

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**“PAPEL DEL CANAL IÓNICO TRPM4 EN EL DESARROLLO
DEL CÁNCER DE PRÓSTATA EN UN MODELO MURINO
TRANSGÉNICO”**

PABLO FELIPE BÁEZ BENAVIDES

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN GENÉTICA**

**Directores de Tesis: Prof. Dr. Ricardo Armisen Yáñez
Prof. Dra. Katherine Marcelain**

2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

PABLO FELIPE BÁEZ BENAVIDES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 06 de Junio de 2013.

**Directores de Tesis: Prof. Dr. Ricardo Armisen Yáñez
Prof. Dra. Katherine Marcelain
ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Gonzalo Cabrera

Prof. Dr. Patricio González

Prof. Dr. Iván Gallegos

**Prof. Dra. Luisa Herrera
Presidente Comisión**

Agradecimientos

Los nombres de ustedes merecen un espacio en esta tesis, sin sus pequeñas o grandes contribuciones este trabajo no habría sido posible:

Dr. Ricardo Armisen	Iván Contreras
Dra. Katherine Marcelain	Cristóbal Muñoz
Dr. Andrés Stutzin	Dr. Carlos González
Tamara Hermosilla	Eduardo Landerer
Eduardo Sagredo	Pablo Cid
Alfredo Sagredo	Dra. Juana Pincheira
Heidi Pérez	Dra. Patricia Iturra

Al Dr. Ricardo Armisen y a la Dra. Katherine Marcelain, gracias por todo su apoyo laboral, por compartir conmigo en la academia y especialmente por su amistad incondicional. A la comisión de tesis: Dra. Herrera, Dr. Gonzales, Dr. Cabrera, Dr. Gallegos, gracias por sus observaciones y aportes. Gracias a los amigos que siempre están. A mi familia en Chile y en Colombia, gracias por su constante apoyo. A Lina, gracias por ser mi fuerza y mi soporte.

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Fisiopatología Molecular del Programa de Fisiopatología del Instituto de Ciencias Biomédicas y del Centro de Estudios Moleculares de la Célula. Las fuentes de financiamiento fueron el Proyecto FONDAP “Centro de Estudios Moleculares de la Célula” y el Proyecto FONDECYT regular # 1120286.

Índice

1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
3.1. Aspectos epidemiológicos y clínicos del cáncer de próstata	5
3.2. Cambios moleculares del Cáncer de próstata	8
3.3. Canales iónicos TRP y cáncer de próstata	10
3.4. El modelo murino TRAMP	16
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	22
5.1. Objetivo general	22
5.2. Objetivos específicos	22
6. Materiales y Métodos	23
6.1. Animales	23
6.2. Extracción de RNA	24
6.3. Síntesis de cDNA	24
6.4. q-PCR	25
6.5. Análisis histopatológico completo	26
6.5.1. Próstatas	26
6.5.2. Pulmones	26
6.5.3. Procedimientos de anatomía patológica	26
6.6. Análisis de los datos y expresión de resultados	27
6.7. Análisis estadístico	29
7. Resultados	31
7.1. Evaluación histopatológica del efecto de hTRPM4 Δ_{1-177} en TRAMP	31
7.1.1. Histología prostática	31
7.1.2. Histología pulmonar	34
7.2. Efecto de hTRPM4 Δ_{1-177} sobre la proliferación celular en próstatas de ratones dobles transgénicos TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 Δ_{1-177} ^(+/-)	35
7.3. Efecto de hTRPM4 Δ_{1-177} sobre la actividad de la vía de β -catenina y algunos de sus genes blancos en el lóbulo dorsolateral del modelo TRAMP.	37
8. Discusión	41
9. Conclusiones	53
10. Bibliografía	54

Índice de figuras

Figura 1. Estructura monomérica y topología de la proteína TRPM4.	11
Figura 2. Niveles de expresión de TRPM4 en CaP humano.	12
Figura 3. Relación de los niveles de expresión de TRPM4 con la Escala de Gleason y el Grado de Gleason.	13
Figura 4. Representación esquemática de la forma truncada de TRPM4 (ΔN -TRPM4) y su transgen.	16
Figura 5. Vía de progresión del cáncer de próstata.	17
Figura 6. Niveles de mRNA de <i>Trpm4</i> en el lóbulo prostático dorsolateral de ratones TRAMP ^(+/-) respecto a ratones silvestres (WT).	20
Figura 7. Número de animales incluidos en el estudio discriminados por genotipo, edad de sacrificio y destino.	23
Figura 8. Análisis de la integridad de los mRNAs mediante electroforesis en gel de agarosa.	24
Figura 9. Diferencias en la positividad del marcador de proliferación celular PCNA entre ratones TRAMP ^(+/-) y TRAMP ^(-/-) .	30
Figura 10. Diferencias en la frecuencia de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) en los modelos TRAMP ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) .	32
Figura 11. Score de lesión total y microfotografías de las lesiones en los ratones TRAMP ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) .	33
Figura 12. Score de lesión total y microfotografías de las lesiones en los ratones TRAMP ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) .	33
Figura 13. Ausencia de focos metastásicos en cortes histológicos de pulmón de ratones TRAMP ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) .	34
Figura 14. Arquitectura y citología de los nódulos linfáticos de ratones TRAMP ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) .	35
Figura 15. Peso del aparato genitourinario (AGU) y diferencias en la positividad del marcador de proliferación PCNA en los ratones TRAMP ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) .	36
Figura 16. Análisis de los niveles de expresión de Ciclina D1, Survivin y E-Cadherina en el lóbulo prostático dorsolateral de ratones TRAMP ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) .	38
Figura 17. Análisis de los niveles de expresión de <i>Snai2</i> y <i>Zeb1</i> en el lóbulo prostático dorsolateral de ratones TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) .	39
Figura 18. Análisis de los niveles de expresión de <i>Vim</i> en el lóbulo prostático dorsolateral, de ratones TRAMP ^(+/-) /hTRPM4 _{$\Delta 1-177$} ^(+/-) y TRAMP ^(+/-) .	40

Índice de tablas

Tabla 1. *Partidores utilizados en las PCR convencionales y en tiempo real.* _____ 25

Tabla 2. *Determinación del Score ajustado de lesión con base en el su grado y distribución.* _____ 28

1. Resumen

Estudios recientes demuestran aumentos significativos en la expresión del canal TRPM4 (*Transient Receptor Potential Melastatin 4*) en cáncer de próstata (CaP). En líneas celulares se ha descrito que TRPM4 aumenta la proliferación a través de la activación, mediada por β -catenina, de genes pro-oncogénicos como *ciclina D1* y *survivina*, y la supresión de la expresión de *E-cadherina*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un transgen dominante negativo de TRPM4 (hTRPM4 Δ_{1-177}) en un modelo murino de cáncer de próstata denominado TRAMP. Se evaluaron histopatológicamente cortes de próstatas y pulmones de ratones TRAMP^(+/-) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} ^(+/-), teñidos con hematoxilina-eosina. Los niveles prostáticos de PCNA se cuantificaron en cortes inmunoteñidos. Los niveles de mRNA de los genes *Cdh1*, *Ccnd1*, *Zeb1*, *Birc5*, *Snai2* y *Vim* en el lóbulo prostático dorsolateral se cuantificaron mediante q-PCR. No se observaron diferencias significativas a nivel histológico entre los ratones TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} ^(+/-) y TRAMP^(+/-). Las diferencias de los valores de positividad anti-PCNA demuestran que a las 12 semanas de edad existe un grado menor de proliferación en los lóbulos dorsal y lateral de los ratones TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} ^(+/-). A las 32 semanas, el 16% de los animales TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} ^(+/-) presentaban metástasis ganglionar, frente a un 40% de los animales TRAMP^(+/-). En cuanto a los niveles de expresión génica de *Ccnd1*, *Birc5*, *Snai2*, *Cdh1* y *Vim*, se observaron tendencias (estadísticamente no significativas) en un patrón que podría sugerir un efecto antineoplásico en los ratones TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} ^(+/-) frente a TRAMP^(+/-). En conjunto, nuestros resultados sugieren que el dominante negativo de hTRPM4 Δ_{1-177}

en este modelo *in vivo* tuvo un efecto antitumoral, probablemente involucrando proteínas de la vía de WNT/ β -catenina, lo cual fue evidente en términos de la reducción de la capacidad proliferativa. Con respecto al mecanismo subyacente, el análisis de los niveles de expresión de genes blanco de la vía WNT/ β -catenina en TRAMP^(+/-)/hTRPM4 $_{\Delta 1-177}$ ^(+/-) muestran una tendencia a una reducción en la expresión de genes que contribuyen al fenotipo hiperproliferativo y metastásico como: *Ccnd1*, *Birc5* y *Snai2*, y un incremento en la expresión de *Cdh1*. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permiten postular al canal Trpm4 como un posible blanco terapéutico para el cáncer de próstata. Se necesitan más estudios para continuar el avance en esta dirección.

2. Abstract

Recent studies show significant increase in TRPM4 (transient receptor potential melastatin 4) channel expression in prostate cancer (CaP). In cell lines has been reported that TRPM4 increase the proliferation through activation of pro-oncogenic genes as *Cyclin D1* and *Survivin* and suppression of expression of *E-cadherin* through β -catenin activation. The aim of this study was to evaluate the effect of a dominant negative TRPM4 transgene (hTRPM4 Δ_{1-177}) in TRAMP mouse, a model of prostate cancer. Prostate and lung slices of TRAMP^(+/-) and TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} mice were evaluated histopathologically with hematoxylin-eosin staining. Prostatic levels of PCNA were quantified in immunostained sections. The mRNA levels of *Cdh1*, *Ccnd1*, *Zeb1*, *Birc5*, *Snai2* and *Vim* genes in the dorsolateral prostate lobe were quantified by q-PCR. No differences were observed by histological analysis between TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} and TRAMP^(+/-) mice. The difference of positivity anti-PCNA values shows that at 12 weeks of age there is a lower degree of proliferation in the dorsal and lateral lobes of TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} mice compared with TRAMP^(+/-). At 32 weeks, 16% of TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} animals had nodal metastases, compared with 40% of TRAMP^(+/-). When gene expression levels of markers related to proliferation and tumoral invasion as *Ccnd1*, *Birc5*, *Snai2*, *Cdh1* and *Vim* were analyzed, was observed a trend in a pattern suggesting an antineoplastic effect in TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} against TRAMP^(+/-). The absence of histological differences between TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} and TRAMP^(+/-) shows that development and neoplastic progression in this analysis is the same in both groups; nevertheless, our results suggest that the dominant negative effect of

hTRPM4_{Δ1-177} in this *in vivo* model triggers an antitumor activity, probably involving the WNT/β-catenin pathway. This was evident in terms of the reduced proliferative capacity. Regarding the underlying mechanism, the expression levels analysis of target genes in the WNT/β-catenin pathway in TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) suggest an increased expression of *Cdh1* and a reduction in the expression of genes that contribute to metastatic and hyperproliferative phenotype, such as *Ccnd1*, *Birc5* and *Snai2*. The results obtained in this thesis work permit postulate the TRPM4 channel as a potential therapeutic target for prostate cancer. More studies are needed to move forward in this direction.

