



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

***ESTUDIO DE LOS PATRONES DE METILACIÓN DE LOS GENES DE LA
FAMILIA SFRP Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE
CÁNCER DE PRÓSTATA***

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

CONSUELO DEL PILAR GARCÍA TOBILLA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR:

DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

UNIDAD DE POSGRADO

UNAM, CIUDAD UNIVERSITARIA

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ACRÓNIMOS	9
INTRODUCCIÓN	11
FISIOLOGÍA, ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA	11
EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS Y LA PRÓSTATA	13
ANATOMÍA DE LA PRÓSTATA	14
HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA	15
CÁNCER DE PRÓSTATA	17
SINTOMATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	19
EL ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO	19
EXAMEN DIGITAL RECTAL	20
BIOPSIA PROSTÁTICA GUIADA POR ULTRASONIDO	21
GAMMAGRAFÍA ÓSEA	22
TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA	22
RESONANCIA MAGNÉTICA	23
ESTRATIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	23
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	25
CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN	28
METÁSTASIS ÓSEA	29
ALTERACIONES MOLECULARES DURANTE EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA	30
EPIGENÉTICA	30
METILACIÓN DEL ADN	31
ESTABLECIMIENTO DE LOS PATRONES DE METILACIÓN DEL ADN	32
DESMETILACIÓN DEL ADN	32
FUNCIONES DE LA METILACIÓN DEL ADN	34
MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS	36
ACETILACIÓN DE HISTONAS	36
METILACIÓN DE HISTONAS	37
H3K4ME3	37
H3K27ME3	38
H3K9ME3	39
ESTABLECIMIENTO DE LAS MARCAS DE HISTONAS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN	39

EPIGENÉTICA Y ENFERMEDAD	42
METILACIÓN DEL ADN Y CÁNCER DE PRÓSTATA	42
MODIFICACIONES DE HISTONAS Y CÁNCER DE PRÓSTATA	44
RUTA WNT	45
FAMILIA DE PROTEÍNAS SFRP	46
SFRPs Y CÁNCER DE PRÓSTATA	47
JUSTIFICACIÓN	51
HIPÓTESIS	52
OBJETIVO GENERAL	53
OBJETIVOS PARTICULARES	53
MATERIALES Y MÉTODOS	54
RESULTADOS	60
EXPRESIÓN DE LOS GENES SFRP EN LÍNEAS CELULARES DE PRÓSTATA	60
EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA SFRP EN MUESTRAS DE TEJIDO DE PRÓSTATA	60
TRATAMIENTOS CON 5-AZA-2'DEOXYCITIDINA Y TRICOSTATINA	62
ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN EN LOS GENES DE LA FAMILIA SFRP	63
ENRIQUECIMIENTO DE H3K27ME3 EN EL PROMOTOR DE SFRP1	67
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES	76
PERSPECTIVAS	77
REFERENCIAS	78
ANEXO 1	87
ANEXO 2.	88
ANEXO 3	89
ANEXO 4	90
ANEXO 5	91
ARTÍCULO	92

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a mis padres y hermano quienes me han apoyado desde el inicio de mi carrera profesional y hoy finalmente concluimos juntos este camino, así que esta tesis está principalmente dedicada a ustedes. Gracias por su confianza, por el apoyo emocional, el consejo y hasta por el soporte económico brindado a lo largo de tantos años.

Quiero agradecer a mi tutor Mauricio Rodríguez por todo el aprendizaje académico y el personal. Gracias por tu apoyo en los momentos difíciles y más gracias aún por la amistad brindada, que es lo más importante que me llevo de este proceso de 7 años.

Uno de los regalos más lindos que me dejó esta experiencia fue a mi hermana “mi manita” Susana Solórzano. Gracias por escucharme, por sostener mi mano en los momentos más difíciles, por darme por consejo y por todas esas experiencias maravillosas que vivimos juntas y que seguiremos acumulando. Gracias también por el consejo académico al lado de Iván Salido, a quien también agradezco infinitamente por su amistad y por ser partícipe de esta aventura.

Quiero agradecer también a todos mis compañeros del INMEGEN, Oscar Uribe, Giovanni Elizarrarás y a todos los miembros del grupo de Cáncer de Próstata por su apoyo en lo experimental y en particular por todos esos buenos ratos. También quiero agradecer al grupo hermano de Cáncer de mama, particularmente a Rosa Rebollar, Sandra Romero y Rocío Arellano por su amistad y por esos momentos de risa en el laboratorio. De este último grupo quiero agradecer en particular al Dr. Alfredo Hidalgo Miranda por su apoyo en muchos sentidos, su consejo y su confianza depositada en mí, así como por su invaluable amistad. Finalmente, agradezco a Berenice Palacios y Eduardo Martínez por su amistad y guía en la culminación de este proceso.

Gracias a mi familia, abuelitos, tíos y primos por las porras siempre brindadas y por tener confianza en mí, particularmente a Potty (Laura Leyra) y a Lourdes Tovilla por su constante apoyo y por haber estado al pendiente a lo largo de este proceso.

Gracias a mis amigos por su confianza invaluable, por su amistad y apoyo incondicional, Mauricio Topete, Viridiana Moreno, Emma Ruíz y Guillermo de Anda. Principalmente a mi flaquito Leonel Sánchez por ser mi mejor amigo, mejor consejero y mi ángel en todos estos años y para siempre.

Agradezco también a mi comité tutor, la Dra. Elizabeth Langley y al Dr. Marco A.Cerbón por su invaluable apoyo académico en la realización de este proyecto. También agradezco al Dr. Ignacio Camacho, la Dra. Marcela Lizano y a la Dra. Patricia García por sus muy atinados comentarios y su colaboración en este trabajo de tesis.

También quiero agradecer al posgrado en Ciencias Biomédicas, a la UNAM y al INMEGEN como instituciones que me abrieron las puertas para desarrollar este trabajo. Aprovecho para agradecer a CONACYT por la beca otorgada y a los programas PAEP y EURICA por los apoyos económicos para la asistencia a congresos y la maravillosa experiencia de estancia en Los Países Bajos. En este sentido, también agradezco a la Universidad de Groningen por abrirme las puertas y al grupo de la UMCG de la Dra. Marianne Rots por maravillosas experiencias y tanto aprendizaje académico.

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte a nivel mundial en varones por tumores malignos. El incorrecto establecimiento de modificaciones epigenéticas, tal como modificaciones postraduccionales de histonas (MPT) y metilación del ADN (meADN), altera los niveles de expresión génica en el CaP. Los genes de la familia de proteínas secretadas relacionadas con *Frizzled* (*SFRP*), son genes supresores de tumor que se encuentran aberrantemente silenciados en muchos tipos de cáncer. La familia de genes *SFRP* está compuesta por 5 miembros (*SFRP1-SFRP5*). La función más conocida de las proteínas *SFRP* es que modulan la ruta WNT, la cual se encuentra aberrantemente activada en CaP. La regulación de la expresión génica de la familia de genes *SFRP* ha sido controversial, por lo que el objetivo de este proyecto fue evaluar los niveles de expresión de los genes de la familia *SFRP* y los niveles de meADN en sus regiones promotoras en líneas celulares de próstata y en muestras frescas de tejido de próstata normal (PN), con hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer de próstata (CaP). Los resultados mostraron pérdida de la expresión de los genes *SFRP* en las líneas celulares de CaP comparadas con las células epiteliales de próstata normales. Dichas observaciones se confirmaron para los genes *SFRP1* y *SFRP5* en los tejidos de CaP. Para *SFRP4* se encontraron niveles de expresión incrementados en CaP comparados con BPH en tejidos frescos. Adicionalmente, tanto en líneas celulares como en tejidos, se encontraron niveles de metilación incrementados en CaP para los genes *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5*. Interesantemente, el gen *SFRP1* en las líneas celulares de CaP no siempre se encontró metilado y utilizando la línea celular LNCaP, en la cual se encontró represión transcripcional de *SFRP1* pero no meADN en su promotor, se encontró un enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), encontrando un nuevo mecanismo de silenciamiento para *SFRP1* en CaP independiente de la meADN. En conclusión, el gen *SFRP1* puede estar silenciado por dos mecanismos epigenéticos distintos en CaP; el primero por hipermetilación del ADN y el segundo por ganancia aberrante de H3K27me3 en la región promotora. Mientras que el gen *SFRP5* se encuentra silenciado en CaP por hipermetilación del ADN.

ABSTRACT

Worldwide, prostate cancer (PCa) is the second cause of death from malignant tumors among men. Establishment of aberrant epigenetic modifications, such as histone post-translational modifications (MPTs) and DNA methylation (DNAm) produce alterations of gene expression that are common in PCa. Genes of the *SFRP* family are tumor suppressor genes that are frequently silenced by DNA hypermethylation in many cancer types. The *SFRP* family is composed of 5 members (*SFRP1-5*) that modulate the WNT pathway, which is aberrantly activated in PCa. The expression of *SFRP* genes in PCa and their regulation by DNAm has been controversial. Our objective was to determine the gene expression pattern of the *SFRP* family in prostatic cell lines and fresh frozen tissues from normal prostates (NP), benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa), by RT-qPCR, and their DNAm status by MSP and bisulfite sequencing. In prostatic cancer cell lines, the 5 *SFRPs* showed significantly decreased expression levels compared to a control normal prostatic cell line. In agreement, *SFRP1* and *SFRP5* genes showed decreased expression levels in CaP fresh frozen tissues compared to NP ($p < 0.01$), while a similar trend was observed for *SFRP2*. Conversely, increased levels of *SFRP4* expression were found in PCa compared to BPH. Moreover, *SFRP2*, *SFRP3*, and *SFRP5* showed DNA hypermethylation in PCa cell lines. Interestingly, we observed DNA hypermethylation at the promoter of *SFRP1* in the PC3 cell line, but not in LNCaP. However, in the LNCaP cell line we found an aberrant gain of the repressive histone post-translational modification Histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3). In conclusion, decreased expression by DNA hypermethylation of *SFRP5* is a common feature of PCa, while decreased expression of *SFRP1* can be due to DNA hypermethylation, but sometimes an aberrant gain of the histone mark H3K27me3 is observed instead.

LISTA DE ACRÓNIMOS

CaP: Cáncer de próstata

MPT: Modificaciones postraduccionales de histonas

meADN: Metilación del ADN

PN: Próstata normal

HPB: Hiperplasia prostática benigna

H3K27me3: Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3

RA: Receptor de andrógenos

DHT: 5-alfa-dihidrotestosterona

T: Testosterona

LH: Hormona luteinizante

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

SHGB: Globulinas de unión a hormonas sexuales

PSA: Antígeno prostático específico

TMPRSS2: Proteasa de serina transmembranal

RTUP: Resección transuretral prostática

USTR: Ultrasonido transrectal

CPRC: Cáncer de próstata resistente a la castración

DNMT: Metiltransferasa de ADN

SAM: S-adenosilmetionina

ICG: Isla CpG

5meC: 5-Metilcitosina

5hmC: 5-Hidroximetilcitosina

TET: *Ten Eleven Translocase*

BER: Reparación por escisión de bases

APOBEC: Subunidad catalítica editora de la apolipoproteína B

TDG: Glicosilasa de Timina de ADN

o/e: Observado/esperado

MBP: Proteínas de unión a grupos metilo

HDAC: Desacetilasas de histonas

HAT: Acetiltransferasas de histonas

Acetil CoA: Acetil coenzima A

SET: Su(*var*) *Enhancer de Zeste* y *Trithorax*

acH: Acetilación de histonas

H3K4me3: Trimetilación de la lisina 4 de la histona H3

SIT: Sitios de inicio de la transcripción

KMT: Metiltransferasas de lisinas

TrxG: Grupo *trithorax*

COMPASS: Complejo de proteínas asociadas a Set1

lncARN: ARN largos no codificantes

TSS: Sitio de inicio de la transcripción

PcG: Grupo polycomb

PRC: Complejo represor polycomb

H2AK119ub: Ubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A

H3K9me2/me3: Dimetilación/trimetilación de la lisina 9 de la histona H3

H3K36me3: Trimetilación de la lisina 36 de la histona H3

H3K27ac: Acetilación de la lisina 27 de la histona H3

FT: Factores de transcripción

LINE: Elementos de nucleótido largos intercalados

MSP: PCR específica para metilación

Estudio de los patrones de metilación de los genes de la familia SFRP y su posible participación en el desarrollo de cáncer de próstata

INTRODUCCIÓN

FISIOLOGÍA, ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA

La próstata es un órgano accesorio del sistema reproductor masculino. Se localiza en la región pélvica, enfrente del recto y debajo de la vejiga (Health, 2012; Fig 1). La próstata tiene la función de válvula al impedir el paso del flujo urinario durante la eyacuación; también produce el flujo prostático que conforma el 20% del semen. El flujo prostático tiene un pH ligeramente ácido (pH 6.4) y está compuesto por moléculas como espermina, espermidina, prostaglandinas, zinc, ácido cítrico, inmunoglobulinas, fosfatasas y proteasas entre otras. Cada uno de estos componentes tiene funciones distintas como la inducción de la movilidad espermática, la estimulación uterina, metabolismo de la testosterona, amortiguador del pH y licuefacción del semen (Campbell-Walsh, 2008).

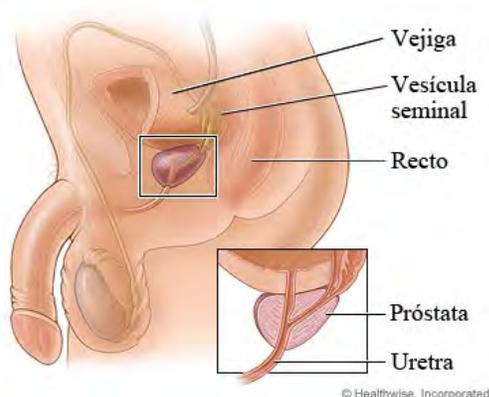


Fig 1. Localización de la próstata. La próstata se encuentra localizada debajo de la vejiga, enfrente del recto y se encuentra rodeando la uretra. Tomada de <https://espanol.kaiserpermanente.org/static/health-encyclopedia/es-us/kb/tp10/105/tp10105.shtml>

La próstata está compuesta por glándulas acinares formadas por células epiteliales principalmente, estas glándulas están rodeadas por un estroma fibromuscular. La porción epitelial prostática está conformada por dos capas

principalmente: La basal y la luminal secretora. A su vez, la parte basal está conformada por 3 subtipos celulares principales que son: Células madre, células transitorias y células basales comprometidas. La segunda capa epitelial está conformada por células epiteliales lumbales o secretoras (Packer and Maitland, 2016). La evidencia apunta a que las células madre prostáticas se encuentran en la membrana basal y que éstas dan origen a las lumbales, pasando por un estado de transición. Existen células estromales que rodean las glándulas, principalmente fibroblastos y que mantienen una comunicación constante con las células epiteliales que conforman esta porción glandular. Esta comunicación se lleva a cabo por la secreción de moléculas de un compartimiento y que pueden activar o inhibir rutas metabólicas en el otro compartimiento. El estroma juega un papel muy importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de la porción epitelial, del mismo modo las células epiteliales influyen en el estroma. Tanto el estroma como el epitelio prostático sufren alteraciones moleculares en condiciones patológicas (Shiao et al., 2016). En la Tabla 1 se muestran algunas características de los diferentes tipos de células que conforman la próstata.

Tabla 1. Tipos de células que conforman la próstata y sus características

Tipo de células	Características
Epiteliales secretoras lumbales	En cultivos celulares perecen y carecen de capacidades para iniciar el desarrollo de un órgano prostático. Dependen de andrógenos para su crecimiento. Producen antígeno prostático específico y Fosfatasa ácida prostática .
Epiteliales basales	Son independientes de andrógenos para su crecimiento. Existe evidencia que apunta a que en este compartimiento basal se encuentran las células madre prostáticas.
Células estromales	Formado principalmente por fibroblastos, músculo suave, nervios y conductos linfáticos. Producen múltiples factores de crecimiento necesarios para el desarrollo y mantenimiento de las células epiteliales.
Células madre o troncales	Se encuentran en la membrana basal, expresan CD133. No dependen ni responden a andrógenos y no expresan el receptor de andrógenos (AR). Pueden iniciar el desarrollo de un órgano prostático in vivo. Pueden formar esferas. Origen clonal para formar células basales, lumbales y neuroendócrinas.

Información de la tabla tomada de Maitland, 2013.

La próstata, así como otros órganos sexuales masculinos, requieren de la señalización de andrógenos para su desarrollo y funcionamiento. El receptor de andrógenos (AR) pertenece a la familia de receptores nucleares a hormonas esteroides. Su función principal es regular la transcripción de genes blanco específicos cuando está unido a su ligando. El ligando más potente y con mayor afinidad por el AR es la 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT), aunque otros andrógenos, como la testosterona (T) también lo pueden activar. Los andrógenos se sintetizan principalmente en los testículos por las células de Leydig, bajo la regulación de la hormona luteinizante (LH) producida por la hipófisis anterior. A su vez la liberación de LH es regulada por la Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que se produce y libera en el hipotálamo. Una vez producida la T, ésta pasa a torrente sanguíneo, donde se une a albúmina y globulinas de unión a hormonas sexuales (SHGB). Posteriormente, la T libre entra a las células prostáticas y en su interior, la T es transformada a DHT por la enzima 5-alfa-reductasa. La DHT se une al AR en el citoplasma, desplazando a las proteínas de choque térmico a las que se encontraba unido el AR. Esto produce la homodimerización del AR y su fosforilación, posteriormente el AR se une a una importina y se transloca al núcleo, en donde regula la transcripción de genes como el antígeno prostático específico (PSA) o la proteasa de serina transmembranal 2 (TMPRSS2), entre otros. La regulación transcripcional por AR se lleva a cabo cuando éste se une a secuencias consenso de ADN denominadas elementos de respuesta a andrógenos (AREs), una vez unido el AR al ADN se unen proteínas coactivadoras o correpressoras que pueden modificar la estructura de la cromatina y así permitir o inhibir la transcripción génica (Tan et al., 2015; Fig 2).

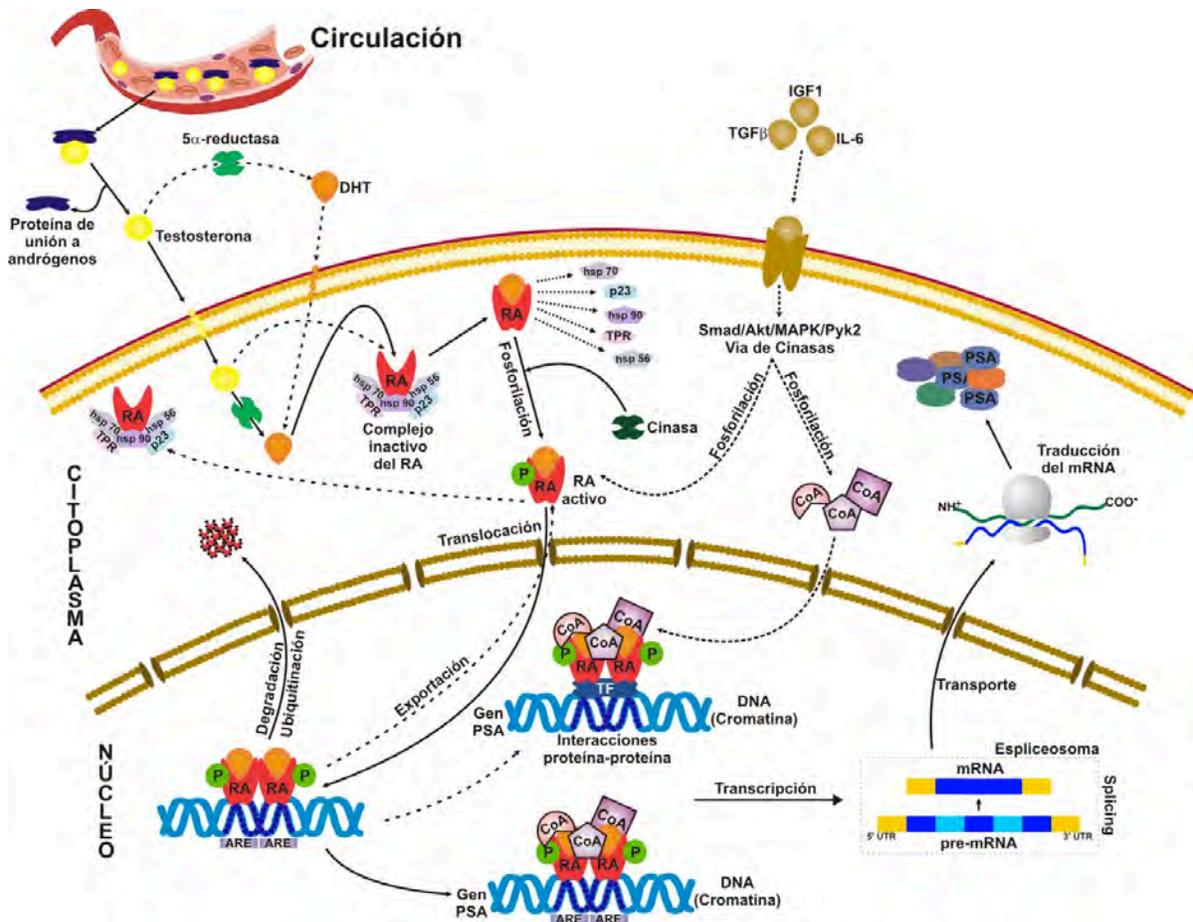


Fig 2. Señalización del receptor de andrógenos (AR). La testosterona en circulación entra a la célula de la próstata en donde es transformada a DHT. Posteriormente la DHT se une al AR en el citoplasma promoviendo la fosforilación, dimerización y translocación del AR al núcleo. En el núcleo el AR se une a secuencias ARE y modula la transcripción de sus genes blanco al reclutar coactivadores o correpresores. Tomada de <http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2011/4/Rojas-et al/Figura1.jpg>

Acronimos: Dihidrotestosterona (DHT), receptor de andrógenos (AR) y elemento de respuesta a andrógenos (ARE)

ANATOMÍA DE LA PRÓSTATA

La anatomía prostática propuesta por McNeal en 1968 continúa siendo la más aceptada en la actualidad con la adición posterior de la zona de transición. De acuerdo a las características histológicas y a la composición celular de la próstata, McNeal propuso 4 distintas zonas de la próstata: Zona Periférica (70% conformada por tejido acinar glandular), zona central (20% conformada por tejido glandular), zona de transición (75% conformada por tejido glandular) y un estroma

fibromuscular anterior. La zona periférica se extiende desde el ápice hasta la base, formando la mayor parte de la base prostática y es la región en la que se originan la mayor parte de los carcinomas. Por otro lado, la zona de transición es en donde se originan la mayor parte de los casos de hiperplasia prostática benigna (HPB) (Selman, 2011; Fig 3).

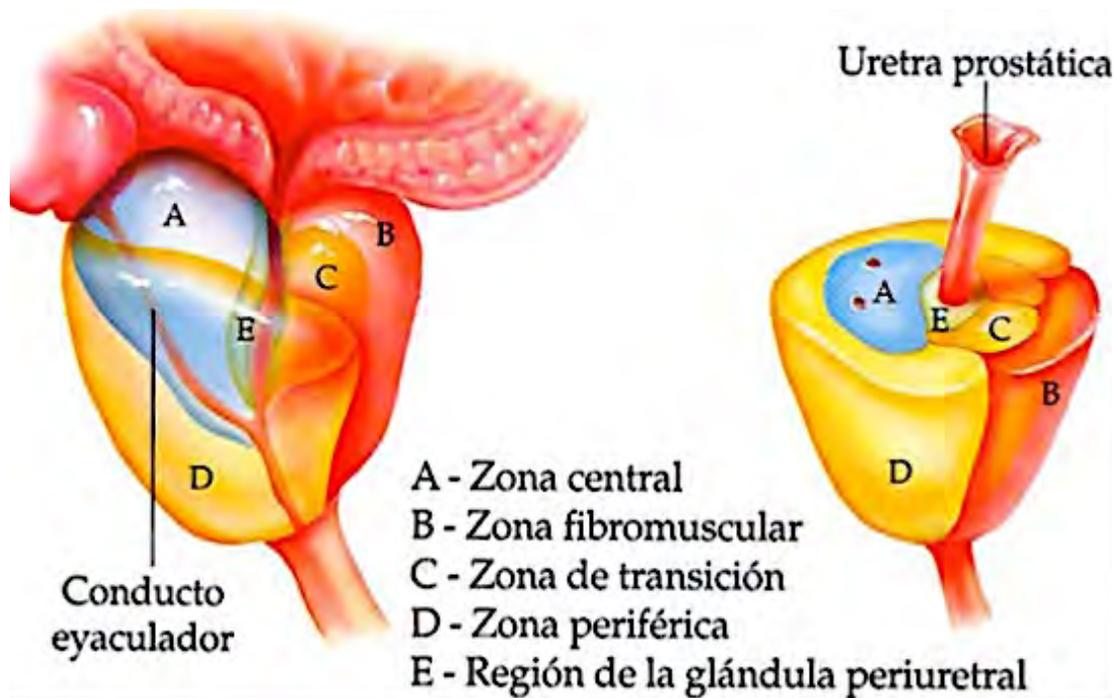


Fig 3. Anatomía de la próstata. Por sus características histológicas, la próstata para su estudio se divide en 5 zonas: Zona central, zona fibromuscular, zona de transición, zona periférica y glándula periuretral. Tomada de <http://es.slideshare.net/alycimiam/cancer-de-prostatasmr>

HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

La HPB también se conoce como hipertrofia prostática benigna y es un agrandamiento benigno de la próstata cuya prevalencia se incrementa significativamente después de los 40 años. Inclusive, estudios en autopsias indican que más del 90% de los varones mayores a 80 años presentan HPB. Como se mencionó previamente, la HPB se origina principalmente en la zona de transición, causando un agrandamiento macroscópico que constriñe la uretra,

obstruyendo el flujo de salida de la vejiga y disminuyendo el flujo urinario. Estos efectos pueden ir desde moderados hasta afectar significativamente la calidad y estilo de vida. El volumen prostático se correlaciona positivamente con la cantidad de PSA sérico y finalmente con el riesgo a padecer una sintomatología más severa. La sintomatología de la HPB está caracterizada por alteraciones como nocturia, sensación de urgencia para orinar, incremento en la frecuencia urinaria, hasta retención urinaria severa, también se presenta dificultad para iniciar la micción, el flujo urinario es menor y hay vaciamiento incompleto de la vejiga. Toda esta sintomatología también es característica de síntomas de obstrucción de vejiga. Con las estrategias terapéuticas actuales, la HPB raramente es la causa directa de muerte. Sin embargo, debido a su alta morbilidad y el impacto económico que tiene, la HPB es un problema de salud severo (Skinder *et al.*, 2016).

El tratamiento de la HPB involucra el uso de bloqueadores de receptores adrenérgicos tipo alfa, inhibidores de la enzima 5-alfa-reductasa, cirugía o una mezcla de estos tratamientos. Los bloqueadores de receptores adrenérgicos tipo alfa-1 inhiben la contracción simpática de las células de músculo suave de la glándula prostática desbloqueando la obstrucción de la vejiga, mejorando así el flujo urinario. Sin embargo, este tipo de tratamiento tiene muchos efectos secundarios y no inhibe el crecimiento prostático por lo que no previene la obstrucción urinaria aguda y finalmente se requiere de intervención quirúrgica. Los inhibidores de la 5-alfa-reductasa, bloquean la conversión de T a DHT, reduciendo el tamaño de la próstata y mejorando el flujo urinario. El estándar de oro para el tratamiento de la HPB sigue siendo la intervención quirúrgica llamada resección transuretral prostática (RTUP); con esta cirugía se remueven los nódulos formados en la zona de transición y se libera el flujo urinario. Desafortunadamente, algunos pacientes no responden a estos tratamientos, por lo que se requiere innovar en la prevención y el desarrollo de otras estrategias terapéuticas para la HPB (Nicholson and Ricke, 2011).

La HPB está caracterizada por un crecimiento hiperplásico de células epiteliales y estromales que produce la formación de nódulos microscópicos y macroscópicos en la glándula prostática. Los primeros nódulos se producen principalmente en la región periuretral y tienen un componente principalmente estromal formado por tejido fibroso y algunas células de músculo liso. Existen diferentes teorías acerca de la etiología de la HPB, entre las que se encuentran: la teoría del despertar embrionario, envejecimiento, niveles de andrógenos, niveles de estrógenos, así como teorías de óxido-reducción e inflamatorias (Skinder et al., 2016). La HPB comparte diversas características moleculares con cáncer de próstata (CaP), sin embargo a diferencia de la HPB, el CaP representa un problema de mortalidad a nivel mundial (Schenk et al., 2011).

CÁNCER DE PRÓSTATA

En el 2012 a nivel mundial, el CaP fue encontrado como el segundo tumor diagnosticado con mayor frecuencia y es la quinta causa de muerte por cáncer en varones. Existe una mayor incidencia de CaP en países desarrollados como Australia, Nueva Zelanda y países de América del norte, a diferencia de las poblaciones asiáticas en donde se reportan los niveles más bajos. En contraste con la incidencia, existe mayor mortalidad por CaP en países en vías de desarrollo. Sin embargo, la mayor mortalidad por CaP se ha encontrado en poblaciones de raza negra, mientras que las menores tasas de mortalidad se han reportado en poblaciones asiáticas (Ferlay et al., 2015; Fig 4). En México, se reporta una incidencia de CaP del 16% y una tasa de defunciones de 13 por cada 100 000 habitantes (IMSS, 2015). Entre los principales factores de riesgo para el desarrollo CaP se encuentran una dieta alta en grasas, fumar, sedentarismo, factores genéticos, exposición a radiación así como infecciones del tracto urinario. Más del 95% de los casos de CaP se originan en las células epiteliales. Sin embargo, se han descrito otras histologías raras como los carcinomas ductales prostáticos, los tumores neuroendócrinos o los de células pequeñas.

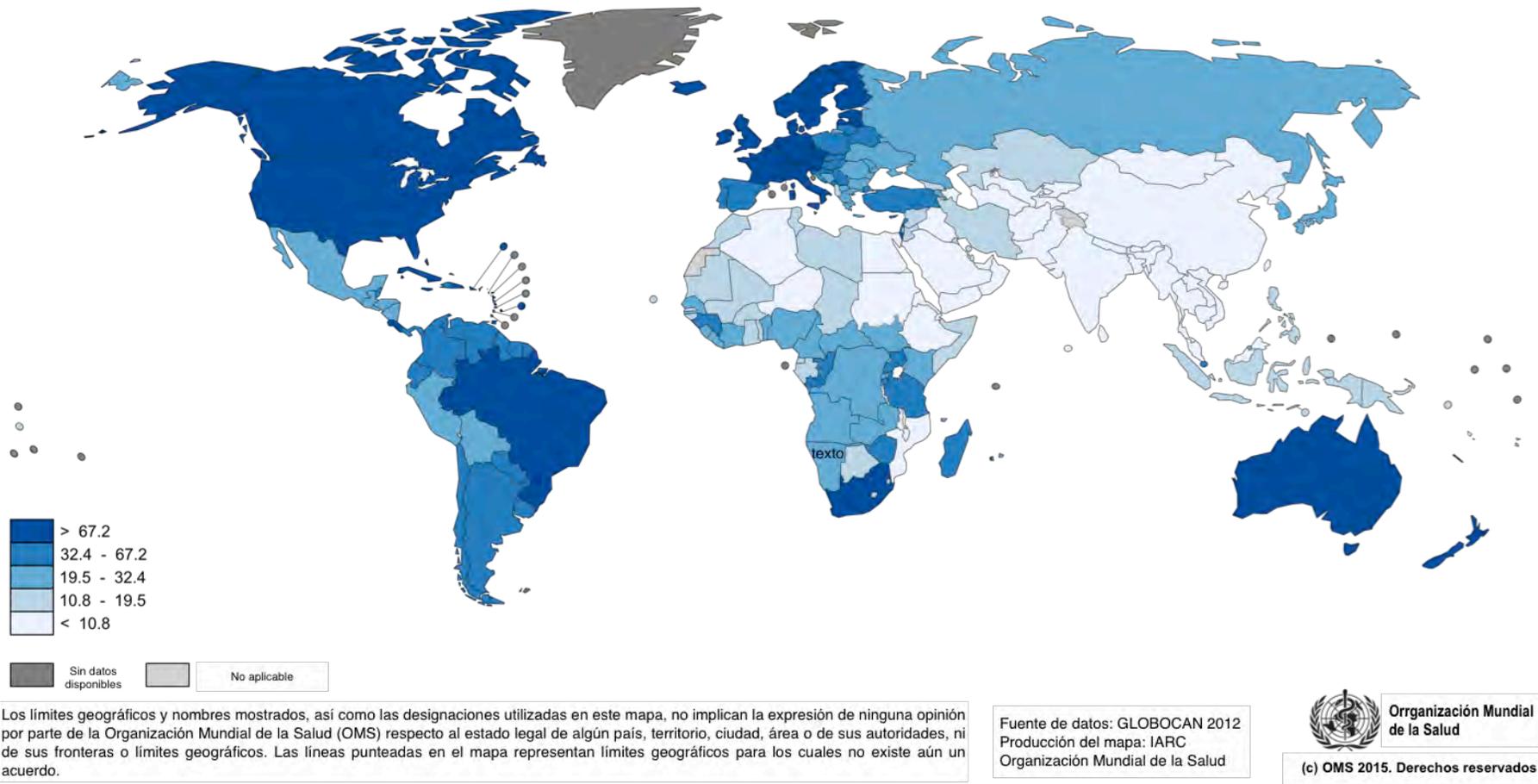


Fig 4. Incidencia de CaP a nivel mundial. Existe una mayor incidencia de CaP en países desarrollados como los países de América del Norte, Australia y algunos europeos. Imagen traducida tomada de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

SINTOMATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Por lo general el CaP en etapas iniciales no presenta ninguna sintomatología característica y en etapas avanzadas puede causar síntomas similares a los de la HPB, además se puede presentar sangre en la orina y disfunción eréctil. Finalmente si el cáncer se ha expandido a huesos también se puede presentar dolor en caderas, espalda, tórax o costillas, adormecimiento de pieARNs y/o pies y pérdida del control de vejiga e intestinos cuando el tumor se ha expandido localmente (Society, 2016b). La detección temprana de CaP puede ocurrir en personas que no tienen ninguna sintomatología y se someten a evaluaciones rutinarias con la intención de encontrar anomalías. Este tipo de pruebas permiten detectar enfermedades en etapas tempranas cuando son más fáciles de curar. En el caso de CaP, la medición sérica del Antígeno Prostático Específico (PSA) es una prueba de diagnóstico, por lo tanto los sistemas nacionales de salud recomiendan a los varones que se realicen la medición anual de los niveles séricos de PSA para una detección oportuna de CaP. Otra prueba de diagnóstico temprano es el examen digital rectal (DRE por sus siglas en inglés) el cual generalmente se realiza si existe alguna anomalía en los niveles séricos de PSA. Si estas evaluaciones resultan con alteraciones, entonces se realiza una biopsia como prueba confirmatoria para la presencia de cáncer. Finalmente, si la biopsia es positiva para CaP, entonces para determinar el grado de avance tumoral y la presencia de metástasis, se realiza un gamagrama óseo, tomografía o una resonancia magnética (Cancer, 2016).

