



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA PROTEÍNA sFRP1 SOBRE LA VÍA WNT A
TRAVÉS DEL GEN DE FUSIÓN *TMPRSS2-ERG* EN
CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE UN MODELO DE
XENOTRANSPLANTE MURINO.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Sergio Alberto Cortés Ramírez



CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Sobeida Sánchez Nieto

VOCAL: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

SECRETARIO: Profesor: Mauricio Rodríguez Dorantes

1er. SUPLENTE: Profesor: Ignacio Camacho Arroyo

2° SUPLENTE: Profesor: Francisca Morayna Gutiérrez Luna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)

Asesor del tema:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

Supervisor técnico:

M.C. Carlos David Cruz Hernández

SUSTENTANTE:

Cortés Ramírez Sergio Alberto

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

A la Facultad de Química

Al Instituto Nacional de Cancerología (INCan)

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

Al programa de becas para la Titulación por Proyectos de Investigación para la
UNAM,

ÍNDICE

RESUMEN 1

MARCO TEÓRICO 2

1. El Cáncer	2
a. Definición	2
b. Incidencia.....	3
2. Cáncer de Próstata Estadísticas	3
a. Incidencia en el Mundo	3
b. Mortalidad en el Mundo	5
c. Estadísticas del Cáncer de Próstata en México.....	6
3. La Próstata	7
a. Fisiología Prostática	7
b. Anatomía de la próstata.....	8
c. Histología de la próstata	10
d. Desarrollo prostático y el papel de los andrógenos.....	11
4. El Cáncer de Próstata	13
a. Historia Natural de la Enfermedad	13
b. Clasificación y Diagnóstico.....	14
5. Alteraciones Genómicas en Cáncer de Próstata	25
a. Cambios genéticos	26
6. Vías de señalización involucradas en cáncer de próstata	28
a. Los Andrógenos	28
b. Receptor de Andrógenos.....	30
c. Acción del Receptor de Andrógenos sobre la próstata.....	31
d. La vía WNT	33
e. Receptores FZD.....	35
f. sFRP1	37
g. Efecto de SFRP1 sobre la actividad transcripcional del Receptor de andrógenos	
40	

HIPÓTESIS 41

OBJETIVOS 41

1. Objetivo General	41
2. Objetivos Particulares	41

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 41

METODOLOGÍA Y MATERIALES 42

1. Líneas celulares	42
2. Modelo de xenotransplante murino	43
3. Orquiectomía y tratamiento con la proteína sFRP1	43
4. Detección de PSA	44

5. Extracción de RNA	44
6. Cuantificación de RNA	44
7. Integridad de RNA	45
8. Ensayo de Retro transcripción	45
9. Extracción de proteínas	45
10. Cuantificación de Proteínas	46
11. Determinación de Grado Gleason y técnicas inmunohistoquímicas	46
12. Ensayos de Expresión (RT-PCR)	46
13. Ensayos de Expresión a nivel de proteína (WB)	47
14. Stripping	48

RESULTADOS 49

1. El tratamiento con la proteína sFRP1 no afecta la masa corporal de los ratones.	49
2. El tratamiento con la proteína sFRP1 promueve el crecimiento tumoral.	50
3. La proteína sFRP1 incrementa los niveles de PSA; en suero, su expresión de a nivel de mensajero (<i>KLK3</i>), e inmunohistoquímica.	51
4. La proteína sFRP1 disminuye el grado de diferenciación celular; efecto sobre el grado Gleason y en la expresión de marcadores troncales a nivel de mensajero.	54
5. sFRP1 incrementa la expresión del receptor de andrógenos.	58
6. El tratamiento con sFRP1 incrementa la expresión del gen de fusión <i>TMPRSS2-ERG</i> así como del gen <i>ERG</i> a nivel de mensajero y proteína.	59
7. El tratamiento con sFRP1 incrementa la expresión del genes de la vía WNT.	62

DISCUSIÓN 63

CONCLUSIONES 68

REFERENCIAS 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Características comunes en las neoplasias malignas.....	3
Figura 2.- Incidencia y Mortalidad asociada a cáncer en países desarrollados o en vías de desarrollo.....	3
Figura 3.- Mapa de la incidencia estimada de CaP alrededor del mundo en 2012.	4
Figura 4.- Incidencia y mortalidad estimada de CaP alrededor del mundo en 2012.	5
Figura 5.- Mortalidad estimada alrededor del mundo en 2012.....	5
Figura 6.- Gráfico construido con datos provenientes del INEGI en su reporte Instituto Nacional de Geografía y Estadística. (30 de 10 de 2017). “ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA DE MUERTOS” (2 DE NOVIEMBRE) DATOS NACIONALES.	6
Figura 7.- Localización anatómica de la próstata.....	7
Figura 8.- Anatomía zonal de la próstata descrita por McNeal.....	9
Figura 9.- Predisposición zonal a patologías prostáticas.....	10
Figura 10.- Esquema histológico de los componentes celulares del tejido prostático.....	11
Figura 11.- Genes Hox implicados en el desarrollo embrionario.	12
Figura 12.- Representación de la historia natural del cáncer de próstata representada mediante los niveles de antígeno prostático específico y volumen tumoral.....	14
Figura 13.- Clasificación TNM del cáncer de próstata en sus diferentes estados.	15
Figura 14.- Patrones de crecimiento descritos por Gleason.....	16
Figura 15.- Estratificación de tumores Gleason por hematoxilina y eosina, y su asociación con el desarrollo y riesgo de la enfermedad.....	17
Figura 16.- Ultrasonido transrectal.	19
Figura 17.- Mosaico de herramientas de diagnóstico y pronóstico utilizadas para el cáncer de próstata.	21
Figura 18.- Tipos de prostatectomía radical.....	23
Figura 19.- Efecto del docetaxel en la función de los micro-túbulos (Hiperestabilización). 25	
Figura 20.- Mecanismo de fusión del gen TMPRSS2 con el gen ERG.	27
Figura 21.- Regiones genómicas implicadas en la fusión.....	28
Figura 22.- Estructura química de los andrógenos.	28
Figura 23.- Mecanismo de acción de la testosterona sobre las células blanco.....	29
Figura 24.- Mecanismo de acción de la DHT.....	30
Figura 25.- Representación del gen y proteína del receptor de andrógenos.....	30
Figura 26.- Principales mecanismos y vías asociadas a la actividad del receptor de andrógenos en cáncer de próstata.	31
Figura 27.- Vía de señalización Wnt canónica.	34
Figura 28.- Estructura de las proteínas sFRP.y su comparación con el receptor FZD.....	36
Figura 29.- Regulación de la vía Wnt por sus antagonistas, las proteínas sFRP.	36
Figura 30.- Expresión de sFRP1 a nivel de mensajero, en diferentes líneas celulares de próstata.....	37
Figura 31.- Mecanismos de acción de sFRP1 de acuerdo a los múltiples tipos de interacción con los ligandos Wnt y/o receptores FZD.	39
Figura 32.- Morfología característica de las células VCaP a baja y alta confluencia.	42

Figura 33.- <i>Curva temporal de la masa corporal de los ratones inoculados con células VCaP.</i>	49
Figura 34.- <i>Curva temporal del efecto de sFRP1 sobre el volumen tumoral.</i>	50
Figura 35.- <i>Concentración sérica de PSA en xenotransplante murino.</i>	51
Figura 36.- <i>Expresión a nivel de mensajero del gen KLK3 en el modelo de xenotransplante murino.</i>	52
Figura 37.- <i>Inmunohistoquímicas para detectar PSA.</i>	53
Figura 38.- <i>Tinción de Hematoxilina/Eosina de cada uno de los tumores.</i>	55
Figura 39.- <i>Expresión a nivel de mensajero del gen SOX2 en el modelo de xenotransplante murino.</i>	57
Figura 40.- <i>Expresión a nivel de mensajero del gen NANOG en el modelo de xenotransplante murino.</i>	57
Figura 41.- <i>Expresión a nivel de mensajero del gen POU5F1 (OCT4) en el modelo de xenotransplante murino.</i>	58
Figura 42.- <i>Expresión a nivel de mensajero del gen AR en el modelo de xenotransplante murino.</i>	59
Figura 43.- <i>Expresión a nivel de mensajero del gen TMPRSS2-ERG en el modelo de xenotransplante murino.</i>	60
Figura 44.- <i>Expresión de la proteína ERG en el modelo de xenotransplante murino.</i>	60
Figura 45.- <i>Inmunohistoquímicas para detectar ERG.</i>	61
Figura 46.- <i>Expresión del gen WNT-3A en el modelo de xenotransplante murino.</i>	62
Figura 47.- <i>Expresión del gen LEF-1 en el modelo de xenotransplante murino.</i>	63
Figura 48.- <i>Posible mecanismo por el cual la proteína sFRP1 actúa sobre el gen de fusión TMPRSS2-ERG, impactando en la vía WNT.</i>	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- <i>Relación entre niveles de antígeno prostático y riesgo de cáncer de próstata.</i>	18
Tabla 2.- <i>Sondas TaqMan® 20X utilizadas en el ensayo RT-PCR.</i>	47
Tabla 3.- <i>Grado Gleason de los tumores control (Verde) y tratados (Rojo).</i>	56

ABREVIATURAS

ADT	Terapia de privación de andrógenos
AIPC	Cáncer de próstata independiente de andrógenos
APC	Axina/Adenomatosis poliposis coli
AR	Receptor de andrógenos
ARE	Elementos de respuesta a andrógenos
BAM	Bloqueo androgénico máximo
BPH	Hiperplasia prostática benigna
CaP	Cáncer de próstata
CDR	Dominio rico en cisteína
CGH	Técnicas de hibridación comparativa
CPRC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CX	Cirugía (Orquiectomía)
DBD	Dominio de unión a ácidos nucleicos
DHT	5 α -Dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRE	Tacto digital rectal
Dvl	Proteína Dishevelled
EGF	Factor de crecimiento epidermal
Fgf	Factor de crecimiento de fibroblastos
FSH	Hormona folículoestimulante
FZD	Familia de receptores frizzled
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GSK3	Glicógeno sintasa cinasa 3
GTFs	Factores de transcripción generales
HPS	Proteína de choque térmico
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina 1
IHC	Inmunohistoquímica
IL-6	Interleucina 6
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LBD	Dominio de unión a ligando
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
lncRNA	RNA largo no codificante
MRI	Resonancia magnética nuclear
NLS	Secuencia de localización nuclear
NTD	Dominio N-terminal (amino terminal)
NTR	Motivo relacionado a netrinas
PCP	Vía WNT de polaridad celular planar
PIN	Neoplasia prostática intraepitelial
PSA	Antígeno prostático específico
RNA	Ácido ribonucleico
RNA pol II	RNA polimerasa II
SCNAs	Alteraciones en el número de copia
sFRP	Proteínas secretadas relacionadas a frizzled
SHH	Proteína sonic hedgehog
T	Testosterona
TRUS	Ultrasonido transrectal
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
UGS	Seno urogenital
5'-UTR	Región no traducida en el extremo 5' del gen

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es la causa más frecuente de mortalidad asociada neoplasias malignas en nuestro país con una tasa de mortalidad del 16% en el año 2015; por ello la necesidad de la mejora en las herramientas terapéuticas y de diagnóstico, así como la implementación de las mismas es cada vez más apremiante.

Dentro de este contexto una de las alteraciones genómicas más importantes en cáncer de próstata es la presencia del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* el cual ha sido identificado en cerca del 50% de los casos de cáncer de próstata y, ciertos trabajos han relacionado la presencia de esta fusión con un peor pronóstico. Se ha demostrado que la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (AR) promueve la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, siendo la proteína ERG capaz de activar la vía de señalización WNT (vía que promueve la expresión de genes relacionados al progreso del CaP).

Además está reportado que la actividad transcripcional del receptor de andrógenos está regulada negativamente por la proteína SFRP1 quien a su vez es un antagonista de la vía WNT. Si a esto sumamos la evidencia de que la proteína sFRP1, tanto *in vitro* como en pacientes tiene una expresión disminuida en CaP, podemos decir que esta es fundamental para el desarrollo y progresión tumoral.

En este trabajo, se propone que el tratamiento con la proteína sFRP1, tras la depleción androgénica, podría regular la expresión de la fusión *TMPRSS2-ERG*, a través del receptor de andrógenos. Esto con el fin de disminuir las características neoplásicas del tumor conocidas como proliferación, migración y grado de indiferenciación.

Esto se realizó en un modelo de xenotransplante murino para el cual se trasplantó una línea celular inmortalizada positiva a la fusión (VCaP), vía subcutánea en ratones inmunodeficientes (nu/nu). Tras el tratamiento con la proteína sFRP1 encontramos que el volumen tumoral incrementó en el grupo tratado, así como la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* a nivel de mensajero y de proteína, además el tratamiento incrementó el grado Gleason de los tumores; lo cual contradice la hipótesis inicial, conduciendo hacia un fenotipo tumoral más agresivo y de peor pronóstico.

A pesar de contradecir la hipótesis este trabajo marca una pauta más sobre la importancia clínica para la implementación de una prueba rutinaria que discierna los tumores *TMPRSS2-ERG* positivos, a fin de brindar un tratamiento certero basado en las necesidades particulares de este tipo de neoplasias.

MARCO TEÓRICO

1. El Cáncer

a. Definición

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define cáncer como un “término genérico para un gran grupo de enfermedades, caracterizadas por un crecimiento celular aberrante, más allá de los límites usuales, capaz de invadir órganos adyacentes o esparcirse a lo largo del cuerpo; otros términos utilizados son tumores malignos o neoplasias” (World Health Organization, 2018).

Dicha alteración en el crecimiento celular está dada por disrupciones en la reproducción celular, así como en los procesos de muerte celular. Causando que las células no sólo se reproduzcan más, sino que las células afectadas no mueran. Las células afectadas, también conocidas como células malignas, usualmente se multiplican hasta formar cuerpos conocidos como tumores; algunos tienden a ser “tumores sólidos” que son masas de tejido; dichos tejidos pueden difundir hacia los órganos adyacentes o bien viajar a través de los conductos linfáticos, o bien, conductos sanguíneos para formar nuevos tumores lejos del sitio de origen (National Cancer Institute, 2015).

Un análisis mucho más amplio sobre este conjunto de patologías, llevó a (Hannah & Winberg, 2011) definir 10 características comunes entre todos los tipos de neoplasias malignas, basadas en mecanismos o comportamientos comunes, con el fin de proveer un marco lógico para el entendimiento de dicha patología, intentando a su vez englobar la gran diversidad de neoplasias malignas que existen (Figura 1).

Dentro de estas características, discutiblemente, la capacidad de proliferación sostenida es una de las más fundamentales en todas las neoplasias. En el tejido normal existen señales que indican a la célula cómo regular su ciclo celular y reproducción, en el caso del cáncer estas señales están desreguladas, e inclusive las células cancerígenas son capaces de enviar señales al tejido estromal circundante, quien responde con diversos factores de crecimiento (Cheng, Chytil, Shyr, & Joly, 2008).

Entre los otros mecanismos de importancia para el desarrollo del cáncer se encuentran; evasión de supresores de crecimiento como *TP53* y *RB* los cuales operan como nodos de control central en la regulación de los programas de proliferación y de apoptosis (resistencia a muerte celular) (Burkhart & Sage, 2008); incremento en la expresión de telomerasa, usualmente ausente en células no inmortalizadas pero sobre expresada en más del 90% de las células inmortales (Hannah & Winberg, 2011); inducción de angiogénesis dado que los tumores requieren de nutrientes y oxígeno, así como evacuar desechos metabólicos y dióxido de carbono, el tejido neoplásico activa el “interruptor” angiogénico para que la vasculatura inactiva comience a desarrollar nuevos vasos para ayudar a expandir el crecimiento neoplásico; activación de invasión y metástasis; evasión inmune; promoción de inflamación e inestabilidad genómica también son características comunes en las neoplasias (Hannah & Winberg, 2011).



Figura 1.- Características comunes en las neoplasias malignas.

Las características del cáncer constituyen un organizado principio para racionalizar la complejidad de una neoplasia; el reconocimiento de estas partes como caracteres integrales de un todo, resulta de suma utilidad al momento de comprender y diseñar estrategias contra las neoplasias malignas. Imagen modificada de (Hannah & Winberg, 2011).

b. Incidencia

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial, con aproximadamente 14 millones de nuevos casos en 2012; y se espera incremento en el número de casos de hasta el 70% en las próximas dos décadas (Ferlay J, 2013). Dicha patología, en 2015, fue responsable de 8.8 millones de muertes siendo la segunda causa de mortalidad a nivel mundial; el 70% de los casos de cáncer ocurren en países desarrollados y en vías de desarrollo (Global Burden of Disease, 2016) (Figura 2)

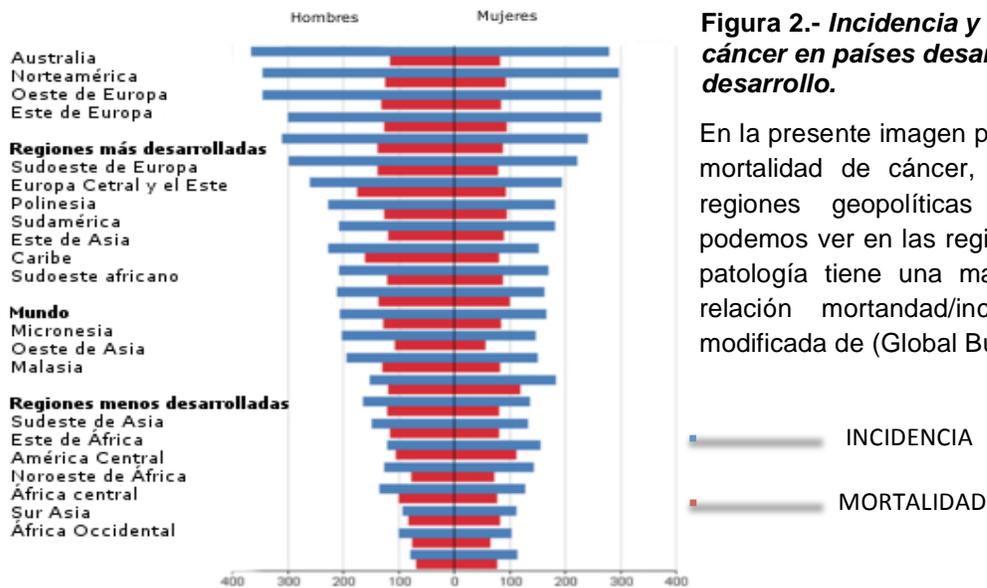


Figura 2.- Incidencia y Mortalidad asociada a cáncer en países desarrollados o en vías de desarrollo.

En la presente imagen podemos ver la incidencia y mortalidad de cáncer, de acuerdo a diferentes regiones geopolíticas en el mundo. Como podemos ver en las regiones más desarrolladas la patología tiene una mayor incidencia, pero una relación mortandad/incidencia menor. Imagen modificada de (Global Burden of Disease, 2016).

2. Cáncer de Próstata Estadísticas
a. Incidencia en el Mundo

El cáncer de próstata (CaP) es el cuarto tipo de neoplasia maligna con mayor incidencia a nivel mundial y es el segundo más común entre hombres. Se estima que, en 2012, 1,1 millón de hombres alrededor del mundo fueron diagnosticados con CaP, representando el 15% de los diagnósticos de cáncer en hombres, donde

el 70 % de los casos (759,000) ocurrieron en países industrializados y menos de 10, 000 casos se presentaron en hombres menores de 40 años siendo una enfermedad que afecta principalmente a varones adultos(Ver figura 3) (International Agency for Cancer Research, 2015).

En Norteamérica la mitad de los hombres y un tercio de las mujeres desarrollarán cáncer a lo largo de su vida (Sudhakar, 2009). De este estadístico deriva la importancia de estudiar diferentes tipos de cáncer masculino, siendo el cáncer de próstata la neoplasia masculina más relevante en el mundo occidental.

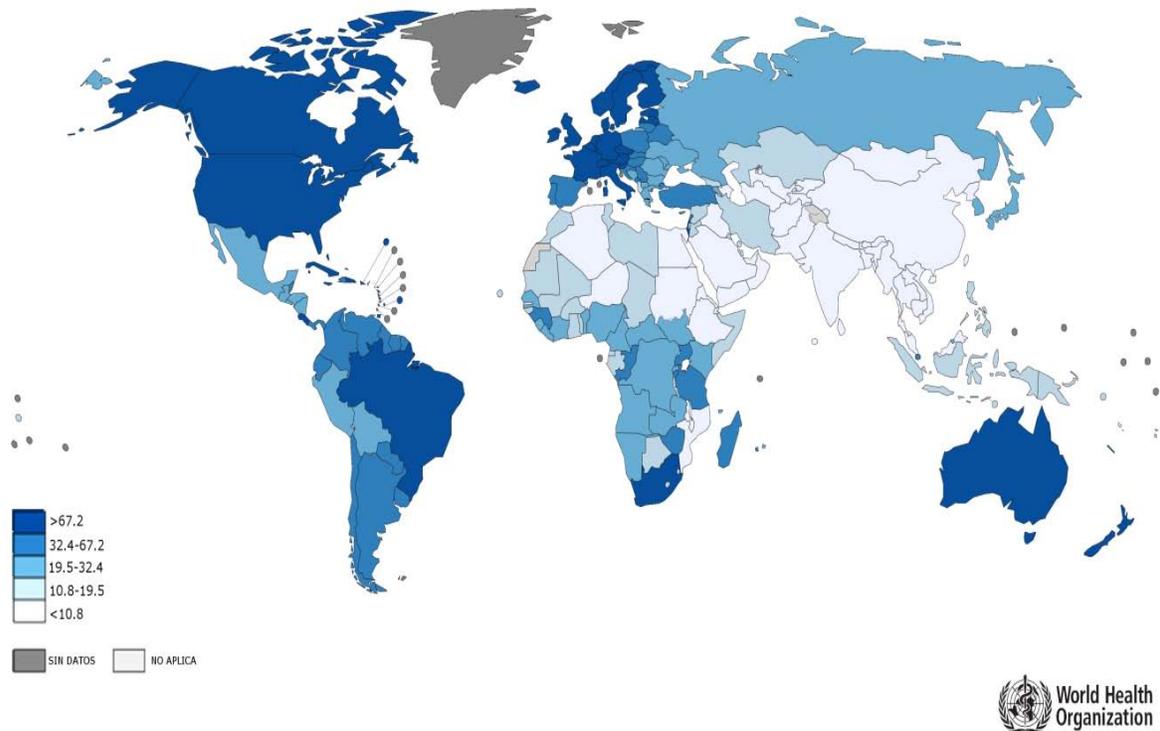


Figura 3.- Mapa de la incidencia estimada de CaP alrededor del mundo en 2012.

Los valores están dados en millones de personas. Como observamos los países con mayor incidencia de cáncer de próstata son aquellos del conocido bloque occidental. Mapa modificado de (International Agency for Cancer Research, 2015)

Las tasas más elevadas de este mal se encuentran en las regiones de Australia/Nueva Zelanda, seguida por Norte América, así como del Oeste y Norte de Europa (Figura 4). Estas tasas de incidencia relativa se mantienen relativamente altas en el Caribe, seguido por el Sur de África y por último Sudamérica (International Agency for Cancer Research, 2015).

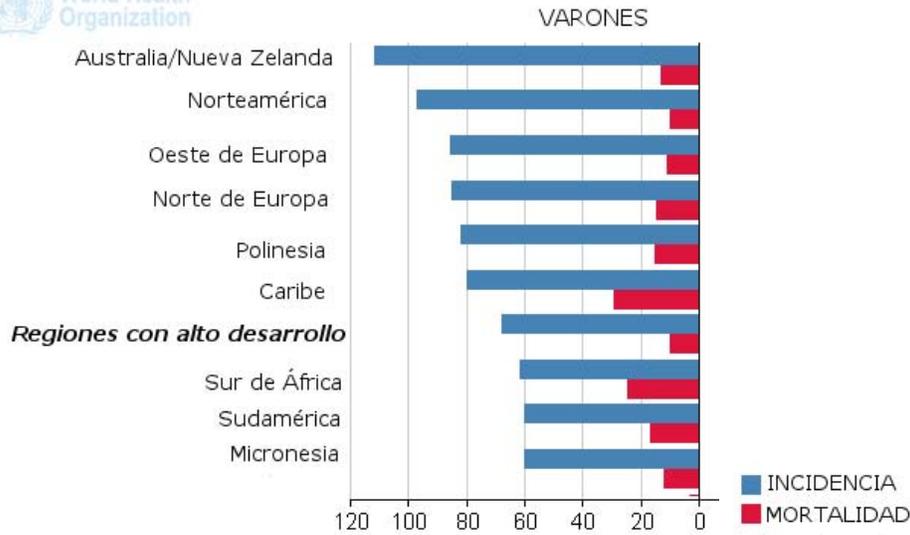


Figura 4.- Incidencia y mortalidad estimada de CaP alrededor del mundo en 2012.

Los valores están dados en millones de personas. Se puede observar la tendencia en la cual las regiones geográficas con mayor desarrollo, son aquellas que más padecen esta enfermedad. Gráfica adaptada de (International Agency for Cancer Research, 2015)

b. Mortalidad en el Mundo

A nivel mundial el CaP, se colocó como la quinta causa de muertes asociadas a neoplasias habiendo ocasionado 307,000 muertes, representando 6,6% del total de las muertes de varones en ese año (International Agency for Cancer Research, 2015). En la figura 5 podemos observar la distribución geográfica de las tasas de mortalidad asociadas a dicha patología.

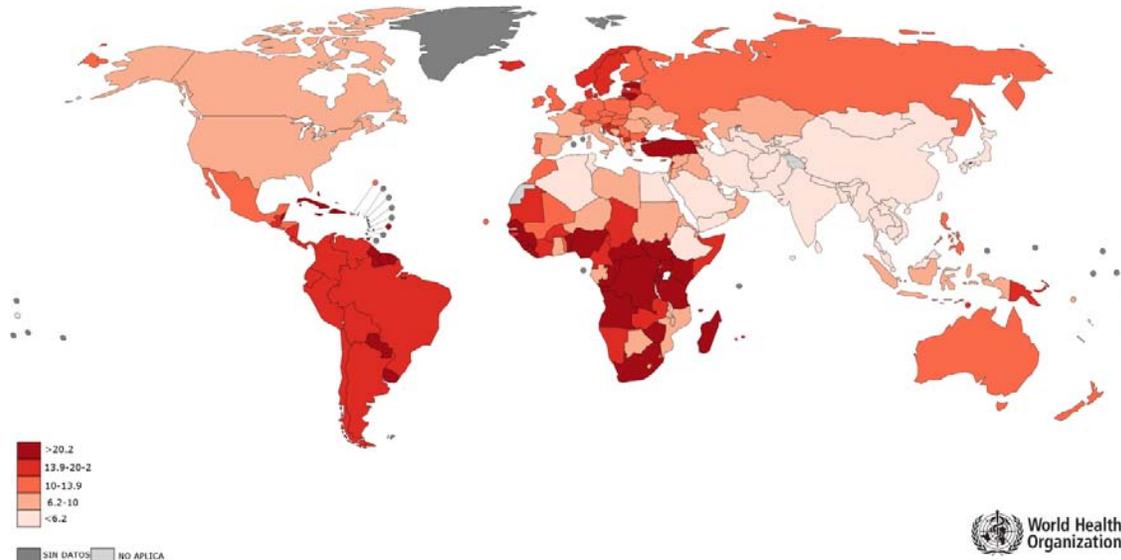


Figura 5.- Mortalidad estimada alrededor del mundo en 2012.

Los valores están dados en millones de personas. Si relacionamos esta figura, con la figura 3, podemos apreciar que los países con una mayor mortalidad asociada a cáncer de próstata no siempre son los que tienen mayor incidencia de éste. Imagen Modificada de (International Agency for Cancer Research, 2015)

c. Estadísticas del Cáncer de Próstata en México

A pesar de que la incidencia de CaP en el país es tres veces menor que lo observado en Estados Unidos de América, la mortalidad por esta causa es prácticamente igual (11.3 vs. 9.8 muertes por cada 100 mil hombres) y representa la primera causa de cáncer y de mortalidad por cáncer en hombres (Instituto Nacional de Salud Pública, 2016). En 2015, 85201 personas fallecieron debido a tumores malignos, de ellos el cáncer de próstata en México fue la causa más frecuente de muertes en varones con un 15.4% de defunciones, superando al cáncer de mama en mujeres (14.4%) y al cáncer de pulmón para varones (10.4%) como se muestra en la Figura 6 (Instituto Nacional de Geografía y Estadística, 2017).

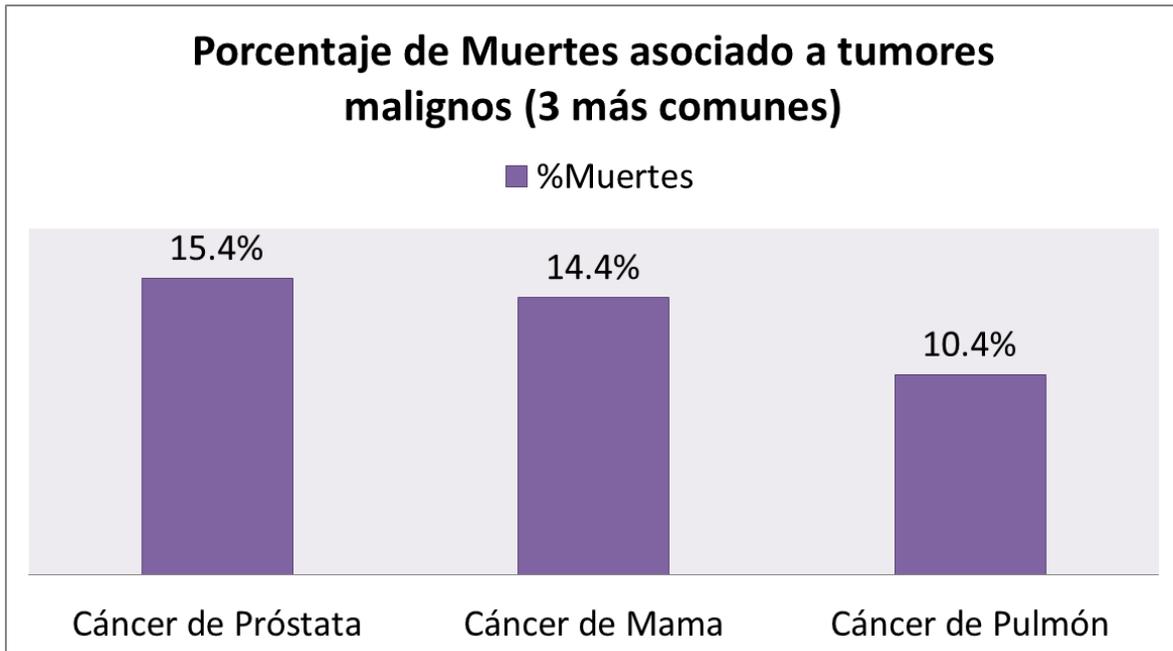


Figura 6.- Gráfico construido con datos provenientes del INEGI en su reporte Instituto Nacional de Geografía y Estadística. (30 de 10 de 2017). "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA DE MUERTOS" (2 DE NOVIEMBRE) DATOS NACIONALES.

