



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*Estudio de los patrones de metilación de genes SFRP en
cáncer de próstata.*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

FRANCISCO GIOVANI ELIZARRARÁS CHÁVEZ

MÉXICO, D.F.

2015





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Samuel Canizales Quinteros**
VOCAL: **Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño**
SECRETARIO: **Profesor: Mauricio Rodríguez Dorantes**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Nancy Monroy Jaramillo**
2° SUPLENTE: **Profesor: Sonia Mayra Pérez Tapia**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

ASESOR DEL TEMA:

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES: _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. CONSUELO DEL PILAR GARCÍA TOBILLA: _____

SUSTENTANTE:

FRANCISCO GIOVANI ELIZARRARÁS CHÁVEZ: _____

Resumen

A nivel mundial una de las principales causas de muerte asociadas a enfermedades no transmisibles es el cáncer. El cáncer de próstata se encuentra entre los primeros lugares en México en cuanto a muertes relacionadas a cáncer en varones. El cáncer de próstata es una afección que puede tener graves complicaciones cuando no se trata prontamente. Como enfermedad presenta un cuadro clínico similar a la hiperplasia prostática benigna o en algunos casos a la prostatitis. El diagnóstico diferencial se lleva a cabo por biopsias y análisis histológico. El tratamiento del cáncer de próstata depende de su avance, desde estadios tempranos donde el tumor está localizado hasta estadios tardíos donde el tumor se encuentra diseminado. Una de las complicaciones más comunes del cáncer de próstata es su progresión a una etapa resistente a la castración, es decir cuando el cáncer puede proliferar en un ambiente falto de andrógenos. Una de las razones por las cuales el cáncer de próstata puede adquirir nuevos fenotipos es por su susceptibilidad a cambios en su epigenoma y así ganar o perder expresión de genes reguladores de pluripotencia. Uno de los mecanismos más dinámicos y mejor estudiados en la actualidad es la metilación del genoma. La metilación del DNA se da principalmente en sitios CpG. En el genoma hay regiones características denominadas “islas CpG” donde la metilación en los dinucleótidos regula a la baja la expresión del gen al cual están asociados. Una familia de genes que regula la pluripotencia y que está asociado a “islas CpG” son los inhibidores de la vía WNT, los genes *SFRP*. En varios tipos de cáncer se ha visto asociada la represión de estos genes por medio de la metilación de las “islas CpG” asociadas su región promotora. Estudios previos realizados en el laboratorio del Dr. Rodríguez determinaron que en cáncer de próstata hay una disminución en la expresión de los genes *SFRP* en muestras de tumores provenientes de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata. En este trabajo se describe la metilación de los genes *SFRP1*, *SFRP2*, y *SFRP5*. Se observó la metilación preferencial del DNA de muestras de cáncer comparadas contra tejido saludable de próstata o incluso contra muestras de hiperplasia prostática benigna. En dos modelos *in vitro* que representan estadios temprano y tardío de cáncer de próstata (LNCaP y PC3 respectivamente) se observó un patrón similar. Por lo tanto la metilación de genes *SFRP* es un evento diferencial en cáncer de próstata.

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Cáncer	3
1.2 Próstata y cáncer de próstata	6
1.2.1 <i>Historia natural de la enfermedad</i>	10
1.2.1.1 Desarrollo de cáncer de próstata	10
1.2.1.2 Sintomatología y diagnóstico	11
1.2.1.3 Tratamiento	12
1.2.1.4 Cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC)	13
1.3 Cáncer de próstata y epigenética	15
1.3.1 Epigenética	16
1.5 Metilación del DNA	17
1.6 Vía WNT/ β -catenina	20
1.6.1 Vía canónica	21
1.6.2 Vía no canónica y vía dependiente de Ca^{2+}	21
1.7 Familia de proteínas SFRP	22
1.8 Genes SFRP y cáncer	24
2 JUSTIFICACIÓN	28
3 HIPÓTESIS	28
4 OBJETIVO GENERAL	28
5 OBJETIVOS PARTICULARES	28
6 METODOLOGÍA	29
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	34
7.1 Metilación y expresión de <i>SFRP1</i>	34
7.2 Metilación y expresión de <i>SFRP2</i>	38
7.3 Metilación y expresión de <i>SFRP5</i>	41
7.4 Silenciamiento por hipermetilación del promotor de genes <i>SFRP</i>	44
8. CONCLUSIONES	45
9. PERSPECTIVAS	46
REFERENCIAS	47
ANEXOS	54

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte relacionadas a enfermedades no transmisibles. Este padecimiento se caracteriza por el crecimiento sin control de células con alteración en la regulación de sus genes. Este crecimiento forma tumores con características distintas al tejido de dónde se originó. Los tratamientos más comunes son, radiación, quimioterapia y cirugía para remover o eliminar las células cancerosas. Las muertes en la mayoría de los casos se asocian a la diseminación descontrolada del tumor en el cuerpo, metástasis, o a la agresividad del tratamiento. (Murphy, 2011)

El cáncer no es la única enfermedad que genera tumores. La formación de masas anormales en el cuerpo se puede deber a diversas patologías. Es por esto que se han establecido características particulares para distinguir al cáncer de otras enfermedades similares, estas son:

- | | |
|--|---|
| i) <i>Conservación de señales proliferativas</i> | vi) <i>Resistencia a muerte celular</i> |
| ii) <i>Evasión de supresores del crecimiento</i> | vii) <i>Desregulación del metabolismo celular</i> |
| iii) <i>Activación de invasión y metástasis</i> | viii) <i>Evasión del sistema inmune</i> |
| iv) <i>Replicación inmortal</i> | ix) <i>Inestabilidad genómica y mutaciones</i> |
| v) <i>Inducción de angiogénesis</i> | x) <i>Inflamación promotora de tumores</i> |

Estas características comprenden la alteración de una gran variedad de rutas metabólicas y de señalización dentro de la célula, no siempre presentándose las mismas en todos los casos (Hanahan & Weinberg, 2011).

Aunque el origen del cáncer sea de una única célula transformada, los insultos que promueven esta transformación son tres: carcinógenos físicos (e.g. radiación), carcinógenos químicos (e.g. asbesto o plomo), y carcinógenos biológicos (e.g. viral, HPV, o predisposición genética). Un factor importante es la edad, debido a que el cuerpo comienza a decaer en su actividad biológica y es más propenso a errores en metabolismo y señalización (WHO en línea, 2014). La gran variedad de cánceres y sus etiologías ha causado que el estudio de la enfermedad no se enfoque tanto en la prevención sino en el diagnóstico (temprano o definitivo) y el tratamiento adecuado y benéfico para cada paciente.

El estudio de cáncer se ha ampliado y se han logrado establecer modelos para describir el comportamiento global de ciertos tipos de cáncer, los más comunes siendo cáncer de

mama, colón, próstata, pulmón, y estómago entre otros. En un estudio realizado en el 2008 por la OMS se reporta al cáncer como una de las enfermedades más importantes en el mundo (figura 1.1), siendo esta patología responsable del 13% (8.2 millones) de las muertes globales por enfermedades no infecciosas (WHO en línea, 2014).

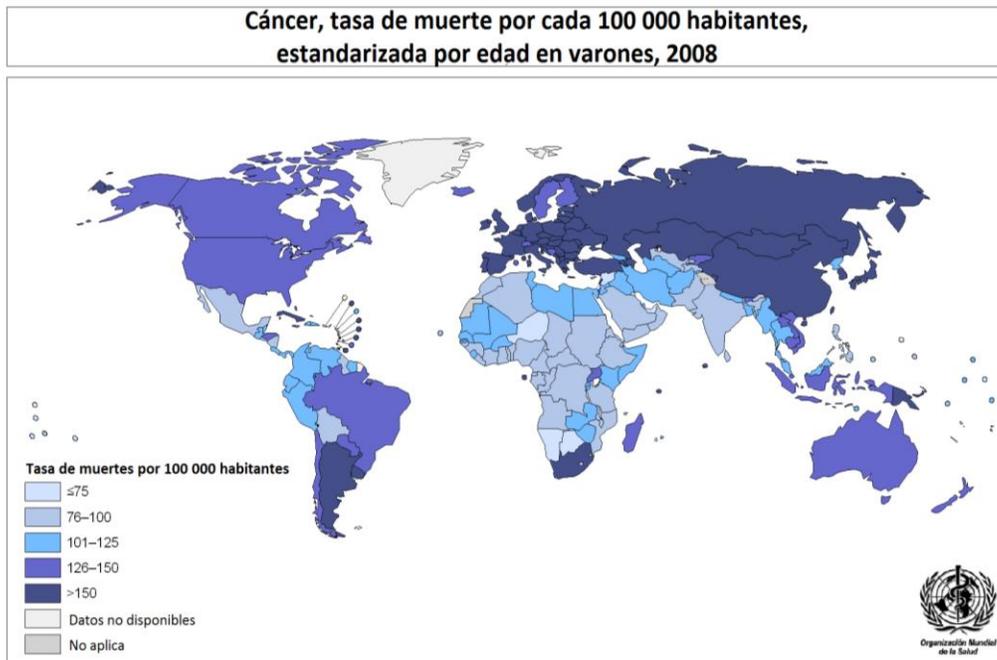


Figura 1.1 Mapa global de tasa de muertes relacionadas a cáncer por cada 100 000 habitantes varones. Modificado de WHO en línea, 2011.

Los 5 tipos de cáncer que más muertes provocan son, en orden descendente: pulmón, mama, colorectal, próstata y estómago (figura 1.2). A nivel mundial para los hombres, los primeros tres son: pulmón, próstata y colorectal (figura 1.3) (WHO, *Cancer mortality and morbidity*).

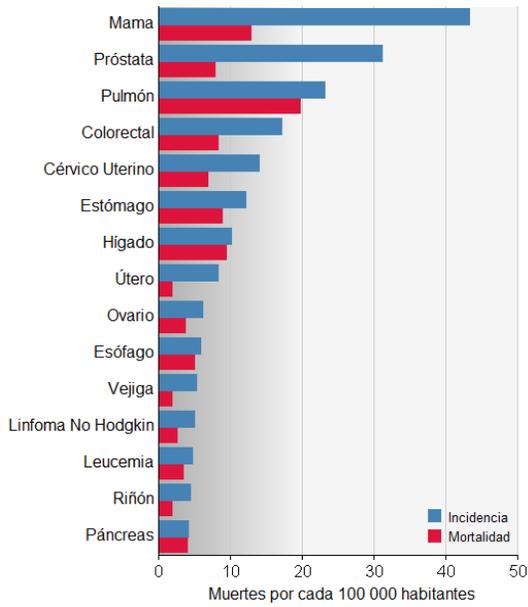


Figura 1.2 Mortalidad e incidencia de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial para ambos sexos. Modificado de GLOBOCAN en línea.

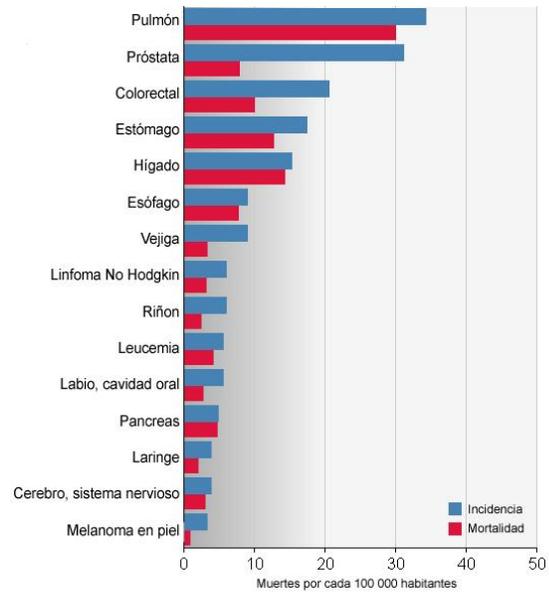


Figura 1.3 Mortalidad e incidencia de los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial que se presentan en varones. Modificado de GLOBOCAN en línea.

En comparación con otros países, en México el primer lugar de muertes por cáncer en varones lo tiene el cáncer de próstata, generando aproximadamente 6400 muertes al año, (figura 1.4). (GLOBOCAN 2014)

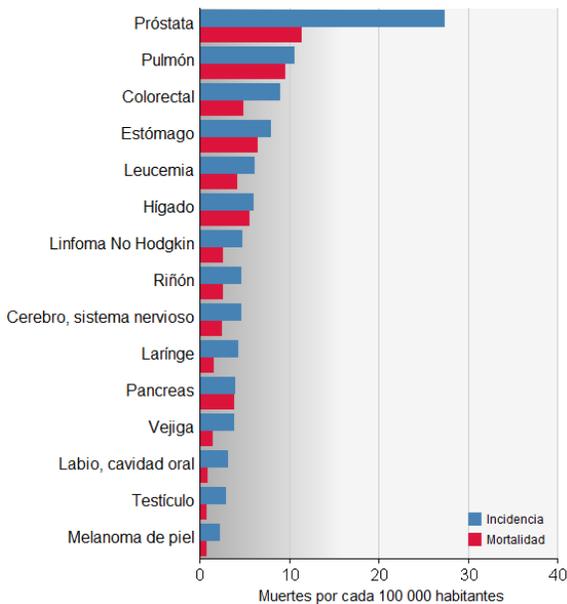


Figura 1.4 Mortalidad e incidencia de los tipos de cáncer más frecuentes en México que se presentan en varones. Modificado de GLOBOCAN en línea.

1.2 Próstata y cáncer de próstata

La próstata es una glándula pequeña localizada debajo de la vejiga, enfrente del recto y que rodea la uretra. Junto con los testículos, epidídimo, conducto deferente, las vesículas seminales y las glándulas de Cowper se encarga de la producción del líquido seminal, fluido que contiene a los espermatozoides y les otorga movilidad y supervivencia. El fluido producido por la próstata es alcalino, contiene principalmente calcio, zinc, citratos, fosfatasa ácida, albumina y KLK3, una proteína mejor conocida como el antígeno prostático específico o PSA, por sus siglas en inglés (Fox, 2011).

La próstata se divide en 5 partes, cada una dependiente en cierto grado de la presencia de andrógenos para llevar a cabo su función. Fisiológicamente estas cinco zonas son: central, transicional, periférica, región glandular periuretral y estroma fibromuscular anterior, figura 1.5 (De Marzo et al 2007).

Zonas de la próstata

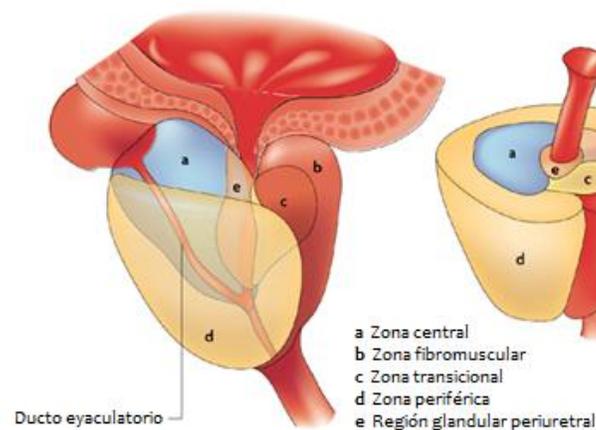


Figura 1.5. Diagrama fisiológico de las zonas de la próstata.
Modificado de De Marzo et al, 2009.

Las afecciones más comunes en próstata son: hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata (CaP) y prostatitis. Cada una de estas patologías tiene su tratamiento y cuadro sintomatológico característico.

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es un crecimiento anormal de la próstata generado por un aumento en el número de células que se da en hombres mayores — 50 años en adelante — caracterizada por un cuadro de síntomas idéntico al de un caso de CaP. La diferencia entre ambas neoplasias es la agresividad, inestabilidad cromosómica y la diseminación del tumor. Los pacientes de HPB suelen ser tratados con cirugía o algún

fármaco adecuado para el tipo y tamaño de tumor que se presenta. La hiperplasia generada en casos de HPB no se disemina, aun cuando llegue a presentar un gran tamaño. Hasta el día de hoy no se ha encontrado evidencia de que los pacientes con HPB tengan mayor probabilidad de generar cáncer. Aun así se puede dar la probabilidad de que una HPB se convierta en cáncer por alguna razón (Simpson, 1997; Guess, 2013). La prostatitis es una inflamación de la próstata provocada por algún patógeno o daño físico. Su sintomatología es similar a la de CaP o HPB aunque se puede presentar con otros síntomas en un lapso corto de tiempo — como fiebre, irritación, dolor punzante, enrojecimiento — lo cual ayuda en su diagnóstico diferencial (Meares, 1991; Krieger et al, 2008).

Otra manera de dividir los compartimentos de la próstata es por su histología. Por su carácter glandular la próstata contiene dos tipos principales de células (figura 1.6):

- i) Epitelio: la mayoría de las células son células exocrinas especializadas en la secreción de componentes del semen, ya que es la principal función de la próstata. Entre los tipos de células en el epitelio se encuentran: secretoras, basales, neuroendocrinas, de urotelio, de ductos eyaculatorios y vesículas seminales. Las células basales no expresan el receptor de andrógenos ya que se encuentran en un estadio poco diferenciado. Los demás tipos celulares si expresan el receptor de andrógenos al ser ya formas más diferenciadas. El receptor de andrógenos regula la expresión de KLK-3 (o PSA) y KLK-2, moléculas características de próstata y el crecimiento mediado por factores de crecimiento llamados *andromedinas* (Gregg et al, 2010; Isaacs y Isaacs, 2004).
- ii) Estroma prostático: compuesto por células musculares y no asociadas a alguna función glandular. Expresan poco AR por lo que dependen en menor medida de la presencia de andrógenos; el AR promueve la secreción de andromedinas, (factores de crecimiento) al compartimiento epitelial (Gregg et al, 2010; Isaacs y Isaacs, 2004).