EL ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO

El PSA es una proteasa de Serinas cuya función principal es impedir la coagulación del semen. Adicionalmente, los niveles séricos de PSA han sido útiles en la detección de CaP ya que incrementan en diferentes afecciones prostáticas. Los niveles de referencia de PSA varían de acuerdo a la edad del paciente y se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores de referencia de PSA según edad

Edad (años)	Valores de referencia de PSA (ng/mL)
40 - 49	2.5
50 - 59	3.5
60 - 69	4.5
70 - 70	6.5

Además, en condiciones normales, el PSA activo puede ser inactivado por proteólisis dentro de la célula y otra porción pasa íntegra al torrente sanguíneo y se conoce como PSA libre. Una vez en el torrente sanguíneo, el PSA rápidamente se une a inhibidores de proteasas y la fracción sérica libre del PSA es mayor que el PSA unido a proteínas. Sin embargo, en condiciones como CaP y HPB la fracción libre de PSA es menor en torrente sanguíneo y esto puede ser indicativo de alguna anomalía prostática. Como se mencionó previamente, los niveles de PSA pueden estar alterados por otras afecciones prostáticas como HPB.

Se conoce como la zona gris cuando los valores de PSA están en el rango de 2.5-10 ng/mL, ya que es difícil discriminar entre CaP y otras patologías. Para discriminar mejor entre un tumor maligno y otras alteraciones prostáticas, también se determinan los niveles de PSA libre y unido a proteínas, entre más bajos sean los niveles de PSA libre, entonces es más probable que se trate de CaP y no de BPH u otra patología (Adhyam and Gupta, 2012).

EXAMEN DIGITAL RECTAL

El DRE lo realiza un médico utilizando guantes y lubricante. El médico introduce el dedo índice en el recto del paciente para buscar irregularidades en la forma, tamaño y textura de la próstata. Aunque existen diversas controversias debido a la subjetividad de esta prueba, aún sigue considerándose una herramienta importante para la detección temprana de CaP (Walsh et al., 2014).

BIOPSIA PROSTÁTICA GUIADA POR ULTRASONIDO

Cuando la probabilidad de la presencia CaP incrementa después de haber detectado niveles elevados de PSA y un tacto rectal sospechoso, entonces se procede a la realización de la biopsia prostática. La confirmación del diagnóstico se realiza con la biopsia prostática dirigida por ultrasonido transrectal (USTR). El USTR sin biopsia permite observar la anatomía prostática, pero no es útil en la detección de lesiones anteriores, apicales o centrales. Tampoco detecta pequeñas tumoraciones, por lo que siempre es necesario realizar la biopsia. El procedimiento de la biopsia consiste en tomar 12 muestras representativas de la próstata con una aguja gruesa por punción (Hodge et al., 1989; Fig 5. Arriba). Las muestras se analizan histopatológicamente y se evalúa el grado de diferenciación histológica en escala de Gleason. El patrón primario se establece en una escala 1-5 basado en la morfología dominante en el tejido y que tanto se aleja del patrón normal. También se asigna un valor al patrón secundario o el siguiente patrón mas frecuente. Entonces finalmente se obtiene un número de dos dígitos, por ejemplo: $3 + 4 = 7$ (Humphrey, 2004; Fig 5. Abajo).

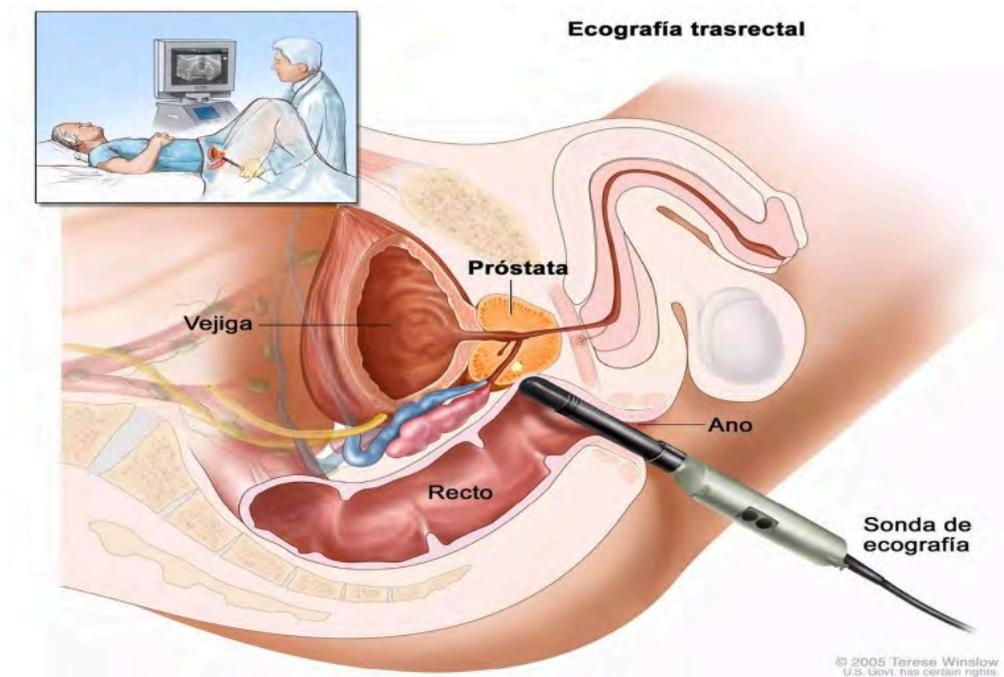




Figura 5. Biopsia guiada por ultrasonido y escala de Gleason. En la parte de arriba se muestra como se realiza la biopsia prostática dirigida por ultrasonido transrectal. Una vez que se tomaron 12 muestras representativas de la próstata, entonces el patólogo determina el grado de diferenciación en escala Gleason con valores de 1 a 5 (abajo). Siendo cinco menor diferenciación celular. Tomada de <http://diplomadomedico.com/deteccion-de-cancer-de-prostata-mediante-biopsia-guiada-por-ultrasonido-transrectal-2/> y de <http://urologiaperuana.blogspot.mx/2013/11/cancer-de-prostata.html>

GAMMAGRAFÍA ÓSEA

El gammagrama óseo se realiza para determinar si el CaP se ha diseminado a huesos. Se realiza cuando los niveles de PSA son mayores a 20 ng/mL, Se diagnostica un grado Gleason mayor a 7 o hay dolor óseo. La técnica se basa en la inyección intravenosa de una sustancia radioactiva y el posterior escaneo con una cámara de rayos gamma. La absorción del material radioactivo cambia cuando hay algunas lesiones como tumoraciones, fracturas o infecciones. Algunas lesiones, principalmente las osteolíticas no se pueden visualizar por este método por lo que se requiere el uso de la tomografía por emisión de positrones (PET por sus siglas en inglés) (Messiou et al., 2009).

TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

La tomografía computarizada se realiza para determinar si el CaP se ha diseminado a ganglios linfáticos. Utiliza rayos X para generar imágenes transversales. Se requiere la ingesta de un contraste que hará que el intestino se

vea de manera distinta y por lo que se pueden detectar tumoraciones. Sin embargo, para la detección de metástasis a ganglios linfáticos se recomienda la realización de una resonancia magnética (Messiou et al., 2009).

RESONANCIA MAGNÉTICA

La resonancia magnética permite obtener imágenes de la próstata para determinar si el cáncer se ha diseminado hacia regiones próximas como vesículas seminales o a otras estructuras adyacentes. Se utilizan ondas de radio e imanes en lugar de rayos X y también se utiliza una sustancia de contraste (Messiou et al., 2009).

ESTRATIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Una vez que se ha determinado el diagnóstico de CaP, así como el avance de la enfermedad, se clasifica el tumor en la escala TNM según la junta del comité americano de cáncer (AJCC por sus siglas en inglés) (Society, 2016a). La estratificación se encuentra descrita en la caja de texto 1 y se fundamenta en 5 piezas de información importantes:

- Extensión del tumor primario (Categoría T).
- Si el cáncer se ha expandido a nódulos linfáticos (Categoría N).
- Si el cáncer ha hecho metástasis a órganos distantes (Categoría M).
- Los niveles de PSA.
- La escala Gleason asignada.

Caja 1. Estratificación de cáncer según la escala TNM

□

Escala TNM

Hay cuatro categorías para describir la extensión local del tumor de la próstata, desde T1 hasta T4. La mayoría de éstas también tienen subcategorías.

T1: su médico no puede palpar el tumor ni verlo con estudios por imágenes, como por ejemplo con una ecografía transrectal.

- **T1a:** el cáncer se encuentra por casualidad (accidentalmente) durante la resección transuretral de la próstata (TURP) que se hizo para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna. El cáncer está en no más del 5% del tejido extirpado.
- **T1b:** el cáncer se detecta durante la TURP, pero está presente en más de un 5% del tejido extirpado.
- **T1c:** el cáncer se encuentra mediante una biopsia por aguja, realizada debido a un nivel aumentado de PSA.

T2: su médico puede palpar el cáncer cuando realiza un examen digital del recto (DRE) o lo observa mediante un estudio por imágenes, como ecografía transrectal, pero parece que aún está limitado a la glándula prostática.

- **T2a:** el cáncer se encuentra en la mitad o menos de un solo lado (izquierdo o derecho) de la próstata.
- **T2b:** el cáncer se encuentra en más de la mitad de un solo lado (izquierdo o derecho) de la próstata.
- **T2c:** el cáncer está en ambos lados de la próstata.

T3: el cáncer se extendió fuera de la próstata y pudo haberse propagado a las vesículas seminales.

- **T3a:** el cáncer se extendió fuera de la próstata, pero no afectó a las vesículas seminales.
- **T3b:** el cáncer se propagó hacia las vesículas seminales.

T4: el cáncer ha crecido hacia los tejidos adyacentes a la próstata (además de las vesículas seminales), como por ejemplo al esfínter uretral (músculo que ayuda a controlar la micción), al recto, la vejiga, y/o a la pared de la pelvis.

Categorías N

Las categorías N describen si el cáncer se ha propagado a los ganglios (nódulos) linfáticos cercanos (regionales).

NX: los ganglios linfáticos adyacentes no fueron evaluados.

N0: el cáncer no se ha propagado a ningún ganglio linfático adyacente.

N1: el cáncer se ha propagado a uno o más ganglios linfáticos cercanos.

Categorías M

Las categorías M describen si el cáncer se ha propagado a partes distantes del cuerpo. Los huesos y los ganglios linfáticos distantes son los lugares más comunes a donde el cáncer de próstata se propaga, aunque también se puede propagar a otros órganos, como a los pulmones y al hígado.

M0: el cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos.

M1: el cáncer se ha propagado más allá de los ganglios linfáticos cercanos.

- **M1a:** el cáncer se propagó a los ganglios linfáticos distantes (en el exterior de la pelvis).

Información obtenida de la Asociación Americana de Cáncer (Society, 2016a)

TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El tratamiento de CaP depende de la estratificación y el estadio en el que se haya encontrado el tumor. A continuación se describen los tratamientos comúnmente utilizados en la clínica según los lineamientos establecidos por el Instituto Nacional de Cancerología en México. Los tratamientos a grandes rasgos se clasifican en 5 grandes grupos y las condiciones para su administración se encuentran descritas en la tabla 3 (Ríos, 2016). A continuación se mencionan los 5 grupos en los que se clasifican los tratamientos de CaP:

- **Vigilancia:** No se administra ningún tipo de tratamiento ni farmacológico ni quirúrgico, únicamente se requiere un constante monitoreo del paciente.
- **Prostatectomía radical:** Involucra la remoción completa de la glándula prostática por un procedimiento quirúrgico.
- **Radioterapia:** Consiste en administrar radiaciones con el objetivo de dañar principalmente el ADN por rupturas de doble cadena y así matar a la célula.
- **Bloqueo hormonal:** Consiste en la administración de fármacos que inhiben a diferentes niveles la producción de andrógenos o antagonizan el propio receptor de andrógenos.
- **Combinación:** una mezcla de los tratamientos anteriormente mencionados.

Tabla 3. Resumen de guías de tratamiento primario para cáncer de próstata

Estadio	Tratamiento	Comentario
T1a	Vigilancia	Tratamiento estándar de tumores con Gleason ≤ 6 , antígeno ≤ 10 , menos de 3 muestras con más de 50% en cada una de ellas y con una expectativa de vida mayor a 10 años. En pacientes con una expectativa mayor a 10 años se recomienda reestadificar con biopsias transrectales de próstata. (Recomendación grado B).
	Prostatectomía radical	Opcional en pacientes menores de 60 años con una expectativa de vida de más de 10 años, especialmente para tumores mal diferenciados. (Recomendación grado B).

	Radioterapia	Opcional en pacientes menores de 60 años con una expectativa de vida, especialmente para tumores mal diferenciados. (Recomendación grado B).
	Bloqueo hormonal	No es opción. (Recomendación grado A).
	Combinación	No es opción. (Recomendación grado C).
T1b-T2b	Vigilancia	Pacientes asintomáticos con tumores bien y moderadamente diferenciados con una expectativa de vida menor a 10 años. Pacientes que no aceptan el tratamiento por las complicaciones. (Recomendación grado B).
	Prostatectomía radical	Tratamiento estándar en pacientes con expectativa de vida mayor a 10 años quienes aceptan el tratamiento y sus complicaciones. (Recomendación grado A).
	Radioterapia	Pacientes con expectativa de vida mayor a 10 años quienes aceptan el tratamiento y sus complicaciones. Pacientes con contraindicaciones para cirugía. Paciente en malas condiciones, con expectativa de vida de 5 a 10 años y tumores mal diferenciados. (Recomendación grado B).
	Bloqueo hormonal	Análogos LH-RH en pacientes sintomáticos que necesitan paliación de los síntomas, no candidatos a tratamiento curativo (recomendación grado C). Los antiandrógenos se asocian con mala evolución en comparación con vigilancia y no se recomienda. (Recomendación grado A).
	Combinación	Bloqueo hormonal neoadyuvante (THNA) + prostatectomía radical, no ha probado beneficio. (Recomendación grado A). THNA + radioterapia, mejor control local no ha probado beneficios en la supervivencia. (Recomendación grado B). Bloqueo (tres años) + radioterapia mejor que radioterapia sola en tumores mal diferenciados. (Recomendación grado A).
T3-T4	Vigilancia	Opción en pacientes asintomáticos con T3, tumores bien y moderadamente diferenciados, con expectativa de vida menor a 10 años. (Recomendación grado C).
	Prostatectomía radical	Opcional en pacientes seleccionados T3a y expectativa de vida mayor a 10 años. (Recomendación grado C).
	Radioterapia	T3 con expectativa de vida mayor a 5 a 10 años. Si no está disponible se recomienda combinación con terapia bloqueo hormonal. (Recomendación grado A).
	Bloqueo	Pacientes sintomáticos con T3 a T4, concentración de APE > 20

	hormonal	ng/ml, mejor que vigilancia. (Recomendación grado A).
	Combinación	Radioterapia + bloqueo hormonal es mejor que radioterapia sola. (Recomendación grado A). THNA+ prostatectomía radical no ha probado beneficio. (Recomendación grado B).
N + M0	Vigilancia	Pacientes asintomáticos con antígeno menor de 20-50 con periodo de doblaje del antígeno prostático específico menor a 12 meses pueden tener una peor supervivencia. (Recomendación grado C).
	Prostatectomía radical	No es la opción estándar. (Recomendación grado C).
	Radioterapia	No es la opción estándar. (Recomendación grado C).
	Bloqueo hormonal	Terapia estándar. (Recomendación grado A).
	Combinación	No es la opción estándar. (Recomendación grado B).
M +	Vigilancia	No es la opción estándar. (Recomendación grado B).
	Prostatectomía radical	No es la opción estándar. (Recomendación grado C).
	Radioterapia	Está indicada en el caso de metástasis óseas dolorosas o compresión radicular, hemorragia u obstrucción urinaria y/o rectal. (Recomendación grado C).
	Bloqueo hormonal	Terapia estándar, no debe negarse tratamiento a pacientes sintomáticos. (Recomendación grado B).
	Combinación	No es la opción estándar. (Recomendación grado C).

Información tomada de Oncoguía: cáncer de próstata (Ríos, 2016).

CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN

Como se observa en la tabla, principalmente en estados de metástasis localizada o distal, el tratamiento estándar utilizado es el bloqueo hormonal. Sin embargo, la mayoría (> 80%) de los pacientes eventualmente presentarán una regresión tumoral y el tratamiento ya no es eficiente, por lo que se produce el cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) (Feldman and Feldman, 2001). Existen diferentes hipótesis acerca de los procesos moleculares que pudieran estar involucrados y algunos de ellos se encuentran sintetizados en la Tabla 4.

Tabla 4. Teorías para explicar el desarrollo de CPRC

Ruta	Dependencia de ligando	de	Dependencia del AR	Mecanismos
AR hipersensible	andrógenos		Depende del AR	Amplificación del AR AR hipersensible por mutaciones Incremento de la DHT
AR promiscuo	Pseudoandrógenos Antagonistas de andrógenos Corticoesteroides Mutaciones de correguladores		AR mutado	El AR al estar mutado puede activarse por moléculas que normalmente no lo hacen. Inclusive, algunos agonistas pueden funcionar como agonistas.
AR forajido	Independiente de andrógenos y de cualquier otro ligando	de	Depende del AR	Activación del AR por fosforilación por vías alteARNs como: Mutación de PTEN Amplificación de Her2/neu Activación de PI3K Activación de MAPK Mutación de correguladores
Evasión el AR	Independiente de andrógenos y de cualquier otro ligando	de	Independiente del AR	Activación de rutas alteARNs de supervivencia celular como: Sobreexpresión de BCL2. Activación de oncogenes Represión de genes supresores de tumores
Células observadoras	Independiente de andrógenos y de cualquier otro ligando	de	Independiente del AR	Células madre malignas

Información tomada y traducida de Feldman and Feldman, 2001

El CPRC se diagnostica cuando se encuentra incremento en los niveles séricos de testosterona, se tienen dos incrementos consecutivos en la medición de PSA en intervalos quincenales o se detecta progresión en las lesiones en tejidos blandos y/o óseos. En este estadio el tratamiento que se utiliza es la quimioterapia y se utilizan moléculas inhibidoras de la formación de microtúbulos, como docetaxel y

cabazitaxel. El Docetaxel se administra en primera línea y cabazitaxel como tratamiento de segunda línea cuando se observa progresión de CaP con docetaxel. Desafortunadamente estos tratamientos no detienen el avance de la enfermedad y por lo general después de algún tiempo se desarrolla metástasis ósea, siendo esta la causa principal de muerte de pacientes con CaP (Ríos, 2016).

METÁSTASIS ÓSEA

Generalmente los pacientes con CaP (aprox el 90%) desarrollan metástasis con tropismo hacia el hueso. Los síntomas de metástasis ósea se caracterizan por la presencia de fuertes dolores, la susceptibilidad a sufrir fracturas, compresiones nerviosas e hipercalcemia. En este estadio el tumor es prácticamente incurable y únicamente se administran medidas paliativas para disminuir los síntomas (Ye et al., 2007). Como tratamientos paliativos se utilizan comúnmente en la clínica los bisfosfonatos, el más frecuentemente empleado es el ácido zoledrónico, el cual también se puede tomar preventivamente en pacientes bajo bloqueo hormonal. Este tratamiento se utiliza principalmente con la finalidad de disminuir la intensidad o retardar la aparición de los eventos relacionados a huesos en CaP. Además, la radioterapia exteARN o con radioisótopos se utiliza en el caso de metástasis dolorosas, así como para prevenir fracturas, aliviar síntomas de compresión nerviosa u obstrucción urinaria o rectal y eventos de hemorragia. Desafortunadamente, toda vez que se detecta la metástasis ósea, la probabilidad de supervivencia disminuye dramáticamente en los pacientes con CaP, siendo esta la principal causa de la enfermedad (El-Amm and Aragon-Ching, 2016).

Debido a que el CaP continúa siendo un problema debido a sus elevados índices de morbilidad y mortalidad, es necesario que se mejoren las estrategias de prevención, de diagnóstico y terapéuticas. Para ello es necesario comprender el desarrollo de la enfermedad desde un punto de vista molecular, ya que muchas alteraciones a este nivel podrían ayudar al manejo del CaP desde la prevención, hasta la terapéutica.

ALTERACIONES MOLECULARES DURANTE EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Se han descrito múltiples alteraciones a nivel de la secuencia de genes que codifican para proteínas en vías metabólicas involucradas en CaP, entre ellas se han reportado mutaciones en genes que participan en procesos como apoptosis, regulación del ciclo celular, invasividad, angiogénesis, proliferación celular y la vía del AR, entre muchas otros (Robinson et al., 2015). Además de mutaciones, existen numerosas alteraciones en la expresión de genes que participan en los mismos procesos (Barfeld et al., 2014; Rajan et al., 2014). Más recientemente, se comenzaron a describir también alteraciones a nivel epigenético, que participan en la regulación transcripcional de las mismas rutas mencionadas (Yegnasubramanian, 2016). En conjunto, la participación de alteraciones genéticas y epigenéticas han permitido encontrar nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico de CaP, así como de nuevos posibles blancos terapéuticos.

EPIGENÉTICA

El término de epigenética fue utilizado por primera vez por Conrad Waddington para describir a los mecanismos moleculares encargados de convertir la información genética en fenotipos particulares (Deichmann, 2016). Actualmente, se define como el estudio de las modificaciones químicas al ADN y a sus proteínas asociadas que afectan localmente la función genómica (Felsenfeld, 2014; Quante and Bird, 2016); dichas modificaciones regulan procesos dependientes del ADN como la transcripción, splicing, estabilidad genómica, replicación del ADN y reparación del ADN, entre otros. Las modificaciones epigenéticas son heredables tanto mitóticamente, como meióticamente y tienen una función relevante a lo largo del desarrollo embrionario, renovación de células adultas, impronta genómica e inactivación del cromosoma X. Los mecanismos que han sido más ampliamente descritos son la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de histonas (MPT), aunque existen otros como los complejos remodeladores de la

cromatina dependientes de ATP y la participación de ARNs no codificantes (ncARN) (Portela and Esteller, 2010).

METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN (meADN) es históricamente el primer mecanismo epigenético que se describió, así como el más descrito por la diversidad de técnicas que se han desarrollado para su estudio (Felsenfeld, 2014). La meADN es la adición covalente del grupo metilo al carbono 5 de las citosinas para formar la 5-metilcitosina (5meC) (Fig 6). Las citosinas metiladas, generalmente se encuentran en el contexto de secuencias palindrómicas CpG. Aunque posteriormente, se describió la existencia de 5meC en contextos distintos, principalmente en células madre embrionarias y células pluripotentes inducidas. Las enzimas encargadas de catalizar esta reacción son las metiltransferasas de ADN (DNMT; Ziller et al., 2011). En mamíferos se conocen 3 DNMT con actividad catalítica, la DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. La DNMT1 es conocida como la metiltransferasa de ADN de mantenimiento, al reconocer el ADN hemimetilado y copiar un grupo metilo en la otra hebra. Esto ocurre durante la mitosis y permite que se herede la marca a las siguientes generaciones celulares. Las DNMT3a y DNMT3b están encargadas de la metilación del ADN *de novo*, que ocurre durante el desarrollo embrionario y desarrollo de células primordiales germinales, para poner marcas de metilación en donde no existe una 5meC previa. Otro miembro de la familia es la DNMT3L, ésta no tiene actividad catalítica, pero es necesaria para el correcto funcionamiento de las DNMT3a y DNMT3b (Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005). Las DNMT utilizan como cofactor al donador universal de grupos metilo S-Adenosilmetionina (SAM). Existen regiones en el genoma con un contenido mayor de sitios CpG que el resto del genoma, a estas regiones se les conoce como islas CpG (ICG). Aproximadamente el 80% de los genes contiene una ICG en su región promotora, la meADN en estas regiones está principalmente

asociada al silenciamiento de la expresión génica de estos genes (Weber et al., 2007).

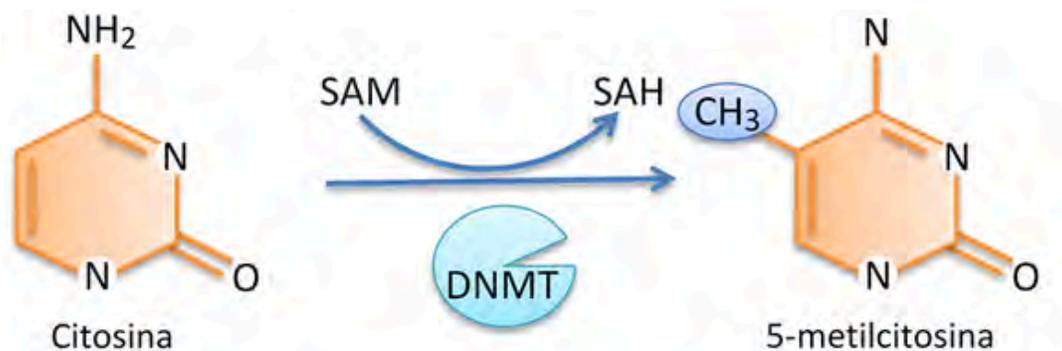


Fig 6. Metilación del ADN. En la figura se muestra la reacción química que ocurre para la metilación de las citosinas en el ADN, el grupo metilo es añadido en el carbono 5, las enzimas DNMT transfieren el grupo metilo a través del donador SAM, liberando SAH y formando 5-metilcitosina.

Acrónimos: Metiltransferasas de ADN (DNMT), S-Adenosil metionina (SAM) y S-Adenosil homocisteína (SAH).

ESTABLECIMIENTO DE LOS PATRONES DE METILACIÓN DEL ADN

Existen dos etapas en el desarrollo embrionario de mamíferos en las que se eliminan por completo las marcas de meADN con el objetivo de establecer nuevas. La primera ocurre durante la formación de células primordiales germinales (CPG) y la segunda ocurre durante el proceso de preimplantación embrionaria. En la primera ocurre una desmetilación global de todos los genes, mientras que en la segunda hay una desmetilación masiva y los únicos genes que permanecen metilados son los improntados. Ambas etapas comienzan por un proceso de desmetilación activa y concluyen por un mecanismo de desmetilación pasiva que se describirán a continuación. Finalmente, se establecen los nuevos patrones de metilación que serán específicos de cada tipo celular (Smith et al., 2012; Gifford et al., 2013; Smith and Meissner, 2013).

DESMETILACIÓN DEL ADN

Existen dos tipos de mecanismos de desmetilación del ADN que son: La desmetilación pasiva y la desmetilación activa. El primero no involucra gasto energético y ocurre por la inhibición de la DNMT1, de mantenimiento, de modo que se pierde la marca de meADN por dilución durante las divisiones celulares al no poder copiar el grupo metilo de una de las hebras complementarias. Mientras que la desmetilación activa involucra gasto energético al remover directamente el grupo metilo de la citosina, por lo que no depende de las divisiones celulares. El mecanismo de desmetilación activa ha sido también descrito para células somáticas, aunque en general en estas células ocurre en muy poca frecuencia (Wu and Zhang, 2010; Kohli and Zhang, 2013; Neri et al., 2015).

Hasta el momento, únicamente se ha descrito un posible mecanismo de desmetilación activa. El cual involucra la oxidación de la 5meC para formar 5-hidroximetilcitosina (5hmC), esta reacción es catalizada por la familia de dioxigenasas de la familia *Ten Eleven Translocases* (TET). Posteriormente se requiere de la participación de Glicosilasas de ADN y/o la desaminasa APOBEC que reconocen la 5hmeC. Finalmente, la citosina originalmente metilada es sustituida por una nueva por el mecanismo de reparación del ADN de escisión de bases (BER; Fig 7). Sin embargo, existe evidencia que sugiere la participación de otras vías en la desmetilación activa del ADN. Entre las proteínas que podrían regular estos mecanismos están AID, UNG2, MBD4, SMUG y TDG (Guo et al., 2011; Schuermann et al., 2016).

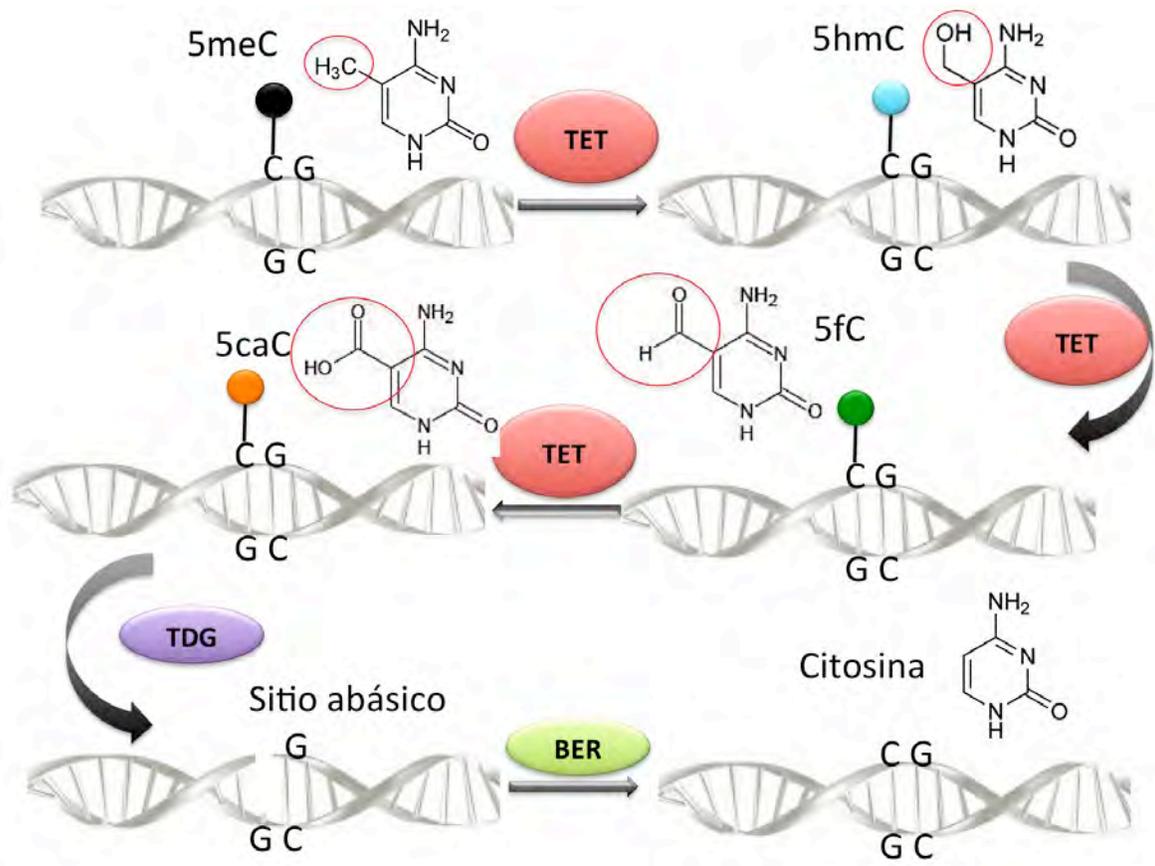


Fig 7. Desmetilación del ADN. El mecanismo de desmetilación activa involucra la oxidación de 5meC a 5caC por la acción de las enzimas TET. La proteína TDG reconoce estas modificaciones y remueve la citosina del ADN generando un sitio abásico que es posteriormente reparado por el mecanismo BER, el cual introduce una nueva citosina en la cadena del ADN sin modificar.

FUNCIONES DE LA METILACIÓN DEL ADN

Como se mencionó previamente, la meADN en ICG en promotores de genes está principalmente asociada a la represión transcripcional. Los criterios para determinar una ICG son que mida al menos 200 pb, que tenga al menos un 50% de contenido CG y que tenga un cociente de al menos 0.6 del número observado de dinucleótidos CpG entre el esperado (o/e). Pero no todas la ICG son funcionales en el mecanismo de represión génica (Bock et al., 2007). De acuerdo a la longitud y contenido de CpG, un estudio previo determinó que existen 3 tipos de ICG: ICG de alta densidad, ICG de mediana densidad e ICG de baja densidad. Siendo las de alta densidad las que son mas susceptibles a estar metiladas y con

mayor probabilidad de participar en los procesos de represión transcripcional por este mecanismo, en contraste con las ICG de baja densidad (Weber et al., 2007).

El mecanismo de represión transcripcional por meADN ocurre debido a que el grupo metilo puede interferir directamente con la unión de factores de transcripción (FT), impidiendo así la transcripción génica. Sin embargo no todos lo FT son sensibles a la meADN, en este sentido el mecanismo más frecuente de represión transcripcional ocurre debido a la unión de proteínas de unión a sitios metilados (MBP) . Estas proteínas a su vez tienen dominios de unión de otros modificadores epigenéticos que inducen un estado compacto de la cromatina para la represión transcripcional. Entre las proteínas que reclutan las MBP, se encuentran las desacetilasas de histonas (HDAC). Finalmente, todo este proceso impide que se lleve a cabo la iniciación de la transcripción (Fournier et al., 2012; Buck-Koehntop and Defossez, 2013).

Aunque la metilación en ICG en promotores de genes ha sido la más estudiada, también existe meADN en regiones intergénicas e intragénicas (Jones, 2012). La meADN en estas regiones apenas comienza a ser estudiada y en los últimos años se ha comenzado a generar información al respecto. Una de las funciones más estudiadas de la meADN es en secuencias repetidas, participando en la estabilidad genómica, como ejemplo particular la meADN previene la retro transposición de algunas secuencias repetidas como LINE-1 (Ariumi, 2016). Interesantemente, en regiones intergénicas, principalmente se ha asociado a la modulación de la actividad de regiones reguladoras como potenciadores y aisladores, participando así en la regulación transcripcional génica y en la organización de la cromatina dentro del núcleo (Aran et al., 2013; Ollikainen et al., 2015; Heyn et al., 2016). Por otro lado, se comenzó a observar incremento en la meADN en el cuerpo de genes transcripcionalmente activos, posteriormente se determinó que generalmente únicamente estaban metilados los exones incluidos en el transcrito final, esto evidenció la participación de la meADN en el proceso de splicing del mRNA (Choi, 2010; Maunakea et al., 2013). Estos hallazgos han

abierto la gama de posibilidades de la participación meADN en muchos procesos celulares. Para que la meADN pueda llevar a cabo sus funciones, necesariamente tiene que actuar en conjunto con otros mecanismos epigenéticos. Entre estos mecanismos se encuentran las MPT, las cuales se describirán en los siguientes párrafos.

MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE HISTONAS

La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, que está formado por un octámero de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Cada una de las histonas se encuentra por duplicado. El ADN se enrolla alrededor del octámero de histonas y son 146 pb las que dan 1.65 vueltas. Las regiones N-terminal de las histonas sobresalen de la estructura del nucleosoma y están formadas principalmente por aminoácidos básicos que permiten la interacción con el ADN. Estas regiones son susceptibles a ser modificadas covalentemente, determinando no sólo la unión del ADN al nucleosoma, sino que también permiten la interacción con otras proteínas, como los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, haciendo que los nucleosomas se acerquen o se alejen entre sí, modulando así otro nivel de compactación de la cromatina (Li and Reinberg, 2011). Se han descrito a la fecha más de 60 distintas MPT y poco se conoce acerca de la función de cada una de ellas. Las mejor caracterizadas son la acetilación y la metilación de histonas (Tan et al., 2011).

ACETILACIÓN DE HISTONAS

La acetilación de las histonas (acH) principalmente ocurre en residuos de Lisina. Esta marca es muy dinámica y es catalizada por la familia de acetiltransferasas de histonas (HAT) y removida por desacetilasas de histonas (HDAC). El grupo donador de grupos acetilo es Acetil coenzima A (CoA). El grupo acetilo neutraliza la carga positiva de la lisina, por lo que debilita la interacción del ADN con el nucleosoma y promueve una estructura abierta de la cromatina con mayor accesibilidad, la presencia de acH en distintas regiones genómicas se asocia

frecuentemente a una alta actividad transcripcional o permisividad (Bannister and Kouzarides, 2011; Ernst et al., 2011; Roadmap Epigenomics et al., 2015).

METILACIÓN DE HISTONAS

La metilación de histonas ocurre principalmente en lisinas y argininas de las cadenas laterales de las histonas. A diferencia de la acetilación, la metilación de histonas no modifica la carga, por lo que la metilación de histonas puede estar asociada tanto a estados de cromatina compacta como abierta. El hecho de que se asocien a uno u otro estado, depende del residuo de aminoácido que sea modificado. Además, las lisinas pueden encontrarse monometiladas, dimetiladas y trimetiladas. Las diferentes metiltransferasas de histonas se caracterizan por la presencia del dominio Su(var) *Potenciador de Zeste* y *Trithorax* (SET) y utilizan SAM como cofactor y donador del grupo metilo. A continuación se describen brevemente las diferentes marcas de metilación de histonas más estudiadas y su función (Bannister and Kouzarides, 2011).

H3K4ME3

La trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) se encuentra principalmente enriquecida en promotores y rodeando sitios de inicio de la transcripción (TSS) de genes transcripcionalmente activos (Ernst et al., 2011; Roadmap Epigenomics et al., 2015). El enriquecimiento de H3K4me3 está íntimamente ligado a ICG desmetiladas. En mamíferos, existen seis metiltransferasas de lisinas (KMT), que pertenecen al grupo de proteínas Trithorax (TrxG), que pueden catalizar esta modificación y son: SETD1A, SETD1B, MLL1, MLL2, MLL3 y MLL4. Estas KMT son subunidades y funcionan en el contexto de complejos multiproteicos denominado complejo de proteínas asociadas a Set1 (COMPASS). Existen varios complejos con la función de catalizar la trimetilación de H3K4, sin embargo, no tienen función redundante, ya que algunos se encargan de establecer la marca y otras de su mantenimiento. Además, de estar activos en diferentes etapas del desarrollo. Las KMT se caracterizan por tener un dominio

SET y utilizan SAM como cofactor y donador de grupos metilo. y el nivel de enriquecimiento de esta marca está directamente asociado al nivel de la actividad transcripcional génica. El reclutamiento de la maquinaria que establece la H3K4me3 a sus sitios blanco se lleva a cabo previa unión de FT y coactivadores. Posteriormente, también se describió la participación de ARN largos no codificantes (lncARN) en el reclutamiento de las KMT. Aunque aún se desconoce el mecanismo por el que la H3K4me3 induce un estado eucromático, existen evidencias que sugieren que posterior al establecimiento de esta marca, se reclutan HAT para promover la acetilación de las histonas H3 y H4, induciendo así un estado abierto de la cromatina (Bannister and Kouzarides, 2011; Schuettengruber et al., 2011; Zhang et al., 2015).

H3K27ME3

La trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) está principalmente asociada a estados de heterocromatina facultativa. Se encuentra enriquecida alrededor de TSS de algunos genes, en regiones subteloméricas, algunas regiones intergénicas y retrotransposones. Algunos genes se encuentran silenciados por la presencia de esta marca. Las proteínas del grupo polycomb (PcG) establecen la marca H3K27me3. Particularmente, el complejo represor polycomb 2 (PRC2) es el responsable de la dimetilación y trimetilación de la H3K27. Las subunidades catalíticas de este complejo son EZH1 y EZH2. Adicionalmente, el complejo represor polycomb 1 (PRC1), reconoce la marca H3K27me3 y las subunidades RING1A o RING1B catalizan la ubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub). Sin embargo, las marcas H3K27me3 y H2AK119ub pueden encontrarse independientemente una de la otra en algunos genes y aún así participar en el silenciamiento. Así como los complejos de TrxG, existe mayor preferencia de PRC2 hacia las regiones ricas en GC. El reclutamiento a sus regiones blanco aún no es claro, sin embargo, se sabe de la participación de FT, así como lncARN (Margueron and Reinberg, 2011).

H3K9ME3

La trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) está enriquecida en regiones de heterocromatina constitutiva, como transposones, heterocromatina pericentromérica y algunos genes silenciados. Existen evidencias más recientes que sugieren que en algunas ocasiones H3K9me3 puede encontrarse colocalizada con H3K27me3, sin embargo, esto ocurre con poca frecuencia. El establecimiento de la H3K9me3 ocurre por diferentes complejos multiprotéticos. El complejo heterodimérico conformado por G9A y GLP catalizan la monometilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me1), así como la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2). Posteriormente, la enzima SETDB1 cataliza la H3K9me2/me3, principalmente en genes y heterocromatina pericentromérica. Por otra parte, las isoenzimas SUV39H1/H2 son capaces de catalizar también las marcas H3K9me2/me3 en contextos distintos. La formación de heterocromatina por H3K9me2/me3 culmina con el reconocimiento de estas marcas por la proteína HP1, que a su vez es capaz de reclutar DNMT para metilar el ADN. Por lo tanto, a diferencia de la H3K27me3, la colocalización de H3K9me2/me3 y meADN es muy frecuente (Zhang et al., 2015).

ESTABLECIMIENTO DE LAS MARCAS DE HISTONAS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN

Una vez que se ha establecido una marca epigenética activadora o represiva en una región genómica, las enzimas responsables de catalizar dichas modificaciones son capaces de reconocer las propias modificaciones de histonas que ellas catalizan u otras modificaciones relacionadas al mismo estado de la cromatina y así se lleva a cabo la propagación de la señal de eucromatina o heterocromatina a lo largo de una región. Posteriormente, estas marcas de histonas pueden ser heredadas mitóticamente. Aún más, las marcas asociadas a un determinado estado de la cromatina modulan negativamente a las que establecen el estado contrario, formando así ciclos de retroalimentación negativa. El mejor ejemplo que describe esta situación es el antagonismo entre la marca

represiva de PRC2, H3K27me3 y la marca H3K4me3 establecida por proteínas del TrxG.

El establecimiento de las marcas de cromatina se lleva a cabo durante la diferenciación celular y sorprendentemente en células madre embrionarias, se pueden encontrar marcas de eucromatina coexistiendo con marcas de heterocromatina, a lo que se le denomina un estado bivalente de la cromatina. Estos dominios bivalentes están caracterizados por la presencia de H3K4me3 y H3K27me3 y se encuentran principalmente en CGI asociadas a genes reguladores del desarrollo. La expresión de los genes marcados por bivalencia va desde muy poca a nula, por lo que se ha hipotetizado que estos genes se encuentran preparados para su activación o represión. En apoyo, se ha demostrado que la pérdida de H3K27me3 en estas regiones permite que estos genes se expresen y por otro lado, la pérdida de H3K4me3 en estos genes los silencia permanentemente por ganancia de meADN y otras marcas de histonas como H3K9me3, entre otros mecanismos. Aunque a la fecha no se han descrito en su totalidad los mecanismos que orquestan las modificaciones epigenéticas durante la diferenciación, existen muchas evidencias que apuntan hacia la participación de factores de transcripción (FT) y de lncARN, entre otros posibles mecanismos (Harikumar and Meshorer, 2015). Es importante recordar que los mecanismos epigenéticos actúan en colaboración para el establecimiento de diferentes estados de la cromatina y que es la combinación de ellos la que determina su actividad. Algunos estudios han permitido determinar la presencia de algunas MPT de histonas y de meADN para reconocer regiones genómicas como promotores, regiones reprimidas por PRC2, regiones de heterocromatina, regiones transcripcionalmente activas, potenciadores activos y potenciadores preparados, entre muchas otras posibilidades (Ernst et al., 2011; Roadmap Epigenomics et al., 2015; Fig 8).

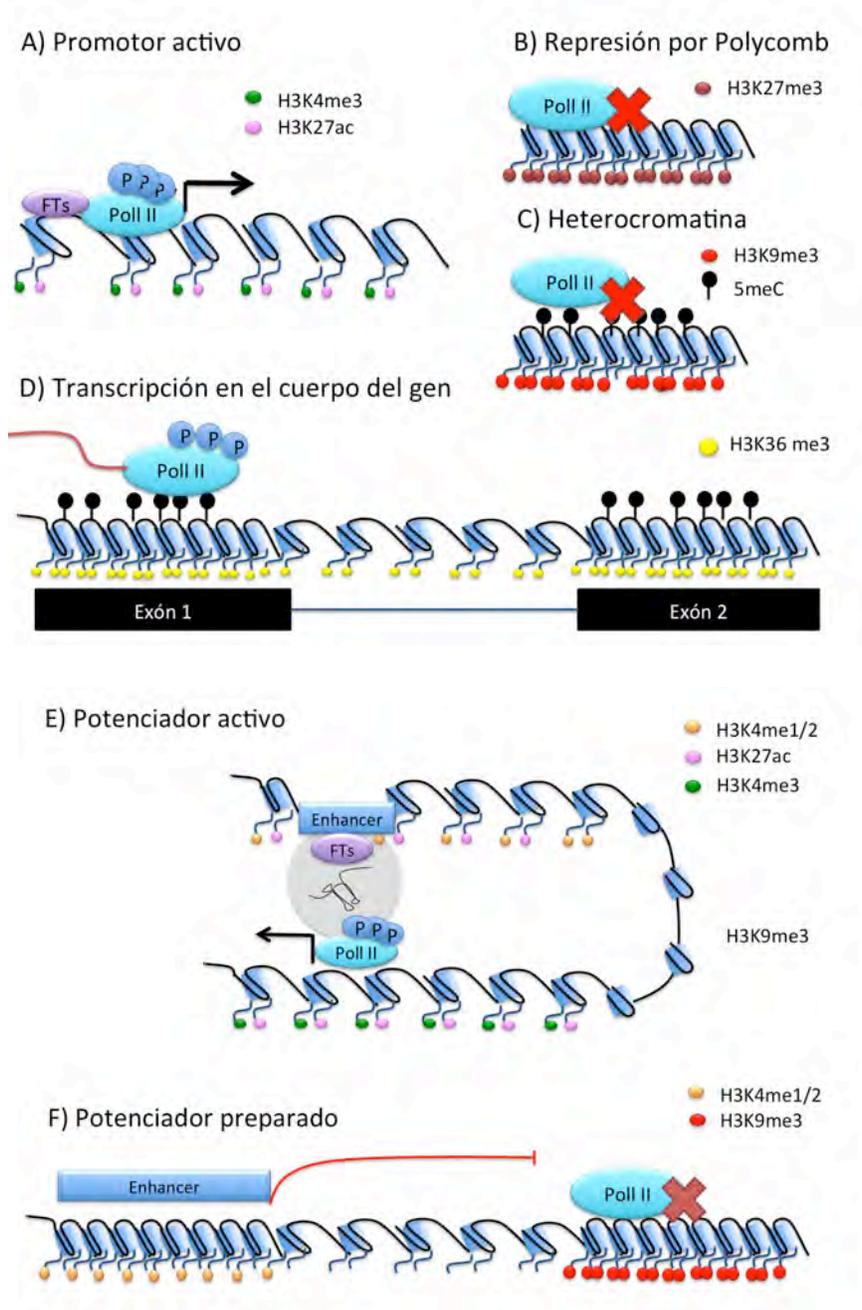


Fig 8. Firmas de cromatina que determinan regiones genómicas. A) Los promotores activos se caracterizan por la ausencia de meADN y la presencia de H3K4me3 y H3K27ac. B) La formación de regiones cerradas de cromatina por Polycomb se caracteriza por la presencia H3K27me3 y ausencia de meADN. C) La formación de heterocromatina se caracteriza por la presencia de H3K9me3 concomitante con meADN. D) El cuerpo de genes transcripcionalmente activos se caracteriza por la presencia de H3K36me3 y los exones incluidos después splicing en el transcrito final tienen niveles mayores de meADN. E) Un *potenciador* activo se caracteriza por la presencia de H3K4me1 o H3K4me2 y H3K27ac, mientras que el promotor que activa se caracteriza por la presencia de H3K4me3, H3K27ac y ausencia de meADN tanto en el *potenciador* como promotor. F) Un *potenciador* inactivo o preparado se caracteriza por la presencia de H3K4me1 o H3K4me2 sin H3K27ac. meADN: Metilación del ADN; H3K4me3: Trimetilación de la lisina 4 de la histona H3.; H3K27ac:

Acetilación de la lisina 27 de la histona H3; H3K27me3: Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3; H3K9me3: Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3;yH3K36me3: Trimetilación de la lisina 36 de la histona H3.

EPIGENÉTICA Y ENFERMEDAD

Aunque todas las células contienen el mismo genoma, la expresión génica es diferencial entre los diferentes tipos celulares que conforman al organismo. Los mecanismos directamente involucrados en la modulación de la expresión son los mecanismos epigenéticos, por lo que el correcto establecimiento de estas marcas durante la diferenciación celular es clave para el desarrollo del organismo. Sin embargo, debido al ambiente, estas modificaciones pueden encontrarse alteradas y participar así en procesos de enfermedad como en desórdenes neurodegenerativos, enfermedades autoinmunes y cáncer. En este sentido, el CaP no es la excepción y las alteraciones epigenéticas resultan en la alteración de la expresión génica, por lo que juegan un papel importante en el desarrollo de estados patológicos (Portela and Esteller, 2010).

METILACIÓN DEL ADN Y CÁNCER DE PRÓSTATA

Las células cancerosas están caracterizadas por una pérdida global de los niveles de meADN, que puede ir desde el 20% hasta aproximadamente un 60%. Las regiones hipometiladas que se han encontrado en CaP corresponden principalmente a secuencias repetidas. Este fenómeno está directamente asociado a características particulares de las células cancerosas como la presencia de inestabilidad cromosómica, translocaciones, la disrupción de algunos genes, así como la reactivación de secuencias parásitas. Un ejemplo muy bien caracterizado es L1, que pertenece a la familia de elementos de nucleótidos largos intercalados (LINE) y se encuentra hipometilada en muchos tipos de cáncer, incluyendo CaP (Kim et al., 2011; Tubio et al., 2014). Adicionalmente, también se ha descrito hipometilación en algunos oncogenes, lo cual conduce al incremento de su expresión. También se han reportado regiones con pérdida de impronta por este mismo mecanismo (Lin et al., 2013).

Al mismo tiempo que se observa una pérdida masiva de meADN, también hay ganancia de los niveles de meADN en regiones con características muy particulares, como ICG asociadas a algunos promotores génicos que corresponden a genes supresores de tumores y que pierden su expresión por este mecanismo (Kim et al., 2011; Schayek et al., 2012; Lin et al., 2013). También existen alteraciones a nivel de la metilación en exones y por lo tanto expresión aberrante de variantes de splicing (Fig 9). Más recientemente, se han reportado alteraciones en la meADN en regiones no promotoras que frecuentemente presentan sitios de unión a proteínas con dominios de unión a ADN y que pueden corresponder a secuencias reguladoras como potenciadores o aisladores. Los cambios en los niveles de meADN en estas regiones podrían estar involucrados en la desregulación de la transcripción, así como en la organización nuclear de la cromatina (Taberlay et al., 2014; Bhasin et al., 2015). Finalmente, la susceptibilidad de algunas regiones a sufrir mutaciones, como duplicaciones, deleciones y translocaciones, está fuertemente asociada a la alteración de la meADN en estas zonas (Lin et al., 2013).

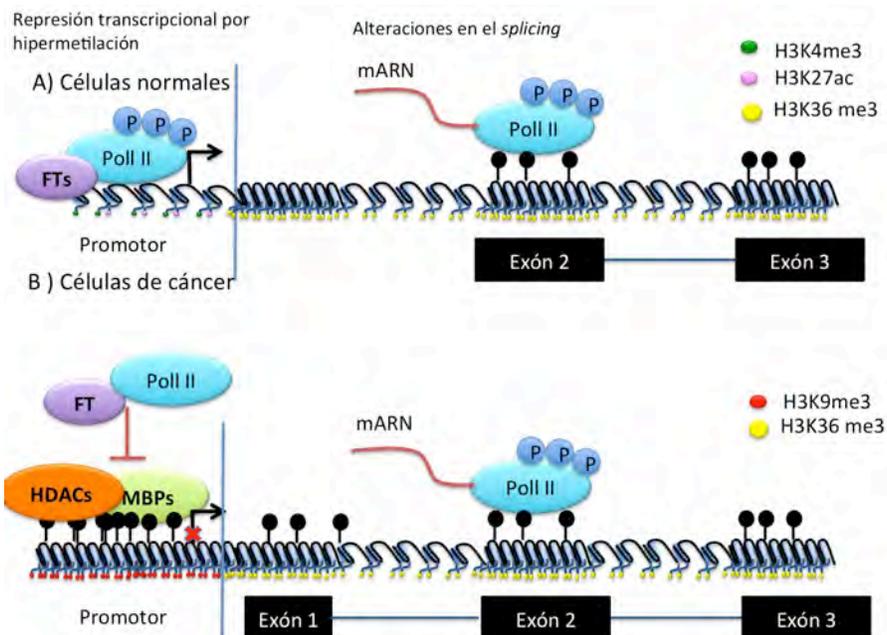


Fig 9. Alteraciones de la meADN en cáncer. A) En células normales los promotores de algunos genes supresores de tumores están desmetilados y tienen presencia de MPT de histonas de activación, por lo que permiten la transcripción génica. En el cuerpo del gen se encuentran metilados los exones que serán incluidos en el transcrito final. B) En células cancerosas los promotores de estos genes supresores de tumores se hipermetilan y por lo tanto no hay transcripción. Además existe metilación aberrante de exones y por lo tanto expresión alterada de variantes génicas.

H3K4me3: Trimetilación de la lisina 4 de la histona H3.

H3K27ac: Acetilación de la lisina 27 de la histona H3.

H3K27me3: Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3.

H3K9me3: Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3.

H3K36me3: Trimetilación de la lisina 36 de la histona H3.

MODIFICACIONES DE HISTONAS Y CÁNCER DE PRÓSTATA

Pocos reportes existen referentes al estudio de los niveles de MPT de histonas en CaP. Sin embargo, se ha reportado la pérdida global de los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4, así como de las marcas represivas H3K9me3 y H3K27me3 (Ellinger et al., 2010; Pellakuru et al., 2012). Contrariamente, en regiones particulares como promotores de muchos genes supresores de tumores se ha encontrado el enriquecimiento aberrante de las marcas de histonas represivas H3K9me3 y H3K27me3, lo cual conduce a la pérdida de su expresión. En condiciones normales, H3K9me3 coexiste con la meADN y esto también se ha observado en CaP, en donde muchos genes supresores de tumores pierden su expresión por hipermetilación del ADN y ganancia de H3K9me3 (Severson et al., 2013). Por otra parte, también se han descrito genes silenciados por el enriquecimiento aberrante de H3K27me3 (Ke et al., 2009; Ngollo et al., 2014). Normalmente el enriquecimiento de H3K27me3 no está asociado a meADN. Sorpresivamente, en el CaP se ha identificado el silenciamiento de muchos genes por enriquecimiento de H3K27me3 e hipermetilación del ADN coexistiendo en la misma región (Takeshima et al., 2015). Existen muchos genes cuya expresión se encuentra alterada por aberraciones epigenéticas, sin embargo, aún se desconocen los mecanismos que conllevan a estas alteraciones. La ruta WNT es una de las rutas cuyos genes sufren frecuentemente alteraciones a nivel de expresión génica por alteraciones epigenéticas en cáncer y CaP no es la excepción (Costa et al., 2010; Li et al., 2016). Particularmente, el grupo de genes de la familia de proteínas secretadas relacionadas con Frizzled (SFRP) ha sido

ampliamente estudiado por sus implicaciones en cáncer y su silenciamiento por hipermetilación del ADN (Perry et al., 2013).

RUTA WNT

La ruta WNT es una vía de transducción de señales que se encuentra principalmente involucrada en el desarrollo embrionario en procesos como diferenciación celular, migración y proliferación; puede activarse por diferentes vías, de ellas la mejor caracterizada es la vía canónica, que involucra a la proteína β -catenina. La activación de esta vía se lleva a cabo por la unión de proteínas secretadas al espacio extracelular WNT a su receptor membranal Frizzled (FZD) y a correceptores como la proteína relacionada con el receptor lipoproteínas de baja densidad 5 (LRP-5) o LRP-6. Posteriormente, ocurre la destrucción del complejo citoplasmático formado por la proteína adenomatosa poliposis coli (APC), axina, la cinasa de glucógeno sintasa- 3β (GSK- 3β) y β -catenina. Dentro del complejo proteico, GSK- 3β se encuentra fosforilando a β -catenina para su degradación, por lo que la destrucción del complejo impide la fosforilación de β -catenina, lo cual resulta en la estabilización y acumulación de ésta en el citoplasma y facilita su translocación al núcleo. Dentro del núcleo, β -catenina actúa como coactivador de factores de transcripción (FT), como el factor de linfocitos T (TCF) y el factor potenciador linfoide (LEF), resultando en la transcripción de genes como MMP, c-Myc, ciclina D1, c-Jun, Fra y miembros de la familia c-Fos (Yokoyama et al., 2014)(Fig 10). La ruta Wnt puede ser modulada a distintos niveles por diferentes moléculas. Se han descrito agonistas y antagonistas que pueden actuar tanto intracelularmente como extracelularmente. Existen al menos 6 diferentes familias de moléculas secretadas que antagonizan la activación de la ruta WNT: La familia Dickkopf (Dkk), El factor inhibitorio de WNT (Wif-1), Wise/SOST, Cerberus y la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina tipo 4 (IGFBP-4) y la familia de proteínas secretadas relacionadas con frizzled (SFRP) (Cruciat and Niehrs, 2013).

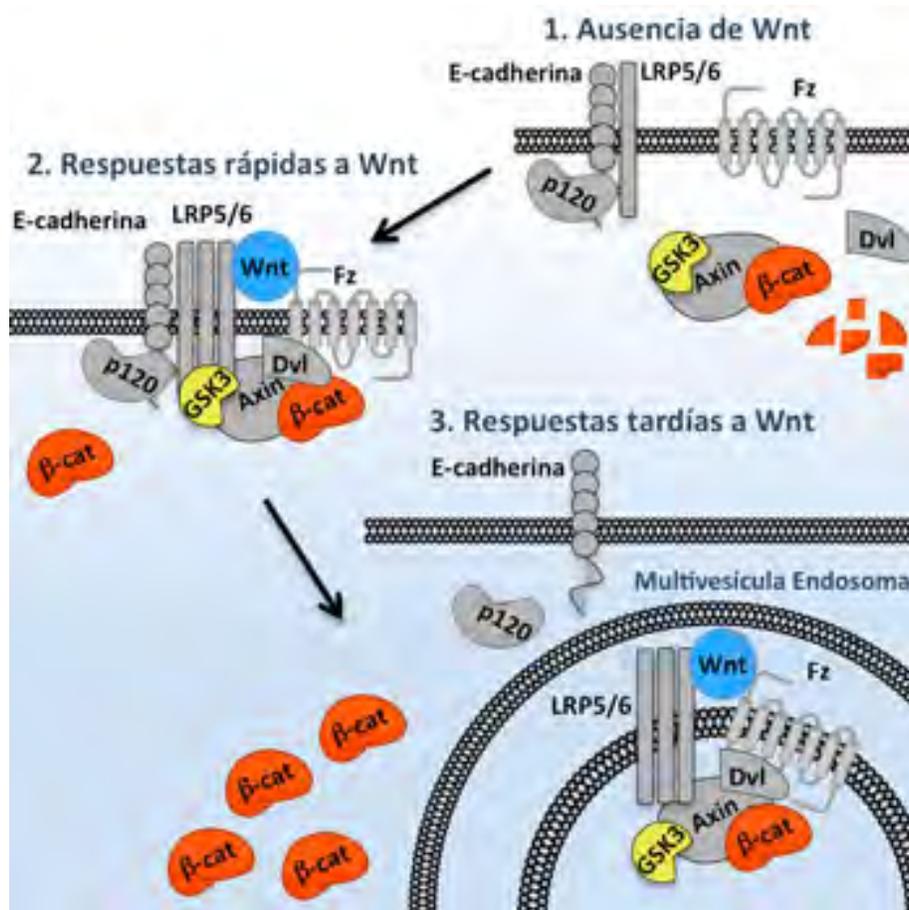


Fig 10. Activación de la ruta WNT. 1. En ausencia de ligando la ruta WNT se encuentra inactiva lo cual culmina con la destrucción de β -Catenina en el proteosoma. 2. Cuando hay ligando WNT al receptor FZ, se desencadena una cascada de señalización que culmina con la translocación de β -Catenina al núcleo y la activación de la transcripción de genes blanco. 3. La β -Catenina también tiene efecto en la adhesión celular al asociarse con cadherinas Tomada de <http://www.uab.cat/web/noticias/detalle-de-una-noticia/nuevos-avances-sobre-el-mecanismo-de-formacion-de-tumores-epiteliales-1099409749848.html?noticiaid=1345665338424>

FAMILIA DE PROTEÍNAS SFRP

La familia SFRP representa la familia más grande de inhibidores secretados de la ruta Wnt; en humanos está conformada por 5 miembros (SFRP1-SFRP5) y están localizados en diferentes regiones genómicas. Las proteínas SFRP son glicosiladas y secretadas al espacio extracelular. Las 5 proteínas SFRP comparten un dominio amino terminal rico en cisteínas (CRD), este dominio guarda una homología con los receptores FZD. Otra característica de las proteínas SFRP es el dominio carboxilo terminal que se conoce como dominio relacionado con netrina

(NTR). El dominio NTR se ha relacionado con la propiedad de unión a heparina, probablemente necesario para la estabilidad de la proteína (Bovolenta et al., 2008; Cruciat and Niehrs, 2013).

El mecanismo de acción más descrito para las proteínas SFRP involucra su unión con las proteínas Wnt secretadas, de esta forma las Wnt son secuestradas y se impide su unión a FZD y por lo tanto no ocurre la activación de la vía; esta función es mediada por el dominio CRD, aunque también existen evidencias que soportan la participación del dominio NTR. Sorprendentemente, estudios mas recientes en otros organismos no mamíferos, demostraron que las proteínas Sfrp no siempre participan como inhibidores de la ruta, sino que también pueden activarla. Aún más, las SFRP pueden participar en rutas distintas a la modulación de Wnt, como ejemplo la proteína SFRP1 inhibe la formación de osteoclastos a través de su unión al receptor de superficie membranal RANKL. Adicionalmente, SFRP1 también actúa como inhibidor de la ruta Notch al inhibir la metaloproteasa ADAM10 y finalmente, también se ha descrito SFRP1 como un modulador negativo de la actividad transcripcional del AR en cáncer de próstata (Bovolenta et al., 2008; Cruciat and Niehrs, 2013).

Existen numerosas evidencias en distintos organismos como peces, anfibios, aves y roedores, que soportan la expresión diferencial y participación de la familia de proteínas SFRP en el desarrollo embrionario. En estudios utilizando ratones como modelo animal se ha demostrado la importancia de la participación de las proteínas Sfrp1 y Sfrp2 para la formación y desarrollo de la próstata, ya que la deleción de *SFRP1* produce defectos en la formación de la próstata. Sin embargo, la principal función de las proteínas SFRP en células diferenciadas es mantener la inactivación de la ruta WNT y por lo tanto se han postulado como proteínas supresoras de tumores. (Zhang et al., 2006; Joesting et al., 2008).

SFRPS Y CÁNCER DE PRÓSTATA

En el 2004 surge uno de los primeros reportes que postula a la familia de genes SFRP como potenciales supresores tumorales y que pierden su expresión en cáncer colorrectal por hipermetilación del ADN en su región promotora. Además, la pérdida de la expresión de los genes *SFRP* conlleva a la activación de la ruta Wnt , promoviendo así los procesos de cáncer. A partir de este artículo, comenzaron a surgir numerosos reportes acerca de la pérdida de la expresión de los genes de la familia *SFRP* por hipermetilación en su región promotora en diversos tipos de cáncer. En algunas ocasiones se han descrito nuevas funciones de las proteínas SFRP diferentes a la supresión tumoral, un ejemplo de esto se describió en ratones adultos, en los cuales la sobreexpresión de *SFRP1* en próstata indujo la proliferación celular (Joesting et al., 2008). Además en células de CaP se ha descrito la participación de la proteína SFRP1 como un inhibidor de la regulación de la actividad transcripcional del AR sobre sus genes blanco (Kawano et al., 2009). En CaP existen diversas evidencias acerca de la cantidad de proteína de los diferentes SFRP, así como de su expresión y estado de metilación (Ver tabla 5). Sin embargo, algunas de las observaciones respecto a su estado de expresión y de metilación no son consistentes entre los diferentes autores.

Tabla 5. Alteraciones de los genes y proteínas de la familia SFRP en cáncer de próstata

Gen	Observación	Referencia
SFRP1	No hay hipermetilación de <i>SFRP1</i> (< 5%) en muestras de CaP comparadas con tejido adyacente morfológicamente benigno.	(Flori et al., 2004)
SFRP1	Hipermetilación de <i>SFRP1</i> (83%) en muestras de CaP comparadas con tejido adyacente morfológicamente benigno y líneas celulares de CaP.	(Lodygin et al., 2005)
SFRP1	Sobreexpresión del mRNA de <i>SFRP1</i> en fibroblastos asociados a cáncer comparados con fibroblastos normales.	(Joesting et al., 2005)
SFRP1	Hipermetilación de <i>SFRP1</i> (17.5%)	(Coutinho-Camilo et al., 2006)
SFRP1	Pérdida de la expresión de SFRP1 en tumores de próstata.	(Yamamoto and Yamamoto, 2008)
SFRP1	Mayores niveles de metilación en el promotor de SFRP1 en próstatas normales que en CaP.	(Costa et al., 2010)
SFRP1	Incremento en la expresión de SFRP1 no significativa en CaP e hipermetilación en 20 % tumores de CaP	(Perry et al., 2013)
SFRP1	Pérdida de la expresión de SFRP1 en la línea celular PC3 por meADN y enriquecimiento de H3K27me3.	(Takeshima et al., 2015)
SFRP1	Niveles bajos de SFRP1 están asociados a un mal pronóstico de CaP.	(Zheng et al., 2015)
SFRP2	En un modelo de ratón de cáncer de próstata resistente a la castración se demostró que la expresión de SFRP2 disminuye el crecimiento tumoral e induce apoptosis y necrosis.	(Placencio et al., 2010)
SFRP2	Hipermetilación de <i>SFRP2</i> (58%) en muestras de CaP	(Kilinc et al., 2012)
SFRP2	Pérdida de la proteína SFRP2 en epitelio de CaP comparado con BPH.	(O'Hurley et al., 2011)
SFRP2	Hipermetilación de <i>SFRP2</i> en tumores de CaP comparado con tejido adyacente benigno.	(Perry et al., 2013)
SFRP3	Pérdida de la proteína SFRP3 en la línea celular PC3 respecto a células prostáticas epiteliales (PrEC). El restablecimiento de la expresión de SFRP3 en PC3 revirtió la transición epitelio mesénquima, el crecimiento tumoral y capacidad de invasión.	(Zi et al., 2005)
SFRP3	Hipermetilación de SFRP3 en células de CaP comparada con tejido adyacente histológicamente sano.	(Perry et al., 2013)
SFRP4	Sobreexpresión de SFRP4 en tumores primarios CaP.	(Wissmann et al., 2003)
SFRP4	Aumento de la proteína SFRP4 en la membrana celular es un indicador de buen pronóstico en CaP, además la expresión de SFRP4 en la línea celular PC3 disminuye la proliferación celular.	(Horvath et al., 2004)
SFRP4	La reexpresión de SFRP4 en las líneas celulares LNCaP y PC3 disminuyó la tasa de proliferación celular y la invasividad de PC3.	(Horvath et al., 2007)
SFRP4	La presencia de la proteína SFRP4 membranal, es un predictor de recurrencia bioquímica de CaP.	(Yip et al., 2011)
SFRP4	Sobreexpresión de SFRP4 en CaP sin cambios en meADN.	(Perry et al., 2013)
SFRP4	La expresión de SFRP4 en CaP es un marcador de recurrencia bioquímica.	(Mortensen et al., 2015)
SFRP5	Hipermetilación de <i>SFRP5</i> (60%) en tumores de CaP comparados con el tejido adyacente sano.	(Perry et al., 2013)

Las diferentes evidencias acerca de la participación de las proteínas SFRP en CaP son únicamente contundentes para el caso de SFRP2, ya que todos los reportes coinciden en la pérdida del mRNA y de la proteína de SFRP2 en CaP e hipermetilación del ADN como su principal mecanismo de silenciamiento génico. La proteína SFRP3 únicamente ha sido estudiada en modelos de líneas celulares y la pérdida de la expresión de SFRP5 por hipermetilación del ADN sólo ha sido reportada por Perry et al., 2012. Los niveles de expresión y de metilación de SFRP1 y SFRP4 han mostrado numerosas inconsistencias entre los diferentes autores. Aún más todos los estudios mostrados utilizan como control el tejido adyacente histológicamente sano, en el cual pueden existir alteraciones moleculares. Adicionalmente, se ha descrito que por el proceso de immortalización de las líneas celulares pueden existir alteraciones a distintos niveles moleculares como en la meADN y por lo tanto dichos cambios no corresponden a lo que se observa en los tejidos. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar el perfil de expresión y estado de metilación de los genes de la familia SFRP en líneas celulares prostáticas, así como en tejidos de CaP, HPB y próstatas normales de individuos sin ninguna otra patología diagnosticada (PN),

JUSTIFICACIÓN

La familia de proteínas SFRP tiene como principal función la modulación de la actividad de la ruta WNT, esta última se encuentra involucrada en procesos de proliferación, regulación del ciclo celular, apoptosis, adherencia celular, diferenciación celular y desarrollo embrionario, entre otros. En procesos cancerosos se ha observado la activación aberrante de la ruta Wnt y CaP no es la excepción. Existen diversos reportes acerca de la expresión de las proteínas SFRP, así como de la regulación transcripcional de los genes que las codifican por meADN y su implicación en CaP. Con excepción de SFRP2, los diversos reportes muestran resultados controversiales para los genes *SFRP* respecto a su nivel de expresión, así como de su estado de metilación. Aún más, hasta el momento todos estos reportes utilizan como control el tejido adyacente histopatológicamente sano o HPB, en ambos casos pueden ocurrir alteraciones a nivel molecular por lo que es necesario obtener un perfil de expresión de los genes SFRP, así como de su estado de meADN utilizando como control células de próstata normales.