3. Introducción

3.1. Aspectos epidemiológicos y clínicos del cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CaP) es una enfermedad oncológica clínicamente caracterizada por un largo periodo de latencia y un crecimiento tumoral lento, razón por la cual muchos de los pacientes son asintomáticos, especialmente en etapas tempranas de la enfermedad [1]. En los casos avanzados del CaP, sin embargo, pueden encontrarse algunos síntomas como flujo urinario débil, urgencia urinaria, sensación de vaciado incompleto y aumento en la frecuencia urinaria, síntomas que también se relacionan con hiperplasia prostática benigna (HPB) y disfunción eréctil, dolor de pelvis, espalda o caderas, los cuales no siempre son sugestivos de CaP y se pueden deber a otras enfermedades [2]. Cuando se derivan del desarrollo y la progresión del CaP, estos síntomas son resultado del incremento en el tamaño tumoral y la progresión a un estado metastásico, en cuyo caso el examen del tacto rectal evidencia anomalías sugestivas de un grado avanzado de la enfermedad.

La latencia prolongada ha hecho de esta enfermedad un candidato ideal para desarrollar estrategias diagnósticas en estadios curativos tempranos [1]. Las dos décadas pasadas marcaron un hito en este aspecto con la implementación de la medición de los niveles séricos del antígeno prostático específico (PSA) como prueba de cribado. En Estados Unidos y otros países desarrollados, su implementación ha elevado significativamente la incidencia en los casos de CaP detectados, lo cual se traduce en medidas preventivas y tratamientos tempranos para los pacientes. No obstante, esta herramienta diagnóstica carece de capacidad discriminatoria entre pacientes con enfermedad letal y aquellos portadores de estadios no letales de la enferme-

dad, en otras palabras, genera un sobre-diagnóstico que se estima oscila entre 60-93% [3]. Éste se constituye en uno de los problemas diagnósticos más importantes de la actualidad, pues los pacientes sobrediagnosticados con CaP son sometidos a un tratamiento que no solo es innecesario y molesto para el paciente, sino que acarrea grandes costos económicos.

En cuanto a su epidemiología, el CaP continúa como un problema de gran importancia para la salud pública. En la actualidad, es el segundo cáncer más frecuentemente diagnosticado y corresponde a la sexta causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo [4]. Su incidencia varía ampliamente en el contexto internacional, con las tasas más altas en Norte América, Australia y Europa Central, y las más bajas en el sudeste y centro-sur de Asia y el norte de África [5]. Estas variaciones se deben fundamentalmente a diferencias en las tasas de detección de CaP, la exposición a condiciones medioambientales diferentes y a la variación genética [6].

En Chile, la mortalidad ha aumentado progresivamente en los últimos años, llegando a 17,4 por 100.000 habitantes en 2002 y constituyendo la tercera causa de muerte por cáncer en los hombres, con aproximadamente 1.200 muertes anuales. La incidencia de la enfermedad es desconocida, pero se ha estimado entre 55 y 57 por 100.000 habitantes en los últimos años [7].

Entre los factores de riesgo a considerar se encuentran especialmente la edad, la raza y los antecedentes familiares:

- Edad: La edad avanzada es el principal factor de riesgo; 75% de los casos de cáncer de próstata son diagnosticados en hombres mayores de 65 años, mientras que en hombres menores de 40 años es un hallazgo poco

frecuente [8]. De igual forma, las muertes relacionadas con este cáncer son más comunes en hombres de edad avanzada.

- El segundo factor de riesgo en importancia es el componente étnico-racial: se ha establecido que en comparación con blancos caucasianos, los afroamericanos poseen un riesgo 60% mayor de CaP, mientras los asiático-americanos poseen un riesgo 38% menor. La explicación a tales diferencias permanece por elucidarse [9].

- Antecedentes familiares: La noción de que el CaP tiene un fuerte componente familiar está sustentada en numerosos estudios epidemiológicos [10-14]. Se ha documentado que los hermanos e hijos de un paciente con cáncer de próstata tienen un riesgo dos a tres veces mayor de desarrollar la enfermedad que el esperado para su edad, etnia y localización geográfica [15]. Adicionalmente, el riesgo de padecer CaP incrementa de acuerdo con el número de miembros de la familia igualmente afectados.

Otros posibles factores de riesgo son el alto consumo de grasas saturadas, la baja ingesta de carotenoides, la vasectomía, las infecciones de transmisión sexual y los altos niveles de andrógeno sérico; no obstante, en muchos casos los resultados encontrados en estos estudios son contradictorios [16].

El origen multifactorial de esta enfermedad ha impedido la identificación de alguna intervención efectiva para su prevención primaria [7], lo cual se constituye en uno de los principales retos sanitarios, con el fin de reducir el impacto personal, social y económico que genera [17].

3.2. Cambios moleculares del Cáncer de próstata

En general, las neoplasias son causadas por diversas mutaciones en varios genes, que conducen a la desregulación del ciclo celular, diferenciación, apoptosis y migración, entre otros procesos celulares fundamentales. En este sentido, el cáncer de próstata es un tipo tumoral complejo; aunque se han identificado diversas alteraciones moleculares, los mecanismos del desarrollo y la progresión del cáncer en sus diversas etapas son aún poco comprendidos. La explicación a esta situación radica en la gran heterogeneidad tanto clínica como molecular del CaP [18]. Es por ello, que los esfuerzos actuales se concentran en el establecimiento de una colección de subtipos homogéneos e identificables con base en un criterio molecular [19], lo cual permitirá a futuro el desarrollo de adecuadas herramientas diagnósticas, pronósticas y de tratamiento. Uno de los enfoques utilizados, con dicho fin, es el estudio de los niveles de expresión de genes relacionados con el CaP. De esta manera, se ha logrado tipificar patrones de expresión que se correlacionan con las etapas del cáncer (desarrollo, progresión, metástasis) e incluso con la evolución clínica y el tratamiento [20-22].

Algunos estudios, por ejemplo, han descrito como eventos primarios en el desarrollo del CaP, la alteración en los niveles de expresión de los genes que codifican la Glutathion S-Transferasa P1 (*GSTP1*) [23-25] y la alfa-metil coenzima-A race-masa (*AMACR*) [26, 27]. La baja expresión del gen *GTSP1* en el cáncer de próstata se debe a la hipermetilación de su región promotora, hallazgo observado en por lo menos el 90% de los tumores y aproximadamente el 70% de las neoplasias intraepi-theliales prostáticas (PIN) [28]. El gen *AMACR*, por su parte, se ha encontrado sobre-

expresado en PIN y otras lesiones atróficas consideradas precancerosas, mientras que un 88% de los tumores prostáticos presentan esta alteración [29].

Como evento de progresión, en aproximadamente 40% de los CaP se ha observado sobreexpresión del gen del receptor activado por proteasas 2 (*PAR-2*), [30]; adicionalmente, parece estar involucrado en el proceso metastásico [31]. Por su parte, los genes que codifican para la hepsin serina proteasa (*TMPRSS1*), la kinasa PIM1 (*PIM1*) [32], el inhibidor de la tripsina secretoria pancreática (*SPINK1*) [33] y la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (*PTEN*) se relacionan con parámetros clínicos del CaP. Por ejemplo, el gen *PTEN*, un reconocido supresor tumoral que con frecuencia está inactivado en diversos tipos de neoplasias, se relaciona con fenotipos más agresivos del CaP [34], como lo son grados Gleason superiores a 7 [35], pronóstico pobre, potencial metastásico y recaída [36].

En los últimos años, con el uso de tecnologías como los microarreglos de cDNA, los cuales permiten estudiar la expresión génica a gran escala, se han hecho grandes progresos en la identificación de genes con niveles de expresión alterados en cáncer. De especial interés resultan los cambios observados en la expresión de varios canales iónicos [37-39], pues aunque éstos no han sido descritos como supresores tumorales ni oncoproteínas, son importantes en procesos celulares fundamentales para la homeostasis tisular, como por ejemplo los controles de proliferación, diferenciación y apoptosis, los cuales guardan una estrecha relación con el desarrollo y la progresión tumoral [40].

Además, el flujo de iones a través de estos canales define propiedades fundamentales en el fenotipo normal de una célula, como su volumen y potencial de membrana [18], aspectos que a su vez intervienen en eventos de señalización

intracelular y activación de respuestas moleculares [41]. En este sentido, los canales que transportan y/o son sensibles al ion Ca^{2+} tienen una gran importancia, pues éste no sólo es el ion universal de señalización, sino que además es uno de los reguladores cruciales de la migración celular [42], por lo que puede estar involucrado en el proceso metastásico.

3.3. Canales iónicos TRP y cáncer de próstata

Varios miembros de la superfamilia de canales *transient receptor potential* (TRP) han sido implicados en cáncer [42, 43]. Esta familia consiste en 28 canales permeables a cationes, los cuales comparten un alto grado de homología estructural y se expresan ubicuamente en el humano [44]. Su selectividad frente a diversos cationes varía ampliamente entre los diferentes miembros de la familia [45]. Debido a esas dos características fundamentales, la alteración en estos canales se ha relacionado a diversas enfermedades [46-49].

En las neoplasias, las mutaciones en este tipo de genes no constituyen un evento frecuente; sin embargo, se ha observado alteración en sus niveles de expresión dependiendo del tipo de cáncer y las etapas del mismo [18]. En cáncer gástrico y de esófago, por ejemplo, hay sobreexpresión de TRPC6 [50, 51], mientras que en cáncer de ovario se sobre-expresa TRPC3 [52]. En ambos ejemplos, estos canales promueven la proliferación celular como mecanismo de progresión tumoral.

En CaP se ha observado una expresión anormal de TRPV6, TRPC4 y TRPC1, lo cual se relaciona con un incremento en el influjo de Ca^{2+} , resistencia a la apoptosis e incremento en la proliferación celular [53]. Por su parte, el canal TRPM4 (Transient Receptor Potential Melastatin 4) también ha despertado un reciente interés. Es una proteína con seis dominios de transmembrana, sus extremos amino y carboxilo se

ubican en el lado intracelular de la membrana y su forma funcional está constituida por homotetrámeros (Figura 1). Es un canal con permeabilidad no selectiva a cationes monovalentes y a diferencia del resto de los canales de su familia (salvo TRPM5), es impermeable al Ca^{2+} [54]. No obstante, este ion regula positivamente la actividad de dicho canal y por ello se ha propuesto que TRPM4 controla el potencial de membrana de las células y, en consecuencia, la fuerza electromotriz (*driving force*) y la magnitud del influjo de Ca^{2+} en células no excitables, lo que genera un fuerte impacto en la fisiología celular [55]. El incremento en sus niveles de expresión ha sido observado en cáncer cervicouterino [56], linfoma no Hodgkin de células B grandes [57] y cáncer prostático [58-60].