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna con mayor porcentaje de defunciones asociada a tumores malignos según datos del INEGI, recolectados en el año 2015. (Instituto Nacional de Geografía y Estadística, 2017).

El acceso al diagnóstico y tratamiento oportunos es una de condiciones asociada a la mortalidad y la diferencia en este acceso, podría explicar la disparidad en la mortalidad por cáncer de próstata observada entre diferentes regiones en el mundo (Instituto Nacional de Salud Pública, 2016).

Por estas razones el estudio de las neoplasias malignas en próstata es muy importante para la población mexicana, a continuación se continuará con los

apartados referidos a la biología de la próstata desde su anatomía y fisiología hasta los desórdenes genómicos presentes en el cáncer de próstata (CaP).

3. La Próstata

La próstata es una glándula exocrina tubo-alveolar, perteneciente al aparato reproductor masculino. Esta glándula tiene una conformación cónica, coloquialmente descrita como “forma de nuez” y su tamaño incrementa a la par de la edad (James, 2014); usualmente mide 3.4 cm de largo por 4.4 cm de ancho y 2.6 de profundidad, así como tiene un peso de entre 15 y 20 gramos (Amis, 1994). La base de la próstata se encuentra en el cuello de la vejiga, mientras que el ápex llega al diafragma urogenital, también conocido como uretra; además de colindar directamente con el recto (Hammermich, Ayala, & Weehler, 2009) como se muestra en la figura 7.

Esta contiene un sistema de ductos que comprenden un epitelio pseudo-estratificado columnar, rodeado por estroma fibro-muscular. La próstata más susceptible a la transformación oncogénica que otros tejidos sexuales secundarios, como las vesículas seminales (Toivanen & Shen, 2017).

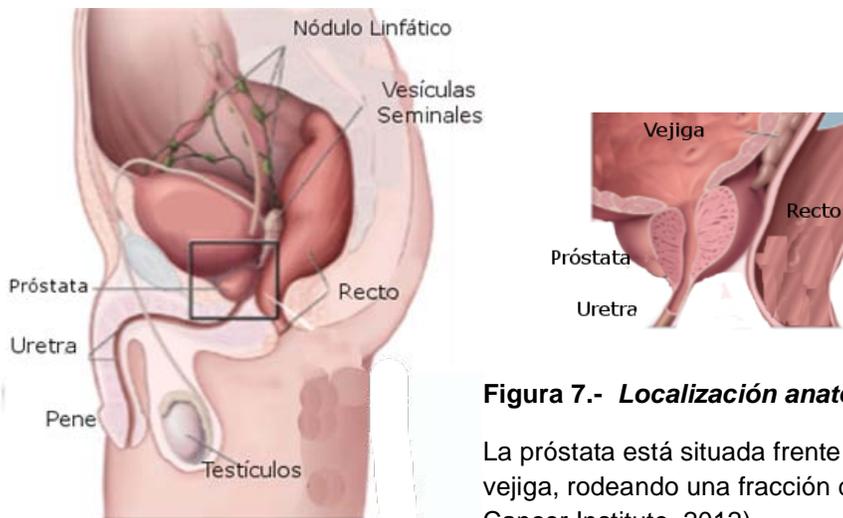


Figura 7.- Localización anatómica de la próstata.

La próstata está situada frente al recto y debajo de la vejiga, rodeando una fracción de la uretra (National Cancer Institute, 2012).

a. Fisiología Prostática

La próstata junto con las vesículas seminales producen el fluido seminal, siendo la próstata responsable de entre el 25 al 30% de este fluido (Lawrentschuk & Perera, 2016). A pesar de que las secreciones prostáticas no son necesarias para la fertilidad, esta se ve mermada en la ausencia de la próstata; por eso se infiere que la función de las secreciones de la próstata es importante para incrementar la fertilidad masculina (Toivanen & Shen, 2017).

El principal aporte de las secreciones prostáticas a dicho fluido es proveerlo de factores necesarios para la gelación, coagulación, licuefacción del semen; así como glicoproteínas asociadas al revestimiento de los espermatozoides (asociado a la evasión de la respuesta inmune al estar en contacto con el moco cervical). A pesar de que las secreciones prostáticas varían entre especies, en el ser humano

las proteínas secretadas están bien caracterizadas (Hayward & Cunha, 2000), teniendo entre ellas:

- Seminogelina, fibronectina y transglutaminasa. Las primeras dos se relacionan con la coagulación post-eyaculatoria del semen, pues tras la eyaculación forman un gel polimerizado; la transglutaminasa ayuda a la formación del polímero necesario para el gel (Hayward & Cunha, 2000).
- Antígeno prostático específico (PSA). Entre cinco y veinte minutos después de la eyaculación el PSA, que es una calicreína (serin-proteasa), disuelve el coágulo (Hayward & Cunha, 2000).
- Lactoferrina. El rol de esta consiste en unirse al espermatozoide y formar parte de los antígenos de recubrimiento (Thaler, Vanderpuye, McIntyre, & Faulk, 1990).
- Espermina, ácido cítrico, colesterol, fosfolípidos, fibrolisina, fibrinogenasa, fosfatasa (Lawrentschuk & Perera, 2016).

b. Anatomía de la próstata

Durante el siglo veinte, surgió una controversia importante respecto a la anatomía de la próstata humana ya que, al contrario de la próstata de distintos animales, en el ser humano no se observaban lóbulos prostáticos. Sin embargo el trabajo de McNeal logró resolver dicha controversia al proponer, y comprobar, un modelo en el cual se establecía la existencia de distintas regiones prostáticas discretas, en lugar de lóbulos (Selman, 2011).

Tras analizar más de 500 muestras de próstata (McNeal, 1981) logró definir, de forma precisa, la composición anatómica de la próstata identificando características antes no detectadas; esto le permitió construir un modelo tridimensional sobre dicho órgano, dividido en cuatro regiones anatómicas (Figura 8), descritas a continuación:

- **Zona Periférica**

Esta zona compone aproximadamente 70% del tejido glandular, comprende un área que va desde el ápex hasta la base de la próstata. Forma un disco de tejido cuyos ductos rodean la uretra de forma radial (McNeal, 1981). El estudio demuestra que esta zona es particularmente sensible al desarrollo de prostatitis crónica, cáncer y atrofia pos inflamatoria lo que la convierte en una de las zonas de mayor interés para el estudio de dichas patologías (Hammermich, Ayala, & Weehler, 2009). Se ha demostrado, mediante pruebas histológicas la predisposición de esta zona al desarrollo de cáncer pues del 70-75% de todos los casos de cáncer de próstata inician en la parte dorsal y dorso-lateral de la zona periférica (Shaikhibrahim, Lindstrot, & Wernert, 2012).

- **Zona Central**

Esta zona constituye un 25% del tejido glandular prostático, tiene forma de cono y en su ápice confluyen los ductos eyaculatorios y la uretra prostática. Se localiza frente a la zona de transición, y está rodeada por la zona periférica; dichas regiones se encuentran separadas por una banda de estroma, además existen

diferencias histológicas importantes entre ambos tejidos lo que indica que estas estructuras (zona central y zona periférica) tienen diferencias biológicas importantes (Hammermich, Ayala, & Weehler, 2009) (McNeal, 1981) (Selman, 2011). El desarrollo de cáncer en la zona central es escaso; aunque no ha sido claramente definido se estima que aproximadamente 5-10% de los casos de cáncer de próstata se desarrollan en esta zona (James, 2014).

- Zona de Transición

La zona de transición identificada por Mc Neal (McNeal, 1981), está compuesta por dos porciones de tejido glandular que rodean a la uretra entre la vejiga (región de tejido glandular peri uretral) y el utrículo prostático (Veru montanum).

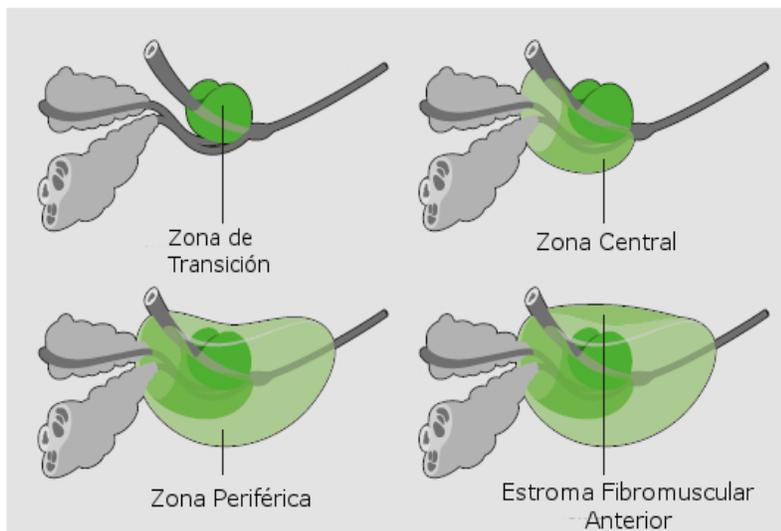
A pesar de que esta es la zona de la próstata más pequeña, ocupando solamente el 5% del volumen glandular, es el principal sitio de desarrollo de la hiperplasia prostática benigna (BPH); el crecimiento nodular de la zona de transición durante la BPH tiene como resultado la compresión de la uretra y la obstrucción parcial de la salida de la vejiga (Aaron, Franco, & Hayward, 2016).

En esta zona se desarrollan del 20-25% de los casos de cáncer de próstata, teniendo comportamientos diferentes respecto a aquellos desarrollados desde la zona periférica; siendo por lo general más grandes (en términos de volumen) y teniendo una mayor producción de PSA (Lee, Thomas, Nolley, Ferrari, Brooks, & Leppert, 2015).

- Estroma Anterior fibromuscular

Esta zona forma por completo la cara anterior de la próstata, siendo un tejido delgado, no glandular (James, 2014). A pesar de que es descrita por (McNeal, 1981) como una región aparentemente sin importancia para la función o patología prostática, esta tiene un papel anatómico crucial; pues este tejido se encarga de proteger por completo la cara anterior de las regiones anteriormente mencionadas (Selman, 2011).

Figura 8.- Anatomía zonal de la próstata descrita por McNeal



La zona de transición compone del 5-10% del tejido glandular en varones jóvenes; en ella se desarrollan aproximadamente el 20% de los casos de cáncer de próstata, aunque está mayormente implicada en los casos de BPH. La zona central forma parte de la base de la próstata, en esta confluyen los conductos eyaculatorios y en ella se desarrollan aproximadamente el 5% de los casos de cáncer. La zona periférica constituye el 70% del tejido glandular y en ella se desarrollan hasta el 75% de los casos de cáncer de próstata. El estroma fibromuscular anterior, está compuesto por tejido no glandular, y protege la cara anterior de la próstata. Imagen modificada de (James, 2014); (Hammermich, Ayala, & Weehler, 2009); (Lee, Thomas, Nolley, Ferrari, Brooks, & Leppert, 2015).

Como se puede inferir en los párrafos anteriores, desde el trabajo de (McNeal, 1981), hasta los más recientes como el de (De Marzo, Platz, & Sutcliffe, 2007), nos permiten hacer un correlato entre la anatomía de la próstata y las patologías características de cada una de sus zonas, permitiendo comprender mejor dichas enfermedades; dadas las características particulares de cada región como podemos observar en la figura 9.

	Zona prostática		
	Periférica	Transición	Central
Atrófia focalizada	Alta prevalencia	Media-Alta prevalencia	Baja prevalencia
Inflamación aguda	Baja prevalencia	Baja prevalencia	Ninguna
Inflamación crónica	Media-Alta prevalencia	Media-Alta prevalencia	Baja prevalencia
BPH	Ninguna	Alta prevalencia	Baja prevalencia
Neoplasia Prostática Intraepitelial (PIN)	Media-Alta prevalencia	Baja prevalencia	Baja prevalencia
Carcinoma	Media-Alta prevalencia	Baja prevalencia	Ninguna

Figura 9.- Predisposición zonal a patologías prostáticas.

La predisposición zonal a ciertas patologías en la próstata nos permite crear mejores modelos en la comprensión de las mismas, inclusive de acuerdo al tipo de inflamación gestada en cada zona. Imagen tomada de (De Marzo, Platz, & Sutcliffe, 2007)

Alta prevalencia
 Baja prevalencia
 Media-Alta prevalencia
 Ninguna

c. Histología de la próstata

El tejido prostático consiste, principalmente, de dos partes: parénquima epitelial y matriz estromal. El estroma se compone de células de músculo liso, tejido conectivo, células endoteliales y fibroblastos. Mientras tanto entre las células epiteliales podemos encontrar 4 subtipos celulares epiteliales que son: epitelio basal, células progenitoras luminales que, a su vez, dan lugar a células luminales secretoras maduras (epitelio secretor) y células neuroendocrinas (Figura 10) (Czyż, Szpak, & Madeja, 2012).

Las células luminales son responsables de la secreción de antígeno prostático específico, expresan receptor de andrógenos, y dependen de los andrógenos para sobrevivir.

Las células estromales representan un componente crucial en el desarrollo del cáncer de próstata, ya que son capaces de secretar factores que promueven la sobrevivencia, el crecimiento y la movilidad de las células de cáncer. En un estado de enfermedad las poblaciones estromales se componen por: células inmunes, como linfocitos y macrófagos, que tras la activación por las citosinas tumorales en lugar de contrarrestar al tumor promueven su crecimiento; fibroblastos asociados a cáncer y miofibroblastos que afectan la composición de la matriz extracelular, además de producir metabolitos útiles para mantener la progresión del cáncer y citosinas que promueven la invasión; células endoteliales que participan en el remodelado de la matriz extracelular e intervienen en procesos angiogénicos; finalmente tenemos a las células progenitoras de médula ósea que son reclutadas

al sitio de desarrollo del tumor y contribuyen a incrementar el reservorio de los otros tipos de células estromales (Chiarugi, Paoli, & Cirri, 2014).

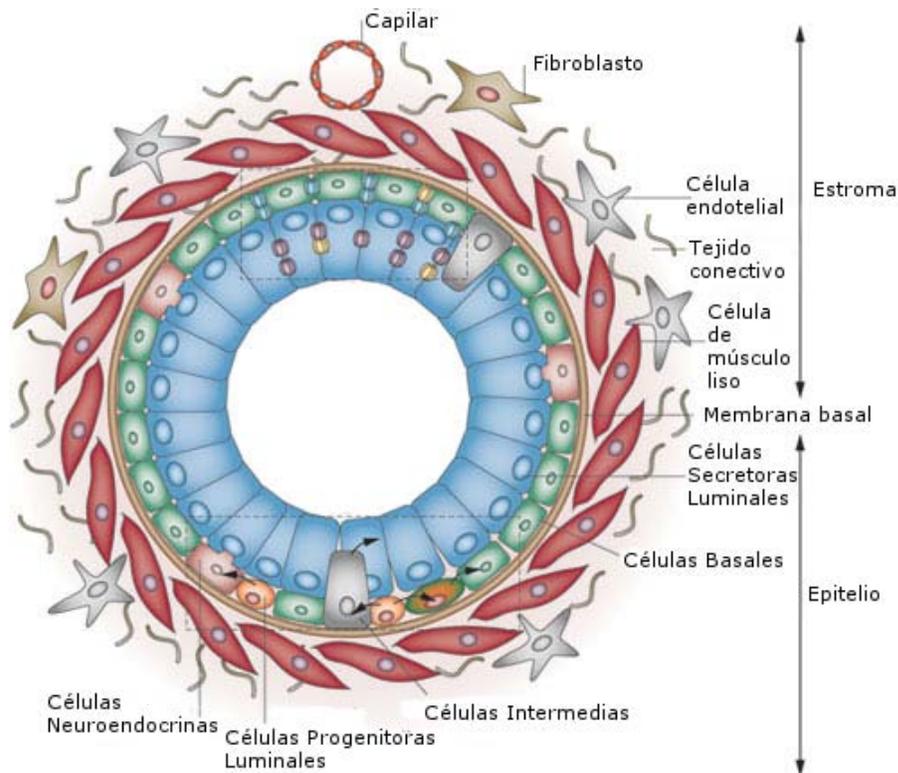


Figura 10.- Esquema histológico de los componentes celulares del tejido prostático.

Podemos observar en el los diferentes linajes que componen a la parte estromal de la próstata, así como a los diversos subtipos celulares que componen a la parte epitelial. Imagen Modificada de (Czyż, Szpak, & Madeja, 2012)

d. Desarrollo prostático y el papel de los andrógenos

La próstata es gestada desde una estructura llamada seno urogenital, el cual forma un caudal de extensión para el intestino posterior; ambos inicialmente unidos como un único tracto excretor a la cloaca embrionaria. La subsecuente división de la cloaca en el tracto urogenital y el ano-rectal ocurre a las 8 semanas de gestación, formando el seno urogenital (Hynes & Fraher, 2004).

Este seno primitivo es subdividido en la vejiga en su parte rostral, en el seno urogenital (UGS) en su parte media y en la uretra en la parte caudal; la próstata se desarrolla a partir del UGS iniciando a la semana 10 de la gestación y finalizando en la etapa de la adolescencia, donde alcanza su madurez (Toivanen & Shen, 2017).

La organogénesis de la próstata es un proceso mediado por la presencia de andrógenos y las subsecuente interacciones epitelio-mesénquima (Toivanen & Shen, 2017). La importancia de estudiar el desarrollo de la próstata, así como el papel de los andrógenos en esta radica en que existe la hipótesis de que ciertas patologías, como el cáncer, ocurren debido a un “despertar” de las vías de señalización implicadas en el proceso de organogénesis (Pierce & Speers, 1988).

El proceso de desarrollo prostático en la etapa embrionaria es un proceso altamente hormo-regulados; investigaciones como la realizada por (Jost, 1953),

demonstraron que el inicio y la determinación del desarrollo prostático son completamente dependientes de los andrógenos producidos por los testículos fetales (Prins & Putz, 2008). La importancia de los testículos fetales en el desarrollo de la próstata se debe a dos productos; a la hormona inhibidora mulleriana y a los andrógenos como la testosterona. Esta última actúa principalmente como una pro-hormona, al sufrir una 5α -reducción, siendo transformada en dihidrotestosterona (DHT) la cual es la principal responsable de la virilización del tracto urogenital (Wilson, 2011).

La acción de la DHT se da tras la unión de este ligando con su receptor clásico conocido como receptor de andrógenos (AR), el cual es un factor de transcripción encargado de regular genes importantes en el desarrollo de la próstata, ejerciendo influencia sobre dos ejes principales:

- Genes Homeobox (*Hoxa13*, *Hoxd13* expresados en la mesénquima prostática y *Hoxb13* expresado en el epitelio prostático) cuya expresión está regulada a la alta en el tejido prostático embrionario dada la acción de los andrógenos; así como otros factores de transcripción reguladores (*NKX3*, *Fox A1*, *Fox A2* y *Notch*). Todos estos genes están relacionados en la estructura y formación de distintos órganos alrededor del cuerpo como podemos ver en la figura 11 (Wilson, 2011).

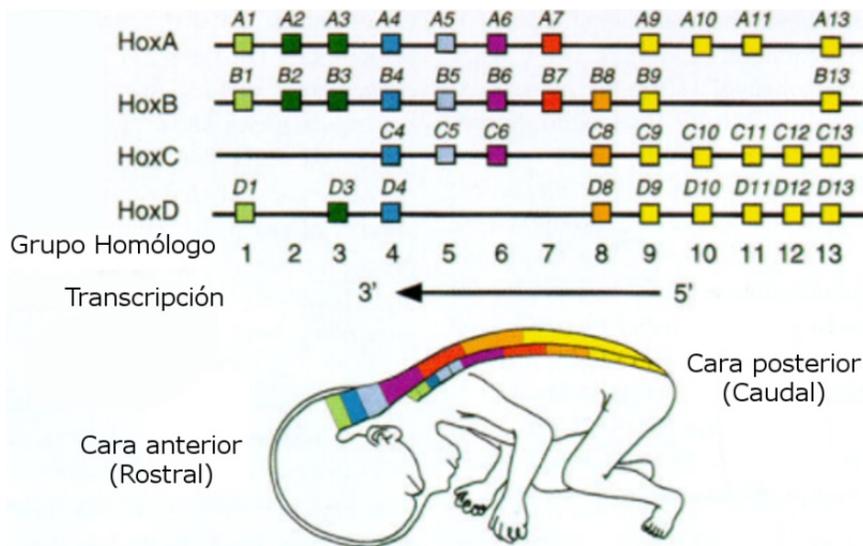


Figura 11.- Genes Hox implicados en el desarrollo embrionario.

Los genes *Hoxa13*, *Hoxd13* y *Hoxb13* son responsables del desarrollo de la próstata a partir de la cara caudal del embrión (Mark & Chambon, 1997).

- Ligandos de señalización secretados. Los andrógenos influyen sobre la expresión y secreción de ligandos con acción autocrina y paracrina (epitelio-mesénquima), implicados en el desarrollo de la próstata como Sonic Hedgehog (SHH), Factor de crecimiento de fibroblastos (Fgf-10), Bmps/ Tgf β /activina, y ligandos de la vía Wnt (Prins & Putz, 2008).

Una vez que comprendimos los mecanismos biológicos para el desarrollo prostático, así como la terminología necesaria relacionada a la anatomía, fisiología e histología de la próstata; podemos continuar con las bases de la patología de interés para este trabajo.

4. El Cáncer de Próstata

a. Historia Natural de la Enfermedad

Como se mencionó anteriormente la mayoría de los casos de cáncer de próstata vienen de una lesión epitelial y se desarrollan a lo largo de varias décadas (Miller & Torkko, 2001). Al ser una patología heterogénea y multifocal, el desarrollo de un modelo descriptivo sobre la historia natural de la enfermedad ha sido difícil; debido a dicha complejidad la clasificación histológica (G1-G3) ha sido reemplazada por la clasificación Gleason, la cual considera el grado de desorganización del tejido como uno de los principales componentes del carcinoma (Schulz, Burchardt, & Cronauer, 2003).

Mientras un tercio de los tumores presentan un crecimiento focalizado e indolente, aproximadamente un tercio se vuelven localmente invasivos, propagándose hacia el tejido más allá de la cápsula o haciendo metástasis hacia los nódulos linfáticos locales o a órganos, frecuentemente hacia hueso, hígado y pulmón.

A lo largo de la progresión en la mayoría de los casos el cáncer expresa receptor de andrógenos (AR), por lo cual la terapia de elección es la depleción androgénica lo cual disminuye el tamaño tumoral, probablemente por inducción de apoptosis y arresto de crecimiento. Sin embargo los carcinomas inevitablemente contienen o desarrollan células que pueden seguir creciendo durante la depleción hormonal, llevando a un estadio de peor pronóstico de la enfermedad y en el cual los tratamientos no brindan resultados efectivos (Schulz, Burchardt, & Cronauer, 2003).

Sin embargo en las últimas décadas la introducción de nuevas pruebas de diagnóstico y seguimiento, como el antígeno prostático específico (PSA), han mejorado el seguimiento de dicha enfermedad. Como se muestra en la figura 12 el PSA ayuda a los médicos a definir escenarios de la enfermedad y así poder elegir una terapia más adecuada.

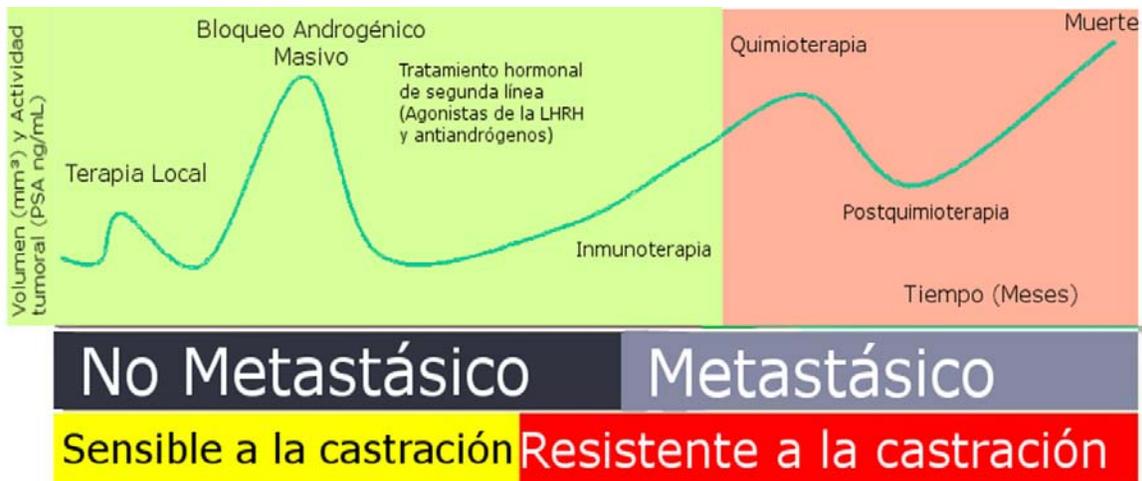


Figura 12.- Representación de la historia natural del cáncer de próstata representada mediante los niveles de antígeno prostático específico y volumen tumoral.

Como podemos ver tras la terapia local (prostatectomía radical) existe una recaída en la cual los niveles de PSA incrementan aún más, para contrarrestar este efecto se inicia con la terapia del bloqueo androgénico masivo. Sin embargo si el CaP tiene otra recaída tras este proceso ya que las células desarrollan el fenotipo CPRC. A partir de este punto, al ser resistente a la acción de los andrógenos, virtualmente ninguna terapia resulta efectiva (Figg, Chau & Small 2010)

b. Clasificación y Diagnóstico

El diagnóstico del cáncer de próstata no puede ser realizado a través de una sola prueba, este implica diversas pruebas como la de antígeno prostático específico (PSA), tacto digital rectal (DRE), perfil bioquímico, ultrasonido transrectal (TRUS), resonancia magnética nuclear (MRI) y biopsias (James, 2014). Además durante los últimos años se han desarrollado una serie de bio-marcadores moleculares, con el fin de mejorar el pronóstico y diagnóstico.

i. CLASIFICACIÓN TNM

Una vez realizado el diagnóstico, se puede evaluar el estadio en el cual se encuentra la enfermedad teniendo diferentes herramientas para ello, la AJCC (American Joint Committee on Cancer) creó un sistema de clasificación del cáncer (conocido como TNM) de próstata basado en 5 piezas de información clave (The American Cancer Society , 2017):

1. La extensión del tumor primario (categoría T)
2. La diseminación a nódulos linfáticos (categoría N)
3. Si el cáncer ha hecho metástasis (categoría M)
4. El nivel de PSA
5. El Grado Gleason

Tras la combinación de estos 5 parámetros clinico-patológicos el TNM nos permite clasificar el cáncer de próstata en 4 estados, relacionados a la progresión de esta neoplasia maligna (Figura 13) los cuales son:

- I. En el estado 1, los niveles de PSA son menores a 10 ng/mL. En este el tumor es microscópico, por lo que no puede sentirse mediante examinación digital rectal (DRE) , además el Grado Gleason debe ser menor a 6.
- II. En este el tumor puede ser sentido por DRE, el PSA en sangre se encuentra entre los 10-20 ng/mL. El tumor sigue localizado en la próstata sin señales de invasión pero ha crecido a lo largo de esta. Dependiendo de si ha crecido a lo largo de una o más zonas de la próstata se puede clasificar en estado II-a o estado II-b.
- III. En este caso el nivel de PSA es variable, lo que caracteriza este estado es que el tumor se ha diseminado hacia el tejido adyacente de la próstata, ya sea a las vesículas seminales o a los órganos contiguos. No muestra invasión de ningún tipo a nódulos linfáticos.
- IV. IV-A El tumor puede tener un Grado Gleason variable, así como niveles de PSA indefinidos, lo que caracteriza a este estado es que el tumor se ha diseminado hacia los nódulos linfáticos adyacentes, sin embargo no hay presencia de metástasis hacia alguna otra parte del cuerpo. IV-B En este caso el cáncer se ha diseminado hacia diferentes partes del cuerpo; otros nódulos linfáticos, huesos, y otros órganos.

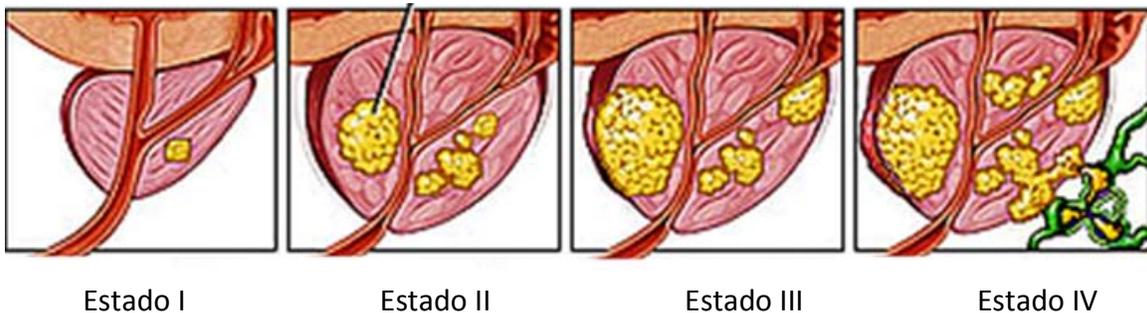


Figura 13.- Clasificación TNM del cáncer de próstata en sus diferentes estados.

Como podemos observar el estado I comprende un tumor focalizado y capsular, en el estado II el tumor se ha diseminado a diferentes zonas prostáticas, en el tercer estado hay invasión a tejido adyacente, y el cuatro es el primer estado metastásico en el cual el tumor ha migrado hacia un nódulo linfático centinela u otros órganos blanco (ProstAID, 2018).

ii. Sistema de clasificación por grado Gleason

El sistema de graduación Gleason para el adenocarcinoma prostático se originó en 1960-1970 tras un estudio aleatorio, bien controlado y prospectivo iniciado por el Dr. Donald Gleason, donde 2900 pacientes fueron incluidos. Este sistema detalla y resume, mediante patrones histológicos, la progresión de la enfermedad logrando la estratificación de la misma. Esto lo hace gracias a la tinción de los tumores de CaP mediante eosina y hematoxilina, observados en el microscopio a 40 y 100 aumentos.

El sistema Gleason define cinco patrones histológicos de crecimiento donde el patrón Gleason 1 representa el patrón más diferenciado y relacionado a un mejor pronóstico y el grado Gleason 5 como el estadio menos diferenciado y relacionado con un peor pronóstico. Dado que muchos tumores presentan dos o más patrones de diferenciación la escala Gleason fue diseñada con el propósito de correlacionar el grado de estos patrones de crecimiento con el comportamiento biológico del carcinoma. La relación está dada mediante la suma del patrón primario y el secundario; en el caso de que exista un solo patrón se considera dos veces y se suma (Chen & Zhou, 2016). En la figura 14 se muestran imágenes representativas de los patrones de crecimiento descritos por (Gleason, 1966), así como una breve descripción de los mismos. Además en la figura 15 se muestra la asociación del grado Gleason con el riesgo y desarrollo de la enfermedad, así como una imagen representativa de cada uno de estos grados.