HIPÓTESIS

Debido a que los genes de la familia *SFRP* se han encontrado silenciados por hipermetilación del ADN en su región promotora en muchos tipos de cáncer, entonces es probable que pierdan su expresión en CaP por este mecanismo o ganancia de marcas represivas de histonas como H3K27me3 y H3K9me3.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el nivel de expresión génica, así como los mecanismos de regulación transcripcional de los genes de la familia *SFRP* en CaP.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de los genes de la familia *SFRP* en líneas celulares de próstata humana.
- Determinar la expresión de los genes de la familia *SFRP* en tejidos de CaP, HPB y PN.
- Analizar un set de datos para buscar mutaciones y alteraciones a nivel de expresión génica de los genes de la familia *SFRP*.
- Realizar tratamientos farmacológicos con 5-Aza y Tricostatina A en líneas celulares prostáticas para conocer la expresión de los genes *SFRP* y su posible regulación por meADN o acetilación de histonas.
- Evaluar los niveles de meADN en la región promotora de los genes de la familia *SFRP*.
- En los genes de la familia *SFRP* que no se encuentre meADN en la región promotora, pero si exista pérdida de la expresión, determinar el enriquecimiento de marcas de histonas en la región promotora en líneas celulares de CaP.

Colección de muestras

Se colectaron 10 muestras de tejidos de CaP y 11 HPB en el marco de una colaboración con el Hospital General Manuel Gea González, este protocolo fue avalado por el comité de ética del hospital. Los tejidos con CaP fueron provenientes de una prostatectomía radical y la porción con mayor celularidad tumoral fue otorgada por un patólogo sin comprometer el diagnóstico del paciente. Todas las muestras de tejido de CaP corresponden a tumores primarios y localizados sin metástasis; 9 de los tejidos tienen un grado en escala de Gleason 6 y únicamente una muestra presentó grado Gleason 8. Los tejidos de HPB fueron provenientes de procesos de resección transuretral prostática. Para la utilización de dichos tejidos con fines de investigación, los pacientes firmaron un consentimiento informado. Finalmente los 4 tejidos de próstata normal (PN) fueron obtenidos a través del Servicio Médico Forense (SEMEOF) de la ciudad de México, el uso de este tipo de muestras con fines de investigación está aprobado por la Ley General de Salud de México. Una porción de cada una de las muestras fue almacenada a -80°C y otra fue embebida en parafina y sometida a una segunda evaluación histopatológica. La información acerca de estas muestras se encuentra en el Anexo 1.

Cultivo celular

Las líneas celulares LNCaP, PC3, 22RV1, DU145 y el control de células epiteliales normales RWPE-1 fueron obtenidas de la compañía ATCC. También se utilizaron células epiteliales de próstata (PrEC) y células estromales de próstata (PrSC), ambas obtenidas de la compañía LONZA. En la tabla 6 se encuentran especificadas las características de cada línea celular. Todas las células crecieron a 37°C de temperatura, 5% de CO_2 en condiciones de 10% humedad y se proliferaron y mantuvieron según los procedimientos estándar de cultivo celular.

Tabla 6. Características de las líneas celulares empleadas

Línea celular	Características principales de las líneas celulares
RWPE-1 (Control normal epitelial)	Células epiteliales adherentes de la zona periférica de una próstata histológicamente normal. Fueron transfectadas con una copia de HPV-18 para la inmortalización del cultivo. Expresan AR funcional. Expresan PSA en presencia de andrógenos.
PrEC (Control normal epitelial)	Cultivo primario de células epiteliales prostáticas normales. Expresan AR funcional. Expresan PSA en presencia de andrógenos.
PrSC (Control normal estromal)	Cultivo primario de células estromales prostáticas normales.
LNCaP	Células tomadas de nódulo linfático derivadas de metástasis de CaP. Expresan AR funcional. Expresan PSA en presencia de andrógenos.
PC3	Células tomadas del hueso derivadas de metástasis de CaP. No expresan AR ni PSA.
22RV1	Células epiteliales de CaP propagadas serialmente en ratones castrados. Expresan AR funcional. Expresan PSA en presencia de andrógenos.
DU145	Células tomadas de cerebro derivadas de metástasis de CaP. No expresan AR ni PSA.
VCaP	Células tomadas de vértebra derivadas de metástasis de CaP. Expresan AR funcional. Expresan PSA en presencia de andrógenos.

Tratamientos farmacológicos

Las líneas celulares LNCaP y PC3 fueron tratadas farmacológicamente utilizando el agente hipometilante 5-Aza-2'-Deoxicitidina (5-Aza). Se sembraron las células a una confluencia del 30% y a las 24h se les administró una concentración de 0.5 μ M de 5-Aza, se les hizo cambio de medio y renovación del fármaco cada 48 horas y se colectó el botón celular al día 7 después del sembrado. Esta concentración se determinó después de hacer una curva con diferentes concentraciones de 5-Aza y a 0.5 μ M se observaron efectos sin ser una concentración muy tóxica para las células. Para el tratamiento con el inhibidor de desacetilasas de histonas (TSA) se sembraron las células LNCaP y PC3 al 30% de confluencia, se añadió la TSA al medio a una concentración final de 200nM el

día 6 después de la siembra. Esta concentración se determinó después de hacer una curva con diferentes concentraciones de TSA y no se observaron efectos tóxicos por la adición del fármaco a esta concentración, mientras que se observaron efectos a nivel de expresión génica. Finalmente, se colectó el botón celular a las 24h después del tratamiento. Los tratamientos combinados se realizaron de la misma forma que los individuales y todas las comparaciones se realizaron contra el Vehículo.

RT-qPCR

La obtención del ARN a partir de los cultivos celulares se realizó utilizando el kit *RNeasy miniKit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ARN a partir de los tejidos se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) haciendo la disrupción del tejido con un equipo *tissueruptor* y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se disolvió en agua y se cuantificó en el equipo *NanoDropTM 1000* (Thermo Scientific) a través de la medición de la absorbancia ($\lambda=260$). Se sometieron 2000 ng de ARN a la retrotranscripción utilizando la enzima Superscript (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR se realizó utilizando sondas *Taqman* para los 5 *SFRPs* y *GAPDH* (*SFRP1*: Hs00610060_m1; *SFRP2*: Hs00293258_m1; *SFRP3*: Hs00173503_m1; *SFRP4*: Hs01113716_m1, *SFRP5*: Hs00922242_m1 y *GAPDH*: Hs02786624_g1) con el *qPCR Mastermix* (Fermentas) en el equipo *Viiia 7* (Applied Biosystems). Los datos se analizaron normalizando contra la expresión del gen constitutivo GAPDH por el método $2^{-\Delta Ct}$ (donde $Ct=Ct \text{ gen} - Ct \text{ GAPDH}$).

PCR específica para metilación y secuenciación de bisulfito de sodio

Para evaluar el estado de metilación en la región promotora de los genes de la familia *SFRP*, se realizó la extracción de ADN a partir de los cultivos celulares

utilizando el *DNeasy minikit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Del mismo modo se realizó la extracción de ADN a partir de las muestras de tejido, previa disrupción con nitrógeno líquido. El ADN obtenido se disolvió en agua y se cuantificó en el equipo nanodrop. Se utilizaron 500 ng para la transformación con bisulfito de sodio utilizando *DNA methylation Gold Kit* (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto para la PCR específica para metilación (MSP) como para la PCR para secuenciación con bisulfito, se diseñaron oligonucleótidos utilizando el programa disponible en la red *MethPrimer*. Para la PCR se utilizó la enzima HotStart (Qiagen) siguiendo las condiciones del fabricante con la Tm especificada para cada par de oligonucleótidos (Anexo 2). Para la MSP se realizó una electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de etidio.

Para la secuenciación con bisulfito se purificó la reacción de PCR a partir del gel de agarosa, utilizando el *PCR gel purification Kit* (Qiagen). Se clonó el fragmento en un vector *PGEM Teasy vector*, se transformó el vector en bacterias competentes E. coli JM110 por choque térmico y se crecieron las colonias en medio LB agar Amp+. Se seleccionaron 10 clonas positivas para el inserto de cada muestra, se creció cada colonia en medio líquido LB Amp+ y se purificaron los plásmidos utilizando el *Zyppi plasmid purification Kit* (Zymo Research). Los plásmidos purificados se enviaron a secuenciar a la compañía *Macrogen Inc.* (Seúl, Korea) utilizando oligonucleótidos SP6 y T7. Las secuencias fueron analizadas en el programa BISMA disponible en la red.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP por sus siglas en inglés)

Se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina para determinar el enriquecimiento de las MPT de histonas H3K4me3, H3K27me3 y H3K9me3. Para ello se crecieron las líneas celulares RWPE-1, LNCaP y PC3. Se fijaron con

formaldehído 3×10^6 células, por 10 minutos con agitación ocasional con formaldehído a una concentración final del 1% sin FBS. Las células se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) y se liberó la cromatina con solución amortiguadora de lisis (50mM Tris-HCl, pH=8, 10 mM EDTA, 1% SDS y cocktail inhibidor de proteasas). La cromatina se sonicó para obtener fragmentos entre 100 y 1000 pb, utilizando un instrumento de sonicación modelo *CPX130PB* (Cole Palmer Instruments); para ello se realizaron 12 ciclos de sonicación (20s, 30% de potencia; 20s en hielo). La cromatina se puso en solución amortiguadora de dilución (16.7 mM Tris-HCl, pH=7.5, 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1.1% Tritón X-100 y 0.1% SDS). Posteriormente la cromatina se puso en contacto con perlas de sefarosa acopladas a proteína G, para eliminar las interacciones inespecíficas, esto se realizó durante 1h a 4°C. Después se centrifugaron las perlas con cromatina y se recuperó la cromatina, de esta porción de cromatina se tomaron 10 μ L como control de carga (*input*). Posteriormente, la cromatina se incubó toda la noche a 4°C con cada uno de los diferentes anticuerpos para H3K4me3, H3K27me3 y H3K9me3 (Cell signaling; #9751, #9733 y #5327), de la misma manera se incubó con un anticuerpo inespecífico IgG (Abcam; #ab46540). Para la inmunoprecipitación, los complejos cromatina-anticuerpo se pusieron en contacto con las perlas de sefarosa y proteína G durante 1.5h a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron las perlas, se retiró el sobrenadante y se lavaron con solución amortiguadora baja en sal (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 2mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100 y 0.1% SDS), luego se lavaron con solución amortiguadora alta en sal (20 mM Tris-HCl, pH 8, 2mM EDTA, 500mM NaCl, 1% Tritón X-100 y 0.1% SDS). El siguiente lavado se realizó con solución amortiguadora de LiCl (10mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 1% desoxicolato de sodio, 1% NP-40 y 0.5M LiCl). Finalmente se realizó un lavado, utilizando TE y se recuperó la cromatina con la solución amortiguadora de elución (1% SDS y 0.1M NaHCO₃)

Para revertir el entrecruzamiento por formaldehído, se añadieron 500 μ L de solución de NaCl 5.0 M, se recuperó el sobrenadante y se calentó a 65°C toda la noche. Posteriormente se hizo la extracción de ADN utilizando *DNeasy miniKit* (Qiagen) y se analizaron los resultados por qPCR. Se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos para amplificar la región promotora de *SFRP1* (Anexo 2) y se analizaron los resultados por el método de Fold enrichment $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{ip} - Ct_{mock}$).

Análisis de datos utilizando la herramienta de cBioportal

Se utilizó la base de datos de *cBioportal* utilizando el set de datos del hospital MSKCC para la búsqueda de diferentes alteraciones en los genes de la familia *SFRP*, *EZH1* y *EZH2*. Se buscaron alteraciones a nivel de expresión de mRNA, mutaciones, amplificaciones y deleciones. Los cambios en la expresión génica se consideraron positivos con valores de $z > 1$ (Taylor et al., 2010).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa *Graphpad prism Software V.6*. Se realizó una prueba de normalidad por Kolmogorov-Smirnov, encontrando que los resultados para expresión de líneas celulares fueron los únicos que se distribuyeron de forma normal y no así los resultados para los resultados de ChIP, ni para los resultados de los tejidos ($p < 0.05$). Para las comparaciones entre los resultados de expresión en líneas celulares se utilizó una prueba de ANOVA y comparaciones múltiples con la prueba de Fisher. Para los datos de metilación, ChIP y expresión en muestras de tejidos prostáticos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y una prueba de Dunn para comparaciones múltiples. Los resultados se consideraron significativos con valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE LOS GENES SFRP EN LÍNEAS CELULARES DE PRÓSTATA

Los resultados para la expresión de los genes *SFRP* por RT-qPCR mostraron que los genes de la familia *SFRP*, a excepción de *SFRP1*, presentan una pérdida significativa en las líneas celulares de CaP comparadas con el control PrEC ($p < 0.0001$) (Fig. 11). En el caso de *SFRP1* se observó pérdida de su expresión en células de CaP comparado con el control RWPE-1 ($p < 0.0001$; Fig. 1a).

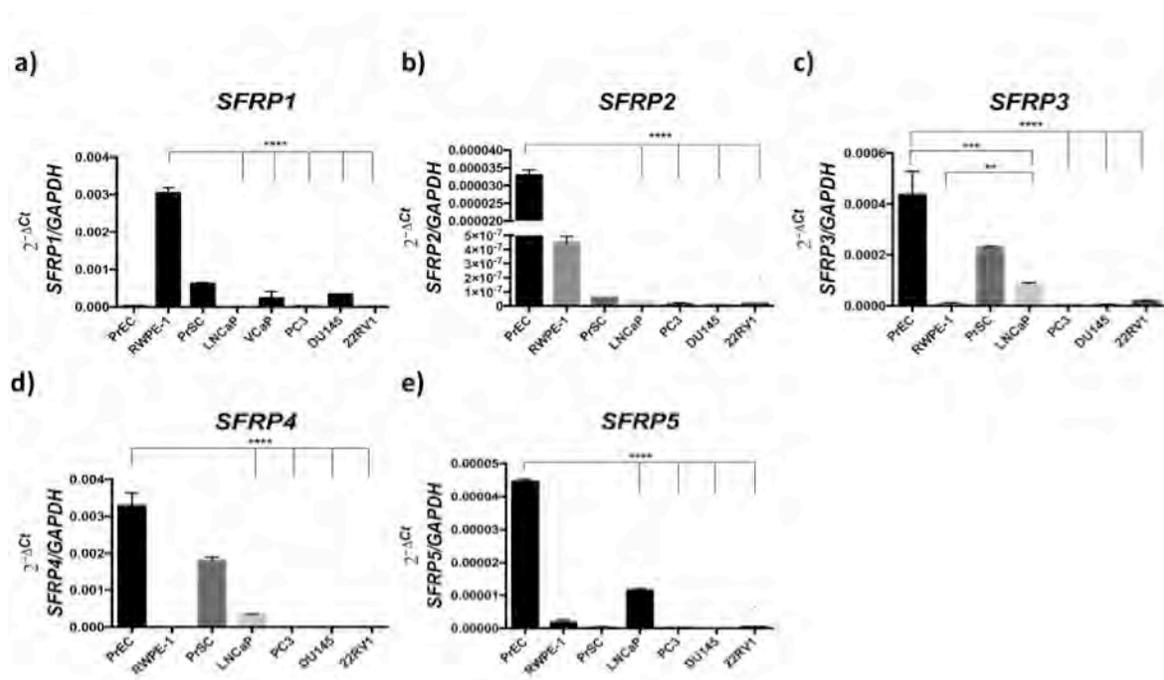


Fig 11. Expresión de los genes *SFRP* en líneas celulares de CaP. En esta figura se observan los resultados de expresión génica de la familia *SFRP* medida por RT-qPCR en las líneas celulares de CaP y las células normales prostáticas, se utilizó el método $2^{-\Delta Ct}$ para el análisis (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$ y (****) $p < 0.0001$.

EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA SFRP EN MUESTRAS DE TEJIDO DE PRÓSTATA

Los resultados de expresión de los genes *SFRP* en los tejidos por RT-qPCR arrojaron que existe pérdida significativa de la expresión de *SFRP1* y *SFRP5* en CaP comparada con PN ($p < 0.01$), además, *SFRP5* también se encuentra

disminuido en HPB ($p < 0.01$) y adicionalmente, se encontró mayor expresión de *SFRP4* en CaP comparado con HPB ($p < 0.01$; Fig 12a, fig 12d y fig 12e). Utilizando el set de datos de MSKCC se confirmó que la pérdida de la expresión de *SFRP1* es la alteración más frecuente para este gen en CaP (Fig 12f). Adicionalmente, se determinó que a excepción de *SFRP5*, hay una tendencia hacia menor expresión de los genes de la familia *SFRP* en tumores metastásicos comparados con tumores primarios (Anexo 3). Finalmente, utilizando estos mismos datos se encontró que la alteración más común en los genes de la familia *SFRP* es a nivel de cambios en los niveles de expresión, ya que no se observaron mutaciones y muy pocas alteraciones a nivel de amplificaciones y deleciones (Fig 12 f).

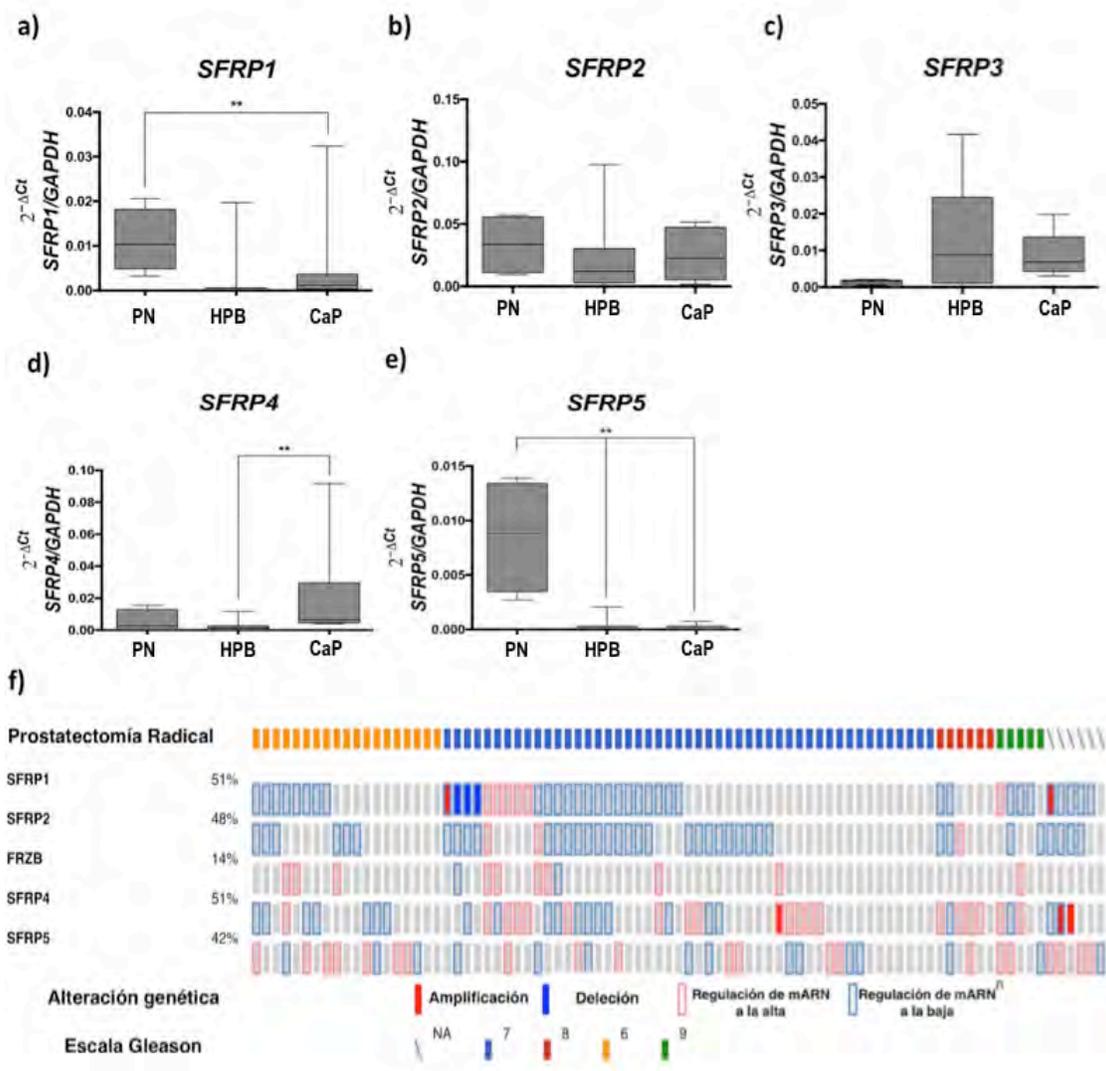


Fig 12. Expresión de los genes SFRP en muestras de CaP. a-e) En esta figura se observan los resultados de expresión génica de la familia SFRP medida por RT-qPCR en las muestras de PN, HPB y CaP. Se utilizó el método $2^{-\Delta Ct}$ para el (** $p < 0.01$). f) Análisis de alteraciones genéticas y de expresión génica de la familia SFRP en CaP utilizando la herramienta *cBioPortal*. Las muestras están acomodadas de izquierda a derecha de menor a mayor escala Gleason (amarillo: Gleason 6; azul: Gleason 7; rojo: Gleason 8 y verde: Gleason 9). Al lado derecho de cada gen se encuentra el porcentaje de pacientes que muestran alteraciones en dicho gen. Cada rectángulo gris representa un paciente. Los cuadros rojos muestran amplificaciones, los azules defecciones, los de contorno rojo incremento en la expresión de ARN y los de contorno azul pérdida de la expresión de ARN.

TRATAMIENTOS CON 5-AZA-2'DEOXYCITIDINA Y TRICOSTATINA

Se realizaron tratamientos con 5-Aza y TSA para determinar la posible influencia de la meADN y de la acetilación de histonas en la regulación transcripcional de los

genes de la familia *SFRP*. Hubo un incremento en la expresión de *SFRP1* en la línea celular LNCaP tratada con 5-Aza ($p < 0.05$); sin embargo, en PC3 se observaron niveles más altos de expresión de *SFRP1* con TSA ($p < 0.01$; Fig 13a). El gen *SFRP2* en LNCaP se sobreexpresó únicamente en presencia de ambos fármacos; mientras que en PC3 *SFRP2* incrementó su expresión por la adición de 5-Aza ($p < 0.001$; Fig 13b). Adicionalmente, el gen *SFRP3* incrementó su expresión en LNCaP en presencia de ambos fármacos, mientras que en PC3 se observó un incremento con 5-Aza ($p < 0.001$), además de un efecto sinérgico con la adición de ambos fármacos ($p < 0.001$). El gen *SFRP4* incrementó su expresión en LNCaP y PC3 en presencia de ambos fármacos ($p < 0.05$; Fig 13d). Finalmente, *SFRP5* únicamente incrementó su expresión en la línea celular PC3 tratada con 5-Aza ($p < 0.01$; Fig 13e).

ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN EN LOS GENES DE LA FAMILIA *SFRP*

En el análisis de metilación por MSP se determinó un incremento en la metilación en todas las líneas celulares de CaP comparadas con PrEC en el promotor de los genes *SFRP2*, *SFRP3* y *SFRP5* (Fig 13f). Mientras que *SFRP1* únicamente se encontró metilado en las líneas celulares PC3 y DU145, sin cambios en LNCaP y 22RV1 comparadas con PrEC (Fig 13f). Los resultados de MSP para *SFRP1*, *SFRP2* y *SFRP5* en las líneas celulares LNCaP y PC3 fueron confirmados por secuenciación con bisulfito de sodio, estas líneas se seleccionaron ya que son las más representativas de CaP, mientras que LNCaP tiene un AR activo y produce PSA, PC3 representa una etapa muy avanzada de CaP con metástasis a hueso y CPRC (Fig 14b, Fig 15b y Fig 16b). Aún más, *SFRP1* disminuyó sus niveles de metilación por la adición de 5-Aza en la línea celular PC3 pero no en LNCaP (Fig 4b). Adicionalmente, se encontró que el tratamiento con 5-Aza efectivamente disminuía los niveles de metilación para los genes *SFRP2* y *SFRP5* en ambas líneas celulares, LNCaP y PC3 (Fig 15b y Fig 16b).

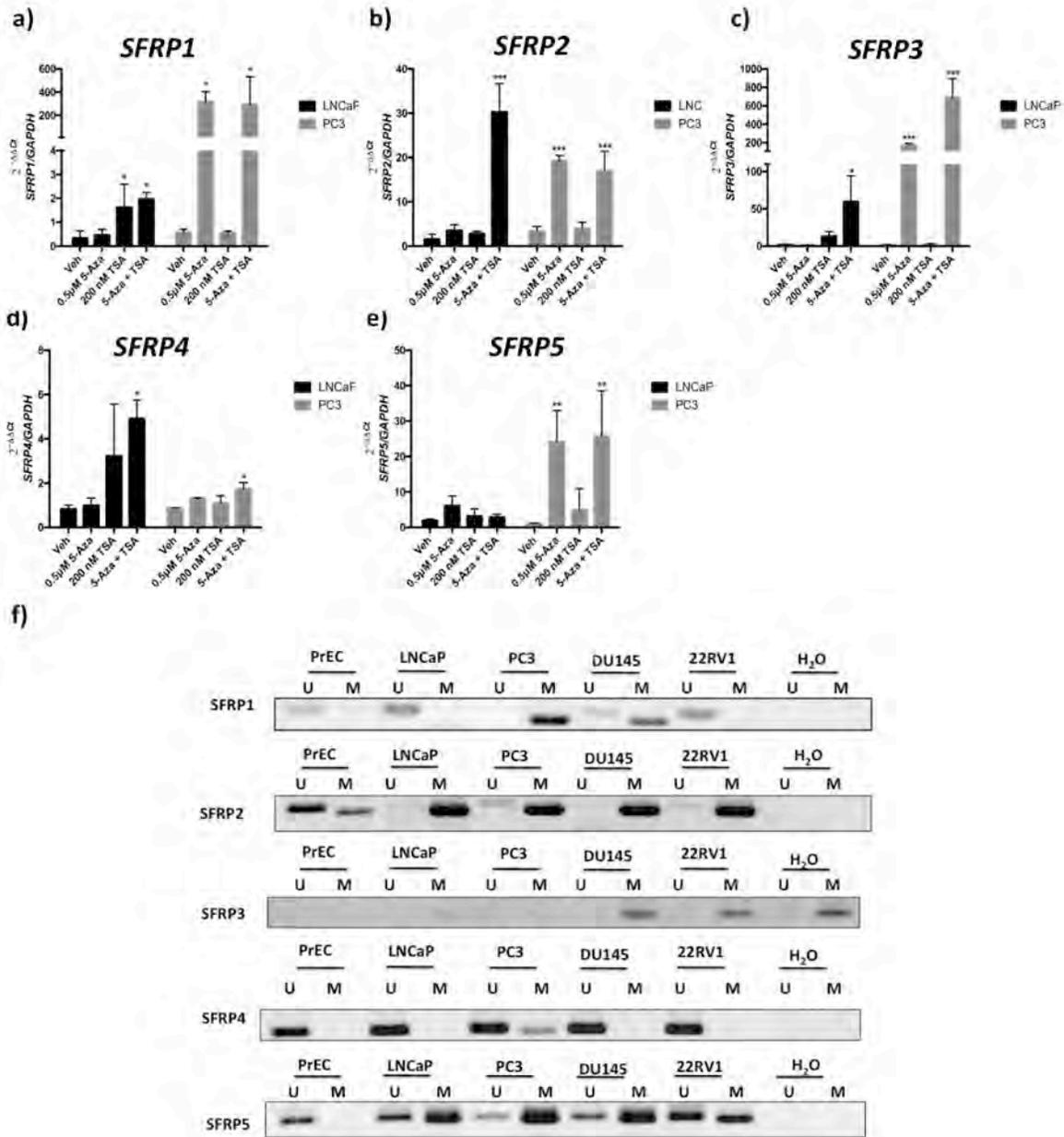


Fig 13. Tratamientos con 5-Aza y TSA y PCR específica de metilación de los genes SFRP. a-e) Se muestran los resultados de RT-qPCR de la expresión de la familia *SFRP* en LNCaP y PC3 tratadas con 5-Aza y TSA. (*) $p < 0.05$. (**) $p < 0.01$. (***) $p < 0.001$. f) Se muestran los resultados de MSP de los genes SFRP en líneas celulares de CaP.

Veh: Vehículo, 5-Aza: 5-Aza-2'-Deoxicitidina, TSA: Tricostatina A, U:Desmetilado y M:Metilado

SFRP1

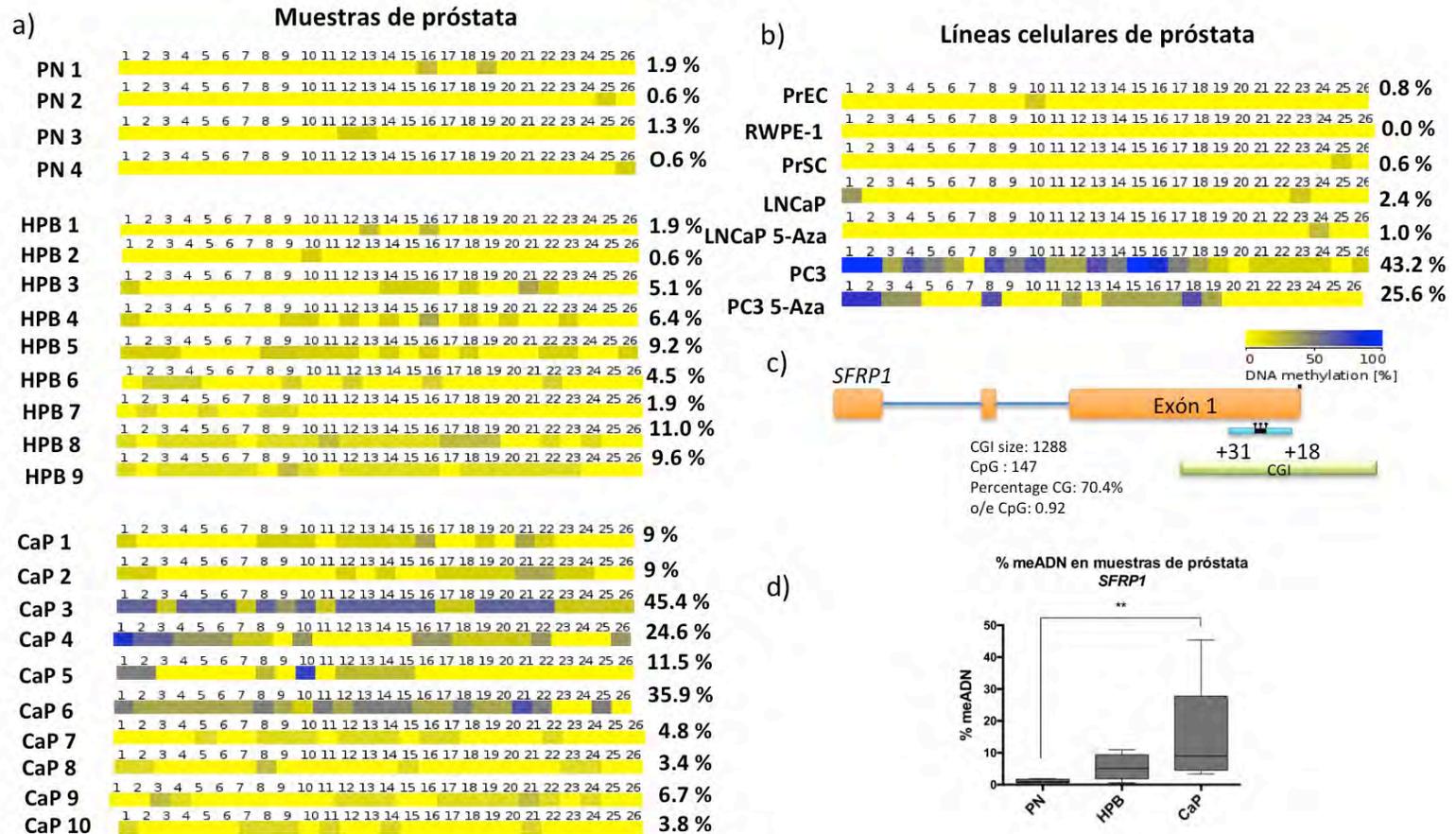


Fig 14. Metilación del ADN en el promotor de SFRP1. Cada cuadro representa un sitio CpG de la región evaluada a) Metilación de SFRP1 en muestras de PN, HPB y CaP. b) Metilación en el promotor de SFRP1 en líneas celulares de próstata y escala de color de % de meADN. C) Mapa de oligonucleótidos empleados para evaluar la metilación en el promotor de SFRP1. D) Análisis de % de metilación del ADN en las muestras de próstata PN, HPB y CaP. (**) $p < 0.01$.