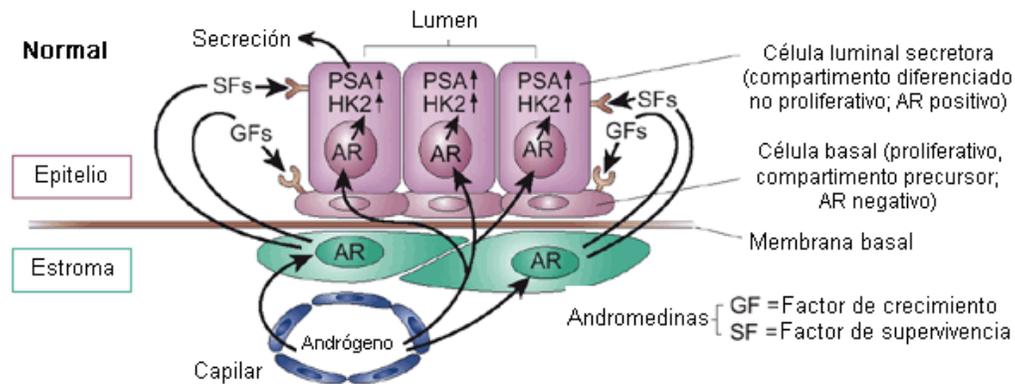


Figura 1.6 Histología de la próstata. En la parte superior se describen las células epiteliales. Hay dos tipos, las basales y las luminales. En la parte inferior las células estromales. Ambos compartimentos depende de andrógenos para su función. Los andrógenos, T o DHT, llegan por sistema circulatorio. Las células estromales secretan factores de supervivencia y crecimiento a las células epiteliales. El receptor de andrógenos es el que permite que las células basales se diferencien al regular la expresión de ciertos genes. Modificada de Isaacs y Isaacs, 2004.

De los casos de CaP el mayor porcentaje se genera en la zona periférica con un 68%, seguido de la zona transicional con un 24% y en la central con un 8%. La mayoría de los casos de cáncer se presentan en la zona periférica ya que esta se compone principalmente de células epiteliales, las cuales se encuentran en una constante división celular y son más susceptibles a mutaciones o errores en el ciclo celular. (Secretaría de Salud, 2001)

Las funciones y el desarrollo de la próstata dependen del eje endocrino: hipotálamo-hipófisis-testículo. La finalidad de este eje es estimular ciertas células del testículo para comenzar la espermatogénesis y en otras promover la síntesis de testosterona a partir de colesterol. La testosterona tiene una función importante al regular la expresión de genes en específico de cada tejido, como la próstata, a través del receptor de andrógenos (AR). (Fox, 2011).

El AR es una proteína codificada en la región q12 del cromosoma X. Es un gen de aproximadamente 190 kb que contiene ocho exones y que codifica para una proteína de 919 aminoácidos. Tiene 5 variantes de *splicing*, tres de las cuales codifican para proteínas. La función de esta proteína es la de regular la expresión de genes dependientes de andrógeno al activarse por la unión de alguna de las dos hormonas esteroideas, testosterona o dihidrotestosterona. Una vez unido el AR a su ligando, este se libera de las proteínas de choque térmico (HSP) que lo rodean y se fosforila para posteriormente formar un homodímero. Este homodímero se transloca al núcleo donde se une a regiones

específicas del genoma, denominadas elementos de respuesta a andrógenos (ARE). Una vez unidos a los ARE, el receptor facilita el reclutamiento de coactivadores o correpresores para regular la expresión de ciertos genes, figura 1.7 (GeneCards en línea). Genes clásicos que se ven regulados por el AR son KLK3 (PSA), KLK2, CIP1 entre otros. Recientemente, el uso de técnicas genómicas ha permitido la identificación de muchos más genes regulados por AR (Bolton et al, 2007). De importancia clínica para el diagnóstico de CaP está PSA. Esta proteína se sobre expresa en tumores y es de gran ayuda para diferenciar entre neoplasias malignas y benignas al estar sobre expresada en cáncer (Heidenreich et al, 2011)

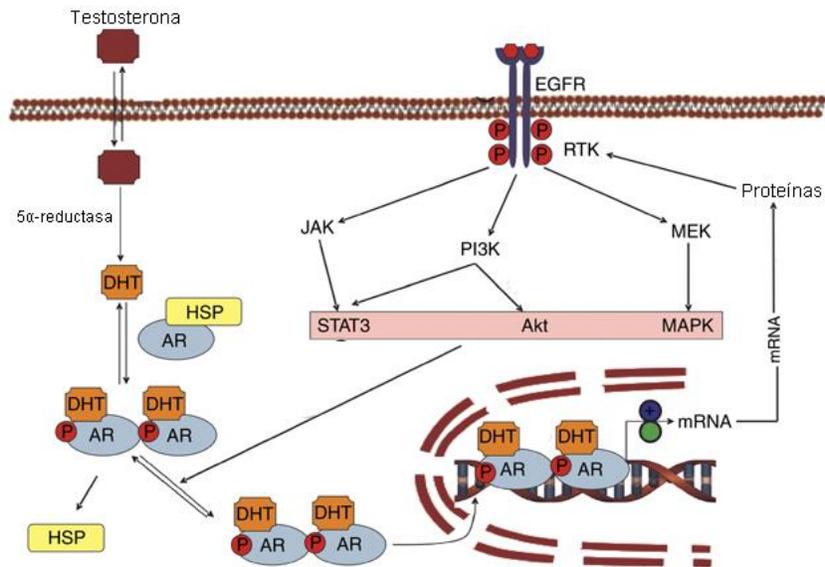


Figura 1.7 Esquema del mecanismo de acción del receptor de andrógenos. Primeramente la testosterona entra a la célula y es convertida en DHT por la 5α-reductasa. La DHT se une al AR y provoca que se libere de las HSP. Una vez liberado se fosforila lo cual permite su dimerización. Una vez dimerizado se transloca al núcleo donde interactúa con AREs para regular la expresión de genes. Se han descrito otras vías por las cuales el AR se puede fosforilar como lo son STAT3, Akt y MAPK. Modificado de Traish et al, 2009.

La alteración de la secuencia del AR provoca diferentes patologías. En el caso de cáncer de próstata (CaP), existen varias mutaciones somáticas asociadas a la enfermedad. Estas mutaciones generan alteración en: unión de cofactores y especificidad del ligando (Brooke et al 2009).

Los mecanismos propuestos para la generación de cáncer de próstata son varios. Desde la ingesta de carcinógenos, agentes infecciosos o desbalances hormonales que generen daño en este tejido, provocando la formación de una o varias células tumorales con la capacidad de generar cáncer (De Marzo et al, 2009).

1.2.1 Historia natural de la enfermedad

El diagnóstico de CaP es complicado debido a que esta patología tiene síntomas similares a otras, principalmente hiperplasia benigna prostática y en un menor número de casos prostatitis.

1.2.1.1 Desarrollo de cáncer de próstata

El desarrollo de CaP tiene tres estadios principales, figura 1.8 (ESSAPharma Inc., 2011):

- 1) Local: El tumor se encuentra localizado en la próstata y no se ha diseminado a algún otro tejido.
- 2) Diseminado: El tumor generó metástasis ya sea a tejidos y/o órganos cercanos o lejanos.
- 3) Resistente a la castración (CRPC): Estadio del tumor caracterizado por su proliferación en un ambiente falto de andrógenos. El tumor puede estar localizado o en metástasis. La terapia hormonal ya no es útil. Normalmente se presenta este tipo de CaP en pacientes recurrentes.

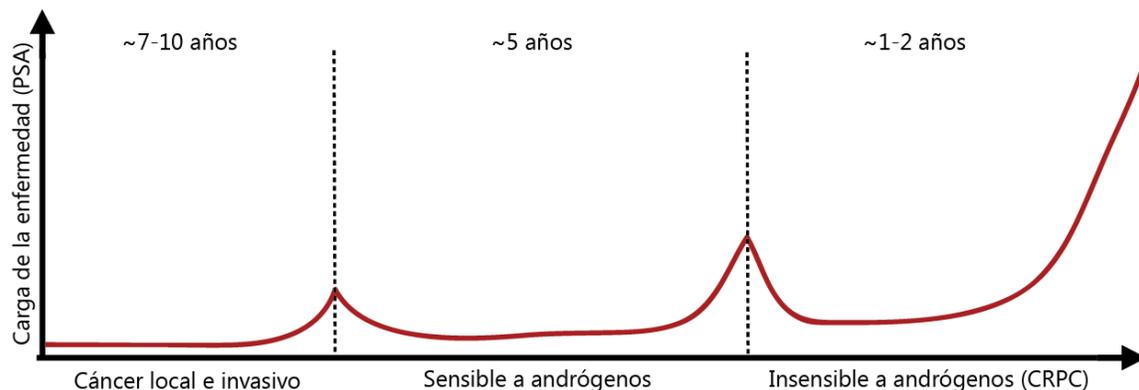


Figura 1.8 Progresión de cáncer de próstata expresado en niveles de PSA. En la primera y segunda etapa se encuentra un cáncer de lento crecimiento, en la mayoría de los casos, que responde muy bien a los tratamientos básicos de cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal. En la tercera etapa se trata normalmente de recurrencia en la cual el cáncer es más agresivo, resistente a la castración y normalmente se encuentra en metástasis. Modificada de ESSAPharma Inc.

1.2.1.2 Sintomatología y diagnóstico

El cáncer de próstata, CaP, en sus etapas iniciales no presenta síntomas ya que es el gran volumen de un tumor avanzado lo que genera el cuadro patológico que lleva a un paciente a buscar atención médica. En la mayoría de los casos de CaP existe un conjunto de síntomas asociados al padecimiento como (American Cancer Society en línea; Cancer Research UK en línea):

- | | |
|---|-------------------------------|
| i) <i>Volumen reducido de orina, oliguria, o incapacidad de orinar, anuria.</i> | v) <i>Fatiga y/o hipoxia.</i> |
| ii) <i>Dificultad para vaciar la vejiga por completo.</i> | vi) <i>Taquicardia.</i> |
| iii) <i>Dolor o ardor al orinar.</i> | vii) <i>Anemia.</i> |
| iv) <i>Hematuria o hematospermia, sangre en los fluidos expulsados por la uretra.</i> | |

Ante estos síntomas el médico deberá de realizar las pruebas diagnósticas apropiadas algunas de éstas son (American Cancer Society en línea; Cancer Research UK en línea):

- a) *Examen digital de próstata*
- b) *Prueba de antígeno prostático específico (PSA)*
 - i. *2.5ng/mL en hombres de menos de 50 años*
 - ii. *3ng/mL en hombres de 50 años*
 - iii. *4ng/mL en hombres de 60 años*
 - iv. *5ng/mL en hombres de 70 años en adelante*

Existen dos tipos de PSA en sangre, el libre y el unido a proteínas. Existe el consenso general de que un nivel alto de PSA libre, medido a partir del PSA total, significa menor probabilidad de cáncer. Esto es benéfico para el diagnóstico diferencial de otras patologías ya que se puede dar un aumento de PSA por otras enfermedades.

- c) *Ecografía transrectal*
- d) *Biopsia (transrectal o transperineal). El tejido obtenido de la biopsia es evaluado al microscopio con base en la escala Gleason. Este parámetro se basa en el nivel de diferenciación de las células y tiene un puntaje del 1 al 5. El valor más pequeño se le da a células observadas con diferenciación; el valor más alto se le da a células poco diferenciadas. Para obtener el puntaje Gleason se eligen dos regiones representativas y se le asigna un valor a cada región, la suma de estos dos valores es el puntaje como tal.*

Estas pruebas son las más comunes aunque recientemente se han propuesto nuevos biomarcadores para detectar de manera específica y sensible los casos de CaP, pero aún no se utilizan en la práctica común, como lo son el PCA3 (Marks et al, 2007), TMPRSS2-ERG, AMACR, SNPs relacionados a cáncer de próstata, células tumorales circulantes y otros más (Prensner et al, 2012).

1.2.1.3 Tratamiento

Dependiendo del avance de la enfermedad es que el médico determina la terapia más conveniente para el paciente (American Cancer Society, 2014; Jiménez et al, 2011; National Cancer Institute, 2014):

Tabla 1. Tratamientos de pacientes con CaP.

Etapa	Signos	Tratamiento recomendado
I	Cáncer localizado. Bajo puntaje en la escala de Gleason (6 o menos) y un bajo nivel de PSA (10 o menos)	Vigilancia activa, radioterapia (radiación externa o braquiterapia), o prostatectomía radical. Generalmente, estos tumores son de lento crecimiento, están localizados y pueden no generar sintomatología.
II	El cáncer no crece más allá de la glándula prostática. El puntaje de Gleason y los niveles de PSA son más altos.	Se recomienda un plan de terapia similar al caso anterior: vigilancia activa, radioterapia o prostatectomía radical. A partir de este estadio y si el paciente cumple con los requisitos, puede ser parte de un ensayo clínico para un nuevo tratamiento. De igual manera y si el médico lo considera necesario el paciente puede comenzar una terapia hormonal antiandrogénica. Los pacientes pueden no presentar sintomatología, pero tienen mayor probabilidad de diseminación a otras partes del cuerpo.
III	El cáncer se ha propagado más allá de la próstata pero no ha invadido otros órganos o zonas del cuerpo. PSA y Gleason altos.	Terapias conjuntas como: radiación externa y terapia hormonal; radiación externa y braquiterapia con terapia hormonal; prostatectomía radical y radioterapia. Pueden someterse a ensayos clínicos si así lo consideran tanto el paciente como el médico.
IV	El cáncer se ha esparcido a otras zonas del cuerpo. PSA y Gleason altos.	Las terapias convencionales no son una opción viable. Los tratamientos son: terapia antiandrogénica, radiación externa, cirugía (TURP), tratamientos para la metástasis (denosumab, bifosfonatos o un radiofármaco), quimioterapia, puede participar en un ensayo clínico. De igual manera el tratamiento incluye la prevención o alivio de otros síntomas derivados por el progreso de la enfermedad.

Dependiendo del tamaño y la diseminación del tumor es el tipo de tratamiento, ya sea farmacológico y/o quirúrgico, que se tendrá hacia la enfermedad. La mayor parte de las terapias son las antiandrogénicas ya que la mayor parte de los pacientes acuden al médico cuando el tumor ya es avanzado.

En un porcentaje menor de la población con CaP, alrededor del 5%, existe recurrencia. Como se menciona, la etapa de CPRC es de pacientes recurrentes. Debido al tratamiento de depleción de andrógenos existen dos vías para que se presente el CPRC: i) Inestabilidad genómica ii) Selección clonal.

1.2.1.4 Cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC).

Como se mencionó previamente, la próstata y sus funciones dependen de la presencia de hormonas esteroideas: testosterona y DHT; al igual que de su receptor, AR. Normalmente después de la terapia antiandrogénica, la mayoría de los cánceres presentan una remisión.

Aun así, como se presentó en la figura 8 puede haber una reincidencia del cáncer, en el cual la terapia antiandrogénica ya no es útil o viable. El nuevo tumor se forma por células que tienen un mecanismo por el cual se han vuelto resistentes a la castración, es decir que pueden proliferar en un ambiente falto de andrógenos y resisten la terapia usada en un inicio (figura 1.9):

i) *Mecanismos de inestabilidad genómica*

- a) Hipersensibilidad: Hay una mayor cantidad de AR o el receptor muta de tal manera que reacciona más fácil a cantidades bajas de hormona en el medio (Feldman & Feldman, 2001).
 - b) Promiscuidad: El receptor adquiere una mutación que le confiere la capacidad de interactuar y activarse con otras moléculas esteroideas o de estructura similar (Feldman & Feldman, 2001).
 - c) Fosforilación por otras vías (Forajida, *outlaw*): El receptor se fosforila por vías alternas como AKT o MAPK, entre otras (Feldman & Feldman, 2001).
 - d) Desviación: Participación de otras moléculas para evadir la apoptosis, e.g. *BCL2*.
- ii) *Selección clonal*: Las células de un tumor no son iguales, algunas presentan alteraciones en su metabolismo que les confieren mejoras en su capacidad de sobrevivir en el microambiente (Feldman & Feldman, 2001).
- e) Células *observadoras*: De principio hay células independientes a andrógenos, las cuales pueden proliferar cuando todas las demás son eliminadas (Feldman & Feldman, 2001).

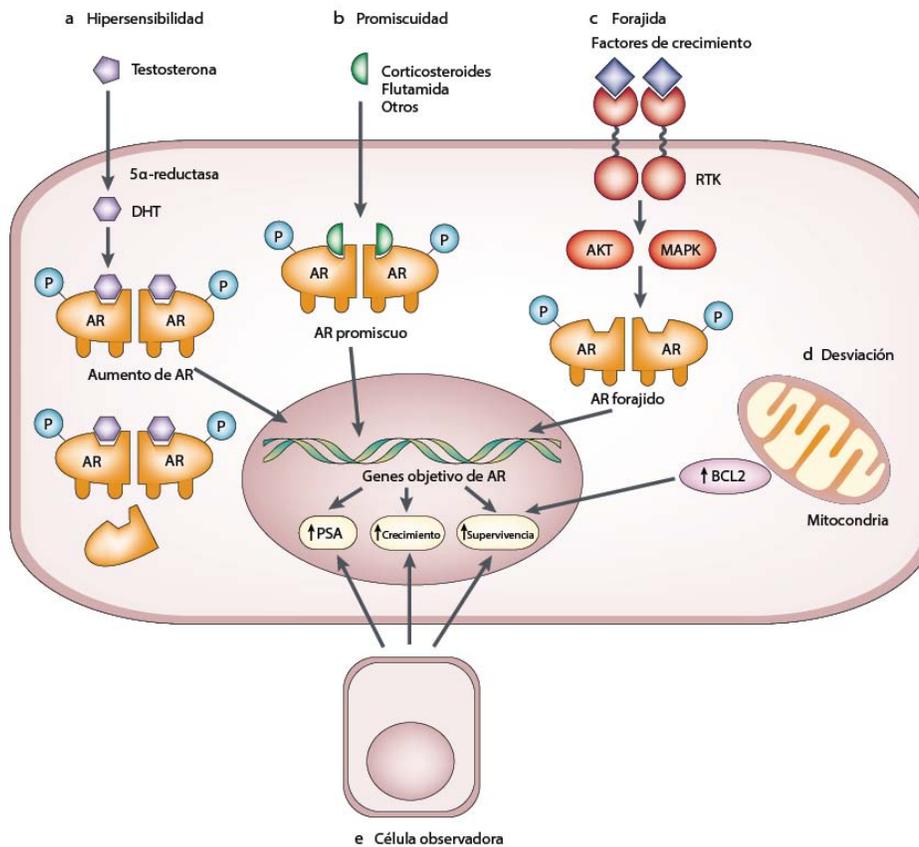


Figura 1.9 Mecanismos por los cuales una célula de CaP se vuelve resistente a la castración. A) hipersensibilidad, mayor número de AR o un AR más activo. B) Promiscuidad, interacción con moléculas de estructura similar a andrógenos. C) Forajida, fosforilación de AR por otras vías como Akt o MAPK. D) Desviación, activación de otros genes para su supervivencia. E) Célula observadora, clona de neoplasia que desde un principio tiene la capacidad de ser resistente a la castración pero no prolifera tanto como otras clonas. Modificado de Feldman & Feldman 2001.

