



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LOS
GENES *SFRP* EN CÁNCER DE PRÓSTATA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Oscar Arturo Uribe De la Huerta



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



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: Prof. Marisol López López
VOCAL: Prof. Francisco Javier Plasencia de la Parra
SECRETARIO: Prof. Mauricio Rodríguez Dorantes
1° SUPLENTE: Prof. Martha Patricia Coello Coutiño
2° SUPLENTE: Prof. Nancy Monroy Jaramillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

SUPERVISOR TÉCNICO:

cDr. Iván Salido Guadarrama

SUSTENTANTE:

Oscar Arturo Uribe De la Huerta

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
1.0 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Generalidades de la próstata.....	7
1.1.2 Papel de los andrógenos en la próstata.....	8
1.2 Patologías que afectan a la próstata.....	10
1.2.1 Hiperplasia prostática benigna (HPB).....	10
1.2.1 Cáncer de próstata.....	11
1.2.1.1 Diagnóstico de CaP.....	13
1.2.1.2 Tratamiento de CaP.....	14
1.2.2 Cáncer de próstata resistente a la castración.....	15
1.3 Mecanismos de regulación epigenética.....	19
1.3.1 Epigenética y cáncer.....	26
1.3.2 Metilación del DNA y cáncer.....	27
1.4 Familia de Proteínas Secretadas Relacionadas con Frizzled (SFRP).....	27
1.4.1 Estructura y función de las proteínas SFRP.....	27
1.4.2 Ruta Wnt e interacciones de las proteínas SFRP.....	28
1.4.3 Proteínas SFRP en cáncer de próstata.....	29
2 JUSTIFICACIÓN.....	30
3 ANTECEDENTES.....	30
4 OBJETIVO GENERAL.....	31
5 OBJETIVO PARTICULAR.....	31
6 HIPOTESIS.....	31
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
7.1 Cultivo celular.....	31
7.2 Expresión relativa de SFRP1 en líneas celulares de próstata.....	32
7.3 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).....	33
7.4 Análisis de datos para ChIP.....	34
8 RESULTADOS.....	35
8.1 Expresión relativa de SFRP1 en líneas celulares de próstata.....	35

8.2 Enriquecimiento de marcas de histonas (H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3) en líneas celulares de próstata.....	37
8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	39
9 CONCLUSIONES.....	42
ANEXO A: Estandarización de la técnica de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).....	43
11 BIBLIOGRAFÍA.....	49

• LISTA DE ABREVIATURAS

- NE: Neuro endócrina
- RA: Receptor de andrógenos
- PSAP: Fosfatasa ácida específica de próstata
- PSA: Antígeno prostático específico
- LH: Hormona luteinizante
- SHGB: Globulina fijadora de hormonas sexuales
- DHT: Dihidrotestosterona
- ADN: Ácido desoxi-ribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- PCT: Proteínas de choque térmico
- ARE: Elementos de respuesta a andrógenos
- HPB: Hiperplasia prostática benigna
- CaP: Cáncer de próstata
- INCaN: Instituto Nacional de Cancerología
- INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- PIN: Neoplasia intraepitelial prostática
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
- CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración
- DNMT: ADN metiltransferasa
- HAT: Histona acil-transferasa
- HDAC: Histona desacetilasa
- HMT: Histona metiltransferasa
- HDM: Histona desmetilasas
- ATP: Adenosil trifosfato
- PcG: Polycomb
- TrxG: Tritorax
- PRC: Complejos represivos de Polycomb
- GSTP1: Glutación-s-transferasa
- SFRP: Proteínas secretadas relacionadas con Frizzled
- CRD: Dominio rico en cisteínas
- NTR: Dominio de Netrina
- FDZ: Frizzled
- ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina.
- RPL30: Proteína ribosomal L30.
- SAT: Satélite
- GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
- MYOD1: Proteína de diferenciación miogénica 1

• **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1: Localización anatomica de la prostata.....7

Figura 2: Anatomia zonal de la próstata.....8

Figura 3: Diferenciacion de epitelio prostático.....8

Figura 4: Síntesis, transporte y metabolismo de hormonas esteroides.....10

Figura 5: Mecanismo de acción de andrógenos y activación del AR.....10

Figura 6: Zona próstática que presenta lesiones en HPB.....11

Figura 7: Curso natural del cáncer de próstata y terapia.....16

Figura 8: Mecanismos que llevan a la andrógeno independendencia.....18

Figura 9: Reacción catalizada por DNA metil transferasas y patrones de metilación de DNA....20

Figura 10: Estructura nucleosomal y principales modificaciones post traduccionales de histonas.....22

Figura 11: La conformación espacial de la cromatina interviene en procesos de regulación génica.....23

Figura 12: Función y composición de los complejos Polycomb.....24

Figura 13: Papel de PcG en diferenciación y auto renovación celular.....24

Figura 14: Mecanismo de represión mediado por Polycomb (PRC2) y metilasas de H3K9.....25

Figura 15: Vía Wnt canónica inactiva y activa.....28

Figura 16: Vía Wnt no canónica.....29

Figura 17: Diagrama de propagación celular.....32

Figura 18: Diagrama de trabajo para el protocolo de Inmunoprecipitación de la cromatina.....33

Figura 19: Ubicación de los sets de oligonucleótidos en las zonas evaluadas para el enriquecimiento de marcas histona.....34

Figura 20: qRT-PCR de SFRP1 en líneas celulares de próstata.....35

Figura 21: Verificación de la fragmentación de cromatina.....36

Figura 22: Representación gráfica de los valores de enriquecimiento obtenidos para los controles de las marcas de histona estudiadas.....37

Figura 23: Representación gráfica de los valores del enriquecimiento de las marcas histona en líneas celulares de CaP en la región 1.....37

Figura 24: Representación gráfica de los valores del enriquecimiento de las marcas histona en líneas celulares de CaP en la región 2.....38

Figura 25: Gel de agarosa donde se muestra el producto amplificado de cada set de oligos probando distintas temperaturas de fusión.....44

Figura 26: Curvas de fusión o melt curves del producto amplificado.....45

Figura 27: Esquema de pasos críticos a tomar en cuenta durante la técnica de CHIP.....46

Figura 28: Métodos para detectar productos amplificados.....47

Figura 29: Representación gráfica de la señal luminiscente detectada dada la amplificación del producto.....48

- **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Estadios en la progresión del cancer prostático.....	13
Tabla 2: Criterios para definir al cancer prostático resistente a la castración.....	16
Tabla 3: Factores pronósticos de progresión a considerar en CPRC.....	17
Tabla 4: Condiciones de crecimiento utilizadas para el crecimiento de las distintas líneas celulares empleadas.....	31
Tabla 5: Secuencia de pares de oligonucleótidos empleadas.....	43
Tabla 6: Mezcla de reacción usada para realizar PCR de punto final.....	43
Tabla 7: Configuración de los ciclos de reacción para PCR de punto final.....	44
Tabla 8: Mezcla de reacción para qRT-PCR empleando SYBR Green/ROX qPCR Master Mix...	47
Tabla 9: Protocolo de termociclado que se programo para la amplificación de secuencias de interés.....	47
Tabla 10: Controles evaluados para cada marca de histona en la técnica de CHIP.....	48

- **RESUMEN**

A nivel mundial el cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo más frecuente de neoplasia maligna y la sexta causa de muerte en varones (Center et al., 2012). En nuestro país según las estadísticas 2015 del INCan indicaron una tasa de mortalidad hospitalaria del 13 por cada 100,000 habitantes, mientras que el INEGI en 2012 reportó una morbilidad hospitalaria de 11.3 por cada 100,000 habitantes. La muerte por CaP ocurre, en la mayor parte de los casos, por un fenómeno llamado Cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). En tumores diseminados se administra una terapia antiandrogénica, después de un lapso de 18 meses, ésta ya no es efectiva y no existe un tratamiento para el CPRC (Feldman and Feldman, 2001). Aunque existen algunas hipótesis, aún no se han descrito en su totalidad los mecanismos moleculares por los cuales ocurre esta transición (Green et al., 2012). Una de las rutas que se encuentra activa en CPRC, es la ruta WNT, que modula procesos de proliferación celular, diferenciación, apoptosis y migración entre otros. La activación de esta ruta se lleva a cabo por la unión de proteínas WNT que son secretadas al espacio extracelular a sus receptores transmembranales *Frizzled*. Esta ruta es inhibida por las proteínas secretadas relacionadas con *Frizzled* (SFRP) (Kypta and Waxman, 2012; Robinson et al., 2008). Existen 5 miembros (*SFRP1-5*), por lo que se ha propuesto que los *SFRP* son genes supresores de tumores. Los genes *SFRP* han sido ampliamente estudiados en diferentes tipos de cáncer. Estos genes, frecuentemente, pierden su expresión por metilación del ADN en su región promotora (Suzuki et al., 2008; Takagi et al., 2008; Urakami et al., 2006; Veeck et al., 2008). Se sabe que el AR puede interactuar con el complejo represor Polycomb 2 (PRC2) y así inhibir la transcripción de algunos de sus genes blanco al establecer la marca represiva de histonas H3K27me3 (Zhao JC., 2012). Esta última es una de las marcas de histonas más estudiadas junto con la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3), otra marca de heterocromatina y la modificación característica de promotores transcripcionalmente activos, H3K4me3 (Bannister AJ., 2011).

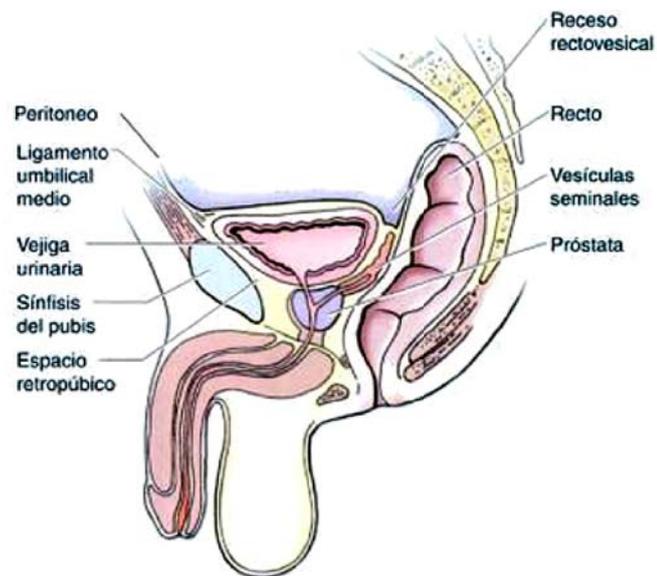
El desarrollo de este proyecto se enfocó a determinar el nivel de expresión del RNAm de SFRP1 en distintas líneas celulares de próstata. Una correspondiente a tejido prostático sano (RWPE-1) y tres de lesiones metastásicas que pueden presentarse en el transcurso del CaP. Posteriormente se evaluó el enriquecimiento de marcas de histonas permisiva (H3K4me3) y represivas (H3K27me3 y H3K9me3) empleando la técnica de CHIP, con la finalidad de establecer la posible intervención de éstas en la regulación transcripcional del RNAm de SFRP1. Encontrándose una notable pérdida de la marca H3K4me3 en las células transformadas y enriquecimiento de la marca represiva H3K27me3 en la línea celular LNCaP. Es por eso que se atribuye a esta marca de histona la disminución en los niveles de expresión del RNAm de SFRP1, tomado en cuenta que la región promotora de este gen se encuentra hipometilada en la línea celular LNCaP.

- **INTRODUCCIÓN**

1.1 GENERALIDADES DE LA PRÓSTATA

La próstata es una glándula exocrina que forma parte del sistema reproductivo masculino en mamíferos. Está situada por debajo de la vejiga, detrás de la sínfisis del pubis, delante del recto, arriba de la membrana perineal y el espacio perineal profundo (Figura1) (Keith L; 2008). Mide alrededor de 3.5 centímetros en su base y aproximadamente 2.5 centímetros en sus dimensiones vertical y anteroposterior. Su peso normal es cercano a los 18 gramos. En la próstata pueden distinguirse principalmente cuatro regiones: la zona periférica, la zona central, de transición y el estroma fibromuscular anterior (Figura 2) (Latarjet M y Liard R., 2008).

Figura 1: Localización anatómica de la próstata. La próstata es una glándula que forma parte del sistema reproductor masculino y se ubica en la región pélvica, debajo de la vejiga y rodeando la uretra. (Tomada y editada de (Keith L; 2008, pp 399.)



La próstata secreta un líquido alcalino (pH=7.3) claro de aspecto lechoso que contiene ácido cítrico, calcio, fosfatasa ácida, una enzima coagulante y una profibrinolisisina. La característica alcalina del líquido prostático es esencial, ya que las secreciones vaginales son ácidas (pH=3.4-4.0) y es probable que se lleve a cabo una neutralización de la acidez de las demás secreciones después de la eyaculación y aumente considerablemente la motilidad y fertilidad de los espermatozoides. (Keith L; 2008).

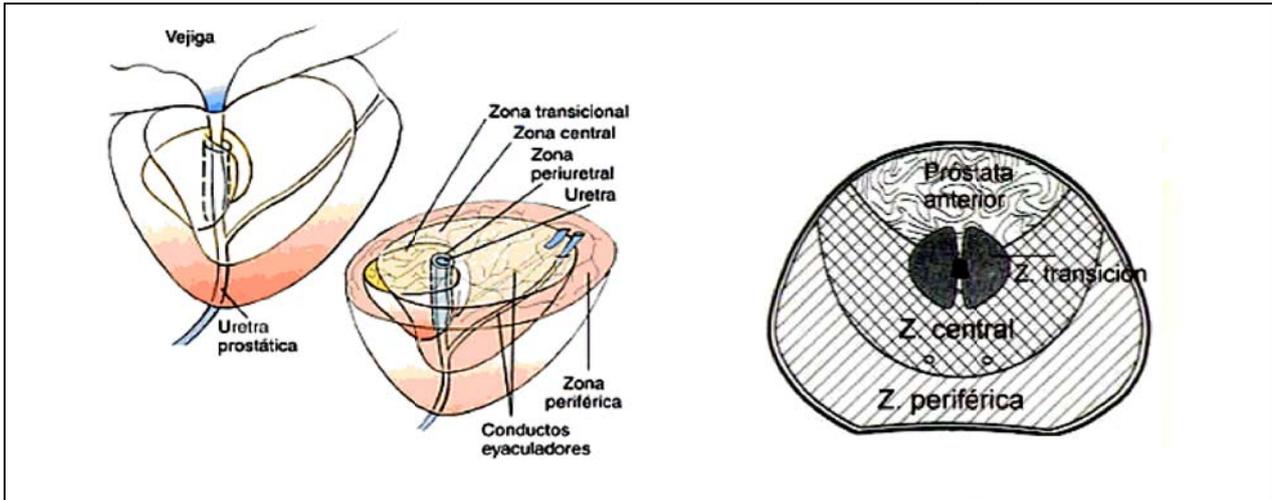


Figura 2: Anatomía zonal de la próstata. Para su descripción compartimental, se utiliza en la próstata un concepto anatómico zonal. Basándose en la diferencia de los componentes celulares de cada zona. (Tomada y editada de Torres J. <http://www.boloncol.com/boletin-7/ecografia-transrectal-de-la-prostata.html> 2015)

Es la glándula accesoria más grande del sistema reproductor masculino. La parte glandular corresponde a casi dos tercios del tamaño de la próstata; el otro tercio es fibromuscular. La próstata se compone de dos tipos principales de células, las células epiteliales y las células estromales. Dentro de la área epitelial encontramos una zona basal, conformada por células madre y células neuro-endocrinas (NE) y otra luminal o secretora (Signoretti y Loda., (2006). Las células madre al dividirse dan origen a una población de células de transición, las cuales se dividen en la capa basal y una fracción de ellas se diferencia y se desplaza hacia la capa luminal secretora. A medida que las células de transición se diferencian y desplazan a esta capa luminal secretora adquieren la expresión de numerosos marcadores genéticos, como el receptor de andrógenos (RA); antígeno prostático específico (PSA); Fosfatasa acida específica de próstata (PSAP), etc (Figura 3). Finalmente, por su arquitectura, el compartimiento del estroma tiene función de sostén estructural y consiste sobre todo de tejido conectivo, células musculares lisas y colágeno (Wein et. al; 2008).

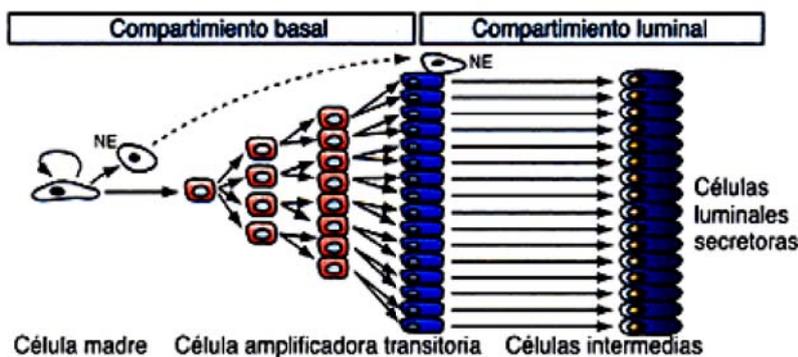


Figura 3: Diferenciación de epitelio prostático. Las células secretoras prostáticas se originan desde el compartimiento celular basal hasta llegar a el compartimiento luminal o de secreción. (Tomada y editada de Wein et. al; 2008, pp. 2682).

1.1.2 Función de los andrógenos en la próstata

Los andrógenos séricos que producen los testículos y las glándulas suprarrenales intervienen en el desarrollo y crecimiento de la próstata, así como del tejido sexual accesorio. En el hombre el principal andrógeno sérico circulante es la testosterona (>95% de origen testicular). Las células de Leydig o células intersticiales son la principal fuente de andrógenos testiculares. Estas células son estimuladas por la hormona luteinizante (LH) para sintetizar testosterona a partir de acetato y colesterol. Además existe una producción adrenal de andrógenos (androstendiona y dehidroepiandrosterona) que a pesar de no ser tan potentes como la testosterona contribuyen con efectos androgénicos en el organismo. (Grossmann M. et. al. 2001).

La testosterona al igual que otras hormonas esteroideas se encuentran unidas a proteínas transportadoras. Algunas cuentan con transportadores específicos como la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHGB) y otros simplemente se unen a proteínas generales del plasma, como la albúmina (Unglaub D; 2009). Sólo el 2% del total de la testosterona sérica no está ligada en el plasma. Únicamente esta testosterona está disponible para la captación por la próstata. Posteriormente la testosterona es convertida a dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5- α reductasa tipo II (Figura 4). La DHT es la forma androgénica más abundante encontrada dentro de la glándula prostática y tiene una afinidad cinco veces más alta por el receptor de andrógenos que la testosterona. En la próstata la testosterona y la DHT se fijan a los RA y los activan para realizar la transcripción de genes blanco. (Green S., 2012.).