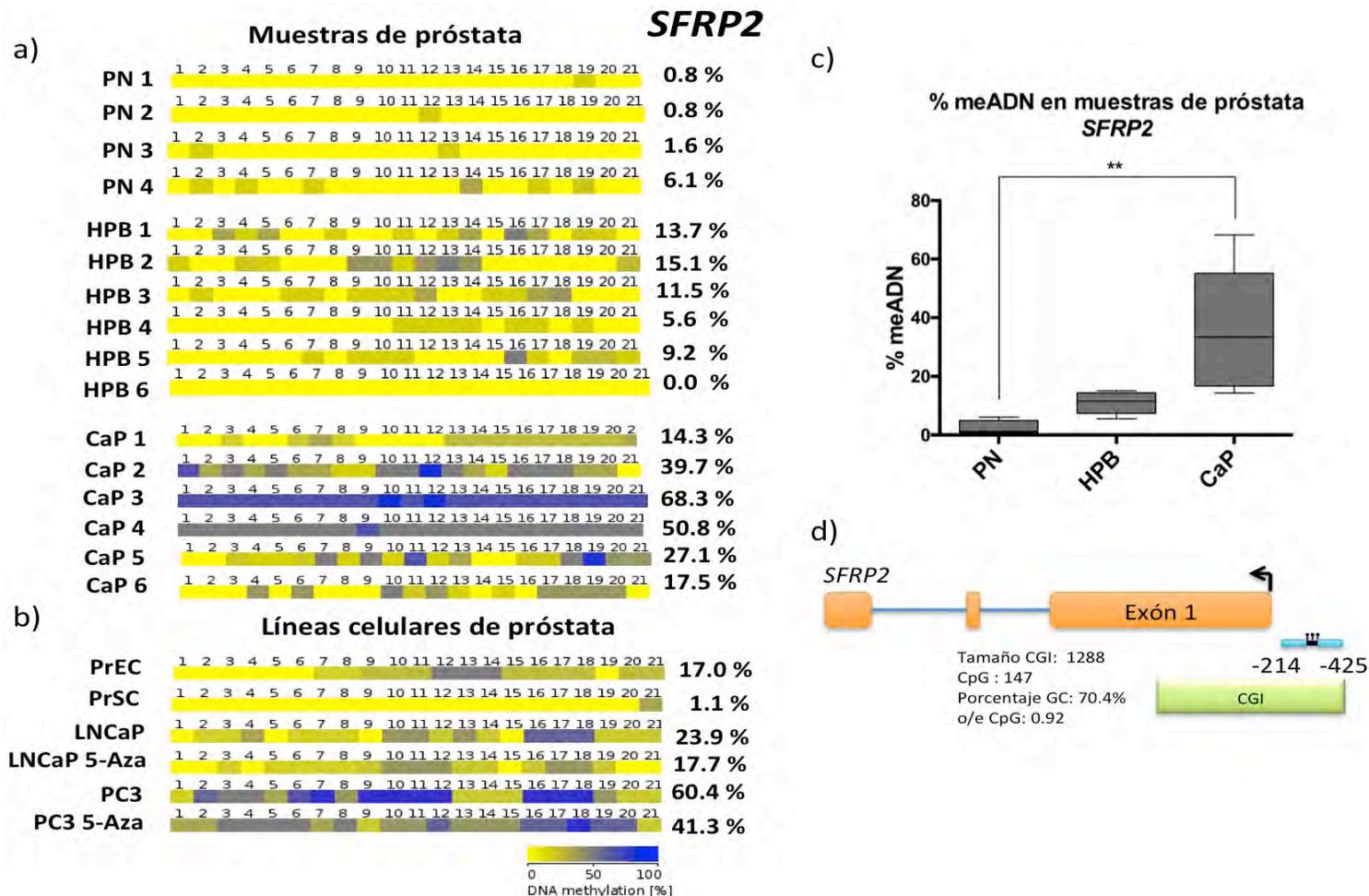


Fig 15. Metilación del ADN en el promotor de *SFRP2*. Cada cuadro representa un sitio CpG de la región evaluada a) Metilación de *SFRP2* en muestras de PN, HPB y CaP. b) Metilación en el promotor de *SFRP2* en líneas celulares de próstata y escala de color de % de meADN. C) Mapa de oligonucleótidos empleados para evaluar la metilación en el promotor de *SFRP2*. D) Análisis de % de metilación del ADN en las muestras de próstata PN, HPB y CaP. (**) $p < 0.01$.

Posteriormente se evaluó el estado de meADN en las diferentes muestras de tejido, los resultados de MSP indicaron los menores niveles de meADN en los promotores de *SFRP3*, *SFRP4* y *SFRP5* en PN, con un incremento en las muestras de BPH y los mayores niveles de metilación en CaP (Anexo 4). En los genes *SFRP1*, *SFRP2* y *SFRP5* se encontró una ganancia significativa en la meADN de sus promotores en CaP comparada con PN ($p < 0.05$; Fig 14a, Fig 14b, Fig 15a, Fig 15b, Fig 16a y Fig 16b).

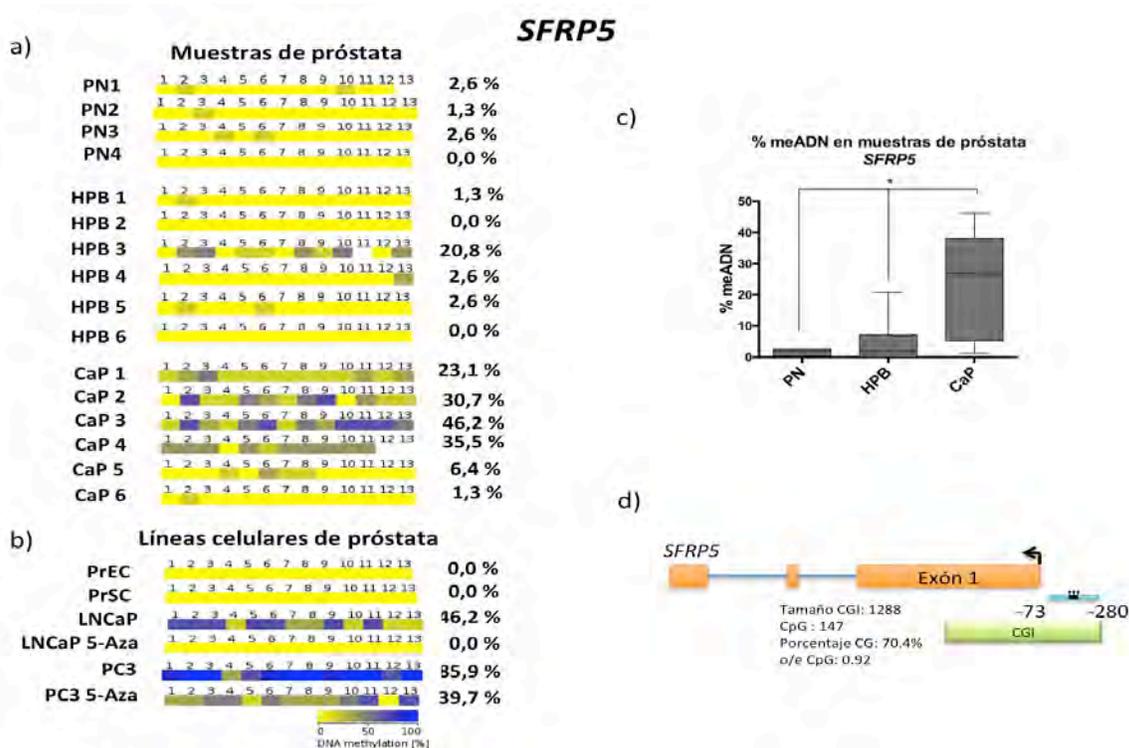


Fig 16. Metilación del ADN en el promotor de *SFRP5*. Cada cuadro representa un sitio CpG de la región evaluada a) Metilación de *SFRP5* en muestras de PN, HPB y CaP. b) Metilación en el promotor de *SFRP5* en líneas celulares de próstata y escala de color de % de meADN. c) Mapa de oligonucleótidos empleados para evaluar la metilación en el promotor de *SFRP5*. d) Análisis de % de metilación del ADN en las muestras de próstata PN, HPB y CaP. (**) $p < 0.01$.

ENRIQUECIMIENTO DE H3K27ME3 EN EL PROMOTOR DE *SFRP1*

En la línea celular LNCaP no se encontró meADN en el promotor de *SFRP1* pero sí represión transcripcional. Para determinar el mecanismo por el que esto ocurría,

se analizó el enriquecimiento de las MPT de histonas H3K4me3, H3K27me3 y H3K9me3 por ChIP. Para ello se evaluaron 3 regiones localizadas a -2000 pb del TSS (R1, R2 y R3) utilizando las líneas celulares RWPE-1, LNCaP y PC3 (Fig 17a y anexo 5). Los resultados arrojaron pérdida del enriquecimiento de H3K4me3 en el promotor de *SFRP1* en LNCaP y PC3 comparadas con RWPE-1 en R1 y R2 ($p < 0.01$; Fig 17b y Fig 17c). Interesantemente, se observó un drástico incremento de la marca represiva H3K27me3 en LNCaP en las 3 regiones evaluadas ($p < 0.0001$; Fig 17b, Fig 17c y anexo 5) y no se encontró ningún cambio en el enriquecimiento de H3K9me3.

Para comprender mas a fondo el mecanismo de silenciamiento de *SFRP1* por ganancia de H3K27me3, en los datos del MSKCC se buscaron alteraciones en EZH1 y EZH2, las subunidades de PRC2 que catalizan la trimetilación de H3K27. Interesantemente se encontró ganancia en la expresión de *EZH2* en el 88% de las muestras de CaP y pérdida de *EZH1* en el 53% de las muestras que se correlaciona con la pérdida de expresión de *SFRP1* en el 51% de las muestras (Fig 17d).

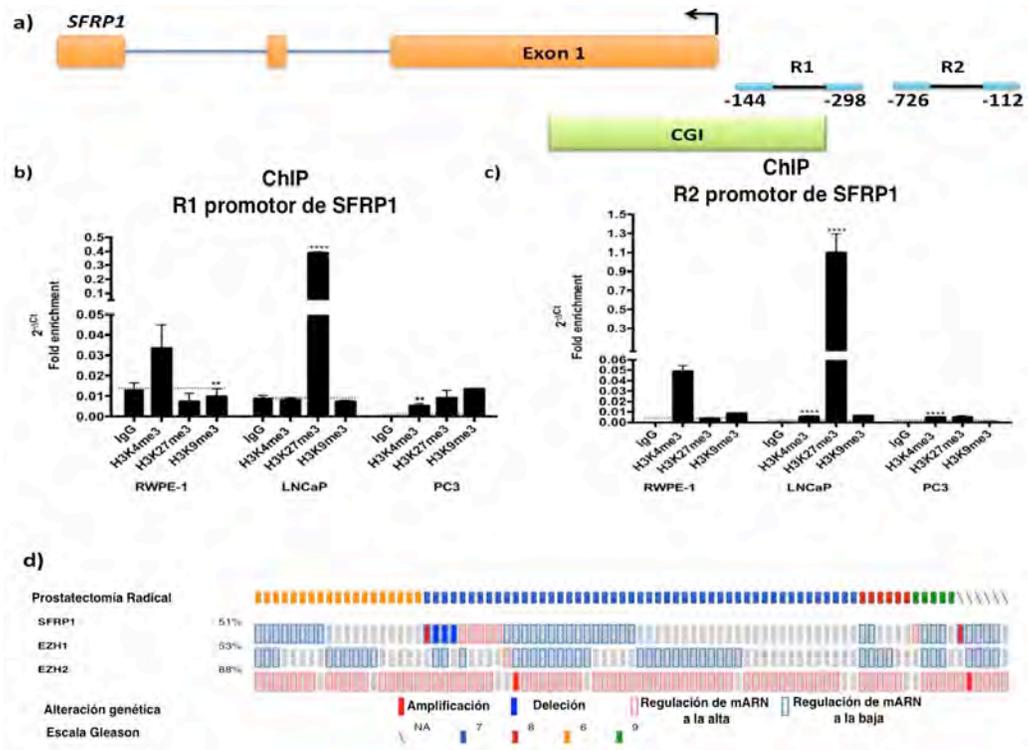


Fig 17. Enriquecimiento de MPT de histonas en el promotor de *SFRP1*. a) Mapa de la localización de los oligonucleótidos para el estudio de las regiones R1 y R2. b y c) Enriquecimiento de H3K4me3, H3K27me3 y H3K9me3 en las regiones 1 y 2 (R1 y R2) de las líneas celulares RWPE-1, LNCaP y PC3. El análisis de datos se llevó a cabo por el método del Fold-enrichment. (**) $p < 0.01$ y (****) $p < 0.0001$.

DISCUSIÓN

El análisis realizado con el set de datos de MSKCC mostró que las mutaciones, amplificaciones y deleciones de los genes de la familia *SFRP* no son un mecanismo que se observe con frecuencia en CaP; aún más, soportan que los cambios en los niveles de la expresión génica son las alteraciones más comunes en los genes de esta familia y fortalece la hipótesis de las que las modificaciones epigenéticas son los principales actores en la desregulación de los genes *SFRP*. Nuestros resultados mostraron que existe hipermetilación en la región promotora de los genes *SFRP2* y *SFRP5* en los tejidos de CaP comparados con PN. Dichos hallazgos correlacionan con lo reportado por Perry *et al* (2013). Respecto a la expresión de *SFRP2* no se encontraron diferencias significativas en los tejidos estudiados, sin embargo, en el set de datos de MSKCC se observa que la alteración más frecuente de *SFRP2* es pérdida de la expresión. Adicionalmente, se observó que la expresión de *SFRP5* estaba disminuida en BPH y CaP, a diferencia de Perry *et al*. (2013) que no reportan diferencias entre CaP y PN; es importante mencionar que nuestro control corresponde a próstatas normales y no a tejido benigno adyacente histológicamente sano, este último puede presentar alteraciones moleculares, esto puede explicar porqué en sus resultados no se encuentran diferencias en la expresión de *SFRP5* y en nuestros resultados si se observan. Los resultados tanto de metilación como de expresión de *SFRP2* y *SFRP5* se confirmaron en las líneas celulares de CaP. Aún más, *SFRP2* ha sido estudiado en CaP como un gen supresor tumoral capaz de inducir apoptosis si se reexpresa en CaP, por lo que el silenciamiento de *SFRP2* por hipermetilación del ADN tiene un impacto directo en el desarrollo de la enfermedad (Placencio *et al.*, 2010). Adicionalmente, los niveles de meADN en los promotores de *SFRP2* y *SFRP5* discriminan mejor entre PN y CaP que los niveles de expresión, por lo cual la meADN en los promotores de estos genes podría ser evaluada como biomarcador de CaP en una cohorte más grande de pacientes.

Aunque no encontramos diferencias significativas en la expresión de *SFRP3*, en el set de datos de MSKCC, se confirmó que la mayor parte de las alteraciones en *SFRP3* en CaP corresponden a ganancia de la expresión, sin embargo, ocurren a una frecuencia muy baja lo que explica que no se hayan encontrado diferencias en nuestros tejidos aunque si se puede observar una tendencia. Además, *SFRP4* mostró mayor expresión en CaP que en BPH, estos hallazgos corroboran los reportes previos en tejidos de CaP en los cuales incluso se ha propuesto la sobreexpresión de *SFRP4* como un biomarcador de mal pronóstico y de recurrencia bioquímica de CaP (Wissmann et al., 2003; Horvath et al., 2004; Yip et al., 2011; Perry et al., 2013; Mortensen et al., 2015). Contrario a lo esperado, en las muestras de tejido de CaP y HPB se observan los mayores niveles de metilación comparados con NP, lo cual sugiere que los genes *SFRP3* y *SFRP4* no se regulan por el mecanismo de meADN que conocemos tradicionalmente, en donde la hipermetilación reprime transcripcionalmente. Sin embargo, estos resultados no se reflejaron en las líneas celulares de CaP, lo que sugiere que dichas observaciones se podrían deber al proceso de inmortalización y no a lo que ocurre en el tejido. Por lo anterior, se debe de tener cuidado con las interpretaciones que se realizan a partir de las líneas celulares de CaP para estos genes en donde se reportan como genes supresores de tumores que pierden su expresión en CaP (Zi et al., 2005; Horvath et al., 2007). En conclusión, tanto la metilación en los promotores de *SFRP3* y *SFRP4*, como la expresión de *SFRP4* podrían ser evaluados como potenciales biomarcadores de CaP en una cohorte mayor.

Nuestros resultados mostraron una pérdida de la expresión génica de *SFRP1* en muestras de CaP y esto se confirmó en el set de datos de MSKCC. Esta represión correlacionó con un aumento significativo de la meADN en el promotor de *SFRP1* en los tejidos de CaP comparados con NP, aunque si se observan detenidamente los resultados de meADN en cada una de las muestras, algunas de ellas muestran niveles comparables con los de BPH, sugiriendo que *SFRP1* no siempre se

encuentra hipermetilado en CaP. Adicionalmente, no en todas en las líneas celulares se replicaron los resultados de meADN en el promotor de *SFRP1*. Sorpresivamente, en LNCaP y 22RV1 no se encontró meADN en *SFRP1*, pero sí en el resto de las líneas celulares. Además, a diferencia de PC3, el tratamiento con 5-Aza en LNCaP no modificó la expresión de *SFRP1*. Estos resultados en conjunto permitieron plantear la hipótesis de que existen diferentes mecanismos de represión transcripcional de *SFRP1* en LNCaP y PC3. Particularmente en PC3 se determinó que la represión transcripcional es mediada por un incremento en la meADN, pero esto no explicó las observaciones en LNCaP. Como era de esperarse, tanto en LNCaP y PC3 se encontró pérdida de la marca característica de promotores activos H3K4me3 y muy interesantemente, se encontró una ganancia significativa H3K27me3 en el promotor de *SFRP1* únicamente en LNCaP y no en PC3. Estos resultados permitieron concluir que la marca H3K27me3 es la responsable del silenciamiento de *SFRP1* en LNCaP y que probablemente en las muestras de CaP que no presentan hipermetilación el gen *SFRP1* podría estar silenciado por este mecanismo. Finalmente, LNCaP representa un estadio menos avanzado de CaP a diferencia de PC3 que corresponde a una metástasis ósea de CaP, lo que permite suponer que probablemente una ganancia previa aberrante de H3K27me3 precede hipermetilación de *SFRP1* en estadios más avanzados de CaP.

La sobreexpresión de EZH2, la subunidad catalítica de PRC2, ha sido ampliamente descrita en CaP. Sin embargo, el homólogo de EZH2, EZH1, también puede ser responsable de dicha modificación y no existen reportes en CaP respecto a su expresión. En el set de datos de MSKCC se confirmó en el 88% de las muestras de CaP la sobreexpresión de *EZH2* e intrigantemente la subexpresión de *EZH1* en el 53% de las muestras. Se han descrito numerosos genes en CaP que pierden su expresión por una ganancia aberrante de H3K27me3, sin embargo aún se desconocen los mecanismos que conllevan a la represión por este mecanismo y aún queda pendiente por determinar si las

alteraciones en la expresión de EZH1 y/o EZH2 son suficientes para el establecimiento aberrante de esta marca en regiones genómicas particulares en CaP. Respecto a la pérdida de la expresión génica de *EZH1* que se observó en el set de MSKCC en las muestras de CaP, aún quedan muchas cuestiones por investigar para conocer más acerca de su posible implicación en CaP, sin embargo este es el primer reporte de alteraciones en *EZH1*.

Los tratamientos con 5-Aza y TSA en LNCaP y PC3 indujeron efectos distintos en la expresión de los genes de la familia *SFRP*, mostrando en algunos casos la potencial participación del mecanismo de acetilación y desacetilación de histonas. Lo anterior podría sugerir la influencia de mecanismos epigenéticos distintos entre ambas líneas celulares sobre la expresión de los genes *SFRP*, tal como se demostró para *SFRP1*, en este sentido, otras MPT de histonas no evaluadas en este trabajo podrían estar participando y probablemente en diferentes tipos de tumor los mecanismos epigenéticos alterados pueden ser distintos y hasta podrían ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de CaP. Pero esta hipótesis tiene que tomarse con cuidado, ya que el efecto de la 5-Aza depende de las duplicaciones celulares y la tasa de replicación entre ambas líneas celulares no es la misma, por lo que el efecto de los fármacos podría verse alterado por esta situación, adicionalmente los efectos de la 5-Aza y la TSA ocurren a nivel global y también los cambios en la expresión génica por estos fármacos pudieran deberse a efectos inespecíficos. Adicionalmente, las estrategias experimentales para abordar las MPT de histonas en una región genómica en particular, aún son muy complicadas de llevar a cabo y arrojan resultados semicuantitativos, por lo que para el estudio de la MPT desde esta perspectiva, se deben desarrollar nuevos métodos experimentales o adaptar y mejorar los ya existentes.

Uno de los principales actores en CaP es el RA y particularmente para *SFRP1*, se observó incremento de H3K27me3 en la línea celular LNCaP, la cual expresa un RA activo. Además, la línea celular 22RV1, con expresión de AR activo, también

mostró pérdida de *SFRP1* sin meADN, lo que sugirió fuertemente la participación del mismo mecanismo de represión que se observa en LNCaP. Uno de los mecanismos por los que el RA reprime la transcripción génica de sus genes blanco, es por la atracción de proteínas del complejo PRC2, el cual establece la H3K27me3. Lo que permitió reforzar esta hipótesis es el hallazgo de un ARE en el promotor de *SFRP1* (Datos no mostrados), reforzando que probablemente el AR podría estar involucrado en la represión transcripcional de *SFRP1* por PRC2. Para demostrar esta hipótesis, se tendrían que realizar diversos experimentos para inhibir el AR utilizando diversas estrategias.

La cohorte de pacientes empleada en este trabajo fue exploratoria y el tamaño de la población estudiada es pequeño. Adicionalmente, en este trabajo únicamente se emplearon muestras de tumores primarios, sin metástasis y con grado 6 en escala de *Gleason*, pero otras variables de la enfermedad no fueron evaluadas, dado que las líneas celulares muestran varias diferencias en su comportamiento a nivel de la regulación transcripcional de los genes de la familia *SFRP*, entonces es probable que el estudio de la meADN, así como de otras modificaciones epigenéticas, incluyendo otras variables de diagnóstico y pronóstico, pudieran arrojar diferencias que permitan estratificar los tumores de CaP. Como variables adicionales se podrían estudiar los niveles PSA sérico, tiempo de supervivencia, respuesta a tratamiento y respuesta a la terapia de castración androgénica, entre otras. La utilidad de la estratificación de los tumores cancerosos radica en la posibilidad de tener en algún futuro terapias específicas para distintos tumores, ya que no todos los pacientes evolucionan y responden de la misma forma a un tratamiento en particular. En soporte a que los niveles de expresión y las alteraciones epigenéticas en los genes de la familia *SFRP* pudieran ser indicadores de este tipo, en el Anexo 3 de este trabajo se observa que los tumores metastásicos tienden hacia niveles menores de expresión para los genes de la familia *SFRP*, únicamente con excepción de *SFRP5*; lo cual puede ser indicativo de la participación de distintos mecanismos epigenéticos en el avance de la

enfermedad. Cabe mencionar que notoriamente, las diferencias que se observan a nivel de cambios en los niveles de meADN son mucho mayores que las que se observan con los niveles de expresión génica y que incluso permiten observar diferencias entre HPB y CaP que no se observaron en algunos casos con los valores de expresión génica, por lo que podrían ser mejores biomarcadores para CaP. Para el uso de la expresión de los genes *SFRP* y sus modificaciones epigenéticas como potenciales biomarcadores, se tendrían que estudiar los niveles de expresión y las marcas epigenéticas en sus promotores en muestras biológicas de acceso más fácil como son la sangre y la orina o considerar el uso de muestras obtenidas por biopsia.

Finalmente, la ruta WNT tiene una implicación muy importante en la proliferación y diferenciación celular y su activación aberrante favorece los procesos oncogénicos en CaP, por lo tanto la pérdida de la expresión de los genes de la familia *SFRP* podría tener un impacto directo en el desarrollo de la enfermedad, apuntando hacia el posible uso estos genes como potenciales blancos terapéuticos. En conclusión, el estudio de los genes *SFRP* desde diferentes puntos, podría expandir las posibilidades para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento que existen para CaP, pudiendo brindar así mejores expectativas de supervivencia y/o calidad de vida a los pacientes que padecen esta enfermedad.

CONCLUSIONES

- Las principales alteraciones de los genes de la familia *SFRP* en CaP son cambios en sus niveles de expresión y en muy pocas ocasiones se observan alteraciones genéticas como mutaciones, amplificaciones o deleciones.
- Es frecuente la hipermetilación del ADN en tejidos y líneas celulares de CaP en los promotores de los genes de la familia *SFRP*.
- El gen *SFRP5* está subexpresado en CaP comparado con NP tanto en tejidos como líneas celulares de CaP.
- El gen *SFRP4* está sobreexpresado en tejidos de CaP comparado con los de BPH; ninguna de las líneas celulares que se usan generalmente como modelo de CaP reflejan estos resultados
- El gen *SFRP1* tiene su expresión disminuída en CaP y esto puede ocurrir por dos mecanismos distintos, uno que involucra hipermetilación del promotor y otro que implica ganancia aberrante de H3K27me3; esto último se determinó en líneas celulares modelo de CaP y podría extrapolarse a los tejidos.

- Analizar los niveles de expresión, el estado de meADN y diversas MPT de histonas de los genes de la familia *SFRP* en una cohorte mayor de pacientes con CaP, analizando más variables que permitan una mejor estratificación tumoral.
- Determinar los niveles de expresión y el estado de meADN en muestras biológicas como sangre y orina para estudiar su posible uso como biomarcadores de CaP
- Realizar experimentos de inhibición farmacológica y a nivel de proteína del RA en modelos celulares *in vitro* y observar los efectos en la expresión de *SFRP1*.
- Realizar experimentos de inhibición y sobreexpresión de EZH1 y EZH2 en modelos celulares *in vitro* y su efecto en la regulación transcripcional génica utilizando plataformas de alta tecnología.

REFERENCIAS

- Adhyam, M. and Gupta, A.K., 2012. A Review on the Clinical Utility of PSA in Cancer Prostate. *Indian J Surg Oncol* 3, 120-9.
- Aran, D., Sabato, S. and Hellman, A., 2013. DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biol* 14, R21.
- Ariumi, Y., 2016. Guardian of the Human Genome: Host Defense Mechanisms against LINE-1 Retrotransposition. *Front Chem* 4, 28.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21, 381-95.
- Barfeld, S.J., East, P., Zuber, V. and Mills, I.G., 2014. Meta-analysis of prostate cancer gene expression data identifies a novel discriminatory signature enriched for glycosylating enzymes. *BMC Med Genomics* 7, 513.
- Bhasin, J.M., Lee, B.H., Matkin, L., Taylor, M.G., Hu, B., Xu, Y., Magi-Galluzzi, C., Klein, E.A. and Ting, A.H., 2015. Methylome-wide Sequencing Detects DNA Hypermethylation Distinguishing Indolent from Aggressive Prostate Cancer. *Cell Rep* 13, 2135-46.
- Bock, C., Walter, J., Paulsen, M. and Lengauer, T., 2007. CpG island mapping by epigenome prediction. *PLoS Comput Biol* 3, e110.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E. and Lopez-Rios, J., 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121, 737-46.
- Buck-Koehntop, B.A. and Defossez, P.A., 2013. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics* 8, 131-7.
- Campbell-Walsh, 2008. *Urología*, 9 ed. Editorial médica panamericana, Madrid, España.
- Cancer, S.A., 2016. prostate cancer.
<http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-signs-symptoms>.
- Choi, J.K., 2010. Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. *Genome Biol* 11, R70.
- Costa, V.L., Henrique, R., Ribeiro, F.R., Carvalho, J.R., Oliveira, J., Lobo, F., Teixeira, M.R. and Jeronimo, C., 2010. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer. *Epigenetics* 5, 343-51.
- Coutinho-Camillo, C.M., Miracca, E.C., dos Santos, M.L., Salaorni, S., Sarkis, A.S. and Nagai, M.A., 2006. Identification of differentially expressed genes in prostatic

epithelium in relation to androgen receptor CAG repeat length. *Int J Biol Markers* 21, 96-105.

- Cruciat, C.M. and Niehrs, C., 2013. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a015081.
- Deichmann, U., 2016. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. *Dev Biol* 416, 249-54.
- El-Amm, J. and Aragon-Ching, J.B., 2016. Targeting Bone Metastases in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Med Insights Oncol* 10, 11-9.
- Ellinger, J., Kahl, P., von der Gathen, J., Rogenhofer, S., Heukamp, L.C., Gutgemann, I., Walter, B., Hofstadter, F., Buttner, R., Muller, S.C., Bastian, P.J. and von Ruecker, A., 2010. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. *Prostate* 70, 61-9.
- Ernst, J., Kheradpour, P., Mikkelson, T.S., Shoresh, N., Ward, L.D., Epstein, C.B., Zhang, X., Wang, L., Issner, R., Coyne, M., Ku, M., Durham, T., Kellis, M. and Bernstein, B.E., 2011. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* 473, 43-9.
- Feldman, B.J. and Feldman, D., 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.
- Felsenfeld, G., 2014. A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. and Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-86.
- Flori, A.R., Steinhoff, C., Muller, M., Seifert, H.H., Hader, C., Engers, R., Ackermann, R. and Schulz, W.A., 2004. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer* 91, 985-94.
- Fournier, A., Sasai, N., Nakao, M. and Defossez, P.A., 2012. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. *Brief Funct Genomics* 11, 251-64.
- Gifford, C.A., Ziller, M.J., Gu, H., Trapnell, C., Donaghey, J., Tsankov, A., Shalek, A.K., Kelley, D.R., Shishkin, A.A., Issner, R., Zhang, X., Coyne, M., Fostel, J.L., Holmes, L., Meldrim, J., Guttman, M., Epstein, C., Park, H., Kohlbacher, O., Rinn, J., Gnirke, A., Lander, E.S., Bernstein, B.E. and Meissner, A., 2013. Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell* 153, 1149-63.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.L. and Song, H., 2011. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423-34.

- Harikumar, A. and Meshorer, E., 2015. Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. *EMBO Rep* 16, 1609-19.
- Health, P., 2012. How does the prostate work?
- Heyn, H., Vidal, E., Ferreira, H.J., Vizoso, M., Sayols, S., Gomez, A., Moran, S., Boque-Sastre, R., Guil, S., Martinez-Cardus, A., Lin, C.Y., Royo, R., Sanchez-Mut, J.V., Martinez, R., Gut, M., Torrents, D., Orozco, M., Gut, I., Young, R.A. and Esteller, M., 2016. Epigenomic analysis detects aberrant super-potenciador DNA methylation in human cancer. *Genome Biol* 17, 11.
- Hodge, K.K., McNeal, J.E. and Stamey, T.A., 1989. Ultrasound guided transrectal core biopsies of the palpably abnormal prostate. *J Urol* 142, 66-70.
- Horvath, L.G., Henshall, S.M., Kench, J.G., Saunders, D.N., Lee, C.S., Golovsky, D., Brenner, P.C., O'Neill, G.F., Kooner, R., Stricker, P.D., Grygiel, J.J. and Sutherland, R.L., 2004. Membranous expression of secreted frizzled-related protein 4 predicts for good prognosis in localized prostate cancer and inhibits PC3 cellular proliferation in vitro. *Clin Cancer Res* 10, 615-25.
- Horvath, L.G., Lelliott, J.E., Kench, J.G., Lee, C.S., Williams, E.D., Saunders, D.N., Grygiel, J.J., Sutherland, R.L. and Henshall, S.M., 2007. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer. *Prostate* 67, 1081-90.
- Humphrey, P.A., 2004. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol* 17, 292-306.
- IMSS, 2015. Cáncer de próstata. IMSS, pp. estadísticas en México de cáncer de próstata.
- Joesting, M.S., Cheever, T.R., Volzing, K.G., Yamaguchi, T.P., Wolf, V., Naf, D., Rubin, J.S. and Marker, P.C., 2008. Secreted frizzled related protein 1 is a paracrine modulator of epithelial branching morphogenesis, proliferation, and secretory gene expression in the prostate. *Dev Biol* 317, 161-73.
- Joesting, M.S., Perrin, S., Elenbaas, B., Fawell, S.E., Rubin, J.S., Franco, O.E., Hayward, S.W., Cunha, G.R. and Marker, P.C., 2005. Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. *Cancer Res* 65, 10423-30.
- Jones, P.A., 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 13, 484-92.
- Kawano, Y., Diez, S., Uysal-Onganer, P., Darrington, R.S., Waxman, J. and Kypka, R.M., 2009. Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *Br J Cancer* 100, 1165-74.
- Ke, X.S., Qu, Y., Rostad, K., Li, W.C., Lin, B., Halvorsen, O.J., Haukaas, S.A., Jonassen, I., Petersen, K., Goldfinger, N., Rotter, V., Akslen, L.A., Oyan, A.M. and Kalland,

- K.H., 2009. Genome-wide profiling of histone h3 lysine 4 and lysine 27 trimethylation reveals an epigenetic signature in prostate carcinogenesis. *PLoS One* 4, e4687.
- Kilinc, D., Ozdemir, O., Ozdemir, S., Korgali, E., Koksall, B., Uslu, A. and Gultekin, Y.E., 2012. Alterations in promoter methylation status of tumor suppressor HIC1, SFRP2, and DAPK1 genes in prostate carcinomas. *DNA Cell Biol* 31, 826-32.
- Kim, J.H., Dhanasekaran, S.M., Prensner, J.R., Cao, X., Robinson, D., Kalyana-Sundaram, S., Huang, C., Shankar, S., Jing, X., Iyer, M., Hu, M., Sam, L., Grasso, C., Maher, C.A., Palanisamy, N., Mehra, R., Kominsky, H.D., Siddiqui, J., Yu, J., Qin, Z.S. and Chinnaiyan, A.M., 2011. Deep sequencing reveals distinct patterns of DNA methylation in prostate cancer. *Genome Res* 21, 1028-41.
- Kohli, R.M. and Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472-9.
- Li, G. and Reinberg, D., 2011. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 21, 175-86.
- Li, J., Huang, K.L., Zhang, T., Li, H., Zhao, J. and Wang, H., 2016. Pan-cancer methylation and expression profiling of adenocarcinomas revealed epigenetic silencing in the WNT signaling pathway. *Neoplasia* 63, 208-14.
- Lin, P.C., Giannopoulou, E.G., Park, K., Mosquera, J.M., Sboner, A., Tewari, A.K., Garraway, L.A., Beltran, H., Rubin, M.A. and Elemento, O., 2013. Epigenomic alterations in localized and advanced prostate cancer. *Neoplasia* 15, 373-83.
- Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Diebold, J. and Hermeking, H., 2005. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 65, 4218-27.
- Maitland, N.J., 2013. Stem cells in the normal and malignant prostate, in: Tindall, D.J. (Ed.), *Prostate cancer: Biochemistry, Molecular Biology and Genetics*. Springer, Rochester, MN, USA
- Margueron, R. and Reinberg, D., 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343-9.
- Maunakea, A.K., Chepelev, I., Cui, K. and Zhao, K., 2013. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res* 23, 1256-69.
- Messiou, C., Cook, G. and deSouza, N.M., 2009. Imaging metastatic bone disease from carcinoma of the prostate. *Br J Cancer* 101, 1225-32.
- Mortensen, M.M., Hoyer, S., Lynnerup, A.S., Orntoft, T.F., Sorensen, K.D., Borre, M. and Dyrskjot, L., 2015. Expression profiling of prostate cancer tissue delineates genes associated with recurrence after prostatectomy. *Sci Rep* 5, 16018.