Figura 14.- Patrones de crecimiento descritos por Gleason

Imagen modificada de (Gleason, 1966) (Humphrey, 2004)

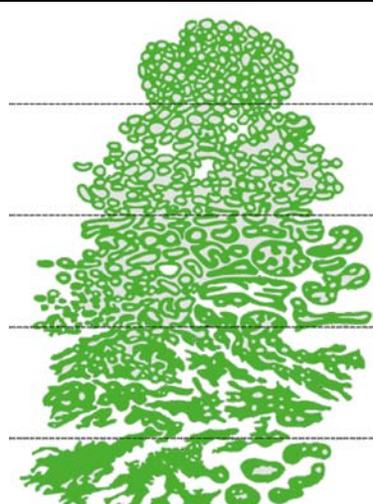
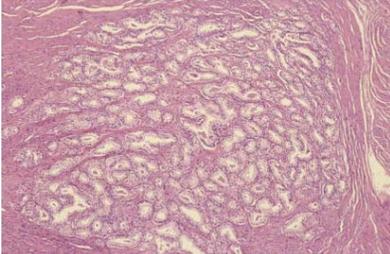
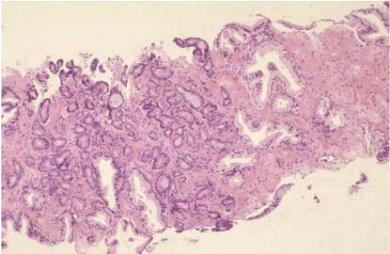
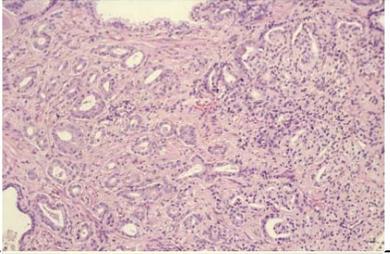
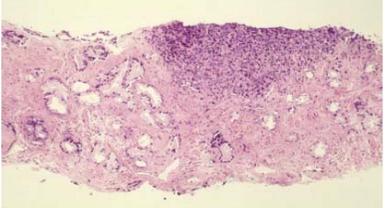
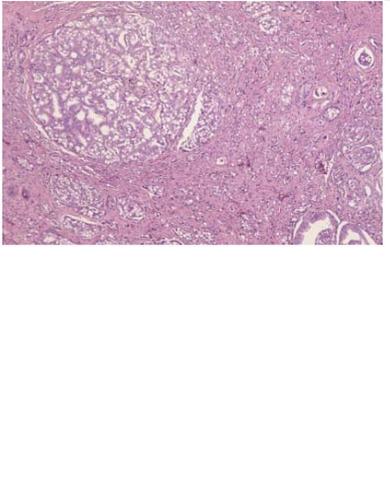
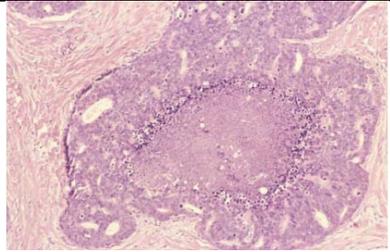
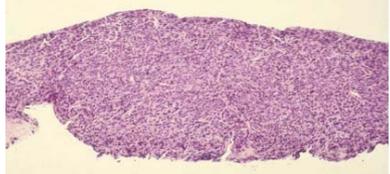
Patrón de crecimiento Gleason	Imagen Representativa <small>Imagen modificada de (Gleason, 1966)</small>	Descripción
1		Este patrón es raro, se caracteriza por un crecimiento uniforme y empacado compacto, pero definido, de ácidos ovalados. Este patrón es encontrado en el 3,5% de los pacientes (Humphrey, 2004).
2		En este caso tenemos ácidos bien definidos rodeados de masas con escasa definición, también característico por un menor grado de empaquetamiento, y la presencia de una mayor cantidad de estroma que separa los ácidos (Humphrey, 2004).
3		El más común de los patrones de crecimiento del cáncer de próstata; se distingue por tener una extensión irregular, ácidos pequeños a muy pequeños, y formaciones glandulares alargadas, grandes y angulares. Existe gran separación con estroma, y en algunos casos epitelio papilar (Humphrey, 2004).
4		Este estadio se pueden observar que los ácidos glandulares están fusionados creando masas, cadenas y agregados (Humphrey, 2004).
5		Caracterizado por agregados anaplásicos en lámina (5B), o masas sólidas con necrosis central (5A) (comedonecrosis). La forma general es difusa, e invasiva (Humphrey, 2004).

Figura 15 .- Estratificación de tumores Gleason por hematoxilina y eosina, y su asociación con el desarrollo y riesgo de la enfermedad

Imagen modificada de (Humphrey, 2004) (James, 2014)

Grado Gleason	Hematoxilina y eosina <small>Tomadas de (Humphrey, 2004)</small>	Desarrollo y Riesgo de la enfermedad
2+2=4		Entre los grados Gleason menores a 6, la determinación de Gleason 3 y 4 es bastante controversial debido a su pobre reproducibilidad, y baja correspondencia con las muestras tras la prostatectomía radical; por ello la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) recomienda que el diagnóstico de Gleason 3-4 sea usado con "discreción" y que se consulte con algún experto (Chen & Zhou, 2016). Este tipo de tumores son de bajo riesgo y de bajo grado de desarrollo (James, 2014).
3+3=6		El patrón de crecimiento 3 se encuentra en la gran mayoría de los tumores, además de que en la mayoría de los casos de CaP se encuentra en su forma pura (3+3); en la cual si bien se observan glándulas bien diferenciadas aunque más oscuras y difusas respecto a los grados Gleason anteriores (Chen & Zhou, 2016).
3+4=7		Aunque no es tan común como encontrar el patrón 3 puro, es bastante usual encontrarlo con los patrones 4 y 5. Siendo el caso más común aquel en el que se encuentra con el patrón de crecimiento 5 (Chen & Zhou, 2016).
3+5=8		
4+4=8		Este es un carcinoma de alto grado, con un crecimiento pobremente diferenciado, en forma de cadenas, de células epiteliales malignas. Además en este estadio el desarrollo histológico es similar a las células renales, por lo que se le conoce como patrón hipernefroide, sin embargo este patrón de crecimiento no es común (Chen & Zhou, 2016). Este es un carcinoma de alto riesgo (James, 2014).

Grado Gleason	Hematoxilina y eosina <small>Tomadas de (Humphrey, 2004)</small>	Desarrollo y Riesgo de la enfermedad
Comedocarcinoma (5A+5A=10)		En este grado se tiene comedocarcinoma intraductal, con necrosis central rodeada por masas sólidas y cribiformes de carcinoma, el aspecto es similar al patrón 3 pero con los cuerpos de necrosis al centro (Chen & Zhou, 2016).
5diB+5B=10		Este se compone de láminas de adenocarcinoma anaplástico, escasamente diferenciado, con sólo pequeñas células glandulares rodeando el neoplasma maligno. Es poco común encontrar la forma 5 en estado puro (Chen & Zhou, 2016).

Habiendo descrito la forma en que se clasifican los tumores, ahora se abordará el tema del diagnóstico así como las diferentes herramientas que existen para ello, las cuales son listadas a continuación:

I. Antígeno Prostático Específico (PSA)

El antígeno prostático específico es una calicreína (serín-proteasa) codificada por el gen (*KLK3*) el cual se encuentra en el cromosoma 19q13.4; dicha proteína es producida por las células epiteliales de la glándula prostática, presente en las secreciones normales de la próstata y elevada en el cáncer. Dada su órgano-especificidad este biomarcador es el más utilizado en la clínica, desde su aprobación en 1994. Un nivel de PSA mayor a 4 ng/mL está definido como superior al límite normal (Saini, 2016).

Además de su órgano especificidad lo que convierte al PSA en un él bio-marcador por excelencia para el cáncer de próstata es la relación proporcional entre niveles de PSA y riesgo de cáncer de próstata como se indica en la tabla 1:

Tabla 1.- Relación entre niveles de antígeno prostático y riesgo de cáncer de próstata.

Tabla modificada de (James, 2014).

Niveles de PSA (ng/mL)	Riesgo (%) de cáncer de próstata
0-0.5	6.6%
0.6-1	10.1%
1.1-2	17.0%
2.1-3	23.9%
3.1-4	26.9%

Sin embargo a pesar de las ventajas que puede presentar este biomarcador, existe un alto índice de sobre-diagnóstico (falsos positivos); ya que sólo el 27% de los pacientes con niveles de PSA entre 4.1-9.9 ng/mL presentan cáncer de próstata. Estos niveles de PSA son conocidos como “zona gris” dado la falta de

especificidad para detectar la enfermedad; por ello es necesario relacionarlo con otras mediciones como %PSA libre, velocidad de PSA, densidad de PSA (Ross, Ahmed, Raison, & Dasgupta, 2016).

II. Tacto Digital Rectal (DRE)

El tacto digital rectal (DRE) es realizado mediante la examinación física de la próstata vía recto buscando bultos, ensanchamientos, o áreas de dureza sospechosa. Como la mayoría de los casos de CaP se encuentran en la zona periférica el 18% de los casos pueden diagnosticarse con DRE sin necesidad de determinar los niveles de PSA, cuando el volumen es igual o mayor a 0.2 mL (James, 2014).

Sin embargo la Asociación Urológica Americana (AUA), en 2013 no pudo encontrar evidencia concluyente para el uso de DRE como herramienta de diagnóstico de primera línea debido a su falta de sensibilidad y la alta posibilidad de errar en la detección de tumores no detectados durante la examinación (Carter, Albertsen, & Zietman, 2013). A pesar de ello, el panel de la AUA (Carter, Albertsen, & Zietman, 2013) recomienda el uso del tacto digital rectal en conjunto con otras herramientas de diagnóstico, con el fin de construir un diagnóstico confirmatorio.

III. Ultrasonido Transrectal (TRUS)

Esta técnica consiste en insertar una sonda que emite ondas sonoras que crean video imágenes de la próstata (figura 16). Este ultrasonido puede detectar tumores que no pueden ser detectados por DRE; además de forma conjunta con la prueba de antígeno prostático específico, puede ayudar a discernir el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna.

Cabe mencionar que el TRUS en ciertos escenarios no es capaz de distinguir entre tejido normal y tejido neoplásico; sin embargo esta prueba, además de ser útil en el apoyo al diagnóstico, es utilizada en la realización de biopsias brindando una localización visual de los posibles tumores (James, 2014).

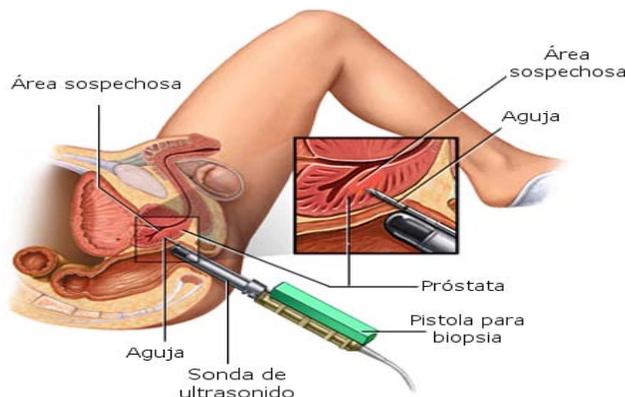


Figura 16.- Ultrasonido transrectal.

Como podemos observar el TRUS nos permite identificar formaciones tumorales, a la par de guiar al médico para la ejecución de la biopsia. Imagen modificada de (Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2000).

IV. Imaginología por Resonancia Magnética (MRI)

La resonancia magnética ha demostrado ser de utilidad en el diagnóstico, localización, estratificación de riesgo y para la determinación del estadio del cáncer de próstata; lo cual abre la oportunidad para el tratamiento focalizado del tumor. La técnica de MRI utilizada en cáncer de próstata es la MRI multiparamétrica, la cual incluye diversas técnicas funcionales de MRI; lo cual permite definir la localización anatómica del tumor, distinguir las cuatro zonas prostáticas, el estroma fibromuscular, las vesículas seminales, ductos eyaculatorios y la uretra. Esta técnica permite detectar además de cáncer, otras anomalías prostáticas benignas como; prostatitis, fibrosis, tejido cicatrizado, hemorragias e hiperplasia prostática benigna (Ghai & Haider, 2015).

V. Biopsia

Este método de diagnóstico y estratificación de la enfermedad debe, por su alta invasión al paciente, teniendo importantes desventajas para el paciente como la posibilidad de infecciones, sangrado, dificultades urinarias y lesiones asociadas al procedimiento.

Por lo tanto antes de indicar si la biopsia es necesaria, se debe realizar un análisis comprehensivo de la historia clínica, edad, herencia, comorbilidades, los resultados de los demás análisis como las diferentes determinaciones de PSA, tacto rectal digital DRE y MRI.

Las biopsias pueden ser realizadas de forma transrectal, perianal o transuretral. Pueden guiarse por medio de TRUS para brindar a los clínicos la localización precisa del posible tumor; una vez que el posible cuerpo tumoral es extraído, puede ser analizado mediante pruebas patológicas; estas pruebas brindan la capacidad de determinar la severidad de la enfermedad y las características de la misma (James, 2014).

VI. Nuevos Biomarcadores

A más de 20 años desde la adopción del PSA como prueba de rutina en el diagnóstico de CaP, han surgido y madurado más tecnologías de diagnóstico. Dentro de esta nueva generación de herramientas las tecnologías genómicas como los microarreglos y secuenciación masiva han permitido grandes avances al crear perfiles característicos que permiten una mayor comprensión y seguimiento de la enfermedad. Como resultado de los avances en estas tecnologías “ómicas”, en la literatura se han reportado muchos nuevos perfiles y biomarcadores asociados a CaP. Además estas tecnologías, lejos de excluir a las ya existentes pueden valerse de ellas (como el PSA o TRUS) para brindar al médico un mejor perfil sobre la enfermedad, lo que permite llevar a cabo un diagnóstico más certero y tener un mejor pronóstico brindando mejores opciones terapéuticas al paciente (Figura 17).

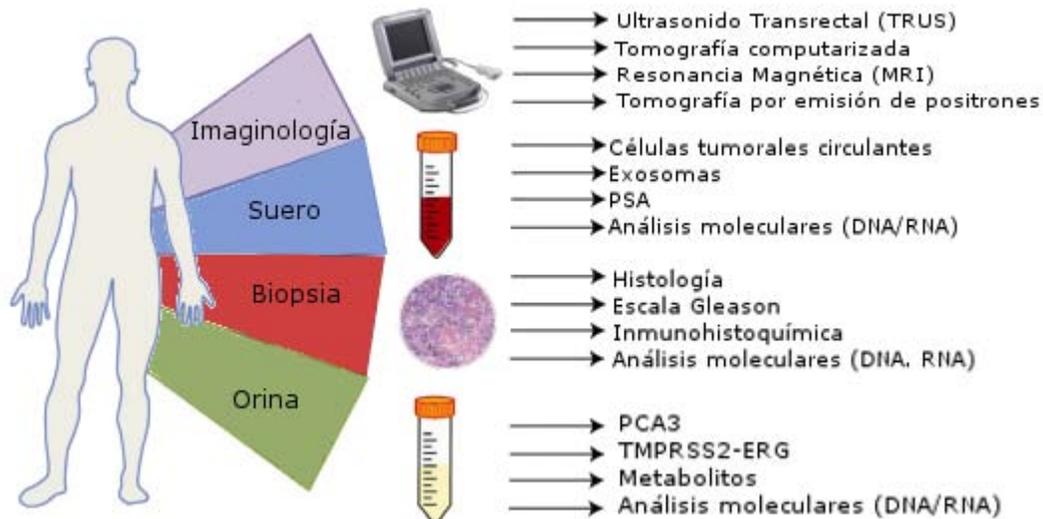


Figura 17.- Mosaico de herramientas de diagnóstico y pronóstico utilizadas para el cáncer de próstata.

Cabe destacar que en el área de las llamadas biopsias líquidas se han hecho presentes el uso de tecnologías genómicas para hallar marcadores asociados a un mal pronóstico de CaP de (Presner, Rubin, & Chinnaiyan, 2012).

1. PCA3

El antígeno de cáncer de próstata 3 (PCA3) es un RNA no codificante (lncRNA), que se encuentra en el cromosoma 9 (9q21-22) de función aún desconocida (Saini, 2016). Este lncRNA no se expresa en tejido prostático normal, tiene baja expresión en tejido con hiperplasia y es altamente expresado en cáncer de próstata (>90% de los tejidos de CaP lo sobre expresan respecto a tejidos con BPH y tejidos normales) (Presner, Rubin, & Chinnaiyan, 2012). A pesar de que su función permanece desconocida, PCA3 RNA sirve como un biomarcador útil para cáncer de próstata encontrándose altamente expresado en más del 95% de los casos de CaP primario y metastásico, además de ser una prueba robusta por su alta especificidad. El nivel de PCA3 tiene una mayor especificidad y es un valor más predictivo que el PSA sérico (Saini, 2016).

Uno de los usos más explorados de este marcador es su habilidad para brindar un diagnóstico oportuno en varones con altos niveles de PSA y una biopsia negativa. Por todo esto la detección de PCA3 en orina es uno de los métodos más utilizados en el diagnóstico de CaP (Saini, 2016).

2. TMPRSS2-ERG

El gen de fusión *TMPRSS2-ERG* se ha identificado en cerca del 50% de los casos de cáncer de próstata. La determinación de su transcrito (RNA) en orina, en conjunto con *PCA3* y *PSA* ha demostrado incrementar la sensibilidad de estas pruebas (de un 68% hasta un 76%), así como mejorar la determinación del riesgo (hasta un 94%) (Saini, 2016). Aunque las implicaciones de esta fusión no han sido completamente dilucidadas, existen trabajos que sugieren que aquellos tumores positivos a la fusión, tienen mayores índices de agresividad, metástasis y

mortalidad (Demichelis, Fal, & Rubin, 2007); algunos otros estudios han reportado que no existe dicha asociación (Gopalan, Leversha, & Gerald, 2009).

3. AMACR

La sobre-expresión de la enzima α -Metilcil coenzima A racemasa es otro biomarcador determinado mediante su expresión a nivel de RNA, el cual ha mostrado tener alta sensibilidad (90%) y especificidad (90%), en las pruebas realizadas en tejido proveniente de biopsias (Presner, Rubin, & Chinnaiyan, 2012). Además a nivel de proteína mantiene una alta sensibilidad (97%) y especificidad (100%) para la detección de cáncer de próstata. Además de esto la pérdida de su expresión está relacionada con recurrencia y metástasis (Saini, 2016).

4. PTEN

PTEN es un gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 10, el cual se encuentra deletado en cáncer de próstata. Esta delección lleva a la activación de la vía de la fosfoinositol 3-quinasa, central para el crecimiento celular, proliferación y metástasis. Además las delecciones de *PTEN* están asociadas con un mal pronóstico y resistencia a la terapia hormonal.

La detección de estas delecciones, en combinación con la detección de *TMPRSS2-ERG* tienen alto potencial en el pronóstico (Saini, 2016).

1. Tratamiento

A lo largo de las dos últimas décadas se han reportado los índices más altos de sobre-diagnóstico y sobre-tratamiento del cáncer de próstata CaP, sin embargo las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento no han sido suficientes para el control de las altas tasas de incidencia y mortandad de esta neoplasia (Chen & Zhao, 2013).

El manejo terapéutico del CaP, aún en la enfermedad localizada, es un tópico complejo debido a la heterogeneidad de la enfermedad y a la gran cantidad de agentes terapéuticos estado-específicos disponibles (Heidenreich, Bastian, Bellmunt, Mottet, & et.al., 2014). A continuación se describen las estrategias terapéuticas de primera línea utilizadas en el cáncer de próstata:

VII. Vigilancia Activa

Esta es la primera opción para el tratamiento de pacientes con bajo riesgo de desarrollar la enfermedad; la estrategia consiste en no dar ninguna clase de tratamiento inicial, hasta que los resultados de las pruebas diagnósticas se modifiquen, en ese momento se administrará el tratamiento adecuado y se evaluará la respuesta del paciente a esta terapia. Si el cáncer comienza a empeorar se iniciará el tratamiento convencional (Heidenreich, Bastian, Bellmunt, Mottet, & et.al., 2014).

VIII. Cirugía

La cirugía es indicada para pacientes con buena salud, un tumor localizado y de alto riesgo. La prostatectomía radical (RP) y la linfadenectomía pélvica (PLDN) son las cirugías mayormente indicadas para el cáncer de próstata (Chen & Zhao, 2013). Tras 10 años de seguimiento, (Bill-Axelson, Holmberg, Johansson, & et.al., 2014), demostró que la RP reduce la mortalidad, el riesgo de metástasis y la progresión local del CaP. En la figura 18 se muestran las diferentes modalidades de prostatectomía radical.

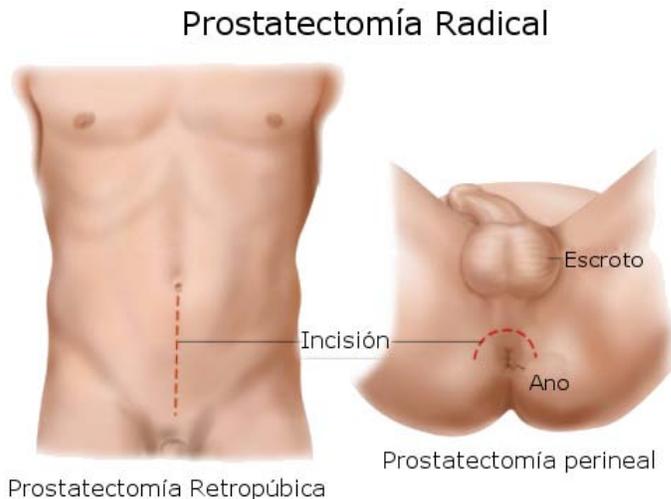


Figura 18.- Tipos de prostatectomía radical.

La prostatectomía radical puede ser llevada a cabo mediante dos clases de procedimientos quirúrgicos, el primero es la prostatectomía retro púbrica en la cual se retira la próstata mediante una incisión en el abdomen; el segundo es la prostatectomía perineal, en la cual la próstata es removida mediante una incisión en el perineo, la ventaja de este método es que permite extraer a la par los nódulos linfáticos adyacentes. Imagen modificada de (PubMed Health, 2018)

Los pacientes más probables a responder a esta clase de terapia son aquellos con un Grado Gleason menor a 8 y niveles de PSA menores a 20 ng/mL, así como un tumor estado II según la clasificación TNM (Chen & Zhao, 2013).

IX. Radioterapia

Después de la prostatectomía radical (RP) la radioterapia está considerada como la segunda modalidad terapéutica para la atención de tumores localizados de alto riesgo. La radioterapia de haz externo (EBRT) sigue siendo el estándar de oro para terapia en diferentes países e instituciones; y ha tenido avances tecnológicos en las últimas décadas (Heidenreich, Bastian, Bellmunt, Mottet, & et.al., 2014).

Otra clase de radioterapia bastante común en la clínica es la braquiterapia la cual consiste en la introducción de insertos radioactivos, los cuales tienen una vida media de hasta 60 días. Un estudio comparativo entre éstas modalidades de radioterapia, develó que ambas tienen resultados similares, alcanzando niveles de supervivencia del 91.7% y del 91 % respectivamente, luego de 5 años. Sin embargo esta clase de terapias tiene sus bemoles como desórdenes urinarios y disfunción eréctil (Chen & Zhao, 2013).

Finalmente tenemos a la terapia de haz de protones (PBT) la cual tiene como principal ventaja la posibilidad de utilizar dosis más precisas de radiación, en comparación con cualquier otro tipo de radioterapia. Esto supone ventajas

importantes incrementando la tasa de supervivencia de los pacientes durante los últimos 10 años (Chen & Zhao, 2013).

X. Terapia Hormonal

La terapia de privación de andrógenos (ADT) ha sido el tratamiento de primera línea contra el cáncer de próstata. Los efectos clínicos benéficos de la ADT en varones con cáncer de próstata metastásico son rápidos y dramáticos (Chen & Zhao, 2013).

La terapia hormonal como tratamiento para el cáncer de próstata fue implementada por (Huggins & Hodges, 1941); en esa época los métodos de terapia hormonal consistían en la castración quirúrgica, conocida como orquiectomía, y en la supresión de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) mediante el uso del fármaco dietilestilbestrol (DES).

Dichos tratamientos solían ser solamente aplicados a varones con un cáncer en estado avanzado debido a que la orquiectomía es permanente (Namiki, Ueno, & Kitagawa, 2012), y a que la ventana terapéutica del DES, es bastante estrecha resultando en toxicidad cardiovascular.

Por esta razón comenzaron a explorarse nuevos agentes terapéuticos que fueran capaces de inhibir la producción de testosterona mediante la desensibilización de las células pituitarias, utilizando LHRH y agonistas de esta hormona (leuprolide) lo que regula a la baja a los receptores de LHRH. Estudios clínicos revelaron que el leuprolide es equivalente a una dosis de 3 mg de DES, pues ambos reducen de forma similar los niveles de testosterona en suero. Sin embargo los agonistas de LHRH presentan efectos adversos; agudos como sofoco, pérdida de libido y disfunciones eréctiles; crónicas como padecimientos músculo-esqueléticos, hematológicos y cardiovasculares (Perlmutter & Lepor, 2007).

Bloqueo androgénico máximo (BAM)

Los andrógenos son producidos en un 95% por los testículos y en un 5% por las glándulas adrenales. Sin embargo el efecto de los antagonistas de LHRH sobre los andrógenos adrenales es controversial; Huggins y Scott demostraron los beneficios de la adrenalectomía en hombres después de la orquiectomía.

Tras esto se comenzó a estudiar la forma de emular ambos efectos farmacológicamente, lográndolo mediante el uso combinado de agonistas de LHRH y un anti andrógeno. Los antiandrógenos flutamida, bicalutamida y nilutamida bloquean los efectos de los andrógenos adrenales sobre el receptor de andrógenos (AR). Además se pueden utilizar otra clase de fármacos, a modo de terapia hormonal secundaria, para garantizar un efecto hormonal sostenido, como los inhibidores adrenales de andrógenos (Ketoconazol y corticoesteroides); así como estrógenos (DES, estradiol, fosfato de poliestradiol) (Perlmutter & Lepor, 2007).

XI. Quimioterapia

Hasta antes de los años noventa la quimioterapia no era considerada efectiva para tratar el cáncer de próstata; de hecho se creía que la quimioterapia no era benéfica para esta clase de neoplasia. Sin embargo tras mediados de los noventa, el uso de quimioterapia en pacientes con cáncer de próstata refractario a hormonas (HRPC) reflejó una mejora importante en la calidad de vida de los pacientes, así como el decremento en los niveles de PSA (Chen & Zhao, 2013).

La familia de los taxanos es el grupo de quimioterapéuticos más utilizada para el tratamiento de cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). Los taxanos son agentes que se unen a la β -tubulina, por lo cual estabilizan a los micro túbulos induciendo arresto del ciclo celular y apoptosis (Figura 19); este proceso es conocido como hiperestabilización de los micro túbulos. Dentro de los quimioterapéuticos más comunes de esta clase están el paclitaxel y el docetaxel (Montero & Valero, 2005).

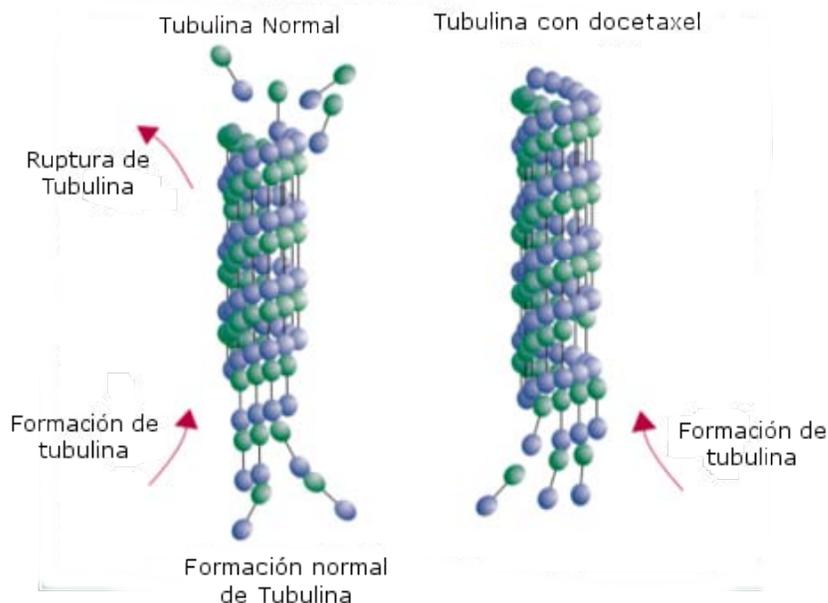


Figura 19.- Efecto del docetaxel en la función de los micro-túbulos (Hiperestabilización).

Mecanismo de acción del docetaxel. Este mecanismo consiste en la estabilización de la tubulina; al impedir el desensamble de esta proteína, se impide realizar el rearrreglo del citoesqueleto, bloquea la mitosis al evitar la formación de un huso mitótico. En otras palabras bloquea la división celular y la reproducción (Montero & Valero, 2005).

En 2004, el docetaxel fue reconocido como el primer agente quimioterapéutico que confería una mejora en la supervivencia promedio en pacientes con cáncer de próstata metastásico (Kapoor & Hotte, 2016).

5. Alteraciones Genómicas en Cáncer de Próstata

La genómica del cáncer de próstata ha sido difícil de estudiar comparando con otros tipos de cáncer por diversas razones; primero porque la localización anatómica de la próstata hace difícil obtener muestras para la investigación; la segunda razón es la dificultad de obtener muestras de estados avanzados de la enfermedad (CRPC). Sin embargo cada vez más biopsias tanto de próstata como de metástasis a hueso y de tejidos blandos han permitido obtener tejidos en distintos estadios de la enfermedad (Rubin & Demichelis, 2018).

Existen diversas alteraciones que promueven la aparición y progresión del cáncer de próstata tales como mutaciones somáticas, alteraciones en el número de copia, marcas epigenéticas y re arreglos cromosómicos como duplicaciones, deleciones y fusión de genes (Berger, Garraway, & et.al., 2011).

a. Cambios genéticos

I. Mutaciones Somáticas

Estudios de secuenciación masiva han caracterizado el panorama genómico del cáncer de próstata identificando pocas mutaciones somáticas altamente recurrentes en esta patología incluyendo: mutaciones en *SPOP*, *TP53*, *PTEN* y *FOXA1*, todas con <15% de incidencia (Rubin & Demichelis, 2018).

II. Alteraciones en el número de copias

Gracias a técnicas de hibridación genómica comparativa (CGH), se logró identificar las principales alteraciones somáticas en el número de copia (SCNAs) en un alto porcentaje de las muestras de CaP focalizado (75%) (Rubin & Demichelis, 2018). Las pérdidas genómicas son 5 veces más comunes que las ganancias; dentro de las principales SCNAs están contemplados los genes *MYC*, *RB1*, *PTEN* y *CHD1* (Dan & et.al., 2015).