El RA es un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción y juega un papel clave en el desarrollo y fisiología de la próstata. El RA cuenta con varias regiones funcionales, como el amino terminal, el dominio de unión a ADN y el dominio de unión a ligando. El dominio de unión a ADN está compuesto principalmente por dos dedos de zinc (uno interviene en la especificidad de unión al ADN, mientras que el otro facilita la dimerización del receptor y estabiliza la unión del complejo ADN-receptor). En la ausencia de ligando el RA es citoplasmático y se encuentra unido a proteínas de choque térmico (PCT). Cuando está presente la hormona se disocia el complejo PCT-RA y el receptor de andrógenos se dimeriza lo que ocasiona que se interne al núcleo. En el núcleo el dímero de RA se une a elementos de respuesta a andrógenos, (ARE, por sus siglas en inglés) se reclutan

co-activadores (remodeladores de cromatina) así como RNA Pol II llevándose a cabo la transcripción de genes blanco (Figura 5). (Green S., 2012).

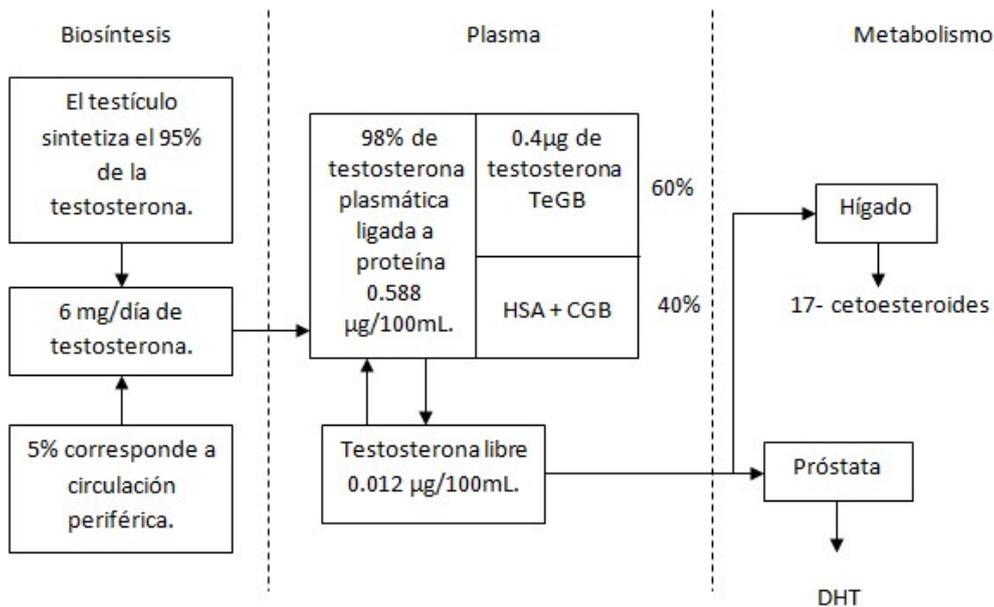


Figura 4: Síntesis, transporte y metabolismo de hormonas esteroides. La síntesis de esteroides se da a partir del colesterol, su conversión a pregnolona (CYP11A1) y posterior actividad de ACTH, LH Y FSH para dar como resultado los esteroides finales. (Tomado y editado de Wein et. al; 2008, pp. 2682).

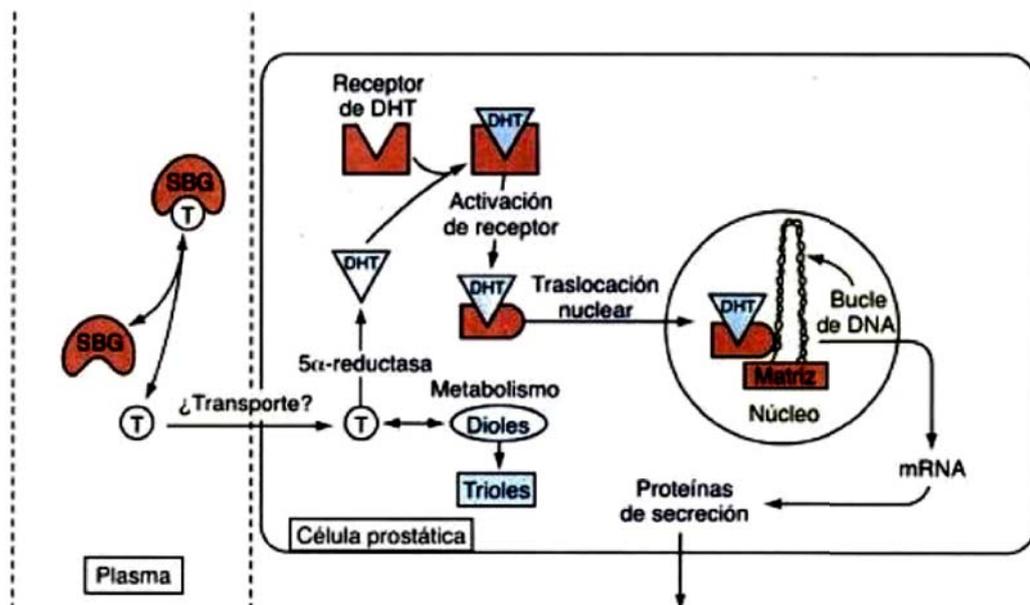


Figura 5: Mecanismo de acción de andrógenos y activación del AR. En ausencia de ligando el receptor de andrógenos es citoplasmático. Al reconocer a su ligando se da una dimerización del receptor y se transloca al núcleo, en donde se une a los elementos de respuesta a andrógenos ocasionando que se dé la transcripción de genes blanco. (Tomado y editado de Wein et. al; 2008, pp. 2682).

Sin embargo, a pesar de las funciones biológicas que desempeña para promover el desarrollo y mantenimiento de las funciones prostáticas, el RA está involucrado en la aparición de ciertas patologías que la afectan, como la Hiperplasia Prostática Benigna y el Cáncer de Próstata.

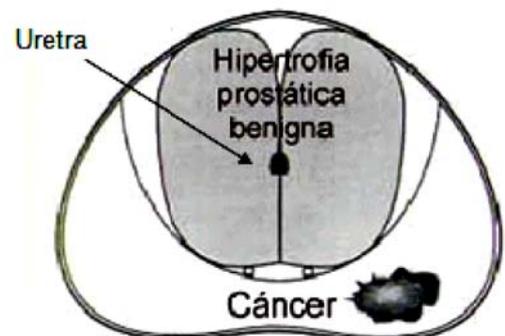
1.2 PATOLOGÍAS DE LA PRÓSTATA

1.2.1 Hiperplasia prostática benigna

La hiperplasia prostática benigna (HPB) ocurre casi con exclusividad en la zona transicional y conduce a la obstrucción parcial o total de la uretra (Figura 6). Se cree que una vez sintetizada la DHT actúa como agente autócrino sobre las células del estroma y como sustancia parácrina sobre las células epiteliales glandulares, lo que las hace proliferar. La probabilidad de presentar HPB aumenta con la edad y se piensa que en algún momento todos los hombres padecerán crecimiento en la próstata si llegan a una etapa adulta madura. Normalmente esta enfermedad cursa asintomática ya que menos de la mitad de los pacientes que la padecen no presentan afecciones. Entre los síntomas que se pueden llegar a manifestar se encuentran la incontinencia, micción dolorosa y dificultad para empezar a orinar (Roehrborn CG., 2011). El diagnóstico consta principalmente del tacto rectal, tasa de flujo urinario, urocultivo y detección de PSA. Como tratamiento se usan bloqueadores α (bloqueo de receptores α 1a-adrenérgicos), los cuales promueven la desinflamación de la próstata y facilitan la micción. Fármacos que disminuyen el nivel de producción de andrógenos por lo que se ve reducido el tamaño de la próstata, aumenta el flujo de orina y los síntomas de la HPB se minimizan (McVary KT, Roehrborn CG, Avins AL, et al. 2011).

Figura 6: Zona prostática que presenta lesiones en HPB.

La zona transicional se ve afectada por la HPB mientras que en la zona transicional se desarrolla el CaP (Tomada y editada de Torres J. <http://www.boloncol.com/boletin-7/ecografia-transrectal-de-la-prostata.html> 2015)



1.2.2 Cáncer de próstata

El cáncer es una enfermedad multifactorial que resulta de la interacción de agentes genéticos y ambientales, tales como la edad, alimentación, sedentarismo, exposición a compuestos químicos, etc. Dichos agentes pueden actuar como iniciadores, promotores y progresores en el desarrollo del cáncer, los cuales provocan que las células adquieran un fenotipo maligno o inmortal. Esto se observa cuando las células “transformadas” presentan cambios o alteraciones en su metabolismo, evasión de los mecanismos de muerte, inestabilidad genómica, proliferación desmedida y mayor capacidad invasiva y de metástasis entre otras (Hanahan, Weinberg; 2011). La cinética celular de este proceso se da en términos de una dinámica que existe entre los factores promotores del crecimiento y los supresores del mismo. Así como de la forma en la que regulan un ciclo celular de síntesis de ADN y mitosis, o el equilibrio existente entre la proliferación y muerte celular (Wein et. al; 2008).

El cáncer de próstata (CaP) es uno de los cánceres más comunes en el varón. La incidencia del cáncer prostático aumenta con la edad y se calcula que entre los 70 y 80 años el 70% de los hombres desarrollará esta enfermedad. Se ha identificado como la segunda neoplasia maligna más frecuente en hombres y la quinta causa de muerte por cáncer a nivel mundial para este género (GLOBOCAN 2012). En México, las estadísticas más recientes, provistas por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) indicaron que el CaP presentó una tasa de mortalidad de 13 por cada 100,000 habitantes, mientras que el INEGI reporta una morbilidad hospitalaria de 11.13 por cada 100,000 habitantes (INEGI 2012, INCaN 2015). Los tumores suelen desarrollarse en la zona periférica de la glándula y constan de varios estadíos (Tabla 1). Esto se debe a que en esta región hay una gran cantidad de células epiteliales que se encuentran en recambio constante y por lo tanto cuentan con una mayor tasa de proliferación (European Society of Medical Oncology, 2008). Aunque la HPB también se caracteriza por una inflamación de la próstata y por un cambio en la proliferación de células tanto estromales como epiteliales, este padecimiento no incrementa el riesgo de presentar CaP (Chuang, 2005) (McConnel, 1994).

El cáncer de próstata generalmente cursa asintomático en estadíos iniciales, cuando el tumor se limita a la cápsula prostática y vesículas seminales. La aparición de síntomas se dan en estadíos tempranos de la enfermedad previos a la metástasis, como inflamación, dificultad para orinar y hematuria entre otros. Cuando existe metástasis a ganglios linfáticos, zona pélvica, vejiga y huesos,

estos síntomas pueden agravar y en ciertos casos se presentan fracturas causadas por descalcificación por el tratamiento empleado (Heidenreich A, et. al. 2013).

Tabla1: Estadios en la progresión del cáncer prostático (European Society of Medical Oncology)

Estadio	Características
I	Se encuentra afectado únicamente uno de los lóbulos de la próstata y no presenta diseminación a ninguna otra región del cuerpo. Se diagnóstica por aumento en las concentraciones del antígeno prostático específico (PSA) y biopsia.
II	La lesión se disemina a otros lóbulos que conforman la próstata y no existe invasión a algún otro tejido.
III	La expansión del tumor llega a invadir a las vesículas seminales, glándulas que aportan una importante cantidad del líquido que conforma al semen y que se encuentran situadas una región anatómica sobre la próstata.
IV	Existe invasión a zonas adyacentes además de las vesículas seminales, como el recto, músculos, pared pélvica, ganglios linfáticos y hueso.

A pesar de tener una alta incidencia aún es difícil poder establecer el diagnóstico del CaP y de sus múltiples estadios, así como diferenciarlo de otras patologías prostáticas como la HPB y la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN por sus siglas en inglés). Actualmente el diagnóstico de la enfermedad se basa en una serie de pruebas y exámenes (screening) que ayude a su detección. Esto tiene la finalidad de identificar a los pacientes que requieren ser sometidos a un tratamiento adecuado y oportuno de aquellos que no lo necesitan y evitar disminuir la calidad de vida por errores de diagnóstico y sobre tratamiento (D'Amico AV, et al., 2011) (Heidenreich A, et al. 2013).

1.2.2.1 Diagnóstico de CaP

A fines de la década de 1980 la introducción de la prueba de antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés) para la detección del cáncer prostático aumentó la posibilidad de lograr un diagnóstico temprano de esta enfermedad (Ross M, 2008). El PSA es una glicoproteína que se produce exclusivamente en el epitelio prostático y se encuentra en bajas concentraciones en el suero de hombres sanos (<4ng/mL) y su concentración incrementa con la edad. Sin embargo esto varía entre poblaciones (Reynolds et al. 2007). Aunque presenta alta sensibilidad (95%), el PSA es poco específico (27%) y esto no permite diferenciar entre un CaP agresivo del que no lo es (existe una

ventana de concentraciones comprendida entre los 4 y 10ng/mL en la cual no es posible discernir entre estadios de CaP u otra patología de la próstata) (You et al., 2010). El ensayo de detección de niveles de PSA debe realizarse de manera sistemática cada año a pacientes de cincuenta años en adelante.

Después de la detección del PSA, y si el resultado de la prueba indica una concentración elevada del mismo, el paciente se somete a un ensayo de tacto rectal. Mediante el tacto rectal se evalúa el tamaño, consistencia y sensibilidad de la próstata (Wein et. al; 2008). De encontrar zonas endurecidas en la próstata además de poca sensibilidad durante el tacto rectal se procede a realizar una biopsia. Esto consiste en obtener pequeñas muestras de la próstata para saber con certeza si el crecimiento prostático es benigno o presenta células malignas. Se lleva a cabo introduciendo un ecógrafo por el recto y guiado por la ecografía se punciona la próstata a través del recto para tomar de 12 a 18 fragmentos de diferentes zonas de la próstata para una posterior evaluación por parte de un patólogo, en base a una escala consensuada de clasificación (American Cancer Society; 2015).

El sistema de graduación o clasificación más difundido para predecir el comportamiento del tumor y la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de próstata se conoce como puntaje o escala de Gleason. Se evalúan los tejidos de dos biopsias de las regiones más grandes del cáncer prostático y se le asignan grados que van del 1 al 5. El grado 1 indica células bien diferenciadas mientras que el grado 5 se le otorga a las células poco diferenciadas. Estos grados, cuando se suman, constituyen un puntaje en la escala que va desde 2 hasta 10. Cuanto más alto es el puntaje es mayor la posibilidad de que el cáncer prolifere y se disemine (Humphrey P., 2014). Es por eso que la mayoría de las investigaciones en este rubro están dirigidas a la búsqueda de biomarcadores que permitan establecer un diagnóstico más certero, así como un tratamiento adecuado para cada caso y, de esta manera, evitar situaciones de sobre diagnóstico y sobre tratamiento que puedan resultar perjudiciales al paciente.

1.2.2.2 Tratamiento de CaP

Cuando la neoplasia está confinada en la cápsula prostática se administra terapia local con la finalidad de disminuir el tamaño del tumor, dicha terapia consta de la administración de fármacos análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) como la leuprorelina, que al estimular a la hipófisis se disminuye la síntesis hormonal (andrógenos) dada la retro alimentación negativa que se produce en el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (American Society of Clinical Oncology, 2014). Por consecuencia se da una disminución en el tamaño prostático. Con el mismo objetivo, puede optarse

por el uso de radioterapia, con la finalidad de practicar una prostatectomía, es decir, la escisión de la próstata y en ocasiones se contempla la extirpación de los testículos (orquiectomía), criocirugía y braquiterapia (Chéchile GE., 2011). Siguiendo el curso de la enfermedad, se opta por una terapia hormonal (privación androgénica), en donde se busca evitar la producción de andrógenos por parte del estímulo generado por la GnRH y la señalización resultante de la activación de el receptor de andrógenos y que pueda estar ocasionando el agrandamiento del tumor. Hasta este momento la sintomatología se remite a dificultad en la micción, dolor, hematuria, disfunción eréctil, etc... exhibe sensibilidad a la castración y aparición de lesiones metastásicas. Los fármacos empleados para el tratamiento de esta etapa son agonistas de la GnRH como la buserelina, goserelina y leuprorelina, así como antagonistas del RA como la flutamida y bicalutamida. El 80 % de los pacientes tienen reincidencia tumoral y se da en un lapso aproximado de 18 meses, presenta lesiones metastásicas y tiene un fenotipo resistente a la castración, es decir, su crecimiento es independiente del estímulo generado por la presencia de andrógenos. El tratamiento consta de agentes quimioterapéuticos que actúan como bloqueadores del receptor de andrógenos y antimitóticos. Entre estos fármacos encontramos a la enzalutamida, docetaxel y cabazitaxel (Figura 7). Por otro lado, se emplean en paralelo medicamentos que impiden la actividad de los osteoclastos (encargados de la erosión ósea), ya que el tratamiento en esta etapa del CaP ocasiona debilitación en la estructura de los huesos. Cabe aclarar que para esta fase y empleando este tratamiento, el paciente puede llegar a mejorar su calidad de vida y extender el periodo de supervivencia un promedio de 12 a 18 meses llegando finalmente a la muerte (Prostate cancer foundation, 2015).