- Neri, F., IncaARNto, D. and Oliviero, S., 2015. DNA methylation and demethylation dynamics. *Oncotarget* 6, 34049-50.
- Ngollo, M., Lebert, A., Dagdemir, A., Judes, G., Karsli-Ceppioglu, S., Daures, M., Kemeny, J.L., Penault-Llorca, F., Boiteux, J.P., Bignon, Y.J., Guy, L. and BeARNrd-Gallon, D., 2014. The association between histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer: relationship with clinicopathological parameters. *BMC Cancer* 14, 994.
- Nicholson, T.M. and Ricke, W.A., 2011. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation* 82, 184-99.
- O'Hurley, G., Perry, A.S., O'Grady, A., Loftus, B., Smyth, P., O'Leary, J.J., Sheils, O., Fitzpatrick, J.M., Hewitt, S.M., Lawler, M. and Kay, E.W., 2011. The role of secreted frizzled-related protein 2 expression in prostate cancer. *Histopathology* 59, 1240-8.
- Ollikainen, M., Ismail, K., Gervin, K., Kyllonen, A., Hakkarainen, A., Lundbom, J., Jarvinen, E.A., Harris, J.R., Lundbom, N., Rissanen, A., Lyle, R., Pietilainen, K.H. and Kaprio, J., 2015. Genome-wide blood DNA methylation alterations at regulatory elements and heterochromatic regions in monozygotic twins discordant for obesity and liver fat. *Clin Epigenetics* 7, 39.
- Packer, J.R. and Maitland, N.J., 2016. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 1863, 1238-60.
- Pellakuru, L.G., Iwata, T., Gurel, B., Schultz, D., Hicks, J., Bethel, C., Yegnasubramanian, S. and De Marzo, A.M., 2012. Global levels of H3K27me3 track with differentiation in vivo and are deregulated by MYC in prostate cancer. *Am J Pathol* 181, 560-9.
- Perry, A.S., O'Hurley, G., Raheem, O.A., Brennan, K., Wong, S., O'Grady, A., Kennedy, A.M., Marignol, L., Murphy, T.M., Sullivan, L., Barrett, C., Loftus, B., Thornhill, J., Hewitt, S.M., Lawler, M., Kay, E., Lynch, T. and Hollywood, D., 2013. Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer. *Int J Cancer* 132, 1771-80.
- Placencio, V.R., Li, X., Sherrill, T.P., Fritz, G. and Bhowmick, N.A., 2010. Bone marrow derived mesenchymal stem cells incorporate into the prostate during regrowth. *PLoS One* 5, e12920.
- Portela, A. and Esteller, M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28, 1057-68.
- Quante, T. and Bird, A., 2016. Do short, frequent DNA sequence motifs mould the epigenome? *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 257-62.
- Rajan, P., Sudbery, I.M., Villasevil, M.E., Mui, E., Fleming, J., Davis, M., Ahmad, I., Edwards, J., Sansom, O.J., Sims, D., Ponting, C.P., Heger, A., McMenamin, R.M.,

Pedley, I.D. and Leung, H.Y., 2014. Next-generation sequencing of advanced prostate cancer treated with androgen-deprivation therapy. *Eur Urol* 66, 32-9.

Ríos, M.Á.J., 2016. Oncoguía: cáncer de próstata. *Cancerología* 6.

Roadmap Epigenomics, C., Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M.J., Amin, V., Whitaker, J.W., Schultz, M.D., Ward, L.D., Sarkar, A., Quon, G., Sandstrom, R.S., Eaton, M.L., Wu, Y.C., Pfening, A.R., Wang, X., Claussnitzer, M., Liu, Y., Coarfa, C., Harris, R.A., Shores, N., Epstein, C.B., Gjoneska, E., Leung, D., Xie, W., Hawkins, R.D., Lister, R., Hong, C., Gascard, P., Mungall, A.J., Moore, R., Chuah, E., Tam, A., Canfield, T.K., Hansen, R.S., Kaul, R., Sabo, P.J., Bansal, M.S., Carles, A., Dixon, J.R., Farh, K.H., Feizi, S., Karlic, R., Kim, A.R., Kulkarni, A., Li, D., Lowdon, R., Elliott, G., Mercer, T.R., Neph, S.J., Onuchic, V., Polak, P., Rajagopal, N., Ray, P., Sallari, R.C., Siebenthall, K.T., Sinnott-Armstrong, N.A., Stevens, M., Thurman, R.E., Wu, J., Zhang, B., Zhou, X., Beaudet, A.E., Boyer, L.A., De Jager, P.L., Farnham, P.J., Fisher, S.J., Haussler, D., Jones, S.J., Li, W., Marra, M.A., McManus, M.T., Sunyaev, S., Thomson, J.A., Tlsty, T.D., Tsai, L.H., Wang, W., Waterland, R.A., Zhang, M.Q., Chadwick, L.H., Bernstein, B.E., Costello, J.F., Ecker, J.R., Hirst, M., Meissner, A., Milosavljevic, A., Ren, B., Stamatoyannopoulos, J.A., Wang, T. and Kellis, M., 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518, 317-30.

Robinson, D., Van Allen, E.M., Wu, Y.M., Schultz, N., Lonigro, R.J., Mosquera, J.M., Montgomery, B., Taplin, M.E., Pritchard, C.C., Attard, G., Beltran, H., Abida, W., Bradley, R.K., Vinson, J., Cao, X., Vats, P., Kunju, L.P., Hussain, M., Feng, F.Y., Tomlins, S.A., Cooney, K.A., Smith, D.C., Brennan, C., Siddiqui, J., Mehra, R., Chen, Y., Rathkopf, D.E., Morris, M.J., Solomon, S.B., Durack, J.C., Reuter, V.E., Gopalan, A., Gao, J., Loda, M., Lis, R.T., Bowden, M., Balk, S.P., Gaviola, G., Sougnez, C., Gupta, M., Yu, E.Y., Mostaghel, E.A., Cheng, H.H., Mulcahy, H., True, L.D., Plymate, S.R., Dvinge, H., Ferraldeschi, R., Flohr, P., Miranda, S., Zafeiriou, Z., Tunariu, N., Mateo, J., Perez-Lopez, R., Demichelis, F., Robinson, B.D., Schiffman, M., Nanus, D.M., Tagawa, S.T., Sigaras, A., Eng, K.W., Elemento, O., Sboner, A., Heath, E.I., Scher, H.I., Pienta, K.J., Kantoff, P., de Bono, J.S., Rubin, M.A., Nelson, P.S., Garraway, L.A., Sawyers, C.L. and Chinnaiyan, A.M., 2015. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 161, 1215-28.

Schayek, H., Bentov, I., Jacob-Hirsch, J., Yeung, C., Khanna, C., Helman, L.J., Plymate, S.R. and Werner, H., 2012. Global methylation analysis identifies PITX2 as an upstream regulator of the androgen receptor and IGF-I receptor genes in prostate cancer. *Horm Metab Res* 44, 511-9.

Schenk, J.M., Kristal, A.R., Arnold, K.B., Tangen, C.M., Neuhausser, M.L., Lin, D.W., White, E. and Thompson, I.M., 2011. Association of symptomatic benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol* 173, 1419-28.

- Schuermann, D., Weber, A.R. and Schar, P., 2016. Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair (Amst)* 44, 92-102.
- Schuettengruber, B., Martinez, A.M., Iovino, N. and Cavalli, G., 2011. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 799-814.
- Selman, S.H., 2011. The McNeal prostate: a review. *Urology* 78, 1224-8.
- Severson, P.L., Tokar, E.J., Vrba, L., Waalkes, M.P. and Futscher, B.W., 2013. Coordinate H3K9 and DNA methylation silencing of ZNFs in toxicant-induced malignant transformation. *Epigenetics* 8, 1080-8.
- Shiao, S.L., Chu, G.C. and Chung, L.W., 2016. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment. *Cancer Lett* 380, 340-8.
- Skinder, D., Zacharia, I., Studin, J. and Covino, J., 2016. Benign prostatic hyperplasia: A clinical review. *JAAPA* 29, 19-23.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A. and Meissner, A., 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484, 339-44.
- Smith, Z.D. and Meissner, A., 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 14, 204-20.
- Society, A.C., 2016a. Prostate cancer stages. <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-staging>.
- Society, A.C., 2016b. Signs and symptoms of prostate cancer, in: <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-signs-symptoms> (Ed.).
- Taberlay, P.C., Statham, A.L., Kelly, T.K., Clark, S.J. and Jones, P.A., 2014. Reconfiguration of nucleosome-depleted regions at distal regulatory elements accompanies DNA methylation of potenciadores and aisladores in cancer. *Genome Res* 24, 1421-32.
- Takehima, H., Wakabayashi, M., Hattori, N., Yamashita, S. and Ushijima, T., 2015. Identification of coexistence of DNA methylation and H3K27me3 specifically in cancer cells as a promising target for epigenetic therapy. *Carcinogenesis* 36, 192-201.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B. and Zhao, Y., 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016-28.

- Tan, M.H., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K. and Yong, E.L., 2015. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 36, 3-23.
- Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., Antipin, Y., Mitsiades, N., Landers, T., Dolgalev, I., Major, J.E., Wilson, M., Socci, N.D., Lash, A.E., Heguy, A., Eastham, J.A., Scher, H.I., Reuter, V.E., Scardino, P.T., Sander, C., Sawyers, C.L. and Gerald, W.L., 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11-22.
- Tubio, J.M., Li, Y., Ju, Y.S., Martincorena, I., Cooke, S.L., Tojo, M., Gundem, G., Pipinikas, C.P., Zamora, J., Raine, K., Menzies, A., Roman-Garcia, P., Fullam, A., Gerstung, M., Shlien, A., Tarpey, P.S., Papaemmanuil, E., Knappskog, S., Van Loo, P., Ramakrishna, M., Davies, H.R., Marshall, J., Wedge, D.C., Teague, J.W., Butler, A.P., Nik-Zainal, S., Alexandrov, L., Behjati, S., Yates, L.R., Bolli, N., Mudie, L., Hardy, C., Martin, S., McLaren, S., O'Meara, S., Anderson, E., Maddison, M., Gamble, S., Group, I.B.C., Group, I.B.C., Group, I.P.C., Foster, C., Warren, A.Y., Whitaker, H., Brewer, D., Eeles, R., Cooper, C., Neal, D., Lynch, A.G., Visakorpi, T., Isaacs, W.B., van't Veer, L., Caldas, C., Desmedt, C., Sotiriou, C., Aparicio, S., Foekens, J.A., Eyfjord, J.E., Lakhani, S.R., Thomas, G., Myklebost, O., Span, P.N., Borresen-Dale, A.L., Richardson, A.L., Van de Vijver, M., Vincent-Salomon, A., Van den Eynden, G.G., Flanagan, A.M., Futreal, P.A., Janes, S.M., Bova, G.S., Stratton, M.R., McDermott, U. and Campbell, P.J., 2014. Mobile DNA in cancer. Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science* 345, 1251343.
- Turek-Plewa, J. and Jagodzinski, P.P., 2005. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 10, 631-47.
- Walsh, A.L., Considine, S.W., Thomas, A.Z., Lynch, T.H. and Manecksha, R.P., 2014. Digital rectal examination in primary care is important for early detection of prostate cancer: a retrospective cohort analysis study. *Br J Gen Pract* 64, e783-7.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. and Schubeler, D., 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39, 457-66.
- Wissmann, C., Wild, P.J., Kaiser, S., Roepcke, S., Stoehr, R., Woenckhaus, M., Kristiansen, G., Hsieh, J.C., Hofstaedter, F., Hartmann, A., Knuechel, R., Rosenthal, A. and Pilarsky, C., 2003. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol* 201, 204-12.
- Wu, S.C. and Zhang, Y., 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 607-20.

- Yamamoto, F. and Yamamoto, M., 2008. Identification of genes that exhibit changes in expression on the 8p chromosomal arm by the Systematic Multiplex RT-PCR (SM RT-PCR) and DNA microarray hybridization methods. *Gene Expr* 14, 217-27.
- Ye, L., Kynaston, H.G. and Jiang, W.G., 2007. Bone metastasis in prostate cancer: molecular and cellular mechanisms (Review). *Int J Mol Med* 20, 103-11.
- Yegnasubramanian, S., 2016. Prostate cancer epigenetics and its clinical implications. *Asian J Androl* 18, 549-58.
- Yip, P.Y., Kench, J.G., Rasiyah, K.K., Benito, R.P., Lee, C.S., Stricker, P.D., Henshall, S.M., Sutherland, R.L. and Horvath, L.G., 2011. Low AZGP1 expression predicts for recurrence in margin-positive, localized prostate cancer. *Prostate* 71, 1638-45.
- Yokoyama, N.N., Shao, S., Hoang, B.H., Mercola, D. and Zi, X., 2014. Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *Am J Clin Exp Urol* 2, 27-44.
- Zhang, T., Cooper, S. and Brockdorff, N., 2015. The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep* 16, 1467-81.
- Zhang, T.J., Hoffman, B.G., Ruiz de Algora, T. and Helgason, C.D., 2006. SAGE reveals expression of Wnt signalling pathway members during mouse prostate development. *Gene Expr Patterns* 6, 310-24.
- Zheng, L., Sun, D., Fan, W., Zhang, Z., Li, Q. and Jiang, T., 2015. Diagnostic value of SFRP1 as a favorable predictive and prognostic biomarker in patients with prostate cancer. *PLoS One* 10, e0118276.
- Zi, X., Guo, Y., Simoneau, A.R., Hope, C., Xie, J., Holcombe, R.F. and Hoang, B.H., 2005. Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. *Cancer Res* 65, 9762-70.
- Ziller, M.J., Muller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., Boyle, P., Epstein, C.B., Bernstein, B.E., Lengauer, T., Gnirke, A. and Meissner, A., 2011. Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet* 7, e100238

ANEXO 1

Información de las muestras

Muestra	Gleason	Edad	APE [ng/mL]
PN1	NA	19	NA
PN2	NA	22	NA
PN3	NA	23	NA
PN4	NA	23	NA
HPB1	NA	66	6.9
HPB4	NA	77	42.2
HPB5	NA	73	12.0
HPB6	NA	51	0.5
HPB8	NA	63	6.6
HPB10	NA	73	12.8
HPB31	NA	74	9.8
HPB46	NA	70	1.7
HPB49	NA	78	12.7
HPB50	NA	59	11.1
HPB55	NA	78	9.5
CaP7	4+4:8	72	8.1
CaP9	3+3:6	70	16.2
CaP13	3+3:6	83	125.0
CaP19	3+3:6	72	110.0
CaP28	3+3:6	78	14.70
CaP38	3+3:6	63	4.3
CaP39	3+3:6	47	7
CaP53	3+3:6	63	65
CaP55	3+3:6	78	9.5
CaP56	3+3:6	66	5.5
CaP63	3+3:6	75	6.5

PN: Próstata normal

HPB: Hiperplasia prostática benigna

CaP: Cáncer de próstata

ANEXO 2.

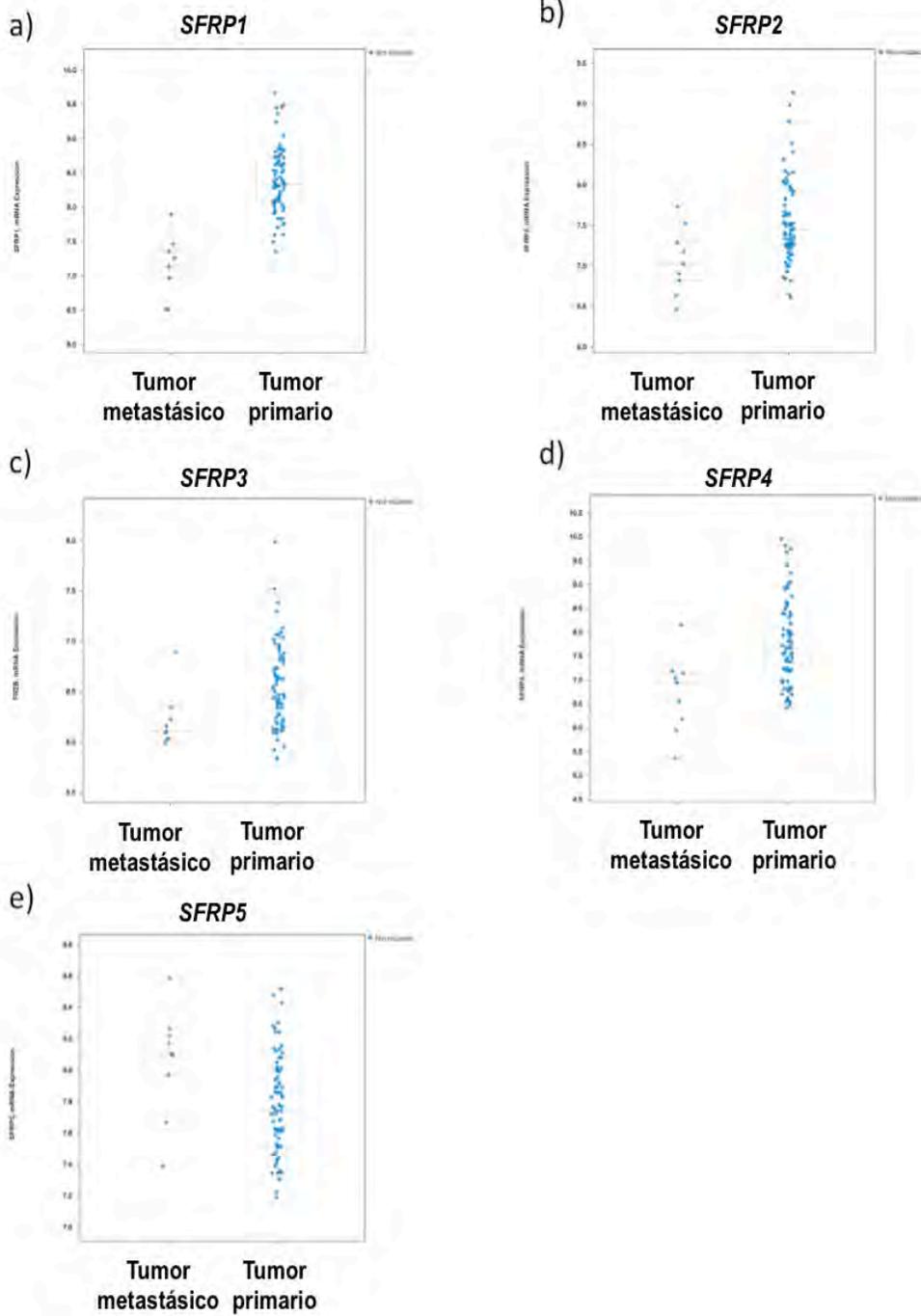
Secuencias de oligonucleótidos

Oligonucleótidos para MSP			
Nombre del oligo	Secuencia	Tm	Tamaño del amplicón (pb)
SFRP2UF	TTTTGGGTTGGAGTTTTTTGGAGTTGTGT	54°C	142
SFRP2UR	AACCCACTCTCTTCACTAAATACAACCTCA		
SFRP2MF	GGGTCGGAGTTTTTCGGAGTTGCGC	54°C	136
SFRP2MR	CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG		
SFRP1UF	GTTTTGTAGTTTTTTGGAGTTAGTGTGTGT	54°C	135
SFRP1UR	CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA		
SFRP1MF	TGTAGTTTTTCGGAGTTAGTGTGCGCGC	54°C	126
SFRP1MR	CCTACGAYCGAAAACGACGCGAACG		
SFRP3MF	ATTTTGGTTATCGAGTAGTTCGAAG	48°C	115
SFRP3MR	ATAACCTCGAAAAAATACACACG		
SFRP3UF	TTTGGTTATTGAGTAGTTTGAAGGTT	48°C	114
SFRP3UR	TCAAAAAAATACACACACCCCTAT		
SFRP4UF	GGGGGTGATGTTATTGTTTTGTATTGAT	54°C	116
SFRP4UR	CACCTCCCCTAACATAAACTCAAACA		
SFRP4MF	GGGTGATGTTATCGTTTTTTGTATCGAC	54°C	112
SFRP4MR	CCTCCCCTAACGTAAACTCGAAACG		
SFRP5UF	GTAAGATTTGGTGTGGGTGGGATGTTT	54°C	141
SFRP5UR	AAAACCTCAACCCAAACCTCACCATACA		
SFRP5MF	AAGATTTGGCGTTGGGCGGGACGTTC	54°C	136
SFRP5MR	ACTCCAACCCGAACCTCGCCGTACG		
Oligonucleótidos para secuenciación con bisulfito			
Nombre del oligo	Secuencia	Tm	Tamaño del amplicón (pb)
MSFRP1F	TTTATTTTGGGGTTTGGAGGTTT	54°C	334
MSFRP1R	CTACAAAAAATAATACTACCCAACCTACT		
MSFRP2F	TTTTATTTATGTTTGGTAATTTAGTAGAAA	50°C	211
MSFRP2R	AAACAACAAACAAAAAACCTAAC		
MSFRP5F	TAGGGAGTTTTGGGGAGAAA	54°C	162
MSFRP5R	CCTAACCCCAACTCCAAAC		
Oligonucleótidos para ChIP			
Nombre del oligo	Secuencia	Tm	Tamaño del amplicón (pb)
SFRP1R1F	TCGAGGTAGAAGGTGGCAGA	60°C	155
SFRP1R1R	GTCCATCACTCAGGCACA		
SFRP1R2F	TCACAGCAAACAGCTCCAAC	60°C	160
SFRP1R2R	CTCTCCTCGGTTCTCT		
SFRP1R3F	TTCTCTGCAAGCCAATGCG	60°C	189
SFRP1R3R	CGAGCGGGTTCGGTTTACT		

MSP: PCR específica de metilación y ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina.

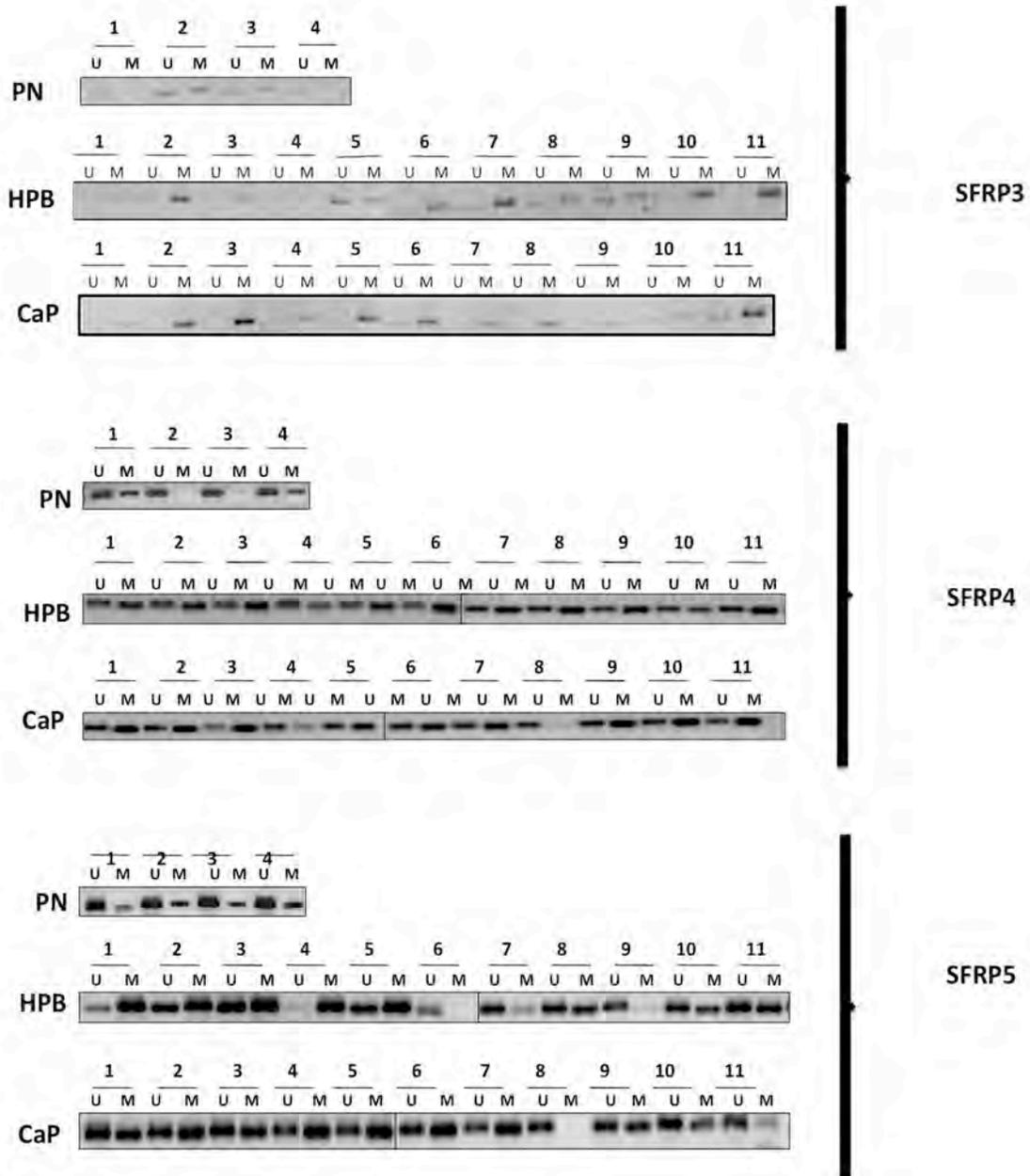
ANEXO 3

Niveles de expresión de la familia *SFRP* en muestras con metástasis Vs. tumor primario



ANEXO 4

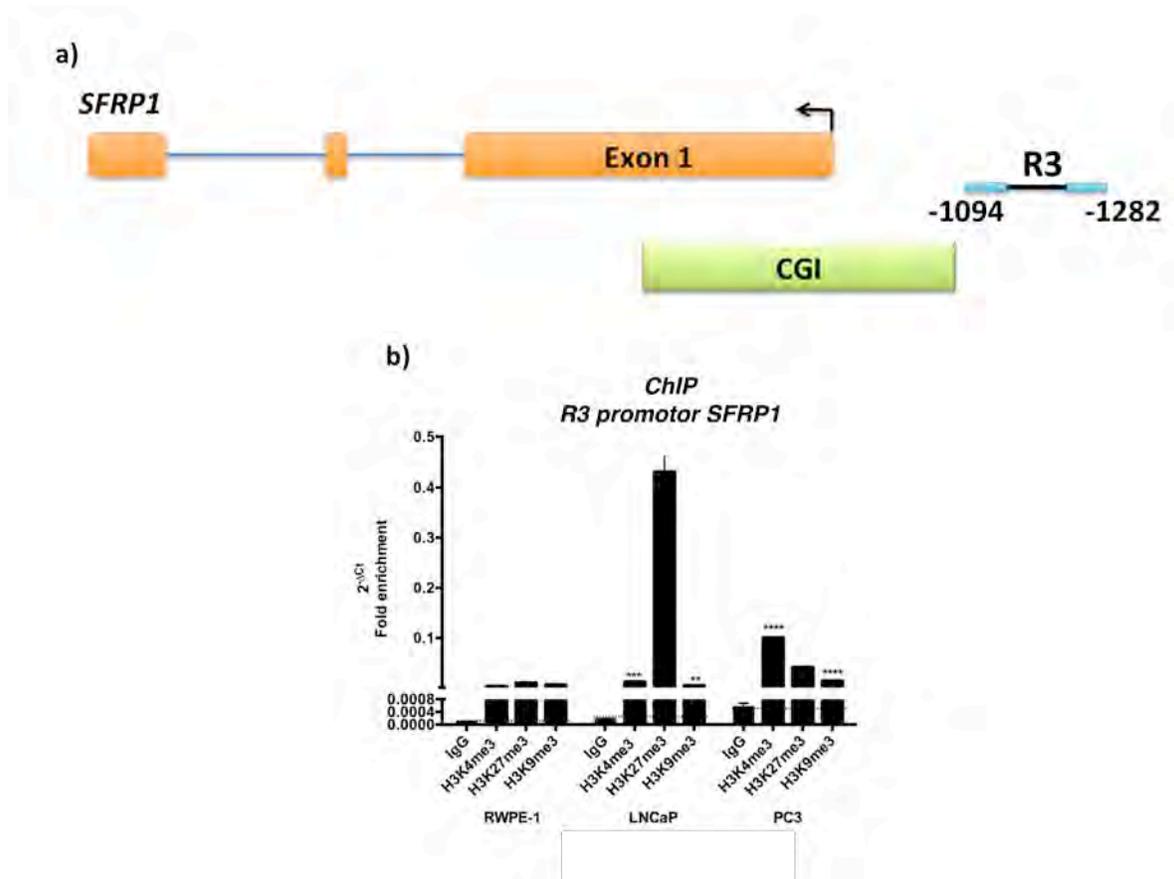
MSP de *SFRP3*, *SFRP4* y *SFRP5* en muestras de PN, HPB y CaP



U: Desmetilado
M:Metilado

ANEXO 5

ChIP para evaluar MPT en R3 del promotor de *SFRP1*



Enriquecimiento de MPT de histonas en el promotor de *SFRP1*. a) Mapa de la localización de los oligonucleótidos para el estudio de la región R3 del promotor de *SFRP1*. b) Enriquecimiento de H3K4me3, H3K27me3 y H3K9me3 en la región R3 de las líneas celulares RWPE-1, LNCaP y PC3. El análisis de datos se llevó a cabo por el método del *Fold-enrichment*. (**) $p < 0.01$ y (****) $p < 0.0001$.

CGI: Isla CpG

ARTÍCULO

92 ESTUDIO DE LOS PATRONES DE METILACIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA SFRP Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PRÓSTATA



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Research paper

SFRP1 repression in prostate cancer is triggered by two different epigenetic mechanisms

Pilar García-Tobilla^a, Susana R. Solórzano^a, Iván Salido-Guadarrama^a, Vanessa González-Covarrubias^b, Gustavo Morales-Montor^c, Carlos E. Díaz-Otañez^d, Mauricio Rodríguez-Dorantes^{a,*}

^a Oncogenomics Laboratory, The National Institute of Genomic Medicine, Mexico City 14610, Mexico

^b Pharmacogenomics Laboratory, The National Institute of Genomic Medicine, Mexico City 14610, Mexico

^c Urology Department, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Mexico City 14080, Mexico

^d Instituto de Ciencias Forenses, Mexico City 06720, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2016

Received in revised form 3 August 2016

Accepted 18 August 2016

Available online xxxx

Keywords:

Prostate cancer

SFRPs

DNA methylation

H3K27me3

PRC2

EZH2

ABSTRACT

Worldwide, prostate cancer (PCa) is the second cause of death from malignant tumors among men. Establishment of aberrant epigenetic modifications, such as histone post-translational modifications (PTMs) and DNA methylation (DNAm) produce alterations of gene expression that are common in PCa. Genes of the *SFRP* family are tumor suppressor genes that are frequently silenced by DNA hypermethylation in many cancer types. The *SFRP* family is composed of 5 members (*SFRP1–5*) that modulate the WNT pathway, which is aberrantly activated in PCa. The expression of *SFRP* genes in PCa and their regulation by DNAm has been controversial. Our objective was to determine the gene expression pattern of the *SFRP* family in prostatic cell lines and fresh frozen tissues from normal prostates (NP), benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa), by qRT-PCR, and their DNAm status by MSP and bisulfite sequencing. In prostatic cancer cell lines, the 5 *SFRPs* showed significantly decreased expression levels compared to a control normal prostatic cell line ($p < 0.0001$). In agreement, *SFRP1* and *SFRP5* genes showed decreased expression levels in CaP fresh frozen tissues compared to NP ($p < 0.01$), while a similar trend was observed for *SFRP2*. Conversely, increased levels of *SFRP4* expression were found in PCa compared to BPH ($p < 0.01$). Moreover, *SFRP2*, *SFRP3*, and *SFRP5* showed DNA hypermethylation in PCa cell lines. Interestingly, we observed DNA hypermethylation at the promoter of *SFRP1* in the PC3 cell line, but not in LNCaP. However, in the LNCaP cell line we found an aberrant gain of the repressive histone post-translational modification Histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3). In conclusion, decreased expression by DNA hypermethylation of *SFRP5* is a common feature of PCa, while decreased expression of *SFRP1* can be due to DNA hypermethylation, but sometimes an aberrant gain of the histone mark H3K27me3 is observed instead.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Among men, prostate cancer (PCa) is the second most frequently diagnosed type of tumor and the fifth cause of death from cancer worldwide (Ferlay et al., 2015). The major cause of mortality from PCa is bone metastases (Siegel et al., 2015). However, the most common pathology of the prostate in elderly men is Benign Prostatic Hyperplasia

(BPH), which is an enlargement of the prostate without invasion or migration capabilities. The etiology and pathology of BPH and PCa are still controversial. Both conditions share common features, such as increased levels of serum prostatic specific antigen (PSA) and the involvement of the Androgen Receptor (AR) pathway (Alcaraz et al., 2009). In the case of PCa, there are many epigenetic marks that have been described as relevant for its development (Jeronimo et al., 2011; Chinaranagari et al., 2015). The most well characterized epigenetic mechanisms are histone post-translational modifications (PTMs) and DNA methylation (DNAm) (Rothbart and Strahl, 2014). Histone PTMs determine the attachment of DNA to the nucleosome and regulate chromatin condensation for different DNA-dependent processes, such as transcription or replication. Among the best characterized histone PTMs, are acetylation and methylation, the former is enriched at euchromatic regions, including active enhancers and promoters, while methylation can be associated to both euchromatic and heterochromatic states. For example, marks on active promoters are defined by Histone

Abbreviations: 5meC, 5-Methylcytosine; AR, Androgen Receptor; BPH, Benign prostatic hyperplasia; DNAm, DNA methylation; H3K27me3, Histone H3 Lysine 27 trimethylation; H3K4me3, Histone H3 Lysine 4 trimethylation; H3K9me3, Histone H3 Lysine 9 trimethylation; NP, Normal Prostate; PCa, Prostate Cancer; PSA, Prostatic specific antigen; PTM, Post-translational modifications; TURP, Transurethral resection of the prostate.

* Corresponding author at: Oncogenomics Consortium, The National Institute of Genomic Medicine, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan, Mexico City, 14610, Mexico.