III. Re arreglos Cromosómicas

El daño al DNA y los re arreglos genéticos son prioridades para el cáncer de próstata. Anteriormente se ha caracterizado fusión de genes como promotor de mutaciones en leucemia, lo cual llevo al estudio de esta clase de re arreglos cromosómicos en cáncer de próstata encontrando eventos de fusión del 50% al 75% de los pacientes de CaP (White, Feng, & Maher, 2013).

IV. Genes de Fusión

Dentro del cáncer de próstata los re arreglos cromosómicos más comunes son las fusiones con los genes de la familia de factores de transcripción ETS. Se ha demostrado que las fusiones más importantes son aquellas entre la 5'UTR (untranslated región) del gen *TMPRSS2* (21q22.3), con los factores de transcripción de la familia ETS, como *ERG* (21q22.2), *ETV1* (7p21.2) o *ETV4*, lo que indica un nuevo mecanismo para la sobreexpresión de genes ETS en cáncer de próstata.

Además se han descubierto otros tres elementos de respuesta a andrógenos con patrones 5' que se fusionan con *ERG*, como lo son *SLC45A3*, *HER-PUD1* y *NDRG1* (Rubin & Demichelis, 2018).

V. Gen de Fusión TMPRSS2-ERG

TMPRSS2 (*Transmembranal Protein Serin type 2*) es un gen responsivo a andrógenos específico de la próstata que codifica para una proteína perteneciente a la familia de las serin proteasas; la función de este gen en la carcinogénesis recae sobre los factores de transcripción de la familia *ETS* (erythroblast transformation-specific) cuando ocurre la fusión.

ERG es un oncogen que codifica un factor de transcripción de esta misma familia (*ETS*), involucrado en proliferación celular, diferenciación, angiogénesis, inflamación y apoptosis (Wang, Wang, Liang, & et.al., 2017). Esto se debe a que el factor de transcripción *ERG*, es un importante regulador de las vía de señalización WNT/LEF1 (Wu, Zhao, & Yu, 2013) y promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Leshem, Berger, & et.al., 2011).

El trabajo realizado por (Tomlins, Rhodes, Kuefer, & et.al., 2005) demostró que más del 55% de los casos de CaP sobre-expresan *ERG* y, mediante el uso de un método estadístico innovador, se comprobó que en la mayoría de los casos esta sobre-expresión se debe a la fusión entre *ERG* y *TMPRSS2*, ambos localizados en el cromosoma 21, aproximadamente a 3 Mb de distancia. El hecho de que la distancia entre estos dos genes sea corta, influye en la alta frecuencia de rearrreglos entre estos genes.

Los principales mecanismos para que se dé la fusión entre ambos genes son: la delección de una parte de la región intergénica que separa a ambos genes, la translocación de uno de los dos genes o bien, por la ocurrencia de ambos mecanismos (Rathinavelu & Levy, 2015) (Figura 20).

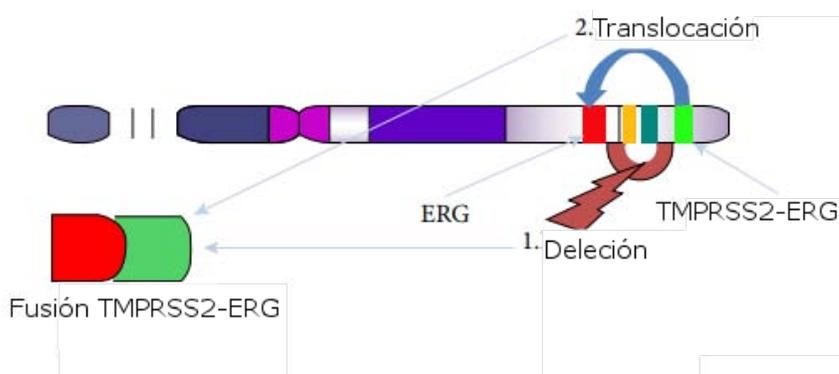


Figura 20.- Mecanismo de fusión del gen *TMPRSS2* con el gen *ERG*.

Este puede deberse a la delección en la región intergénica o bien a la translocación de alguno de estos genes a la región promotora del otro (Rathinavelu & Levy, 2015).

Esto da como resultado la unión entre la región promotora y 5' UTR del gen *TMPRSS2*, además del exón 1 del mismo gen, con el exón 4 del gen *ERG* (Figura 21). Esto permite que el gen *ERG* sea sobre expresado ya que su nueva región promotora responde a andrógenos, dando como resultado una proteína *ERG* funcional pero cuyos aminoácidos 1 al 44 son eliminados del producto final (McGarty & et.al., 2014).

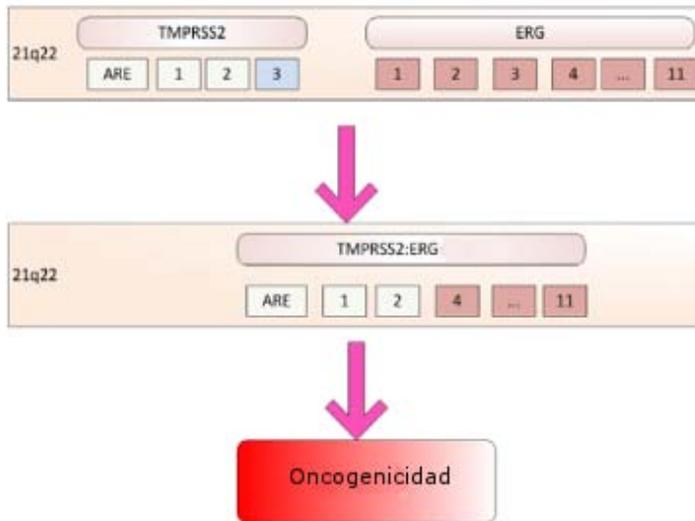


Figura 21.- Regiones genómicas implicadas en la fusión.

Como podemos ver el promotor de TMPRSS2, con su región de elementos de respuesta a andrógenos (ARE), así como dos de sus exones se unen con el exón 4 al 11 del gen ERG (McGarty & et.al., 2014).

6. Vías de señalización involucradas en cáncer de próstata

a. Los Andrógenos

Los andrógenos, u hormonas sexuales masculinas, se definen como sustancias capaces de desarrollar y mantener las características sexuales masculinas en tejidos reproductivos (principalmente en el tracto genital, fertilidad y características sexuales secundarias) así como contribuyen con el metabolismo anabólico de algunos tejidos somáticos; dichas moléculas son sintetizadas en las células de Leydig ubicadas en los testículos.

La testosterona junto con su metabolito, 5 α -dihidrotestosterona (DHT), son los principales andrógenos masculinos, siendo ambas moléculas de 19 carbonos con un núcleo esterano (Figura 22) (Handelsman, 2016).

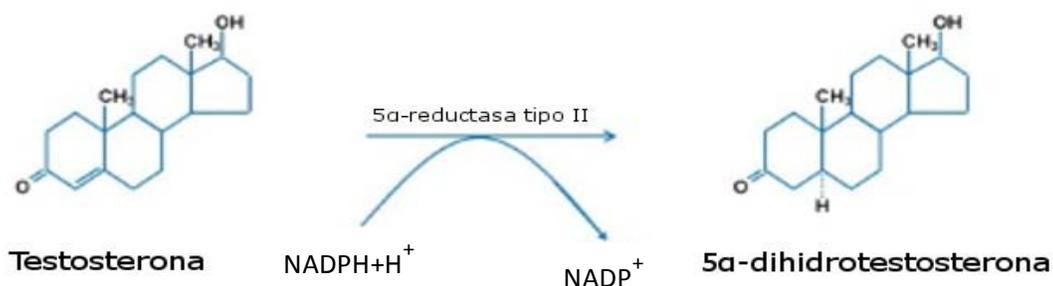


Figura 22.- Estructura química de los andrógenos.

Podemos notar que los dos andrógenos principales son hormonas del tipo esteroideo. Al ser reducida por la 5 α -reductasa, la testosterona pierde un doble enlace dando origen a su metabolito más activo DHT (McEwan & Brinkmann, 2016).

Tanto la testosterona como el DHT ejercen su efecto biológico mediante la unión al receptor de andrógenos (AR) y la inducción de su actividad transcripcional (Heinlein & Chang, 2004); aunque la afinidad de ambas hormonas por el receptor de andrógenos es diferente, siendo dos veces mayor la afinidad por DHT, este efecto se ve compensado por una mayor concentración de testosterona en el cuerpo (Grino, Griffin, & Wilson, 1990).

La testosterona (T) tiene como blancos células en el hipotálamo, la glándula pituitaria, los testículos y el ducto wolffiano; tras llegar a su blanco se une al receptor de andrógenos (AR) formando un complejo T-AR, el cual se une a secuencias específicas de DNA lo que le permite regular la transcripción de genes asociados a espermatogénesis (como el gen que codifica para la RNA helicasa testicular regulada por gonadotropinas *GRTH*) (Villar, Tsai-Morris, & Dufau, 2012), y diferenciación de los ductos Wolffianos (gen *Trp63* encargado de la diferenciación de epitelios) (Murashima, Miyagama, Yamada, & et.al., 2011), además de la retroalimentación negativa en la síntesis de gonadotropinas pues regula al polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria *PACAP* (Grafer & Halvorson, 2013) (Figura 23).

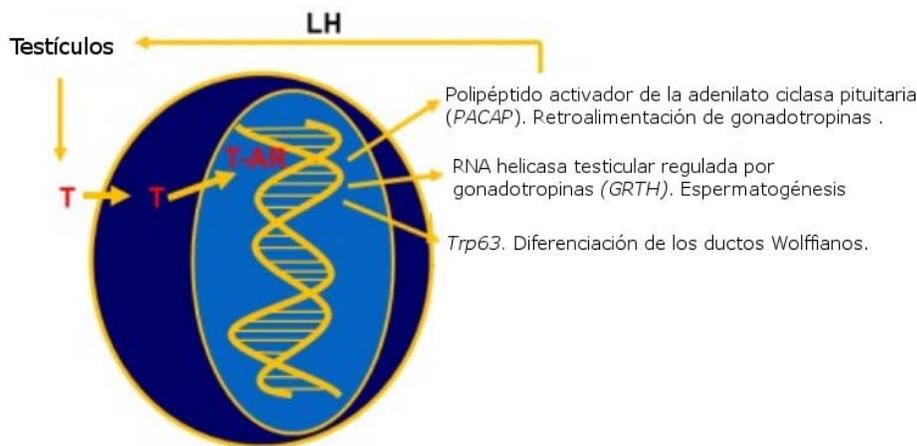


Figura 23.- Mecanismo de acción de la testosterona sobre las células blanco.

Como podemos ver en la imagen al llegar al citosol de la célula blanco, la testosterona forma un complejo con el receptor de andrógenos el cual le permite translocarse al núcleo, para acoplarse al promotor de los genes responsivos a andrógenos (McEwan & Brinkmann, 2016).

Cuando la testosterona llega al seno urogenital, el tracto urogenital y demás órganos blanco, entra a la célula y la 5α -reductasa tipo 2 se encarga de metabolizar a dicha hormona. Una vez que se forma la DHT, este metabolito se une al receptor de andrógenos formando un complejo DHT-AR que funge como factor de transcripción, regulando genes relacionados con el desarrollo de la próstata como lo son *NOTCH* y β -*catenina* (Nantermet, Xu, Ray, & et.al., 2003), genitales externos al tener un efecto en genes relacionados al desarrollo del pene como el gen queratina 33B (*Krt33b*) (Ma, Wu, Gong, & et.al., 2014) y caracteres sexuales secundarios (Figura 24) (McEwan & Brinkmann, 2016).

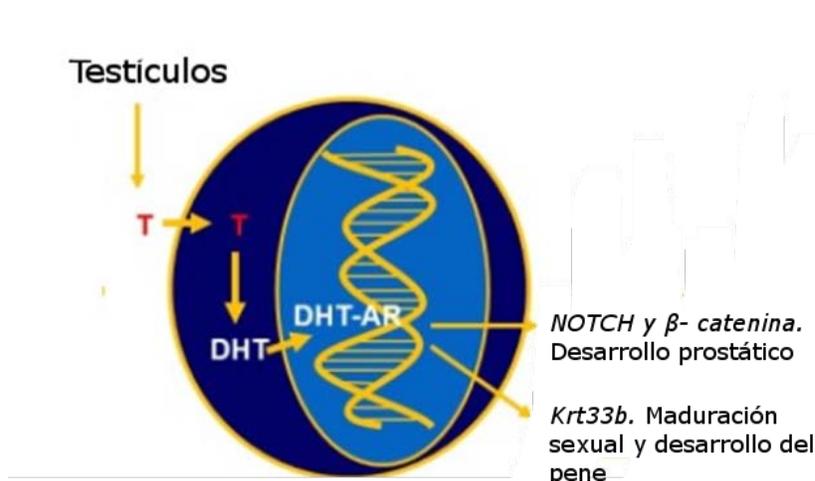


Figura 24.- Mecanismo de acción de la DHT.

Como podemos ver en la imagen al llegar al citosol de la célula blanco la testosterona metabolizada por la 5 α -reductasa en DHT. Esta DHT forma un complejo con el receptor de andrógenos el cual le permite translocarse al núcleo, para acoplarse al promotor de los genes responsivos a andrógenos (McEwan & Brinkmann, 2016).

b. Receptor de Andr6genos

El receptor de andrógenos (AR) es un factor de transcripción nuclear miembro de una familia de receptores esteroideos. El gen que codifica para este receptor se encuentra en el cromosoma X (q11-12) y está compuesto por ocho exones. Codifica para una proteína de 919 aminoácidos y masa de 110 kDa, la cual consta de cuatro dominios; el dominio N-terminal (NTD) el cual es constitutivamente activo y puede activar la transcripción de forma independiente a los andrógenos; el dominio de unión a ácidos desoxirribonucleicos (DBD) que consiste en dos dedos de zinc, que tienen un motivo (P-box) que coordina el contacto específico del AR con los genes blanco; el dominio de unión a ligando (LBD) el cual permite la unión del AR con la testosterona y DHT por lo cual este dominio representa el principal mecanismo de control para la vía de señalización de los andrógenos; finalmente la región bisagra que se encarga de separar el dominio de unión a ligando del dominio de unión a ácidos nucleicos (Figura 25) (Lonergan & Tindall, 2011).

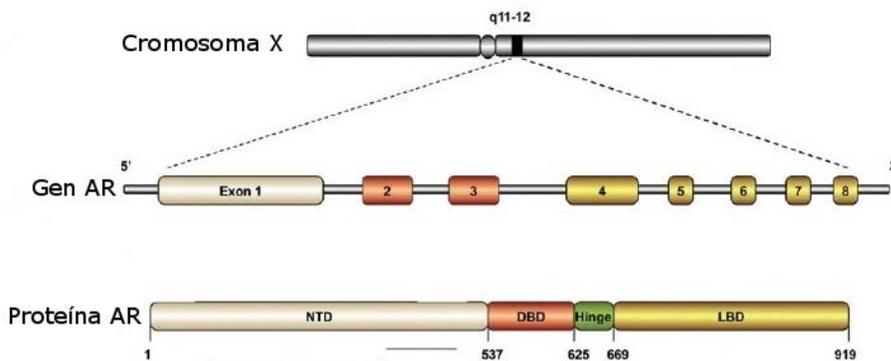


Figura 25.- Representación del gen y proteína del receptor de andrógenos.

En ella se muestran los cuatro dominios principales; el dominio N terminal, el de unión a ácidos desoxirribonucleicos, el dominio de unión a ligando y la región bisagra. Codificados por el cromosoma X en el brazo q11-12. (Lonergan & Tindall, 2011).

c. Acción del Receptor de Andrógenos sobre la próstata

El receptor de andrógenos en ausencia de su ligando permanece, principalmente en el citoplasma, donde se asocia a las proteínas de choque térmico (HSP) unidas a proteínas del cito esqueleto y chaperonas (Lonergan & Tindall, 2011); una vez que la testosterona o la DHT se unen al AR, hacen que este pierda la unión con las HSP, fosforilando al receptor de andrógenos, logrando translocarse al núcleo y uniéndose como homodímero a los enhancers de genes responsivos a andrógenos. Acto seguido el receptor de andrógenos recluta co-reguladores que activan la maquinaria transcripcional, uniéndose de forma directa e indirecta a proteínas como la RNA pol II, factores de transcripción generales (GTF's) (McEwan & Brinkmann, 2016).

El receptor de andrógenos puede ser transactivado en la ausencia, o con bajos niveles, de DHT. Esto mediante la activación de muchos mecanismos, incluyendo péptidos extracelulares como el factor de crecimiento tipo insulina (ILGF), el factor de crecimiento epidermal (EGF) y la interleucina 6 (IL-6) (Figura 26) Esto permite mantener al receptor de andrógenos transcripcionalmente activo en condiciones de depleción androgénica, lo cual permite el desarrollo del fenotipo de cáncer resistente a la castración (Lonergan & Tindall, 2011).

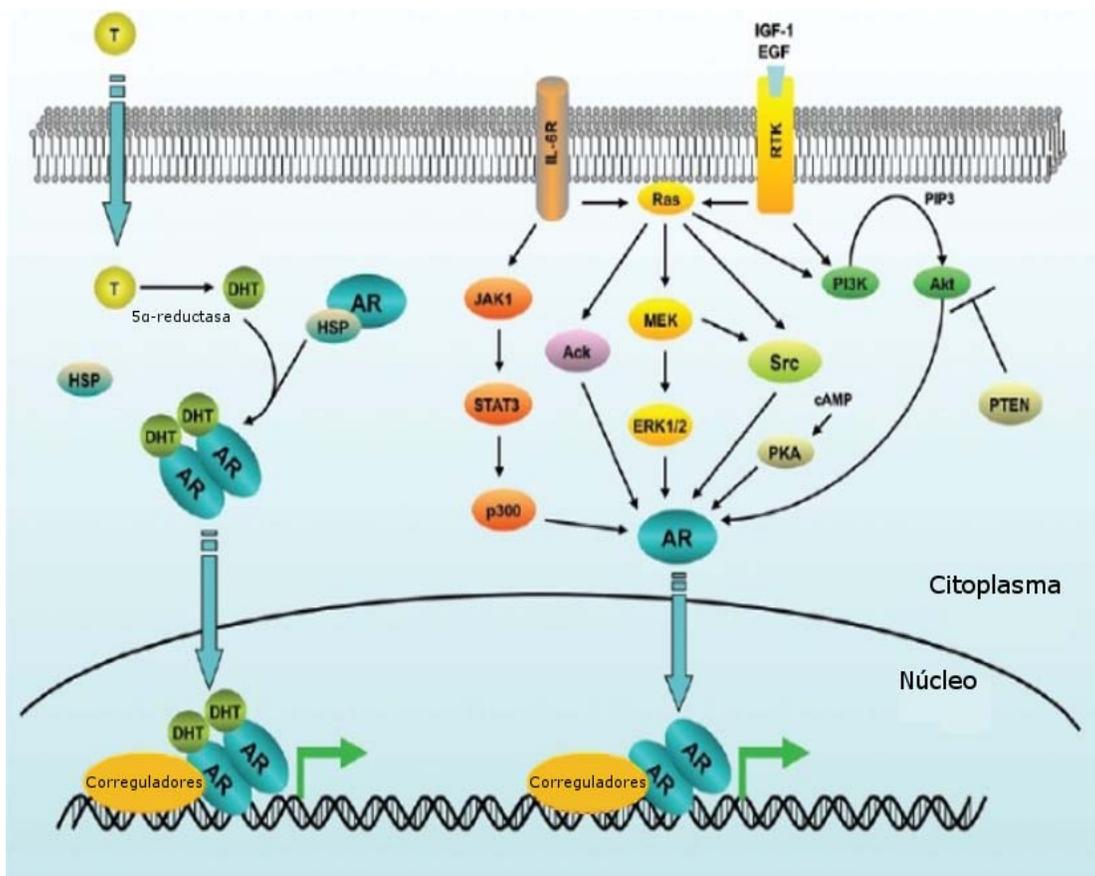


Figura 26.-Principales mecanismos y vías asociadas a la actividad del receptor de andrógenos en cáncer de próstata.

En el esquema podemos observar el mecanismo de acción de la testosterona sobre los genes responsivos a andrógenos así como los posibles mecanismos de transactivación del receptor de andrógenos, tras la depleción androgénica (Lonergan & Tindall, 2011).

Una vez en el núcleo, existe una serie de genes que se ven regulados por el AR, como el cluster de las calicreínas (KLK3/PSA, KLK2, KLK4), TMPRSS2, el gen de fusión TMPRSS2-ERG, ACTN1, así como genes relacionados a la proliferación y ciclo celular (Nelson, Clegg, Lin, & et.al., 2003). Esto hace que el receptor de andrógenos juegue un papel importante en la progresión tumoral. Es por ello que una de las terapias más eficientes para combatir el cáncer de próstata es la del bloqueo androgénico máximo o depleción androgénica. Sin embargo tras el BAM ciertos tipos de cáncer se vuelven, eventualmente, cáncer de próstata independiente de andrógenos (AIPC) y progresan hasta hacer metástasis (Feldman & Feldman, 2001).

Dentro de los mecanismos de desarrollo de AIPC se encuentran aquellos dependientes del receptor de andrógenos, y aquellos que no dependen del receptor de andrógenos. Entre aquellos mecanismos dependientes del receptor de andrógenos se encuentran:

I. Hipersensibilización del receptor de andrógenos (AR)

Uno de los posibles mecanismos para desarrollar la independencia de andrógenos es incrementar la sensibilidad a niveles bajos de andrógenos, esto puede deberse a tres posibles factores; el incremento en los niveles de expresión de receptor de andrógenos también conocido como amplificación del AR; el segundo de estos mecanismos tiene que ver con un incremento en la afinidad y estabilidad del receptor de andrógenos por la DHT; el último mecanismo de hipersensibilización consiste en un incremento en la producción local de DHT por las células de próstata, mediante el incremento de la actividad de la 5 α -reductasa.

II. Receptor de andrógenos (AR) promiscuo

La mayoría de los AIPC expresan al AR. Y aunque algunos tumores se adaptan de forma inicial al ambiente bajo en andrógenos, otros desarrollan mutaciones que les permiten evadir la regulación normal de los andrógenos. Estos cambios, usualmente, son mutaciones sin sentido en el gen que codifica al receptor de andrógenos, particularmente en el dominio de unión a ligando, brindando oportunidad al AR de activarse por diversos análogos y antagonistas de andrógenos, así como esteroides no androgénicos.

III. Activación del receptor de andrógenos (AR) por factores de crecimiento

En las células tumorales existe sobre expresión de receptores para factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), el factor de crecimiento epidermal (EGF), así como el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), o HER-2-neu; estos factores son capaces de fosforilar de forma indirecta al receptor de andrógenos permitiendo que este pueda translocarse al núcleo sin necesidad de la unión al ligando.

d. La vía WNT

La vía de señalización Wnt es una vía altamente conservada que regula aspectos como destino celular, proliferación, migración celular, polaridad celular y organogénesis durante el desarrollo embrionario (Komiya & Habas, 2008).

Las Wnt comprenden una familia de 19 lipoglicoproteínas, que se unen a los receptores transmembranales FZD, así como a una variedad de correceptores como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP 4,5,6) con el fin de activar la vía de señalización canónica (dependientes de β -catenina) tanto como las vías no canónicas (independientes de β -catenina) (Murillo & Kypta, 2017). La vía Wnt juega un papel importante en el desarrollo del fenotipo de resistencia a andrógenos (Feldman & Feldman, 2001).

Dado a que la vía Wnt juega un papel crucial durante la embriogénesis, las proteínas Wnt están estrictamente reguladas durante todas las etapas del desarrollo. Por esta razón la desregulación de esta vía tiene graves consecuencias en la organogénesis, además de estar relacionada a patologías como el cáncer (Logan & Nusse, 2004).

I. Ruta Canónica (β -catenina)

El propósito principal de la ruta canónica es la acumulación y translocación del coactivador transcripcional β -catenina. En ausencia de las proteínas Wnt, la β -catenina permanece en el citoplasma donde es degradada por el complejo Axina/Adenomatosis poliposis coli (APC)/Glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK3). La fosforilación de la β -catenina por parte del complejo Axina/APC/GSK3, permite su subsecuente destrucción proteolítica por el proteosoma (Komiya & Habas, 2008).

La unión de las proteínas Wnt con su complejo receptor (Fz y LRP5/6) activa a las proteínas Dishevelled (Dvl-1,2 y 3) las cuales inhiben la actividad del complejo Axina/APC/GSK3, evitando la fosforilación de la β -catenina. Esto lleva a la estabilización de la β -catenina, logrando que esta se acumule en el citoplasma y pueda ser trascolada al núcleo. La β -catenina por sí misma no tiene una secuencia de localización nuclear (NLS), por lo cual se cree que su importación depende de las proteínas Ran (Cardigan & Waterman, 2012).

Una vez en el núcleo la β -catenina es capaz de unirse a una serie factores de transcripción entre los cuales los más caracterizados son LEF-1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1)/TCF 7 (T-cell Factor) (Figura 27) (Cardigan & Waterman, 2012).

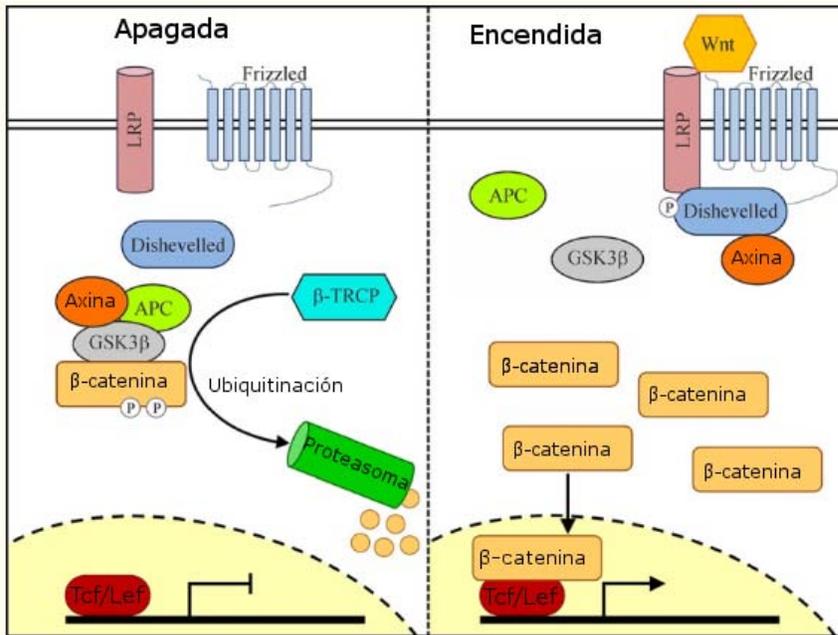


Figura 27.- Vía de señalización Wnt canónica.

Al acoplarse el ligando Wnt al receptor Frizzled se activa la vía canónica dependiente de β -catenina la cual al acoplarse a Tcf/Lef1 inicia la acción de este factor de transcripción desencadenando la promoción de la expresión de sus genes blanco (Lee & Piazza, 2017).

Dichos factores de transcripción activan la transcripción de genes asociados al desarrollo y progresión del cáncer como c-myc (He, Sparks, Kinzler, & et.al., 1998), n-myc (Berge, Brugmann, Helms, & Nusse, 2008), ciclina-D (Sansom, Reed, Clarke, & et.al., 2005), c-jun (Mann, Gelos, Siedow, Hanski, & et.al., 1999), metaloproteinasas de matriz 2,7,9 (Nusse, 2017), gastrina (Koh, Bulitta, Wang, & et.al., 2000), factor de crecimiento endotelial VEGF (Zang, Gaspard, & Chung, 2001), fibronectina, E-caderina, (Berge, Brugmann, Helms, & Nusse, 2008), entre otros.

Además de estos genes, se ha demostrado que la vía Wnt- β -catenina promueve la renovación y proliferación de células troncales asociadas a cáncer (Cancer stem Cells/ CSC); en el modelo de (Bisson & Prowse, 2009) se demostró que la vía de señalización Wnt- β -catenina induce directamente la expresión del marcador de troncalidad celular CD44. También se ha relacionado la expresión de otros genes (factores de transcripción) característicos de CSCs como Nanog, Oct4 y Sox2. Dichos factores de transcripción se encargan de controlar el programa genómico necesario para la pluripotencialidad y auto-renovación de las CSCs (Cole, Johnstone, RA., & et.al., 2008).

II. Rutas no Canónicas

La vía de señalización Wnt no canónica, comúnmente referida como independiente de β -catenina, puede ser dividida en dos rutas; la vía de polaridad celular planar (PCP) y la vía dependiente de canales de calcio (Wnt/ Ca^{2+}).

1. Polaridad Celular Planar (PCP)

La ruta PCP inicia con el acoplamiento de Wnt a receptores Frizzled (Fz) independientes de LRP5/6, los cuales llevan a la activación de las proteínas Dsh. Esta última es capaz de activar a Daam1, la cual permite que el factor Rho active a la cinasa Rho (ROCK) que media la polimerización de actina durante la

gastrulación. Daam 1 también es capaz de regular la polimerización de actina, mediante la activación de profilina y de JNK. La polimerización de actina permite cambios en el citoesqueleto lo que lleva a la polarización celular y finalmente, a la motilidad durante la gastrulación (Komiya & Habas, 2008).

2. Dependiente de canales de calcio

La señalización de la vía Wnt dependiente de canales de calcio / Wnt/Ca²⁺ inicia su mecanismo de acción mediante la activación de Dsh a través de proteínas G. Las proteínas Dsh activan a la fosfodiesterasa (PDE) que inhibe la liberación de calcio, además esto activa a la fosfolipasa C (PLC) que activa la IP3, esto lleva a la liberación del calcio intracelular lo que activa la calcineurina y CamK11; CamK11 activa a TAK, y a NEMO, proteínas que regulan negativamente la acción del eje β -catenina/Tcf (Komiya & Habas, 2008).

e. Receptores FZD

La familia de receptores Frizzled (FZD) engloba a un grupo de genes que codifican para proteínas integrales de membrana, con 7 motivos transmembranales, que actúan en distintas vías de señalización involucradas en la embriogénesis y homeostasis del tejido. Estos receptores tienen el extremo amino terminal (N-terminal) en su región extracelular; esta región amino terminal contiene un dominio rico en cisteína (CRD) que permite a diferentes ligandos acoplarse al receptor (Schulte & Brya, 2007).

I. Principales ligandos de los receptores FZD

Los receptores *FZD* son capaces de acoplarse a distintas moléculas consideradas como ligandos afines. Los principales ligandos endógenos son las proteínas WNT, las cuales engloban 19 formas en mamíferos; estas proteínas son capaces de activar la mayoría de las rutas de señalización dependientes de *FZD* (Schulte & Brya, 2007). Las proteínas WNT más importantes son; Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt7a, Wnt8 y Wnt8b. Sin embargo se ha reportado que la proteína Wnt3a se encuentra altamente expresada en células de CaP de estadio avanzado (Bonci, Coppola, De Maria, & et.al., 2008).