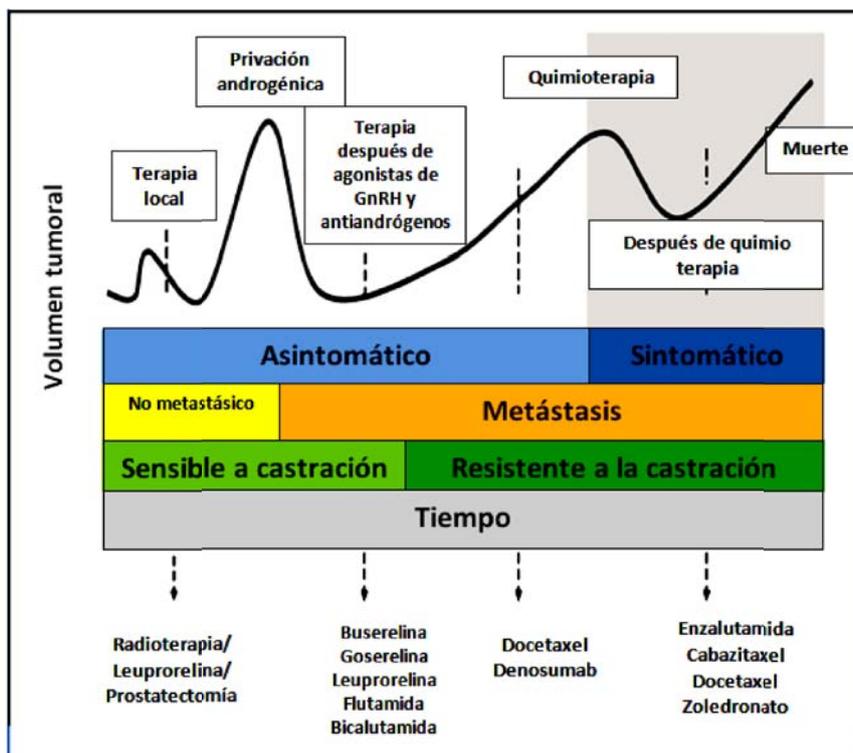


Figura 7: Curso natural del cáncer de próstata y terapia. En sus inicios la enfermedad puede cursar de manera asintomática por lo que su detección en estadios tempranos aún resulta difícil, no presenta lesiones metastásicas y es sensible a un tratamiento de privación androgénica. El CaP en estado avanzado se caracteriza por ser insensible a andrógenos, es decir, no requiere de estos para generar los estímulos necesarios que provocan el crecimiento celular. Existe metástasis a diversos órganos (ganglios y hueso). El tratamiento de elección involucra la interferencia con la señalización mediada por el receptor de andrógenos (tomado y editado de www.primeoncology.org)

1.2.3 CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN (CPRC)

El término resistente a la castración se ha aplicado al cáncer de próstata que aún presenta progresión en un paciente al cual se le ha sometido a la privación androgénica gonadal. La supervivencia media oscila desde los 4 años para pacientes con recurrencia de PSA hasta 12 a 18 meses para pacientes con enfermedad metastásica extensa (Tabla 2) (Alcaraz A., 2011).

Los tratamientos hormonales que aún pueden tener efecto sobre el CPRC incluyen la supresión con antiandrógenos, uso de corticoides o estrógenos, agentes dirigidos contra el receptor de andrógenos (AR) o inhibidores de la síntesis de andrógenos como la bicalutamida, la enzalutamida y la abiraterona las cuales interviene en la síntesis de andrógenos catalizada por la enzima CYP17 y que se expresa en tejido tumoral testicular y prostático. La privación de testosterona se lleva a cabo por medio de castración química o quirúrgica y puede estar asociada o no a un tratamiento antiandrogénico. El tratamiento de primera línea empleado para pacientes con CPRC es el docetaxel, que ejerce su actividad interviniendo en factores críticos durante la fase S de la mitosis. Como opciones de tratamiento de segunda línea están la abiraterona y el cabazitaxel, el MDV3100 que actúa a nivel de receptor de andrógenos impidiendo su translocación al núcleo y los SARDS que son degradadores selectivos del mismo (Alcaraz A., 2011).

Tabla2: Criterios para definir al cáncer prostático resistente a la castración.

- Niveles de testosterona considerados de castración (testosterona < 50ng/dl o 1,7 nmol/l).
- Tres elevaciones consecutivas de PSA, separadas por al menos una semana, considerando el resultado de dos incrementos del 50% sobre el punto más bajo con un PSA mayor de 2ng/ml.
- Supresión de andrógenos de al menos cuatro semanas o una segunda manipulación hormonal hecha, con progresión del PSA (a pesar de terapias hormonales consecutivas).
- Progresión de lesiones óseas o progresión de lesiones en tejidos blandos según criterios RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors).

No resulta sencillo valorar la respuesta a un tratamiento y establecer un pronóstico adecuado para pacientes con CPRC, por lo que la búsqueda de marcadores adecuados que ayuden a establecer la evolución y pronóstico de la enfermedad respecto a un tratamiento permanece (Tabla 3). Recientemente se propuso al conteo de células circulantes de CaP como posible factor a evaluar durante la progresión del CPRC y así definir la eficacia de los tratamientos. Los cambios en el número de células tumorales circulantes durante el tratamiento se correlaciona con el pronóstico. Pero debido a la heterogeneidad que hay entre los pacientes con CPRC el pronóstico puede variar significativamente de un paciente a otro. (Alcaraz A., 2011). Descifrar los mecanismos por los cuales la enfermedad puede progresar hasta este punto es un tema que ocupa a diversos grupos de investigación en el mundo.

Tabla3: Factores pronósticos de progresión a considerar en CPRC.

Factores pre-quimioterapia	<ul style="list-style-type: none"> • Dolor • Estado general (escala de Karnofsky) • Nivel de fosfatasa alcalina • Numero de localizaciones metastásicas • Presencia de localizaciones metastásicas • Valores de hemoglobina • Valor de PSA • Periodo de tiempo desde el diagnostico
Factores post-quimioterapia	<ul style="list-style-type: none"> • Progresión durante el tratamiento de primera linea. • Número de factores de progresión

Las modificaciones genéticas juegan un papel importante en el desarrollo del CaP a su estado más avanzado y al igual que en otros tipos de cáncer podemos encontrar mutaciones que favorecen esta situación. Un ejemplo de esto es la ausencia de la enzima glutatión-S-transferasa la cual esta involucrada en procesos de detoxificación de compuestos electrofílicos, o la presencia de versiones mutantes de *PTEN*, que al no poder ejercer su función de fosforilasa se impide la activación de mecanismos que llevan a la apoptosis. Al haber un incremento en la tasa de mutación se ve aumentada la posibilidad de que las células adquieran la capacidad de presentar proliferación sostenida sin requerir estímulo androgénico. También se han descrito alteraciones en el AR, en las que éste aumenta su sensibilidad debido a una baja concentración hormonal ocasionado por la terapia de privación de andrógenos. Por otro lado se pueden dar casos en los que la expresión del receptor aumenta y, aunque los niveles hormonales son bajos esto incrementa la posibilidad de que

se forme el complejo ligando-receptor. Otra forma en la que puede progresar la enfermedad es por la producción local de andrógenos por parte de las células prostáticas dada la conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DHT), mediada por la enzima 5 α -reductasa (B. Feldman; D. Feldman; 2001). Nótese que, todos estos mecanismos a pesar de que están involucrados en el avance de la enfermedad aún existe cierta dependencia hacia el estímulo hormonal. Por otro lado, existen otros mecanismos por los que el CaP puede seguir su curso hacia la hormono independencia (Figura 8).

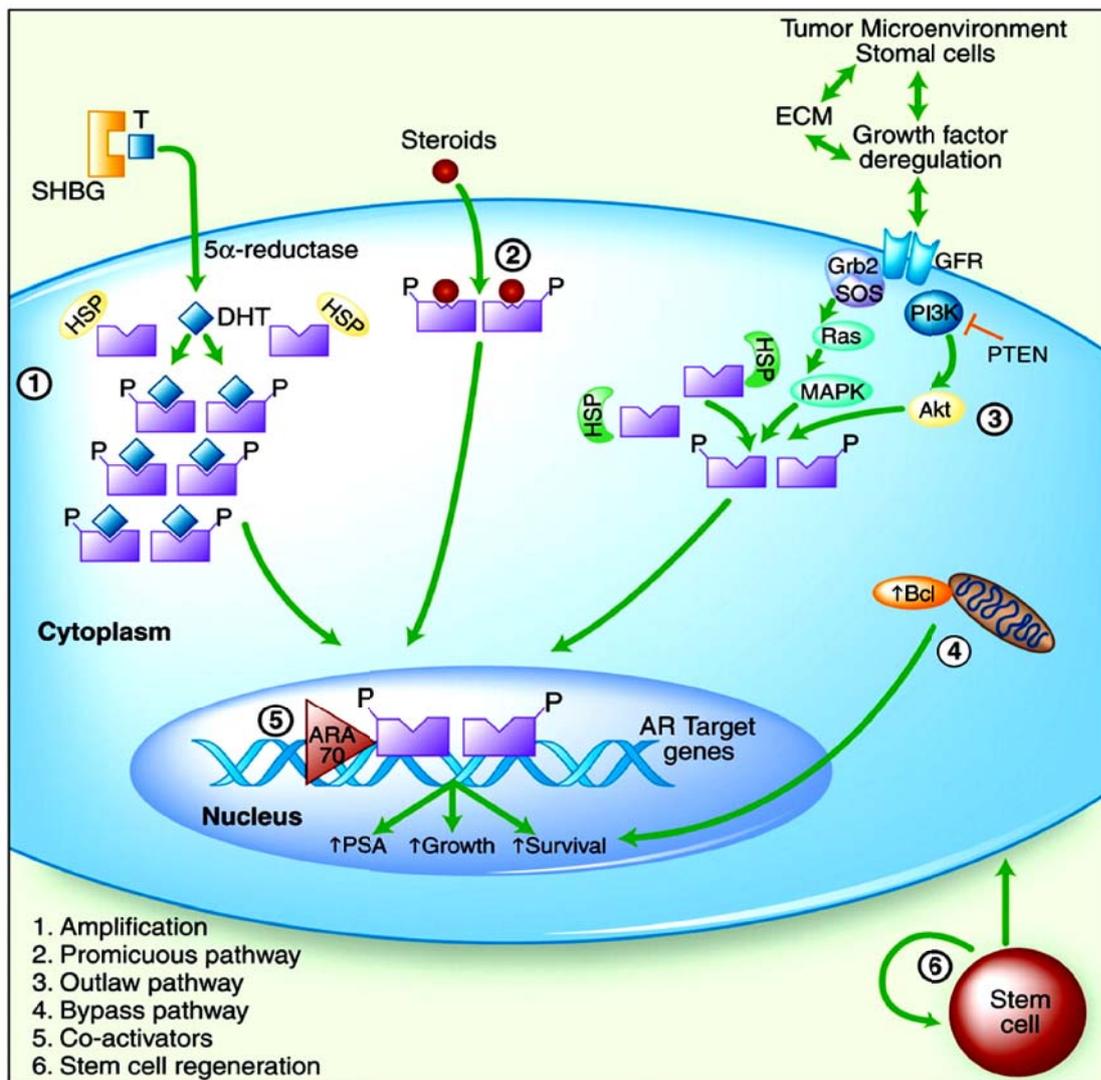


Figura 8: Mecanismos que llevan a la andrógeno independencia. Estos mecanismos involucran alteraciones en el número de copias del gen del receptor de andrógenos como, así como situaciones en las cuales el RA puede ser activado por otras moléculas esteroideas o por moléculas que no comparten ninguna homología con el ligando que se une al sitio de unión en el receptor. (B. Feldman; D. Feldman 2001)

En primera instancia se da un aumento en la síntesis del RA lo que incrementa la posibilidad de que se dé la interacción del receptor con la concentración remanente de andrógenos disponibles. Por otro lado puede presentarse una disminución en la especificidad de la unión del ligando con el receptor, por lo que hay una activación aberrante de la vía de señalización desencadenada por la interacción de diversas moléculas (flutamida, testosterona, DHT, corticoesteroides, etc.) en sitios de unión mutados del RA. También se puede dar la activación del receptor de andrógenos de manera ligando independiente, es decir, la interacción de factores de crecimiento que propician la transcripción de genes blanco del RA en la ausencia de andrógenos. Otra alternativa que podría estar mediando el crecimiento celular es asegurar la supervivencia sin hacer uso del RA mediante la modulación de factores pro apoptóticos. La desregulación de co-activadores y co-represores, quienes intervienen como mediadores de la señalización entre el RA y la maquinaria transcripcional influyen en la capacidad de activación del receptor. Por último se piensa que células de CaP con fenotipo troncal (con crecimiento independiente del RA) contribuyen con el reabastecimiento de la población celular (B. Feldman; D. Feldman 2001).

Los avances referentes a la identificación y tratamiento de pacientes en un estado de resistencia a castración son notables, pero aún resultan insuficientes para lograr que la esperanza de vida y sobre todo la calidad de esta sean alentadoras (Alcaraz A; 2011)

Además de los mecanismos que se han mencionado, existen otras vías por las cuales el CaP puede seguir su curso a la fase andrógeno independiente. Esto involucra a los mecanismos de regulación epigenética y las posibles alteraciones que pueden sufrir durante la iniciación y progresión del cáncer.

1.3 Mecanismos de regulación epigenética

La epigenética involucra a todas aquellas modificaciones químicas que sufre el material genético sin que se vea alterada la secuencia de nucleótidos, y que pueden hacer que cambien los niveles de expresión de genes. Existen diversas formas de regulación epigenética y entre las más estudiadas encontramos a las modificaciones postraduccionales de histonas, posicionamiento de nucleosomas y metilación del ADN. (Portela A; 2010.)

Metilación del ADN: La metilación del ADN se refiere a la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. Este fenómeno ocurre casi de manera exclusiva en dinucleótidos CpG agrupados en

secuencias de más de 200 pares de bases (pb) conocidos como islas CpG, las cuales se encuentran asociadas generalmente a regiones promotoras de genes y que, cuando no se desarrolla la enfermedad están desmetiladas. (Figura 9)

La metilación del ADN puede inhibir la expresión génica por varios mecanismos, metilación de islas CpG, metilación en “costas” de islas CpG y metilación de la secuencia que codifica para un gen. La metilación no está involucrada únicamente con regulación transcripcional, hay secuencias conocidas como elementos largos inter dispersos que se encuentran metilados para evitar inestabilidad cromosómica y translocaciones (Portela A; Esteller M. 2010).

La reacción de metilación es llevada a cabo por un grupo de enzimas conocidas como ADN-metil transferasas, (DNMT’s por sus siglas en inglés) que catalizan la adición de un grupo metilo a partir de un donador (S-adenosilmetionina) al carbono 5 de una citosina (Figura 8) (K. Chiam et al. 2014).

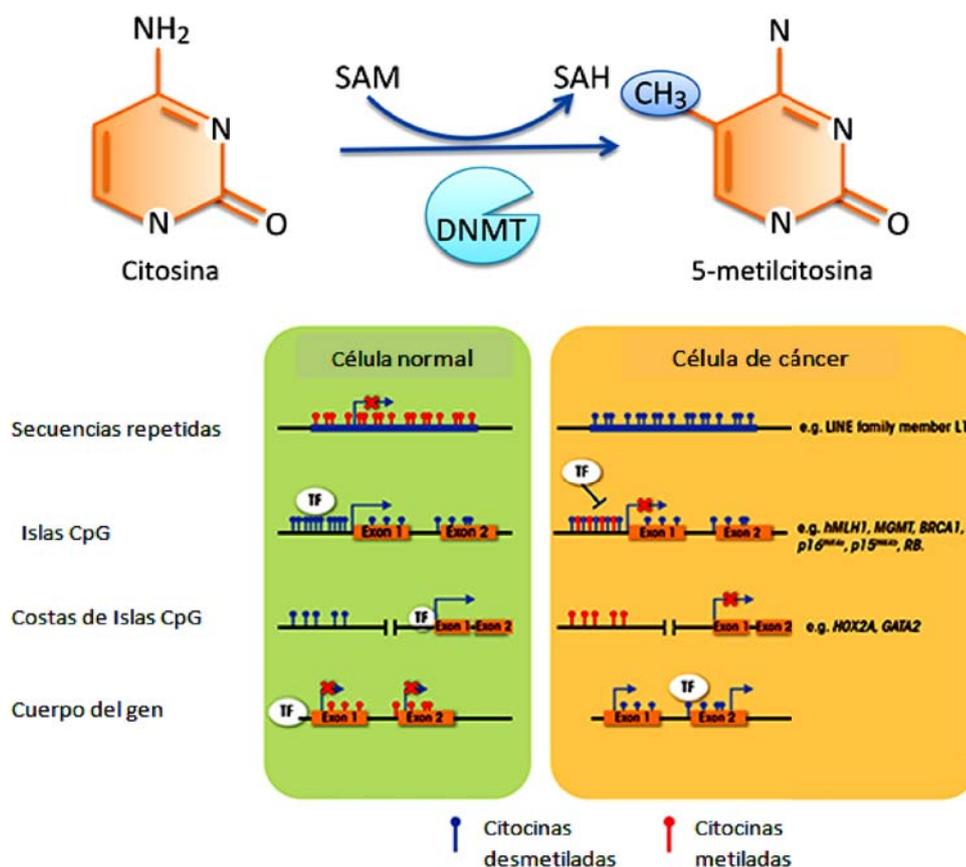


Figura 9: Reacción catalizada por DNA metil transferasas y patrones de metilación de ADN. El material genético puede sufrir metilaciones que derivan en inhibición de la trascrición. Las reacciones de metilación están mediadas por enzimas conocidas como ADN metil-transferasas. La adición de grupos metilo puede darse (a) en regiones promotoras, (b) en costas de islas CpG (CpG “shores”) y (c) en el cuerpo del gen (Tomado y editado de Varela-Rey, et.al.).

