsh, A. J., Bhaskaran, R., Davis, R. J., Waltho, J. P., & Sharrocks, A. D. (1996). Determinants of DNA-binding specificity of ETS-domain transcription factors. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(7), 3338–3349.
- Skuse, A. (2015). What Was Cancer? Definition, Diagnosis and Cause. En *Constructions of Cancer in Early Modern England: Ravenous Natures [Internet]*. Palgrave Macmillan. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547261/>
- Smith, D. C., & Pienta, K. J. (1999). Paclitaxel in the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Seminars in Oncology*, *26*(1 Suppl 2), 109–111.
- Smith, R. D., & Patel, A. (2011). Transurethral resection of the prostate revisited and updated. *Current Opinion in Urology*, *21*(1), 36–41. <https://doi.org/10.1097/MOU.0b013e3283411455>
- Souza, A. G., Marangoni, K., Fujimura, P. T., Alves, P. T., Silva, M. J., Bastos, V. A. F., Goulart, L. R., & Goulart, V. A. (2016). 3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. *Experimental Cell Research*, *341*(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.015>

- Squire, J. A. (2009). TMPRSS2-ERG and PTEN loss in prostate cancer. *Nature Genetics*, 41(5), 509–510. <https://doi.org/10.1038/ng0509-509>
- Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., McNeal, J. E., Freiha, F. S., & Redwine, E. (1987). Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM198710083171501>
- Steele, V. E., Arnold, J. T., Lei, H., Izmirlian, G., & Blackman, M. R. (2006). Comparative effects of DHEA and DHT on gene expression in human LNCaP prostate cancer cells. *Anticancer Research*, 26(5A), 3205–3215.
- Stephan, C., Rittenhouse, H., Hu, X., Cammann, H., & Jung, K. (2014). Prostate-Specific Antigen (PSA) Screening and New Biomarkers for Prostate Cancer (PCa). *EJIFCC*, 25(1), 55–78.
- Surana, R., Sikka, S., Cai, W., Shin, E. M., Warriar, S. R., Tan, H. J. G., Arfuso, F., Fox, S. A., Dharmarajan, A. M., & Kumar, A. P. (2014). Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1845(1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.11.004>
- Suzman, D. L., & Antonarakis, E. S. (2014). Castration-resistant prostate cancer: Latest evidence and therapeutic implications. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 6(4), 167–179. <https://doi.org/10.1177/1758834014529176>
- Taghiyev, A. F., Rokhlin, O. W., & Glover, R. B. (2011). Caspase-2–Based Regulation of the Androgen Receptor and Cell Cycle in the Prostate Cancer Cell Line LNCaP. *Genes & Cancer*, 2(7), 745–752. <https://doi.org/10.1177/1947601911426007>

- Taguchi, Y.-H., Iwadate, M., & Umeyama, H. (2016). SFRP1 is a possible candidate for epigenetic therapy in non-small cell lung cancer. *BMC Medical Genomics*, *9 Suppl 1*, 28. <https://doi.org/10.1186/s12920-016-0196-3>
- Tan, P. Y., Chang, C. W., Chng, K. R., Wansa, K. D. S. A., Sung, W.-K., & Cheung, E. (2012). Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(2), 399–414. <https://doi.org/10.1128/MCB.05958-11>
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., & Zhang, Z. (2017). GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*, *45*(Web Server issue), W98–W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>
- Tanguay, S., Awde, M., Brock, G., Casey, R., Kozak, J., Lee, J., Nickel, J. C., & Saad, F. (2009). Diagnosis and management of benign prostatic hyperplasia in primary care. *Canadian Urological Association Journal*, *3*(3 Suppl 2), S92–S100.
- Tauriello, D. V. F., Jordens, I., Kirchner, K., Slootstra, J. W., Kruitwagen, T., Bouwman, B. A. M., Noutsou, M., Rüdiger, S. G. D., Schwamborn, K., Schambony, A., & Maurice, M. (2012). Wnt/ β -catenin signaling requires interaction of the Dishevelled DEP domain and C terminus with a discontinuous motif in Frizzled. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(14), E812–820. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114802109>
- Thiele, S., Rauner, M., Goettsch, C., Rachner, T. D., Benad, P., Fuessel, S., Erdmann, K., Hamann, C., Baretton, G. B., Wirth, M. P., Jakob, F., & Hofbauer, L. C. (2011). Expression profile of WNT molecules in prostate cancer and its regulation by

aminobisphosphonates. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(6), 1593–1600.