1.3 Cáncer de próstata y epigenética

El tratamiento de cualquier tipo de cáncer puede generar una regresión del tumor, pero como se ha mencionado anteriormente, no todas las células del tumor son por regla idénticas a la célula de origen. En un tumor hay más de una clona presente; gran parte del tejido canceroso es de una única estirpe y en un menor porcentaje hay otras clonas, figura 1.10 (Marusyk et al, 2012). Esto se relaciona estrechamente al modelo de CPRC que establece la presencia de una célula *observadora*, independiente de andrógenos desde un principio pero incapaz de proliferar tan rápido como las sensibles a andrógeno (Gleave, 1991).

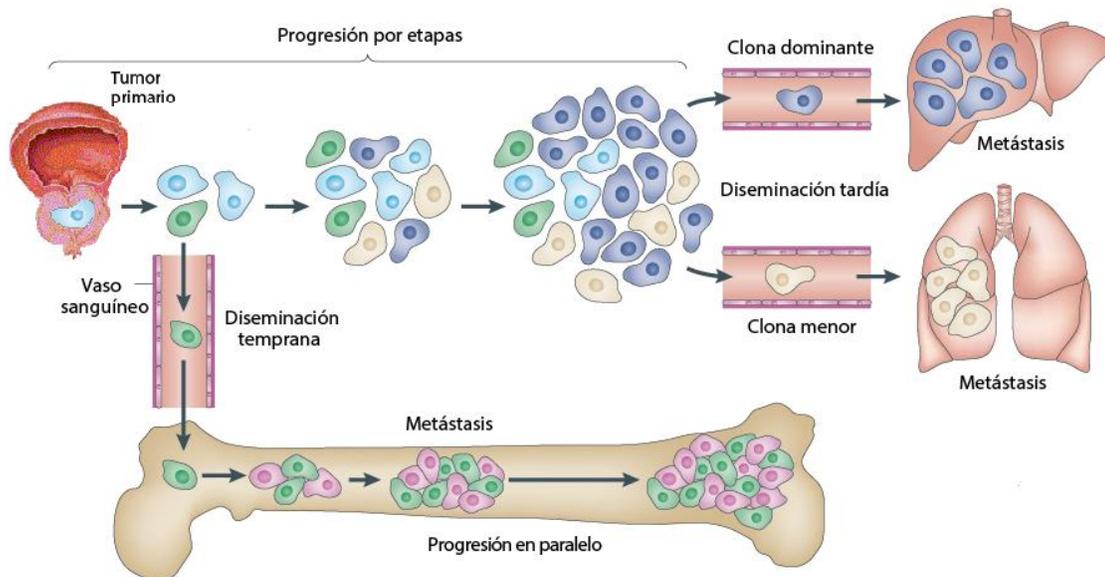


Figura 1.10 Progresión de una neoplasia, metástasis y formación de diversas clonas. En la parte superior izquierda se encuentra la célula progenitora que forma dos clonas primarias. Una de ellas adquiere capacidad de metástasis e invade otros tejidos donde genera un tumor, de igual manera este tumor se forma por varias clonas. El tumor primario tarda más en generar otras clonas con capacidad de metástasis. Modificado de Marusyk 2012.

Las células *observadoras*, mencionadas como modelo de CRPC, pueden tener una inestabilidad genómica más apta para su supervivencia en el ambiente hostil en el que se encuentran, per se, el paciente en tratamiento. La inestabilidad genómica se puede dar por: pérdida de DNA telomérico, pérdida de la integridad genómica en ciertos sitios cromosómicos, mutaciones en el DNA, alteraciones en el número de copias de genes, hipometilación global en DNA, hipermetilación de regiones específicas de DNA, modificación en las marcas de histona, entre otras (Hanahan & Weinberg, 2011). Los últimos tres mecanismos mencionados comprenden cambios en el *epigenoma* (factores no asociados a la secuencia de DNA que funcionan como reguladores de la expresión génica) de la célula. Estos cambios son más dinámicos que la alteración de la secuencia de DNA, pues son susceptibles al metabolismo y microambiente de la célula.

1.3.1 Epigenética

Desde hace unas décadas se ha logrado un gran avance en el área de las ciencias genómicas, sobre todo en la rama de la epigenética. Esta área de la ciencia estudia la relación entre las señales ambientales y de desarrollo y su impacto en la determinación del fenotipo de una célula. Se trata de un complejo de sistemas de regulación de la expresión de varios genes, sistemas que son heredables mitóticamente, preservables y reversibles

(Riddihough & Zahn, 2010). Los mecanismos que rigen y regulan la diferenciación de las células son la base de la epigenética. Existen varios mecanismos de regulación epigenética: metilación del DNA, variantes de histonas, modificaciones de histonas, los complejos Polycomb y Trithorax, RNAs no codificantes, dinámica nuclear y complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (e.g. SWI/SNF). Todos estos mecanismos son dinámicos y se alteran rápida y fácilmente con la dieta, agentes citotóxicos, estrés, edad y enfermedades, entre otros (Portela & Esteller, 2010; Feinberg et al, 2006).

La gama de alteraciones epigenéticas sirven como adyuvantes o precursores de alteraciones genéticas. Por esto se considera que la perturbación epigenética de células progenitoras — células capaces de generar más estirpes celulares, pero de un tipo en específico — es un factor determinante para el riesgo de cáncer, agresividad y de la heterogeneidad de la enfermedad. Un modelo descrito por Feinberg y colaboradores explica la formación de cáncer a partir de alteraciones epigenéticas, figura 1.11 (Feinberg et al, 2006):

i) Perturbación de células progenitoras:

Alteración epigenética que genera células neoplásicas. Se da en genes que ayuden al desarrollo tumoral. Varios están relacionados a vías sensibles al microambiente; E-caderina, β -catenina, conexinas, y APC son las más comunes. El daño epigenético es frecuente en células sometidas a estrés agudo o crónico.

ii) Mutación inicial:

Se establece la alteración, activación o silenciamiento, de un gen y se promueve la plasticidad de la célula; se puede comenzar a formar un fenotipo neoplásico

iii) Plasticidad genética y epigenética:

Una de las primeras alteraciones en cáncer es la hipometilación del DNA, lo que provoca relajamiento de centrómeros y rearrreglo cromosomal. A la par hay sobreexpresión de proteínas de centrómero, CENPA y CENPH, las cuales podrían formar nuevas regiones centroméricas. Otro escenario es la alteración de un gen relacionado con modificación de la cromatina; e.g. la expresión de EZH2 — regula la marca H3K27me3 — en cáncer de próstata, el cual genera silenciamiento de varios genes y participa en metástasis.

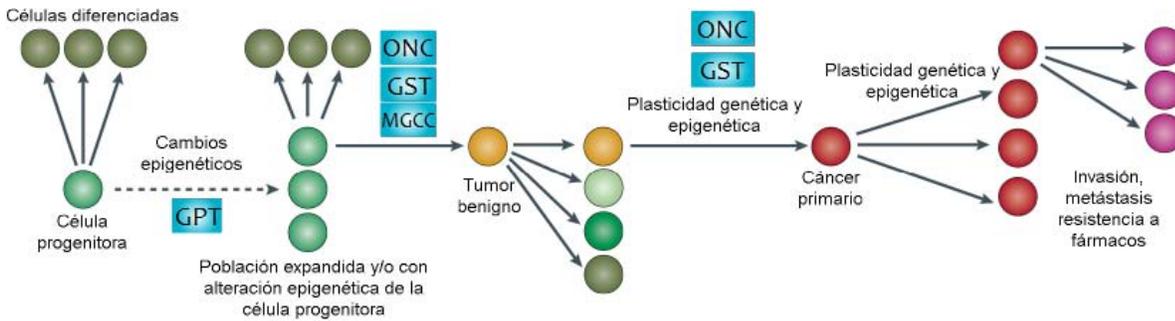


Figura 1.11 Progenitor epigenético del cáncer. En la primera etapa se da una mutación en un gen progenitor de tumores (GPT). La célula progenitora continúa dividiéndose y en un punto la activación del GPT provoca la activación de oncogenes (ONC), y el silenciamiento de genes supresores de tumores (GST); ambos cambios provocan mutaciones en genes de control celular (MGCC) lo cual permite la formación de una célula neoplásica. Posteriormente la neoplasia puede continuar activando ONC o silenciando GST al tener plasticidad genética y epigenética. Esto permite que se desarrollen diversas clonas y que se genere cáncer, metástasis, vías alternas de supervivencia y resistencia a fármacos.

En CaP existen cuatro mecanismos epigenéticos de relevancia: metilación del DNA, variantes de histonas, miRNA y RNAs largos no codificantes, y modificaciones a histonas (Valdés-Mora & Clark, 2014).

1.5 Metilación del DNA

La metilación del DNA es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados hoy en día, ya que se observan alteraciones a este nivel en genes específicos en diferentes patologías. Este mecanismo de regulación epigenética consiste en la adición covalente de un grupo metilo en el carbono 5 de una citosina (5meC) preferente a un dinucleótido CpG (Suzuki & Bird, 2008; Valdés-Mora & Clark, 2014). Se han descrito la metilación en sitios CpA y CpT en células troncales embrionarias, pero no en células diferenciadas (Ramsahoye et al, 2000). Dentro del genoma hay una gran cantidad de sitios CpG, y en algunas regiones existe un número superior al esperado de estos sitios, estas regiones se denominan islas CpG (CGI, *CpG islands*). Las CGI son regiones de DNA de al menos ~1000 pb con un alto contenido de bases G y C (65%) y en la cual se presenta en gran proporción el par CpG (un cociente de sitios CpG observados entre esperados de más de 0,6). Estas regiones, en su mayoría, se encuentran libres de metilación tanto en células germinales como en células somáticas. Las CGI metiladas son normalmente las relacionadas a genes de impronta genómica, del cromosoma X inactivo, y de genes expresados únicamente en línea germinal (Suzuki & Bird, 2008). Otros sitios de interés en cuanto a la metilación son las bahías CpG, que son sitios que rodean a la CGI y se encuentran a 2 kb alrededor de esta. Más allá de

las bahías están los *shelves* y posterior están sitios únicos en el “mar abierto”. De igual manera existen los “barrancos” CpG, similares a las islas en composición pero cuya regulación se da por la alta metilación de sus bahías y *shelves*. Las islas, bahías, *shelves* y los sitios en “mar abierto” son regiones de regulación genética (Edgar et al, 2014).

La adición de los grupos metilo se da por la acción de las enzimas DNMT (*DNA methyl transferases*) figura 1.12. Existen dos tipos de enzimas DNMT, las de mantenimiento y las *de novo*. La DNMT1 es una metil transferasa de mantenimiento, es decir, durante la replicación del DNA esta enzima reconoce la hebra hemimetilada y añade un grupo metilo al sitio CpG complementario al sitio CpG metilado. La DNMT3a y la DNMT3b son metil transferasas *de novo*, tienen la capacidad de metilar DNA sin necesidad de que exista un grupo metilo en la otra hebra; este proceso es requerido dado que durante la formación de células germinales hay una desmetilación de todo el genoma con excepción de ciertos genes. La DNMT3L es una metil transferasa *de novo* presente en oogénesis para el establecimiento de la impronta genómica y ayuda también a la función de DNMT3a y 3b. Las DNMT usan como donador de grupo metilo a SAM (S adenosil metionina) molécula que depende del ciclo del ácido fólico para su regeneración. (Herceg & Vaissière, 2011; Law & Jacobsen, 2010).

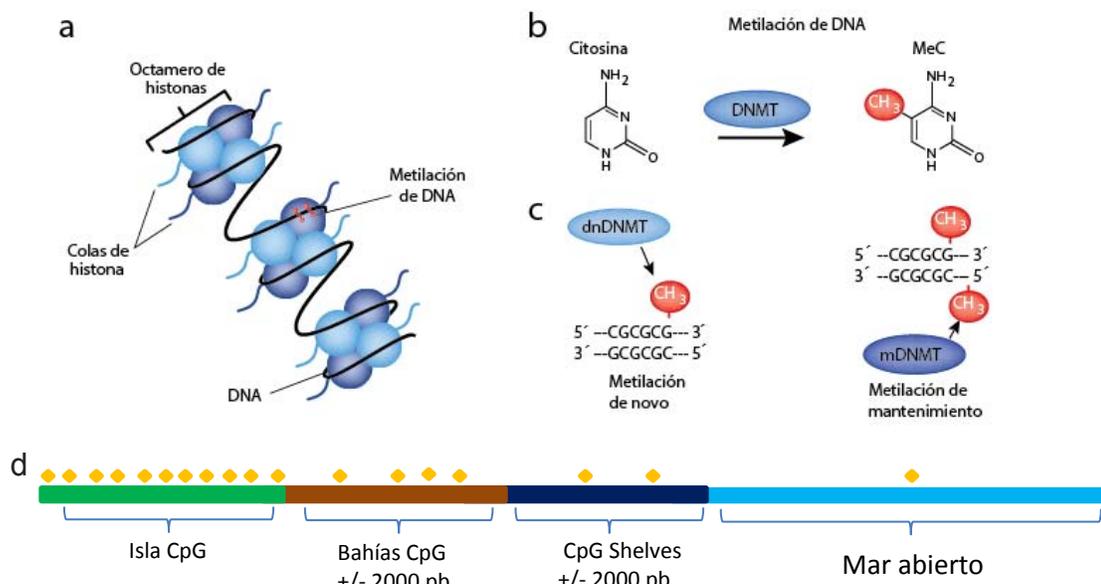


Figura 1.12 Metilación del DNA. a) El DNA se encuentra enrollado en octámeros de histonas o nucleosoma. Este DNA y las histonas tienen *cross talk* con otras enzimas y pueden promover o no la metilación, compactación y reparación de DNA. b) La base que se metila del DNA es la citosina, y ésta adición ocurre en el carbono 5 por la acción de una DNMT. c) Existen dos tipos de metilación: *de novo* (por DNMT3a/b) y de mantenimiento (DNMT1). d) Esquema de los sitios CpG más estudiados, de color verde la isla CpG, de color café y comprendiendo 2000 pb río arriba o abajo de la isla están las bahías CpG, de color azul marino y comprendiendo los siguientes 2000 pb están los “shelves”, finalmente después de estas regiones está el “mar abierto”; los círculos amarillos representan meDNA. Modificado de Day & Sweatt 2010.

En cáncer se han observado dos alteraciones, hipometilación global del DNA e hipermetilación del DNA en regiones promotoras (Portela & Esteller, 2010).

La hipometilación del DNA ocurre principalmente en regiones repetidas, secuencias muy comunes en las regiones centroméricas y pericentroméricas, lo cual provoca una inestabilidad genómica ya que la metilación del DNA funciona como marca de represión y es fundamental en la formación de heterocromatina (Ehrlich, 2002). Una vez que se pierde la metilación se da una desregulación de varias regiones cromosómicas y se pierde o gana la expresión de genes.

La hipermetilación del DNA frecuentemente ocurre en regiones promotoras lo cual genera silenciamiento de genes, normalmente genes supresores de tumores. Hay tres mecanismos propuestos para el silenciamiento de genes por medio de metilación del DNA, meDNA: i) interrupción de la transcripción al evitar la unión de Pol II y factores de transcripción al sitio promotor ii) unión de MBPs (Methyl Binding Protein) a la región metilada lo cual inhibe la transcripción al evitar la unión de factores de transcripción iii) Unión de MBP a la región metilada lo cual recluta desacetilasas de histona y complejos remodeladores de la cromatina, que conlleva a la formación de heterocromatina (Ballestar & Wolffe, 2001).

La meDNA provoca silenciamiento y puede tener otras consecuencias como la desaminación de la citosina metilada lo cual genera una timina y un apareamiento erróneo. Este error se corrige por la vía de reparación de apareamientos errados. Otra manera de perder la metilación es por una vía pasiva o por una vía activa. La desmetilación pasiva es la que se genera cuando un componente de la vía de metilación está inhibido o deletado. Un ejemplo de desmetilación pasiva es el uso del fármaco 5-aza-2'-deoxicitidina, DAC, el cual inhibe a las DNMT. La desmetilación activa se da por vía enzimática (figura 1.13). Las proteínas que regulan esta desmetilación son las TET (*Ten Eleven Translocases*). Estas enzimas catalizan la conversión del grupo metil de 5meC a un grupo hidroxilo, posteriormente a un grupo formil y finalmente a un grupo carboxil. Estas tres bases oxidadas se pueden remover de la secuencia por las vías de reparación de DNA, —TDG, BER, o SMUG1— ya que son reconocidas como errores (Pastor et al, 2013).