A su vez, el material genético está asociado a las histonas, que son proteínas que están involucradas en el empaquetamiento del ADN y que, también son susceptibles de sufrir modificaciones que alteren los patrones de expresión génica. La asociación de estas proteínas se conoce como nucleosoma y esta formado por dos dímeros de las histonas H2A-H2B y un tetrámero de las histonas H3-H4, dando lugar a la formación de un octámero. En dicho octámero un segmento de aproximadamente 150 pb se enrolla alrededor del nucleosoma dándole 1.6 vueltas. Cada nucleosoma esta separado por un segmento de 50 pb (ADN de unión) que interactúa con la histona H1 (Portela A; Esteller M. 2010). (Figura 10)

Modificación postraducciona de histonas: Las modificaciones de histonas son más dinámicas y complejas que las que se presentan en la metilación del ADN. En un estado de represión transcripcional los aminoácidos (aa) lisina, arginina y serina de los extremos amino terminal (N-terminal) presentan gran afinidad a la carga negativa del ADN. Las modificaciones post traduccionales que pueden sufrir las histonas, tales como la acetilación y la metilación se refieren a la adición específica de estos grupos bioquímicos a los residuos de aa en el extremo N-terminal de las histonas, por lo que se ve afectada la afinidad de estos amino ácidos al ADN, ocasionando un cambio conformacional en la estructura de la cromatina que altera la transcripción de genes. Por ejemplo, la acetilación de histonas dada la actividad de las histona aciltrasferasas, (HAT's) está relacionada con activación transcripcional al catalizar la adición de grupos acetilo empelando como donador a la Acetil Coenzima A, esto neutraliza las cargas positivas de las histonas convirtiendo a las aminas en amidas, por lo que se reduce la capacidad de las histonas para unirse al ADN. Mientras que la remoción de este grupo por las histona-desacetilasas (HDAC's) provoca un estado de represión al escindir grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas. Y se ha visto que en diferentes tipos tumorales estas enzimas se encuentran sobre expresadas o mutadas. Por otro lado, la metilación y desmetilación involucra la adición o eliminación de uno o más grupos metilo (mono, di o tri) en los residuos de lisina o arginina de las histonas H3 y H4 por las histona metiltrasferasas (HMT's) e histona desmetilasas (HDM's). La metilación de histonas juega un papel muy importante en la regulación epigenética y se lleva a cabo al emplear a la S-adenosilmetionina como donador de grupos metilo. Esta modificación puede llevar a un estado de transcripción activa o represiva dependiendo del residuo y naturaleza de la modificación. (Figura 10) (K. Chiam et al., 2014)

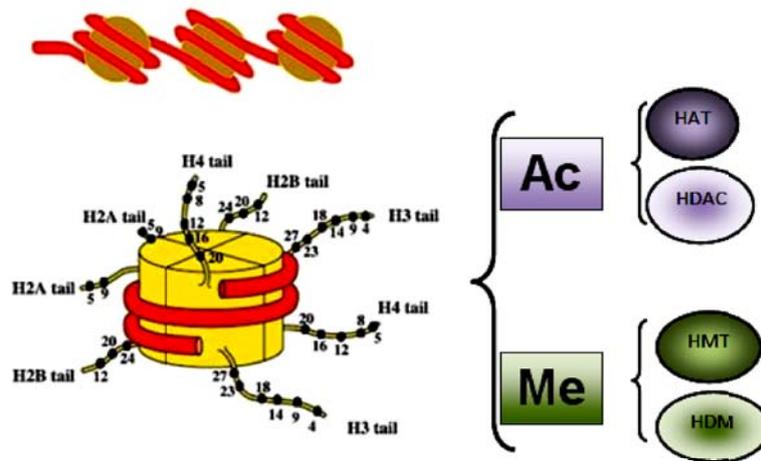


Figura 10: Estructura nucleosomal y principales modificaciones post traduccionales de histonas.

Las histonas son susceptibles de sufrir modificaciones post traduccionales en residuos de lisina, arginina y serina de los extremos N-terminal que cambian la interacción del ADN con el nucleosoma. Permitiendo que se dé una activación o represión transcripcional que depende de la naturaleza e interacción entre las modificaciones presentes. (tomada y editada de http://www.integratedhealthcare.eu/1/en/histones_and_chromatin/1497/)

Los nucleosomas funcionan como barreras que impiden la interacción de los factores de transcripción con su sitio de unión en el ADN. Además se ha reportado que pueden intervenir en la forma en la que se da la metilación en algunas regiones del genoma. Específicamente, la regulación ejercida por los nucleosomas tiene que ver con la incorporación de variantes de histonas, las cuales se diferencian por presentar modificaciones en los extremos N-terminal y en algunos amino ácidos clave. Por ejemplo, la incorporación de la variante H2A.Z provee protección contra la metilación del ADN (Portela A; Esteller M. 2010). Por otro lado la ubicación nucleosomal en el espacio puede ser modificada por complejos remodeladores como SWI/SNF, que actúan a través del uso de ATP como sustrato energético y cuya actividad influye en el nivel de compactación del material genético. (Figura 11)

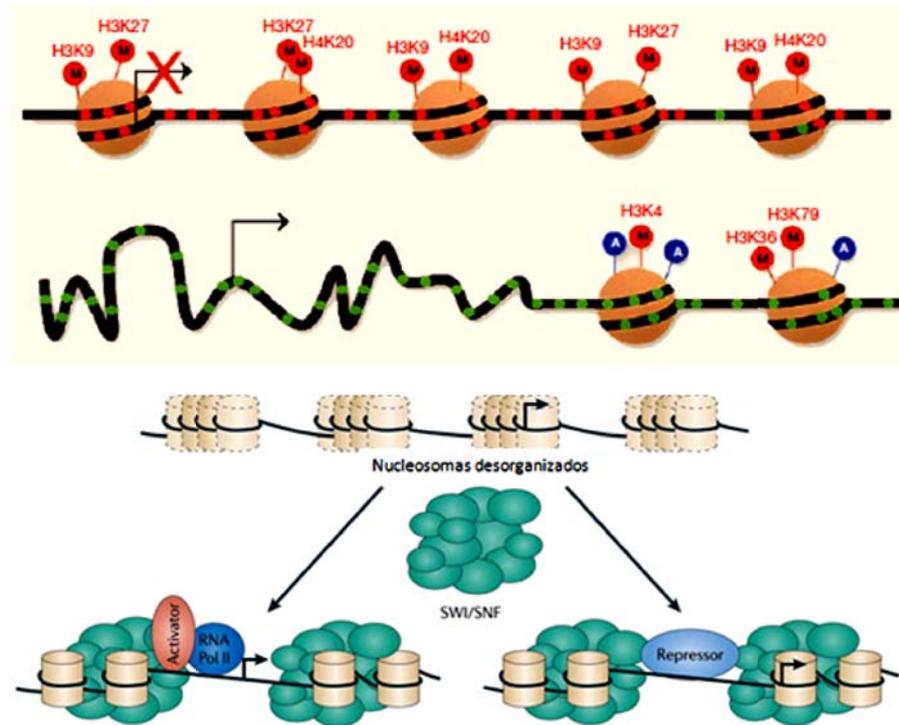


Figura 11: La conformación espacial de la cromatina interviene en procesos de regulación génica. Reacciones de metilación y acetilación, actividad de complejos remodeladores de cromatina e interacciones en los diferentes residuos de histonas dan como resultado una modificación en la conformación espacial tridimensional de la cromatina lo que influye en la accesibilidad de factores promotores y maquinaria de la transcripción (Tomado y editado de Portela A; Esteller M. 2010). (Boris G. Wilson).

Complejos remodeladores de la cromatina: El grupo de proteínas Polycomb (PcG) y Tritorax (TrxG) son complejos multiprotéicos que tienen un papel activo en la regulación epigenética de la transcripción. En el caso de Polycomb esto sucede a través de lo que se conoce como complejos represivos de Polycomb, (PRC por sus siglas en inglés) PRC1 y PRC2. Estos complejos pueden variar según la incorporación de proteínas homologas (Figura12). El PRC2 cuenta con una metiltransferasa conocida como EZH2, que promueve de manera específica la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3, (marca de histona H3K27me3) que se relaciona con el silenciamiento de genes (Di Croce L. Helin., 2013). Durante el desarrollo de CaP se ha visto que hay una mayor expresión de la metiltransferasa EZH2, lo que contribuye a mantener el estado hipermetilado de ciertos genes (K. Chiam et al. 2014). Por otro lado, se considera que la actividad de TrxG antagoniza a Polycomb promoviendo un estado transcripcionalmente activo de la cromatina mediante la formación de la

marca de histona H3K4me3 en sitios específicos reconocidos por el complejo protéico (Di Croce., L. Helin., 2013).

Se ha visto también que PcG y TrxG intervienen en la propagación de un estado transcripcional activo o represivo durante el ciclo celular, ayudando al crecimiento y diferenciación, así como a la auto renovación de células troncales (Figura 13). Es por esto que se piensa que durante el desarrollo del cáncer los genes que codifican para las proteínas que conforman estos complejos se encuentran alterados o desregulados (Di Croce., L. Helin., 2013).

Figura 12. Función y composición de los complejos Polycomb. Los complejos represivos de Polycomb son grupos heteroméricos de proteínas que median los posibles cambios en el estado

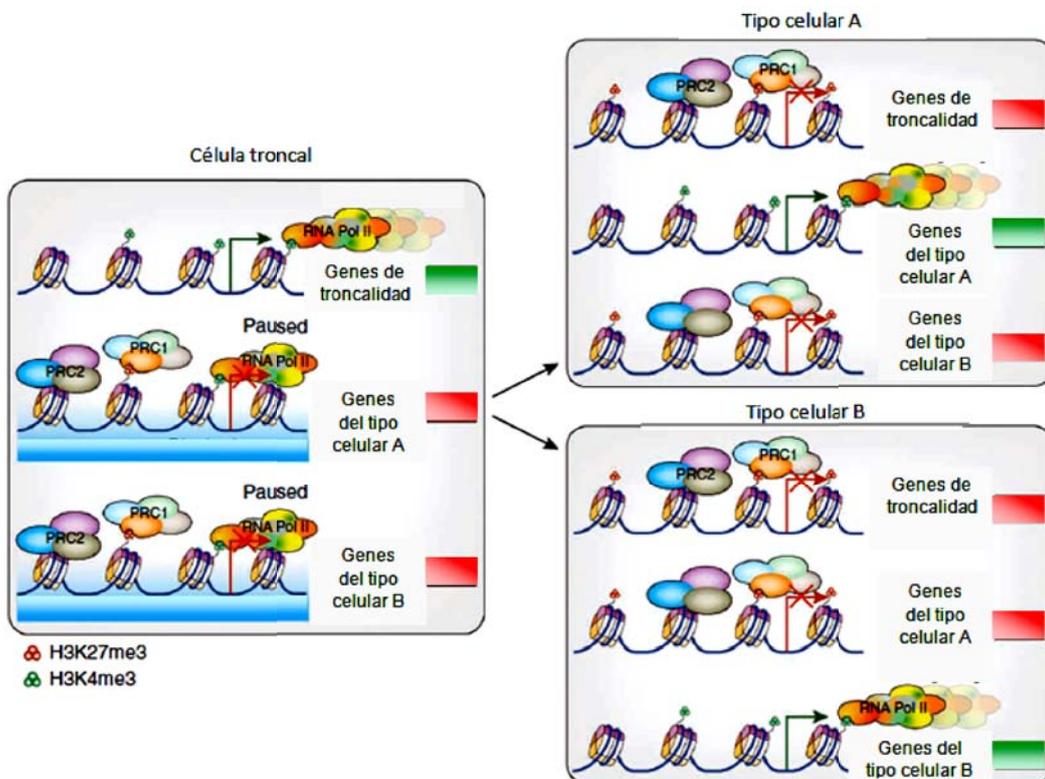
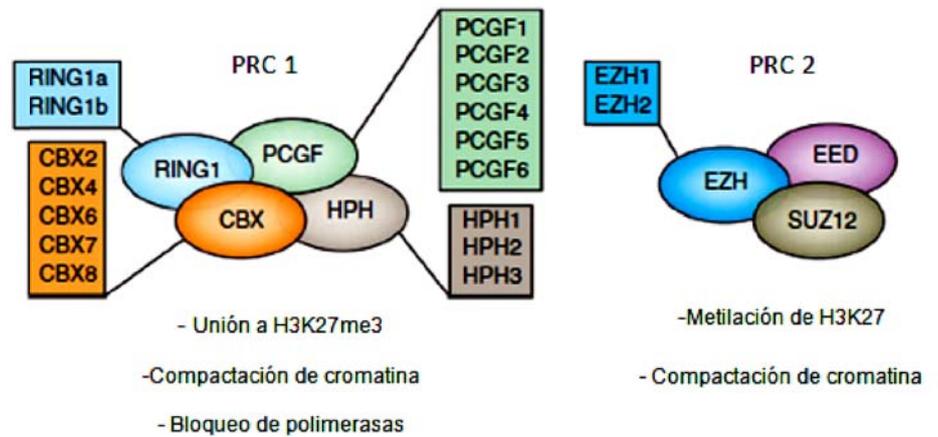


Figura 13. Papel de PcG en diferenciación y auto renovación celular. Las modificaciones orquestadas por Polycomb juegan un papel muy importante en la transcripción de genes involucrados en el desarrollo y diferenciación celular. (Tomado y editado de Di Croce L. Helin. 2013)

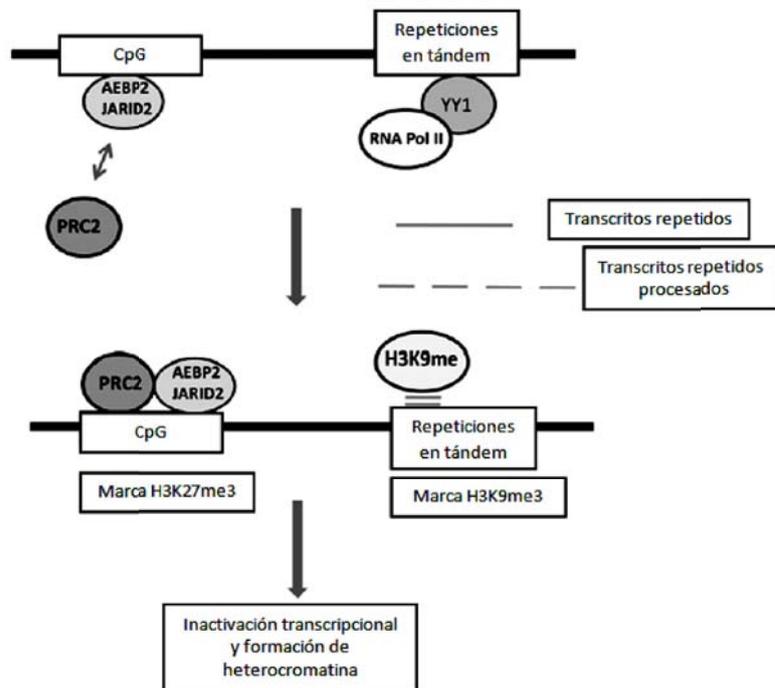


Figura 14: Mecanismo de represión mediado por Polycomb (PRC2) y metilasa de H3K9. Las marcas de histona H3K27me3 y H3K9me3, que están implicadas en represión transcripcional se originan por mecanismos diferentes, de igual forma se encuentran asociadas a diferentes regiones del genoma. H3K27me3 esta presente en zonas ricas en dinucleótidos CpG y H3K9me3 a regiones repetidas. (Tomado y editado de Kim J. 2012)

El estado transcripcional, reprimido o activo no depende de la presencia de una única marca de histona, si no de la interacción que resulta de las múltiples modificaciones que pueden sufrir estas proteínas al mismo tiempo, a esto se le conoce como código de histonas (Gut P. Verdin, 2013).

Marcas de histona H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3

H3K4me3

La mono, di y trimetilación de la cuarta lisina del amino terminal se puede encontrar distribuida ampliamente en todo el genoma. Cuando está presente existe un estado de activación transcripcional que se encuentra estrechamente asociada a regiones promotoras de genes activos. (Barski, A. et. al. 2007). La regulación transcripcional que ejerce tiene que ver más bien con su capacidad para promover la unión de factores de transcripción positivos y el bloqueo de los negativos. Un ejemplo de esto es que la H3K4me3 puede reclutar factores remodeladores de la cromatina como CHD1 y BPTF, los cuales permiten que exista un estado transcripcionalmente activo. Y previene la unión de los complejos de represión como NuRD e INHAT (Flanagan, J.F., 2005). (Nishioka, K., 2002).

H3K9me3

Esta marca de histona se relaciona con un estado de represión transcripcional. Su distribución en el genoma se da de forma preferente en regiones que carecen de islas CpG. Por ejemplo en regiones donde hay secuencias repetidas en tándem (satélites). (Figura 14). Las regiones del genoma donde hay enriquecimiento de esta marca de histona se encuentran frecuentemente metiladas. Se sabe que la marca H3K9me3 es producida por varias enzimas, entre las que se encuentran SETDB1, SUV39H1 y SUV39H2. Además de que su distribución es más global que la H3K27me3 (Kim J. 2012).

H3K27me3

Al igual que la H3K9me3 tiene una actividad represora sobre la transcripción. Se encuentra asociada a regiones codificantes, en particular a zonas que están involucradas en la regulación del desarrollo y diferenciación en células madre embrionarias (CME). La trimetilación de la lisina 27 del N-terminal es producto de una reacción catalizada por la EZH2 del complejo represivo de Polycomb 2 (PRC2) al interactuar con las proteínas de unión ADN AEBP2 y JARID2. (Figura 13) (Kim J. 2012). La H3K27 puede ser mono, di y trimetilada. La variante monometilada esta ligada a promotores transcripcionalmente activos y se ha visto que las tres pueden ser producidas por el complejo PRC2 (Ferrari, K.J et al, 2014).

1.3.1 Epigenética y cáncer

El epigenoma en cáncer se caracteriza por cambios globales en la metilación del ADN, patrones de metilación del ADN, patrones de modificación de histonas y perfiles de expresión de enzimas remodeladoras de la cromatina, quienes presentan un papel importante en la iniciación y progresión del cáncer (Esteller M; 2011). Durante el desarrollo del cáncer se da una pérdida masiva de metilación del ADN. La hipometilación ocurre en secuencias repetidas promoviendo inestabilidad cromosómica, translocaciones, etc. Así mismo esta hipometilación en promotores específicos puede activar la expresión aberrante de oncogenes. Al mismo tiempo se observa un patrón de hipermetilación en las islas CpG de ciertos promotores de genes. La inactivación transcripcional causada por la hipermetilación del promotor afecta a genes involucrados en vías de señalización como la reparación de ADN, Ras, puntos de control del ciclo celular, p53 y apoptosis. Los promotores hipermetilados se proponen como biomarcadores para pronóstico y diagnóstico. Los

patrones de hipermetilación son tumor específicos y aún no se sabe cómo es que unas regiones se hipermetilan mientras que otras permanecen sin metilar. Una posibilidad es que la inactivación de algunos genes específicos confiera ventaja para el crecimiento celular, resultando en la selección clonal (Portela A; 2010).

1.3.2 Epigenética en CaP

Las alteraciones epigenéticas en CaP son muy frecuentes y juegan un papel importante en la iniciación y progresión de la enfermedad. Son incluso más comunes que las mutaciones y generalmente se presentan en estadios premalignos de la enfermedad, es por eso que se les ha considerado como biomarcadores de interés para establecer diagnósticos, pronósticos y tratamientos (Gu L. et al. 2015). En este sentido se ha determinado la sobre expresión de la metil transferasa EZH2 del PcG en lesiones provocadas por CaP, además de establecer su importancia en el desarrollo de la andrógeno independencia por medio de la represión transcripcional de genes y que pueden servir como factor pronóstico para el paciente (Sooryanarayana V. et al; 2007). Por lo que se ha propuesto un panel de genes que presentan alteraciones de expresión en distintos estadios del CaP. Entre estos genes podemos encontrar al que codifica para la enzima glutatión-s-transferasa, (GSTP1) que se encarga de la metabolización de compuestos electrofílicos y oxidantes que son nocivos para la célula y el gen APC (Poliposis adenomatosa crónica) (K. Chiam et al. 2014). Por otro lado, estudios realizados en CaP y otros tipos de cáncer han demostrado tener alteraciones en la expresión de una familia de genes conocidos como Proteínas Secretadas Relacionadas con Frizzled) SFRP, y que pueden tener valor diagnóstico y pronóstico en la enfermedad.