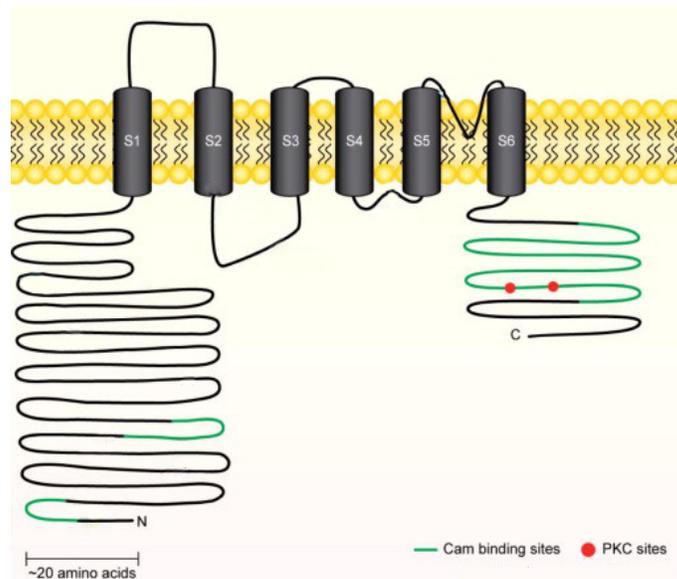


Figura 1. Estructura monomérica y topología de la proteína TRPM4. La formación del poro del canal iónico funcional requiere la homotetramerización de la proteína. Se muestran los sitios de unión a calmodulina (segmentos verdes) y proteína quinasa C (PKC) (círculos rojos) (S1-S6: Segmentos transmembrana del canal TRPM4). Tomada y modificada de [61].

El análisis de una cohorte de dominio público (Oncomine) compuesta por seis estudios de microarreglos de cDNA de CaP, reveló que cinco de los estudios presentaban un incremento significativo en los niveles de expresión de *TRPM4*

($p < 0.05$) en comparación con controles normales (Armisen et al., datos no publicados). Al realizar el meta-análisis de los cinco estudios (que comprendían un total de 62 muestras de controles y 162 muestras de pacientes con CaP) se observó una sobreexpresión de 3.6 veces (media) y un "gen rank" de 86 con un valor de $p < 4.2 \times 10^{-7}$ (Figura 2A). En virtud de complementar estos datos, se realizó un segundo estudio en la cohorte comercial "Tissue Scan Prostate Cancer II" (Origene), compuesta por 48 muestras de cDNA de próstata (ocho muestras control y 40 muestras de cáncer de próstata); mediante PCR cuantitativo, se analizó la expresión de *TRPM4* y se observó una sobreexpresión de 3.5 veces en las muestras de CaP frente a las muestras control (Valor de $P < 0.0113$, prueba Mann Whitney de dos colas, Figura 2B).

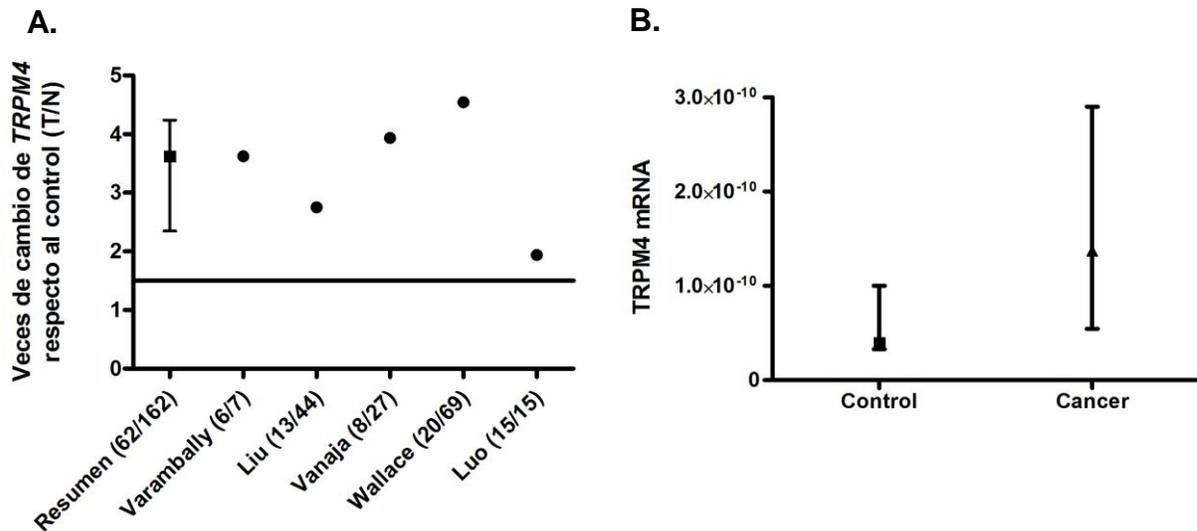


Figura 2. Niveles de expresión de TRPM4 en CaP humano. A. Metanálisis de la expresión de mRNA de TRPM4 en cinco de seis estudios de microarreglos registrados en la base de datos de Oncomine. ($p < 0.05$, veces de cambio respecto al control > 1.5). **B.** Diferencia en los niveles de expresión génica de TRPM4 en cáncer de próstata y tejido sano, determinados por q-PCR en una cohorte comercial "Tissue Scan Prostate Cancer II" de Origene. Los datos se presentan como la media \pm RIQ de los niveles de cDNA de TRPM4 normalizados respecto a β -actina. ($p < 0.0113$)

Al analizar la información completa de la anatomía patológica de las próstatas

de estos pacientes, incluyendo puntaje Gleason, etapificación (TNM) y estadio de la enfermedad, se encontró que en los pacientes con *score* Gleason >7 o Gleason de alto grado (4+3, 5+3, 4+4, 4+5, 5+5, 5+5) los niveles de *TRPM4* se encontraban significativamente elevados (Prueba de Kruskal-Wallis seguido de prueba de comparación múltiple de Dunn's, ambos $p < 0.05$, Figura 3 A y B). Esto sugiere que la expresión (o función) de *TRPM4* podría, por una parte, participar en los mecanismos biológicos que explicarían la progresión de la enfermedad y por otra, ser utilizado como marcador pronóstico en la práctica clínica.

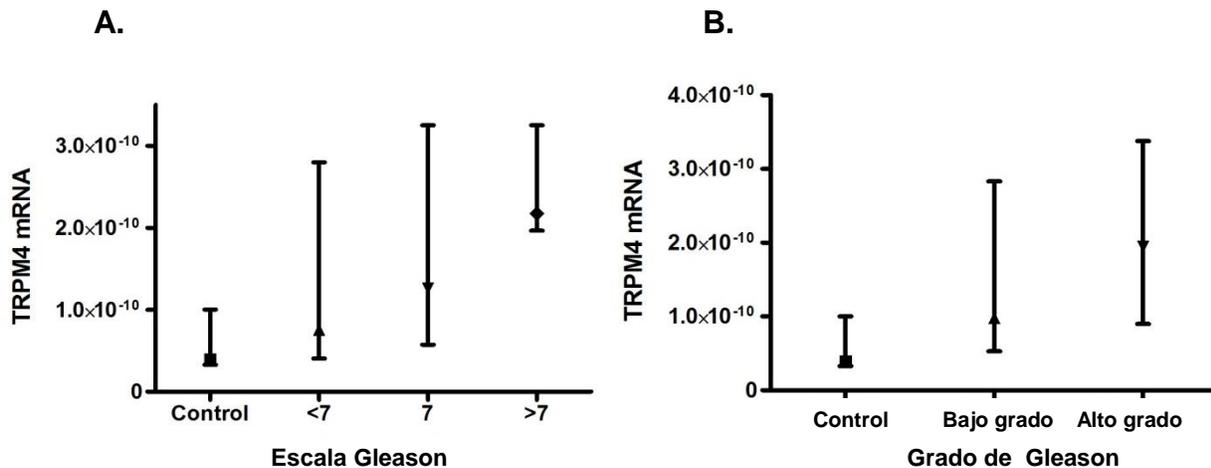


Figura 3. Relación de los niveles de expresión de *TRPM4* con (A) la Escala de Gleason y (B) el Grado de Gleason. Análisis de una cohorte comercial "Tissue Scan Prostate Cancer II" de Origene. Los datos se presentan como la media ± RIQ de los niveles de cDNA de *TRPM4* normalizados respecto a β -actina. (Prueba de Kruskal-Wallis seguido de prueba de comparación múltiple de Dunn's, ambos $p < 0.05$).

En cuanto a los mecanismos moleculares involucrados en la progresión neoplásica, estudios recientes han señalado que *TRPM4* podría ser importante para la capacidad proliferativa en líneas celulares derivadas de tumores, mediante el favorecimiento de la estabilización y traslocación nuclear del oncogén β -catenina (*CTNNB1*), la activación de la expresión de genes prooncogénicos como *ciclina D1*

(*CCND1*), *survivina* (*BIRC5*) y la supresión de la expresión de *E-cadherina* (*CDH1*) [55].

Armisen et al. demostraron en células HeLa que la disminución de los niveles de expresión de *TRPM4* mediante el uso de un RNA interferente de tipo horquilla pequeña o shRNA (siglas en inglés de *short hairpin RNA*), disminuía los niveles de expresión de β -catenina y sus genes blanco *ciclina D1* y *survivina*, mientras que aumentaban los niveles de *E-cadherina* [55]. Estos hallazgos son relevantes, pues β -catenina es una proteína que ejerce funciones importantes tanto de adhesión celular como de regulador transcripcional [62]. Por ello, su distribución subcelular es variable, se encuentra principalmente en la membrana celular en donde se asocia a la región citoplásmica de E-cadherina, y una pequeña fracción se localiza en el núcleo y citoplasma, en cuyo caso participa en la vía de señalización Wnt. En este sentido, en un modelo murino se ha demostrado que la activación de la vía Wnt/ β -catenina posee un rol importante en la progresión del CaP [63] y probablemente favorece el comportamiento invasivo y metastásico del tumor [64]. Todo esto se sustenta en el papel de β -catenina como cofactor transcripcional en la síntesis de las proteínas “homeobox unida a dedos de zinc E-Box” y “dedo de zinc Snai2” codificadas por los genes *ZEB1* y *SNAI2*, respectivamente. Dichas proteínas están involucradas en el programa de transición epitelio-mesénquima (EMT), habitualmente relacionado con el desarrollo embrionario, y que se activa en procesos similares durante el desarrollo de carcinomas invasivos. Tanto ZEB1 como SNAI2 actúan como represores de la transcripción de E-Cadherina, proteína transmembrana involucrada en la adhesión celular, de forma que favorece el proceso de EMT [65, 66].