La hipermetilación es un fenómeno característico del cáncer. Como se ha descrito previamente se da preferencialmente en genes que promuevan la plasticidad de la célula, es decir que ayuden a que la célula gane pluripotencia. Algunas vías afectadas por hipermetilación en su región promotora son la de reparación de DNA (*hMLH1*, *MGMT*), ciclo

celular (*p16(INK4a)*, *p15(INK4b)*), apoptosis (*DAPK*), adherencia celular (*CDH1*, *CDH13*), vía Hedgehog (di Magliano & Hebrok, 2003), vía GLI, vía SMAD, vía BER (Vogelstein & Kinzler, 2004) y vía WNT (Reya & Clevers, 2005), entre otras.

Como se mencionó anteriormente las vías que se ven afectadas durante el desarrollo de cáncer, descrito por el modelo de progenitor epigenético, son las sensibles a cambios en el microambiente. La vía WNT/ β -catenina promueve el silenciamiento o activación de una amplia gama de genes asociados a la pluripotencia mediante diversas vías descritas a continuación (Holland et al, 2013).

1.6 Vía WNT/ β -catenina

La vía WNT/ β -catenina se encarga de regular diferenciación celular, embriogénesis, organogénesis adhesión celular, migración celular, formación de eje y mesodermo y la polaridad de los tejidos. Su enfoque hacia la formación de diversas patologías, cáncer entre ellas, se justifica por su efecto pleiotrópico en una célula (Holland et al, 2013; Huelsken & Birchmeier, 2001; Huelsken & Behrens, 2002). Esta ruta se divide en dos vías de señalización principalmente, la vía canónica y la vía no canónica. La vía no canónica se divide a su vez en la de polaridad de tejido y la dependiente de calcio.

1.6.1 Vía canónica

Las señales de esta vía se traducen a través de la familia de receptores Frizzled (Fz) y los correceptores LRP5/LRP6 activados por la interacción de Fz con la proteína WNT (figura 1.14). Cuando no hay actividad en esta vía, la β -catenina se encuentra en un complejo que la lleva a degradación por proteasoma. Cuando se activa la vía, la β -catenina queda exenta de la degradación y se libera a citoplasma, en donde se acumula. La β -catenina se transloca a núcleo donde interactúa con factores de transcripción. Este complejo promueve la transcripción de genes blanco de la vía canónica de la ruta WNT, como lo son *FGF20*, *DKK1*, *WISP1*, *MYC*, y *CCND1*. (Huelsken & Behrens, 2002; Katoh & Katoh, 2007; Reya & Clevers, 2005). Una asociación importante de la vía canónica es la de β -catenina con el AR. El receptor de andrógenos aumenta su actividad cuando se encuentra asociado a esta proteína. De igual manera adquiere la capacidad de responder a otras moléculas esteroideas como androstenediona y estradiol. Por mecanismos similares reduce el antagonismo por bicalutamida (Truica et al, 2000).

1.6.2 Vía no canónica y vía dependiente de Ca²⁺

Al igual que la vía canónica, las vías no canónicas se activan por medio de la interacción de WNT con los receptores Fz pero usa otros correceptores (figura 1.14). Un grupo de pequeñas proteínas G son moléculas efectoras dependientes de DVL en la vía no canónica. Las pequeñas proteínas G están asociadas a procesos de reorganización de citoesqueleto durante la invasión y metástasis en cáncer. La interacción con RAC media la interacción de profilina y actina resultando en la restructuración del citoesqueleto y la gastrulación. La activación de esta vía promueve la actividad de enzimas que inhiben la ruta canónica de WNT. La NLK (*Nemo Like Kinase*) y el NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) son las moléculas efectoras de la vía no canónica dependiente de Ca²⁺. Esta ruta ayuda a regular la liberación de calcio de retículo endoplásmico (RE). Los niveles elevados de calcio y DAG activan CDC42, factor importante para la diferenciación del patrón ventral; también activan la CaMKII, responsable de la activación de NFAT que a su vez regula procesos de sistema inmune, cardiaco, del esqueleto y nervioso (Katoh & Katoh, 2007; Reya & Clevers, 2005).

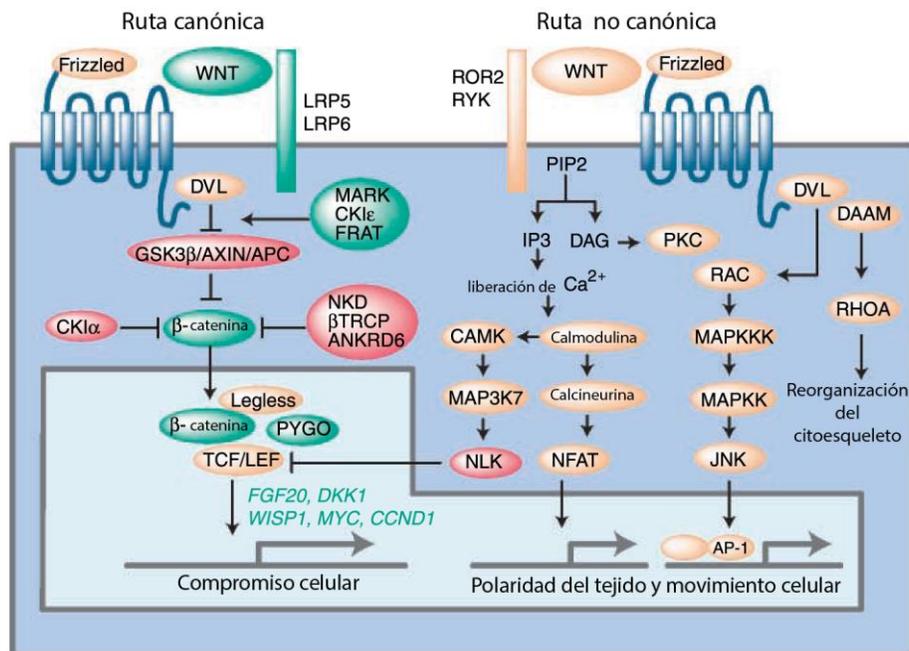


Figura 1.14 Esquema de las rutas canónica y no canónica de WNT. En verde se marcan las moléculas que regulan de manera positiva la ruta canónica. En rojo las moléculas que inhiben la ruta canónica. En naranja están las moléculas que participan pero no tienen actividad de regulación de la vía canónica o son parte de las vías no canónicas. Las proteínas SFRP interactúan con el receptor Frizzled o con las moléculas WNT (Katoh & Katoh, 2007; Reya & Clevers, 2005).

Las vías de WNT son negativamente reguladas por dos tipos de inhibidores específicos:

- i) Inhibidores secretados: Las proteínas SFRP1, SFRP2, SFRP3, SFRP4, SFRP5 y WIF1 que inhiben la interacción de WNT con el receptor Fz. Las proteínas inhibidoras DKK1, DKK2, DKK3 y DKK4 interactúan con los correceptores LRP5/6 y provocan su endocitosis, evitando así la formación del complejo WNT-Fz-LRP5/6.
- ii) Inhibidores intracelulares: APC, AXIN1, AXIN2, CK1 α , GSK3 β

1.7 Familia de proteínas SFRP

Las proteínas SFRP están estructuradas modularmente. Se encuentran dobladas en dos dominios independientes; en el extremo N terminal se encuentra un péptido de señal de secreción seguido por un dominio rico en cisteína (CDR). El extremo C terminal tiene segmentos de residuos con carga positiva y 6 cisteínas que forman 3 puentes disulfuro; estas características forman el módulo NTR (similar al de otras proteínas e.g. WNT).

La función principal de las proteínas SFRP es la de regular la vía WNT, figura 1.15. Esto lo hace por medio de cuatro mecanismos: A) interacción con proteínas WNT, evitando su unión con el receptor Fz, B) interacción entre proteínas de la familia SFRP con ellas mismas (regulando actividad una de la otra) C) Señalización por el receptor Frizzled a través de la unión de una proteína SFRP D) formación de complejos entre proteínas SFRP, frizzled y WNT (Bovolenta et al 2008).

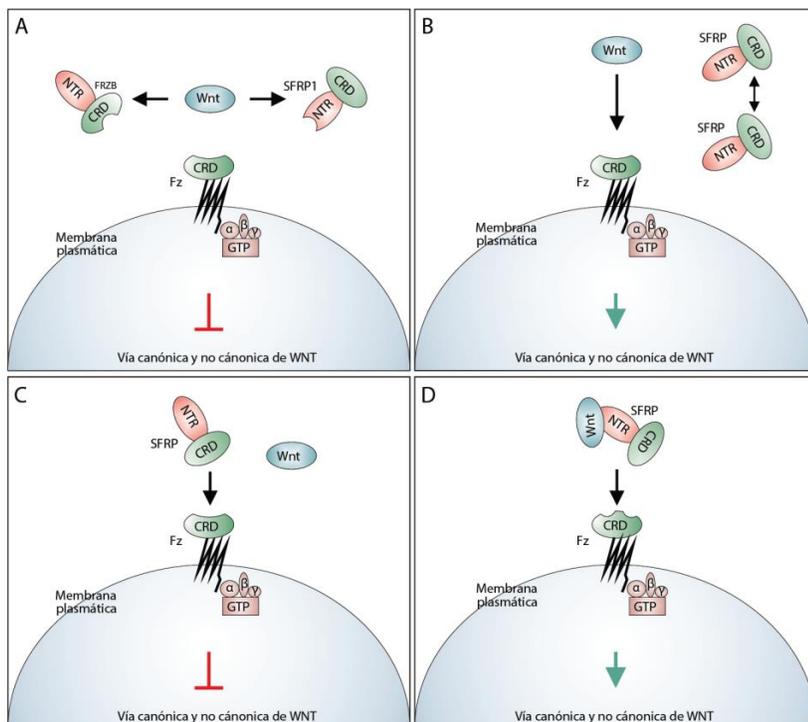


Figura 1.15 Mecanismos de regulación de la vía WNT por SFRP. A) Secuestro de sustrato, interacción de SFRP con WNT. B) Secuestro entre ellos mismos, regulación de la actividad de uno y otro. C) Inhibición por unión con el receptor Fz. D) Formación de un complejo WNT-SFRP que activa de otra manera el receptor Fz. Modificado de Bovolenta 2008.

En la mayoría de los casos estos genes tienen una isla CpG (CGI) cercana o dentro de la región promotora. Para esta investigación se consideró como la región promotora a los nucleótidos contenidos de 0 a -2000 pb del sitio de inicio de la transcripción. En la tabla 1 se encuentra una descripción genómica de los genes *SFRP*.

Tabla 2. Familia de genes *SFRP*

Gen	Características
<i>SFRP1</i>	Localizado en el cromosoma 8, en la banda p11.21, cercano al centrómero. Es un gen contenido en la hebra antisentido de una longitud de ~47,500 pb. Contiene 3 exones codificantes que forman un mRNA de ~4500pb el cual se traduce a una proteína del mismo nombre con longitud de 314 residuos. Su CGI es de 1288pb, tiene un contenido GC del 70.4% y un contenido CpG de 22.8%; tiene un cociente de observado/esperado de 0.92. Algunas etiquetas ontológicas de este gen son (de acuerdo a la base de datos GO): diferenciación de osteoblastos, desarrollo del divertículo metanefrogénico, somitogenesis, cierre del tubo neural, desarrollo vascular.
<i>SFRP2</i>	Localizado en el cromosoma 4, en la banda q31.3. Es un gen contenido en la hebra antisentido de una longitud de ~8,500 pb. Contiene 3 exones codificantes que forman un mRNA de ~2000pb el cual se traduce a una proteína del mismo nombre con longitud de 295 residuos. Su CGI es de 1315pb, tiene un contenido GC del 64.9% y un contenido CpG de 17.0%; su cociente de observado/esperado es de 0.82. Algunas etiquetas ontológicas del gen son (de acuerdo a la base de datos GO): unión a fibronectina, unión a integrina, activador de metaloenzimas, unión a WNT.
<i>SFRP3</i>	Localizado en el cromosoma 2, en la banda q32.1. Es un gen contenido en la hebra antisentido de una longitud de ~33,890 pb. Contiene 6 exones codificantes que forman un mRNA de ~3160pb el cual se traduce a una proteína del mismo nombre con longitud de 325 residuos. Tiene una isla CpG, de 549pb que se encuentra después del sitio de inicio de la transcripción y otra antes pero de menor tamaño, 274pb. De la base de datos ENCODE se obtuvo la asociación de la isla grande posterior a la marca H3K4me3, y a sitios sensibles a DNAsa, marcas que delimitan el promotor. La isla pequeña se encontró antes de estas marcas. Analizar la hipermetilación de las CGI de este gen no es útil ya que en teoría no se asocian al promotor. Algunas etiquetas ontológicas de este gen son (de acuerdo a la base de datos GO): unión a proteína, unión a WNT, unión al dominio PDZ, activación tipo WNT del receptor Fz.
<i>SFRP4</i>	Localizado en el cromosoma 7, en la banda p14.1. Es un gen contenido en la hebra antisentido de una longitud de ~119,700 pb. Contiene 6 exones codificantes que pueden formar 3 variantes por splicing de las cuales el mRNA común tiene una longitud de ~2950pb el cual se traduce a una proteína del mismo nombre con longitud de 346 residuos. Su CGI es de 933pb, tiene un contenido GC del 67.7% y un contenido CpG de 19.7%; su cociente de observado/esperado es de 0.86. El gen <i>SFRP4</i> no se trabajó pues en experimentos anteriores de MSP no hubo metilación diferencial en el promotor de este gen en muestras de CaP, HPB y PN. Algunas etiquetas ontológicas de este gen son (de acuerdo a la base de datos GO): desarrollo vascular, internalización del receptor Fz, evita la axonogénesis, desarrollo del cerebro, regulación negativa de la proliferación celular.
<i>SFRP5</i>	Localizado en el cromosoma 10, en la banda q24.2. Es un gen contenido en la hebra antisentido de una longitud de ~5,200 pb. Contiene 3 exones codificantes que forman un mRNA de ~1800pb el cual se traduce a una proteína del mismo nombre con longitud de 317 residuos. Su CGI es de 943pb, tiene un contenido GC del 69.4% y un contenido CpG de 21.2%; su cociente de observado/esperado es de 0.88. Algunas etiquetas ontológicas de este gen son (de acuerdo a la base de datos GO): unión a proteína, unión a proteína WNT, unión al dominio PDZ, activación tipo WNT del receptor Fz.

1.8 Genes SFRP y cáncer

La familia de genes *SFRP* ha sido descrita en varios estudios de cáncer ya que son reguladores negativos de la vía WNT, vía reguladora de funciones celulares que al encontrarse activadas pueden promover el desarrollo de cáncer. Como se describió anteriormente regulan la vascularización (*SFRP1* y *SFRP4*), unión a la matriz extracelular por interacción con integrinas (*SFRP2*), inhiben la proliferación (*SFRP4*) y todas interactúan con la ruta WNT para regular la β -catenina.

En varios tipos de cáncer se ha visto hipermetilación en la región promotora de los genes *SFRP*:

Tabla 3. Hipermetilación de la región promotora de genes *SFRP* en cáncer.

<i>SFRPs</i>	Tipos de cáncer	Descritos por
Todos	En cáncer colorectal, glioblastoma multiforme y cáncer gástrico.	Suzuki et al 2004; Schiefer et al 2014; Nojima et al 2007
<i>SFRP1</i>	En cáncer de mama, testículo, pulmón, hepatocelular, gástrico y renal (entre otros)	Fukui et al, 2005; Shih et al, 2006; Dahl et al ,2007
<i>SFRP2</i>	En cáncer de esófago, en adenomas colorectales y en cáncer de colon	Saito et al, 2014; Voorham, et al, 2013; Wang et al, 2013
<i>SFRP5</i>	Mejor respuesta en cáncer de pulmón al tratamiento de inhibición de EGFR-TKI si se encuentra desmetilado.	Zhu et al, 2012

En cáncer de próstata se han realizado estudios sobre la familia de genes *SFRP* por separado:

Gen	Estudio	Descrito por
<i>SFRP1</i>	Expresión aumentada de <i>SFRP1</i> en la respuesta osteolítica en muestras de metástasis de CaP en hueso.	Larson et al, 2013
<i>SFRP1</i>	Regulación negativa en cáncer de próstata de la actividad del receptor de andrógenos por interacción con <i>SFRP1</i> . Se describió la actividad pero el mecanismo por el cual lo hace no está descrito.	Kawano et al, 2009
<i>SFRP1</i>	Metilación de genes específicos en CaP, <i>SFRP1</i> (entre otros). Su uso en conjunto con <i>COX2</i> y <i>p57</i> como panel de diagnóstico para CaP.	Lodygin et al, 2005
<i>SFRP1</i>	Regulación negativa de <i>SFRP1</i> por miR-1260b; cuando se inhibía este miRNA en CaP se observaba una disminución de la proliferación celular, invasión, migración y actividad de TCF. Se reportó la reexpresión de <i>SFRP1</i> con tratamientos de genisteína al provocar desmetilación y modificaciones de histona.	Hirata et al, 2014
<i>SFRP2</i>	Diferenciación entre tumores benignos y malignos basados en la expresión de <i>SFRP2</i> , al igual que la formación de diferentes tipos de tumores, sólidos (expresión de <i>SFRP2</i>) ó difusos (no hay expresión de <i>SFRP2</i>).	O'Hurley et al, 2011

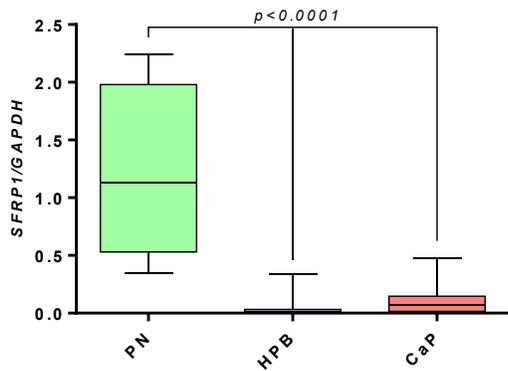
<i>SFRP3</i>	SFRP3 inhibe el crecimiento de la línea celular PC3 (CaP insensible a andrógenos). Modifica la morfología de la célula y la convierte a un fenotipo menos agresivo. Se encuentra una disminución en la activación de AKT, β -catenina en citoplasma, y actividad de TCF.	Zi et al, 2005
<i>SFRP4</i>	Inhibición de crecimiento e invasión de CaP, localizado o metástasis, sensible o insensible a andrógenos, por SFRP4.	Horvath et al, 2007

La vía WNT se ha asociado al inicio y progresión de CaP. El hecho de que se vean silenciados genes inhibidores de la vía establece la importancia de estos como posibles supresores de tumores. Esta vía también se encuentra asociada con el establecimiento de metástasis a hueso, presente en el 90% de los pacientes que fallecen por cáncer de próstata (Robinson et al, 2008; Larson et al, 2013).