<https://doi.org/10.1002/jcb.23070>

Thorpe, A., & Neal, D. (2003). Erratum: Benign prostatic hyperplasia (*Lancet* (2003) 361 (1359-1367)). En *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14088-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14088-3)

Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X. W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J. E., Shah, R. B., Pienta, K. J., Rubin, M. A., & Chinnaiyan, A. M. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*.

<https://doi.org/10.1126/science.1117679>

Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>

Urbinati, G., de Waziers, I., Slamić, M., Foussignière, T., Ali, H. M., Desmaële, D., Couvreur, P., & Massaad-Massade, L. (2016). Knocking Down TMPRSS2-ERG Fusion Oncogene by siRNA Could be an Alternative Treatment to Flutamide. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 5, e301. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.16>

Uren, A., 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 4374–4382. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4374>

van Steenbrugge, G. J., van Uffelen, C. J., Bolt, J., & Schröder, F. H. (1991). The human prostatic cancer cell line LNCaP and its derived sublines: An in vitro model for the

- study of androgen sensitivity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 40(1–3), 207–214. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(91\)90184-7](https://doi.org/10.1016/0960-0760(91)90184-7)
- Vargas-Rondón, N., Villegas, V. E., & Rondón-Lagos, M. (2017). The Role of Chromosomal Instability in Cancer and Therapeutic Responses. *Cancers*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/cancers10010004>
- Veedu, R. N. (2017). *Aptamers: Tools for Nanotherapy and Molecular Imaging*. Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/b20047>
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D., & Moon, R. T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Developmental Cell*, 5(3), 367–377. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00266-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00266-1)
- Visvanathan, K., Helzlsouer, K. J., Boorman, D. W., Strickland, P. T., Hoffman, S. C., Comstock, G. W., O'Brien, T. G., & Guo, Y. (2004). Association among an ornithine decarboxylase polymorphism, androgen receptor gene (CAG) repeat length and prostate cancer risk. *The Journal of Urology*, 171(2 Pt 1), 652–655. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000108384.74718.73>
- Vlachostergios, P. J., Galletti, G., Palmer, J., Lam, L., Karir, B. S., & Tagawa, S. T. (2017). Antibody therapeutics for treating prostate cancer: Where are we now and what comes next? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(2), 135–149. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1258398>
- Wang, Y., Luo, Y., Bing, T., Chen, Z., Lu, M., Zhang, N., Shangguan, D., & Gao, X. (2014). DNA aptamer evolved by cell-SELEX for recognition of prostate cancer. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100243>

- Wei, G.-H., Badis, G., Berger, M. F., Kivioja, T., Palin, K., Enge, M., Bonke, M., Jolma, A., Varjosalo, M., Gehrke, A. R., Yan, J., Talukder, S., Turunen, M., Taipale, M., Stunnenberg, H. G., Ukkonen, E., Hughes, T. R., Bulyk, M. L., & Taipale, J. (2010). Genome-wide analysis of ETS-family DNA-binding in vitro and in vivo. *The EMBO Journal*, *29*(13), 2147–2160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.106>
- What Is Cancer?* (s/f). Recuperado el 17 de agosto de 2020, de <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>
- What Is Cancer?* - National Cancer Institute (nciglobal,ncienterprise). (2007, septiembre 17). [CgvArticle]. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Willert, K., & Nusse, R. (1998). Beta-catenin: A key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*, *8*(1), 95–102. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(98\)80068-3](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80068-3)
- Wilson, S. (2009). Update on the management of prostate cancer with goserelin acetate: Patient perspectives. *Cancer Management and Research*, *1*, 99–105.
- Wodarz, D. (2009). Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution. Princeton Series in Evolutionary Biology. By Steven A. Frank. Princeton (New Jersey): Princeton University Press. \$99.50 (hardcover); \$39.50 (paper). Xiii + 378 p.; ill.; author and subject inde. *The Quarterly Review of Biology*. <https://doi.org/10.1086/598317>
- Wu, D., & Pan, W. (2010). GSK3: A multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(3), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.002>

- 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>
- Wu, X., Ding, B., Gao, J., Wang, H., Fan, W., Wang, X. X., Zhang, W., Wang, X. X., Ye, L., Zhang, M., Ding, X., Liu, J., Zhu, Q., & Gao, S. (2011). Second-generation aptamer-conjugated PSMA-targeted delivery system for prostate cancer therapy. *International journal of nanomedicine*, *6*, 1747–1756.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S23747>
- Xavier, C. P., Melikova, M., Chuman, Y., Üren, A., Baljinnyam, B., & Rubin, J. S. (2014). Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/ β -catenin signaling. *Cellular Signalling*, *26*(1), 94–101.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.09.016>
- Xing, Y., Clements, W. K., Kimelman, D., & Xu, W. (2003). Crystal structure of a β -catenin/Axin complex suggests a mechanism for the β -catenin destruction complex. *Genes & Development*, *17*(22), 2753–2764.
<https://doi.org/10.1101/gad.1142603>
- Xu, C., & Wang, J. (2015). Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *10*(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.08.011>
- Yin, L., Rao, P., Elson, P., Wang, J., Ittmann, M., & Heston, W. D. W. (2011). Role of TMPRSS2-ERG gene fusion in negative regulation of PSMA expression. *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021319>