La proteína ciclina D1, por su parte, promueve la transición de la fase G₁ a S del ciclo celular, mientras que la survivina es una proteína involucrada en la progresión mitótica y en la inhibición de la apoptosis. Por lo tanto, el patrón de los niveles de expresión de estos genes, observado en estas células, refleja que la ausencia de TRPM4 podría influir negativamente en la progresión mitótica, la tasa de proliferación celular, el potencial migratorio y la metástasis. No obstante, hasta el momento no se ha utilizado modelo *in vivo* alguno con el fin de demostrar esta y otras hipótesis.

Precisamente, con el objetivo de esclarecer el papel de *TRPM4* en un modelo *in vivo*, se ha desarrollado (en colaboración con Centro de Estudios Científicos de Valdivia) un ratón transgénico que mediante el promotor del gen Probasin (*Pbsn*) expresa específicamente en la próstata una forma truncada de TRPM4 que carece del dominio intracelular amino terminal (hTRPM4 Δ_{1-177}) y que tiene un efecto dominante negativo sobre la actividad del canal iónico TRPM4 endógeno (Figura 4). El efecto de hTRPM4 Δ_{1-177} ha sido descrito anteriormente [67] y se ha utilizado en diversos modelos celulares [68-70]. De esta manera, el ratón hTRPM4 $\Delta_{1-177}^{(+/-)}$ permitirá evaluar el efecto de la ausencia de función de este canal en el desarrollo y progresión tumoral. Para ello, en este trabajo se realizaron cruces dirigidas entre el modelo hTRPM4 $\Delta_{1-177}^{(+/-)}$ y un modelo denominado TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate) que desarrolla CaP.

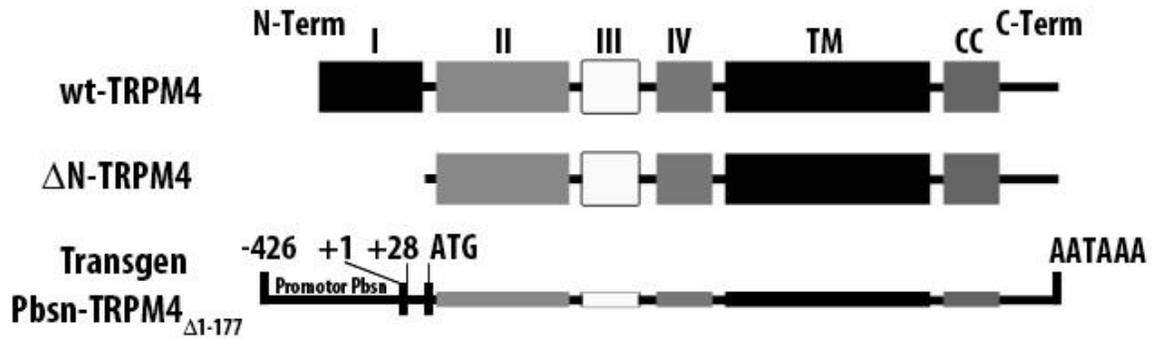


Figura 4. Representación esquemática de la forma truncada de TRPM4 (ΔN -TRPM4) y su transgen. La forma silvestre de TRPM4 (wt-TRPM4) posee cuatro dominios únicos o de homología (I-IV), seis dominios transmembrana (TM) y un dominio coiled-coil (CC). La proteína ΔN -TRPM4 carece de los aminoácidos 1 a 177 del extremo amino terminal (N-Term) y la regulación transcripcional de su transgen está bajo el control de la región promotora del gen Probasin (Pbsn) (nucleótidos -426 a +28). Modificada de [67].

3.4. El modelo murino TRAMP

Bostwick y Brawer describieron a nivel histológico un modelo secuencial de la patogénesis en el epitelio prostático humano [71]. En este modelo se describen las distintas etapas del CaP, desde la hiperplasia atípica, una lesión temprana comúnmente encontrada, hasta la enfermedad metastásica presente en hueso, pulmón e hígado, observada en etapas avanzadas de la enfermedad [72]. En las etapas tempranas se evidencian algunas lesiones inflamatorias, hiperplásicas e hiperproliferativas que se cree son precursoras del CaP. Posteriormente, en el cáncer temprano, se observa la estratificación y el hacinamiento celular, con una irregularidad o discontinuidad de la capa de células basales, etapa conocida como PIN. En hombres mayores de 45 años estas lesiones son bastante comunes; sin embargo, en la gran mayoría de los casos, las lesiones no progresan a tumores clínicamente detectables [72]. Posteriormente, la próstata afectada puede desarrollar un carcinoma *in situ*, no invasivo, comúnmente conocido como neoplasia intraepitelial

prostática de alto grado, que se cree es el precursor del adenocarcinoma localmente invasivo [73]. Finalmente, ocurre la invasión y la metástasis [71] (Figura 5).

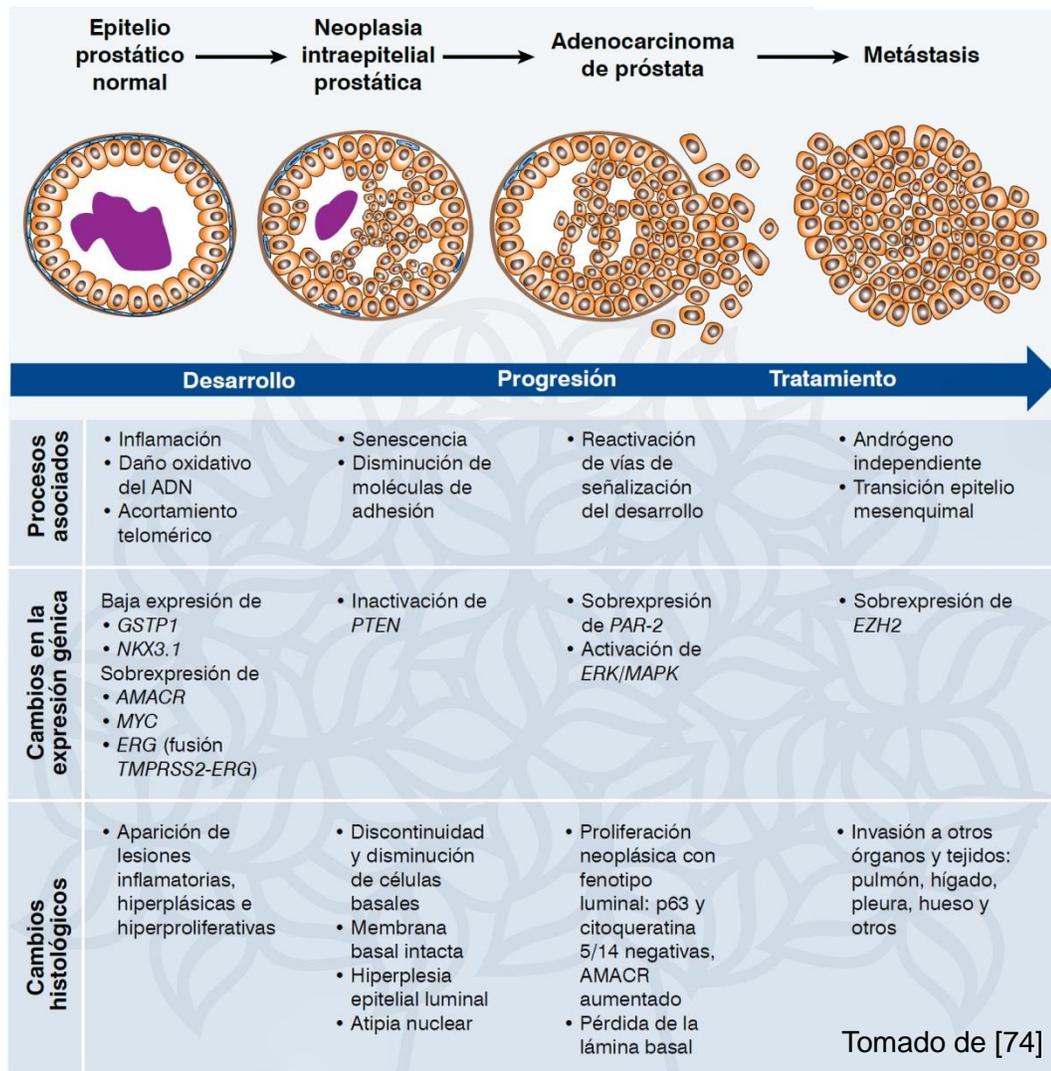


Figura 5. Vía de progresión del cáncer de próstata. Los cambios histopatológicos se correlacionan en cada etapa con procesos moleculares y con alteraciones en vías génicas importantes (Tomado de [74]).

Basado en un análisis histológico similar, se puede establecer el estadio patológico tumoral, mediante un sistema denominado el score Gleason. Este sistema evalúa la arquitectura histológica a un bajo aumento óptico, con el fin de identificar los dos patrones glandulares más frecuentes y asignarles valores de 1 a 5, según el

grado de diferenciación, y cuya suma da un *score* definitivo de 2 a 10. En la actualidad, este sistema se utiliza ampliamente como un indicador pronóstico del CaP [75].

El conocimiento histopatológico a profundidad de cada una de estas etapas del desarrollo y progresión tumoral, ha sido importante en el desarrollo de modelos murinos transgénicos que recrean, en la medida de lo posible, las lesiones secuenciales del proceso de transformación que sufren las células epiteliales prostáticas en el ser humano durante el desarrollo y la progresión del CaP.

En este sentido, el modelo TRAMP es quizá el de mayor importancia en el campo investigativo. Desde el punto de vista molecular, este modelo se basa en el uso del promotor próstata-específico del gen Probasin (*Pbsn*), el cual es regulado hormonalmente por andrógenos para generar la sobreexpresión de los antígenos T grande y t pequeño del virus SV40 [76]; en consecuencia, su expresión se correlaciona con la madurez sexual. El antígeno T grande tiene la capacidad de unirse a supresores tumorales importantes como p53 y pRb (retinoblastoma 1), conduciendo a inestabilidad genómica y afectando el ciclo celular; el antígeno t pequeño actúa inhibiendo la proteína fosfatasa 2A (PP2A) promoviendo así la activación de rutas de transducción de señales mitogénicas y la supervivencia celular tumoral [77]. La alteración de estas vías moleculares y procesos celulares fundamentales resulta en el desarrollo progresivo del CaP.

En la actualidad, el ratón TRAMP ha llegado a ser considerado el modelo mejor caracterizado de CaP. Esto se debe fundamentalmente a tres de sus propiedades: fue el primer modelo con capacidad para desarrollar tumores espontáneos gracias a la capacidad de inducir expresión de su transgen de manera específica en la próstata

[72]. Segundo, simula de manera muy próxima las etapas que cursa esta neoplasia en el humano [78]: se observa hiperplasia prostática a las 10 semanas de edad [79], el adenocarcinoma empieza a las 18 y está completamente desarrollado a las 24 semanas [79], posteriormente desarrolla metástasis a los ganglios linfáticos, pulmones y ocasionalmente a huesos o riñones. Tercero; tiene la capacidad de desarrollar un fenotipo andrógeno-independiente tras su castración a las 12 semanas [80].