Estudios previos en laboratorio del Dr. Rodríguez demostraron que existía una expresión diferencial en los genes de la familia SFRP en muestras de cáncer comparadas contra tejido saludable o hiperplasia (García, P. 2010;) (Figura 1.16). Estos datos se presentan de misma manera en líneas celulares control, PrEC o PrSC comparadas contra líneas de CaP: LNCaP y PC3. Esto sugiere que existe una regulación negativa de los genes durante la progresión de CaP. Es de interés evaluar los posibles mecanismos por los cuales se da la represión de los genes de la familia SFRP. Se eligieron los genes *SFRP1*, *SFRP2* y *SFRP5*, dado que en experimentos previos, datos no mostrados, se demuestra que existe metilación diferencial en estos genes y en *SFRP3* y *SFRP4* no hay este tipo de regulación dado que la CGI es muy pequeña o no presenta evidencias de metilación, correspondientemente.

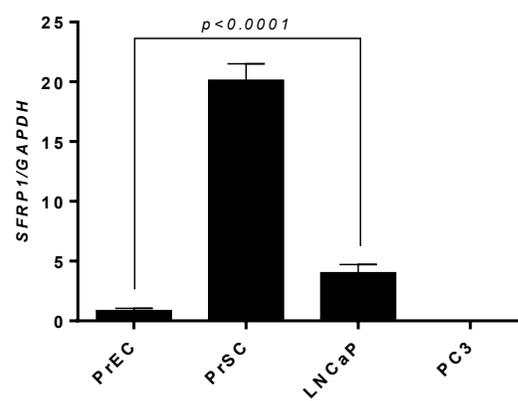
1A

Expresión relativa de SFRP1, muestras de tejido



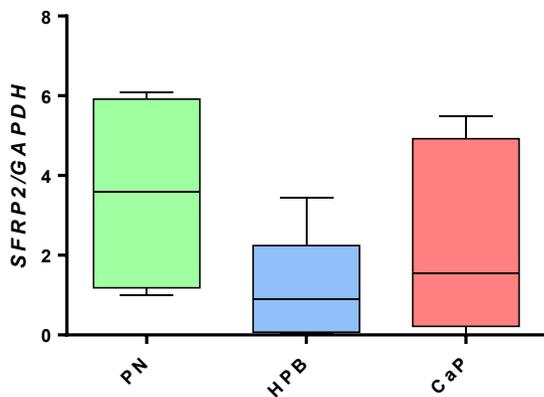
1B

Expresión relativa de SFRP1, líneas celulares



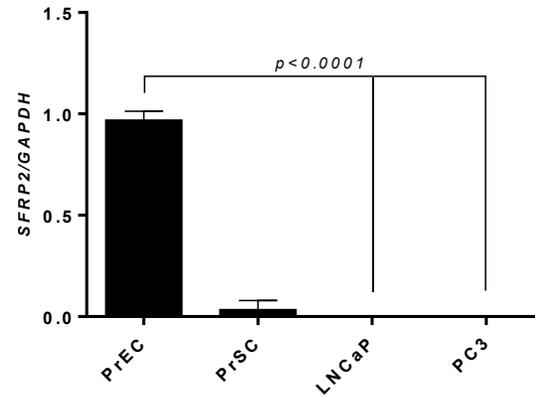
2A

Expresión relativa de SFRP2, muestras de tejido



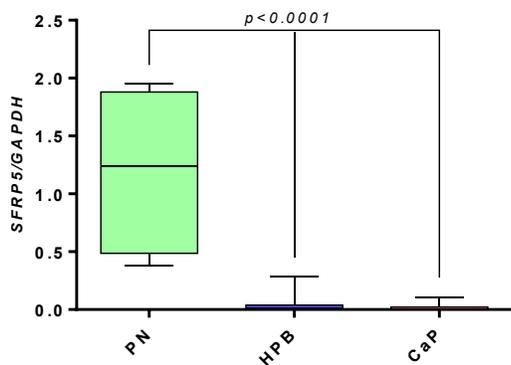
2B

Expresión relativa de SFRP2, líneas celulares



3A

Expresión relativa de SFRP5, muestras de tejido



3B

Expresión relativa de SFRP5, líneas celulares

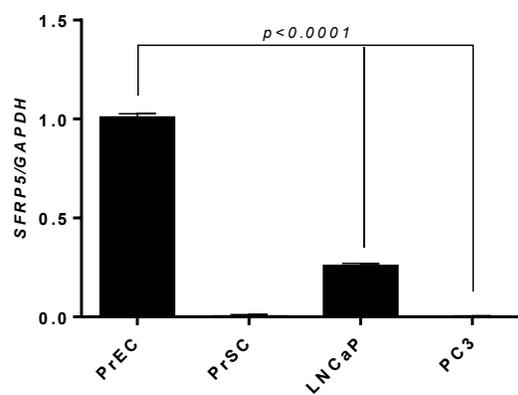


Figura 1.16. 1A) q-RTPCR de *SFRP1* para muestras de tejido. 1B) q-RTPCR de *SFRP1* para líneas celulares 2A) q-RTPCR de *SFRP2* para muestras de tejido. 2B) q-RTPCR de *SFRP2* para líneas celulares 3A) q-RTPCR de *SFRP5* para muestras de tejido. 3B) q-RTPCR de *SFRP5* para líneas celulares. Hay diferencia significativa entre PN (próstata normal) y HPB o CaP (hiperplasia benigna próstática y cáncer de próstata) en cuanto a la expresión de SFRP1 y SFRP5. No hay diferencia en la expresión de SFRP2 en tejidos. En líneas celulares hay diferencia entre el control principal (PrEC) y LNCaP para la expresión de SFRP1. Para SFRP2 y SFRP5 hay diferencia entre el control y ambas líneas celulares de CaP, LNCaP y PC3. (García, 2010)

2 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata es una enfermedad presente en un porcentaje importante en el sector salud (15% de los casos de cáncer), tanto en el mundo como en México. Los pacientes con CaP tienen buen pronóstico cuando son diagnosticados en etapas tempranas, sin embargo la mayor parte de los pacientes recurren al médico en etapas más avanzadas, en las cuales el tratamiento generalmente sólo prolonga la vida del paciente algunos años. En cáncer se han descrito diferentes alteraciones de la ruta WNT asociado al silenciamiento por la hipermetilación del sitio promotor de los genes *SFRP*. En CaP, existen reportes controversiales acerca del estado de metilación de los genes *SFRP*. Por lo tanto es importante realizar estudios acerca de su regulación, así como de su participación en el proceso carcinogénico.

3 HIPÓTESIS

Dado que se ha demostrado que existen alteraciones en la expresión de los genes SFRP en CaP y estos genes se encuentran hipermetilados en muchos tipos de cáncer, entonces es probable que en CaP estén silenciados por metilación del DNA en su región promotora.

4 OBJETIVO GENERAL

Determinar los patrones de metilación en regiones promotoras de los genes *SFRP1*, *SFRP2* y *SFRP5* en muestras de tejido de próstata y líneas celulares de próstata.

5 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de *SFRP1*, *SFRP2* y *SFRP5* en líneas celulares de CaP, tratadas con 5-aza-2'-deoxicitidina.
- Determinar el estado de metilación del ADN en la región promotora de los genes *SFRP 1, 2, y 5* en muestras de tejido y líneas celulares establecidas.

6 METODOLOGÍA



Figura 6.1 Diagramas de flujo de la metodología experimental llevada a cabo. A la izquierda el diagrama para evaluar el estado de metilación de los genes SFRP1/2/5 y a la derecha el diagrama de flujo para evaluar la expresión de los genes SFRP1/2/5.

Obtención de tejidos

Se utilizaron tejidos de pacientes con cáncer de próstata (CaP) e hiperplasia prostática benigna (HPB), 6 muestras de cada patología, obtenidas del Hospital General Manuel Gea González con su respectivo consentimiento informado. También se utilizaron 4 muestras de próstatas saludables (PN), provenientes de individuos del servicio médico forense (SEMEFO). Dado la baja variabilidad esperada en tejido saludable se usaron sólo 4 muestras de este tejido.

Cultivo de líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de CaP: LNCaP y PC3 (ATCC). Como controles: PrEC y PrSC (LONZA). Cada línea se cultivó bajo las condiciones establecidas por el proveedor.

Línea celular	Presencia de AR	Condiciones ambientales	Medio de cultivo usado
LNCaP, representativa de un cáncer menos avanzado.	+	37°C 5% CO ₂	RPMI con suero fetal bovino al 10% y 2g/L de NaHCO ₃ (Sigma)
PC3, representativa de un cáncer avanzado.	-		DMEM con suero fetal bovino al 10% (Gibco)
PrEC	+		PrEGM (Lonza) con SFB al 10%
PrSC	+		SCBM (Lonza) con SFB al 10%

1. Expresión de los genes SFRP en líneas celulares tratadas con DAC

Tratamientos con 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC)

Estos tratamientos se hicieron con la finalidad de revertir la metilación en el DNA de las líneas celulares ya que DAC es un inhibidor de DNMTs y promueve la desmetilación pasiva.

Se trataron las líneas LNCaP y PC3 con DAC a 5µM durante una semana bajo el siguiente esquema de trabajo:

Día	Tratamiento
1	Sembrar 50 000 células de PC3 y 80 000 de LNCaP en placas de 6 pozos. Realizar triplicados de cada grupo (vehículo y DAC)
2	Añadir DAC a los pozos en tratamiento para tener [5 µM].
3	-
4	Cambiar el medio y tratar con DAC.
5	-
6	Cambiar el medio y tratar con DAC.
7	Recolectar las células y realizar la extracción de DNA y RNA.

Extracción de RNA

Se realizó la extracción de RNA de muestras de tejido y de cultivo celular usando *RNeasy Mini kit* de Qiagen, siguiendo el protocolo. Primero se lisan las células en amortiguador con tiocianato y guanidina, que también inactiva RNasas. La adición de un amortiguador con etanol permite la adsorción de nucleótidos. La centrifugación posterior permite la eliminación de impurezas y de RNAs pequeños (rRNA y tRNA). El RNA extraído fue cuantificado en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm y se realizó un gel de agarosa al 1.5% para evaluar la integridad del RNA extraído.

Retrotranscripción

Se usaron 3000 ng de RNA extraído, en cada caso, para realizar una retrotranscripción usando la enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT)* de Invitrogen siguiendo el protocolo proporcionado. Al final de la fase de retrotranscripción se inactiva la enzima por calor.

q-RTPCR

Con el cDNA obtenido se realizó una PCR cuantitativa (q-RTPCR) usando sondas TaqMan® para evaluar la expresión de los genes *SFRP1*, *SFRP2* y *SFRP5* en muestras de línea celular.

Previamente en laboratorio se había realizado la q-RTPCR de las muestras de PN, HPB y CaP, al igual que la de líneas celulares, PrEC, PrSC, LNCaP y PC3.

Análisis de datos de q-RTPCR

Se determinó la expresión de los genes por medio de la comparación con el gen GAPDH por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estos datos se usaron en análisis estadístico usando el software GraphPad Prism 6.0.

2. Secuenciación de DNA transformado con bisulfito de sodio

Extracción de DNA

Se extrajo el DNA de los tejidos de CaP, HPB y PN y de las líneas celulares de LNCaP, PC3, PrEC y PrSC usando el kit *QIAamp® DNA Mini Kit* de QIAGEN y se siguió la metodología establecida. EL primer paso es el de lisis celular para liberar el material genético, aquí se eliminan proteínas y otros contaminantes. El segundo paso es el uso de un amortiguador para promover la retención de los nucleótidos en la columna. Los siguientes pasos son para eliminar impurezas retenidas, como proteínas o RNA, usando dos amortiguadores diferentes. El último paso es el de elución de DNA.

Se cuantificó en NanoDrop y se evaluó su integridad por electroforesis en gel de agarosa 1.5%.

Tratamiento con bisulfito de sodio

Al DNA extraído se le realizó el tratamiento con bisulfito de sodio usando el kit *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit* de Zymo Research siguiendo la metodología indicada. El método se basa en la conversión de C a U. La muestra de DNA es colocada en condiciones altamente oxidantes (por la acción del bisulfito de sodio y el alta temperatura) y cualquier C que no esté metilada es más susceptible a la pérdida de su amino en posición 4. La metilación de la C en el carbono 5 protege a la base de esto.

PCR de la región de interés

Con el DNA transformado con bisulfito de sodio se realizó una PCR usando primers específicos para cada gen. Se usó la enzima *HotStartTaq*[®] *DNA Polymerase* de Qiagen siguiendo la metodología indicada para la reacción de amplificación. Se purificó la reacción con *MinElute*[®] *PCR Purification kit* de Qiagen.

Clonación del producto de PCR en plásmido

-Ligación y transformación

Se usó y se siguió lo establecido en el protocolo del kit *pGEM*[®]-*T Easy Vector System I* de Promega para insertar el producto de PCR en un vector bacteriano. Este vector se transformó en la cepa JM109 (bacterias competentes) distribuidas por Promega por medio de choque térmico.

El método se basa en la inserción del producto de amplificación en un plásmido que tiene el operón lac en su secuencia. Este plásmido está diseñado para interrumpir la secuencia de la enzima β -galactosidasa, codificada en *lac Z*, cuando se ligue un amplicon deseado al vector. De igual manera cuenta con un gen de resistencia a ampicilina. Cuando se siembran las bacterias competentes por 24h a 37°C en agar LB adicionado con IPTG (activador del operón lac), X-gal (compuesto sensible a la acción de β -galactosidasa) y ampicilina se obtienen dos fenotipos de colonias de bacteria: colonias blancas y colonias azules. Las colonias azules al tener actividad de β -galactosidasa no deben de tener inserto y por lo tanto son negativas. Las colonias blancas tiene presencia de un inserto y se debe de verificar en gel de agarosa al 1.5% que sea el inserto del peso esperado.

Extracción de plásmido

Las colonias positivas se sembraron por duplicado en tubos con 5mL de medio (LB) y se incubaron a 37°C por 24h. Posteriormente se centrifugaron, el medio se decantó y se resuspendieron en 300 μ L de agua miliQ. El resuspendido se utilizaba con el protocolo de Zyppy[™] Plasmid Miniprep Kit de Zymo Research. El método se basa en la retención del plásmido en la columna, posterior a la lisis de las bacterias y a su lavado con amortiguadores que eliminan impurezas. Posterior a esto se realiza la elución del DNA.

Secuenciación

Las muestras de plásmido extraído se llevaron a una concentración entre 100-150 ng/μL y se enviaron a secuenciación en MacroGen Inc. Corea del Sur por el método de Sanger adaptado a electroforesis capilar. La razón de amplificar el inserto en plásmido es para evitar el error que sucede en la secuenciación para las primeras 100pb. La secuencia obtenida es más confiable ya que está flanqueada por pb que son irrelevantes ya que pertenecen al plásmido.

Análisis de los datos de secuenciación

Los datos de secuenciación se analizaron con el software *BISMA* y la información de este análisis fue usada para el estudio estadístico de los resultados usando el software GraphPad Prism 6.0.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Metilación y expresión de *SFRP1*

A partir de los datos obtenidos de secuenciación se realizó un análisis por medio del software BISMA para evaluar los sitios CpG que presentaran metilación. De este análisis se obtuvieron los mapas de calor mostrados en la figura 7.1.1 (y subsecuentes). El color amarillo denota una baja incidencia de metilación y el color azul una alta incidencia. De los datos de porcentaje de metilación obtenidos de este análisis se hicieron las gráficas y los análisis estadísticos pertinentes (todos con una $n=6$) mostrados en las gráficas de barras de porcentaje de metilación. El análisis de expresión de *SFRP1*, como los otros genes de interés, por qRT-PCR se realizó estandarizando contra GAPDH mediante $\Delta\Delta Ct$.

Como se muestra en la figura 7.1.1 existe una diferencia significativa entre el porcentaje de metilación del sitio promotor de las muestras de próstata normal y las muestras de CaP. Se encontró diferencia entre HPB vs CaP ($p=0.0090$, corrección de Tukey, no mostrado en la figura) pero no entre HPB vs PN. Esto sugiere que la metilación diferencial del gen *SFRP1* es característica de una neoplasia maligna.