II. sFRPs

Entre los principales inhibidores de la vía Wnt destacan las proteínas SFRP (secreted frizzled-related proteins) los cuales se encuentran subexpresados en distintos tipos de cáncer; por lo cual se sugiere que existe una inactivación específica del tumor a estas proteínas (Laverge, Musso, & et.al., 2012).

Las sFRPs son glicoproteínas de aproximadamente 300 aminoácidos (a.a.). Contienen un dominio rico en cisteína (CDR) que tiene comparte entre un 30-50% de similitud con los ligandos Wnt, por lo que las proteínas sFRP también pueden actuar como ligandos de las proteínas FZD; además de tener un motivo relacionado a netrinas con carboxilo terminal (NTR) (Figura 28). Existen 5 sFRPs reportados en mamíferos los cuales se designan del 1 al 5 (Yihui, Biao, & Jablons, 2007). Estos sFRPs se pueden clasificar en dos subgrupos basados en la homología de la secuencia; el primer grupo está compuesto por sFRP1, sFRP2 y

sFRP5; mientras que el segundo grupo engloba sFRP3 y sFRP4 (Kawano & Kypta, 2003).



Figura 28.- Estructura de las proteínas sFRP.y su comparación con el receptor FZD

Las proteínas sFRP son glicoproteínas con un tamaño aproximado de 300 a.a. Su dominio rico en cisteína que comparte hasta un 50% de homología con los ligandos de la vía Wnt por lo que pueden acoplarse a los receptores FZD (Kawano & Kypta, 2003).

El dominio CDR de las proteínas sFRP es de particular importancia ya que, cuenta con 10 cisteínas con un patrón de 5 puentes disulfuro idéntico al dominio CDR de FZD. Debido a esta semejanza estructural, las proteínas sFRP son capaces de inhibir a la vía Wnt de forma antagónica, mediante su interacción con los ligandos Wnt (Figura 29) (Kawano & Kypta, 2003).

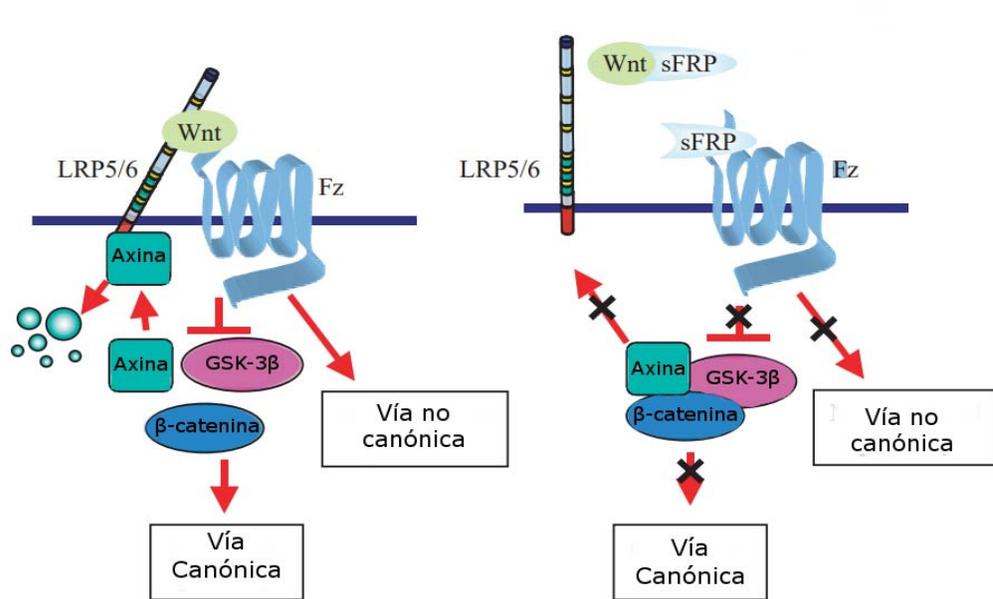


Figura 29.- Regulación de la vía Wnt por sus antagonistas, las proteínas sFRP.

Los antagonistas de la vía Wnt pueden actuar a dos niveles el primero es el secuestro del ligando Wnt, y el segundo es una inhibición competitiva por ocupar el receptor, en ambos casos se impide el acoplamiento de LRP5/6 a FZD, bloqueando la degradación de axina, paso necesario para el inicio de la cascada de señalización (Kawano & Kypta, 2003).

f. sFRP1

El gen sFRP1 se encuentra en el cromosoma 8p21, esto es importante pues dicho sitio es susceptible a pérdida de heterocigosidad en cáncer (Wright, Wilson, Kerr, Chenevix-Trench, & et.al., 1998). Además se ha reportado que está regulado a la baja en cáncer cervical, de mama, ovario y riñón (Zhou, Wang, Linder, & et.al., 1998). Además de esto la hipermetilación del promotor sFRP1 (así como sFRP2, sFRP4 y sFRP5) es frecuente en tumores de colon (Suzuki, Gabrielson, Chen, Baylin, & et.al., 2002). La regulación a la baja de estas proteínas puede estar relacionada con su actividad pro-apoptótica, reportada en distintas ocasiones. En el caso particular de sFRP1, por ejemplo, sensibiliza células de mama a apoptosis inducida por factor de necrosis tumoral (TNF) (Melkonyan, Chang, Shapiro, Umansky, & et.al., 1997).

En el caso específico de próstata, el trabajo de (García-Tobilla, Solórzano, Rodríguez-Dorantes, & et.al., 2016) logró demostrar que la expresión de sFRP1 se ve abatida en líneas celulares de cáncer respecto a líneas celulares de próstata normal; además de encontrar diferencias significativas en el porcentaje de metilación en el promotor de sFRP1 entre próstata normal y cáncer de próstata (Figura 30).

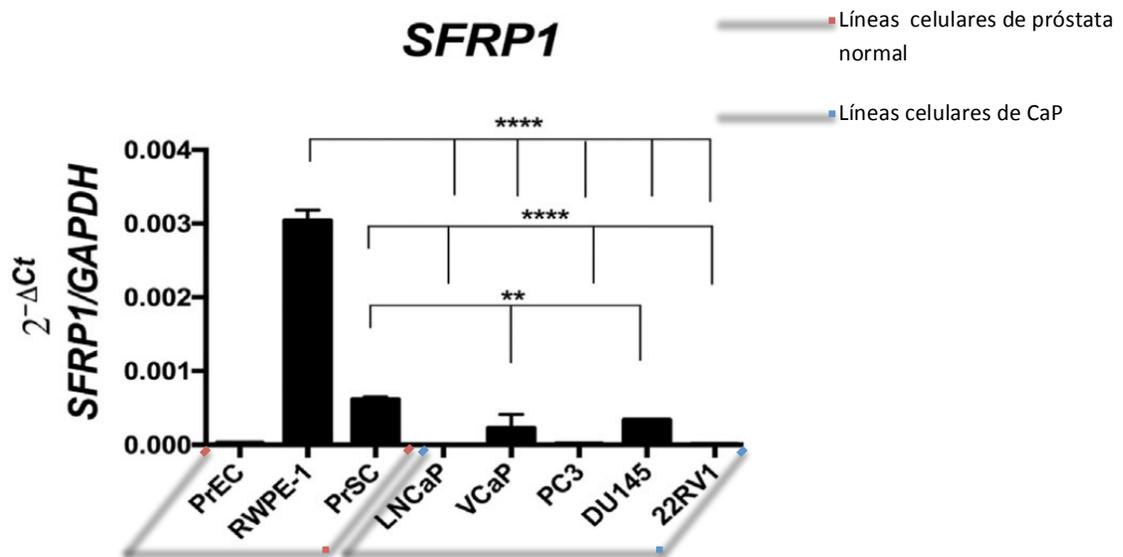


Figura 30.- Expresión de sFRP1 a nivel de mensajero, en diferentes líneas celulares de próstata.

La expresión de sFRP1 en líneas celulares de CaP está a la baja comparado con la expresión de dicha proteína en líneas de próstata normal. Esta pérdida de expresión también ha sido reportada en pacientes por lo cual parece ser que la pérdida de esta proteína puede estar relacionada con el sostén de los procesos oncogénicos (García-Tobilla, Solórzano, Rodríguez-Dorantes, & et.al., 2016).

Dicha pérdida de expresión del gen sFRP1 está mediada por dos mecanismos distintos dependiendo del estadio de la enfermedad; siendo el primero de ellos la ganancia de la marca de histonas represora H3K27me3 a nivel del promotor, durante la fase sensible a andrógenos del CaP; y el segundo mecanismo la hipermetilación del promotor en la fase insensible a la acción de los andrógenos. Esto parece indicar que la ganancia de la marca H3K27me3 puede preceder a la hipermetilación del promotor en estados más avanzados del cáncer (García-Tobilla, Solórzano, Rodríguez-Dorantes, & et.al., 2016).

Esto nos lleva a inferir que la pérdida de expresión de sFRP1 está implicada con procesos oncogénicos, aunque existen reportes controversiales sobre el papel que juega dicha proteína en el cáncer de próstata. Estudios como el de (Joesting, Perrin, Marker, & et.al., 2005) demostraron que el estroma tumoral, que sobreexpresa sFRP1, envía a la proteína a las células epiteliales adyacentes lo que lleva a un incremento en la proliferación, decremento de la apoptosis, y un decremento en la señalización mediada a través de la vía Wnt canónica.

La controversia en cuanto a la acción de la proteína sFRP1 sobre el cáncer de próstata puede deberse a la clase de interacción que dicha proteína tenga con los receptores FZD y con los ligandos de la vía Wnt. Entre las formas que sFRP1 puede influir sobre la vía de señalización Wnt (sea en su ruta canónica y no canónica) tenemos cuatro principales mecanismos (Figura 31); A) en el primer mecanismo sFRP1 secuestra los ligandos a través del dominio NTR ejerciendo una acción como antagonista, por lo cual se inhibe la vía de señalización Wnt; B) el segundo de ellos consiste en la formación de un complejo inactivo con los receptores FZD, evitando la activación de la vía de señalización Wnt; C) de forma alternativa sFRP1 puede activar la vía de señalización favoreciendo la interacción Wnt-FZD mediante la formación de un complejo sFRP/Wnt/FZD sinérgico al ligando Wnt; D) finalmente en ausencia de ligandos Wnt, los CDR de sFRP1 y FZD forman un heterodímero capaz de iniciar la transducción de señales Wnt (Lopez-Ríos, Esteve, Ruiz, & Bovolenta, 2008).

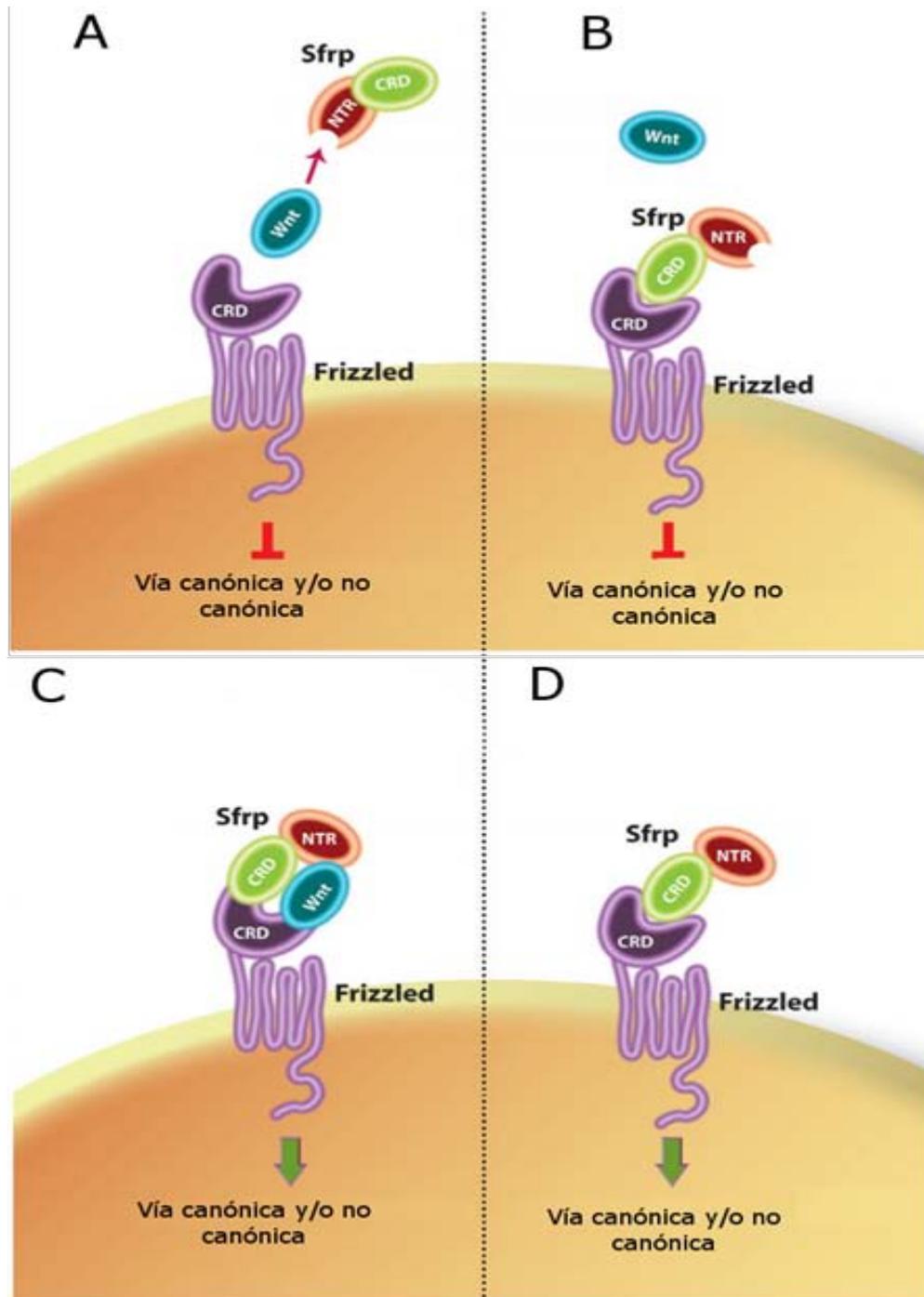


Figura 31.- Mecanismos de acción de sFRP1 de acuerdo a los múltiples tipos de interacción con los ligandos Wnt y/o receptores FZD.

Existen cuatro mecanismos de las proteínas sFRP sobre la vía WNT; El primero (A) consiste en la inhibición de la vía por secuestro de ligando, mientras que en (B) la vía se ve interrumpida debido a la inhibición competitiva al interactuar sFRP en lugar del ligando endógeno con el receptor. Los otros dos mecanismos han sido recientemente reportados y el primero es la activación de la vía por la formación de un complejo funcional sFRP-Wnt capaz de activar vías canónicas y no canónicas (C), finalmente el mecanismo (D) ha sido escasamente reportado y es la activación de la vía por sFRP debido a su interacción con FZD (Lopez-Ríos, Esteve, Ruiz, & Bovolenta, 2008).

g. Efecto de SFRP1 sobre la actividad transcripcional del Receptor de andrógenos

El estudio realizado por (Kawano, Diez, Kypta, & et.al., 2009) reveló que la proteína sFRP1 inhibe la actividad transcripcional del receptor de andrógenos; como resultado sFRP1 inhibe la proliferación de células de CaP andrógeno-dependientes, siendo el CDR el principal responsable de este efecto. Dicha investigación determinó que la acción de sFRP1 sobre la actividad transcripcional del AR es independiente de la vía Wnt tanto canónica como Wnt/Ca²⁺. sFRP1 forma complejos con los receptores FZD, capaces de reprimir la actividad transcripcional de AR.

Dado este efecto podemos suponer que la pérdida de la expresión de sFRP1 en cáncer de próstata, lleva a una activación poco regulada del AR, crucial para la progresión del CaP (Kawano, Diez, Kypta, & et.al., 2009).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de próstata en México fue la causa más frecuente de muertes en varones con un 15.4% de defunciones para el año 2015 (Instituto Nacional de Geografía y Estadística ., 2017). A pesar de que la incidencia de esta neoplasia es menor comparada con lo que ocurre en Estados Unidos, la mortalidad por esta causa es prácticamente igual (11.3 vs. 9.8 muertes por cada 100 mil hombres) (Instituto Nacional de Salud Pública, 2016).

Esto puede ser debido a la falta de implementación de biomarcadores, que permitan un diagnóstico oportuno y que sean capaces de brindar un mejor seguimiento de la enfermedad; así como la carencia de una estrategia terapéutica diseñada específicamente para atender las necesidades particulares de cada tipo de tumor, ya que el cáncer de próstata es una patología compleja y heterogénea.

Siguiendo esta línea de pensamiento el presente trabajo busca sentar las bases para el diseño de una estrategia terapéutica alternativa, para el tratamiento de tumores positivos al gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, reportados como más agresivos e invasivos.

El gen de fusión *TMPRSS2-ERG* se ha identificado en cerca del 50% de los casos de cáncer de próstata y, ciertos trabajos han relacionado la presencia de esta fusión con una mayor agresividad (cuando está dada por una delección, en vez de por una translocación) (Gopalan A. , Leversha, Gerald, & et.al., 2009). Está demostrado que la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (AR) promueve la expresión del gen de fusión *TMPRSS2- ERG*, cuyo producto (ERG) es capaz de activar la vía de señalización WNT, promoviendo la expresión de genes relacionados al progreso del CaP (Yu, Yu, Arul, & et.al., 2010). Además se demostró que la actividad transcripcional del receptor de andrógenos está regulada negativamente por la proteína SFRP1 quien a su vez es un antagonista de la vía WNT (Kawano, Diez, Uysal-Onganer, Darrington, Waxman, & Kypta,

2009). Nuestro grupo ha observado, tanto en modelos *in vitro* como en pacientes, que la proteína sFRP1 tiene una expresión disminuida en CaP, respecto a epitelio y estroma normales (García-Tobilla, Solórzano, Rodríguez-Dorantes, & et.al., 2016). En este trabajo, se propone que el tratamiento con la proteína sFRP1, tras la depleción androgénica, podría regular la expresión de la fusión *TMPRSS2-ERG* mediante la merma de la actividad transcripcional del *AR*, en un modelo de xenotransplante murino.

HIPÓTESIS

El tratamiento con la proteína sFRP1, disminuirá la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (*AR*) lo cual logrará regular a la baja la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*. El abatimiento del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* inhibirá la vía de señalización Wnt logrando atenuar la progresión del CaP.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la proteína sFRP1, tras la depleción androgénica, sobre el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* y genes de la vía de señalización WNT, relacionados a la expresión de *TMPRSS2-ERG*, en un modelo de xenotransplante murino.

2. Objetivos Particulares

- A. Inducir la formación tumoral de células que expresan la fusión *TMPRSS2-ERG*, en ratones de fenotipo desnudo.
- B. Evaluar el efecto que tiene la proteína sFRP1 sobre la progresión tumoral, a través de parámetros clínico-patológicos como; determinación de volumen tumoral, estimación de los niveles de antígeno prostático específico (PSA) y del Grado Gleason del xenotransplante.
- C. Determinar las causas moleculares del efecto observado por el tratamiento con la proteína sFRP1.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

En este trabajo se pretende demostrar si la proteína sFRP1 tiene un efecto sobre la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, impactando sobre las capacidades neoplásicas del tumor y sobre la vía de señalización WNT. Por este motivo se decidió construir un eje compuesto por tres preguntas:

- A. ¿Tendrá el tratamiento con la proteína sFRP1 efecto significativo sobre las propiedades neoplásicas del tumor?
- B. ¿El tratamiento con sFRP1 impactará sobre la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*?
- C. ¿El tratamiento con la proteína sFRP1 tendrá algún efecto sobre genes asociados a la vía WNT?

METODOLOGÍA Y MATERIALES

1. Líneas celulares

Para la implantación del xenotransplante se utilizaron líneas celulares de cáncer de próstata derivadas de metástasis a vértebra, VCaP (ATCC® CRL-2876™), adquiridas de la compañía ATCC; éstas son células epiteliales, inmortalizadas, adherentes, sensibles a la acción de los andrógenos, expresan antígeno prostático específico, expresan la fusión *TMPRSS2-ERG*, y su tiempo de duplicación es de 53 horas, aunque les lleva más de 48 horas en formar la mono capa adherida; por lo cual les puede tomar hasta dos semanas alcanzar el 50% de confluencia. (Figura 32) (ATCC, 2016).

Número de ATCC: **CRL-2876**
Designación: **VCaP**

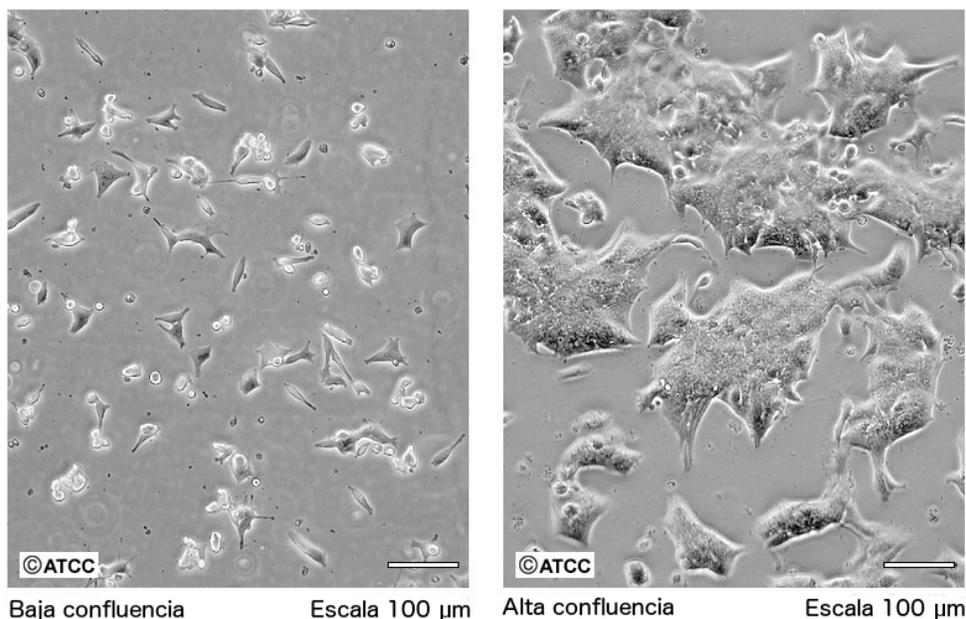


Figura 32.- Morfología característica de las células VCaP a baja y alta confluencia.

Imagen modificada de (ATCC, 2016).

Para efectuar el cultivo celular las células se sembraron en frascos de 25 cm^2 , mantenidas con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (ATCC® 30-2002™) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco™ 16000044 fetal bovine sera); dichas células se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmósfera al 5% de CO_2 . Se sembró una cantidad inicial de 1×10^6 células por frasco de 25 cm^2 , y se esperó a que alcanzaran un 80% de confluencia (aproximadamente 5×10^6 de células), para realizar los subcultivos.

2. Modelo de xenotransplante murino

Para este modelo se obtuvieron 11 ratones NU/NU, machos, de entre 6 y 8 semanas de edad del bioterio UPEAL (DCBS.BIOT.037.17) perteneciente a la Universidad Autónoma de Metropolitana (UAM).

Estos ratones se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos (SPF) con macro ambiente filtrado, con filtros HEPA, a una temperatura de 19-23°C, humedad relativa del 45-55%, con fotoperiodos 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad y ruido menor a 85 db. Se les alimentó con LabDiet fórmula 5010, autoclaveable para roedor en mantenimiento, y con agua esterilizada mediante autoclave, baja en sales. El suministro fue *ad libitum*.

A la semana de haber recibido y acondicionado a los ratones, estos se inocularon con 1×10^6 células VCaP, vía subcutánea en la zona dorsal del ratón. Dichas células estaban embebidas en Corning® Matrigel® Matrix; preparación rica en proteínas de matriz extracelular como laminina, colágeno, entactina, proteoglicanos; y factores de crecimiento como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), entre otros. Dichos factores promueven la adhesión y diferenciación de células epiteliales de cáncer en modelos *in vivo*. (Corning Incorporated, 2013).

Los ratones fueron monitoreados y empleados con apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; en la cual se especifican las técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2001).

Tras la inoculación, se monitoreó semanalmente el volumen tumoral mediante la fórmula $V = \pi/6 \times (\text{diámetro largo} \times [\text{diámetro corto}]^2)$, asumiendo que el tumor es un esferoide como reporta (Medina, Herrera-Penilla, Brandan, & et.al., 2008).

3. Orquiectomía y tratamiento con la proteína sFRP1

Una vez que el tumor alcanzó los 300 mm^3 , se procedió a realizar la orquiectomía con el propósito de emular el bloqueo androgénico máximo.

Para este procedimiento se anestesió a los ratones con una mezcla isoflurano/oxígeno (2% de isoflurano) utilizando una unidad de inhalación para roedores (AM Bickford) durante 5 minutos; y a lo largo de la cirugía con un porcentaje de isoflurano del 1%.

Una vez anestesiados, se realizó una incisión abdominal que permitiese localizar y externalizar los testículos, para realizar el ligamiento de ductos y vasos principales, con la finalidad escindir estos testículos.

Finalmente se procedió a suturar la piel, suspender la anestesia y acondicionar al ratón para su observación. Una semana después del procedimiento quirúrgico (Cx) se dividió a los ratones en dos grupos para comenzar el tratamiento (Tx); el primero de ellos, o grupo control, fue tratado con 50µL PBS de manera subcutánea semanalmente; el segundo grupo, o grupo tratado, siguió un régimen con la proteína recombinante sFRP1 (SRP3154 SIGMA), previamente diluida en

PBS hasta la concentración 0.01 nM, administrando 50µL de dicha solución una vez por semana. Tras 11 semanas de haber iniciado el Tx, se procedió con la eutanasia de cada sujeto y recuperación del tumor; el cual fue segmentado en tres partes, una para extracción de proteínas, otra para extracción de RNA y la última para pruebas histológicas.

4. Detección de PSA

Durante todo el modelo de xenotransplante murino, se determinaron los niveles de PSA en suero con la finalidad de dar seguimiento a la progresión tumoral y tener un control del tratamiento.

Para la obtención de sangre del ratón se inmovilizó al sujeto sin anestésico, se frotó con alcohol la cola durante 30 segundos y se realizó un corte transversal a la cola. Se colectó la sangre mediante frotación y goteo, hasta reunir un volumen aproximado de 400 µL. La colecta fue realizada en tubos BD microtainer #365967, con activador de coagulación y gel separador. Finalizada la colecta se limpió la cola del ratón con etanol al 75%.

Tras la obtención de la muestra de sangre se permitió la coagulación de la muestra durante 25 minutos, y se centrifugó 3 minutos a 11337 g (13000 rpm). Esto con la finalidad de obtener el suero. Una vez obtenido el suero se almacenó a -70°C, por algunas semanas/meses hasta tener el total de los sueros a utilizar.

Tras tener los sueros necesarios de cada ratón se procedió a realizar una prueba ELISA con el propósito de cuantificar la concentración de PSA existente en sangre, para lo cual se utilizó el kit PSA (Human) ELISA Kit, cat# KA0208 DE ABNOVA, cuyo fundamento es una ELISA del tipo sándwich, siguiendo el protocolo establecido por el proveedor.

5. Extracción de RNA

Al momento de extraer el tumor, este se colocó en el reactivo TRIzol (Invitrogen™ TRIzol™ Reagent # 15596026) el cual permite preservar la integridad del RNA, mediante la inhibición de RNAsas, así como disuelve los componentes celulares durante la homogeneización de las muestras. Las muestras fueron homogeneizadas mediante el uso de un disruptor de tejido, TissueRuptor II de la marca QIAGEN.

El protocolo de extracción se efectuó según las especificaciones del fabricante (TRIzol™ Reagent User Guide, 2016). Finalmente se diluyó el RNA extraído en aproximadamente 15 µL de agua libre de RNAsas (DEPC).

6. Cuantificación de RNA

Tras la extracción de RNA se cuantificó el mismo mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis de Thermo Fisher Scientific. Para ello se cargó 1 µL de agua DEPC en la platina del espectrofotómetro, con el propósito de fijar un blanco, tras esto se limpió la platina y se procedió a cargar 1 µL de muestra. Finalmente se determinó la absorbancia a 260 nm, con el fin de obtener la concentración de RNA en ng/µL; además de esto el NanoDrop ND-1000 permite la

determinación de los coeficientes 260/280 y 260/230 los cuales indican la pureza de la muestra resaltando si existe contaminación con proteínas o con moléculas contaminantes (fenoles, guanidina) respectivamente. Un valor aproximado de 2.0 en el coeficiente 260/280 es aceptable para decir que tenemos RNA libre de proteínas, mientras que un valor de 1.8 a 2.2 en el cociente 260/230 es aceptable para decir que no existe presencia de moléculas contaminantes.

7. Integridad de RNA

Con el propósito de evaluar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

Para preparar el gel de agarosa se pesaron 0.75 gramos de agarosa UltraPure™ ThermoFisher Scientific. Los cuales se disolvieron en 50 mL de amortiguador TBE 0.5x (45mM Tris-Molaridad Borato, 1mM EDTA, pH 7) tras calentamiento y agitación. Al gel en estado líquido se le añadieron 50 µL del agente intercalante GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain a una concentración de 1x, en agitación.

Tras esto se montó el caster para verter el gel, colocar la peineta con los pozos y se esperó hasta la gelificación. Una vez gelificado se trasladó el gel a la cámara de electroforesis la cual fue llenada con TBE 0.5x. Se cargaron 1 µL de muestra, 2 µL de buffer de carga y 2 µL de Gel Red 1x. La electroforesis fue efectuada a 75V durante una 1.5 hrs.

Tras la electroforesis se reveló la integridad del RNA mediante el sistema transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System.

8. Ensayo de Retro transcripción

Tras haber obtenido y evaluado la integridad del RNA de cada tumor, se llevó a cabo una reacción de retro transcripción (RT) con el propósito de obtener el DNA complementario (c-DNA) para la PCR tiempo real. Para efectuar este ensayo, se utilizaron 200 ng de RNA por cada muestra, preparando la reacción con el kit Reverte Aid Synthesis (ThermoFisher, K1691), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Una vez que se preparó la muestra con el kit, las condiciones de tiempo y temperatura para la reacción fueron: 42°C durante 60 minutos, seguido de 70°C durante 5 minutos, y finalmente se almacenó 4°C durante toda la noche.

El almacenamiento del c-DNA puede durar hasta varios meses a -20°C.

9. Extracción de proteínas

Una porción del tumor se utilizó para la obtención de proteínas, embebido en el amortiguador de lisis y extracción RIPA 89900 de Thermo Scientific, el tejido se homogeneizó mediante el uso del disruptor de tejido TissueRuptor II de la marca QIAGEN.