E-mail address: mrodriguez@inmegene.gob.mx (M. Rodríguez-Dorantes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.030>

0378-1119/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: García-Tobilla, P., et al., *SFRP1* repression in prostate cancer is triggered by two different epigenetic mechanisms, *Gene* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.030>

H3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3), on the other hand, Polycomb repressed regions are enriched with Histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3), while heterochromatin has high occupancy of Histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3) (Roadmap Epigenomics et al., 2015). Many alterations in the patterns of histone PTMs have been described for PCa, e.g. some studies suggest global loss of chromatin repressive histone mark H3K9me3 in PCa compared to non-malignant prostate tissue, and many important genes have been found to be silenced by aberrant occupancy of H3K27me3 at their promoters (Kondo et al., 2008; Ellinger et al., 2010). Understanding these epigenetic modifications has allowed the discovery of new potential tools to improve diagnosis, prognosis, and even finding new targetable epigenetic modulators (Verma, 2015).

The most studied epigenetic mechanism in cancer is DNAm, the covalent addition of a methyl group to cytosines to form 5-methylcytosine (5mC). This reaction generally occurs in a CpG dinucleotide context and it is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs). DNAm at CpG islands (CGIs) at promoter regions is generally associated with repression of gene transcription (Bogdanovic and Veenstra, 2009). In PCa a global genome DNA hypomethylation is observed when compared to normal prostate cells, this happens concomitantly with hypermethylation at certain regions, such as promoters of tumor suppressor genes, leading to their silencing (Kim et al., 2011; Zelic et al., 2015). Genes that encode the family of secreted frizzled-related proteins (SFRPs) have been studied in many cancer types and it has been reported that they are silenced due to aberrant DNA hypermethylation within their promoter regions (Suzuki et al., 2008; Lin et al., 2009; Liang et al., 2015).

In humans, the SFRP family of proteins encompasses 5 members (SFRP1–SFRP5) that are inhibitors of the wingless-type (WNT) pathway and participate in processes such as cell proliferation, differentiation, cell anchorage, apoptosis, and cell cycle regulation. SFRPs are extracellular soluble proteins with a cysteine-rich domain (CRD), also present in frizzled (FZ) receptors and wingless-type (WNT) proteins (Bovolenta et al., 2008). The activation of the WNT/ β -catenin pathway is mediated by extracellular soluble WNT proteins that bind to a surface receptor, FZ, and to one of the co-receptors of the low density-lipoprotein-receptor-related protein (LRP) family, LRP-5 or LRP-6. A signaling cascade is then initiated to activate dishevelled (DVL) which releases β -catenin from a

complex with axin, adenomatous polyposis coli (APC), and glycogen synthase kinase 3B (GSK3B). Once β -Catenin is released, it is translocated to the nucleus, where in cooperation with transcription factors of the T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) family, it initiates transcription of genes, including CCND1, MYC, JUN, and VEGFR, among many others (Undi et al., 2016). SFRPs are able to sequester WNTs to inhibit their interaction with FZ receptors. Moreover, SFRPs can bind directly to FZ receptors to form inactivated complexes. The WNT pathway is aberrantly activated in PCa and SFRPs decreased expression could be participating in its deregulation (Kawano and Kypta, 2003; Kypta and Waxman, 2012; Jung et al., 2013).

There are many discrepancies regarding SFRP expression and DNAm in PCa. Some reports indicate decreased SFRP expression by DNAm hypermethylation and a tumor suppressor activity, while others report an increased expression and an oncogenic role without DNA hypermethylation (Joesting et al., 2005; Lodygin et al., 2005; Zi et al., 2005; Horvath et al., 2007; Costa et al., 2010; Kilinc et al., 2012; Perry et al., 2013; Zheng et al., 2015). The molecular mechanisms underlying these inconsistencies have not been unraveled. Therefore, the aim of this study was to determine gene expression pattern of the SFRP gene family and its regulation by DNAm at their promoters in cell lines and prostatic tissues, using as control normal prostate (NP) tissues. Herein, we demonstrated a decreased expression by DNA hypermethylation of SFRP5 in PCa. Moreover, SFRP4 increased expression in PCa can discriminate between PCa and BPH. Finally, we described new insights in the epigenetic regulation mechanisms of SFRP1 in PCa, which can be silenced either by DNA hypermethylation or H3K27me3 occupancy.

2. Material and methods

2.1. Cell culture

We used normal epithelial cells RWPE-1 and PrEC, normal prostate stromal cells PrSC and as prostate cancer models, LNCaP, PC3, DU145 and 22Rv1. Human prostatic cell lines, RWPE-1, LNCaP, PC3, VCaP, DU145, and 22Rv1 were purchased from American Type culture collection (ATCC, Manassas, VA, USA). PrEC and PrSC primary cell cultures were obtained from LONZA (LONZA, Basel, Switzerland). All prostatic

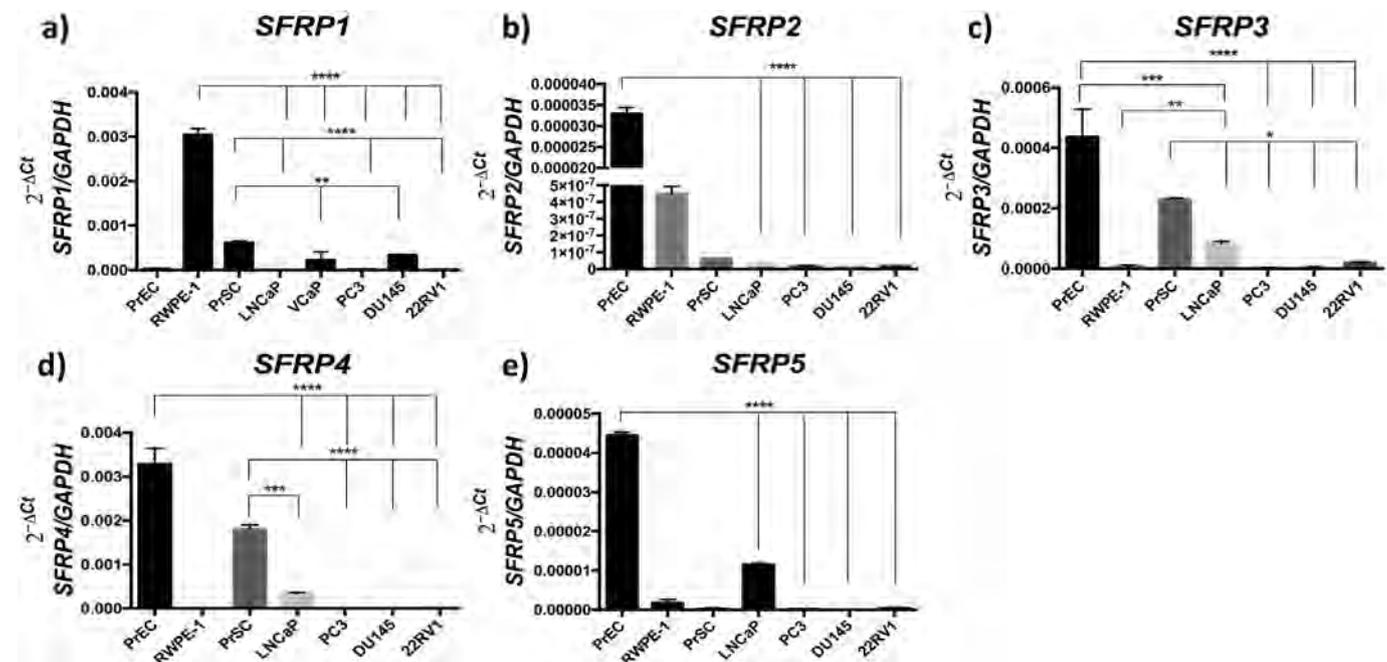


Fig. 1. SFRP family mRNA expression in prostate cell lines. qRT-PCR was conducted to measure the mRNA levels of SFRPs in prostate cell lines. Normalization was done against GAPDH. Data represent $2^{-\Delta Ct}$ means \pm SE of three independent experiments. All PCa cell lines were compared to PrEC, RWPE-1 and PrSC (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$). (a) SFRP1 mRNA expression. (b) SFRP2 mRNA expression. (c) SFRP3 mRNA expression. (d) SFRP4 mRNA expression. (e) SFRP5 mRNA expression.

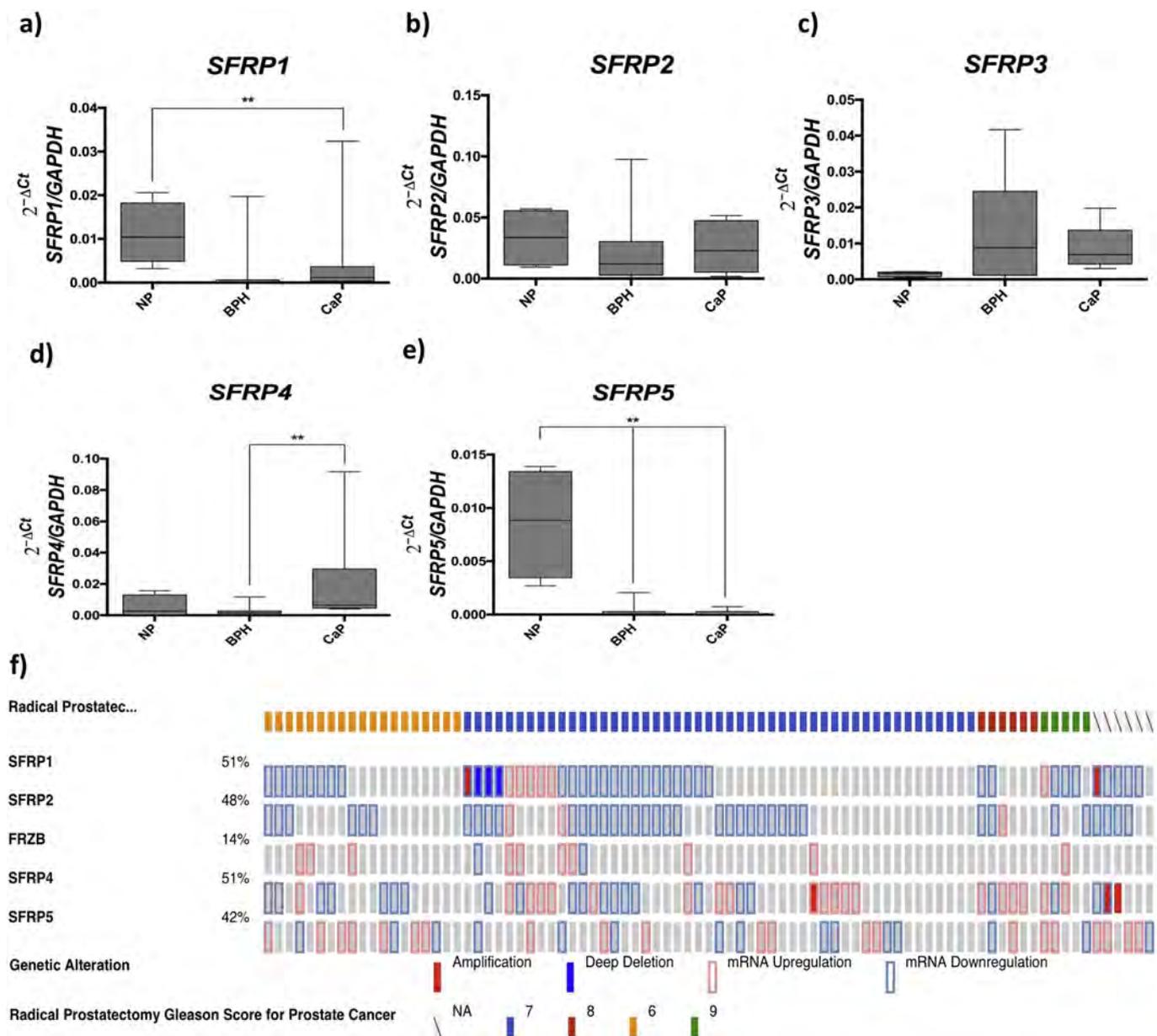


Fig. 2. *SFRP* family mRNA expression in prostate samples. qRT-PCR was conducted to measure the mRNA levels of *SFRPs* in fresh frozen prostate tissue samples (NP: normal prostates, BPH: benign prostatic hyperplasia and PCa: prostate cancer). Normalization was done against *GAPDH*. Data represent $2^{-\Delta Ct}$ media and the minimum and maximum value. Multiple comparisons were done (** $p < 0.01$). (a) *SFRP1* mRNA expression. (b) *SFRP2* mRNA expression. (c) *SFRP3* mRNA expression. (d) *SFRP4* mRNA expression. (e) *SFRP5* mRNA expression. (f) MSKCC data analysis performed with the cBioPortal tool for alterations in *SFRP* genes, samples are ordered from Gleason 6 to Gleason 9 (Gleason 6: yellow; Gleason 7: Blue; Gleason 8: red and Gleason 9: Green). Each sample is represented by the rectangles (gray: without alteration; red filled: amplification; blue filled: deletion; red line: increased expression and blue line: decreased expression) Abbreviations: normal prostate (NP), benign prostatic hyperplasia (BPH), and prostate cancer (PCa).

cancer cell lines are epithelial cells with different metastatic sites. LNCaP, 22Rv1, and VCaP are the only cell lines that have expression of a functional Androgen Receptor and produce PSA. All cultures were grown according to the specifications of the manufacturer and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 95% air at 37 °C. For DNA isolation, we used DNA miniKit (Qiagen, Hilden, Germany) and for RNA the RNeasy miniKit (Qiagen).

2.2. 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) and trichostatin (TSA) treatments

We seeded LNCaP cells at a 40% confluency and PC3 at 30%. At 24 h after seeding, 5-Aza-2'-Deoxycytidine (5-Aza) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was administered to a concentration of 0.5 mM and medium and drug were replenished every 48 h. Trichostatin A (TSA)

(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added at a final concentration of 200 nM on the 6th day after seeding, and cells were harvested on the 7th day.

2.3. Tissue collection

We collected PCa and benign prostatic hyperplasia (BPH) tissues from the Hospital General Manuel Gea González. PCa samples were obtained after radical prostatectomy and BPH samples after transurethral resection (TURP). Every patient signed a written informed consent for his participation in the study. The ethics committee of the hospital approved the protocol. Prostate samples were sent for pathological examination to confirm malignancy or BPH. Normal prostate tissues (NP) were collected from cadavers from the forensic medical service of

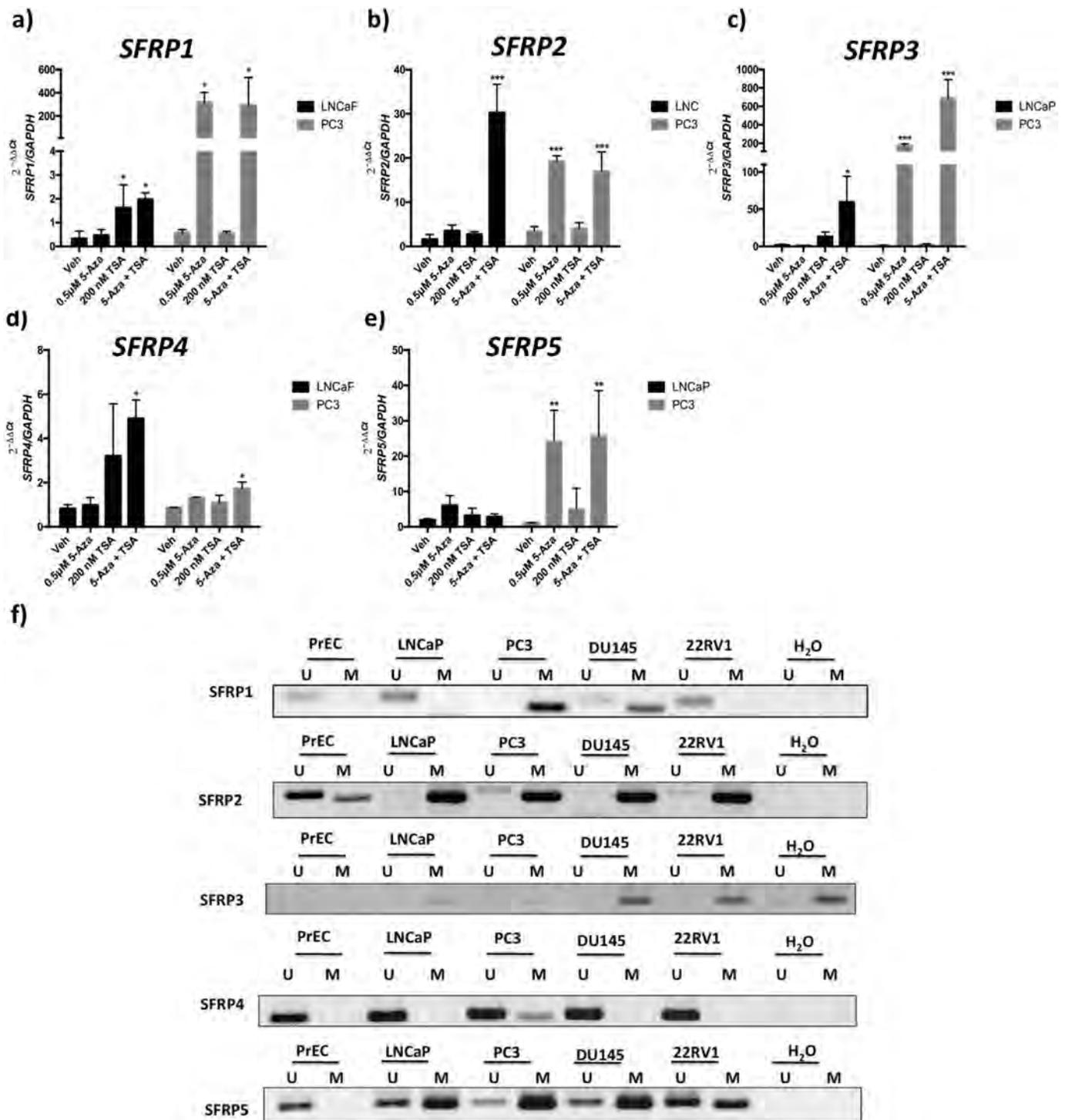


Fig. 3. Implication of DNAm of SFRPs in Pca cell lines. LNCaP and PC3 cells were treated with 0.5 μM of 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) 24 h after seeding with every 48 h drug and medium renewal, 200 nM of Trichostatin A (TSA) was added at the 6th day and cells were harvested 7 days after seeding. qPCR was performed to measure expression levels of SFRP family genes. Data represent 2^{-ΔΔCt} means ± SE of three independent experiments. All comparisons were done against the Vehicle (*p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001). (a) SFRP1 mRNA expression. (b) SFRP2 mRNA expression. (c) SFRP3 mRNA expression. (d) SFRP4 mRNA expression. (e) SFRP5 mRNA expression. (f) SFRP family genes MSP in prostate cell lines (U: unmethylated and M: methylated). Abbreviations: Vehicle (Veh), 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza), and Trichostatin A (TSA).

Mexico City. Prostates were collected and divided into two parts for nucleic acid extraction and for a second pathological examination in paraffin embedded tissues. Sample information is listed in Supplementary Table 1. DNA from tissues was extracted as described above with previous liquid nitrogen tissue disruption and RNA was extracted using the Trizol reagent protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.4. qRT-PCR

Retrotranscription was performed using 500 ng of RNA to generate cDNA using a Superscript II Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), qPCR was performed using Taqman probes (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and Universal PCR master mix (Applied Biosystems) in a Viia 7 Real Time PCR-System (Applied Biosystems,

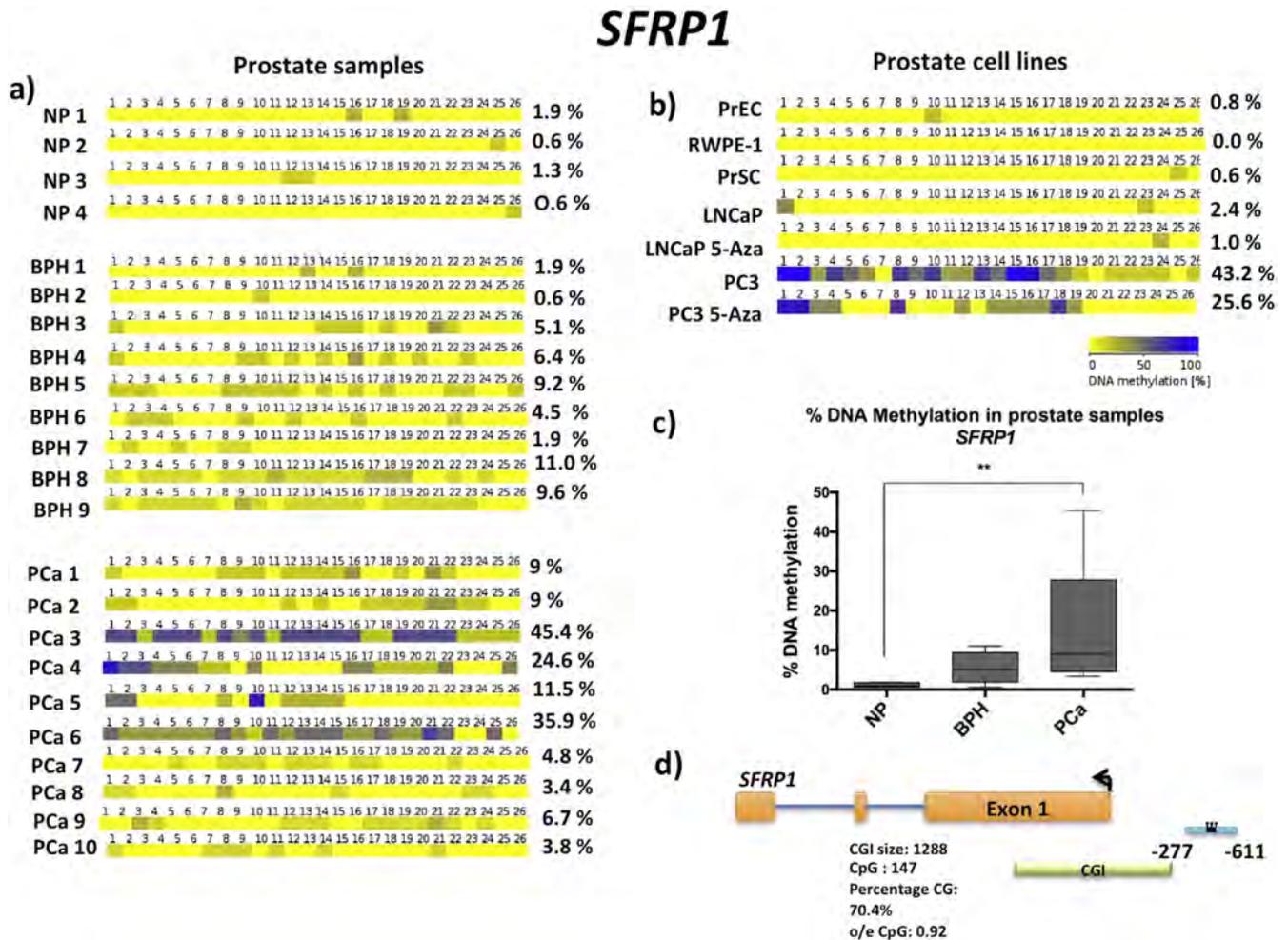


Fig. 4. DNA methylation at *SFRP1* promoter. DNA methylation measured by bisulfite sequencing of 8 clones of each sample of *SFRP1* promoter is represented. Each row is a different sample, while numbers in the upper part are the CpGs evaluated also represented by each square. Yellow to blue color scale represents 0% to 100% of DNAm. On the right, the % of DNAm mean is shown. (a) DNAm evaluated by bisulfite sequencing in Fresh frozen tissue prostate samples (NP: normal prostates, BPH: benign prostatic hyperplasia and PCa: prostate cancer). (b) DNAm evaluated by bisulfite sequencing in prostate cell lines. (c) Data represent % of DNAm media and the minimum and maximum value of the prostate tissue samples. Multiple comparisons were done (** $p < 0.01$). (d) Position of primers relative to transcription start site of *SFRP1*. Abbreviations: normal prostate (NP), benign prostatic hyperplasia (BPH), prostate cancer (PCa), CpG island (CGI), and observed/expected CpG (o/e).

Carlsbad, CA, USA). Data analyses were done using the $2^{-\Delta Ct}$ method ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{GAPDH}}$).

2.5. Methylation-specific PCR (MSP) and bisulfite sequencing

We used the DNA methylation Gold Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) for bisulfite transformation, 200 ng of DNA were used. For MSP we designed primer pairs for each *SFRP* gene and for bisulfite sequencing primers were designed for *SFRP1*, *SFRP2*, and *SFRP5*. Primers for DNA analysis were designed using the Methprimer Software (Li and Dahiya, 2002) (See oligo sequences and T_m in Supplementary Table 2). PCR was conducted using an AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), with an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at the respective T_m for each set of primers for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min.

For bisulfite sequencing, PCR was conducted using a Hot Star Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), with an initial denaturation step at 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at the respective T_m for each pair of primers for 30 s and extension at 72 °C for 1 min. PCR amplicons were purified with a PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The PCR fragments were cloned into a PGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). Cloned plasmids were transformed into JM109 High Efficiency

Competent cells (Promega, Madison, WI, USA). Transformed cells were selected using LB/ampicillin/IPTG/X-Gal agar plates. White positive colonies were picked and grown in LB/ampicillin medium and plasmid purification was performed using Zyppy Plasmid miniPrep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). We selected 8 positive clones per sample; plasmids were sequenced using SP6 and T7 primers at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Data Analysis was performed using BISMA and BDPC software (Rohde et al., 2008; Rohde et al., 2010).

2.6. ChIP

Cell lines, RWPE-1, LNcaP, and PC3 were grown under standard cell culture conditions, 3×10^6 cells were crosslinked for 10 min with occasional agitation with 1% of formaldehyde and normal growth medium without FBS. The crosslinking reaction was stopped with glycine 125 mM. Cells were washed twice with PBS and disrupted using lysis Buffer (50 mM Tris-HCl, pH = 8; 10 mM EDTA; 1% SDS; protease inhibitor cocktail). The chromatin fraction was sonicated in a CPX130PB sonicator (Cole Parmer Instruments), for 12 cycles (30% power; 20 s/ice 20 s) to obtain fragments between 100 and 1000 bp. Chromatin was diluted in buffer (16.7 mM Tris-HCl, pH = 7.5; 167 mM NaCl; 1.2 mM EDTA; 0.5 mM EGTA, 1.1% TritonX-100; 0.1% SDS) and precleared with G protein-sepharose beads (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; #10-1242), in agitation at 4 °C for 1 h. After centrifugation we

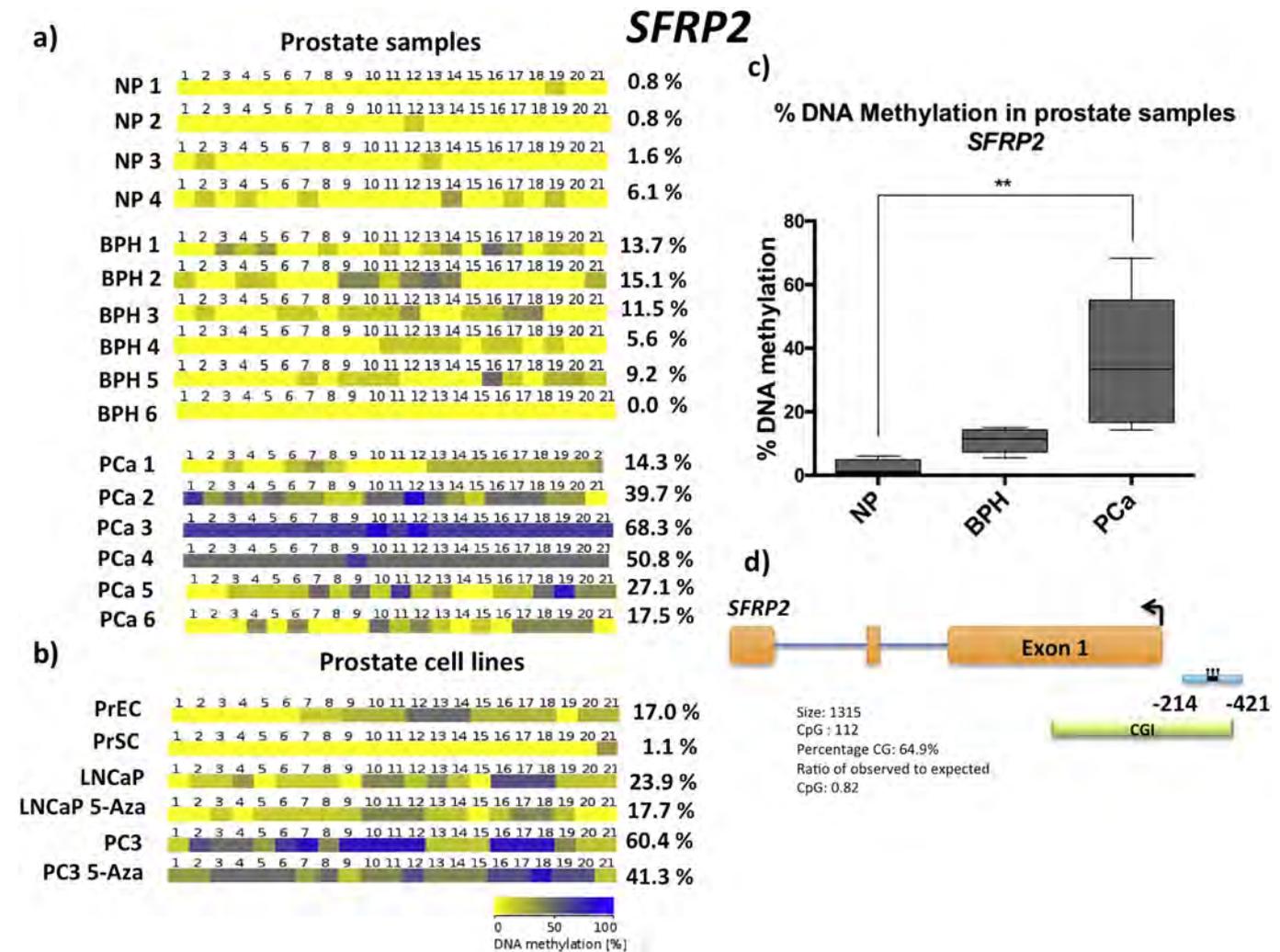


Fig. 5. DNA methylation at *SFRP2* promoter. DNA methylation measured by bisulfite sequencing of 8 clones of each sample of *SFRP2* promoter is represented. Each row is a different sample, while numbers in the upper part are the CpGs evaluated also represented by each square. Yellow to blue color scale represents 0% to 100% of DNAm. On the right, the % of DNAm mean for each sample is shown (NP: normal prostates, BPH: benign prostatic hyperplasia and PCa: prostate cancer). (a) DNAm evaluated by bisulfite sequencing in fresh frozen tissue prostate samples. (b) DNAm evaluated by bisulfite sequencing in prostate cell lines. (c) Data represent % of DNAm media and the minimum and maximum value of the prostate tissue samples. Multiple comparisons were done (** $p < 0.01$). (d) Position of primers relative to transcription start site of *SFRP2*. Abbreviations: normal prostate (NP), benign prostatic hyperplasia (BPH), prostate cancer (PCa), CpG island (CGI), and observed/expected CpG (o/e).

separated de supernatant and recovered input samples by taking 10 μ L. Afterwards, chromatin was incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with continuous agitation in the presence of antibodies: H3K4me3, H3K27me3, H3K9me3 (cell signaling, Danvers, MA, USA; #9751, #9733, and #5327), and IgG antibody for the mock control (Abcam, Cambridge, UK; ab46540). For immunoprecipitation, G protein-sepharose beads were incubated with the chromatin-ab complexes for 1.5 h at 4 $^{\circ}$ C. Next, beads were centrifuged and 1 mL of dilution buffer was added. Beads were washed with low-salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.1% SDS), high-salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH = 8.0; 2 mM EDTA; 500 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.1% SDS), LiCl buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 1% Sodium deoxycholate; 1% NP-40 M; 0.5 M LiCl), and with Tris-EDTA. Chromatin was harvested using 250 μ L of elution Buffer (1% SDS; 0.1 M NaHCO₃). Reverse crosslinking was performed by adding 500 mL of 5 M NaCl and heating at 65 $^{\circ}$ C overnight, followed by DNA extraction. All centrifugations above were performed in a bench centrifuge at 8000 rpm for 2 min.

Next, qRT-PCR was performed using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2 \times (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). We designed 3 pairs of primers to target the promoter region of *SFRP1* by covering 3 different regions (R1–R3) up to 2000 bp upstream the

transcription start site (TSS) of *SFRP1*, being R1 the closest to the TSS (Supplementary Table 2). Data analysis was done using the Fold enrichment method $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct \text{ IP} - Ct \text{ mock}$).

2.7. cBioportal query

We used the cBioportal tool to look for genetic alterations, including point mutations, amplifications, deletions or expression changes in *SFRP* genes in prostate cancer (Cerami et al., 2012; Gao et al., 2013) using the Prostate adenocarcinoma of the Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) data set as reference, for this analysis 218 tumor samples and 149 matched normal samples were studied. For mRNA expression alterations, changes were considered positive when z-scores were over 1.0 (Taylor et al., 2010).