1.4 Familia de Proteínas Secretadas Relacionadas con Frizzled (SFRP)

Las proteínas SFRP comprende un grupo de cinco proteínas (SFRP1-SFRP5) y son una familia de proteínas solubles que están relacionadas estructuralmente con los receptores de la vía de señalización Wnt, la cual está involucrada en procesos de desarrollo, diferenciación, muerte y proliferación. Esta relación esta dada por la homología que guardan con el sitio donde se unen las proteínas Wnt en el receptor Frizzled. Desde que se definió la interacción entre las SFRP y los ligandos Wnt se les ha considerado como antagonistas de la vía impidiendo su activación. Es por esto que el estudio de las proteínas SFRP se ha incrementado para entender su papel en el desarrollo y la progresión de enfermedades (Bovolenta.P, 2008).

1.4.1 Estructura y función de las proteínas SFRP

Estructuralmente las proteínas SFRP cuentan con dos dominios principales. El amino terminal que contiene el péptido señal de secreción, seguido de un dominio compuesto de diez cisteínas (CRD) que tienden a formar puentes disulfuro, tal como los que presentan los dominios CRD extracelulares de los receptores Frizzled. En cuanto al extremo carboxilo terminal, éste se caracteriza por tener residuos cargados positivamente, además de contar con seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro formando lo que se conoce como dominio de Netrina (NTR). Es importante resaltar que existen diferencias entre los dominios de cada SFRP (modificaciones post traduccionales) lo que les confiere a cada una un mecanismo de acción diferente por medio del cual ejercen su función, tales como N-glicosilación o sulfatación de residuos de tirosina (Bovolenta, P 2008).

1.4.2 Ruta Wnt e interacción de las proteínas SFRP

La vía de señalización Wnt es esencial en procesos del desarrollo celular y se define como canónica (dependiente de β -catenina) o no canónica (independiente de β -catenina). Se activa por medio de la interacción de ligandos Wnt (glicoproteínas con dominios ricos en cisteína) con los receptores transmembranales Frizzled (FDZ) (Surana R et al, 2014).

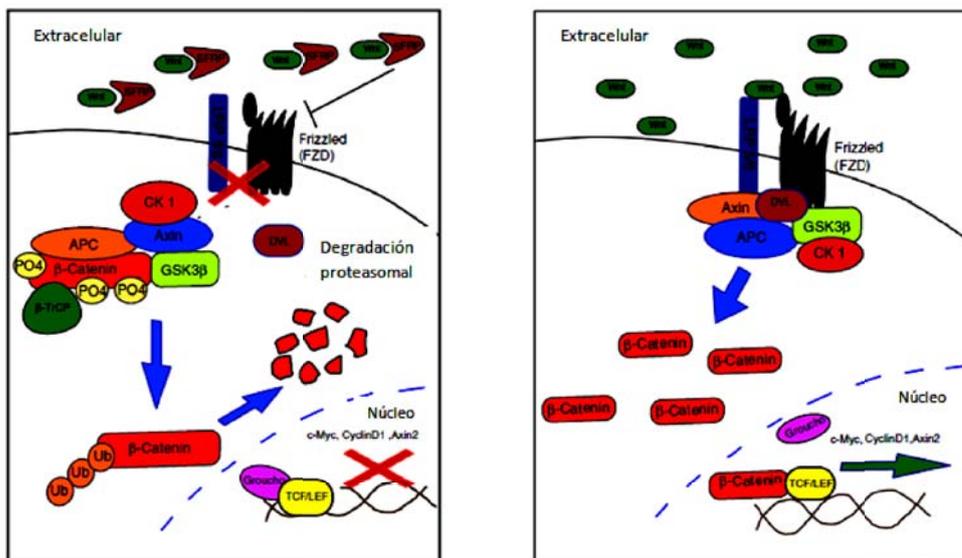


Figura 15: Vía Wnt canónica inactiva y activa. (Panel izquierdo) Mientras la vía se encuentra inactiva, un complejo de destrucción conformado por Axina, APC, GSK3 β y CK1 provoca la ubiquitinación de la β -catenina lo que lleva a una degradación proteasomal. A su vez, el factor de transcripción TCF es inhibido por el co-represor Groucho. **(Panel derecho)** Cuando el ligando Wnt interactúa con el receptor FDZ se desestabiliza el complejo destructor e incrementa la concentración citoplasmática de β -catenina. Ésta se transloca al núcleo y se une al factor de transcripción (TCF/LEF) promoviendo la transcripción de genes blanco que tienen un papel muy importante en señalizaciones relacionadas con la supervivencia celular, proliferación y diferenciación (Surana R et al, 2014).

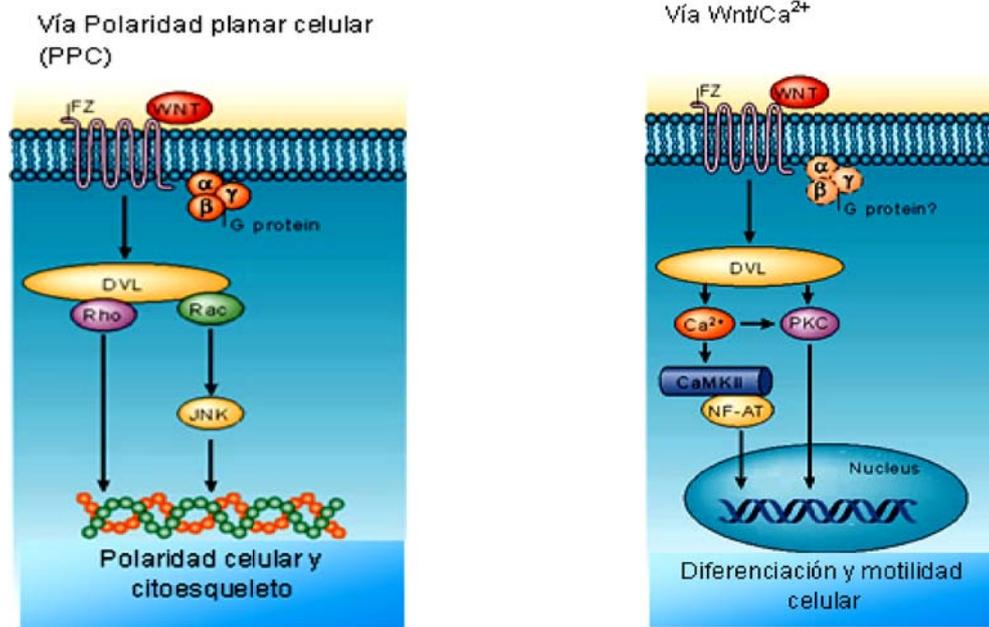


Figura 16: Vía Wnt no canónica. En este caso la inducción de la transcripción es independiente de β -catenina y se han descrito dos mecanismos por los cuales esto puede ocurrir. Uno involucra la polaridad planar celular (PPC) y la otra la vía Wnt/ Ca^{2+} . La vía de señalización de PPC es indispensable en la regulación de la polaridad celular durante la morfogénesis, por medio de la activación de factores de transcripción dependientes de cinasas JNK. Por otro lado, en la vía dependiente de calcio se da una activación de la fosfolipasa C, seguido de una liberación intracelular de Ca^{2+} , esto provoca que se active el regulador transcripcional nuclear de células-T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés) (Surana R. et al, 2014) (Tomado y editado de http://www.nature.com/nrn/journal/v6/n5/fig_tab/nrn1665_F1.html)

1.4.3 Proteínas SFRP en cáncer de próstata

La vía de señalización Wnt está alterada en CaP, al igual que la expresión de los ligandos Wnt. Además, esta hiperactividad se ha relacionado con la progresión a la fase andrógeno independiente debido a posibles cruces en la señalización del receptor de andrógenos (Surana R. et al, 2014). Incluso se ha visto que la β -catenina actúa como cofactor en la actividad transcripcional mediada por el RA (Y. Kawano et al. 2009).

Estudios realizados en diferentes líneas celulares y muestras de tejido de CaP han mostrado que existe hipermetilación del *SFRP2* en el 70% de los casos y del *SFRP5* en el 60%. Sin embargo la metilación de *SFRP1* sólo se ha detectado en casos avanzados andrógeno independientes. Mientras que el *SFRP4* no se encuentra metilado en ninguna línea celular de cáncer de próstata estudiada. Es por eso que se cree que la hipermetilación de estos antagonistas de la vía Wnt puede propiciar la

evolución del CaP y por tanto se asocia con un mal pronóstico. (Surana R. et al, 2014) (Paola Bovolenta, 2008).

La proteína SFRP1 interviene reprimiendo la actividad transcripcional del receptor de andrógenos en líneas celulares sensibles a andrógenos por un mecanismo que involucra la formación del complejo SFRP1/FDZ. Así como disminución en la actividad proliferativa y reducción de la expresión del RNAm de genes regulados por andrógenos (Y. Kawano et al. 2009).

- JUSTIFICACIÓN

La proteína SFRP1, que forma parte de una familia de proteínas que intervienen con la señalización de la vía WNT, la cual se encuentra alterada en cáncer de próstata y que ayuda promoviendo el avance de la enfermedad se encuentra desregulada. A diferencia del resto de las proteínas pertenecientes a este grupo, *SFRP1* no se encuentra metilado en células LNCaP (sensibles a andrógenos). Aunado a que el CaP se caracteriza por presentar una mayor cantidad de modificaciones epigenéticas que alteraciones en la secuencia de nucleótidos, es por eso que este trabajo apunta a describir un posible mecanismo de regulación epigenética que puede estar interviniendo en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

ANTECEDENTES

El CaP se caracteriza por una gran variedad de anormalidades genéticas y epigenéticas, lo cual ocasiona que exista una gran heterogeneidad entre tumores. Durante el desarrollo temprano del cáncer de próstata alteraciones epigenéticas mantienen al tumor en un estado clonal hasta que éste es capaz de realizar metástasis. Estos eventos comprenden la metilación del ADN en regiones promotoras y alteraciones en la distribución y enriquecimiento de modificaciones postraduccionales de histonas. En este sentido, diversos estudios han demostrado que las regiones promotoras de los genes *SFRP* se encuentran hipermetiladas. Para el caso particular de *SFRP1* dicho estado de hipermetilación se ha encontrado únicamente en las líneas celulares de CaP PC3 y DU145 (Surana R. et al, 2014).

Estudios realizados en nuestro equipo de trabajo, demostraron que en sitios CpG en la línea celular LNCaP existe un estado de hipometilación, en contraste con PC3, la cual presenta hipermetilación

de las secuencias analizadas (2.4 y 43.2% respectivamente). Por otra parte, al realizar tratamiento con 5-Aza-2-deoxicitidina (agente desmetilante) el porcentaje de metilación disminuye para el caso de LNCaP a 1.0% mientras que para PC3 alcanza un 25.6%. Cabe mencionar que se efectuaron ensayos de expresión de SFRP1 para ambas líneas celulares, los resultados de tales experimentos confirmaron que el gen se encuentra sub-expresado tanto en LNCaP como en PC3. Esto sugiere que el estado hipermetilado de PC3 está desregulando la expresión de SFRP1, situación que no explica el caso de LNCaP, lo cual indica que la represión transcripcional del gen está siendo regulada por otro mecanismo. Otra observación importante a mencionar es que la expresión de SFRP1 se recuperó al realizar el tratamiento con el agente desmetilante en las células PC3.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la expresión del mRNA del gen *SFRP1* en líneas celulares de próstata. Y el enriquecimiento de marcas de histona en su secuencia promotora.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los niveles de expresión relativa del mRNA de SFRP1 en líneas celulares de próstata.
- Determinar el enriquecimiento de la marca de histona activadora (H3K4me3) y las marcas represoras (H3K9me3 y H3K27me3) en la región promotora del gen *SFRP1*.

HIPÓTESIS

- La expresión de la proteína de SFRP1 se encuentra abatida en la línea celular LNCaP. Sin embargo presenta un estado hipometilado en la región que codifica para *SFRP1*. Por tanto, es posible que la presencia de marcas de histona represivas (H3K27me3 y H3K9me3) estén ocasionando un estado transcripcionalmente inactivo en la cromatina, causando que el RNAm de *SFRP1* se vea disminuido.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

En la Tabla 4 se presentan las condiciones bajo las cuales se hicieron crecer los distintos tipos celulares de próstata empleados en el desarrollo experimental. Y en la Figura 17 se observa el esquema correspondiente a la metodología de propagación celular.

Tabla 4: Condiciones de crecimiento utilizadas para el crecimiento de las distintas líneas celulares empleadas

<p>RWPE-1 (AR+) (Tejido prostático normal)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Medio KFSM (Keratinocyte Serum Free Medium). Se requiere de la adición de BPE (Bovine Pituitary Extract) y EGF EGF (Epidermal Growth Factor). Las condiciones de incubación que se emplearon fueron temperatura de 37°C y 5% CO₂ cambiando el medio cada cuarto día hasta alcanzar 80-90% de confluencia.
<p>LNCaP (AR+) (Metástasis a nódulo linfático)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Medio RPMI adicionado con L-glutamina, suero fetal bovino (FBS), piruvato de sodio, HEPES, glucosa y bicarbonato. Las condiciones de incubación que se emplearon fueron temperatura de 37°C y 5% CO₂ cambiando el medio cada cuarto día hasta alcanzar 80-90% de confluencia.
<p>VCaP (AR+) (Metástasis a médula espinal)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Medio RPMI adicionado con L-glutamina, suero fetal bovino (FBS), piruvato de sodio, HEPES, glucosa y bicarbonato. Las condiciones de incubación que se emplearon fueron temperatura de 37°C y 5% CO₂ cambiando el medio cada cuarto día hasta alcanzar 80-90% de confluencia.
<p>PC3 (AR-) (Metástasis a hueso)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contiene L-glutamina, glucoa, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio. Las condiciones de incubación que se emplearon fueron temperatura de 37°C y 5% CO₂ cambiando el medio cada cuarto día hasta alcanzar 80-90% de confluencia.

Propagación de células.

Las condiciones de propagación variaron entre líneas celulares. Tales como el tiempo de tripsinización y la concentración de tripsina.

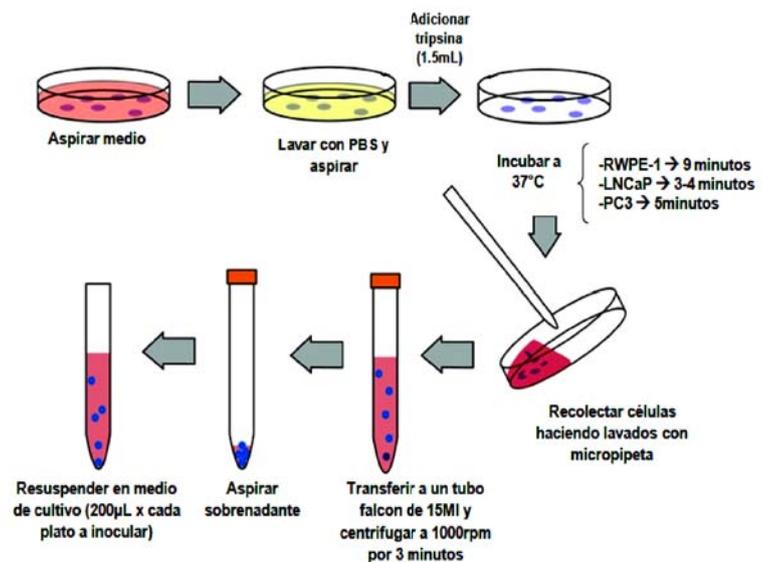


Figura 17: Diagrama de propagación celular. El cultivo y tratamiento celular se realizó en una campana de bioseguridad nivel II. Haciendo los cambios de medio y propagaciones en los momentos indicados para evitar el estrés celular.

2. Expresión relativa de *SFRP1* en líneas celulares de próstata.

Para determinar la expresión del RNAm de *SFRP1*, se crecieron células RWPE-1, LNCaP, VCaP y PC3 en placas de 6 pozos hasta que alcanzaron confluencia de 85-90%. Posteriormente se extrajo el RNA empleando el kit de purificación RNeasy Mini Kit de QIAGEN, así como la cuantificación del mismo por medio de Nanodrop y verificación de la integridad de las muestras en un gel de agarosa al 1%. Habiendo efectuado lo anterior se realizó una retrotranscripción (RT) empleando el equivalente a 500 ng de RNA, haciendo uso del Kit de Thermo Scientific. Finalmente, estas muestras se usaron para medir la expresión relativa del RNAm de *SFRP1* empleando la sonda TaqMan correspondiente, y como control GAPDH de Applied Biosystems (cat. 4400291 y 4308313 respectivamente) además de el TaqMan PreAmp Master Mix (4488593). El análisis de los datos se hizo utilizando el método de DCt y aplicando una prueba de ANOVA, comparando las líneas celulares de CaP con la de epitelio sano RWPE-1.

3. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para determinar el enriquecimiento de las marcas de histona, se diseñaron cuatro pares de oligos que abarcaban una región de 1400 pb antes del sitio de inicio de transcripción empleando la herramienta Primer BLAST.

Para realizar la técnica de ChIP se crecieron las distintas líneas celulares de próstata hasta tener un aproximado de 6×10^6 células, las cuales fueron tratadas con formaldehído para efectuar el entrecruzamiento y posteriormente incubación con los anticuerpos (provistos por Cell Signaling) dirigidos contra cada una de las marcas de histonas (H3K4me3 cat. C42D8 Rabbit mAb #9751) (H3K9me3 cat. Rabbit Antibody #9754) y (H3K27me3 cat. C36B11 Rabbit mAb #9733).