Este modelo se ha usado en diversos estudios sobre el papel de varias moléculas en el desarrollo y progreso del CaP. Hafeez B. et al. por ejemplo, publicaron recientemente la primera evidencia genética *in vivo* de que la proteína kinasa C epsilon ($PKC\epsilon$) es esencial en los procesos de desarrollo y metástasis del CaP, los cuales se inhiben luego de la delección del gen $PKC\epsilon$ en el modelo murino [81].

También se ha estudiado la importancia de β -catenina en la carcinogénesis prostática del modelo TRAMP. Mediante el suministro de dosis establecidas de apigenina, un flavonoide de origen natural, se observó una disminución significativa en el volumen prostático y se eliminó completamente la presencia de metástasis a los ganglios linfáticos, pulmones e hígado de los ratones TRAMP a las 20 semanas, mientras que el suministro de este flavonoide por encima de las 50 semanas, demostró mejorar significativamente la supervivencia. Todos estos efectos estarían mediados, al menos en parte, por la inhibición de la señalización de β -catenina [82].

En cuanto a los niveles de mRNA de *Trpm4* en este modelo murino, nuestros estudios demuestran que dicho canal iónico no se encuentra sobre-expresado en los

tumores prostáticos con respecto a los niveles de expresión en próstatas de ratones silvestres a las 12 semanas de edad (Figura 6).

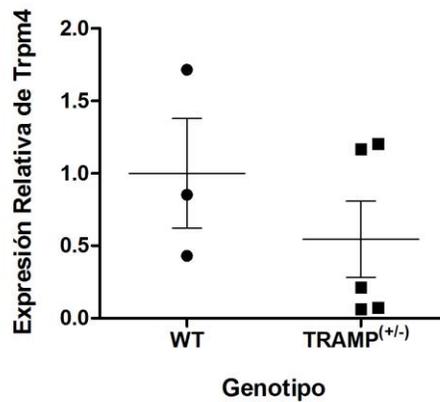


Figura 6. Niveles de mRNA de Trpm4 en el lóbulo prostático dorsolateral de ratones TRAMP^(+/-) respecto a ratones silvestres (WT). Los niveles de mRNAs fueron cuantificados por transcripción reversa y q-PCR en la próstata dorsolateral de ratones TRAMP^(+/-) y silvestres y fueron normalizados de acuerdo a los niveles del gen Hprt1. La expresión relativa se estableció respecto a los niveles en los ratones silvestres. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Prueba t de Student no pareado. $p > 0,05$) Los datos se muestran como medias \pm SEM.

Debido a estos antecedentes y a sus importantes cualidades, se escogió el modelo TRAMP en esta propuesta investigativa, para evaluar el papel de TRPM4 en el desarrollo y progresión del CaP. Con este fin, se obtuvieron ratones dobles transgénicos (TRAMP^(+/-)/hTRPM4 _{Δ 1-177}^(+/-)) y se evaluaron los posibles cambios en las características tumorales, definidos por el análisis histopatológico, dando cuenta de aquellos cambios atribuibles a la ausencia del canal TRPM4 en la próstata murina, al compararlos con los ratones TRAMP^(+/-) control. Estas observaciones histopatológicas se complementaron con la inmunohistoquímica del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), una proteína que se sintetiza en las fases G₁ y S del ciclo celular y se correlaciona por tanto con el estado proliferativo de las células.

Dado que en líneas celulares la disminución de TRPM4 resulta en una reducción de los niveles de β -catenina nuclear y de su actividad transcripcional, se cuantificaron mediante q-PCR, los niveles de expresión de algunos genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina como *Ccnd1*, *Zeb1*, *Birc5*, *Snai2*, *Cdh1*, y adicionalmente los niveles de *Vim*, un marcador del proceso de EMT en cáncer.

4. Hipótesis

La expresión de hTRPM4 Δ_{1-177} afecta negativamente la progresión del cáncer de próstata en el modelo murino TRAMP.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Establecer la participación del canal TRPM4 en la progresión del cáncer de próstata.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar histopatológicamente el efecto de hTRPM4 Δ_{1-177} en el modelo TRAMP.
2. Establecer el efecto de hTRPM4 Δ_{1-177} sobre la proliferación en próstatas de ratones dobles transgénicos TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ_{1-177} ^(+/-).
3. Establecer el efecto de TRPM4 Δ_{1-177} sobre la actividad de la vía de β -catenina y algunos de sus genes blancos.

6. Materiales y Métodos

6.1. Animales

Un total de 46 ratones machos se incluyeron en el análisis; 18 ratones dobles transgénicos ($TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$) y 18 ratones $TRAMP^{(+/-)}$ control para estudios de histología, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical, en tres grupos de 12 animales cada uno, a las 12, 22 y 32 semanas de edad y adicionalmente 10 animales, 5 de cada genotipo, para estudios de expresión génica (Figura 7). Cada animal se genotipó por PCR usando DNA obtenido de la punta de la cola. Los animales se mantuvieron en un ambiente con clima controlado con periodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, y con una dieta de agua y alimentos *ad libitum*.

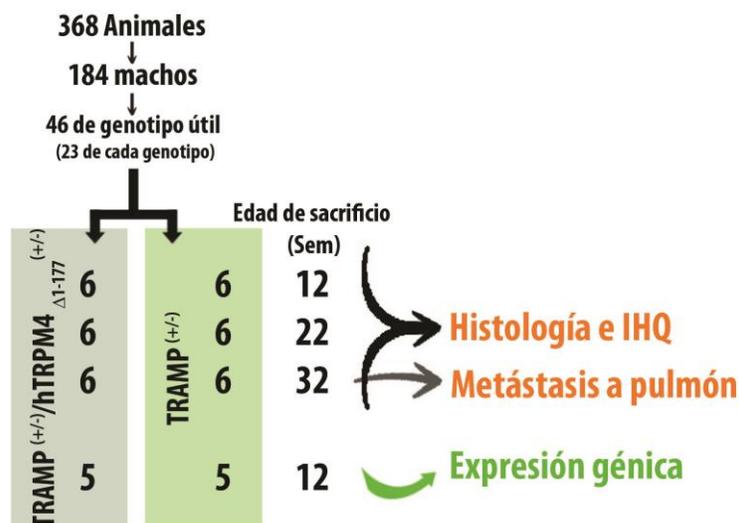


Figura 7. Número de animales incluidos en el estudio discriminados por genotipo, edad de sacrificio y destino.

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó un poder del 80%, para detectar una diferencia entre las cohortes de una unidad de desviación estándar (un cambio del 50%), con base en una prueba U de Mann-Whitney no paramétrica de dos colas

con un error alfa de 0.05. Este estudio fue aprobado en Septiembre de 2010 por el Comité de Bioética sobre investigación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo el protocolo de manejo y cuidado de animales de laboratorio N° CBA# 0368 FMUCH.

6.2. Extracción de RNA

Los lóbulos prostáticos dorsolaterales de cada ratón se conservaron en RNAlater para la posterior extracción de RNA total mediante el *kit* RNeasy® de Qiagen®, tratamiento con DNAsa (RNase-Free DNase I set de Omega Bio-Tek) y ulterior cuantificación en un espectrofotómetro BioTek (Synergy™ 2), a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del RNA se determinó estableciendo la relación de absorbancia 260/280 con valores aproximados a 2.0 y el grado de integridad se evaluó en un gel de agarosa al 2% teñido con 5µl de GelRed™ 5.000x, corrido a 90 V durante 45 minutos (Figura 8). Los lóbulos dorsal y lateral se procesaron y analizaron en conjunto, siguiendo reportes previos.

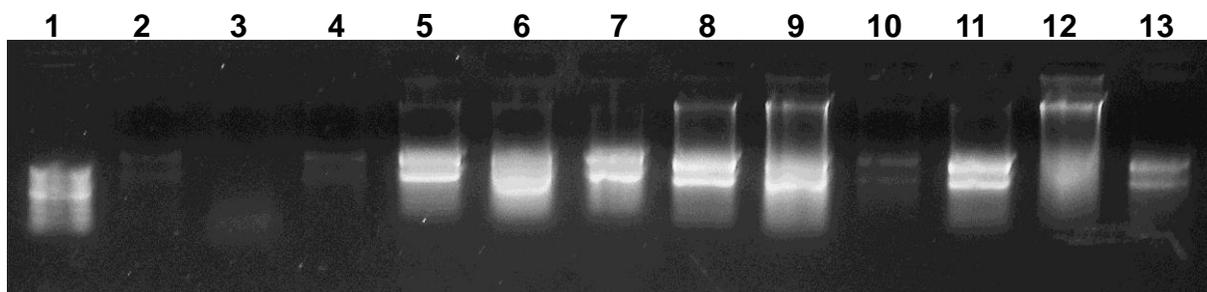


Figura 8. Análisis de la integridad de los mRNAs mediante electroforesis en gel de agarosa. Los carriles 2 a 13 corresponden a RNA total extraído de los lóbulos prostáticos dorsolaterales de ratones $TRAMP^{(+/-)}$ y $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$. Las muestras con RNA degradado fueron excluidas del estudio (carriles 2-4, 6, 10, 12). Carril 1: Ladder 1Kb.

6.3. Síntesis de cDNA

Las muestras de RNA se ajustaron a una concentración de 210 ng/µl. La síntesis de cDNA se realizó mediante el kit AffinityScript™ Multiple Temperature

Reverse Transcriptase, usando 1,75 ul de Oligo dT y 0,25 ul de random primers, según las instrucciones del fabricante.

6.4. q-PCR

Para realizar las curvas de calibración de la q-PCR, se realizaron diluciones seriadas (1/10) del cDNA hasta alcanzar una concentración de 10^{-9} ng/ μ l. Posteriormente se realizaron PCRs convencionales con partidores para los genes *Cdh1*, *Ccnd1*, *Zeb1*, *Birc5*, *Snai2* y *Vim* (Tabla 1). 10 μ l del producto de PCR se corrieron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% teñido con 5 μ l de GelRed™ 5.000x, durante 50 minutos. Finalizada la electroforesis, los productos se aislaron desde el gel (QIAquick® Gel Extraction kit de QIAGEN®), se diluyeron y cuantificaron en un termociclador Eco™ Real Time PCR System de Illumina, para generar la curva de calibración estándar de cada gen.

Tabla 1. Partidores utilizados en las PCR convencionales y en tiempo real.