Tras la homogeneización del tejido, este fue sonificado con una amplitud del 40%, tres veces; treinta segundos de sonicación y 30 segundos en hielo. Una vez sonicada la muestra es centrifugada durante 30 minutos a 13000 rpms. Esto dio lugar a un precipitado y sobrenadante, se conservó el sobrenadante pues esta es la solución que contiene las proteínas de interés.

10. Cuantificación de Proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método EZQ® Protein Quantitation Kit (Thermo-Fisher Scientific R33200) el cual se sustenta en la reacción de los grupos aromáticos de las proteínas con un fluoróforo. El protocolo se siguió siguiendo las especificaciones indicadas por el fabricante (Thermo-Fisher Scientific), obteniendo tras el protocolo el papel de ensayo el cual se reveló con un transiluminador a 300 nm transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System, con una exposición de 0.05 segundos. Una vez revelado el papel de ensayo, se realizó la interpolación de la señal arrojada por las muestras dentro de la curva estándar, mediante el uso del software *Image Studio Lite* (LI-COR Biosciences).

11. Determinación de Grado Gleason y técnicas inmunohistoquímicas

Tras haber extraído los tumores, se seccionaron y una tercera parte de cada tumor fue sumergida en formalina (solución de formol al 10%) suficiente como para cubrir el total del volumen tumoral. Este líquido incoloro coagula las proteínas, manteniendo una estructura adecuada del tejido para que pueda ser embebido en parafina, formando bloques de tejido.

Una vez obtenidos los bloques de tejido embebido en parafina (Abcam, 2018) se obtuvo una laminilla de cada bloque, la cual fue fijada a un portaobjetos, el proceso fue realizado por la Unidad de Histología y Microscopía del INMEGEN.

Con el propósito de determinar el grado Gleason de cada tumor obtenido se tiñeron las laminillas con hematoxilina y eosina, tinción ácido-base cuyo componente básico (hematoxilina) tiñe estructuras celulares ácidas como los núcleos, heterocromatina y nucléolos de un tono azul púrpúreo; mientras que el componente ácido (eosina) interacciona con los componentes celulares básicos, como lo son las proteínas citoplasmáticas, brindándoles una tonalidad rosada. Esta tinción nos permite determinar la disposición celular y el grado de diferenciación de los tejidos prostáticos, por lo cual es la herramienta utilizada en la asignación del grado Gleason (Gleason, 1966).

Además de esto se analizó la presencia de antígeno prostático específico (PSA) y la proteína ERG mediante la técnica de inmunohistoquímica. El anticuerpo para la evaluación de PSA fue PSA/KLK3 (D11E1) XP Rabbit mAb #2475 de Cell Signaling en una dilución 1:150. Mientras que el anticuerpo utilizado para la evaluación de la proteína ERG fue Erg-1/2/3 Antibody (C-17): sc-354 SANTA CRUZ, utilizado en una dilución 1:30.

12. Ensayos de Expresión (RT-PCR)

Este ensayo se realizó en una placa óptica de 96 pozos en los cuales se cargaron; 2.5 µL de cada muestra de c-DNA, equivalentes a 500 ng de muestra; 5 µL de 2X TaqMan® Gene Expression Master Mix; 1 µL de cada sonda TaqMan® 20X y 2.5 µL de agua DEPC, dando un volumen final de 11 µL. En la tabla 2 se muestran las sondas utilizadas así como el número de catálogo de cada una.

Tabla 2.- Sondas TaqMan® 20X utilizadas en el ensayo RT-PCR.

Todas las sondas fueron adquiridas de la casa comercial Applied Biosystems | Thermo Fisher Scientific.

Sonda TaqMan® 20X	Catálogo
GAPDH (Control)	Hs02758991_g1
AR	Hs00201853_m1
KLK3 (PSA)	Hs02576345_m1
TMPRSS2-ERG	Hs01122322_m1
ERG	Hs01554629_m1
LEF-1	Hs00610060_m1
WNT3A	Hs00263977_m1
SOX2	Hs01053049_s1
NANOG	Hs02387400_g1
POU5F1 (OCT4)	Hs04260367_gH

Una vez cargada la placa óptica, se realizó la PCR tiempo real con el sistema Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, mediante el método curva estándar y 45 ciclos.

Tras obtener los datos, se determinó la expresión relativa a nivel de mensajero de cada uno de los genes mediante el método de $2^{-\Delta ct}$, el cual normaliza los niveles de expresión mediante el uso de un gen control endógeno (House-keeping gene) (Livak & Schmittgen, 2001).

13. Ensayos de Expresión a nivel de proteína (WB)

Los ensayos de Western Blot se realizaron con una cantidad equivalente a 10 µg de proteína por muestra. Dada la escasa cantidad de proteína en algunas de las muestras se decidió agrupar las muestras y mezclarlas en tres tubos distintos para ambos grupos (Control y tratamientos). Tras esto se realizó la electroforesis en geles SDS-PAGE al 12%; la electroforesis se realizó por 20 minutos a 50 V y 70 minutos a 75 V, para obtener un patrón del marcador de peso molecular bien definido (SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard Thermo Fisher Scientific # LC5925).

Al terminar la electroforesis las proteínas presentes en el gel se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PDVF) (BioRad#1620177) previamente activada con metanol. El proceso de transferencia se realizó en un equipo The Trans-Blot® SD semi-dry de Bio Rad, a 20V durante 30 minutos. Al finalizar se comprobó que la transferencia fuera completa mediante dos tinciones; la primera de ellas es la tinción azul de Coomassie para los geles SDS-PAGE, esta tinción fue revelada mediante el equipo transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System; la segunda la tinción fue la de la membrana con rojo de Ponceau, tras documentar fotográficamente el resultado, se lavó la membrana con el amortiguador TBST1X/Tween 1% (10mM Tris.HCl, 15mM NaCl, 1% Tween® 20 a pH 7.5) , 3 veces hasta perder la coloración rojiza.

Luego de comprobar que la transferencia fue exitosa, se procedió con el bloqueo de la membrana con leche svelty al 5%, diluida en buffer TBST1x/Tween 1% por dos horas a 4°C. Acto seguido se efectuó la exposición al anticuerpo primario (GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb #5174 Cell Signaling) a una dilución 1:2000, en un sistema de leche al 1% en TBST1x/Tween 1%, el proceso de incubación con el anticuerpo primario duró toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST1x/Tween 1%, luego se colocó el anticuerpo secundario a una dilución 1:5000 (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP # 65-6120) en leche Svelty al 1% y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizar este periodo, las membranas se lavaron tres veces con el amortiguador TBST1x/Tween 1%.

Finalmente estas membranas se incubaron con 600 µL del sustrato Luminata™ Forte Western HRP Substrate (MerckMillipore WBLUF0100). Tras este periodo de incubación, las membranas fueron reveladas en el transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System, en su función de Chemi-blot, tomando 10 fotografías a lo largo de 60 segundos.

14. Stripping

Para evaluar una segunda proteína en la misma membrana que se reveló la proteína constitutiva, se realizó un stripping, siguiendo el siguiente protocolo.

La membrana se lavó por 10 minutos con amortiguador Mild stripping (0.2 M glicina, 3.5 mM SDS, 1% Tween 20, pH 2.2) tres veces. Se descartó el amortiguador, y se lavó cuatro veces con PBS durante 10 minutos. Finalmente la membrana se lavó a temperatura ambiente con TBST1x/Tween 1%. Tras esto se pudo proceder con la fase de bloqueo de igual forma que el western blot. Al finalizar las dos horas de bloqueo, se lavó la membrana 3 veces con el amortiguador TBST1x/Tween 1%, para finalmente incubar toda la noche a 4°C con el nuevo anticuerpo primario (Erg-1/2/3 Antibody (C-17): sc-354 SANTA CRUZ) 1:500 en leche al 1%. Tras esto se procedió de la misma manera que en el protocolo de western blot, hasta revelar la membrana.

RESULTADOS

De los once ratones adquiridos cinco fueron capaces de desarrollar el tumor por el xenotransplante, y finalizar las 10 semanas de tratamiento con la proteína recombinante sFRP1 y con el vehículo PBS; sin embargo uno de los ratones control desarrolló dos tumores independientes en sitios anatómicos distintos, por lo cual se consideró como un tumor control más.

1. El tratamiento con la proteína sFRP1 no afecta la masa corporal de los ratones.

A lo largo de todo el modelo, la masa corporal de los ratones fue monitoreada semanalmente con el propósito de evaluar algún posible efecto del tratamiento sobre el estado físico de los ratones. Sin embargo, el tratamiento con la proteína sFRP1 para cada ratón no muestran efecto alguno sobre la masa de los ratones, aunque podemos observar un leve decremento en la masa corporal tras la realización de la orquiectomía (Figura 33). Los ratones etiquetados como 2VD, 2VI, 2R pertenecen al grupo de ratones control, mientras que los ratones 3R, 3N y 1N pertenecen al grupo de ratones tratados.

□

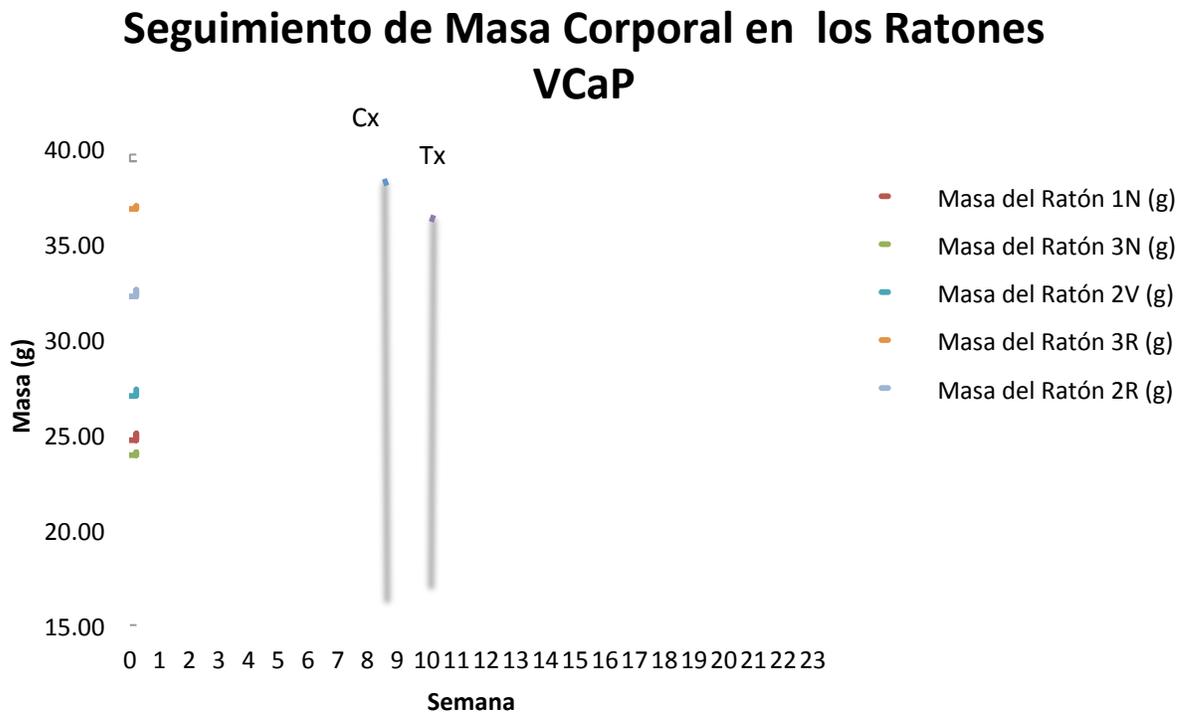


Figura 33.- Curva temporal de la masa corporal de los ratones inoculados con células VCaP.

Esta figura muestra la variación en la masa corporal de los ratones a lo largo del tiempo, como podemos apreciar las variaciones inter-individuales en la masa corporal no dependen del tratamiento con la proteína recombinante. En la presente figura se muestran la semana en que se realizó la cirugía (Cx) y la semana de inicio de tratamiento (Tx).

2. El tratamiento con la proteína sFRP1 promueve el crecimiento tumoral.

Semanalmente se determinó el volumen tumoral mediante la fórmula reportada por (Medina, Herrera-Penilla, Brandan, & et.al., 2008), $V = \pi/6 \times (\text{diámetro largo} \times [\text{diámetro corto}]^2)$, esto permitió observar diferencias claras en el volumen tumoral de aquellos ratones que fueron tratados con la proteína sFRP1 respecto a los ratones control.

Los tumores de los ratones tratados con la proteína sFRP1 son significativamente más grandes que aquellos no tratados, para algunos puntos del tratamiento. En la figura 34 podemos observar la comparación del volumen tumoral entre los tratamientos y el control a lo largo de las semanas que se sometió al tratamiento.

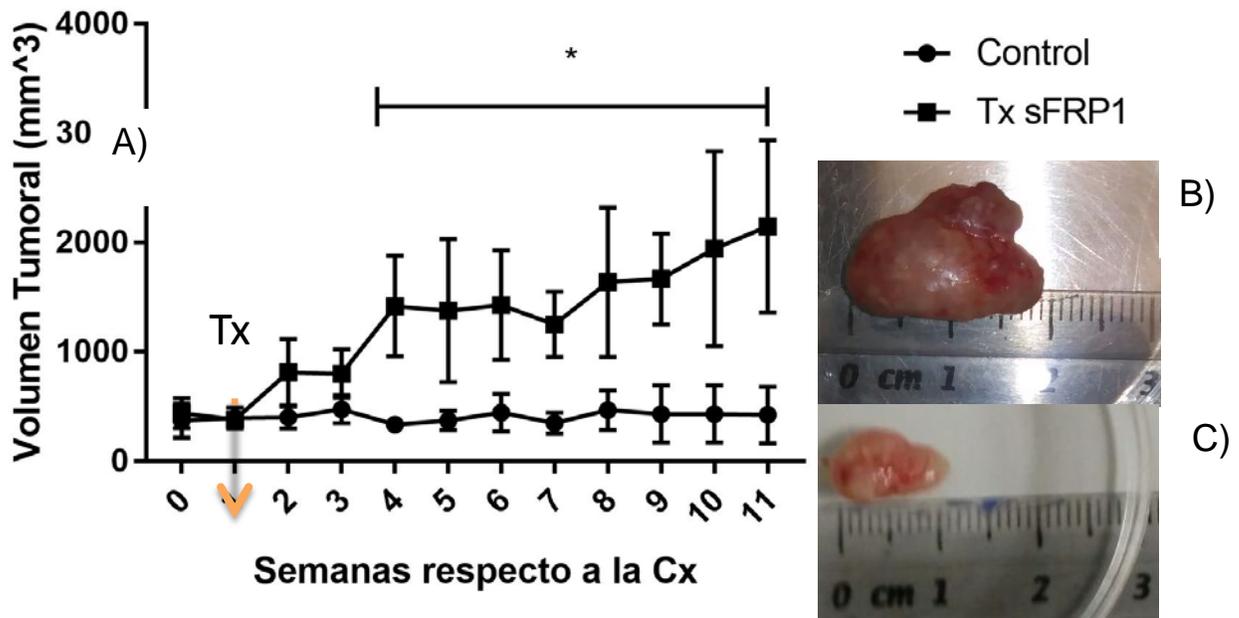


Figura 34.- Curva temporal del efecto de sFRP1 sobre el volumen tumoral.

A) La tendencia general del tratamiento con la proteína sFRP1 fue incrementar el tamaño del tumor significativamente. Esto se ilustra mejor en B) donde tenemos que el tumor tratado es más voluminoso que el tumor control C).

3. La proteína sFRP1 incrementa los niveles de PSA; en suero, su expresión de a nivel de mensajero (*KLK3*), e inmunohistoquímica.

Como fue reportado por (Saini, 2016), niveles de PSA séricos mayores a 4 ng/mL son indicativos de alguna patología prostática, además de que el riesgo asociado a CaP incrementa respecto a la concentración de PSA.

En el caso de nuestro modelo utilizamos la concentración de PSA sérico con el propósito de tener un parámetro bioquímico para dar seguimiento a la progresión del CaP. Con esta determinación se construyó una curva respecto a las semanas tras la castración y se realizó un estadístico, con el propósito de determinar si existen diferencias en la concentración sérica de PSA para cada uno de los grupos (Figura 35). Como podemos observar en el gráfico, no existe diferencia estadística significativa entre ambos grupos, sin embargo en este caso hay que considerar que en el grupo control existió un ratón que desarrolló dos tumores de tamaño similar, lo cual incrementó la media para dicho grupo; además en el caso del grupo tratado hay un tumor que nunca alcanzó un gran volumen tumoral, lo cual impacta disminuyendo la media del grupo e incrementando su desviación estándar.

A pesar de los pormenores biológicos que impactan en la estadística de nuestro experimento, podemos notar que el grupo control tiene una tendencia al alza durante todo el experimento, respecto al grupo control.

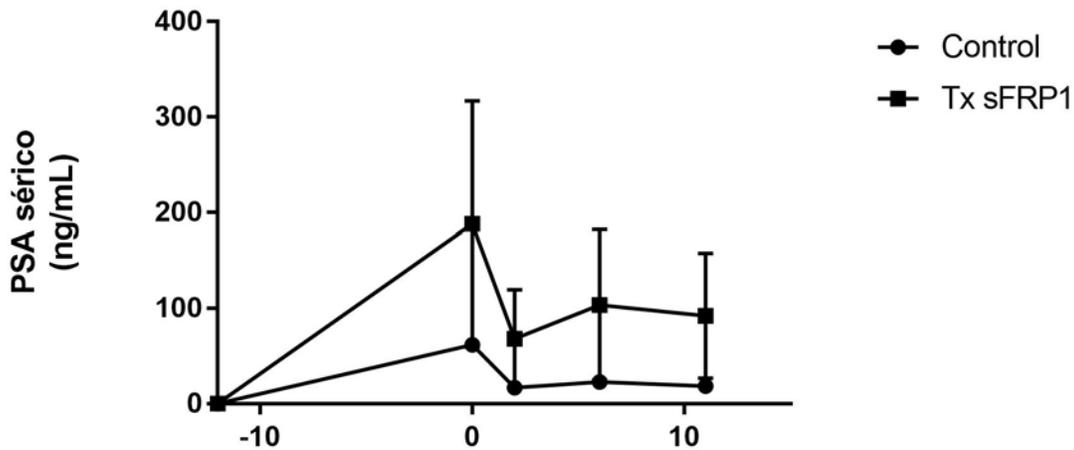


Figura 35.- Concentración sérica de PSA en xenotransplante murino.

En esta figura podemos observar de la progresión tumoral mediante la determinación del PSA sérico. Aunque no existe diferencia estadística significativa, el grupo tratado con sFRP1 presenta una tendencia a niveles más elevados del antígeno respecto al grupo control.

Con el propósito de esclarecer más el papel de la proteína sFRP1 sobre el antígeno prostático específico, se realizó un ensayo de RT-PCR para conocer la expresión relativa a nivel de mensajero, mediante el gen *KLK3* que codifica para dicha calicreína. Como podemos ver en la figura 36, los niveles de expresión a nivel de mensajero del gen *KLK3* presentan un comportamiento similar a lo

observado en los niveles séricos de PSA, por lo cual aparentemente el gen se sobre expresa en el grupo tratado, sin embargo esta diferencia no es suficiente como para ser estadísticamente significativa.

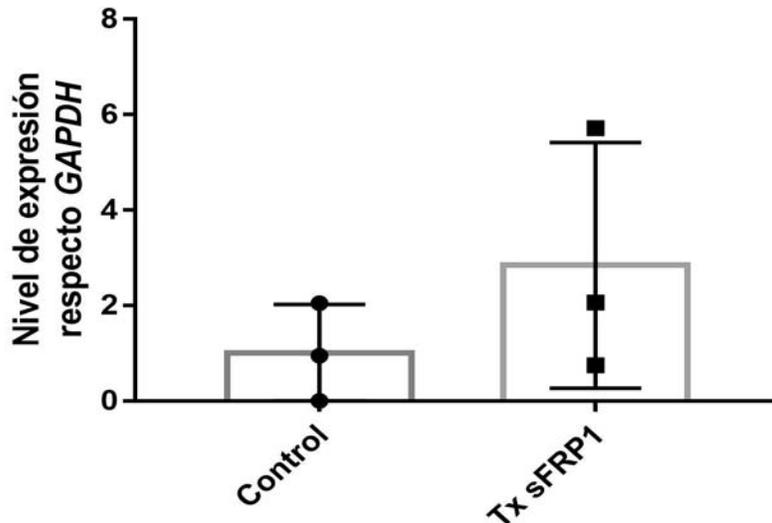


Figura 36.- Expresión a nivel de mensajero del gen KLK3 en el modelo de xenotransplante murino.

Como podemos observar en esta figura existe una tendencia a mayor expresión en el grupo tratado con la proteína que en el grupo control. Aunque esto no sea estadísticamente significativo, se repite el comportamiento observado para PSA a nivel del suero.

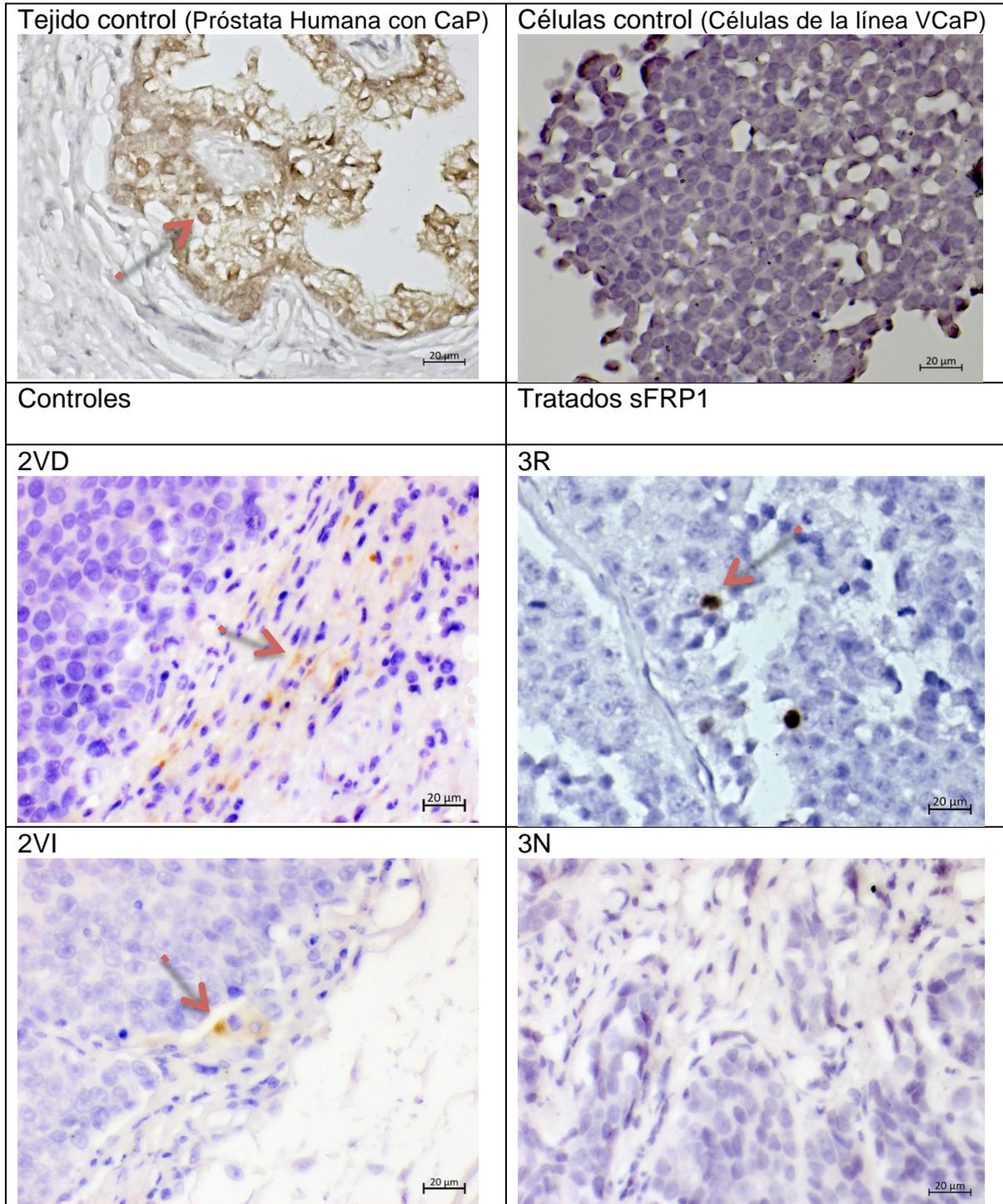
El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y se consideró significativa una $p < 0.05$

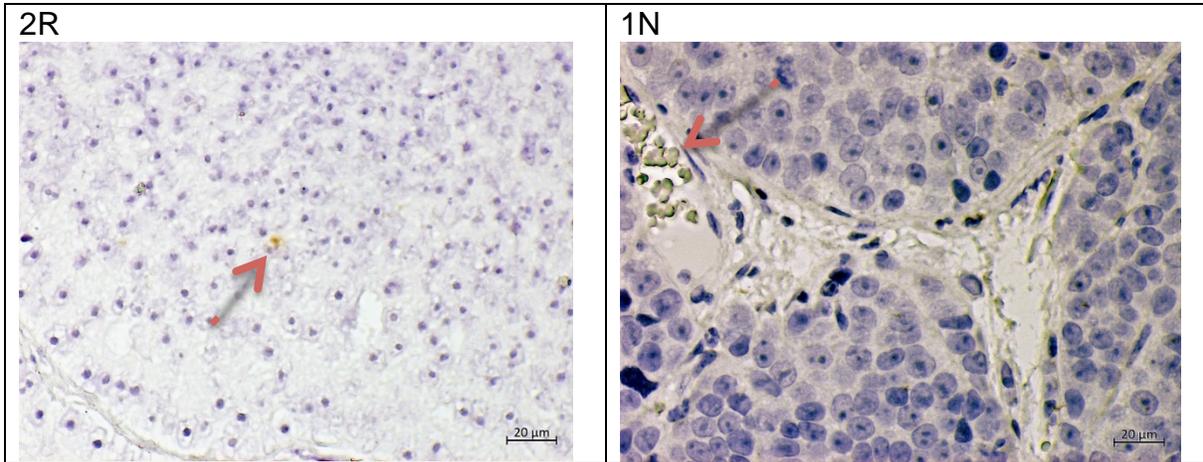
Tras confirmar la expresión a nivel de mensajero se realizaron las pruebas de inmunohistoquímica para confirmar que las células epiteliales del tumor expresaran antígeno prostático específico, y determinar la localización histológica de la marca PSA (+) a lo largo del xenotransplante.

Como podemos ver en la figura 37, no hay diferencias significativas en la expresión de PSA, menos a nivel histológico, entre los grupos tratados con la proteína comparando contra los grupos control.

Figura 37.- Inmunohistoquímicas para detectar PSA.

Se utilizó el anticuerpo PSA/CLK3 (D11E1) XP Rabbit mAb #2475 de Cell Signaling en una dilución 1:150. Las imágenes fueron tomadas a 400 aumentos y la escala es de 20 μm . Como se aprecia no existe diferencia significativa entre la marca del anticuerpo (café) señalada con flechas rojas en los sujetos tratados respecto a los controles.



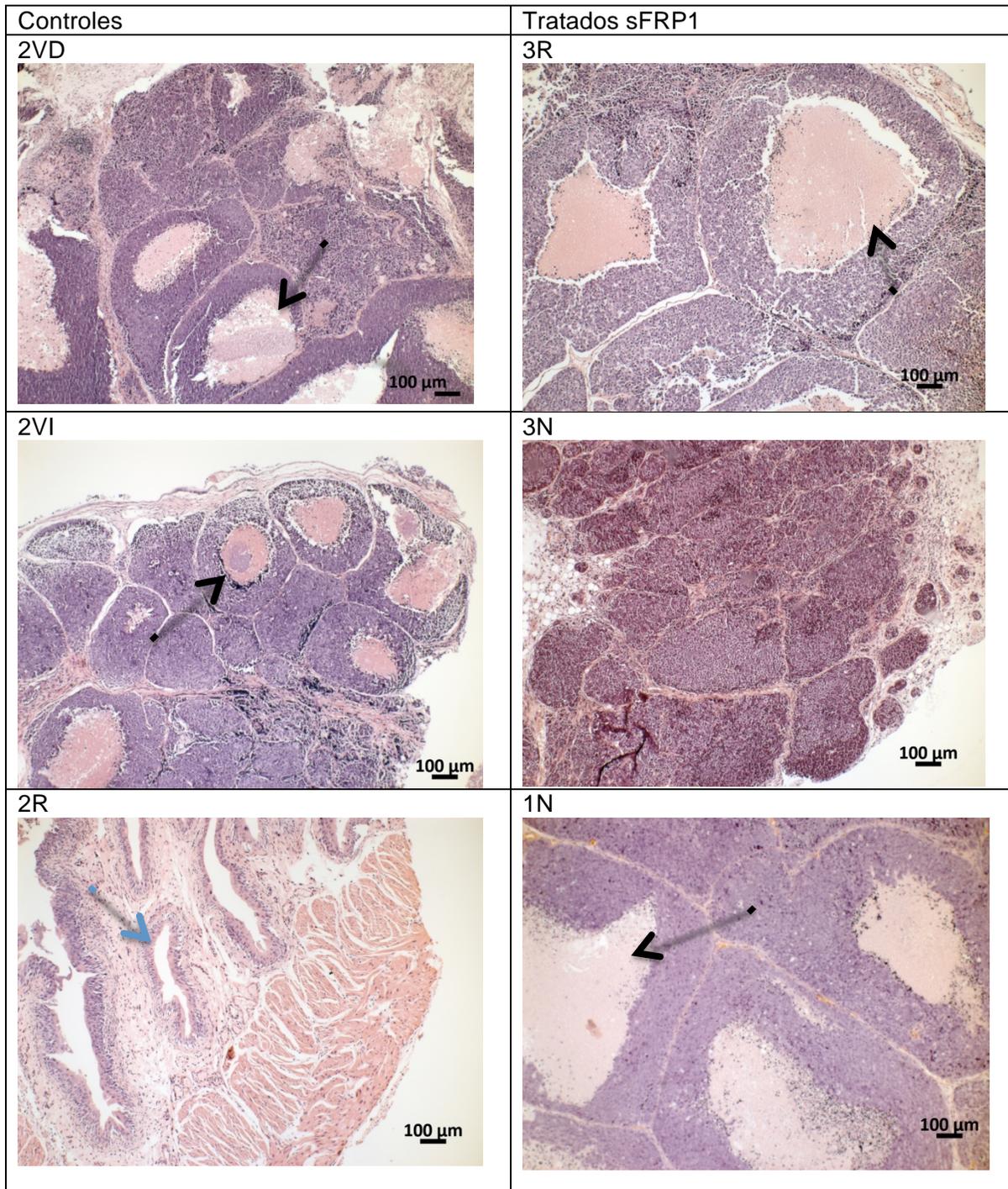


A diferencia de los resultados obtenidos en el ensayo de ELISA, así como la expresión a nivel de RT-PCR en el ensayo de inmunohistoquímica no podemos notar una diferencia significativa, ni hacer un análisis mediante las plataformas computacionales, respecto a la presencia de marca en los tejidos tratados respecto a los controles. Sin embargo analizando la morfología y disposición del tejido éstos contaban con escaso o inexistente lumen epitelial, lo que explica la falta de acumulación del PSA dentro de un lumen para poder ser detectado mediante la técnica de inmunohistoquímica.