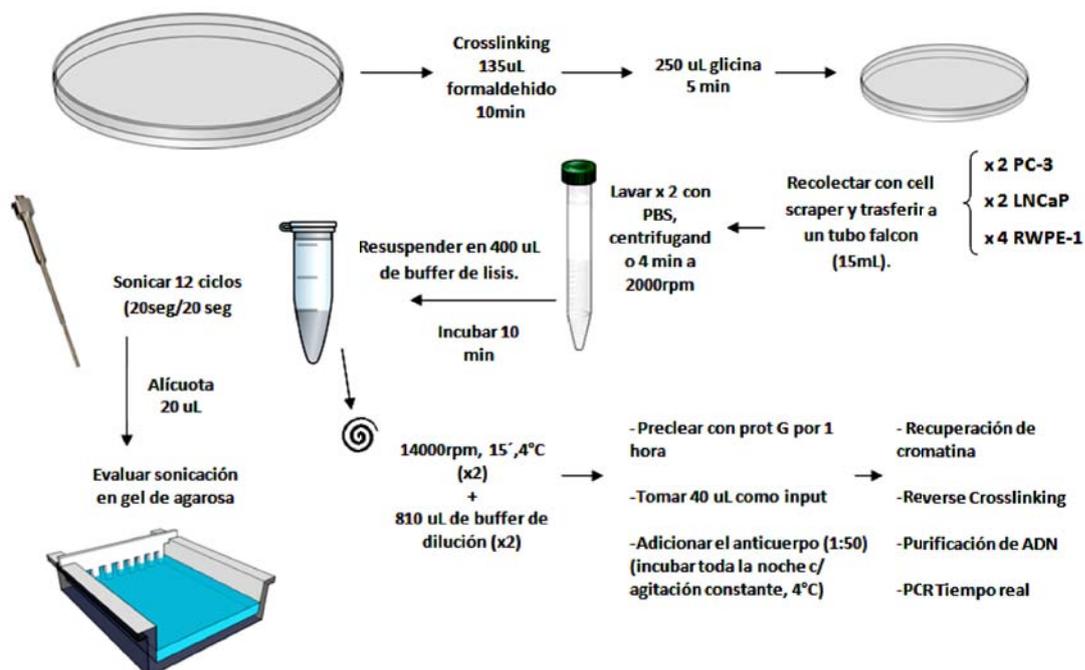


Figura 18: Diagrama de trabajo para el protocolo de Inmunoprecipitación de la cromatina. (ChIP). Para realizar el ChIP se emplearon anticuerpos dirigidos contra las marcas de histona a estudiar. Previo proceso de entrecruzamiento con formaldehído 38% y fragmentación con sonicador (200-1000 pb). Recuperación de complejo cromatina-anticuerpo usando perlas de proteína G y purificación de ADN para finalmente someter las muestras a

Se recuperó el complejo proteína-ADN/Anticuerpo usando perlas de agarosa (Proteína G) (Invitrogen cat 10004D). Para revertir el entrecruzamiento se realizó un tratamiento con NaCl 5 M a 65°C por un periodo de 6 horas. Posteriormente se adicionó EDTA 0.5 M, Tris-HCl 20mM (pH 8) y proteinasa K, la muestra se incubó durante 1.5 horas a 45 °C. Finalmente se añadió EtOH absoluto y se purificó el DNA empleando el kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN (cat. 51306). Se eluyó en 50 uL de H₂O DEPC.

La preparación de la mezcla para realizar el PCR en tiempo real se describe en la Tabla 8 de este documento. Se usó el Maxima SYBR Green qPCR Master Mix de Thermo Scientific (cat. K0221). Para llevar a cabo la reacción se empleó el equipo ViiA 7 de Applied Biosystems usando el protocolo de termociclado detallado en la Tabla 9.

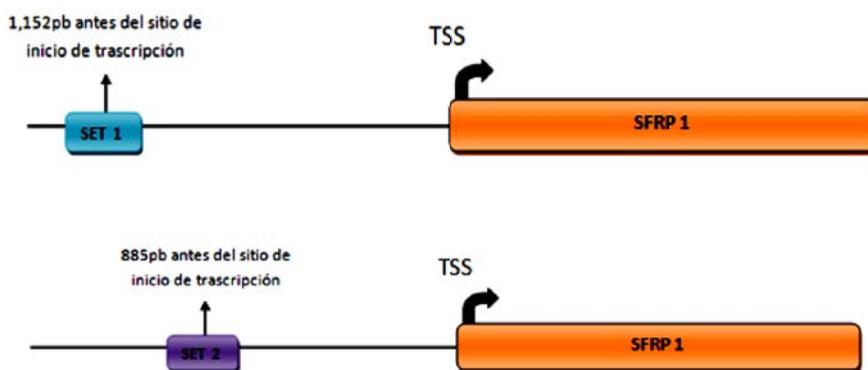


Figura 19. Ubicación de los sets de oligonucleótidos en las zonas evaluadas para el enriquecimiento de marcas de histona. De los cuatro juegos diseñados se seleccionaron aquellos que demostraban tener un enriquecimiento significativo de las marcas de histona de interés.

Análisis de datos para ChIP (qPCR)

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos de la PCR en tiempo real se realizó empleando el método comparativo del ciclo de umbral $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct por sus siglas en inglés). Se empleó el 10% de INPUT para normalizar. (Life Technologies, 2015) (Schmittgen, T., y Livak K., 2008). Posteriormente se realizó una prueba de ANOVA para establecer significancia entre el control inespecífico IgG y las marcas de histona estudiadas.

Al ser la muestra tratada con el IgG el correspondiente al control inespecífico, todo aquel valor que se encuentre por debajo del reportado por el IgG no cuenta con un nivel de enriquecimiento significativo en la zona evaluada.

RESULTADOS

A continuación se presentan los datos obtenidos de los dos pares de oligos que tuvieron una señal detectable de enriquecimiento usando la técnica de qPCR. Estos datos fueron tratados mediante el análisis estadístico descrito en la sección anterior y la comparación de grupos se hizo respecto a la línea celular RWPE-1, ya que ésta es una línea celular epitelial sana.

1. Expresión relativa de *SFRP1* en las distintas líneas celulares de próstata

En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos correspondientes a la expresión del mRNA de *SFRP1* en las diferentes líneas celulares de próstata evaluadas, usando como control para normalizar GAPDH. En la cual, se observa que hay niveles mucho más bajos del mRNA de *SFRP1* en células de CaP al ser comparadas con RWPE-1 (línea celular de epitelio normal).

Expresión relativa del mRNA de *SFRP1* en líneas celulares de próstata

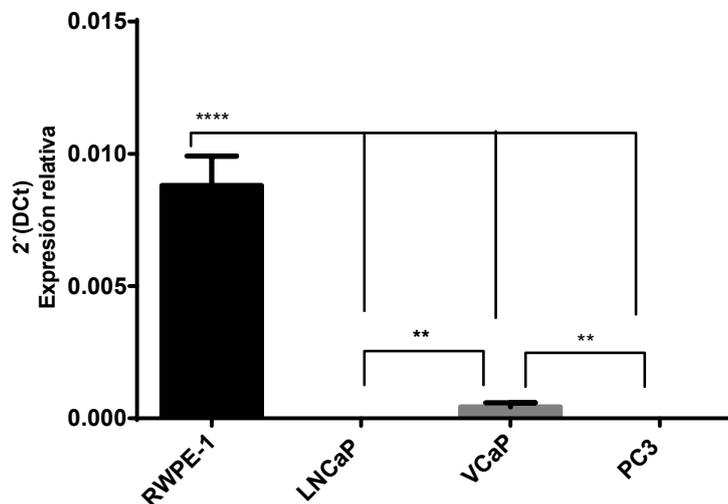


Figura 20: qRT-PCR de *SFRP1* en líneas celulares de próstata. Se puede apreciar que existe una pérdida significativa de la expresión de *SFRP1* en células correspondientes a CaP en comparación con la célula epitelial sana RWPE-1. Obteniéndose un valor de $p < 0.0001$ (****). Lo que sugiere que durante el desarrollo y progresión de la enfermedad *SFRP1* se ve abatido. Por otro lado, al comparar las líneas celulares de CaP

La cromatina obtenida del entrecruzamiento se fragmentó empleando un sonicador con una amplitud de sonicación de 30 con la finalidad de obtener fragmentos de ADN comprendidos entre 500 a 1000

pb. Posteriormente se purificó el ADN usando el kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN (cat. 51306). Para verificar que los fragmentos fueran del tamaño requerido se corrió un gel de agarosa al 1.5% Figura 21.

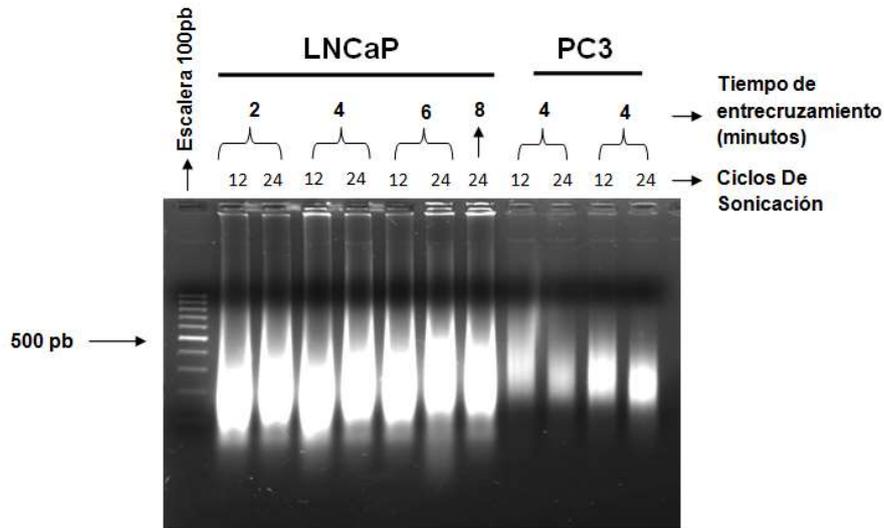


Figura 21: Verificación de la fragmentación de cromatina. Gel de agarosa 1.5% donde se muestran diferentes ciclos de sonicación con diferentes tiempos de entrecruzamiento con formaldehído en las líneas celulares LNCaP y PC3

La Figura 22, corresponde a los controles de la inmunoprecipitación donde se muestra el enriquecimiento positivo y negativo inherente a cada una de las marcas de histona evaluadas, demostrando que la técnica de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) funciona de manera eficiente. La significancia está en función de la comparación de los controles positivo contra negativo para cada caso, según la marca de histona evaluada.

Determinación de la presencia de las marcas de histona en los controles empleados para la técnica de ChIP

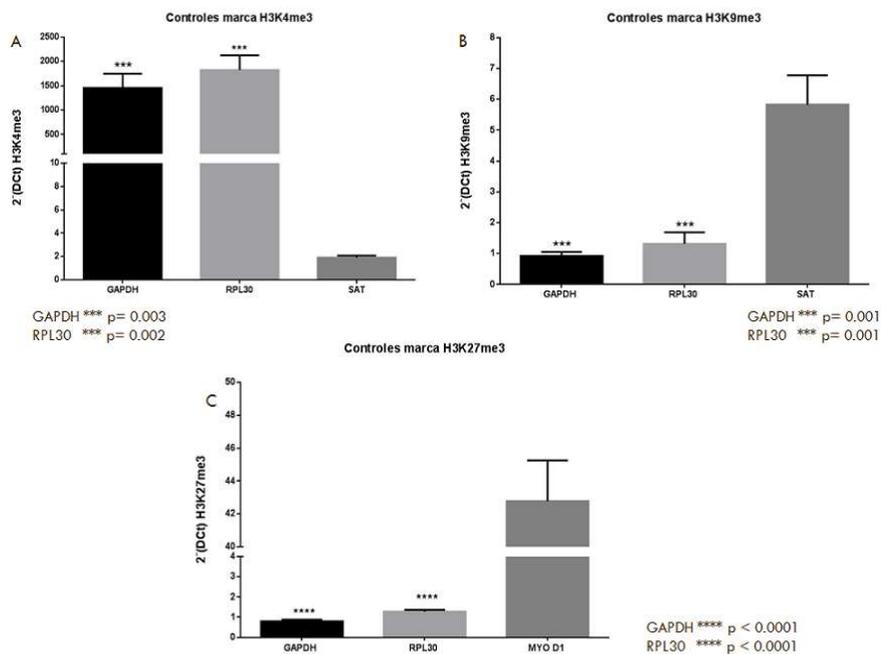


Figura 22: Representación gráfica de los valores de enriquecimiento obtenidos para los controles de las marcas de histona estudiadas. A) Gráfica para los controles de **H3K4me3** en donde **GAPDH** (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) y **RPL30** (Proteína ribosomal L30) funcionan como controles positivos y **SAT** (Satélite) como negativo. **B)** Gráfica para los controles de **H3K9me3** los cuales actúan de forma inversa, **GAPDH** y **RPL30** como negativos y **SAT** como positivo. **C)** Gráfica para los controles de la marca **H3K27me3**, **GAPDH** y **SAT** son controles negativos y **MYOD1** (Proteína de diferenciación miogénica 1) positivo.

En el panel A, se muestran los controles positivos (GAPDH y RPL30) y negativo (SAT) para la marca de histona H3K4me3. Al comparar el enriquecimiento de la marca de histona de los controles positivos contra el negativo se obtiene una significancia de (***) $p=0.003$ para GAPDH y de (***) $p=0.002$ para RPL30, evidenciando la funcionalidad de los controles para emplear la técnica de ChIP. En el panel B, se muestran el control positivo (SAT) y negativos (GAPDH y RPL30) de la marca de histona H3K9me3. La comparación de ambos controles negativos contra el positivo indican una significancia de (***) $p=0.001$. Finalmente en el panel C, tenemos al control positivo (MYOD1) y negativos GAPDH y RPL30 de la marca de histona H3K27me3. Al efectuar la comparación de ambos controles negativos contra el positivo se obtiene una significancia de (****) $p<0.0001$

2. Enriquecimiento de las marcas de histona H3K4me3, H3K27me3 y H3K9me3 en la región de *SFRP 1*

En la Figura 23 se representa el enriquecimiento de las marcas de histona H3K4me3, H3K9me3 y H3K27me3 en la región 1 para las líneas celulares de próstata RWPE-1, LNCaP, VCaP y PC3. La comparación entre grupos se realizó enfrentando los datos de la línea RWPE-1 contra aquellas que corresponden a CaP.

Enriquecimiento de Marcas de Histona en Líneas Celulares de Próstata en la Región 1 (1,152 pb antes del sitio de inicio de transcripción)

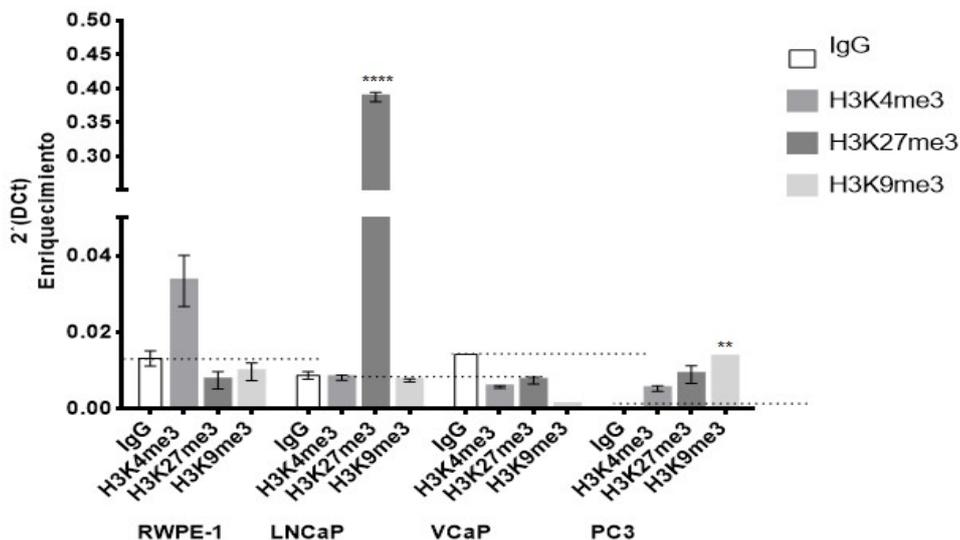


Figura 23. Representación gráfica de los valores del enriquecimiento de las marcas histona en líneas celulares de CaP en la región 1. La comparación se realizó tomando como control la línea RWPE-1 ya que pertenece a tejido epitelial sano contra el resto de las líneas celulares de CaP. Obteniendo en el caso de la marca H3K27me3 para LNCaP una significancia con valor de (****) $p < 0.0001$ y para el caso de PC3 en la marca H3K9me3 (**) $p < 0.0045$.

La marca de histona H3K4me3, (activación transcripcional) se encuentra mayormente enriquecida en la línea celular de próstata normal RWPE-1 respecto a los tipos celulares de CaP de metástasis a nódulo linfático (LNCaP), de metástasis vertebral (VCaP) y de metástasis a hueso (PC3). De las cuatro regiones evaluadas, las correspondientes al primero y segundo set de oligos, los cuales se encuentran ubicados 1152 y 885 pares de bases antes del sitio de inicio de transcripción respectivamente, demostraron ser los que tenían un incremento en la presencia de la marca.

En la secuencia correspondiente a la región 1, RWPE-1 cuenta con un enriquecimiento 6.1 veces mayor que LNCaP, mientras que en la región 2 este se ve incrementado 8.7 veces. Por otra parte, la señal detectada del enriquecimiento de esta histona para la línea PC3 no supera a la que corresponde al IgG. (Figura 24).

Enriquecimiento de Marcas de Histona en Líneas Celulares de Próstata en la Región 2 (885 pb antes del sitio de inicio de transcripción)

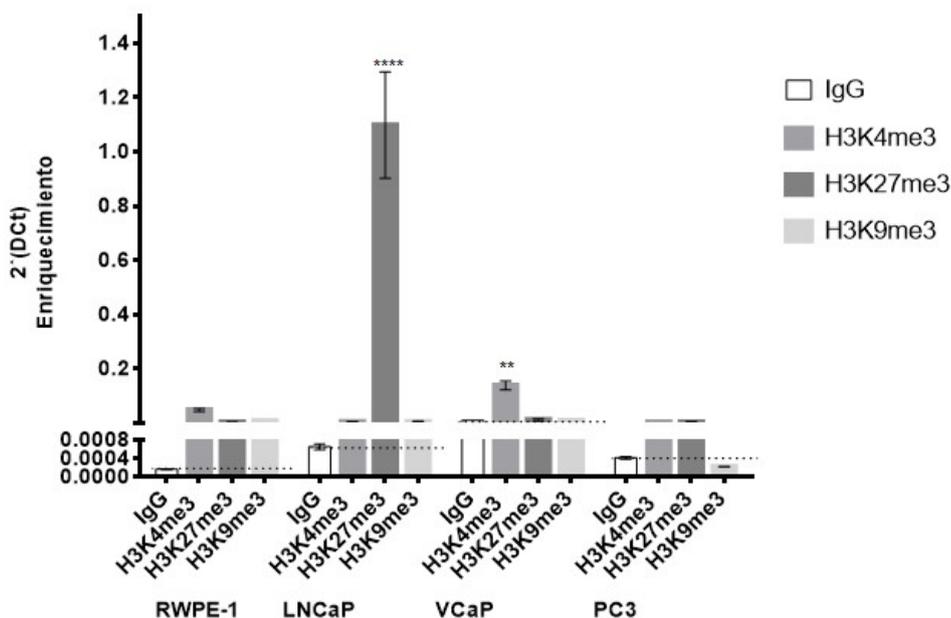


Figura 24: Representación gráfica de los valores del enriquecimiento de las marcas histona en líneas celulares de CaP en la región 2. La comparación se realizó tomando como control la línea RWPE-1 ya que pertenece a tejido epitelial sano contra el resto de las líneas celulares de CaP. Obteniendo en el caso de la marca H3K27me3 para LNCaP una significancia con valor de (****) $p < 0.0001$ y para el caso de VCaP en la marca H3K4me3 (**) $p < 0.0094$.