2.8. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Graphpad Prism Software (version 6, La Jolla, CA, USA). To report comparisons of expression data in cancer cell lines versus controls, we used an ANOVA test, and for multiple comparisons, the Fisher's less significant difference test (LSD). To find differences between NP, BPH, and CaP for bisulfite sequencing

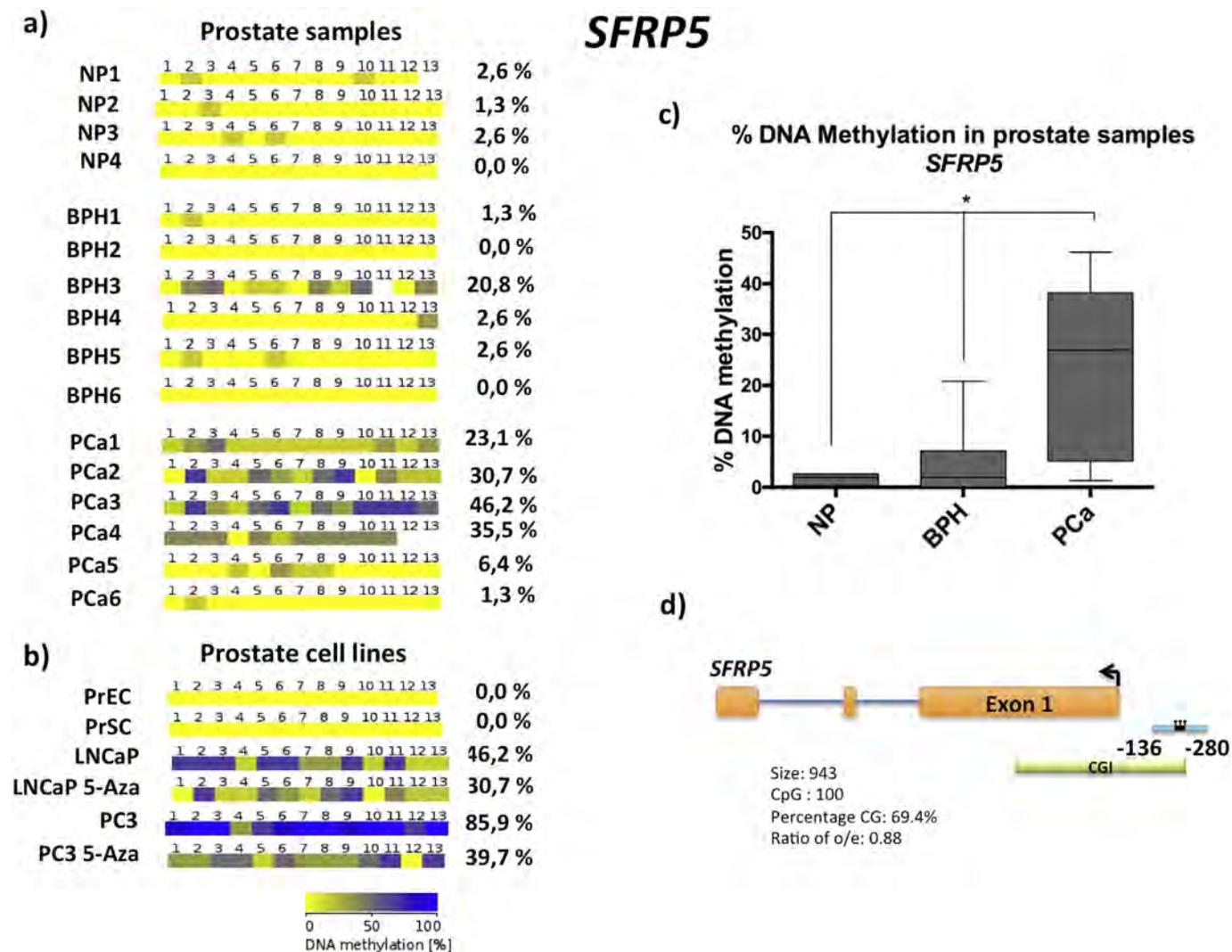


Fig. 6. DNA methylation at *SFRP5* promoter. DNA methylation measured by bisulfite sequencing of 8 clones of each sample of *SFRP5* promoter is represented. Each row is a different sample, while numbers in the upper part are the CpGs evaluated also represented by each square. Yellow to blue color scale represents 0% to 100% of DNAm. On the right, the % of DNAm mean for each sample is shown. (a) DNAm evaluated by bisulfite sequencing in fresh frozen tissue prostate samples (NP: normal prostates, BPH: benign prostatic hyperplasia and PCa: prostate cancer). (b) DNAm evaluated by bisulfite sequencing in prostate cell lines. (c) Data represented in boxplots represent the % of DNAm of each population. Multiple comparisons were done (* $p < 0.05$). (d) Position of primers relative to transcription start site of *SFRP5*. Abbreviations: normal prostate (NP), benign prostatic hyperplasia (BPH), prostate cancer (PCa), CpG island (CGI), and observed/expected CpG (o/e).

experiments, expression, and ChIP data, we performed a Kruskal-Wallis test, and for multiple comparisons a Dunn's test. Results were considered significant at a threshold p -value ≤ 0.05 .

3. Results

3.1. Decreased expression of *SFRP1* and *SFRP5* in prostate cancer

All *SFRP* genes but *SFRP1* showed significant ($p < 0.0001$) decreased expression levels in the different prostatic cancer cell lines as compared with control PrEC cells (Fig. 1b–Fig. 1e). RWPE-1 normal epithelial cells showed increased levels of *SFRP1* relative to all the PCa cell lines (Fig. 1a; $p < 0.0001$). Moreover, in fresh frozen PCa tissues, we observed that gene expression of *SFRP1* and *SFRP5* was decreased in comparison to NP ($p < 0.01$). No changes in gene expression were found for *SFRP2* and *SFRP3* in fresh frozen tissues (Fig. 2b and Fig. 2c). Interestingly, *SFRP5* expression was lower in BPH samples than in NP samples ($p < 0.01$; Fig. 2a–Fig. 2e). Finally, the only gene that showed a differential expression between BPH and PCa was *SFRP4*, which was increased in PCa ($p < 0.01$; Fig. 2d).

In order to compare our data with a greater cohort, we analyzed the MSKCC data set using the cBioPortal tool to look for alterations in *SFRP* genes. The alterations analyzed included point mutations, gene amplifications, gene deletions, and changes in mRNA expression. In this data set we found that the major alteration for *SFRP1* and *SFRP2* was mRNA decreased expression (40.9% and 44.5%, respectively). For *SFRP3*, a gain of expression (11.7%) was the major alteration. For *SFRP4* and *SFRP5* the alterations were represented by either gain or loss of gene expression (Fig. 2f). Regarding genetic alterations in the PCa samples, only 3.5% of the cases presented deletions of *SFRP1*, 2.3% presented amplifications of *SFRP1*, and 3.5% presented amplifications of *SFRP4*. Not a single point mutation was detected in none of the 5 *SFRPs* (Fig. 2f). To get a better insight into the role of *SFRP* genes during cancer development, we compared their expression in metastatic PCa tumors and primary tumors, finding a trend towards decreased expression levels of all *SFRPs* in metastatic tumors, except for *SFRP5* (Supplementary Fig. 1).

3.2. Effect of 5-Aza and TSA in the expression of *SFRPs*

To determine if DNAm modulates the expression of *SFRPs*, we inhibited the DNAm machinery in LNCap and PC3 cell lines using 5-

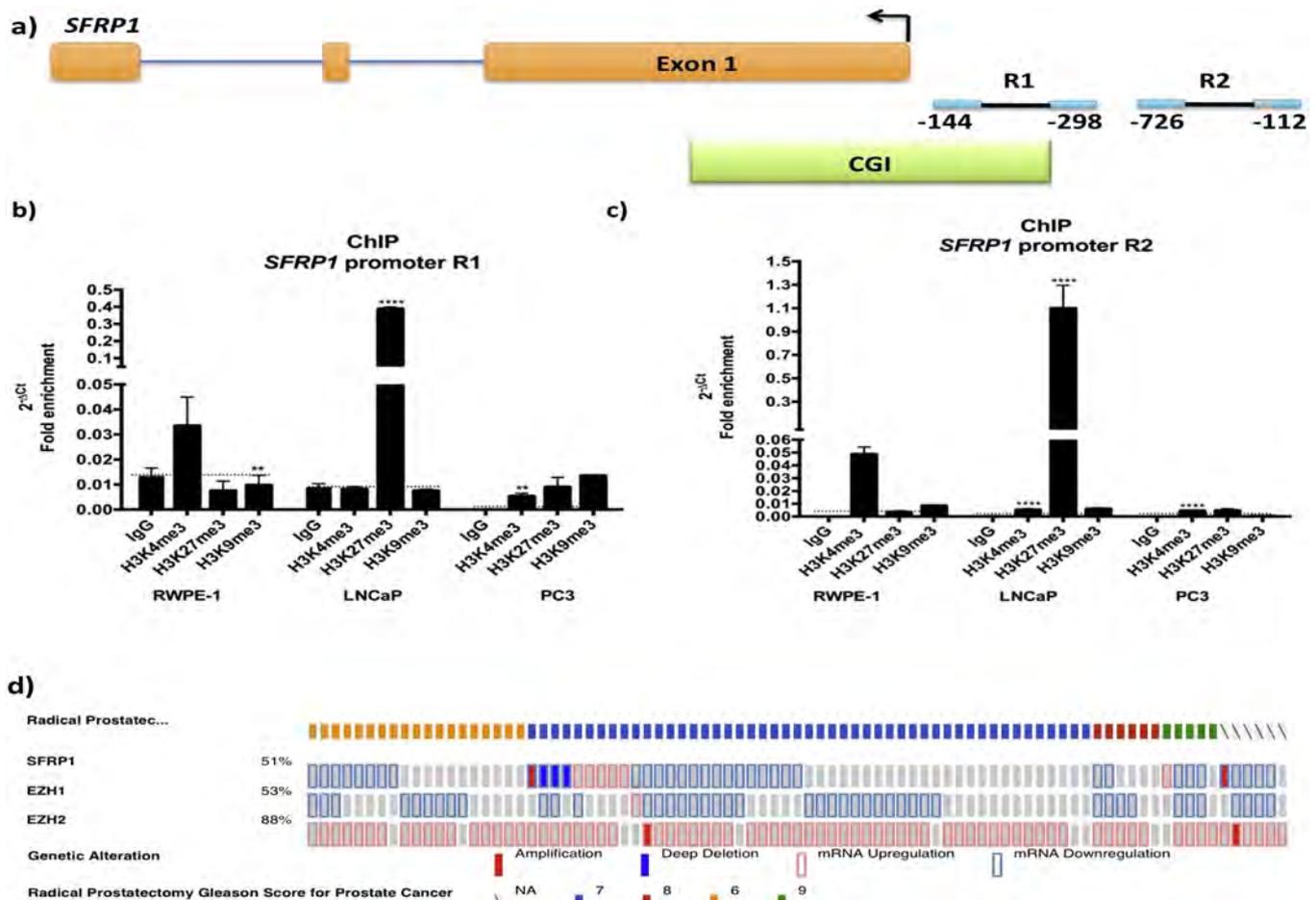


Fig. 7. Enrichment of histone modifications at *SFRP1* promoter. ChIP was performed for histone modifications H3K4me3, H3K27me3 and H3K9me3, two different regions are shown. Data were analyzed by the Fold enrichment method and IgG antibody was used as mock control. (a) Position of the two set of primers that amplify Region 1 (R1) and Region 2 (R2) relative to the transcription start site of *SFRP1*. (b) Enrichment of histone modifications at R1 of *SFRP1* promoter. Comparisons were made against RWPE-1 (** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$). (c) Enrichment of histone modifications at R2 of *SFRP1* promoter. Comparisons were made against RWPE-1 (**** $p < 0.0001$). (d) MSKCC data analysis performed with the CbioPortal tool for alterations in *SFRP1*, *EZH1* and *EZH2* genes. Samples are ordered from Gleason 6 to Gleason 9 (Gleason 6: yellow; Gleason 7: Blue; Gleason 8: red and Gleason 9: Green). Each sample is represented by the rectangles (gray: without alteration; red filled: amplification; blue filled: deletion; red line: increased expression and blue line: decreased expression).

Aza. We also used a histone deacetylase inhibitor, TSA, and both combined treatments. *SFRP1* showed increased expression levels only when 5-Aza was added to LNCaP cells, while in PC3 cells when TSA was administered alone (Fig. 3a). Moreover, *SFRP2* expression increased in LNCaP cells only with both drugs, 5-Aza and TSA, while in PC3 cell line 5-Aza increased *SFRP2* expression (Fig. 3b). For *SFRP3*, an increase on gene expression was observed when both drugs were supplied in LNCaP cells and in PC3 cells 5-Aza and combined treatment increased its expression (Fig. 3c). *SFRP4* increased its expression in LNCaP and PC3 only in combination of both drugs (Fig. 3d). Finally, no changes were observed in *SFRP5* expression in LNCaP cells under any treatment, while 5-Aza rendered increased *SFRP5* expression in PC3 cells (Fig. 3e).

3.3. DNA hypermethylation at *SFRPs* in prostate cancer

To look for a potential modulation by DNAm of *SFRPs* expression in prostatic cell lines, we first performed MSP. Our results showed increased methylation levels at the promoters of *SFRP2*, *SFRP3*, and *SFRP5* in all cancer cell lines as compared with PrEC, while we did not observe hypermethylation at *SFRP4* promoter (Fig. 3f). Interestingly, we only found hypermethylation at the promoter of *SFRP1* in the cancer cell lines PC3 and DU145, but not in LNCaP or 22RV1 (Fig. 3f). Some of these results were further confirmed using bisulfite sequencing at *SFRP1*, *SFRP2*, and *SFRP5* promoters in PC3 cell and LNCaP cell lines (Figs. 4b, 5b, and 6b). Moreover, when 5-Aza was added to PC3 cultures, methylation levels

decreased at *SFRP1* promoter (Fig. 4b). Additionally, we observed decreased DNAm levels at *SFRP2* and *SFRP5* under the action of 5-Aza in both cell lines (Fig. 5b and Fig. 6b). In the prostatic fresh frozen tissues, we found hypermethylation at the promoters of *SFRP3*, *SFRP4*, and *SFRP5* in PCa and BPH (Supplementary Fig. 2). In PCa, *SFRP1*, *SFRP2*, and *SFRP5* were hypermethylated compared to NP ($p < 0.01$), while only *SFRP5* showed hypermethylation in BPH samples compared to NP ($p < 0.05$).

3.4. *SFRP1* promoter is enriched with H3K27me3 in LNCaP cells

The fact that *SFRP1* expression was decreased but not hypermethylated in LNCaP led us to hypothesize a different repression mechanism for *SFRP1* independent of DNAm. Thus, we looked for histone PTMs by performing chromatin immunoprecipitation (ChIP) for H3K4me3, H3K27me3, and H3K9me3. Regions R1 and R2 of *SFRP1* promoter showed a significant ($p < 0.01$) decrease of H3K4me3 occupancy in LNCaP and PC3 compared to RWPE-1 (Fig. 7b and Fig. 7c). Interestingly, the amount of H3K27me3 increased ($p < 0.001$) in LNCaP cells when compared to RWPE-1 at the three regions R1, R2, and R3 (Fig. 7b, Fig. 7c, and Supplementary Fig. 3a).

To determine whether EZHs expression could be involved in the gain of H3K27me3 at *SFRP1* observed in LNCaP cells, we analyzed them in the reference MSKCC data set to look for genetic and expression alterations in PCa, finding an increased expression of *EZH2* in 51.8% of the PCa samples, while *EZH1* showed decreased expression in 88% of the PCa samples (Fig. 7d).

4. Discussion

Here, we provide the first study on gene expression of the *SFRP* family profiling DNA methylation in fresh tissues and cell lines using NP and not benign adjacent tissue as control. Previous investigations have proposed *SFRPs* as tumor suppressor genes that are frequently silenced in PCa, and our analysis in PCa cell lines consistently replicate these observations for all *SFRPs* (Fig. 1) (Horvath et al., 2004; Zi et al., 2005; O'Hurley et al., 2011; Kilinc et al., 2012; Perry et al., 2013; Mikhailenko et al., 2014). Our findings correlated with the significant decreased levels of *SFRP1* and *SFRP5* found in PCa tissues. However, our data did not show differences on *SFRP2* expression in fresh frozen tissues, but the analysis of the MSKCC data set showed that decreased *SFRP2* expression is the most frequent alteration in PCa (Fig. 2a, Fig. 2b, Fig. 2e, and Fig. 2f). In the MSKCC data set several tumors with different Gleason scores and different tumor grades were used, while our samples only cover primary tumors and low Gleason scores. These differences in our cohort characteristics could explain this discrepancy. Moreover, *SFRP3* and *SFRP4* showed no differences in expression levels in PCa tissues compared to NP (Fig. 2c and Fig. 2d). In the reference MSKCC dataset, the majority of *SFRP3* alterations are associated with an increased *SFRP3* expression (Fig. 2f). But the alterations of this kind exist in <13% of tumors, suggesting that even if downregulation of *SFRP3* is the most common alteration of *SFRP3* in PCa, it is not presented at a high frequency. Regarding *SFRP4* we found a marked increase of its expression in PCa compared with BPH. In agreement, there are many reports that show high levels of *SFRP4* protein at the cell membrane of cancer cells; whether this predicts good or bad prognosis of recurrence and survival has been widely debated (Horvath et al., 2004; Yip et al., 2011; Mortensen et al., 2015). Moreover, and in agreement with our findings, when studying *SFRP4* mRNA levels, most of the reports have shown upregulation of *SFRP4* (Wissmann et al., 2003; Perry et al., 2013; Mortensen et al., 2015). However, when downregulation of *SFRP3* or *SFRP4* has been reported in cell lines, tumor suppressor activities for these genes have been proposed (Zi et al., 2005; Horvath et al., 2007). Findings in prostatic cell lines of *SFRP* genes should be taken carefully since they do not consistently parallel the observations in tissues, perhaps because immortalization process for cell lines establishment can induce aberrant epigenetic alterations (De Carvalho et al., 2012). Furthermore, our results here showed that decreased levels of *SFRP1* and *SFRP5* are a common feature of BPH and PCa. Finally, with *SFRP5* as an exception, metastatic tumors showed the lowest expression levels of *SFRPs* suggesting a silencing reinforcement throughout the development of PCa (Supplementary Fig. 1).

The fact that *SFRPs* show only a few genetic alterations suggests that epigenetic mechanisms may be involved in their deregulation (Fig. 2f). Additionally, DNA hypermethylation of these genes in many cancer types has been shown (Suzuki et al., 2004; Fukui et al., 2005; Marsit et al., 2005; Nojima et al., 2007; Kinoshita et al., 2011). As reported by Perry et al., we confirmed that DNA hypermethylation at the promoters of *SFRP2* and *SFRP5* is a common feature of PCa, as it can be observed in both tissues and cell lines (Fig. 4 and Fig. 5). The same was observed at the promoters of *SFRP3* and *SFRP4* in tissues by the MSP technique (Supplementary Fig. 2). However, in cell lines, hypermethylation was observed at *SFRP3*, but not at the *SFRP4* promoter. This implies that DNAm at *SFRP3* and *SFRP4* promoters does not seem to reflect the traditional idea of promoter DNA hypermethylation associated with gene silencing. Moreover, for all *SFRPs*, even if BPH samples show a trend towards increased levels of DNAm compared to NP, these levels are always lower than those observed in PCa (Fig. 2 and Supplementary Fig. 2). This suggest that DNAm levels at these regions could be studied as potential biomarkers of PCa, perhaps with higher sensitivity and specificity than mRNA expression levels when trying to discriminate between BPH and PCa; this would have to be assessed in a greater cohort.

Regarding the epigenetic regulation of *SFRP1*, the presence of 5-Aza in LNCaP cell line rendered no changes in *SFRP1* expression. On the

contrary, a dramatic increase of *SFRP1* expression was observed in PC3 when treated with 5-Aza, suggesting that *SFRP1* was regulated by a DNAm-dependent mechanism in PC3, but not in LNCaP (Fig. 3a). This hypothesis was confirmed by bisulfite sequencing, where high levels of DNAm were observed in PC3, but not in LNCaP or in control RWPE-1 cells (Fig. 4b). When looking for a possible mechanism that could participate in decreasing expression levels of *SFRP1* in LNCaP, we found a marked increase of the PRC2 mark H3K27me3 in LNCaP, but not in PC3 or RWPE-1. As expected, this was observed concomitantly with a loss of H3K4me3, a PTM highly enriched in active promoters, in both LNCaP and PC3 (Fig. 7). This PRC2-dependent mechanism of repression could be extrapolated to our BPH samples, where a downregulation of *SFRP1* can be observed without hypermethylation. Moreover, the fact that 6 out of 10 of our PCa tissue samples showed DNAm levels similar to those found in BPH and NP, could be indicative that H3K27me3 occupancy could be decreasing *SFRP1* expression and not DNAm (Fig. 4a). However, this remains to be proven with further experimentation. In addition, these observations could explain the low methylation levels found at the *SFRP1* promoter in previous studies and the hypermethylation at *SFRP1* reported by others (Lodygin et al., 2005; Costa et al., 2010; Perry et al., 2013). Interestingly, the PC3 cell line showed DNAm at the *SFRP1* promoter and this cell line represents the latest stage of PCa associated to bone metastasis. This may be indicative that an aberrant gain of H3K27me3 mark could precede hypermethylation at higher cancer stages in *SFRP1* promoter.

The catalytic subunit of the PRC2 complex is generally *EZH2*, although sometimes, its homolog *EZH1* can substitute it (Mochizuki-Kashio et al., 2015). It has been widely shown that *EZH2* is overexpressed in PCa (Chinranagari et al., 2014; Melling et al., 2015). In agreement, the MSKCC reference set confirmed overexpression of *EZH2* in PCa. Interestingly, >50% of the PCa samples showed decreased levels of *EZH1*, this has never been addressed before and the implication of *EZH1* in the PCa process remains fully unexplored, opening a new field of investigation. However, whether *EZH1* or *EZH2* expression downregulation could directly establish aberrant H3K27me3 at gene promoters, like *SFRP1*, leading to their silencing remains to be proved.

5. Conclusion

We found that *SFRP5* has decreased expression levels in PCa associated to DNA hypermethylation. In addition *SFRP4* overexpression was present in PCa but not in BPH. Moreover, *SFRP1* showed decreased expression levels in PCa and DNA hypermethylation in some of the PCa tissues and PC3 cell line, while in LNCaP this was associated with increased H3K27me3 occupancy.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.08.030>.

Acknowledgements

The authors are grateful to CONACYT for the funding provided for this research (Grant Nos. 390094 and 177687). We would also like to thank to the Programa de doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM for providing academic support to Dr. Pilar García. Finally, we are grateful to Dr. Elizabeth Langley for grammar review of the manuscript and to M.Sc. José Luis Cruz Colin for the technical assistance provided.

References

- Alcaraz, A., Hammerer, P., Tubaro, A., Schroder, F.H., Castro, R., 2009. Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur. Urol.* 55, 864–873.
- Bogdanovic, O., Veenstra, G.J., 2009. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549–565.
- Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., Lopez-Rios, J., 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* 121, 737–746.

- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A.P., Sander, C., Schultz, N., 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2, 401–404.
- Chinranagari, S., Sharma, P., Chaudhary, J., 2014. EZH2 dependent H3K27me3 is involved in epigenetic silencing of ID4 in prostate cancer. *Oncotarget* 5, 7172–7182.
- Chinranagari, S., Sharma, P., Bowen, N.J., Chaudhary, J., 2015. Prostate cancer epigenome. *Methods Mol. Biol.* 1238, 125–140.
- Costa, V.L., Henrique, R., Ribeiro, F.R., Carvalho, J.R., Oliveira, J., Lobo, F., Teixeira, M.R., Jeronimo, C., 2010. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer. *Epigenetics* 5, 343–351.
- De Carvalho, D.D., Sharma, S., You, J.S., Su, S.F., Taberlay, P.C., Kelly, T.K., Yang, X., Liang, G., Jones, P.A., 2012. DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer Cell* 21, 655–667.
- Ellinger, J., Kahl, P., von der Gathen, J., Roggenhofer, S., Heukamp, L.C., Gutgemann, I., Walter, B., Hofstadter, F., Buttner, R., Müller, S.C., Bastian, P.J., von Ruecker, A., 2010. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. *Prostate* 70, 61–69.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *J Cancer* → *Int. J. Cancer* 136, E359–E386.
- Fukui, T., Kondo, M., Ito, G., Maeda, O., Sato, N., Yoshioka, H., Yokoi, K., Ueda, Y., Shimokata, K., Sekido, Y., 2005. Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 24, 6323–6327.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., Schultz, N., 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* 6, p11.
- Horvath, L.G., Henshall, S.M., Kench, J.G., Saunders, D.N., Lee, C.S., Golovsky, D., Brenner, P.C., O'Neill, G.F., Kooner, R., Stricker, P.D., Grygiel, J.J., Sutherland, R.L., 2004. Membranous expression of secreted frizzled-related protein 4 predicts for good prognosis in localized prostate cancer and inhibits PC3 cellular proliferation in vitro. *Clin. Cancer Res.* 10, 615–625.
- Horvath, L.G., Lelliott, J.E., Kench, J.G., Lee, C.S., Williams, E.D., Saunders, D.N., Grygiel, J.J., Sutherland, R.L., Henshall, S.M., 2007. Secreted frizzled-related protein 4 inhibits proliferation and metastatic potential in prostate cancer. *Prostate* 67, 1081–1090.
- Jeronimo, C., Bastian, P.J., Bjartell, A., Carbone, G.M., Catto, J.W., Clark, S.J., Henrique, R., Nelson, W.G., Shariat, S.F., 2011. Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. *Eur. Urol.* 60, 753–766.
- Joesting, M.S., Perrin, S., Elenbaas, B., Fawell, S.E., Rubin, J.S., Franco, O.E., Hayward, S.W., Cunha, G.R., Marker, P.C., 2005. Identification of SFRP1 as a candidate mediator of stromal-to-epithelial signaling in prostate cancer. *Cancer Res.* 65, 10423–10430.
- Jung, S.J., Oh, S., Lee, G.T., Chung, J., Min, K., Yoon, J., Kim, W., Ryu, D.S., Kim, I.Y., Kang, D.I., 2013. Clinical significance of Wnt/beta-catenin signalling and androgen receptor expression in prostate cancer. *World J. Mens Health* 31, 36–46.
- Kawano, Y., Kypta, R., 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* 116, 2627–2634.
- Kilinc, D., Ozdemir, O., Ozdemir, S., Korgali, E., Koksbal, B., Uslu, A., Gultekin, Y.E., 2012. Alterations in promoter methylation status of tumor suppressor HIC1, SFRP2, and DAPK1 genes in prostate carcinomas. *DNA Cell Biol.* 31, 826–832.
- Kim, J.H., Dhanasekaran, S.M., Prensner, J.R., Cao, X., Robinson, D., Kalyana-Sundaram, S., Huang, C., Shankar, S., Jing, X., Iyer, M., Hu, M., Sam, L., Grasso, C., Maher, C.A., Palanisamy, N., Mehra, R., Kominsky, H.D., Siddiqui, J., Yu, J., Qin, Z.S., Chinnaiyan, A.M., 2011. Deep sequencing reveals distinct patterns of DNA methylation in prostate cancer. *Genome Res.* 21, 1028–1041.
- Kinoshita, T., Nomoto, S., Kodera, Y., Koike, M., Fujiwara, M., Nakao, A., 2011. Decreased expression and aberrant hypermethylation of the SFRP genes in human gastric cancer. *Hepato-Gastroenterology* 58, 1051–1056.
- Kondo, Y., Shen, L., Cheng, A.S., Ahmed, S., Bumber, Y., Charo, C., Yamochi, T., Urano, T., Furukawa, K., Kwabi-Addo, B., Gold, D.L., Sekido, Y., Huang, T.H., Issa, J.P., 2008. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat. Genet.* 40, 741–750.
- Kypta, R.M., Waxman, J., 2012. Wnt/beta-catenin signalling in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 9, 418–428.
- Li, L.C., Dahiya, R., 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18, 1427–1431.
- Liang, J., Kang, X., Halifu, Y., Zeng, X., Jin, T., Zhang, M., Luo, D., Ding, Y., Zhou, Y., Yakeya, B., Abudu, D., Pu, X., 2015. Secreted frizzled-related protein promoters are hypermethylated in cutaneous squamous carcinoma compared with normal epidermis. *BMC Cancer* 15, 641.
- Lin, Y.W., Chung, M.T., Lai, H.C., De Yan, M., Shih, Y.L., Chang, C.C., Yu, M.H., 2009. Methylation analysis of SFRP genes family in cervical adenocarcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135, 1665–1674.
- Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Diebold, J., Hermeking, H., 2005. Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res.* 65, 4218–4227.
- Marsit, C.J., Karagas, M.R., Andrew, A., Liu, M., Danaee, H., Schned, A.R., Nelson, H.H., Kelsey, K.T., 2005. Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 65, 7081–7085.
- Melling, N., Thomsen, E., Tsourlakis, M.C., Kluth, M., Hube-Magg, C., Minner, S., Koop, C., Graefen, M., Heinzer, H., Wittmer, C., Sauter, G., Wilczak, W., Huland, H., Simon, R., Schlomm, T., Steurer, S., Krech, T., 2015. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis* 36, 1333–1340.
- Mikhailenko, D.S., Perepechin, D.V., Apolikhin, O.I., Efremov, G.D., Sivkov, A.V., 2014. Markers for non-invasive molecular genetic diagnosis of oncurological diseases. *Urologia* 116–120.
- Mochizuki-Kashio, M., Aoyama, K., Sashida, G., Oshima, M., Tomioka, T., Muto, T., Wang, C., Iwama, A., 2015. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. *Blood* 126, 1172–1183.
- Mortensen, M.M., Hoyer, S., Lynnerup, A.S., Orntoft, T.F., Sorensen, K.D., Borre, M., Dyrskjot, L., 2015. Expression profiling of prostate cancer tissue delineates genes associated with recurrence after prostatectomy. *Sci Rep* 5, 16018.
- Nojima, M., Suzuki, H., Toyota, M., Watanabe, Y., Maruyama, R., Sasaki, S., Sasaki, Y., Mita, H., Nishikawa, N., Yamaguchi, K., Hirata, K., Itoh, F., Tokino, T., Mori, M., Imai, K., Shinomura, Y., 2007. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 26, 4699–4713.
- O'Hurley, G., Perry, A.S., O'Grady, A., Loftus, B., Smyth, P., O'Leary, J.J., Sheils, O., Fitzpatrick, J.M., Hewitt, S.M., Lawler, M., Kay, E.W., 2011. The role of secreted frizzled-related protein 2 expression in prostate cancer. *Histopathology* 59, 1240–1248.
- Perry, A.S., O'Hurley, G., Raheem, O.A., Brennan, K., Wong, S., O'Grady, A., Kennedy, A.M., Marignol, L., Murphy, T.M., Sullivan, L., Barrett, C., Loftus, B., Thornhill, J., Hewitt, S.M., Lawler, M., Kay, E., Lynch, T., Hollywood, D., 2013. Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer. *J Cancer* → *Int. J. Cancer* 132, 1771–1780.
- Roadmap Epigenomics, C., Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenyk, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M.J., Amin, V., Whitaker, J.W., Schultz, M.D., Ward, L.D., Sarkar, A., Quon, C., Sandstrom, R.S., Eaton, M.L., Wu, Y.C., Pfening, A.R., Wang, X., Claussnitzer, M., Liu, Y., Coarfa, C., Harris, R.A., Shores, N., Epstein, C.B., Gjonneska, E., Leung, D., Xie, W., Hawkins, R.D., Lister, R., Hong, C., Gascard, P., Mungall, A.J., Moore, R., Chuah, E., Tam, A., Canfield, T.K., Hansen, R.S., Kaul, R., Sabo, P.J., Bansal, M.S., Carles, A., Dixon, J.R., Farh, K.H., Feizi, S., Karlic, R., Kim, A.R., Kulkarni, A., Li, D., Lowdon, R., Elliott, G., Mercer, T.R., Neph, S.J., Onuchic, V., Polak, P., Rajagopal, N., Ray, P., Sallari, R.C., Siebenthal, K.T., Sinnott-Armstrong, N.A., Stevens, M., Thurman, R.E., Wu, J., Zhang, B., Zhou, X., Beaudet, A.E., Boyer, L.A., De Jager, P.L., Farnham, P.J., Fisher, S.J., Haussler, D., Jones, S.J., Li, W., Marra, M.A., McManus, M.T., Sunyaev, S., Thomson, J.A., Tlsty, T.D., Tsai, L.H., Wang, W., Waterland, R.A., Zhang, M.Q., Chadwick, L.H., Bernstein, B.E., Costello, J.F., Ecker, J.R., Hirst, M., Meissner, A., Milosavljevic, A., Ren, B., Stamatoyannopoulos, J.A., Wang, T., Kellis, M., 2015. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518, 317–330.
- Rohde, C., Zhang, Y., Jurkowski, T.P., Stamerjohans, H., Reinhardt, R., Jeltsch, A., 2008. Bisulfite sequencing data presentation and compilation (BSPC) web server – a useful tool for DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 36, e34.
- Rohde, C., Zhang, Y., Reinhardt, R., Jeltsch, A., 2010. BISMA-fast and accurate bisulfite sequencing data analysis of individual clones from unique and repetitive sequences. *BMC Bioinf.* 11, 230.
- Rothbart, S.B., Strahl, B.D., 2014. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 627–643.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2015. Cancer statistics, 2015. *J Clin* → *CA Cancer J. Clin.* 65, 5–29.
- Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., Baylin, S.B., 2004. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 36, 417–422.
- Suzuki, H., Toyota, M., Carraway, H., Gabrielson, E., Ohmura, T., Fujikane, T., Nishikawa, N., Sogabe, Y., Nojima, M., Sonoda, T., Mori, M., Hirata, K., Imai, K., Shinomura, Y., Baylin, S.B., Tokino, T., 2008. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *J Cancer* → *Br. J. Cancer* 98, 1147–1156.
- Taylor, B.S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B.S., Arora, V.K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., Antipin, Y., Mitsiades, N., Landers, T., Dolgav, I., Major, J.E., Wilson, M., Socci, N.D., Lash, A.E., Heguy, A., Eastham, J.A., Scher, H.I., Reuter, V.E., Scardino, P.T., Sander, C., Sawyers, C.L., Gerald, W.L., 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11–22.
- Undi, R.B., Gutti, U., Sahu, I., Sarvothaman, S., Paspuleti, S.R., Kandi, R., Gutti, R.K., 2016. Wnt signaling: role in regulation of haematopoiesis. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 32, 123–134.
- Verma, M., 2015. The role of epigenomics in the study of cancer biomarkers and in the development of diagnostic tools. *Adv. Exp. Med. Biol.* 867, 59–80.
- Wissmann, C., Wild, P.J., Kaiser, S., Roepcke, S., Stoehr, R., Woenckhaus, M., Kristiansen, G., Hsieh, J.C., Hofstaedter, F., Hartmann, A., Knuechel, R., Rosenthal, A., Pilarsky, C., 2003. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J. Pathol.* 201, 204–212.
- Yip, P.Y., Kench, J.G., Rasiyah, K.K., Benito, R.P., Lee, C.S., Stricker, P.D., Henshall, S.M., Sutherland, R.L., Horvath, L.G., 2011. Low AZGP1 expression predicts for recurrence in margin-positive, localized prostate cancer. *Prostate* 71, 1638–1645.
- Zelic, R., Fiano, V., Grasso, C., Zugna, D., Pettersson, A., Gillio-Tos, A., Merletti, F., Richiardi, L., 2015. Global DNA hypomethylation in prostate cancer development and progression: a systematic review. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 18, 1–12.
- Zheng, L., Sun, D., Fan, W., Zhang, Z., Li, Q., Jiang, T., 2015. Diagnostic value of SFRP1 as a favorable predictive and prognostic biomarker in patients with prostate cancer. *PLoS One* 10, e0118276.
- Zi, X., Guo, Y., Simoneau, A.R., Hope, C., Xie, J., Holcombe, R.F., Hoang, B.H., 2005. Expression of Frzb/secreted frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. *Cancer Res.* 65, 9762–9770.