4. La proteína sFRP1 disminuye el grado de diferenciación celular; efecto sobre el grado Gleason y en la expresión de marcadores troncales a nivel de mensajero.

Tras haber demostrado el efecto de la proteína sFRP1 sobre la progresión tumoral, a través del seguimiento del PSA en suero; y observar un posible efecto sobre el progreso de la enfermedad, el siguiente paso lógico fue evaluar si el tratamiento con sFRP1 alteraba el grado de diferenciación tumoral, factor también relacionado con la progresión tumoral, específicamente con el grado Gleason de la neoplasia. En la figura 38 podemos observar la tinción de hematoxilina y eosina realizada para cada uno de los tejidos tumorales, a fin de hallar el grado Gleason de estos.

Figura 38.- Tinción de Hematoxilina/Eosina de cada uno de los tumores.



Como podemos observar en los tumores control 2VD y 2VI, controles, podemos observar una pérdida de los cuerpos glandulares los cuales comenzaron a fusionarse con el fin de crear masas uniformes, con escaso estroma entre las formaciones celulares, esto da lugar a pensar que tenemos patrones de crecimiento 4, sin embargo además de esta clase de patrones de crecimiento

tenemos otro el cual está caracterizado por masas sólidas con necrosis central (diferenciada de las formaciones glandulares por el centro rosado, correspondiente a la eosina unida a proteínas citoplasmáticas que se liberaron tras la necrosis) lo que se conoce como patrón de crecimiento 5A. Realizando la suma de ambos patrones de crecimiento, obtenemos un grado Gleason equivalente a 9; siendo este un tumor bastante avanzado y de mal pronóstico (James, 2014).

En el caso del otro tumor control, tenemos un patrón de crecimiento con glándulas bien diferenciadas (Flechas azules) aunque difusas, y con ciertas zonas de oscurecimiento producto de la alta acumulación celular en ellas. Esto empata con el característico patrón de crecimiento 3, pues además, existe una gran cantidad de estroma entre el tejido glandular. Al tener el patrón de crecimiento 3 en estado tenemos como resultado que el grado Gleason del tumor es 6, el cual corresponde a un estadio intermedio de la enfermedad, aunque es el más común de encontrar en los pacientes de CaP (Chen & Zhou, 2016).

Por otra parte dos de los tumores tratados, 3R y 1N, presentan el mismo patrón de crecimiento en estado puro; comedocarcinoma intraductal con necrosis central rodeada por masas sólidas de células (Flechas negras). Además estas masas de comedocarcinoma son mucho más grandes que las presentes en los tumores control, además de tener mucho menos estroma respecto a los controles. Esto indica que el tratamiento con la proteína disminuyó el grado de diferenciación de este tumor pues no hay epitelio glandular presente y el estroma es escaso, al perder el fenotipo característico estas células proliferaron hasta el punto de formar masas sólidas con el centro necrosado. El tener sólo el patrón de crecimiento 5A por todo el tumor, podemos determinar que el grado Gleason es de 10. Por otro lado el patrón de crecimiento del tumor 3N corresponde a agregados anaplásticos en lámina, de forma difusa, con alta proliferación celular; esto corresponde al patrón de crecimiento 5B. Al encontrarse en estado puro, tenemos un tumor con grado Gleason equivalente a 10, pero con un patrón de crecimiento distinto a los otros dos tumores tratados (Chen & Zhou, 2016). En la tabla 3 mostramos el grado Gleason para cada uno de los tumores analizados.

Tabla 3.- Grado Gleason de los tumores control (Verde) y tratados (Rojo).

Tumor	Grado Gleason
2VD	9
2VI	9
2R	6
3R	10 A
3N	10 B
1N	10 A

En otras palabras, el tratamiento con la proteína sFPR1 influye en el grado de diferenciación celular, disminuyendo este y logrando que la enfermedad progrese con un peor pronóstico, respecto al control.

Con el fin de validar los resultados de las pruebas histológicas, se realizó una RT-PCR para marcadores característicos de troncalidad como lo son SOX2, NANOG, y OCT4.

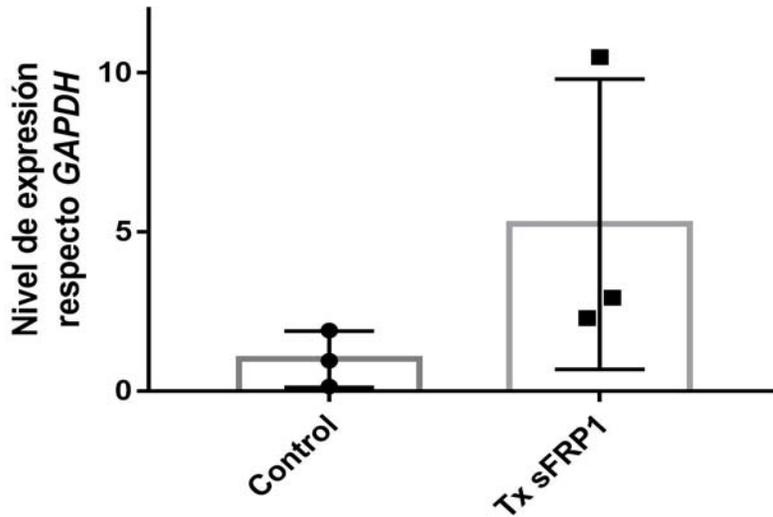


Figura 39.- Expresión a nivel de mensajero del gen SOX2 en el modelo de xenotransplante murino.

Existe una mayor expresión del marcador troncal SOX2 en el grupo tratado con la proteína que en el grupo control. Aunque esto no sea estadísticamente significativo, el promedio es más de dos veces mayor en el grupo tratado que en el control.

El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y se consideró significativa una $p < 0.05$

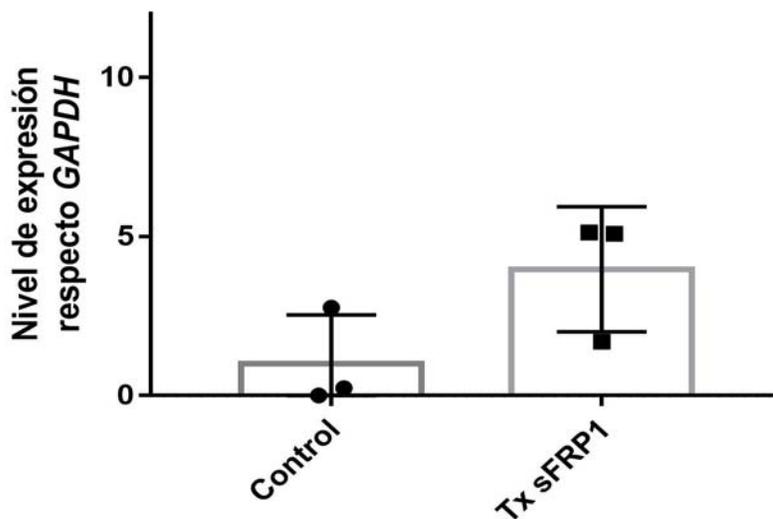


Figura 40.- Expresión a nivel de mensajero del gen NANOG en el modelo de xenotransplante murino.

La diferencia en los niveles de expresión no es estadísticamente significativa, sin embargo existe una tendencia a la alza en el grupo tratado.

El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y se consideró significativa una $p < 0.05$.

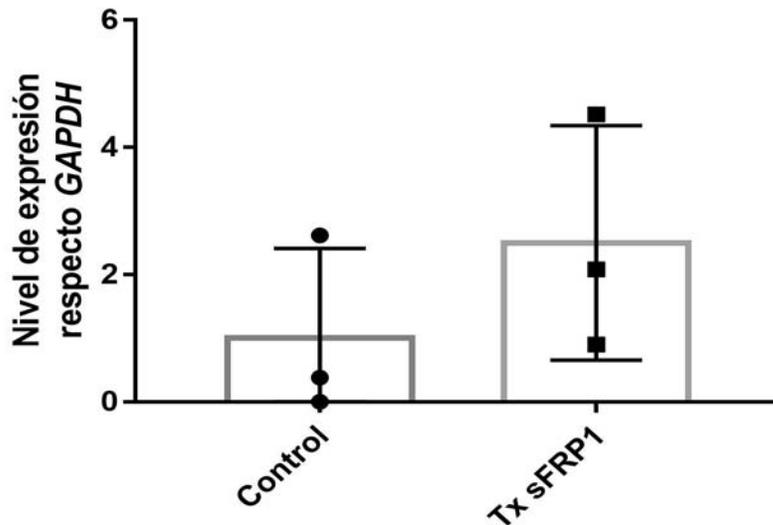


Figura 41.- Expresión a nivel de mensajero del gen *POU5F1* (*OCT4*) en el modelo de xenotransplante murino.

El marcador del gen *OCT4* presenta una tendencia no significativa a mayores niveles de expresión en el grupo tratado con la proteína sFRP1.

El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y se consideró significativa una $p < 0.05$

Como podemos ver en la mayoría de los genes asociados encontramos una diferencia estadística significativa. A pesar de esto en todos los genes observamos una tendencia a la alza lo cual indica que el tratamiento con sFRP1 puede impactar sobre el grado de diferenciación del tumor; aunque hace falta incrementar el número de individuos tanto tratados como no tratados para que nuestro análisis pueda ser representativo.

5. sFRP1 incrementa la expresión del receptor de andrógenos.

Una vez que se comprobó que el tratamiento con la proteína sFRP1 influye sobre la progresión tumoral, el paso consecuente es evaluar los mecanismos moleculares asociados a este efecto. Como primera parte decidimos evaluar la expresión del receptor de andrógenos a nivel de mensajero ya que basados en el trabajo de (Kawano, Diez, Kypta, & et.al., 2009), esta proteína regula negativamente al receptor de andrógenos. Por esto la primera molécula a evaluar fue el receptor de andrógenos, para lograr esto se realizó una RT-PCR.

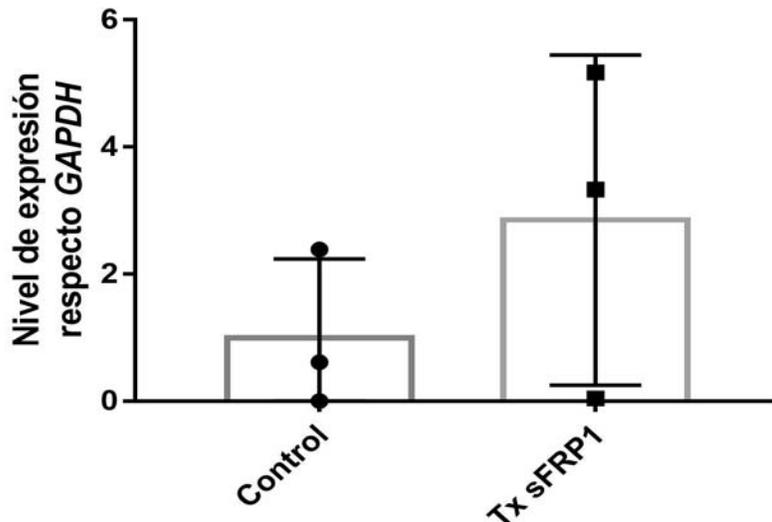


Figura 42 .-Expresión a nivel de mensajero del gen AR en el modelo de xenotransplante murino.

Existe una tendencia a la alza en la expresión para el grupo tratado, sin embargo dicha diferencia no es significativa a pesar de que la media sea 2 veces mayor. El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y se consideró significativa una $p < 0.05$

En la figura 42 podemos observar una tendencia a la alza en la expresión del receptor de andrógenos tras la administración de la proteína sFRP1, lo cual contradice lo reportado por (Kawano, Diez, Kypta, & et.al., 2009). Sin embargo corresponde con los resultados observados para la expresión de PSA/KLK3, ya que el promotor de este gen tiene elementos de respuesta a andrógenos.

6. El tratamiento con sFRP1 incrementa la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* así como del gen *ERG* a nivel de mensajero y proteína.

La parte medular de este trabajo está basada en el posible efecto que pueda tener la proteína sFRP1 sobre el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, mediado por el receptor de andrógenos. Con este propósito determinamos la expresión del gen *TMPRSS2-ERG* a nivel de mensajero así como la expresión de su proteína ERG, siendo esta proteína la posible responsable del efecto fenotípico visto en el grado de diferenciación celular, al ser la proteína ERG un factor de transcripción que tiene un efecto importante sobre genes de la vía WNT.

Como primera parte en la figura 43 se muestra la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* a nivel de mensajero, seguido de la figura 44 donde se muestra la expresión de la proteína traducida por este mensajero por western blot, y finalmente en la figura 45 podemos ver la expresión de esta proteína y su localización histológica por inmunohistoquímica.

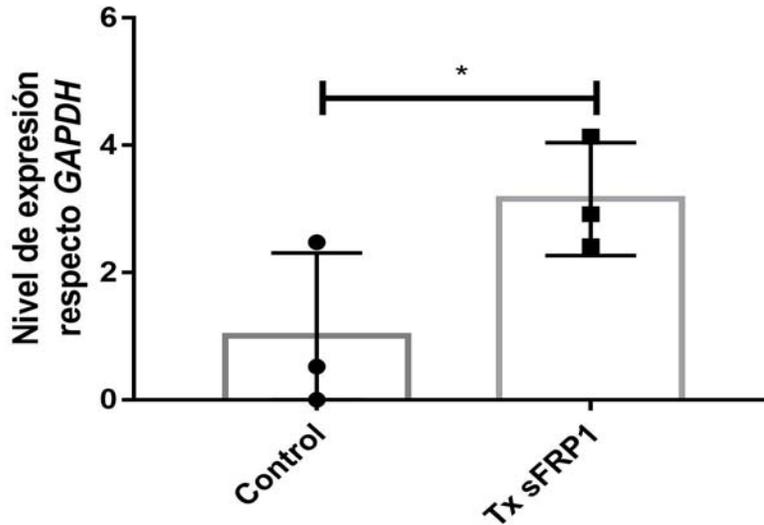


Figura 43.- Expresión a nivel de mensajero del gen *TMPRSS2-ERG* en el modelo de xenotransplante murino.

Existen diferencias estadísticas significativas entre el grupo control y el grupo tratado con la proteína sFRP1. Esto indica que el tratamiento con la proteína sFRP1 merató la expresión del gen de fusión aunque este fuese a la alza, contrario a la hipótesis.

El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y con una $p < 0.05$

El valor de $p = 0.0387$

Expresión de ERG en Xenotransplante a Nivel de Proteína

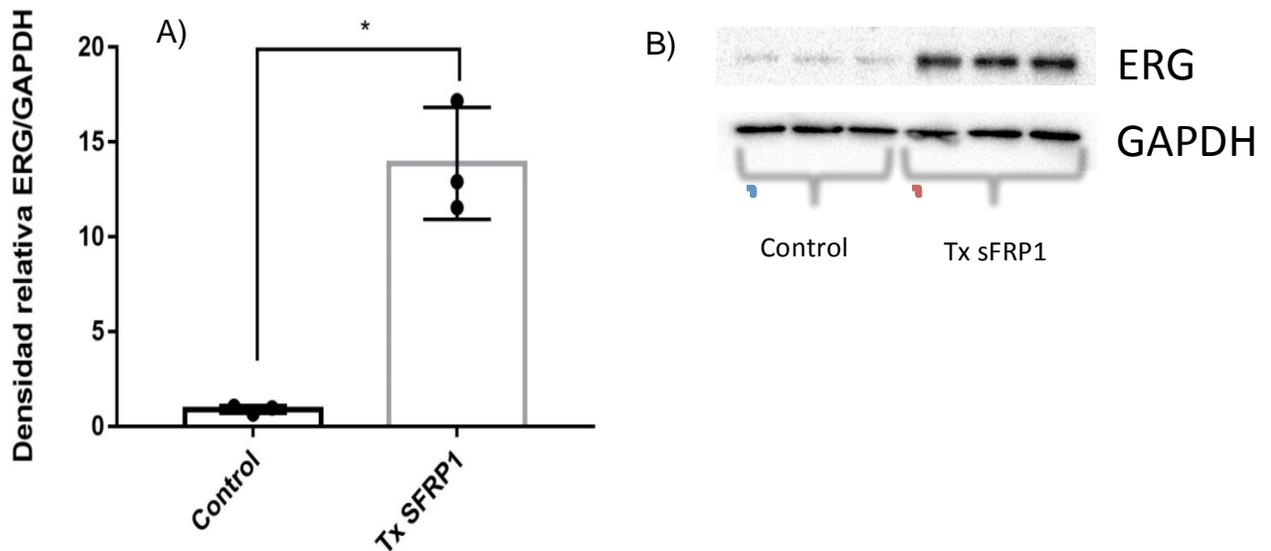
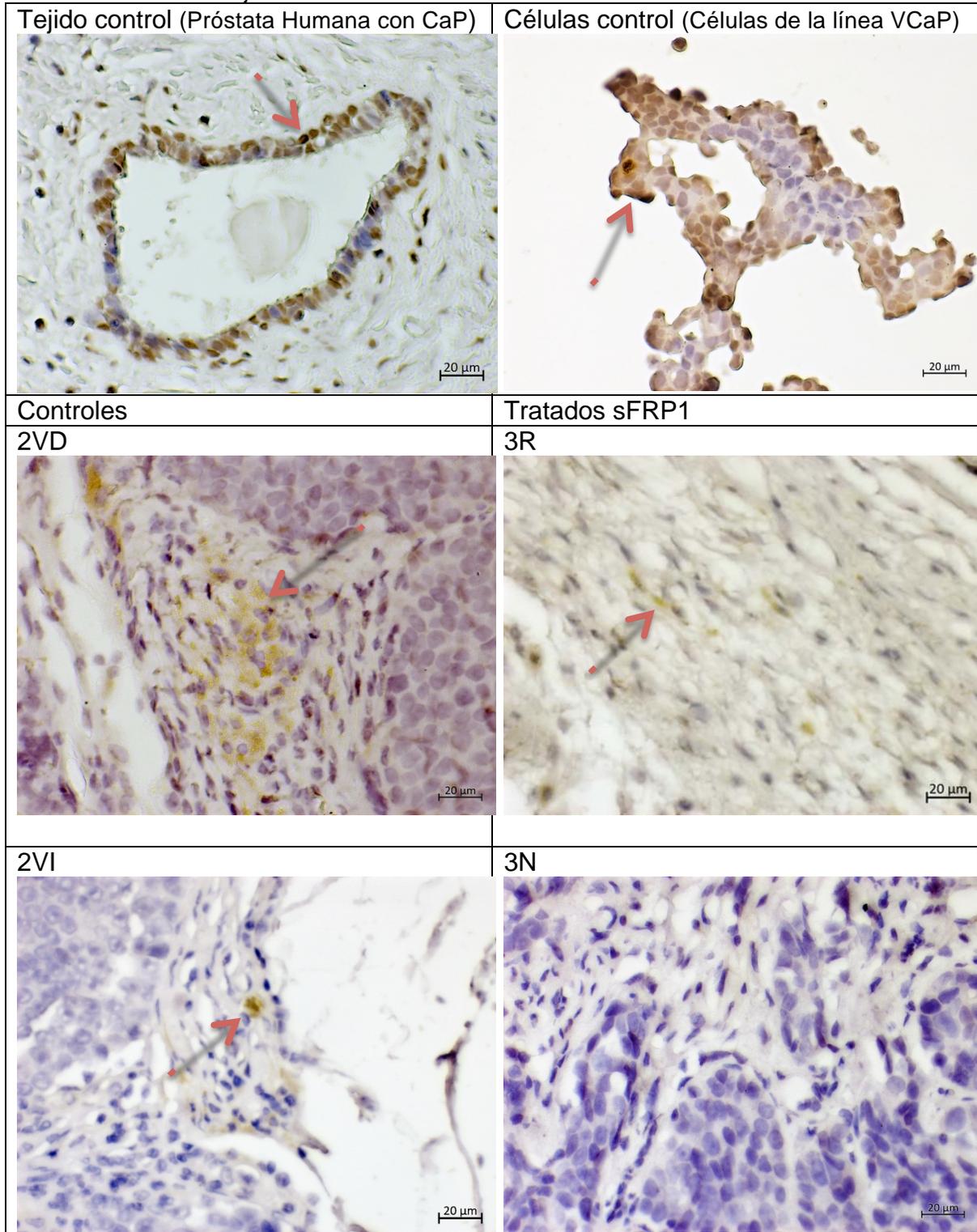


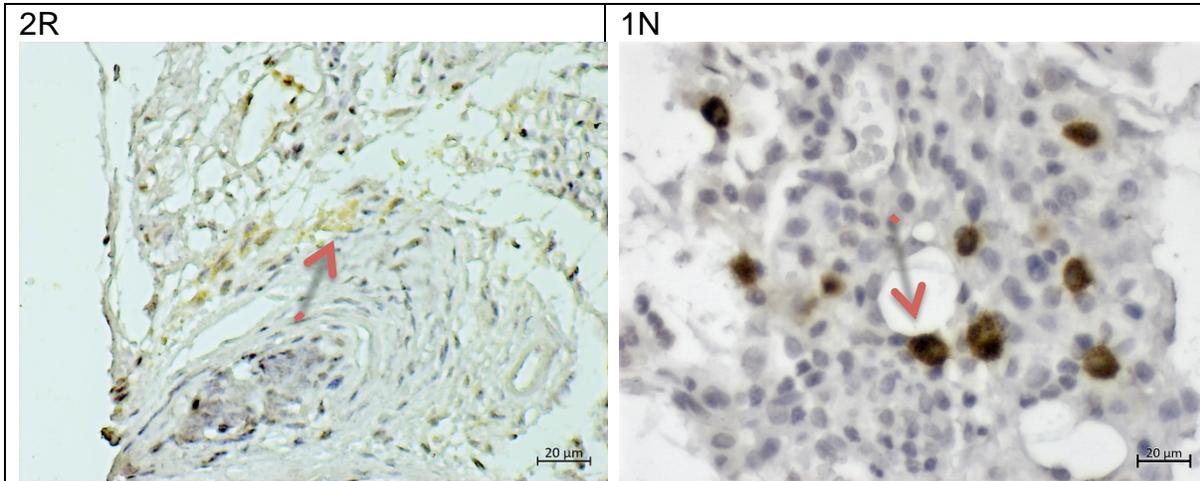
Figura 44.- Expresión de la proteína ERG en el modelo dextranotransplante murino.

A) Muestra que la proteína ERG está sobre expresada en los grupos tratados, respecto a los controles lo cual empata con su expresión a nivel de mensajero. Esto es un fuerte indicativo de que el tratamiento con la proteína sFRP1 incrementó la expresión de nuestra proteína ERG. En la imagen B) se muestran los inmuno-blots, siendo realizados en la misma membrana tras un proceso de stripping. El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y con una $p < 0.05$ El valor de $p = 0.008$

Figura 45.-Inmunohistoquímicas para detectar ERG.

Se realizaron con el anticuerpo Erg-1/2/3 Antibody (C-17): sc-354 SANTA CRUZ immunohistochemistry dilución 1:30. Las imágenes fueron tomadas a 400 aumentos, a escala de 20 µm. Señalando los tumores control y los tratados. La marca positiva a ERG es de color café señalada con flechas rojas.





En el caso de esta inmunohistoquímica podemos notar que la marca se expresa más en los grupos control respecto a los tratados, sin embargo algo peculiar es que esta es una marca citoplasmática, no nuclear como debería ser para un factor de transcripción como lo es ERG. Esto puede indicar que el anticuerpo no está actuando de forma específica, además de esto la marca tiende a acumularse en el escaso estroma que presentan estos tejidos, mientras las células que se encuentran en las formaciones celulares del tumor no expresan dicha marca.

7. El tratamiento con sFRP1 incrementa la expresión del genes de la vía WNT.

Los genes de la vía Wnt responden al factor de transcripción ERG, al verse este sobre expresado es de suponerse que activará la expresión de genes asociados a la vía Wnt, por lo cual el siguiente paso fue determinar la expresión de genes asociados a la vía Wnt. En las figuras 46 y 47 se muestra la expresión de los genes *LEF-1* y *WNT3A*, los cuales están asociados a la vía Wnt.

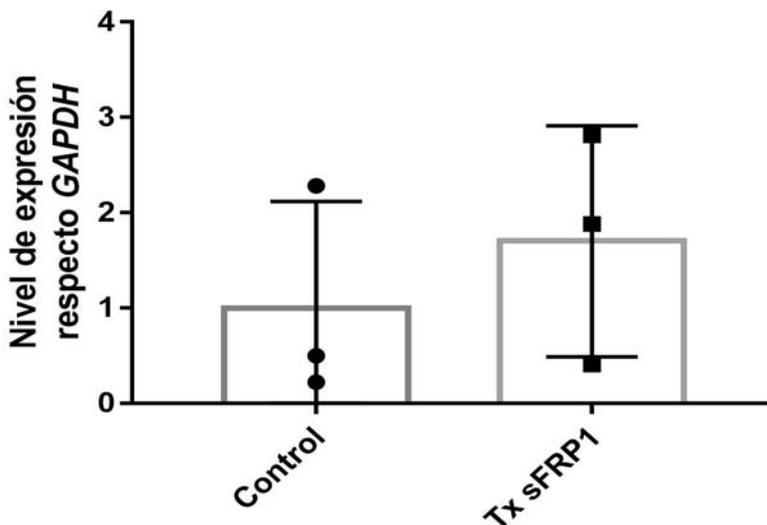


Figura 46.- Expresión del gen WNT-3A en el modelo de xenotransplante murino.

Como podemos observar al tener una desviación elevada, nuestra comparación en la expresión del gen WNT-3A no muestra diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado. Sin embargo se presenta una ligera tendencia a la alta en el grupo tratado.

El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y con una $p < 0.05$

Como podemos apreciar en este gráfico el gen WNT-3A presenta una tendencia a la alta en el grupo tratado respecto al grupo control, lo que es un indicador de que el tratamiento está activando la vía Wnt; mediante la acción del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*. Sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas por lo que lo observado podría ser un efecto de las diferencias interindividuales y no del tratamiento.

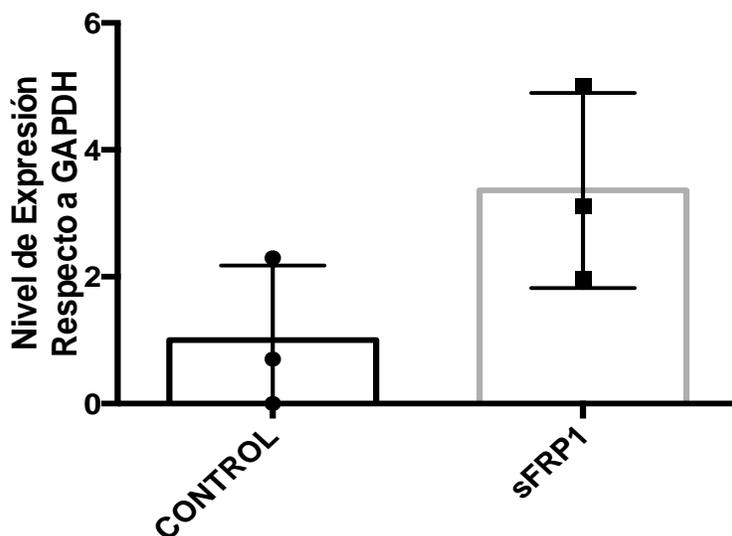


Figura 47.- Expresión del gen LEF-1 en el modelo de xenotransplante murino.

La comparación en el nivel de expresión del gen LEF-1 para el grupo control y el grupo tratado con la proteína sFRP1 no muestra diferencia estadísticamente significativa, sin embargo hay una clara tendencia a tener mayores valores de expresión en el grupo tratado.

El análisis se realizó mediante una T-student no pareada, a una cola y con una $p < 0.05$

LEF-1, junto con TCF, es el factor de transcripción activado por β -catenina encargado de la expresión de los genes de la vía Wnt. Siendo la expresión de este factor depende de ERG, al verse ERG expresado a la alta con tras el tratamiento sFRP1, este activó la expresión de LEF-1, por lo cual se ve igualmente expresado a la alta a nivel de mensajero.

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue determinar el efecto de la proteína sFRP1 sobre la progresión tumoral de CaP en un modelo xenotransplante murino. Se emularon las condiciones del bloqueo androgénico máximo y el estado de resistencia a andrógenos tras el tratamiento. A partir de la orquiectomía se comenzó a administrar la proteína recombinante SFRP1. Nuestra hipótesis inicial fue que la proteína sFRP1 regularía a la baja la actividad del receptor de andrógenos como lo reportó (Kawano, Diez, Kypta, & et.al., 2009). Al disminuir la actividad del AR se verían regulados a la baja los elementos de respuesta a andrógenos de la familia de genes de las calicreínas (*KLK3/PSA*, *KLK2*, *KLK4*), el gen *TMPRSS2*, el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, el gen *ACTN1*, y los genes relacionados a la proliferación (Nelson, Clegg, Lin, & et.al., 2003). Este efecto disminuiría la expresión de genes responsivos a ERG, como algunos genes reportados de la vía *WNT/LEF1* (Wu, Zhao, & Yu, 2013). Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo fueron contrarios a lo planteado en la hipótesis. Por lo cual en los siguientes párrafos se discuten los posibles factores que influyeron en la obtención de estos resultados

Primeramente se analizaron los niveles de antígeno prostático específico, así como su relación con el volumen y progresión tumoral. Como podemos observar en el gráfico 2 el volumen tumoral promedio se vio afectado por el tratamiento con la proteína sFRP1, alcanzando volúmenes hasta 4 veces mayores en los ratones tratados. Se observó que estos tumores eran más esféricos que los tumores control y podían tener diferentes lóbulos. Dicho incremento en la masa tumoral fue contrario a la hipótesis, lo cual podría indicar que la proteína sFRP1 favorece la proliferación en las células que expresan el gen de fusión TMPRSS2-ERG.

Estudios que contradicen a lo reportado por (Kawano, Diez, Kypta, & et.al., 2009) sobre el papel de la proteína sFRP1 exógena en CaP no son nuevos; trabajos como el de (Joesting, Perrin, Marker, & et.al., 2005) proponen que el estroma prostático sobre-expresa y secreta a la proteínasFRP1, lo que incrementa la proliferación y disminuye la apoptosis. Esto puede ser similar a lo reportado por el presente modelo, sin embargo los mecanismos moleculares para que sFRP1 lleve a cabo su acción pueden ser diferentes a los reportados por Joesting ya que en dicho trabajo no se utiliza un modelo celular que exprese el gen de fusión TMPRSS2-ERG.