DISCUSIÓN

Al analizar la expresión relativa del RNA mensajero de la proteína SFRP1 en las líneas de próstata con las que se trabajó, se observa que éste se encuentra abatido en aquellas células que presentan un fenotipo maligno. Por otro lado, los resultados obtenidos de la técnica de ChIP demostraron que las células de epitelio normal (RWPE-1) presentan un mayor enriquecimiento de la marca de histona permisiva H3K4me3 en la región que codifica para la proteína SFRP1, y que la misma confiere protección contra la metilación de islas CpG. (Balasubramanian D. 2012). Aún más, se ha descrito que diversos tipos de cáncer (mama, colon y pulmón) presentan una pérdida considerable de ésta marca de histona, así como hipermetilación de la región promotora de *SFRP1* (Veeck J. 2006). Mientras que la línea celular LNCaP cuenta con un enriquecimiento notable de la marca represiva H3K27me3, a la cual puede atribuirse la disminución en el nivel de RNAm de *SFRP1*, tomando en cuenta que esta región del genoma se encuentra hipometilada en esta línea celular. Tal aumento en la marca de represión (H3K27me3) puede jugar un papel muy importante en el desarrollo de CPRC, de acuerdo con el trabajo desarrollado por Sooryanarayana y colaboradores en 2007. En el cual establecen la sobre expresión de la metiltransferasa EZH2 en CaP, así como un panel de genes reprimidos transcripcionalmente por dicha enzima, además de la recuperación de la expresión génica al abatir por medio de un siRNA la expresión del complejo represor EZH2.

La línea celular PC3, que presenta un alto porcentaje de metilación en la región promotora de *SFRP1* cuenta con un enriquecimiento considerable de las marcas represivas H3K27me3 y H3K9me3 respecto a H3K4me3 en la región 1 (1,152 pb antes del sitio de inicio de la transcripción). A esto se le suma la capacidad de esta marca represiva de interactuar con la maquinaria de metilación del ADN y promover la metilación de islas CpG. (Rose N. 2014) (Viré E. 2006).

Para la región 2 (885 pb antes del sitio de inicio de la transcripción), LNCaP cuenta con un enriquecimiento 619.3 veces mayor de la marca H3K27me3 que las células pertenecientes a un epitelio sano. En cuanto al tipo celular de metástasis a hueso (PC3), la abundancia de la marca H3K27me3 es 1.1 veces mayor que en RWPE-1 para la región 1. Mientras que para la región 2 incrementa 2.8 veces más respecto a RWPE-1, lo que no resulta significativo.

Es posible que la presencia de la marca H3K4me3 en la línea celular VCaP en la región 2 logre establecer un mínimo de expresión del mRNA de *SFRP1*, el cual es posible observar en la Figura 20. Aún así tal nivel de expresión no es comparable con el que presenta el tipo celular RWPE-1 que cuenta con un gran nivel de expresión de este mensajero.

La marca H3K27me₃, que juega un papel importante en la represión transcripcional de genes, y que es producida de manera específica por la metiltransferasa EZH2 del PRC2, se encuentra presente de manera más abundante en la línea celular LNCaP en relación con los tipos celulares RWPE-1, VCaP y PC3.

En lo que respecta a la marca H3K9me₃, que se encuentra enriquecida particularmente en la región 1 (1,152 pb antes del sitio de inicio de transcripción) de la línea celular PC3, es posible que su presencia esté involucrada en la disminución de la plasticidad epigenética, asegurando de esta manera el estado de represión transcripcional.

Takeshima H. et. al. (2009); exponen que la presencia de la Pol II (activa o no) y de marcas de histona represivas, pueden predecir una posible alteración en el epigenoma de promotores independientemente del nivel transcripcional del gen.

Otro estudio, realizado por el mismo grupo (Takeshima H. et. al. 2014) reveló que la metilación del ADN en la célula epitelial sana es baja, y que existe mayor presencia de genes regulados únicamente por la histona H3K27me₃ en la línea celular RWPE-1 en comparación con PC3. A su vez, ésta exhibe una mayor proporción de secuencias génicas metiladas, además de incrementar la cantidad de genes que cuentan con ambas modificaciones (metilación del ADN y marca H3K27me₃), dichos genes pueden actuar como supresores de tumores, entre los que se encuentran IGFBP7 y SFRP. Esto posiblemente puede estar relacionado con la plasticidad epigenética, tomando en cuenta que las modificaciones postraduccionales de histonas son más plásticas que la metilación del ADN, dando paso al concepto de heterocromatina constitutiva y facultativa.

Un estudio realizado en 2008 por Gal-Yam et. al. demostró que, en células pluripotentes, hay genes involucrados en el desarrollo temprano que son regulados por el complejo Polycomb y se encuentran hipermetilados en cáncer. Generalmente ambos fenómenos son mutuamente excluyentes, por lo que la coexistencia de los dos mecanismos epigenéticos es el resultado de la desregulación de éstos durante la progresión de la enfermedad para asegurar el fenotipo maligno.

Un aspecto desde el punto de vista clínico que vale la pena resaltar estudiado por Takeshima H. et. al en 2014 es que, al aplicar un tratamiento con un agente desmetilante aunado a la inhibición de la metiltransferasa EZH2 presenta un efecto aditivo en la disminución de la proliferación celular *in vitro*, así como reducción en el tamaño de tumores implantados en ratones. Esto implica que, empleando un tratamiento combinado sea posible tratar neoplasias con clones de células transformadas que cuenten con ambos tipos de alteración epigenética.

La implementación y alcances de los nuevos programas de salud, tanto informativos como paliativos, dan lugar a un incremento en la esperanza de vida de los pacientes. Dado que el CaP es un padecimiento comúnmente detectado en hombres de edad avanzada, el interés en encontrar patrones epigenéticos que permitan diferenciarlo de otras patologías prostáticas o los diferentes estadios del cáncer resulta cada vez de mayor interés. Con la finalidad de realizar un diagnóstico acertado y extender el tratamiento a aquellos pacientes cuyo diagnóstico lo amerite.

En los últimos años el estudio de los diversos mecanismos de regulación epigenética han sido ampliamente estudiados, dando lugar al planteamiento de nuevas preguntas y el cómo resolverlas. Ya que muchos de ellos resultan extremadamente complejos debido a la cantidad de factores que intervienen en los múltiples procesos, dificultando así la elucidación de tales mecanismos y su posible aplicación al área clínica

Hay mutaciones que juegan un papel importante para el desarrollo de la enfermedad, principalmente en la secuencia que codifica al RA. Sin embargo, las modificaciones epigenéticas intervienen como otra forma de regulación génica para procesos tales como el desarrollo, proliferación y muerte entre otros. Los mecanismos epigenéticos se ven desregulados en etapas tempranas de diversos tipos de cáncer, entre ellos el CaP lo que favorece un fenotipo maligno.

Las múltiples clonas celulares cancerígenas, encontradas en los diversos blancos metastásicos descritos en CaP, cuentan con características génicas diferentes y que les otorgan capacidades que les permiten incrementar su nivel de agresividad, evadiendo los mecanismos de muerte y aumentando su capacidad invasiva y de proliferación

CONCLUSIONES

El nivel de expresión del RNAm de *SFRP1* en las diferentes líneas de próstata se ve abatido a medida que se da el desarrollo de la enfermedad ya que hay un notable decremento en dicho mensajero, lo que sugiere que *SFRP1* se comporta como un gen supresor. Mismo que se observa en casos de cáncer de mama, colon y pulmón.

LNCaP exhibe un estado hipometilado en la secuencia que codifica para *SFRP1*, así como abatimiento en la expresión de la proteína SFRP1. A su vez, la marca de histona H3K27me3 se encuentra enriquecida en las dos regiones estudiadas. Dicha marca de histona se asocia a un estado de represión transcripcional, por lo que podemos atribuir el abatimiento del RNAm de SFRP1 a la presencia de esta modificación de histona. Por otro lado, VCaP fue la única célula de CaP que mostró tener una ligera expresión del RNAm de *SFRP1*, esto puede deberse a un enriquecimiento de H3K4me3 en la región 2 (885 pb antes del sitio de inicio de transcripción).

PC3 muestra un enriquecimiento significativo de la marca H3K9me3 en la región 1 (1,152 pb antes del sitio de inicio de transcripción), lo que puede estar contribuyendo a la represión transcripcional de *SFRP1*, disminuyendo la plasticidad epigenética.

La determinación del enriquecimiento de las diferentes marcas de histonas nos ayuda a conocer los posibles mecanismos por los cuales la enfermedad se desarrolla a estadios avanzados. Así como un posible factor de pronóstico para establecer la posible situación en la que se encuentra cada paciente y la forma de abordar cada condición de manera adecuada y oportuna.

ANEXO A: Descripción de técnicas y estandarización de ChIP

El diseño de oligonucleótidos para el gen *SFRP1* se logró haciendo uso de la herramienta Primer Blast del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Previa localización de la secuencia de interés por medio de Genome Browser (Universidad de Santa Cruz - California).

Tabla 5: Secuencias de pares de oligos empleadas

No. de juego	Oligonucleótidos SFRP1	
	Forward	Reverse
1	TCGAGGTAGAAGGTGGCAGA	GTCCATCACTCAGGCACACA
2	TCACAGCAAACAGCTCCAAC	GCTCCTCTCCTCGGTTCTCT
3	GGTGA AACCCCGTCTCTA	CAGTTTCGCTCTTGTTGC
4	CTTCTCTGCAAGCCAATGCG	CGAGCGGGTTCGGTTTACT

Se realizaron reacciones de PCR de punto final con el objetivo de establecer la capacidad de los primers para hibridar en la secuencia molde de ADN y producir el amplicón deseado. Las muestras de ADN se obtuvieron usando el kit de extracción de ADN QiAmp DNA Mini KIT de QIAGEN y la cuantificación de ácidos nucleicos, ADN en este caso en un equipo Nano Drop 3000 de Thermo Scientific. En cuanto a los reactivos para la reacción se usó el kit AmpliTaq Gold de Roche (Tabla6) y el protocolo de termociclado descrito en la Tabla 7

Tabla 6: Mezcla de reacción usada para realizar PCR de punto final

	1x (µL)		1x (µL)
10x Buffer PCR	2.5	Forward Primer	1
25mM MgCl ₂	1.5	Reverse Primer	1
10mM de dATP	0.5	GoldTaq	0.5
10mM de dCTP	0.5	Muestra (≈500ng/µL)	1.5
10mM de dGTP	0.5	H ₂ O	15
10mM de dTTP	0.5	Total	25

Tabla 7: Configuración de los ciclos de reacción para PCR de punto final.

Desnaturalización de ADN	Hibridación de primers	Elongación
95°C (10 min)	Tm's: 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C. (30 seg)	72°C (5 min)

Posteriormente, el producto de la reacción fue analizado al cargarlo en un gel de agarosa al 1.5%. Obteniendo los siguientes resultados.

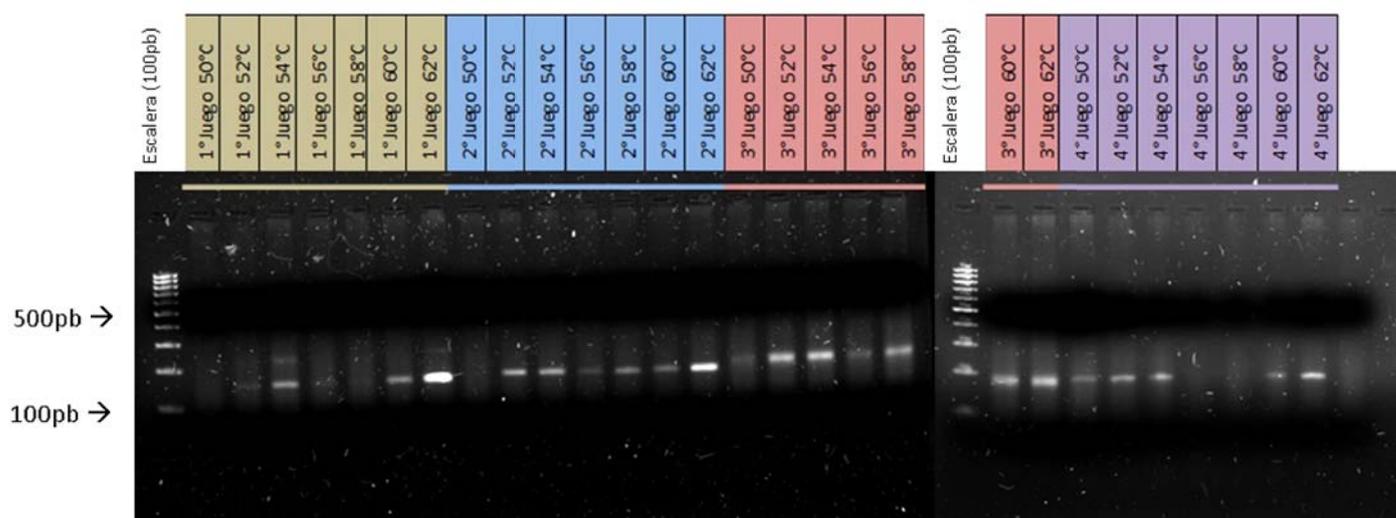


Figura 25: Gel de agarosa donde se muestra el producto amplificado de cada set de oligos probando distintas temperaturas de fusión.

Los juegos de oligonucleótidos 1, 2 y 4 tienen un comportamiento similar al presentar mayor cantidad de producto amplificado a una temperatura de 62°C, mientras que el tercer juego lo hace a una temperatura de 52-54°C

La cantidad de células que se empelaron para cada experimento de inmunoprecipitación se determinó por medio de revisión literaria y otros protocolos de ChIP publicados. Así como tiempos de incubación para el entrecruzamiento con formaldehído, sonicación (dependiente de línea celular) incubación con anticuerpo y lavados para recuperación de cromatina. (eBioscience, 2010) (CellSinaling, 2013).

Posteriormente se realizó un experimento con la mezcla de reacción de la Tabla 8 implementando un ensayo de curva de fusión, para establecer la especificidad de los oligos y por tanto la amplificación de un solo producto de reacción (Figura 26).

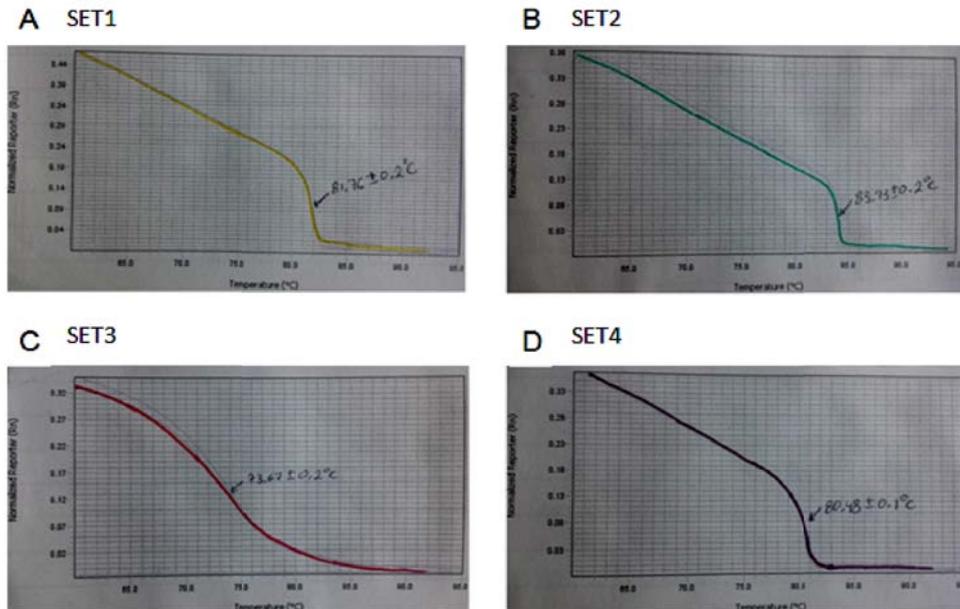


Figura 26: Curvas de fusión o melt curves del producto amplificado. El punto de fusión indica el momento en el cual el 50% del producto se encuentra como ADN de cadena doble o ADN de cadena sencilla. Al observar un solo punto de inflexión se puede decir que se está sintetizando un amplicón específico por cada juego de oligos.

Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)

La inmunoprecipitación de la cromatina es una técnica que se emplea para identificar secuencias de ADN que interactúan in vivo con proteínas de interés (factores de transcripción, histonas, etc...). Involucra el entrelazamiento del ADN con las proteínas usando formaldehído [37%] (8-10 minutos), se adiciona glicina 2.5 M para detener el efecto del formaldehído (5 minutos). Después se corta el ADN en pequeños fragmentos empleando un sonicador (30% amplitud por 12 ciclos de 20s hielo/20s sonicado) siempre en hielo, Se incuba el complejo ADN/proteína con anticuerpos dirigidos a la proteína de interés. Se recupera el complejo usando perlas de proteína G (agarosa). Empleando buffers se lavan las perlas y se recupera la cromatina, se lleva a cabo el desenlace del complejo ADN/proteína, un tratamiento con proteinasa K degrada los elementos proteínicos dejando libre el ADN, el cual se purifica para su uso posterior en un ensayo de PCR en tiempo real. (Figura 27).