Gen		Secuencia 5´ - 3´	Tm	CG%	Largo amplicón (pbs)
<i>Ccnd1</i>	Fw	TTC CCT TGA CTG CCG AGA AGT T	58.6	50	190
	Rv	TTG CGG ATG GTC TGC TTG TTC	58.2	52	
<i>Snai2</i>	Fw	GCA AGA TCT GTG GCA AGG CTT T	63.10	50	132
	Rv	GT GCC CTC AGG TTT GAT CTG T	64.21	52	
<i>Vim</i>	Fw	TGG ATC AGC TCA CCA ACG ACA A	56.25	50	140
	Rv	TCT GAA TGA CTG CAG GGT GCT T	56.84	50	
<i>Zeb1</i>	Fw	CGA ATG CCC GAA CTG CAA GAA A	57.58	50	163
	Rv	ACT GCC TGG TGA TGT CGA AAG A	56.28	50	
<i>Birc5</i>	Fw	GGT TCC CAG CCT TCC AAT TCC T	55.56	55	143
	Rv	CCT TCA AGA ACT GGC CCT TCC T	56.5	55	
<i>Cdh1</i>	Fw	CCCGTCCTGCCAATCCTGATG	59.6	61	138
	Rv	GGCTAGCGGCTTCAGAACCA	59.2	60	
<i>Hprt1</i>	Fw	GTCCTGTGGCCATCTGCCTAGT	60.3	59	139
	Rv	CCAGAGGGTAGGCTGGCCTAT	59.2	61	

Para la cuantificación de los niveles de expresión se realizó una q-PCR de 40 ciclos a 95°C por 15 minutos, 58°C por 15 minutos y 72°C por 15 minutos, usando para ello el *Master Mix Brilliant II SYBR®* QPCR de Agilent Technologies®. Los valores de expresión obtenidos desde el software (EcoRealtime v4.0.) se normalizaron respecto al gen *Hprt1*.

6.5. Análisis histopatológico completo

6.5.1. Próstatas

Las próstatas se diseccionaron en sus cuatro lóbulos (anterior, dorsal, lateral y ventral), se fijaron en formaldehído por un tiempo no menor a 24 horas, y se incluyeron en parafina. Se prepararon láminas con cortes de 3 µm de grosor, las cuales se sometieron a desparafinización en Neo-Clear y deshidratación en una serie de soluciones de etanol con concentraciones crecientes de 70% a 100%.

6.5.2. Pulmones

Los pulmones de los ratones de 32 semanas se diseccionaron y fijaron en formaldehído y se incluyeron en parafina. Se realizaron tres cortes seriados de 3 µm de grosor cada 50 µm de tejido pulmonar a fin de aumentar la probabilidad de encontrar focos metastásicos. Las láminas con los cortes se sometieron a desparafinización en Neo-Clear y deshidratación en una serie de soluciones de etanol con concentraciones crecientes de 70% a 100%.

6.5.3. Procedimientos de anatomía patológica

Un médico veterinario patólogo estableció la condición de las próstatas y los pulmones incluidos. Mediante la aplicación de protocolos previamente diseñados y establecidos en los laboratorios de anatomía patológica, se realizó el estudio histopatológico completo con las tinciones especializadas requeridas para tal fin

(hematoxilina-eosina e inmunotinciones). Para el ensayo de inmunohistoquímica se empleó el kit comercial de Thermo Scientific® (UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer), siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación: las secciones de 3 µm se lavaron con solución buffer fosfato (PBS) (tres veces durante 4 min), se incubó en buffer de recuperación (Buffer Citrato 10mM con pH 6.0) a 100°C por 10 min y tras su enfriamiento, se realizó el bloqueo de la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 10 min a temperatura ambiente. Los cortes se lavaron nuevamente por tres veces con PBS, y posteriormente se incubaron con la solución de bloqueo (Ultra V Block, Thermo Scientific®) durante 10 min a temperatura ambiente. Subsecuentemente, todas las secciones se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario por 20 min a temperatura ambiente, evitando la exposición a la luz. Se usaron anticuerpos monoclonales anti-PCNA murino (Thermo Scientific® Lab Vision) y anti-hTRPM4 (OriGene Technologies). Posteriormente se incubaron los cortes durante 10 minutos con potenciador de anticuerpo primario y se lavaron tres veces con PBS durante 4 min. Se agregó el polímero HRP y se incubó por 15 min, posteriormente se repitió el ciclo de lavado con PBS. Se agregó el cromógeno revelador por 3 min, observando la reacción al microscopio. Finalmente los cortes se lavaron con PBS y se sometieron a tratamiento de contraste nuclear con hematoxilina, para posteriormente ser sellados con pegamento neutro.

6.6. Análisis de los datos y expresión de resultados

El Dr. Carlos González, DVM., PhD., de la Universidad Andrés Bello, realizó a ciegas el análisis histopatológico de las próstatas teñidas con hematoxilina-eosina; se determinó el porcentaje de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) presente en cada uno de los lóbulos prostáticos de cada ratón a las 12 semanas. Por otro lado,

las próstatas de los ratones de 22 y 32 semanas de edad se evaluaron mediante un esquema de graduación modificado, propuesto recientemente por Berman et al.[83], el cual permite establecer las diferencias en la progresión de las lesiones neoplásicas en el modelo TRAMP. Este esquema se basa en un sistema de puntuación numérico que evalúa tanto las lesiones histopatológicas más severas como también las más comunes y sus distribuciones en cada lóbulo prostático, en una escala que puede ir de 0 a 21 y cuyo score total (sumatoria de las dos evaluaciones) puede alcanzar un valor de 42, en donde los valores más altos corresponden a las próstatas más afectadas (Tabla 2).

Grado de la lesión	Distribución	Score ajustado de la lesión
0	Difusa	0
1	Focal	1
1	Multifocal	2
1	Difusa	3
2	Focal	4
2	Multifocal	5
2	Difusa	6
3	Focal	7
3	Multifocal	8
3	Difusa	9
4	Focal	10
4	Multifocal	11
4	Difusa	12
5	Focal	13
5	Multifocal	14
5	Difusa	15
6	Focal	16
6	Multifocal	17
6	Difusa	18
7	Focal	19
7	Multifocal	20
7	Difusa	21

Tabla 2. Determinación del Score ajustado de la lesión con base en el su grado y distribución. Adaptado de [83]

Cada lóbulo prostático se analizó por separado ya que la malignidad presenta un curso diferente en cada uno; los lóbulos dorsal y lateral son los más afectados, la próstata anterior se afecta medianamente y la próstata ventral no desarrolla cáncer [83].

Todos los cortes histológicos de las próstatas se digitalizaron mediante fotografías en serie de cada campo microscópico a 100x que incluía tejido, con un microscopio Olympus BX41 dotado con una cámara fotográfica QImaging MicroPublisher 3.3 RTV. La secuencia de fotografías se agrupó en una sola imagen panorámica de cada corte histológico del lóbulo prostático mediante el software Adobe® Photoshop® CS5 Extended v12.0 x32. Los núcleos PCNA positivos se cuantificaron, por cada lóbulo, como porcentaje de señales positivas en cada fotografía panorámica mediante el programa Image-Pro® PLUS V.4.5.0.29 de Media Cybernetics, Inc. Este protocolo se estableció previamente en nuestro laboratorio, con base en comparaciones entre ratones pareados por edad descendientes de la misma cruce (TRAMP^(+/-) y TRAMP^(-/-)) (Figura 9). En los cortes histológicos de pulmón del grupo de ratones de 32 semanas se realizó la búsqueda de posibles metástasis.

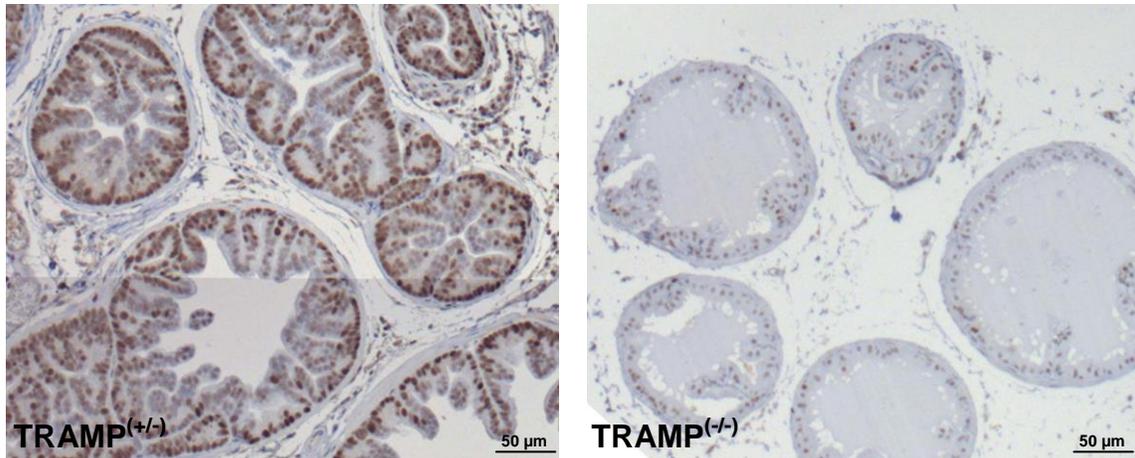
6.7. Análisis estadístico

La significancia estadística se estableció con un valor de $p < 0,05$, mediante la prueba de U Mann Whitney de dos colas (Figuras 10A, 11 y 12) o una prueba *t* de Student no pareada de dos colas, y una prueba F para comparar las varianzas (figuras 15, 16, 17 y 18), o una prueba exacta de Fisher, con un intervalo de confianza del 95% (Metástasis pulmonares y ganglionares). Los resultados de la q-PCR, fueron obtenidos de una curva estándar de amplificación para cada gen, se normalizaron

respecto al gen *Hprt1* y se expresaron como expresión relativa de cada muestra respecto al control.

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Prism v5.0 for Windows. GraphPad® Software Inc.

A.



B.

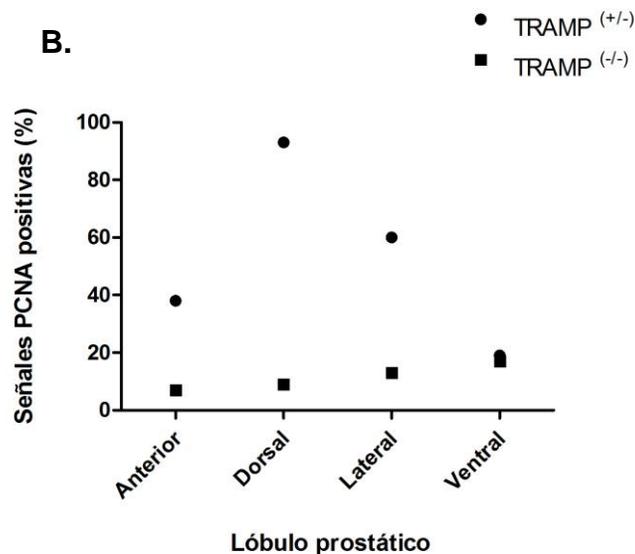


Figura 9. Diferencias en la positividad del marcador de proliferación celular PCNA entre ratones TRAMP^(+/+) y TRAMP^(-/-). **A.** Cortes histológicos del lóbulo prostático dorsal con inmunotinción anti-PCNA en ratones TRAMP^(+/+) y TRAMP^(-/-) a las 20 semanas de edad (300X). **B.** En cada corte histológico se calculó el porcentaje de señales PCNA positivas de cada uno de los lóbulos prostáticos (anterior, dorsal, lateral y ventral) del ratón TRAMP^(+/+) y fueron comparados respecto a los porcentajes en el ratón TRAMP^(-/-). El análisis del porcentaje total de señales positivas de cada ratón, mostró diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p=0,014$.