La región promotora del gen PSA es un elemento de respuesta a andrógenos. Con el propósito de elucidar si sFRP1 incrementa el volumen tumoral mediante la activación de la vía del receptor de andrógenos, se analizó la concentración de PSA sérico, mediante un ensayo de ELISA. La terapia con SFRP1 incrementó las concentraciones de PSA, aunque de forma no significativa lo cual pudo haber sido resultado del doble tumor que presentaba uno de los ratones control, el cual incrementó en gran medida el PSA en dicho ratón. El incremento de PSA fue similar a nivel del mensajero de PSA (expresión del gen *KLK3*) aunque tampoco encontramos diferencias estadísticas significativas. Esto indica que la terapia estaba elevando la actividad transcripcional del receptor de andrógenos de forma indirecta. Esta afirmación se basa en trabajos previos donde se ha demostrado que en el núcleo celular existe una serie de genes regulados por el AR.(Nelson, Clegg, Lin, & et.al., 2003).

Tras determinar la expresión de PSA a nivel de proteína mediante la prueba de ELISA se realizaron pruebas inmuno-histoquímicas para determinar la disposición histológica de la proteína PSA. Sin embargo existieron distintas dificultades técnicas y biológicas por las cuales este ensayo no resultó como se planeó. La primera dificultad es que las células al perder el grado de diferenciación, parecieron no almacenar PSA en el citoplasma, además de la pérdida a nivel de tejido de los cuerpos luminares de secreción. Esto impidió la posibilidad de tener cuerpos celulares donde se concentrase el antígeno prostático específico lo cual dificultó la localización de este a nivel de tejido. Por ello una de las perspectivas de este trabajo es realizar nuevos ensayos de inmunohistoquímica a diferentes niveles de desarrollo tumoral, sin embargo esto incrementaría mucho el número de ratones a utilizar.

En síntesis podemos decir que el tratamiento con la proteína sFRP1 incrementó la actividad transcripcional del receptor de andrógenos, aunque esto no sea

estadísticamente significativo. Sin embargo en el modelo de xenotransplante no nos fue posible evaluar de forma directa el efecto de la proteína sFRP1 sobre dicha molécula. Por lo tanto el efecto observado podría deberse no a la acción de sFRP1 sobre el AR sino a dos fenómenos independientes ocurriendo al mismo tiempo como lo son 1) la activación de la vía WNT por sFRP1 a través de alguna ruta ya sea canónica o no canónica dependiente de canales de calcio (Komiya & Habas, 2008); 2) la influencia de diferentes factores de crecimiento sobre un receptor de andrógenos hipersensible.

Para comprender más la influencia de esta terapia sobre el receptor de andrógenos, se determinó la expresión de este a nivel de mensajero, ensayo en el que observamos una tendencia al incremento en los niveles de expresión de AR en el grupo tratado con la proteína. A pesar de no ser estadísticamente significativo, el hecho de que el receptor de andrógenos pudiese expresarse más tras la exposición a la proteína sFRP1 nos hace pensar que con el fenotipo AIPC, el AR se vuelve hipersensible y se sobreexpresa (Feldman & Feldman, 2001) así que su actividad se ve promovida por algún factor liberado tras la exposición a sFRP1; para comprobar esto necesitamos realizar ensayos de inmunoprecipitación tanto de AR como de sFRP1, y hacer un análisis de masas con el propósito de determinar qué factores están acoplados a ambas proteínas.

Como segunda etapa del proyecto se evaluaron características fenotípicas como el grado Gleason ya que este indica el nivel de diferenciación celular en un tumor, lo que puede esclarecer un poco más el efecto que está teniendo la proteína sFRP1 sobre la progresión tumoral reflejado en el grado de diferenciación celular pues se ha relacionado la pérdida de diferenciación con un mal pronóstico tumoral (Bisson & Prowse, 2009).

Como podemos observar en la tabla 2 y la tabla 3 la terapia incrementa el grado de indiferenciación celular y modifica los patrones de crecimiento tumoral lo que conlleva a un grado Gleason más elevado. Esto se refleja en que el tumor perdió los cuerpos glandulares y el estroma que divide a éstos formando masas de alta confluencia celular (Chen & Zhou, 2016). Además de esto se observó que en los cuerpos tumorales más grandes, el grado de indiferenciación es mayor así como los cuerpos de comedonecrosis fueron más notorios.

Con el propósito de evaluar si realmente existe un efecto por parte de los tratamientos sobre el grado de diferenciación celular, se evaluaron marcadores característicos asociados a troncalidad como: *SOX2*, *NANOG* y *OCT4*. Los genes *SOX* son parte de una familia de factores de transcripción indispensables para el desarrollo embrionario siendo un factor importante para la autorenovación de las células troncales pluripotenciales humanas, a la par de otros factores intrínsecos como *NANOG* y *OCT4*, formando el eje central en la capacidad de autorenovación de éstas células y el destino celular de las mismas (Zhang & Cui, 2014). Como podemos ver en los gráficos 5, 6 y 7 los marcadores de troncalidad presentan una

tendencia a sobre expresarse en los tumores tratados indicando que éstos tienen un grado de diferenciación menor. Observamos que la expresión de marcadores troncales puede asociarse al decremento en el grado de diferenciación celular y, por tanto a la pérdida del estroma tumoral. Al perder el estroma la estructura tumoral es menos rígida lo cual podría promover la difusión e invasión. A pesar de que estos ensayos podrían indicar que el tratamiento con sFRP1 influye sobre el grado de diferenciación tumoral, promoviendo la expresión de marcadores troncales, esto no es significativo por lo cual se tendrá que incrementar el tamaño de muestra para poder brindar una conclusión más acertada.

Tras haber observado diferencias significativas en el tamaño tumoral y una tendencia no significativa a la sobreexpresión e incremento de la actividad del AR, el siguiente paso fue evaluar la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG*.

Como sabemos la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* depende de la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (Nelson, Clegg, Lin, & et.al., 2003) por lo que al tener posible incremento en su actividad y expresión, se esperaba una expresión más elevada de *TMPRSS2-ERG* en los tratamientos. Esto se pudo confirmar a nivel de mensajero y de proteína donde *TMPRSS2-ERG* se sobre expresó en los grupos tratados con sFRP1. Este resultado es de particular relevancia pues permite explicar el efecto observado en el fenotipo ya que la proteína del gen de fusión es *ERG* la cual está involucrada en proliferación celular, diferenciación, angiogénesis, inflamación y apoptosis (Wang, Wang, Liang, & et.al., 2017).

El factor de transcripción *ERG*, es un importante regulador de la vía de señalización *WNT/LEF1* (Wu, Zhao, & Yu, 2013) y promueve la transición epitelio-mesénquima (EMT) (Leshem, Berger, & et.al., 2011). *ERG* es capaz de incrementar los niveles de β -catenina en las células, ocasionando un incremento en la expresión y actividad transcripcional de *LEF-1* (Wu, Zhao, & Yu, 2013). Por lo cual se decidió determinar la expresión de dos genes relacionados a la vía *WNT* como lo son el ligando *WNT-3A* y su promotor *LEF-1*.

Los resultados del presente trabajo coinciden con el reporte de (Wu, Zhao, & Yu, 2013), pues tenemos *ERG* expresado a la alza en los grupos tratados con la proteína sFRP1, y en estos mismos grupos la expresión de *LEF-1* y *WNT3A* pareciera ser mayor, aunque sin diferencias estadísticas significativas. En este caso podemos atribuir la falta de significancia en los resultados a que la expresión de *LEF-1/TCF* se ve regulada por el gen *SOX2* mediante un sistema de coregulación (Kormish, Sinner, & Zorn, 2010).

Ciertos trabajos asocian la activación de la vía *WNT* con una disminución en el grado de indiferenciación y disminución de metástasis (Bisson & Prowse, 2009), sin embargo la actividad de la vía *WNT* sobre el grado de troncalidad y la capacidad metastásica, así como su influencia en la transición epitelio mesénquima, EMT, depende del tipo de tejido; por lo cual mientras en algunos tipos de tumores la actividad de la vía *WNT* pareciera inhibir la progresión tumoral, en la mayoría de los tumores se asocia la activación de la vía *WNT* con un

fenotipo más metastásico, invasivo y que tiene mayor capacidad de sostén para las células troncales asociadas a cáncer (Zhan, Rindtorff, & Boutros, 2017).

Resumiendo los hallazgos realizados en este trabajo tenemos que la proteína sFRP1 de alguna manera regula a la alta la expresión del receptor de andrógenos en el tumor tras la depleción androgénica; si bien este efecto a nivel transcripcional puede deberse a la misma terapia de depleción, el hecho de que en el grupo tratado con la proteína la expresión sea aparentemente mayor indica que nuestro tratamiento se relaciona con este enriquecimiento del AR.

Al incrementar la expresión sobre AR, sFRP1, regula a la alta la expresión del gen de fusión TMPRSS2-ERG, lo que lleva a una mayor traducción de la proteína; impactando ERG a su vez sobre la expresión de genes de la vía WNT, como LEF-1 y WNT3A. Aunque hacen falta ensayos para determinar el mecanismo específico de este fenómeno, podemos inferir que la vía WNT canónica es la que resiente el efecto de ERG, pues modifica la expresión del factor de transcripción LEF-1 (Figura 48). Este incremento en los genes de la vía WNT se ve reflejado en el fenotipo teniendo tumores menos diferenciados, con un grado Gleason mayor y con un incremento en el volumen, dada su alta proliferación.

Hacen falta más estudios como ensayos de funcionales y ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP), con una cohorte mayor, con el fin de validar el efecto de la proteína sFRP1 sobre tumores positivos al gen de fusión, sin embargo este trabajo propone las bases para definir dicho mecanismo. Además de esto podemos afirmar que este trabajo comprueba la importancia de la detección clínica como parte de las pruebas de diagnóstico, del gen de fusión ya que lejos de seguir el comportamiento observado por (Kawano, Diez, Kypka, & et.al., 2009), la exposición de los tumores TMPRSS2-ERG a la proteína sFRP1 incrementó algunas de las propiedades neoplásicas del tumor como proliferación, grado de indiferenciación lo que resultó en una enfermedad con peor pronóstico.

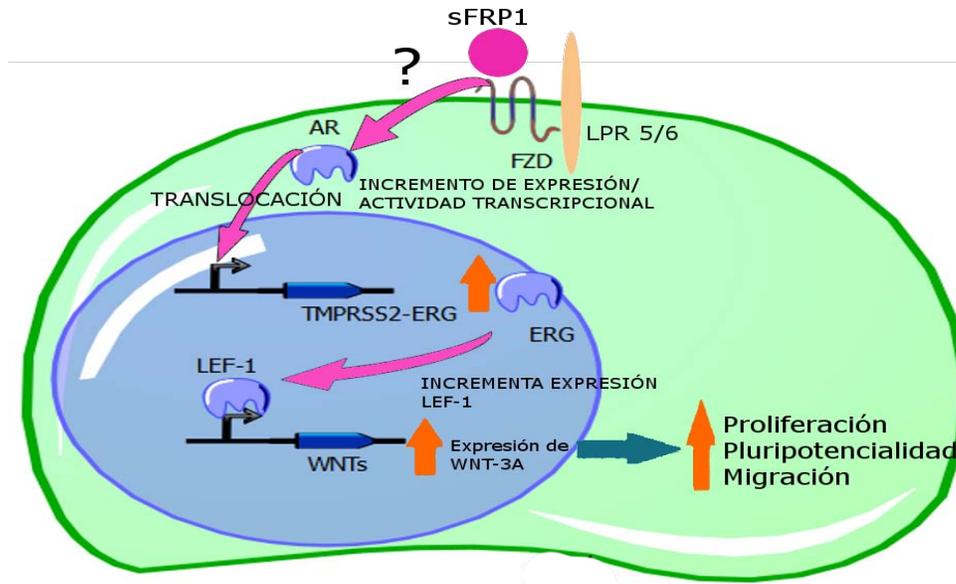


Figura 48.- Posible mecanismo por el cual la proteína sFRP1 actúa sobre el gen de fusión *TMPRSS2-ERG*, impactando en la vía *WNT*.

Dentro del mecanismo propuesto sFRP1, por algún mecanismo aún no descrito, incrementa la actividad transcripcional y expresión del receptor de andrógenos lo que hace que éste se trasloque al núcleo. Una vez en el núcleo se acopla al promotor de *TMPRSS2-ERG*, promoviendo la transcripción de *ERG*. Con *ERG* sobre expresado, *LEF-1* es regulado a la alta, induciendo la expresión de la vía *WNT*. Esto incrementa proliferación, migración y disminuye la diferenciación celular.

CONCLUSIONES

El tratamiento con la proteína sFRP1 incrementó significativamente la expresión del gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en el xenotransplante.

sFRP1 influyó en el grado de diferenciación y patrón de crecimiento celular generando un grado Gleason más elevado.

A pesar de que se intentó elucidar los mecanismos moleculares por los que ocurría esta relación entre la expresión del gen de fusión y los marcadores de troncalidad, los resultados no fueron estadísticamente significativos.

PERSPECTIVAS

Como perspectiva se recomienda incrementar el número de muestras del modelo para poder realizar un análisis estadístico que sea más representativo; además se propone la inclusión de pruebas de inmunoprecipitación y análisis de masa con el propósito de detallar los mecanismos moleculares asociados a la acción de sFRP1 en tumores con la fusión *TMPRSS2-ERG*.

Al ser este efecto contrario a lo reportado para las células que no expresan el gen de fusión éste trabajo marca una pauta más sobre la importancia clínica para la implementación de una prueba rutinaria que discierna los tumores *TMPRSS2-ERG*

positivos, a fin de brindar un tratamiento más certero acorde a las necesidades particulares de este tipo de neoplasias.

REFERENCIAS

- Aaron, L., Franco, O., & Hayward, S. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of BPH. *Urol Clin North Am* , 279–288.
- Abcam. (01 de 01 de 2018). *IHC-PARAFFIN PROTOCOL (IHC-P)*. Recuperado el 05 de 06 de 2018, de Abcam protocols: http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/ihc_p.pdf
- American Cancer Society. (2015). Cancer Facts and figures. *American Cancer Society*, 1.
- American Cancer Society. (2015). Cancer Facts and Figures. *American Cancer Society*, 20-21.
- Amis, E. S. (1994). *Radiology of the Lower Urinary Tract // Anatomy and Physiology of the Prostate*. (L. E.K., Ed.) Berlin, Germany: Springer, Berlin, Heidelberg .
- ATCC. (01 de 01 de 2016). *VCaP (ATCC® CRL-2876™)*. Recuperado el 04 de 05 de 2018, de CULTURE METHOD: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2876.aspx#culturemethod>
- Berge, T., Brugmann, S., Helms, J., & Nusse, R. (2008). Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*, 3247-3257.
- Berger, M., Garraway, L., & et.al. (2011). The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*, 214-220.
- Bill-Axelsson, A., Holmberg, L., Johansson, J., & et.al. (2014). Radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* , 932-942.
- Bisson, I., & Prowse, D. (2009). WNT signaling regulates selfrenewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. *Cell Res*, 683-687.
- Bonci, D., Coppola, V., De Maria, R., & et.al. (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nature Med*, 1271-1277.
- Burkhardt, D., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 671-682.
- Cardigan, K., & Waterman, M. (2012). TCF/LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1-22.
- Carter, H., Albertsen, P., & Zietman, A. (2013). EARLY DETECTION OF PROSTATE CANCER: AUA GUIDELINE. *AUA- Guideline*, 3-22.
- Chen, F., & Zhao, X. (2013). Prostate Cancer: Current Treatment and Prevention Strategies. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 279-284.

- Chen, N., & Zhou, Q. (2016). The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res*, 58-64.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., & Joly, A. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.*, 1521-1533.
- Chiarugi, P., Paoli, P., & Cirri, P. (2014). Tumor Microenvironment and Metabolism in Prostate Cancer. *Semin Oncol*, 41(2), 267–280.
- Cole, M., Johnstone, S., RA., Y., & et.al. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev*, 745-7554.
- Corning Incorporated. (01 de 02 de 2013). *Cells behave better on Corning Matrigel matrix—the original, trusted extracellular matrix (ECM)*. Recuperado el 04 de 05 de 2018, de Corning Life Sciences: <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html>
- Czyż, J. s., Szpak, K., & Madeja, Z. (2012). The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nat Rev Urol*, 9, 274-282.
- Dan, & et.al. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 1215-1228.
- De Marzo, A., Platz, E., & Sutcliffe, S. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7, 256-269.
- Demichelis, F., Fal, K. I., & Rubin, M. (2007). TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*, 4596–4599.
- Feldman, B., & Feldman, D. (2001). THE DEVELOPMENT OF ANDROGEN-INDEPENDENT PROSTATE CANCER. *Nature Rev*, 34-45.
- Ferlay J, S. I. (2013). *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. GLOBOCAN 2012* (Vol. 1). Lyon, Francia: International Agency for Research on Cancer.
- Figg, W., Chau, C., & Small, E. (2010). *Drug Management of Prostate Cancer*. New York: Springer-Verlag New York.
- Gálvez de la Torre, I. (2008). *Cuidados enfermeros al paciente oncológico*. Madrid, España: Editorial Vértice.
- García-Tobilla, P., Solórzano, S., Rodríguez-Dorantes, M., & et.al. (2016). SFRP1 repression in prostate cancer is triggered by two different epigenetic mechanisms. *Gene*, 292-301.
- Ghai, S., & Haider, M. (2015). Multiparametric-MRI in diagnosis of prostate cancer. *IJU*, 194-201.
- Gleason, D. (1966). Classification of prostatic carcinoma. *Cancer Chemother Rep*, 125-128.

- Global Burden of Disease. (2016). *Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015* (Vol. 388). Lancet.
- Gopalan, A., Leversha, M. A., Gerald, W. L., & et.al. (2009). TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res*, 1400–1406.
- Gopalan, A., Leversha, M., & Gerald, W. (2009). TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res*, 1400-1406.
- Grafer, C., & Halvorson, L. (2013). Androgen receptor drives transcription of rat PACAP in gonadotrope cells. *Mol. Endocrinol.*, 1343-1356.
- Grino, P., Griffin, J., & Wilson, J. (1990). estosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*, 1165-1172.
- Hammermich, K. H., Ayala, G., & Weehler, T. (2009). *Prostate Cancer*. (H. H. Scardino, Ed.) Cambridge: Cambridge University Press.
- Handelsman, D. (16 de 12 de 2016). *Androgen Physiology, Pharmacology and Abuse*. Recuperado el 29 de 04 de 2018, de Endotext [Internet].: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279000/>
- Hannah, D., & Winberg, R. (03 de 2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.*, 144, 646-657.
- Hayward, S., & Cunha, G. (2000). THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. *Radiol Clin North Am*, 38(1), 1-8.
- He, J., Liu, X., & et.al. (2017). Sox2 inhibits Wnt- β -catenin signaling and metastatic potency of cisplatin-resistant lung adenocarcinoma cells. *Molecular Medical Reports*, 1693-1701.
- He, T., Sparks, A., Kinzler, K., & et.al. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* , 1509-1512.
- Heidenreich, A., Bastian, P., Bellmunt, J., Mottet, N., & et.al. (2014). EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent—Update 2013. *Eur Urol*, 124-137.
- Heinlein, J., & Chang, C. (2004). Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews*, 25(2), 276-308.
- Huggins, C., & Hodges, C. (1941). Studies on prostate cancer.1. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research*, 293-297.

- Humphrey, P. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*, 292-306.
- Hynes, P., & Fraher, J. (2004). The development of the male genitourinary system. I. The origin of the urorectal septum and the formation of the perineum. *Br J Plast Surg*, 57, 27-36.
- Institute of Medicine (U.S.). Committee on Cancer Control in Low- and Middle-Income Countries. (2007). *Cancer Control Opportunities in Low- and Middle-Income Countries*. (G. H. Sloan FA, Ed.) Washington D.C.: National Academies Press (US);
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística . (30 de Octubre de 2017). *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA DE MUERTOS" (2 DE NOVIEMBRE) DATOS NACIONALES*. Recuperado el 21 de 04 de 2018, de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2016). *Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas*. Retrieved 2016 йил 21-12 from Investigadores del CISP analizaron las tasas de mortalidad según el nivel de marginación de los 32 estados: <https://www.insp.mx/avisos/4189-cancer-prostata-mx.html>
- International Agency for Cancer Research. (2015). *GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence World Wide in 2012*. Retrieved 2016 йил 21-12 from Prostate Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp>
- James, N. (2014). Clinical features and diagnosis of prostate cancer. En N. James, *Primer on Prostate Cancer* (Vol. VIII, pág. 50). London: Springer.
- Joesting, M., Perrin, S., Marker, P., & et.al. (2005). Identification of SFRP1 as a Candidate Mediator of Stromal-to-Epithelial Signaling in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 10423-10430.
- Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Rec Prog Horm Res*, 379-418.
- Kapoor, A., & Hotte, S. (2016). Chemotherapy research for metastatic prostate cancer. *Can Urol Assoc J*, 140-143.
- Kawano, Y., & Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J cell Sci*, 2627-2634.
- Kawano, Y., Diez, S., Kypta, R., & et.al. (2009). Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *Br J Cancer*. , 1165-74.
- Kawano, Y., Diez, S., Uysal-Onganer, P., Darrington, R., Waxman, J., & Kypta, R. M. (2009). Secreted Frizzled-related protein-1 is a negative regulator of androgen receptor activity in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 100(7), 1165-1174.

- Koh, T., Bulitta, C., Wang, T., & et.al. (2000). Gastrin is a target of the beta-catenin/TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest.*, 533-539.
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 68-75.
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 68-75.
- Kormish, J., Sinner, D., & Zorn, A. (2010). Interactions between SOX factors and Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn*, 56-68.
- Lavergne, E., Musso, O., & et.al. (2012). Blocking Wnt signaling by SFRP-like molecules inhibits in vivo cell proliferation and tumor growth in cells carrying active β -catenin. *Oncogene*, 423-433.
- Lawrentschuk, N., & Perera, M. (14 de 04 de 2016). *Benign Prostate Disorders*. Recuperado el 19 de 04 de 2018, de Endotext (Internet): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279008/>
- Lee, J. J., Thomas, I.-C., Nolley, R., Ferrari, M., Brooks, J. D., & Leppert, J. T. (2015). Biologic Differences Between Peripheral and Transition Zone Prostate Cancer. *The Prostate*, 75(2), 183–190.
- Lee, K., & Piazza, A. (2017). The interaction between the Wnt/ β -catenin signaling cascade and PKG activation in cancer. *J Biomed Res*, 189–196.
- Leshem, O., Berger, R., & et.al. (2011). TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model. *PLoS One*, 1-12.
- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2⁻DDCT Method. *Methods. Elsevier Science*, 402-408.
- Logan, C., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 781-810.
- Lonergan, P., & Tindall, D. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog*, 10-20.
- Lopez-Ríos, J., Esteve, P., Ruiz, J., & Bovolenta, P. (2008). The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate. *Neural Dev*, 1-19.
- Ma, Y., Wu, K., Gong, Y., & et.al. (2014). Testosterone regulates keratin 33B expression in rat penis growth through androgen receptor signaling. *Asian J Androl.* , 817–823. .
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, C., & et.al. (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1603-1608.

- Mark, M., & Chambon, P. (1997). Homeobox Genes in Embryogenesis and Pathogenesis. *Nature. Pediatric Research*, 421-429.
- Mayo Foundation for Medical Education and Research. (01 de 01 de 2000). *MAYO CLINIC*. Recuperado el 23 de 04 de 2018, de Transrectal biopsy of the prostate: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/prostate-cancer/multimedia/transrectal-biopsy-of-the-prostate/img-20007929>
- McEwan, I., & Brinkmann, A. (12 de 06 de 2016). *Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders*. Recuperado el 29 de 04 de 2018, de Endotext [Internet].: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279028/>
- McGarty, T., & et.al. (2014). *ERG TMRSS2 and Prostate Cancer*. EU: White Paper.
- McNeal, J. (1981). The Zonal Anatomy of the Prostate. *The Prostate*, 2, 35-49.
- Medina, L., Herrera-Penilla, B., Brandan, M., & et.al. (2008 de 10 de 2008). Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 27(57), 1-11.
- Melkonyan, H. S., Chang, W. C., Shapiro, J. P., Umansky, S. R., & et.al. (1997). SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 13636-13641.
- Miller, G., & Torkko, K. (2001). Natural History of Prostate Cancer—Epidemiologic Considerations. *Epidem Rev*, 14-19.
- Montero, A., & Valero, V. (2005). Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lan Oncol*, 229-239.
- Murashima, A., Miyagama, S., Yamada, G., & et.al. (2011). Essential Roles of Androgen Signaling in Wolffian Duct Stabilization and Epididymal Cell Differentiation. *Endocrinology*, 1640–1651.
- Murillo, V., & Kypta, R. (2017). WNT signalling in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 1-14.
- Namiki, N., Ueno, S., & Kitagawa, Y. (2012). Role of hormonal therapy for prostate cancer: perspective from Japanese experiences. *Transl Androl Urol*, 160-172.
- Nantermet, P., Xu, J., Ray, W., & et.al. (2003). Identification of Genetic Pathways Activated by the Androgen Receptor during the Induction of Proliferation in the Ventral Prostate Gland. *J Biol Chem*, 1310-1322.
- National Cancer Institute. (2012). What You Need to Know About Prostate Cancer. En N. I. Health, *What You Need to Know About Prostate Cancer* (pág. 48). Maryland: NIH PUBLICATION.

- National Cancer Institute. (09 de 02 de 2015). *UNDERSTANDING CANCER*. Recuperado el 21 de 03 de 2018, de WHAT IS CANCER: www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer
- Nelson, P., Clegg, N., Lin, B., & et.al. (2003). The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 11890-11895.
- Nusse, R. (01 de 06 de 2017). *Wnt Target Genes*. Recuperado el 30 de 04 de 2018, de The Wnt homepage: http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes
- Perlmutter, M., & Lepor, H. (2007). Androgen Deprivation Therapy in the Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Rev Urol*, S3-S8.
- Pierce, G., & Speers, W. (1988). Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer Res*, 48(8), 1996-2004.
- Presner, J., Rubin, M., & Chinnaiyan, A. (2012). Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med*, 1-14.
- Prins, G., & Putz, O. (2008). Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, 641-659.
- ProstAID. (01 de 01 de 2018). *Stages of Prostate Cancer*. Recuperado el 23 de 04 de 2018, de ProstAID UK: http://www.prostaid.co.uk/?page_id=935
- PubMed Health. (30 de 03 de 2018). *Prostate Cancer Treatment (PDQ®)*. Recuperado el 24 de 04 de 2018, de PubMed Health: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032722/>
- Rathinavelu, A., & Levy, A. (2015). Key Genes in Prostate Cancer Progression: Role of MDM2, PTEN, and TMPRSS2-ERG Fusions. En R. Mohan, *Prostate Cancer - Leading-edge Diagnostic Procedures and Treatments* (págs. 179-195). EU: IntechOpen.
- Ross, T., Ahmed, K., Raison, N., & Dasgupta, P. (2016). Clarifying the PSA grey zone: The management of patients with a borderline PSA. *Int J Clin Pract*, 950-958.
- Rubin, M., & Demichelis, F. (2018). The Genomics of Prostate Cancer: emerging understanding with technologic advances. *Mod Path*, 1-11.
- Saini, S. (2016). PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol*, 97-106.
- Sansom, O., Reed, K., Clarke, A., & et.al. (2005). Cyclin D1 is not an immediate target of beta-catenin following Apc loss in the intestine. *J. Biol. Chem.*, 28463-28467.
- Schulte, G., & Brya, V. (2007). The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.*, 519-527.

- Schulz, W., Burchardt, M., & Cronauer, M. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Molec Hum Reprod*, 437–448.
- Selman, S. (2011). The McNeal Prostate: A Review. *Urology*, 78, 1224-1228.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (22 de 08 de 2001). *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Recuperado el 04 de 05 de 2018, de Diario Oficial de la Federación: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-062-zoo-1999>
- Shaikhibrahim, Z., Lindstrot, A., & Wernert, N. (2012). The peripheral zone of the prostate is more prone to tumor development than the transitional zone: Is the ETS Family the key? *Mol Med Rep*, 313-316.
- Stewart, B., & Kleihues, P. (2003). *World Cancer Report*. Lyon, France: IARC PRESS.
- Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, 1(2), 1-4.
- Suzuki, H., Gabrielson, E., Chen, W., Baylin, S., & et.al. (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Gen*, 141-149.
- Thaler, C., Vanderpuye, O., McIntyre, J., & Faulk, W. (1990). Lactoferrin binding molecules in human seminal plasma. *Biol Reprod*, 43(4), 712-717.
- The American Cancer Society . (18 de 12 de 2017). *Prostate Cancer Stages*. Recuperado el 23 de 04 de 2018, de American Cancer Society: <http://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>
- Toivanen, R., & Shen, M. (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell specification. *Development*, 1382-1398.
- Toivanen, R., & Shen, M. M. (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*, 144(8), 1382-1398.
- Tomlins, S., Rhodes, D., Kuefer, R., & et.al. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. . *Science*, 644-648.
- TRIzol™ Reagent User Guide. (09 de 11 de 2016). *Introvigen*. Recuperado el 05 de 05 de 2018, de ThermoFisher: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15596026>
- Villar, J., Tsai-Morris, C., & Dufau, M. (2012). Androgen-Induced Activation of Gonadotropin-Regulated Testicular RNA Helicase (GRTH/Ddx25) Transcription: Essential Role of a Nonclassical Androgen Response Element Half-Site. *Mol Cell Biol*, 1566–1580.

- Wang, Z., Wang, Y., Liang, H., & et.al. (2017). Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. *Mol Med Rep*, 5450–5458.
- White, N., Feng, F., & Maher, C. (2013). Recurrent Rearrangements in Prostate Cancer: Causes and Therapeutic Potential. *Curr Drug Targets*, 450-459.
- Wilson, J. D. (2011). The Critical Role of Androgens in Prostate Development. *Endocrinol Metab Clin*, 40, 577-590.
- World Health Organization. (01 de 01 de 2018). *Cancer*. Recuperado el 20 de 04 de 2018, de World Health Organization: <http://www.who.int/cancer/en/>
- Wright, K., Wilson, P., Kerr, J., Chenevix-Trench, G., & et.al. (1998). Frequent loss of heterozygosity and three critical regions on the short arm of chromosome 8 in ovarian adenocarcinomas. *Oncogene*, 1185-1188.
- Wu, L., Zhao, J., & Yu, J. (2013). ERG is a critical regulator of Wnt/LEF1 signaling in prostate cancer. *Cancer Res*, 6068-6079.
- Yihui, S., Biao, H., & Jablons, D. (2007). Roles of secreted frizzled-related proteins in cancer. *Acta Pharmacol Sin*, 1499-1504.
- Yu, J., Yu, J., Arul, C., & et.al. (2010). An Integrated Network of Androgen Receptor, Polycomb, andTMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression. *Cancer cell*, 443-454.
- Zang, X., Gaspard, J., & Chung, D. (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*, 6050-6054.
- Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 1461-1473.
- Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*, 305–311.
- Zhou, Z., Wang, J., Linder, S., & et.al. (1998). Up-regulation of human secreted frizzled homolog in apoptosis and its down-regulation in breast tumors. *Int. J. Cancer*, 95-99.