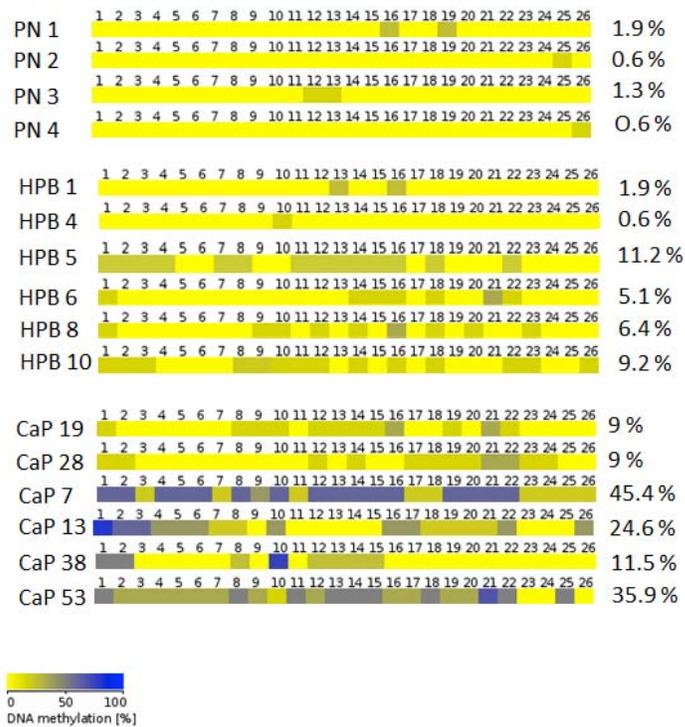
La expresión de *SFRP1* en HPB y CaP fue diferente contra PN. Por lo tanto una característica importante del desarrollo tumoral, ya sea benigno o maligno, es la pérdida de expresión de *SFRP1*. Esto se puede adjudicar a la regulación negativa de *SFRP1* de la angiogénesis. Una inhibición de *SFRP1* promovería la formación de nuevos vasos sanguíneos, necesarios para el crecimiento de la neoplasia (Ezan et al, 2004; Hu et al, 2009).

El hecho de que exista un silenciamiento de *SFRP1* en HPB, pero no se encuentre una hipermetilación en el sitio promotor sugiere que existe otro mecanismo de silenciamiento. Hasta la fecha se han establecido otros mecanismos para la formación de heterocromatina en la región promotora, ejemplo son la desacetilación de histonas y la marca de represión H3K9me3 (trimetilación de la lisina 9 de la histona 3) el cual podría ser el caso en HPB (Fuks, 2005), una neoplasia benigna que no presenta fenotipo invasivo y que por lo tanto no requeriría silenciar de manera más estable la expresión de *SFRP1*.

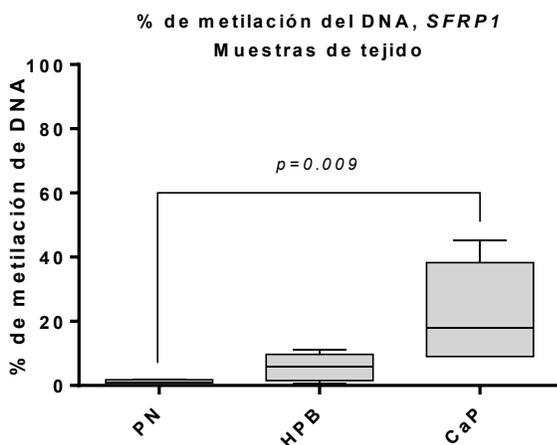
Un mecanismo importante que se debería de tener en cuenta es la expansión de heterocromatina constitutiva por la deslocalización de regiones centroméricas. Como se mencionó en la introducción (Feinberg et al, 2006) la sobreexpresión de CENPA y CENPH, proteínas centroméricas, podrían generar nuevas regiones de heterocromatina. Como se

menciona en la tabla 2 de la introducción el gen *SFRP1* se encuentra muy cercano al centrómero lo cual lo podría hacer susceptible a ser silenciado por la formación de un centrómero falso. Esto se podría corroborar realizando una inmunoprecipitación de la cromatina contra las proteínas CENPA y CENPH y después evaluando la presencia del gen *SFRP1*.

A)



B)



C)

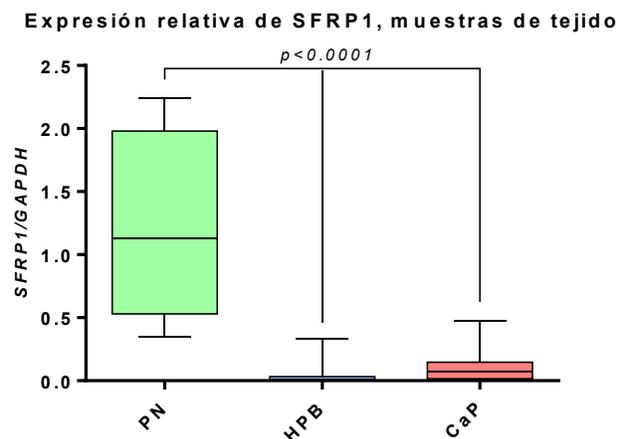


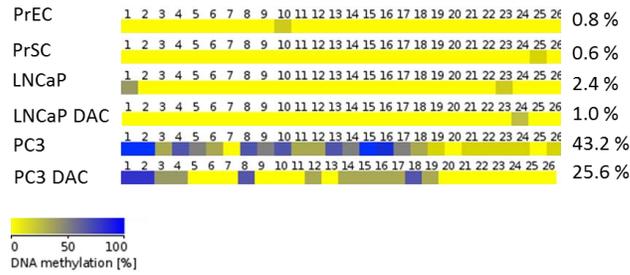
Figura 7.1.1 A) Mapa de calor de los sitios CpG analizados para metilación. B) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de ADN extraído de próstata normal (PN), hiperplasia benigna (HPB), y cáncer de próstata (CaP). La única diferencia significativa se encontró entre CaP vs PN. C) q-RT-PCR de *SFRP1* para muestras de tejido. Se encuentran diferencias significativas entre PN vs HPB y PN vs CaP.

Para tener una idea más clara sobre la metilación en cáncer de próstata en diferentes etapas del cáncer se usaron 4 líneas celulares. PrEC representando un control positivo que proviene de tejido epitelial de próstata (sitio donde se generan la mayoría de los casos de CaP, Secretaría de Salud, 2011). Se usó también la línea PrSC, línea celular proveniente de estroma prostático, como control pero los análisis estadísticos se hicieron siempre contra PrEC. Representando un estadio temprano de CaP está LNCaP y un estadio tardío está PC3.

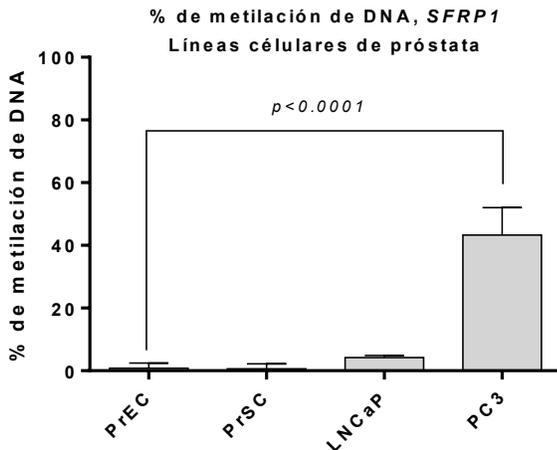
En la figura 7.1.2 se observa hipermetilación en la región promotora de *SFRP1* en la línea celular PC3. A diferencia de LNCaP, PC3 no presenta expresión de AR y es un CaP resistente a la castración. Lo que la metilación en esta región sugiere es que en estadios avanzados de la enfermedad es necesario el silenciamiento del gen de forma más estable. Por lo tanto PC3 regula por meDNA a *SFRP1*. Los cambios en la expresión se dan sólo entre PrEC vs LNCaP, donde hay un aumento leve del nivel de mSFRP1. En conclusión LNCaP tiene un mecanismo de silenciamiento diferente a meDNA para el caso de *SFRP1*.

El tratamiento con DAC, en líneas celulares de mamíferos, propicia la desmetilación pasiva del DNA al inhibir a las DNMT. Ambas líneas de CaP mostraron resultados heterogéneos al someterse a tratamiento con DAC, como se muestra en la figura 7.1.3. La línea celular que tuvo una desmetilación fue LNCaP y no se observan cambios significativos en la expresión. PC3 no tuvo cambios significativos en la metilación pero si muestra un aumento marcado en la expresión de *SFRP1*. Como se estableció antes LNCaP aparentemente no se regula por metilación, por lo que la pérdida de metilación en este caso no debería de ser relevante. El porcentaje de metilación de LNCaP es de 2.4% y de LNCaP-DAC es de 1.0%. Esta diferencia no tiene importancia ya que representa la pérdida de un único sitio de metilación, el cual no está conservado en ambas muestras como se puede observar en el mapa de calor de la figura 7.1.2 A. La única línea celular que podría regularse por meDNA es PC3 al tener un aumento en la expresión de SFRP1 después del tratamiento con DAC. No es corroborable este dato dado que el cambio en el porcentaje de metilación entre la muestra control y el tratamiento no tienen diferencia significativa.

A)



B)



C)

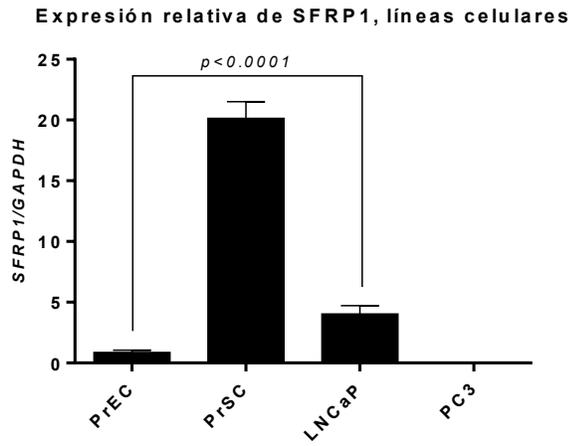
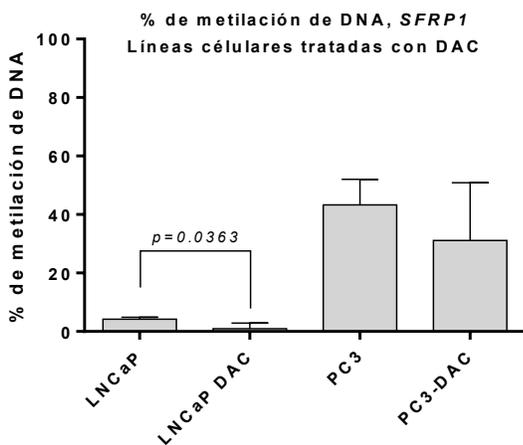


Figura 7.1.2 A) Mapa de calor de los sitios CpG analizados para metilación. B) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de DNA extraído de líneas celulares. Hubo diferencia significativa entre el control PrEC y PC3. C) q-RT-PCR de *SFRP1* para líneas celulares. Se encuentran diferencias significativas entre PrEC vs LNCaP.

A)



B)

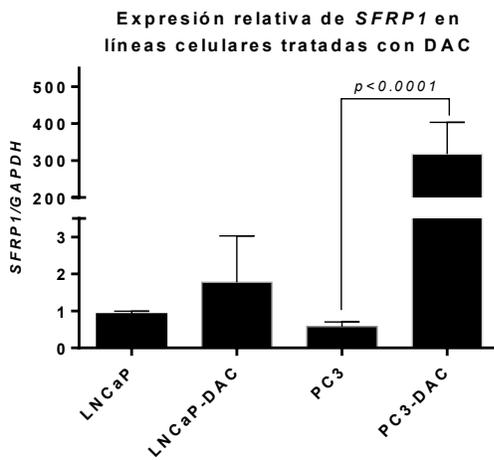


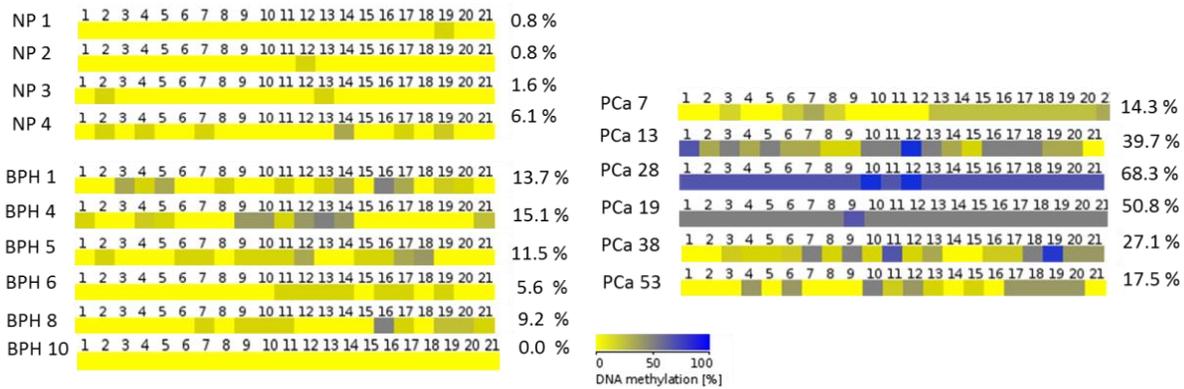
Figura 7.1.3 A) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de DNA extraído de líneas celulares tratadas con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC). Hubo diferencia significativa entre el LNCaP y su tratamiento LNCaP-DAC. B) q-RT-PCR de *SFRP1* para líneas celulares tratadas con DAC. Se encuentran diferencias significativas entre PC3 vs PC3-DAC.

7.2 Metilación y expresión de *SFRP2*

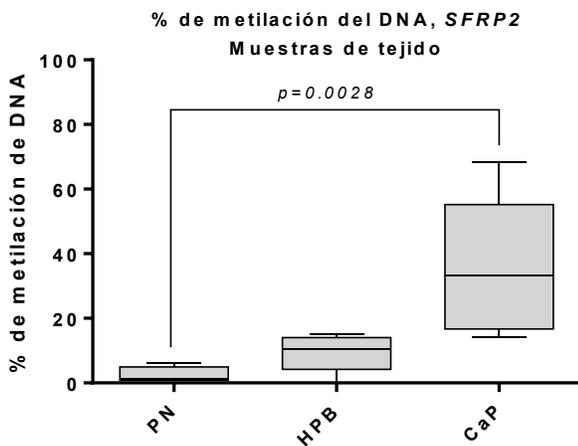
En muestras de tejido nuevamente la diferencia significativa de porcentaje de metilación se observó entre PN vs CaP como se muestra en la figura 7.2.1. En los análisis de expresión no hay diferencias entre ningún grupo. Se pueden apreciar tendencias, una disminución en HPB, pero PN y CaP tienen niveles muy similares de *SFRP2*. Se puede observar una tendencia entre los valores de las medias; PN tiene el valor más alto de expresión (3.560), seguido de CaP (2.285) y el más bajo es de HPB (1.274). La razón de tener valores tan dispersos de expresión podría deberse a que el silenciamiento de *SFRP2* no presenta una ventaja significativa para la neoplasia, aunque está reportado que *SFRP2* está silenciado en tipos de cáncer más agresivos (O'Hurley et al, 2011). Se observó también la diferencia significativa ($p=0.0028$, corrección por Tukey) entre la metilación de HPB vs CaP, y se puede concluir que esta metilación (en *SFRP2*) también es característica de neoplasias benignas aunque no regula la expresión.

Otro punto de análisis importante es que *SFRP2* se asocia a la unión de la célula a la matriz celular, el hecho de que las muestras fueran extraídas de un tumor sólido podría responder a la diversidad en los resultados. Un tumor sólido como tal no se ha diseminado por lo que todavía se encuentra asociado a su matriz celular y debe de tener una expresión adecuada de *SFRP2*. Las muestras de cáncer que presentaban bajos niveles de *SFRP2* podrían ser de tumores con mayor capacidad invasiva o regiones del tumor que tenían una mayor población con potencial de metástasis. Debido a que no se cuentan con los datos histológicos de las muestras de CaP no se puede ahondar en este análisis.

A)



B)



C)

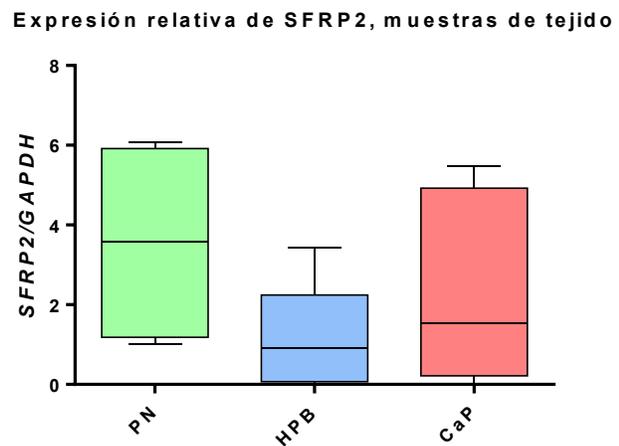
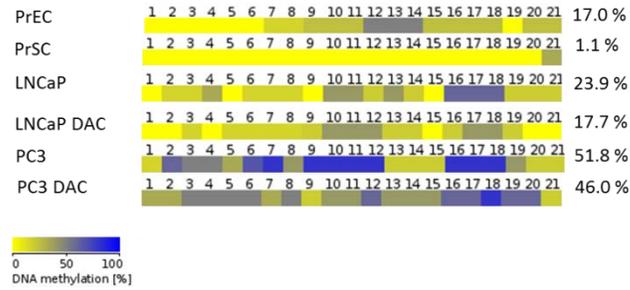


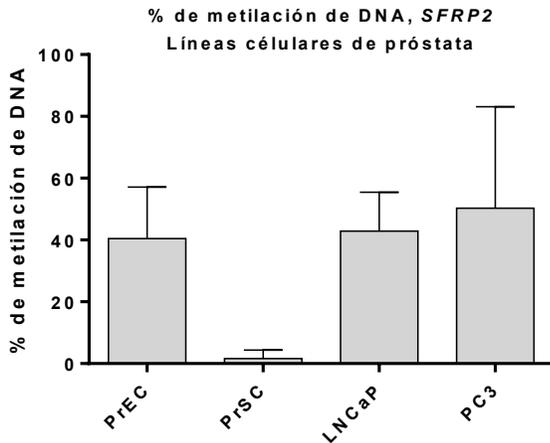
Figura 7.2.1. A) Mapa de calor de los sitios CpG analizados para metilación. B) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de ADN extraído de próstata normal (PN), hiperplasia benigna (HPB), y cáncer de próstata (CaP). La única diferencia significativa se encontró entre CaP y PN. C) q-RTPCR de *SFRP2* para muestras de tejido. No hay diferencias significativas entre el control y las enfermedades.