7. Resultados

7.1. Evaluación histopatológica del efecto de hTRPM4 $_{\Delta 1-177}$ en el modelo

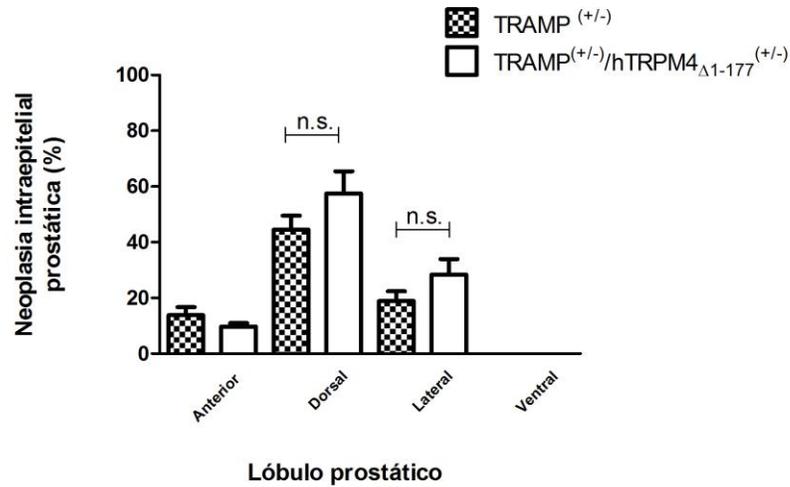
TRAMP

7.2. Histología prostática

A las 12 semanas de edad, el 100% de los ratones analizados presentó diversos grados de PIN, los lóbulos más afectados fueron el dorsal y el lateral con un 44% y 19% respectivamente en TRAMP^(+/-); y 57% y 28% en TRAMP^(+/-)/hTRPM4 $_{\Delta 1-177}$ ^(+/-), mientras que el lóbulo ventral no presentó lesión alguna. En cuanto a la frecuencia de PIN entre TRAMP^(+/-)/hTRPM4 $_{\Delta 1-177}$ ^(+/-) y TRAMP^(+/-), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los lóbulos ($p > 0,05$) (Figura 10).

A las 22 semanas de edad, los lóbulos dorsal y lateral presentaron mayor frecuencia de lesiones y mayor severidad de las mismas que los demás lóbulos, con un promedio de score total de 20 y 13 en TRAMP^(+/-) y de 25 y 14 en TRAMP^(+/-)/hTRPM4 $_{\Delta 1-177}$ ^(+/-). A las 32 semanas, los lóbulos anterior, dorsal y lateral presentaron en promedio un score total de aproximadamente 15. Los datos obtenidos por este método, tanto a las 22 como a las 32 semanas, tampoco revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los lóbulos de los dos grupos ($p > 0,05$) (Figuras 11 y 12).

A.



B.



Figura 10. Diferencias en la frecuencia de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) en los modelos TRAMP^(+/-) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-). A. Porcentaje de PIN en los lóbulos anterior, dorsal, lateral y ventral de ratones TRAMP^(+/-) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-) a las 12 semanas de edad. No se observaron diferencias significativas (Prueba de Mann Whitney, $p > 0,05$). Los datos se muestran como medias \pm SEM. B. Microfotografías (200X) representativas de áreas con PIN en el lóbulo dorsal en los ratones TRAMP^(+/-) (Der.) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-) (Izq.) a las 12 semanas de edad. n.s.=no significativo.

Es importante resaltar que en todos los ratones TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-) de 32 semanas se pudo identificar a nivel histopatológico cada uno de los lóbulos prostáticos, mientras que dos de los seis ratones TRAMP^(+/-) presentaban próstatas con tumores de muy alto grado, en los cuales fue imposible identificar cada uno de los lóbulos, por tanto en dichos tumores no se pudo calcular el score total discriminado por lóbulo prostático.

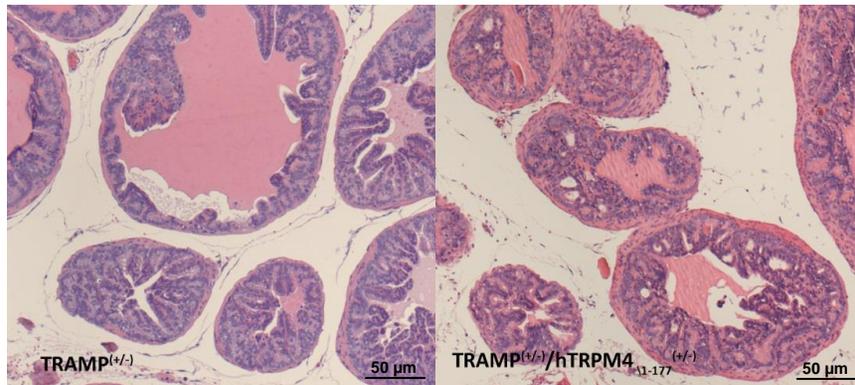
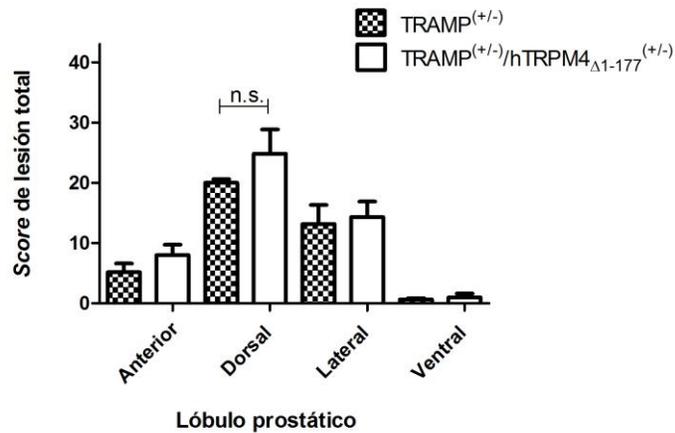


Figura 11. Score de lesión total y microfotografías de las lesiones en los ratones TRAMP^(+/-) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-). El gráfico muestra las medias \pm SEM del Score de lesión total en cada lóbulo prostático de seis ratones TRAMP^(+/-) y seis TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) a las 22 semanas de edad. Las microfotografías, tomadas a un aumento de 200X, muestran campos representativos de las lesiones prostáticas. No se observaron diferencias significativas (Prueba de Mann Whitney. $p > 0,05$).

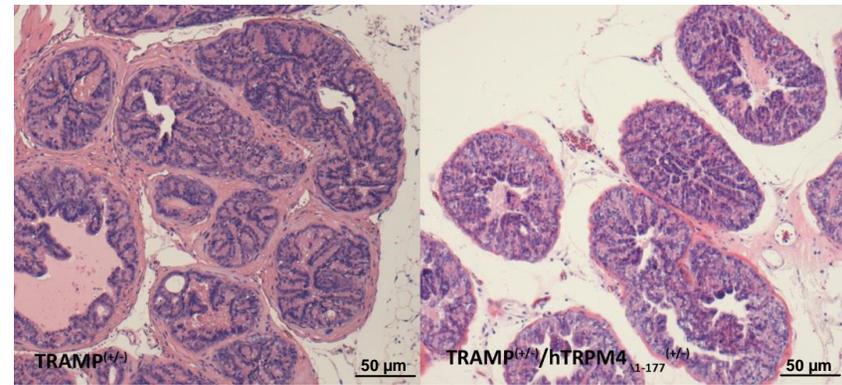
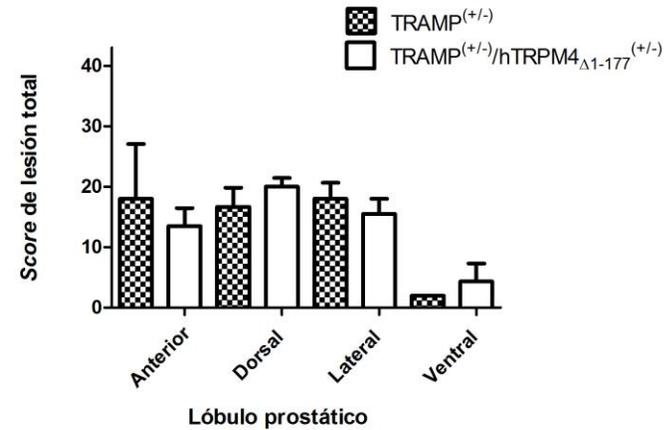


Figura 12. Score de lesión total y microfotografías de las lesiones en los ratones TRAMP^(+/-) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-). El gráfico muestra las medias \pm SEM del Score de lesión total en cada lóbulo prostático de cuatro ratones TRAMP^(+/-) y seis TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) a las 32 semanas de edad. Las microfotografías, tomadas a un aumento de 200X, muestran campos representativos de las lesiones prostáticas. No se observaron diferencias significativas (Prueba de Mann Whitney. $p > 0,05$).

7.2.1. Histología pulmonar

En este estudio se realizó una evaluación del pulmón “entero”, entendiéndose por esto, el análisis de cortes seriados de pulmón cada 50 μm , lo que arrojó en promedio entre 5 y 10 placas de cortes histológicos de pulmón por cada ratón. Al realizar la evaluación microscópica de los mismos, no se observaron metástasis en los ratones $\text{TRAMP}^{(+/-)}/\text{hTRPM4}_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ o en los $\text{TRAMP}^{(+/-)}$ de 32 semanas de edad (Figura 13).

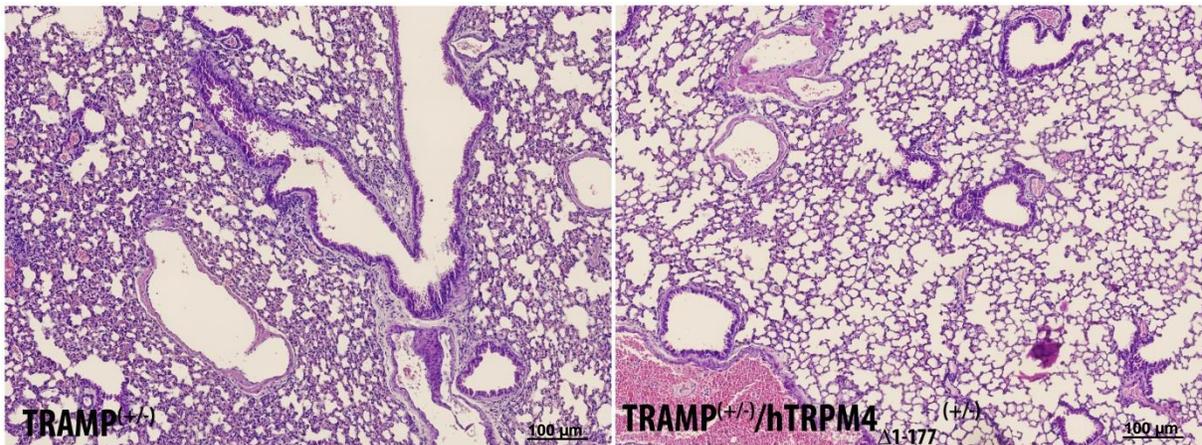


Figura 13. Ausencia de focos metastásicos en cortes histológicos de pulmón de ratones $\text{TRAMP}^{(+/-)}$ y $\text{TRAMP}^{(+/-)}/\text{hTRPM4}_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$. Las microfotografías, tomadas a un aumento de 100X, muestran campos representativos de cortes histológicos de pulmón estudiados en seis ratones $\text{TRAMP}^{(+/-)}$ y seis $\text{TRAMP}^{(+/-)}/\text{hTRPM4}_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ a las 32 semanas de edad, en los cuales no se observaron focos metastásicos.