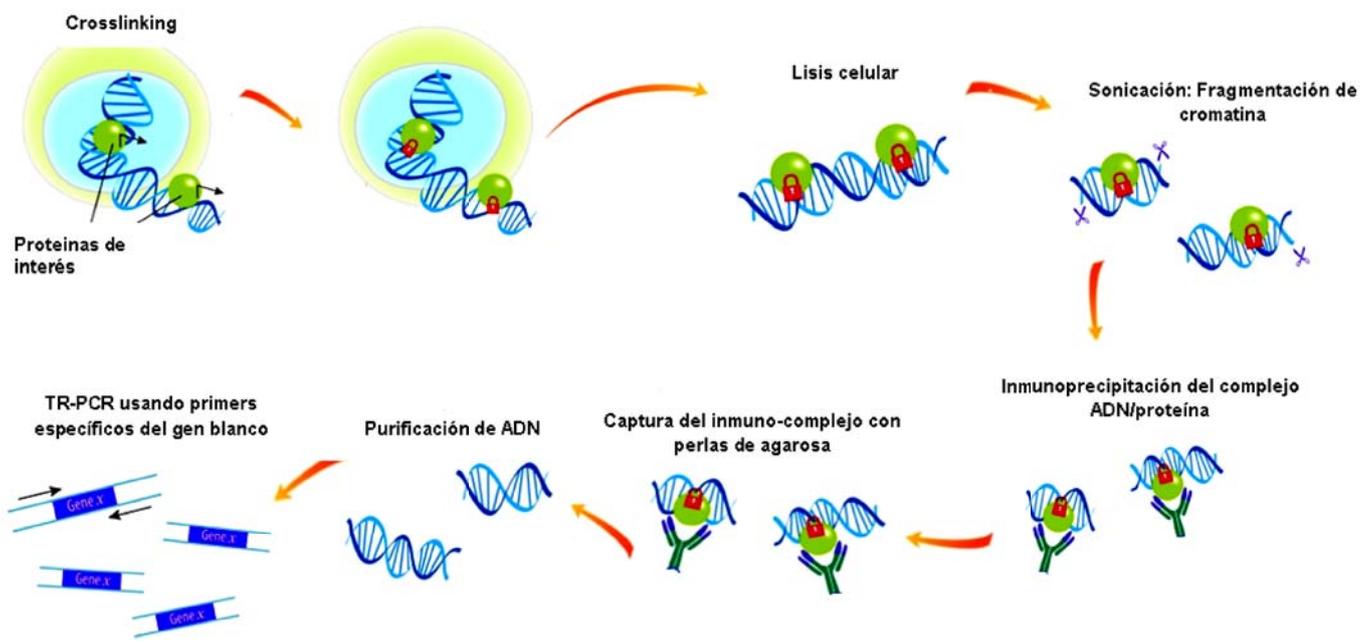


Figura 27: Esquema de pasos críticos a tomar en cuenta durante la técnica de ChIP.

PCR EN TIEMPO REAL (q-PCR):

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una variante de la técnica de PCR que se emplea para amplificar y cuantificar de forma simultánea el producto de amplificación deseado. Al igual que en la PCR de punto final, es necesario el uso de una ADN polimerasa termoestable, dinucleótidos trifosfato (dNTP's), juegos de primers específicos de la región de interés, secuencia molde o templado y la incorporación de un fluoróforo. Éste último será el que se detecte al excitarlo con una longitud de onda apropiada, lo que brindara la señal a detectar por el equipo. La señal fluorescente será directamente proporcional a la cantidad del amplicón formado. En este sentido se usan comúnmente agentes intercalantes como SYBR GREEN, (Figura 28a) o sondas dirigidas de forma específica al gen blanco (sondas Taqman) (Figura 28b).

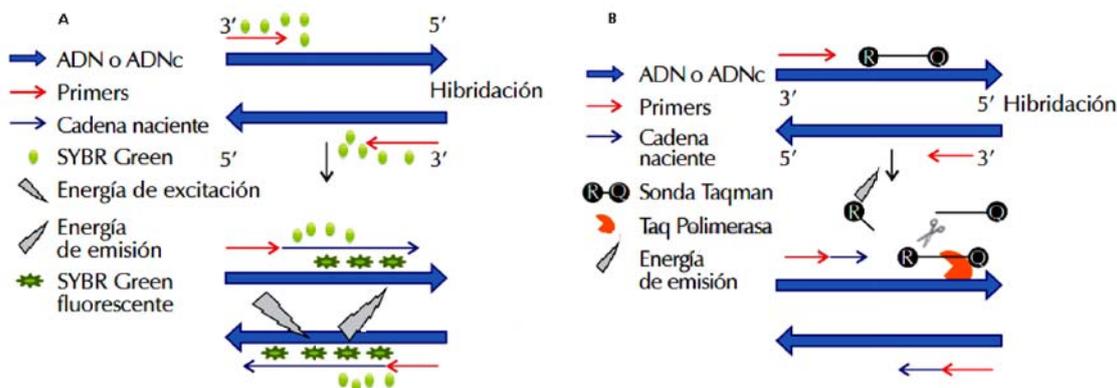


Figura 28: Métodos para detectar productos amplificados. SYBR GREEN es un agente que se une a ADN de doble cadena, cuando esto sucede se estimula al fluoróforo a una longitud de onda de 480nm y la emisión resultante a 520nm. Las sondas Taq son secuencias de oligonucleótidos que cuentan con un agente fluorescente y un quencher o “apagador”, cuando se da la hibridación con la secuencia blanco se libera el reportero y el apagador por efecto de la actividad exonucleasa (5'→3') que posee la Taq polimerasa. Al suceder lo anterior el fluoróforo emite su señal, la cual es captada por el equipo. (Tomada y editada de De Dios T; 2013).

Para la realización de este experimento se empleó el método de SYBR Green en placas de 96 pozos en un equipo ViiA 7 de Applied Biosystems usando la siguiente mezcla de reacción. (Tabla 8).

Tabla 8. Mezcla de reacción para qRT-PCR empleando SYBR Green/ROX qPCR Master Mix.

	1 x (μL)
Master Mix	5.0
Forward primer (1μM)	1.0
Reverse primer (1μM)	1.0
Muestra	3.8
Total	10.8

La programación de las etapas de termociclado se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en el protocolo del kit SYBR Green con el que se trabajó. (Tabla 9)

Tabla 9: Protocolo de termociclado que se programó para la amplificación de secuencias de interés

Paso	Temperatura °C	Tiempo	No. de ciclos
Pre-tratamiento UDG	50	2 min	1
Desnaturalización primaria	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 s	40
Hibridación	60	30 s	
Elongación	72	30 s	

La reacción se llevó a cabo probando distintas temperaturas de fusión (T_m) para establecer aquella en la cual la reacción fuese más eficiente, con un máximo de 40 ciclos.

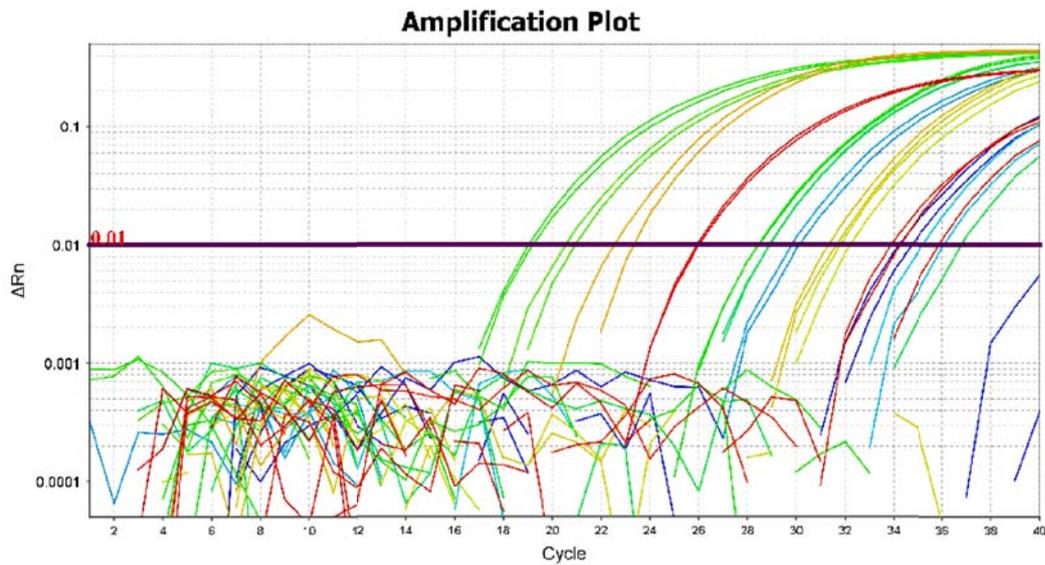


Figura 29. Representación gráfica de la señal luminiscente detectada dada la amplificación del producto.

En la Tabla 10 se presentan los diferentes controles, tanto positivos como negativos que se emplearon para cada marca de histona según sea el caso.

Tabla 10: Controles evaluados para cada marca de histona en la técnica de CHIP

H3K4me3	GAPDH (+)	RPL30 (+)	SAT (-)
H3K9me3	GAPDH (-)	RPL30(-)	SAT(+)
H3K27me3	GAPDH (-)	RPL30 (-)	MYO D1(+)

BIBLIOGRAFÍA

1. Alcaraz A. (2011) "**Cáncer de próstata resistente a la castración**" *Actas Urológicas Españolas*, Vol. 36(6) pp: 367-374.
2. American Society of Clinical Oncology, (2014), "**Prostate cancer: Treatment options**" [En línea] disponible en: <http://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-pr%C3%B3stata/opciones-de-tratamiento> [Accesado el 23 de septiembre de 2015].
3. Bannister A.J; et. al. (2011) "**Regulation of chromatin by histone modifications**" *Cell Research*, Vol. 21; pp. 381-395.
4. Balasubramanian D. (2012), "**H3K4me3 inversely correlates with DNA methylation at a large class of non-CpG-island-containing start sites**". *Genome Med.* Vol. 4(5), pp 47.
5. Barski, A. (2007). "**High resolution profiling of histone methylations in human genome**", *Cell*, Vol. 129, 823-837.
6. Cell Signaling Technology, (2013), "**SimpleChIP Plus Chromatin Immunoprecipitation Protocol (Agarose Beads)**" [En línea] disponible en: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=simplechip-plus-agarose> [Accesado el 15 de junio de 2015].
7. Chéchile GE. (2011). "**Tratamiento farmacológico de los tumores urogenitales. En: Terapéutica farmacológica de los trastornos neoplásicos e inmunológicos**". Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid. pp. 265-294).
8. Center, M.M., et. al; (2012). "**International variation in prostate cancer incidence and mortality rates.**" *Eur Urol* Vol. 61, 1079-1092.
9. Chiam, K. Ricciardelli, C. y Bianco-Miotto, T. (2014) "**Epigenetic biomarkers in Prostate cancer**" *Cancer Letters* Vol. 342, pp. 248–256.
10. Chuang YC., Po-Hui Chiang, Chao-Cheng Huang, Naoki Yoshimura, Michael B. Chancellor., (2005)., "**Botulinum toxin type A improves benign prostatic hyperplasia symptoms in patients with small prostate**", *Urology*. Vol. 66 (4), pp. 775-779.
11. D' Amico AV, Crook JM, Beard CJ, DeWeese TL, Hurwitz M, Kaplan ID. **Radiation therapy for prostate cancer.** en Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, et al., eds. *Campbell-Walsh Urology*. 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011.
12. De Dios T; **Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real**; *Investigación en discapacidad*; 2013, Vol. 2(2), pp. 70-78.
13. Di Croce, y L. Helin (2013) "**Transcriptional regulation by Polycomb group proteins**", *Nature structural & molecular biology* Vol. 20. pp. 1147-1155.
14. eBioscience., (2010)., "**Immunoprecipitation protocol**" [En línea] disponible en: <https://www.ebioscience.com/media/pdf/best-protocols/immunoprecipitation.pdf> [Accesado el 15 de junio de 2015]
15. Esteller M; (2011), "**Epigenetic changes in cancer**" *F1000 Biology reports*. Vol. 3(9), doi:10.3410/B3-9

16. European Society of Medical Oncology., (2015)., **“Patient guide series”** [En línea] disponible en: <http://www.esmo.org/content/download/6628/115197/file/Cancer-de-prostata-Guia-para-Pacientes-ACF-ESMO.pdf> [Accesado el 30 de Mayo de 2015].
17. Feldman, B. y Feldman, D. (2001) **“The development of androgen-independent prostate cancer”** Nat rev cancer, Oct;1(1) pp 34-45.
18. Ferrari, K.J (2014), **“Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity”**. Mol. Cell Vol. 53, 2014. 49-62.
19. Flanagan, J.F.,(2005) **“Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail”**. Nature Vol. 438, 2005, 1181-1185.
20. Gal-Yam E. (2008) **“Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line”** PNAS. Vol. 105, pp. 12979-12984.
21. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ. **“Global Cancer Facts & Figures”**. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2007.
22. Green, S., (2012).**“Androgen action and metabolism in prostate cancer”**., Molecular and Cellular Endocrinology. Vol. 360 (0). pp 3-13.
23. Grossmann, M. et. al., (2001),**“Androgen Receptor Signaling in Androgen-Refractory Prostate Cancer”**, Journal of the National Cancer Institute, Vol. 93, 1687-1697.
24. Gu, L. (2015) **“BAZ2A (TIP5) is involved in epigenetic alterations in prostate cancer and its overexpression predicts disease recurrence”**; Nature genetics, Vol. 47(1). pp 22-33.
25. Gut P. Verdin, E. **“The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism”**, Nature, 2013, Vol. 502, pp 489-498.
26. Hanahan, D. y Weinberg R. (2011), **“Hallmarks of Cancer: The Next Generation”**, Cell Vol. 144, pp. 646-674.
27. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason MD, Matveev V, Mottet N, van der Kwast, Wiegel T, Zattoni F. (2013) **“Guidelines on prostate cancer”**. European Association of Urology [En línea] disponible en: http://www.uroweb.org/gls/pdf/09_Prostate_Cancer_LR.pdf [Accesado el 3 de Junio de 2015].
28. Humphrey, P. (2004). **“Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate”**, Modern Pathology, Vol. 17 pp. 292–306.
29. Keith, L., (2008), **“ Anatomia con orientacion clinica”** 5° ed; Ed. Panamericana; México; 2008; pp. 399.
30. Kim J. (2012) **“Recruitment and Biological Consequences of Histone Modification of H3K27me3 and H3K9me3”**, ILAR Journal, Vol. 53 (3-4) pp. 232-239.
31. Kypta, R.M., and Waxman, J. (2012). **“Wnt/beta-catenin signalling in prostate cancer. Nat Rev Urol.”** Vol. 9(8) pp. 418-28.

32. Latarjet, M. y Liard, R., (2008), **“Anatomía humana”** 4 ed. Ed. Panamericana; Vol. 2; China; pp. 1598.
33. Life Technologies, (2015), **“ChIP analysis”** [En línea] disponible en <https://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/epigenetics-noncoding-rna-research/chromatin-remodeling/chromatin-immunoprecipitation-chip/chip-analysis.html>[Accesado el 15 de junio de 2015].
34. McConnell, J. (1998),**“The Effect of Finasteride on the Risk of Acute Urinary Retention and the Need for Surgical Treatment among Men with Benign Prostatic Hyperplasia”**, the New England Journal of Medicine; Vol. 338(9), pp. 557-563.
35. McVary, KT, et al. (2011), **“Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia”**. J Urol; Vol. 185; pp:793-803.
36. Nishioka, K., (2002) **“Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation”**. Genes Dev. Vol. 16, 479-489.
37. Bovolenta P., (2008), **“Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease”**, J. Cell Sci. Vol. 121 pp. 737-746.
38. Portela, A. y Esteller M. (2010), **“Epigenetic modifications and human disease”**, Nature biotechnology, Vol. 8, pp. 1057-1068.
39. Prostate cancer foundation, (2015), **“Terapia hormonal en cáncer de próstata”**, [En línea] disponible en: http://www.pcf.org/site/c.leJRIROrEpH/b.8586097/k.A289/Terapia_hormonal.htm27/05/15 [Accesado el 27 de Mayo de 2015].
40. Reynolds, M. Katsury, K. Groskopf, J. Schalken, J. y Rittenhouse, H. (2007), **“Molecular markers for prostate cancer”** Cancer Lett. Vol. 249, 5-13.
41. Robinson, D.R. et. al; (2008). **“Wnt signaling and prostate cancer”**. Curr Drug Targets; Vol. 9. pp. 571-580.
42. Roehrborn, CG, (2011), **“Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH)”**. Med Clin North Am. Vol. 95 (1); pp. 87-100.
43. Rose N. (2014), **“Understanding relationship between DNA methylation and histone lysine methylation”**. Nature, Vol. 439, pp. 871-874
44. Ross, M. (2008), **“Histología”**, 5° ed., Ed. Panamericana., China, pp. 810-811.
45. Sabina, S. y Massimo, L. (2006) **“Defining Cell Lineages in the Prostate Epithelium”**, Cell Cycle, Vol. 5:2, pp. 138-141.
46. Schmittgen, T. y Livak K., (2008), **“Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method”** Nature Protocols, Vol. 3(6). pp. 1101-1108.
47. Sooryanarayana V. et al; (2007) **“The Polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer”** Nature, Vol. 419, pp. 624-629.

48. Surana R. (2014), **“Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers”**, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1845, pp. 53–65.
49. Suzuki, H. et al. (2008). **“Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer.”** *Br J Cancer* Vol. 98, 1147-1156.
50. Takagi, H. et al. (2008). **“Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma.”** *J Gastroenterology* Vol. 43, pp. 378-389.
51. Takeshima H. et. al., (2014), **“Identification of coexistence of DNA methylation and H3K27me3 specifically in cancer cells as a promising target of cancer therapy”**, *Carcinogenesis*; Vol. 36(2). pp.192-201.
52. Takeshima H. et. al., (2009) **“The presence of RNA Polymerase II, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoters CpG islands”** *Genome Res.* Vol. 19(11) pp.1974-1982.
53. Unglaub, D., (2009), **“Fisiología humana”**, 4° ed., Ed. Panamericana., Argentina. pp. 219.
49. Urakami, S., et al. (2006). **“Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection.”** *Clin Cancer Res* Vol. 12, pp. 2109-2116.
50. Veeck, J., et. al; (2006). **“Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavorable prognosis ”**. *Oncogene*,r Vol. 25, pp. 3479-3488.
51. Veeck, J., et. al; (2008). **“Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer”**. *Mol Cancer* Vol. 7, pp. 83.
52. Vilar, E. (2015). **“Boletín oncológico”** [En línea]. España, disponible en: <http://www.boloncol.com/boletin-7/ecografia-transrectal-de-la-prostata.html> [Accesado el 25 de Mayo de 2015].
53. Viré E. (2006), **“The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation”**. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1839, pp 1362-1372.
54. Wein. et. al., (2008), **“Urología”**, 9° ed. Ed. Panamericana, Vol. 3, Argentina, pp. 2661- 2680.
55. Y. Kawano (2009). **“Secreted Frizzled related protein 1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer”**. *British Journal of Cancer*, Vol. 100; pp. 1165-1174.
56. You, J., Cozzi, P., Walsh, B., Willcox, M., Kearsley, J., Russell, P., y Li, Y. (2010) **“Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression”**. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* Vol. 73, pp. 10-22.
57. Zhao JC. et. al.(2012); **“Cooperation between Polycomb and androgen receptor during oncogenic transformation”**. *Genome Research*, Vol. 22; pp. 322-331.