Yu, J., Yu, J., Mani, R.-S., Cao, Q., Brenner, C. J., Cao, X., Wang, G. X., Wu, L., Li, J., Hu, M., Gong, Y., Cheng, H., Laxman, B., Vellaichamy, A., Shankar, S., Li, Y., Dhanasekaran, S. M., Morey, R., Barrette, T., ... Chinnaiyan, A. M. (2010). 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>

Zheng, L., Sun, D., Fan, W., Zhang, Z., Li, Q., & Jiang, T. (2015a). Diagnostic value of SFRP1 as a favorable predictive and prognostic biomarker in patients with prostate cancer. *PloS One*, *10*(2), e0118276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118276>

Zheng, L., Sun, D., Fan, W., Zhang, Z., Li, Q., & Jiang, T. (2015b). Diagnostic value of SFRP1 as a favorable predictive and prognostic biomarker in patients with prostate cancer. *PloS One*, *10*(2), e0118276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118276>

Zhu, S., Liu, L., Korzh, V., Gong, Z., & Low, B. C. (2006). RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: Use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. *Cellular Signalling*, *18*(3), 359–372.


<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.05.019>

PRIMARY RESEARCH

Open Access



SFRP1 increases TMPRSS2-ERG expression promoting neoplastic features in prostate cancer in vitro and in vivo

Carlos D. Cruz-Hernández¹, Marian Cruz-Burgos¹, Sergio A. Cortés-Ramírez¹, Alberto Losada-García¹, Ignacio Camacho-Arroyo², Patricia García-López³, Elizabeth Langley³, Vanessa González-Covarrubias¹, Monserrat Llaguno-Munive³, Martha E. Albino-Sánchez⁴, José L. Cruz-Colín¹, Carlos Pérez-Plasencia³, Fredy O. Beltrán-Anaya¹ and Mauricio Rodríguez-Dorantes^{1*} 

Abstract

Background: Prostate cancer (PCa) is the second cause of cancer related death in North American men. Androgens play an important role in its progression by regulating the expression of several genes including fusion ones that results from structural chromosome rearrangements. *TMPRSS2-ERG* is a fusion gene commonly observed in over 50% of PCa tumors, and its expression can be transcriptionally regulated by the androgen receptor (AR) given its androgen responsive elements. *TMPRSS2-ERG* could be involved in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during tumor development. ERG has been reported as a key transcriptional factor in the AR-ERG-WNT network where five SFRP proteins, structurally similar to WNT ligands and considered to be WNT pathway antagonists, can regulate signaling in the extracellular space by binding to WNT proteins or Frizzled receptors. It has been shown that over-expression of SFRP1 protein can regulate the transcriptional activity of AR and inhibits the formation of colonies in LNCaP cells. However, the effect of SFRP1 has been controversial since differential effects have been observed depending on its concentration and tissue location. In this study, we explored the role of exogenous SFRP1 protein in cells expressing the *TMPRSS2-ERG* fusion.

Methods: To evaluate the effect of exogenous SFRP1 protein on PCa cells expressing *TMPRSS2-ERG*, we performed in silico analysis from TCGA cohort, expression assays by RT-qPCR and Western blot, cell viability and cell cycle measurements by cytometry, migration and invasion assays by xCELLigence system and murine xenografts.

Results: We demonstrated that SFRP1 protein increased ERG expression by promoting cellular migration in vitro and increasing tumor growth in vivo in PCa cells with the *TMPRSS2-ERG* fusion.

Conclusions: These results suggest the possible role of exogenous SFRP1 protein as a modulator of AR-ERG-WNT signaling network in cells positive to *TMPRSS2-ERG*. Further, investigation is needed to determine if SFRP1 protein could be a target in against this type of PCa.

Keywords: SFRP1, *TMPRSS2-ERG*, Xenograft

Background

Prostate cancer (PCa) is the second cause of cancer-related deaths in North American men [1]. The PCa 5-year survival is nearly 100% when is diagnosed at local stage but poor (32.6%) when it's diagnosed with

*Correspondence: mrodriguez@inmegem.gob.mx

¹ Instituto Nacional de Medicina Genómica, Pèriferico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610 Mexico city, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.