Para las líneas celulares las muestras no presentan una metilación diferencial al ser comparadas con PrEC como se ve en la figura 7.2.2. Usando el segundo control, PrSC, se obtuvo una diferencia significativa ($p=0,0830$, corrección por Dunnet) con PC3. Se observa en líneas celulares que *SFRP2* está metilado preferentemente, incluso en tejido sano. La expresión del gen se da principalmente en PrEC; este resultado es de esperarse ya que las líneas celulares son de metástasis a diferentes tejidos, lo cual corrobora de cierta manera que para mejorar o establecer la capacidad invasiva del tumor es necesario el silenciamiento de *SFRP2*.

A)



B)



C)

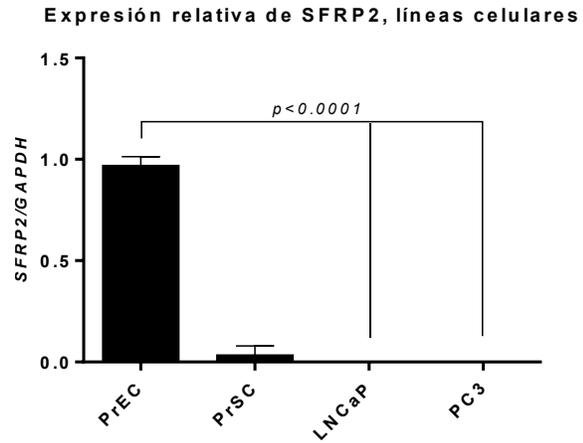
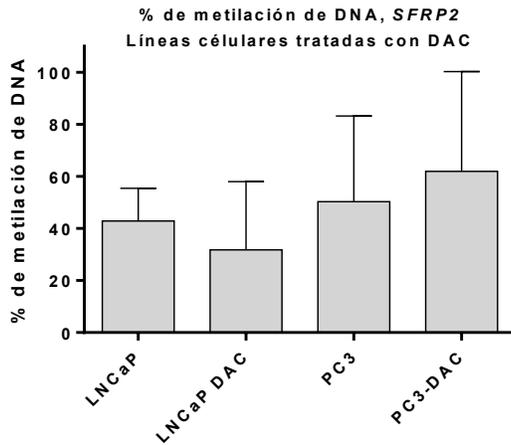


Figura 7.2.2 A) Mapa de calor de los sitios CpG analizados para metilación. B) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de DNA extraído de líneas celulares. No hay diferencias significativas entre el control, PrEC, y las líneas de CaP. C) q-RTPCR de *SFRP2* en líneas celulares. Hay diferencias significativas entre PrEC vs LNCaP y PrEC vs PC3.

En la figura 7.2.3 se tienen datos sin correlación directa. En la gráfica de porcentaje de metilación no se observan cambios entre los grupos control y sus tratamientos. Incluso la tendencia de PC3 vs PC3-DAC es de promover la metilación, sin tener relevancia estadística. Los datos de expresión tienen menos dispersión y se observa que PC3 recupera la expresión de *SFRP2* después del tratamiento con DAC. De manera similar, LNCaP tiene la tendencia de ganar expresión posterior al tratamiento con DAC.

A)



B)

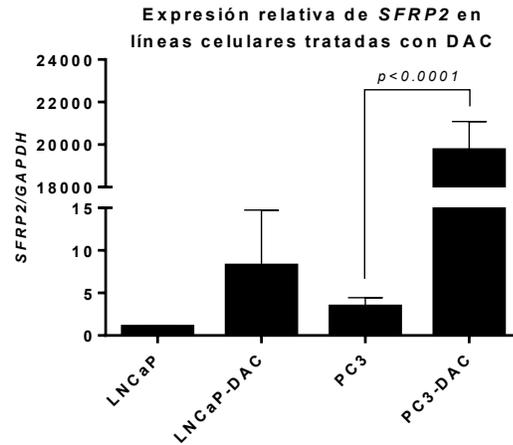
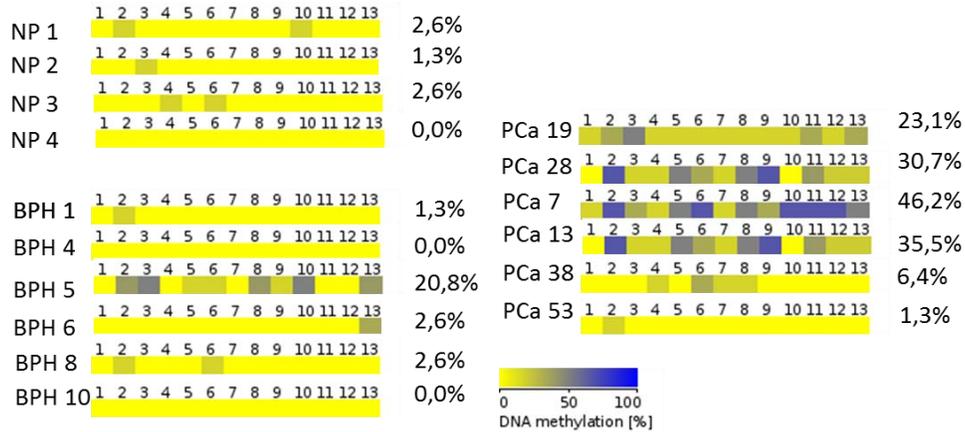


Figura 7.2.3 A) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de DNA extraído de líneas celulares tratadas con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC). No hubo diferencia significativa entre los tratamientos y los controles. B) q-RTPCR de *SFRP2* en líneas celulares de próstata tratadas con DAC. Hay diferencias significativas entre PC3 vs PC3-DAC.

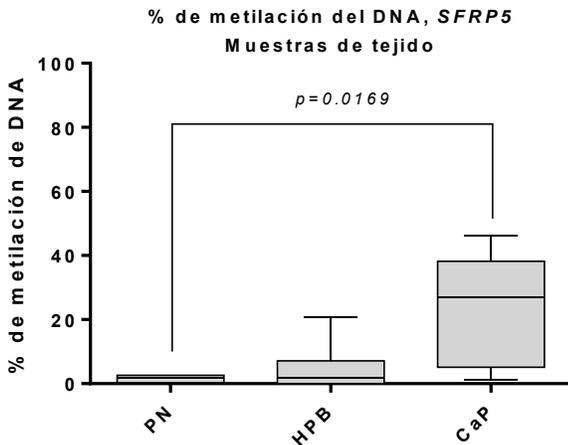
7.3 Metilación y expresión de *SFRP5*

En *SFRP5* hubo diferencia significativa en la metilación entre PN vs CaP. La expresión de *SFRP5* se pierde en CaP y HPB por completo, similar al caso de *SFRP1*. Por lo tanto se concluye que la metilación de *SFRP5* es un buen parámetro de diferenciación entre un tejido normal y uno neoplásico. De igual manera hay diferencia significativa ($p=0.0169$, corrección por Tukey, no se marca en la figura) entre la metilación de HPB vs CaP, por lo que se puede concluir que esta metilación también es característica de neoplasias malignas.

A)



B)



C)

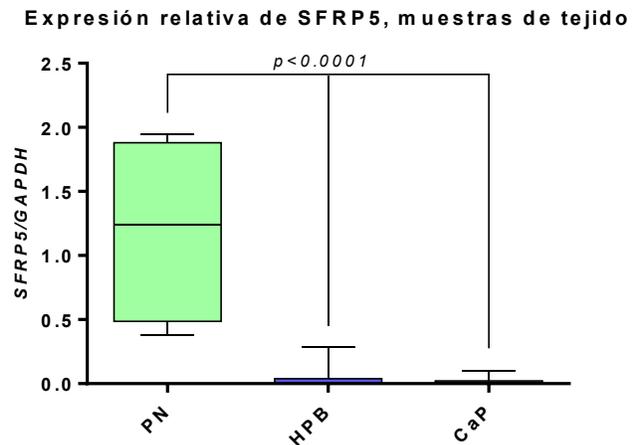
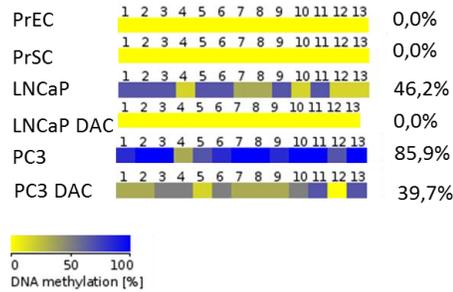


Figura 7.3.1 A) Mapa de calor de los sitios CpG analizados para metilación. B) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de ADN extraído de próstata normal (PN), hiperplasia benigna (HPB), y cáncer de próstata (CaP). La única diferencia significativa se encontró entre PN vs CaP. C) q-RTPCR de *SFRP5* para muestras de tejido. Se encuentran diferencias significativas entre PN vs HPB y PN vs CaP.

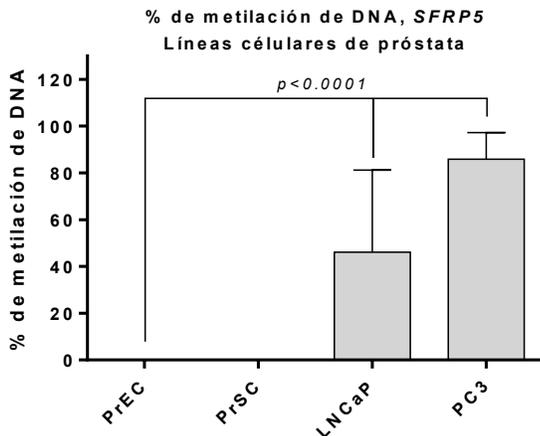
En la figura 7.3.2 se muestran los resultados para las líneas celulares. Hubo diferencias entre la metilación del control principal contra las líneas de CaP, LNCaP y PC3. En la expresión sucedió lo mismo, ocurriendo una pérdida de *SFRP5* en LNCaP y PC3. Esto sugiere que *SFRP5* es un gen de silenciamiento necesario para el desarrollo de cáncer sin importar el estadio o capacidad de invasión.

En cuanto a los tratamientos en ambas líneas se pierde la metilación en la región analizada del promotor como se muestra en la figura 7.3.3. Sólo en PC3 se recupera la expresión. Aunque se puede apreciar una tendencia de recuperación en LNCaP-DAC, no se puede hipotetizar nada debido a que la ganancia de expresión es mínima comparada con la ganancia de expresión obtenida por PC3-DAC. Se puede establecer que LNCaP no regula *SFRP5* por metilación en tanto que PC3 sí.

A)



B)



C)

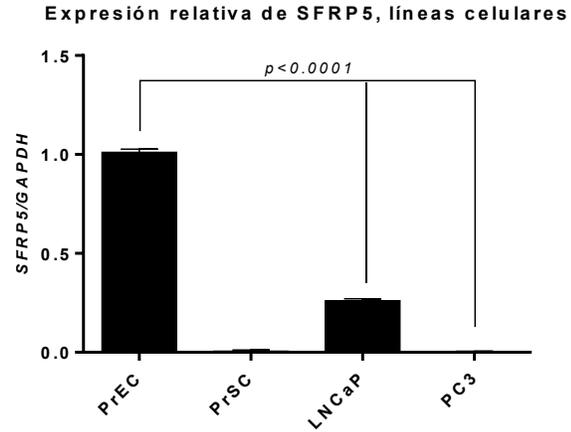
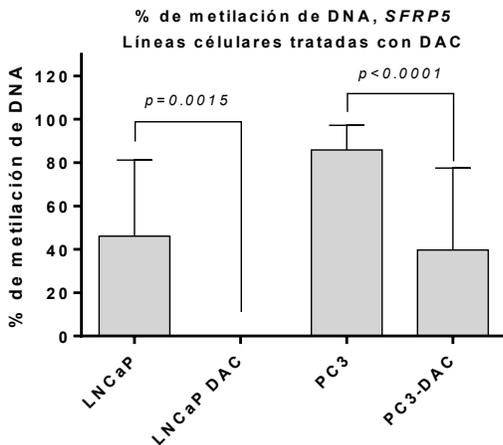


Figura 7.3.2 A) Mapa de calor de los sitios CpG analizados para metilación. B) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de DNA extraído de líneas celulares. Hubo diferencia significativa entre el control PrEC vs LNCaP y PrEC vs PC3. C) q-RTPCR de *SFRP5* en líneas celulares de próstata. Hay diferencias significativas entre PrEC vs LNCaP y PrEC vs PC3.

A)



B)

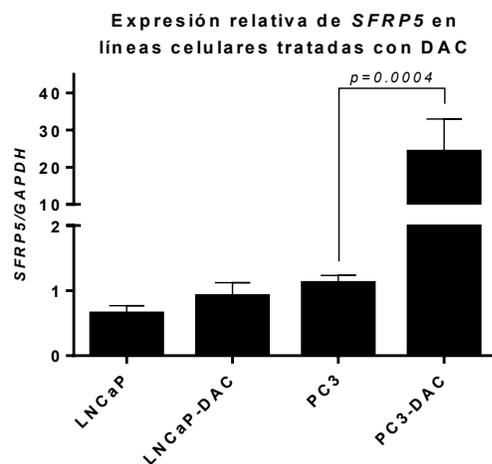


Figura 7.3.3 A) Gráfico comparativo en el cual se observa el porcentaje de metilación de DNA extraído de líneas celulares y sus tratamientos con el agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. Hubo diferencia significativa entre LNCaP vs LNCaP-DAC y entre PC3 vs PC3-DAC. B) q-RTPCR de *SFRP5* en líneas celulares y sus tratamientos con DAC. Hay diferencias entre PC3 y PC3-DAC.

7.4 Silenciamiento por hipermetilación del promotor de genes *SFRP*

Se encuentra reportado que un regulador positivo de la vía WNT/ β -catenina es TGF- β . Esta molécula evita la degradación de β -catenina (sin interactuar con Fz) y por lo tanto permite la activación de la vía (Attisano & Wrana, 2013; Zhou, 2011). TGF- β es de importancia ya que se le considera como una molécula encargada de que el tumor evada al sistema inmune durante la formación inicial de los tumores, característica importante de células cancerígenas. Dado que el sistema inmune se encuentra atacando células cancerosas, estas están sometidas a un estrés constante y a ciertas señales moleculares. La activación de la vía WNT/ β -catenina por TGF- β puede generar por algún mecanismo la represión de los inhibidores de la vía (Mittal et al, 2014; Hanahan & Weinberg, 2011). Un experimento por realizar es evaluar el efecto que tiene TGF- β sobre la metilación de la región promotora de los genes *SFRP* en estadios de cáncer libres de metilación en su región promotora. Un modelo adecuado sería LNCaP dados los resultados experimentales. En un estudio similar Perry y colaboradores establecieron resultados congruentes, en tanto a *SFRP1* y *5*, con lo reportado en esta investigación. La metilación de genes *SFRP* es un proceso de relevancia en CaP y es reversible en modelos *in vitro* bajo tratamiento con agentes desmetilantes como DAC. En la cohorte que ellos estudian sólo encuentran relevancia de *SFRP2* y establecen que existe una expresión de este gen en tejido sano y neoplásico pero no en líneas celulares de CaP (Perry et al, 2013). Esto contrasta en el hecho de que los resultados de expresión mostrados en la figura 7.2.1 muestran una pérdida en la expresión de *SFRP2* al menos para HPB.

El hecho de que los genes *SFRP1*, *2* y *5* tengan metilación diferencial en CaP vs PN o HPB podría resultar útil para su uso en paneles de diagnóstico. Se debe de aumentar el número de tumores a evaluar para poder validar estos tres genes como biomarcadores de cáncer. No sólo se debe de evaluar la metilación en su región promotora sino considerar de igual manera otros mecanismos de silenciamiento (marcas de histona, formación de heterocromatina, remodelación de la cromatina —afectando *enhancers*—, entre otros).

8. CONCLUSIONES

- Se determinó que en CaP *SFRP1*, 2 y 5 tienen hipermetilación en su región promotora en comparación con PN y HPB.
- En cuanto a los estadios de CaP, representados por LNCaP (temprano) y PC3 (tardío) se estableció que en etapas tempranas deben existir otros mecanismos de silenciamiento de los genes *SFRP1*, 2 y 5 ya que no presentan hipermetilación pero sí existe una disminución en su expresión.
- En PC3 todos los casos de tratamiento con DAC tuvieron un aumento en la expresión de los genes candidato. Sólo *SFRP5* tuvo el perfil esperado teniendo una disminución en su metilación y un aumento en su expresión, por lo que es el único gen del que se puede concluir que es regulado por meDNA en su región promotora. En *SFRP1* y *SFRP2* no hay una diferencia significativa por lo cual el aumento en la expresión no es por la desmetilación en la región promotora sino por algún efecto indirecto del tratamiento.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar otros mecanismos epigenéticos que puedan estar silenciando los genes *SFRP*.
 - Marcas de histona (H3K9me3 —heterocromatina constitutiva—, H3K27me3 —heterocromatina facultativa—)
 - Formación de centrómeros falsos, presencia de CENPA y/o CENPH.
 - Desacetilación de histonas.

- Realizar experimentos *in vivo* para evaluar las propiedades anti tumorales de los genes *SFRP1* y *SFRP2* ya que se han asociado a capacidad de invasión, *SFRP1* inhibe angiogénesis y *SFRP2* permite la unión a matriz celular.
 - Crecer los tumores en modelos *in vivo*, rata o ratón, y evaluar la vascularización del tumor (en presencia o ausencia de *SFRP1*) y la capacidad de metástasis (presencia o ausencia de *SFRP2*).

- Evaluar el papel de TGF- β en la metilación de los genes *SFRP*.

- Realizar un mayor muestreo de pacientes con CaP y HPB para determinar si los genes en verdad pueden ser usados en un panel diagnóstico. Realizar análisis de expresión y metilación de la región promotora.

REFERENCIAS

1. American Cancer Society, *Tratamiento inicial del cáncer de próstata*. 2014. Accesado en línea <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/cancer-de-prostata-treating-by-stage>
2. National Cancer Institute, *Treatment option overview for Prostate Cancer* (2014). Accesado en línea <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/prostate/HealthProfessional/page3>
3. American Cancer Society, *What are the signs and symptoms of prostate cancer?* 2014. Accesado en línea <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/moreinformation/prostatecancerearlydetection/prostate-cancer-early-detection-symptoms-of-prostate-cancer>
4. Attisano, L., & Wrana, J. L. (2013). Signal integration in TGF- β , WNT, and Hippo pathways. *F1000prime reports*, 5.
5. Ballestar, E., & Wolffe, A. P. (2001). Methyl-CpG-binding proteins. *European Journal of Biochemistry*, 268(1), 1-6
6. Bolton, E. C., So, A. Y., Chaivorapol, C., Haqq, C. M., Li, H., & Yamamoto, K. R. (2007). Cell-and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes & development*, 21(16), 2005-2017.
7. 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(6), 737-746
8. Brooke, G. N., & Bevan, C. L. (2009). The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression. *Current genomics*, 10(1), 18.
9. Cancer Research UK, *Prostate Cancer Symptoms*. 2014. Accesado en línea <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/type/prostate-cancer/about/prostate-cancer-symptoms>
10. De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., ... & Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 256-269.
11. di Magliano, M. P., & Hebrok, M. (2003). Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 903-911.

12. Edgar, R., Tan, P. P. C., Portales-Casamar, E., & Pavlidis, P. (2014). Meta-analysis of human methylomes reveals stably methylated sequences surrounding CpG islands associated with high gene expression. *Epigenetics & chromatin*, 7(1), 1-13.
13. Ezan, J., Leroux, L., Barandon, L., Dufourcq, P., Jaspard, B., Moreau, C., ... & Dupl a, C. (2004). FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovascular research*, 63(4), 731-738.
14. ESSAPharma Inc. *Prostate cancer overview*. 2011. Accesado el 9 abril del 2014 <http://essapharmaceuticals.com/prostatecanceroverview/>
15. Dahl, E., Wiesmann, F., Woenckhaus, M., Stoehr, R., Wild, P. J., Veeck, J., ... & Hammerschmied, C. G. (2007). Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma. *Oncogene*, 26(38), 5680-5691.
16. Day, J. J., & Sweatt, J. D. (2010). DNA methylation and memory formation. *Nature neuroscience*, 13(11), 1319-1323.
17. Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21(35), 5400-5413.
18. Feinberg, A. P., Ohlsson, R., & Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature reviews genetics*, 7(1), 21-33.
19. Feldman, B. J., & Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 34-45.
20. Fox, S. I. (2011). *Human Physiology* (12 ed.) Nueva York, Estados Unidos: McGraw Hill. pp (698-716)
21. Fukui, T., Kondo, M., Ito, G., Maeda, O., Sato, N., Yoshioka, H., ... & Sekido, Y. (2005). Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 24(41), 6323-6327.
22. Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Current opinion in genetics & development*, 15(5), 490-495.
23. García, P. (2010). Estudio de los patrones de metilación de la familia de genes *SFRP* durante la progresión del cáncer de próstata. Tesis de licenciatura.

24. GeneCards, *Androgen Receptor* por Weizmann Institute of Science. Consultado en línea: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AR&search=androgen+receptors>
25. Gleave, M., Hsieh, J. T., Gao, C., von Eschenbach, A. C., & Chung, L. W. (1991). Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Research*, 51(14), 3753-3761.
26. GLOBOCAN 2012 *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012* consultado en línea: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
27. Gregg, J. L., Brown, K. E., Mintz, E. M., Piontkivska, H., & Fraizer, G. C. (2010). Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. *BMC cancer*, 10(1), 165.
28. Guess, H. A. (2013). Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiologic reviews*, 23(1), 152-8.
29. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
30. Heidenreich, A., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M., Matveev, V., ... & Zattoni, F. (2011). EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *European urology*, 59 (1), 61-71.
31. Herceg, Z., & Vaissière, T. (2011). Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics*, 6(7), 804-819.
32. 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*.
33. Holland, J. D., Klaus, A., Garratt, A. N., & Birchmeier, W. (2013). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Current opinion in cell biology*, 25(2), 254-264.
34. Horvath, L. G., Lelliott, J. E., Kench, J. G., Lee, C., Williams, E. D., Saunders, D. N., ... & Henshall, S. M. (2007). Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer. *The Prostate*, 67(10), 1081-1090.

35. Hu, J., Dong, A., Fernandez-Ruiz, V., Shan, J., Kawa, M., Martínez-Ansó, E., ... & Qian, C. (2009). Blockade of Wnt signaling inhibits angiogenesis and tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 69(17), 6951-6959.
36. Huelsken, J., & Birchmeier, W. (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current opinion in genetics & development*, 11(5), 547-553.
37. Isaacs, J. T., & Isaacs, W. B. (2004). Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nature medicine*, 10(1), 26-27.
38. Jiménez M.A., Solares M., Martínez P.,... *Oncoguía: Cáncer de próstata* Cancerología 6 (2011): 13 – 18. Accesado en línea <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1298053652.pdf>
39. Katoh, M., & Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical Cancer Research*, 13(14), 4042-4045.
40. 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.
41. Krieger, J. N., Lee, S. W. H., Jeon, J., Cheah, P. Y., Liang, M. L., & Riley, D. E. (2008). Epidemiology of prostatitis. *International journal of antimicrobial agents*, 31, 85-90.
42. Larson, S. R., Zhang, X., Dumpit, R., Coleman, I., Lakely, B., Roudier, M., ... & Morrissey, C. (2013). Characterization of osteoblastic and osteolytic proteins in prostate cancer bone metastases. *The Prostate*, 73(9), 932-940.
43. Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204-220.
44. 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.
45. Marks, L. S., Fradet, Y., Lim Deras, I., Blase, A., Mathis, J., Aubin, S. M., ... & Groskopf, J. (2007). PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology*, 69(3), 532-535.
46. Marusyk, A., Almendro, V., & Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. *Nature Reviews Cancer*, 12(5), 323-334.

47. Meares Jr, E. M. (1991). Prostatitis. *The Medical clinics of North America*, 75(2), 405-424.
48. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*, 27, 16-25.
49. Murphy, K. (2011). *Janeway's immunobiology*. Garland Science.
50. National Cancer Institute *Cancer staging (2014)*
<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/staging>
51. Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M., Watanabe, Y., Maruyama, R., Sasaki, S., ... & Shinomura, Y. (2007). Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 26(32), 4699-4713.
52. O'Hurley, G., Perry, A. S., O'Grady, A., Loftus, B., Smyth, P., O'Leary, J. J., ... & Kay, E. W. (2011). The role of secreted frizzled-related protein 2 expression in prostate cancer. *Histopathology*, 59(6), 1240-1248.
53. Pastor, W. A., Aravind, L., & Rao, A. (2013). TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(6), 341-356.
54. Perry, A. S., O'Hurley, G., Raheem, O. A., Brennan, K., Wong, S., O'Grady, A., ... & Hollywood, D. (2013). Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 132(8), 1771-1780.
55. Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28(10), 1057-1068.
56. Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T., & Chinnaiyan, A. M. (2012). Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Science translational medicine*, 4(127), 127rv3-127rv3.
57. Ramsahoye, B. H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5237-5242.

58. Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843-850
59. Riddihough, G., & Zahn, L. M. (2010). What is epigenetics?. *Science*, 330 (6004), 611-611.
60. Robinson, D. R., Zylstra, C. R., & Williams, B. O. (2008). Wnt signaling and prostate cancer. *Current drug targets*, 9(7), 271-580.
61. Schiefer, L., Visweswaran, M., Perumal, V., Arfuso, F., Groth, D., Newsholme, P., ... & Dharmarajan, A. (2014). Epigenetic regulation of the secreted frizzled-related protein family in human glioblastoma multiforme. *Cancer Gene Therapy*.
62. Saito, T., Mitomi, H., Imamhasan, A., Hayashi, T., Mitani, K., Takahashi, M., ... & Yao, T. (2014). Downregulation of sFRP-2 by epigenetic silencing activates the β -catenin/Wnt signaling pathway in esophageal basaloid squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv*, 464(2), 135-143.
63. Secretaría de Salud *Programa de acción: Cáncer de próstata* (2001) (1ed) http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/cancer_prostata.pdf
64. Shih, Y. L., Shyu, R. Y., Hsieh, C. B., Lai, H. C., Liu, K. Y., Chu, T. Y., & Lin, Y. W. (2006). Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 107(3), 579-590.
65. Simpson, R. J. (1997). Benign prostatic hyperplasia. *The British Journal of General Practice*, 47(417), 235.
66. Suzuki, H., Watkins, D. N., Jair, K. W., Schuebel, K. E., Markowitz, S. D., Chen, W. D., ... & Baylin, S. B. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature genetics*, 36(4), 417-422.
67. Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 465-476
68. The WNT homepage, *FRAT/GBP* Stanford (2013). Accesado en línea <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/frat>
69. Traish, A. M., & Morgentaler, A. (2009). Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potential molecular switch for tumour growth. *British journal of cancer*, 101(12), 1949-1956.
70. Truica, C. I., Byers, S., & Gelmann, E. P. (2000). β -Catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer research*, 60(17), 4709-4713.

71. Valdés-Mora, F., & Clark, S. J. (2014). Prostate cancer epigenetic biomarkers: next-generation technologies. *Oncogene*.
72. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10(8), 789-799.
73. Voorham, Q. J., Janssen, J., Tijssen, M., Snellenberg, S., Mongera, S., van Grieken, N. C., ... & Carvalho, B. (2013). Promoter methylation of Wnt-antagonists in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas. *BMC cancer*, 13(1), 603.
74. Wang, L. S., Kuo, C. T., Cho, S. J., Seguin, C., Siddiqui, J., Stoner, K., ... & Huang, Y. W. (2013). Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. *Nutrition and cancer*, 65(1), 118-125
75. World Health Organization, *Cancer, Fact sheet No. 297* (2014) Accesado en línea <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
76. World Health Organization, *Cancer, death rates per 100 000 population, age standardized Males 2008*. (2011) Accesado en línea http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Deaths_Cancer_Males_2008.png
77. World Health Organization, *Cancer mortality and morbidity (2008)* Accesado en línea http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/
78. Zhu, J., Wang, Y., Duan, J., Bai, H., Wang, Z., Wei, L., & Wang, J. (2012). DNA Methylation status of Wnt antagonist SFRP5 can predict the response to the EGFR-tyrosine kinase inhibitor therapy in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 31(1), 80-96.
79. Zhou, S. (2011). TGF- β regulates β -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 112(6), 1651-1660.
80. Zi, X., Guo, Y., Simoneau, A. R., Hope, C., Xie, J., Holcombe, R. F., & Hoang, B. H. (2005). Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. *Cancer Research*, 65(21), 9762-9770.

ANEXOS

A continuación se muestran geles representativos de las metodologías llevadas a cabo en el proyecto de investigación. No se muestran todos los geles realizados.

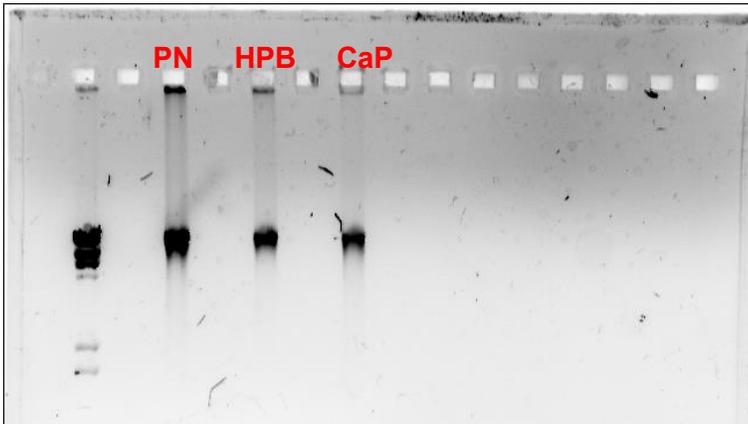


Figura I. Gel de integridad del DNA. Este tipo de geles se realizaron para las extracciones de DNA para evaluar que no hubiera degradación de los ácidos nucleicos.

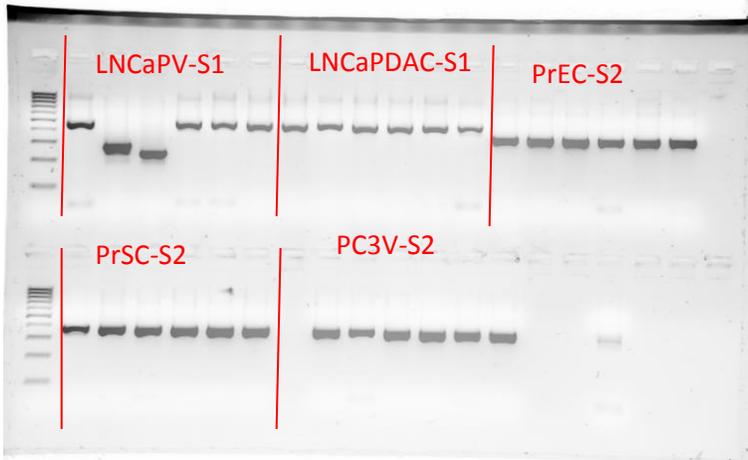


Figura II. Foto de presencia y ausencia de inserto. Imagen de un gel en el que se verificaba la presencia del inserto en las colonias de bacterias elegidas como positivas. En el segundo y tercer carril se tienen dos colonias falsas positivas características por no tener el peso esperado. En estos casos se elegían otras colonias positivas para suplantar los errores.

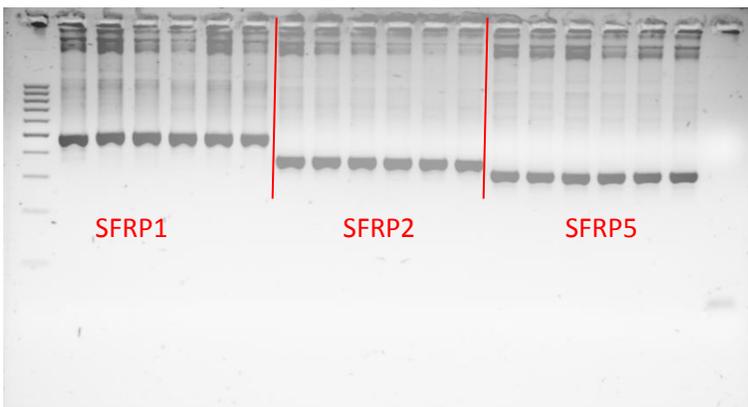


Figura III. Insertos de *SFRP1*, 2 y 5. Gel de verificación de inserto donde se muestra de manera diferencial la presencia de los tres genes y como migran diferente por el peso de su secuencia: *SFRP1* con 487pb, *SFRP2* con 361pb y *SFRP5* con 316pb.

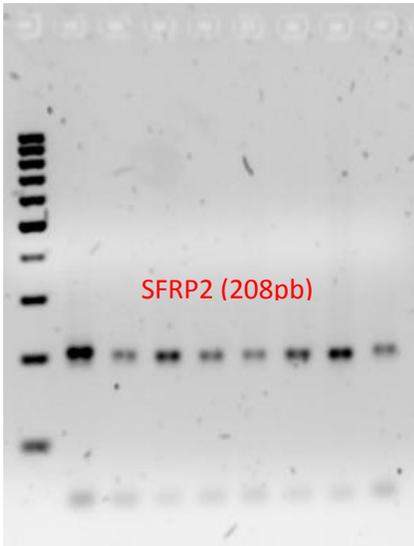


Figura IV. Amplificación de región interés, PCR. Gel para verificar que la reacción de PCR fuera exitosa.

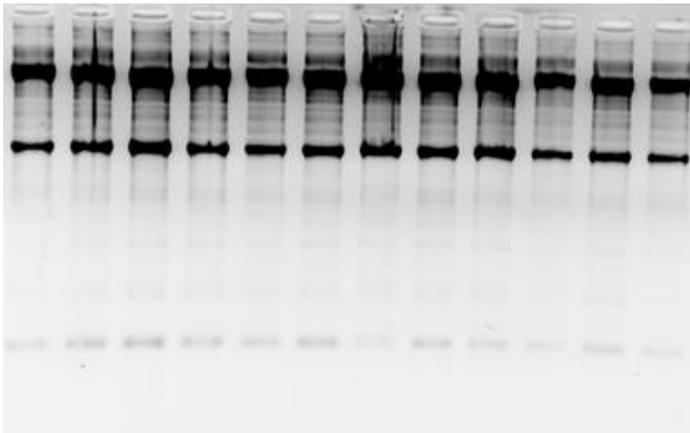


Figura V. Gel de integridad de RNA. Este tipo de geles se realizó con el RNA extraído para evaluar la integridad de los ácidos nucleicos y que fueran útiles para su uso en métodos posteriores.

De izquierda a derecha: PC3-V1, PC3-V2, PC3-V3, PC3-DAC1, PC3-DAC2, PC3-DAC3, PC3-T1, PC3-T2, PC3-T3, PC3-DAC/T1, PC3-DAC/T2, PC3-DAC/T3.

Tabla I Diseño de primers. Los primers usados debían de contener parte de la CGI, no tener pares CpG y encontrarse dentro del sitio promotor. El sitio promotor se estableció de 0 a -2000 pb a partir del sitio de inicio de la transcripción.

Gen	Forward	Reverse	Tm(°C)
<i>SFRP1</i>	CTACAAAAAATAATACTACCCAACCTACT	TTTATTTTGGGGTTTGGAGGTTT	52
<i>SFRP2</i>	AAACAACAAACAAAAAACCTAACC	TTTTATTTATGTTTGGTAATTTAGTAGAAA	50
<i>SFRP5</i>	CCTAACCCCAACTCCAAAAC	TAGGGAGTTTTGGGGAGAAA	52