Debido a la ausencia de focos metastásicos en los pulmones, también se calculó la frecuencia de metástasis ganglionar en los animales de 32 semanas (Figura 14). Luego de analizar los cortes histológicos de los ganglios linfáticos pélvicos, se estableció que el 16% (uno de seis) de los animales $\text{TRAMP}^{(+/-)}/\text{hTRPM4}_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ presentaban metástasis, frente a un 40% de los animales $\text{TRAMP}^{(+/-)}$ (dos de cinco). Las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas (Prueba exacta de Fisher. $p > 0,05$)

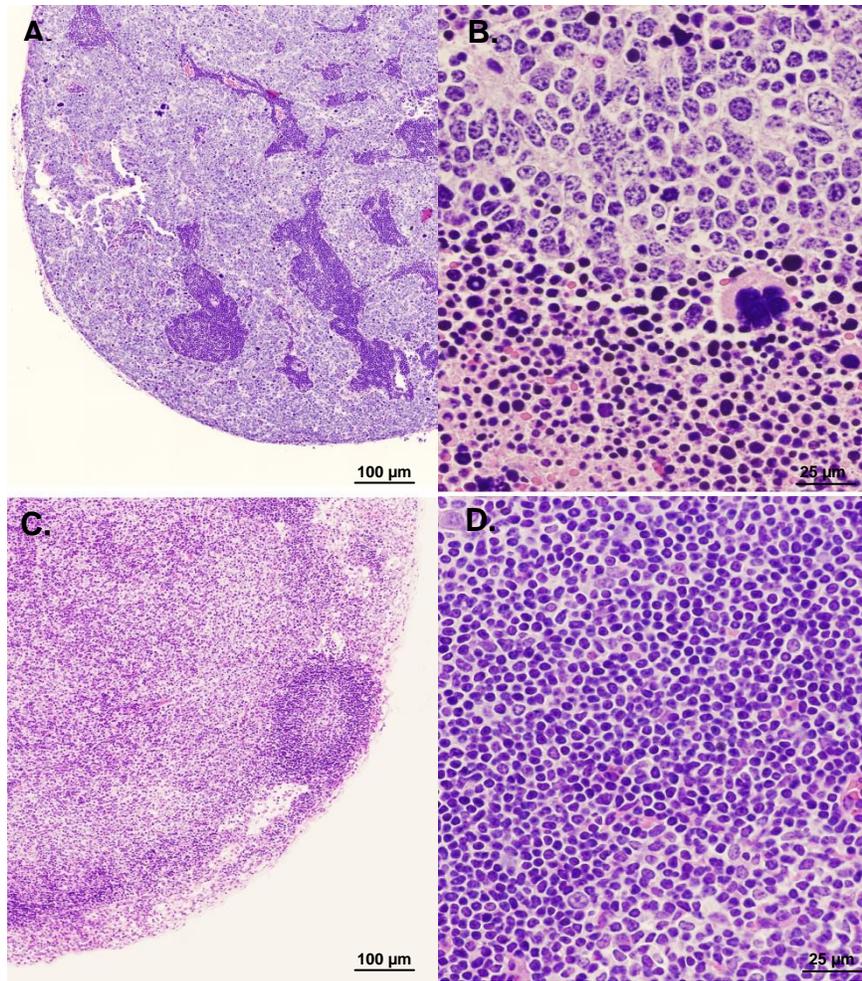


Figura 14. Arquitectura y citología de los nódulos linfáticos de ratones $TRAMP^{(+/-)}$ y $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$. Los cortes histológicos de ganglios linfáticos de seis ratones $TRAMP^{(+/-)}$ y seis $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ de 32 semanas de edad fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Se muestran campos representativos en microfotografías a un aumento de 100X (A y C) y 400X (B y D). **A.** Se observa la pérdida de la arquitectura normal del nódulo linfático **B.** Proliferación neoplásica compuesta por células epiteliales pobremente diferenciadas. **C. y D.** Ganglio linfático de apariencia normal.

7.3. Efecto de $hTRPM4_{\Delta 1-177}$ sobre la proliferación celular en próstatas de ratones dobles transgénicos $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$

A fin de realizar un seguimiento al incremento anormal del aparato genitourinario (AGU) (vejiga, uretra, vesículas seminales y próstata), derivado de las alteraciones en la capacidad proliferativa, los pesos del AGU de cada animal fueron registrados y analizados. No se observaron diferencias a las 12 y 22 semanas de

edad, mientras que a las 32 semanas se observó una tendencia al mayor peso del AGU de los ratones TRAMP^(+/-) frente a sus contrapartes TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-), sin embargo estas diferencias no fueron significativas (Figura 15A).

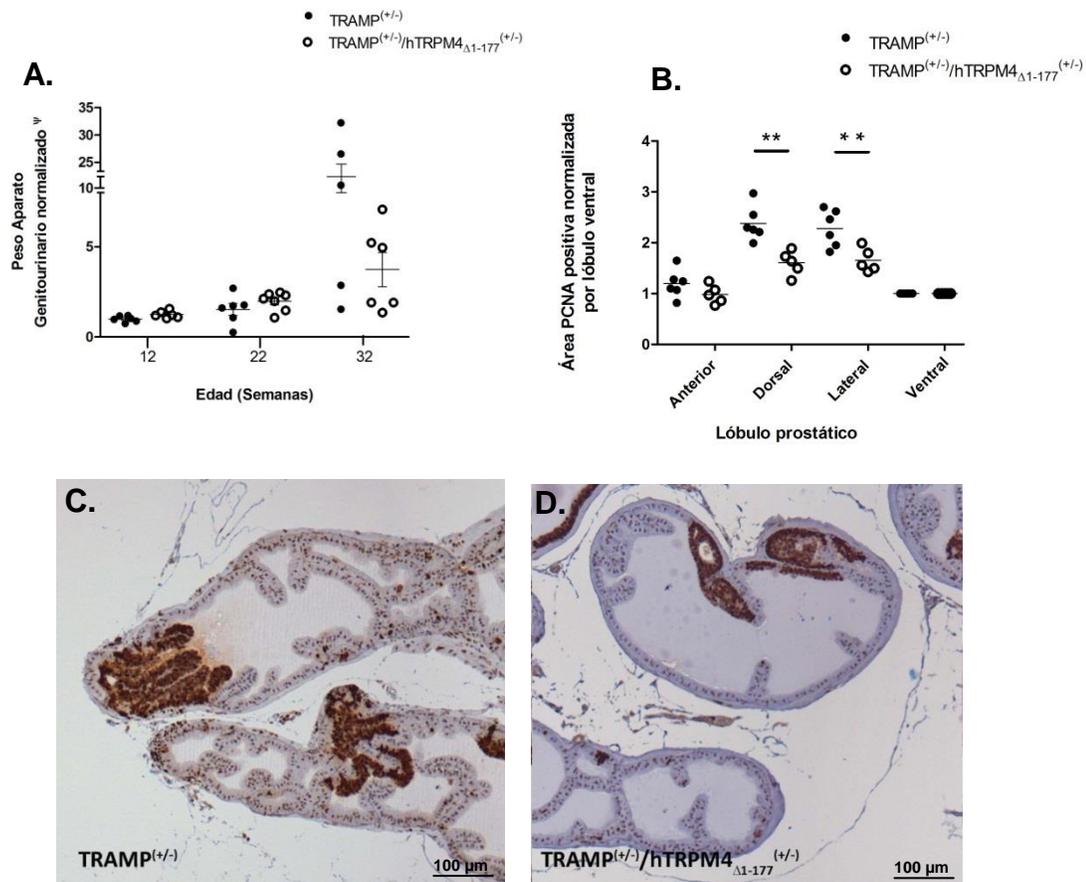


Figura 15. Peso del aparato genitourinario (AGU) y diferencias en la positividad del marcador de proliferación PCNA en los ratones TRAMP^(+/-) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-). **A.** El grafico muestra el peso del AGU normalizado de los ratones TRAMP^(+/-) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-) a las 12, 22 y 32 semanas de edad. ψ El peso en gramos del AGU de cada animal fue normalizado usando el peso promedio de los ratones TRAMP^(+/-) de 12 semanas. No se observan diferencias estadísticamente significativas (Prueba t de Student. $p > 0,05$). Los datos se muestran como medias \pm SEM. **B.** El grafico muestra el área PCNA positiva en cada lóbulo prostático de seis ratones TRAMP^(+/-) y seis TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-) a las 12 semanas de edad. El área PCNA positiva del lóbulo ventral de cada próstata, entendida como el valor de positividad basal al marcador PCNA, se usó como valor normalizador en cada lóbulo prostático. Los lóbulos dorsal y lateral, que se caracterizan por presentar mayor grado de neoplasia, presentan diferencias significativas en los niveles de PCNA analizados por inmunohistoquímica. (Prueba t de Student. Dorsal ** $p = 0,0021$. Lateral ** $p = 0,0090$). Los datos se muestran como medias \pm SEM. **C.** y **D.** Las microfotografías, tomadas a un aumento de 100X, muestran campos representativos del lóbulo prostático anterior con coloración inmunohistoquímica para PCNA en los ratones TRAMP^(+/-) (C) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ 1-177^(+/-) (D) a las 12 semanas de edad.

Adicionalmente, se establecieron las diferencias proliferativas a nivel histopatológico entre los dos grupos; se analizaron los cortes prostáticos inmunoteñidos para el marcador PCNA a las 12 semanas de edad, y se determinó el porcentaje de área nuclear PCNA positiva presente en cada uno de los lóbulos. Dado que en este modelo el lóbulo ventral no desarrolla cáncer espontáneo, el porcentaje estimado de positividad anti-PCNA en dicho lóbulo de cada próstata se usó como valor normalizador interno, entendiéndose como el porcentaje de positividad basal al marcador PCNA. Los valores normalizados mostraron niveles PCNA positivos significativamente incrementados en los lóbulos dorsal y lateral de los ratones TRAMP^(+/-) frente a TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) ($p < 0,05$) (Figura 15 B-D).

7.4. Efecto de hTRPM4_{Δ1-177} sobre la actividad de la vía de β-catenina y algunos de sus genes blancos en el lóbulo dorsolateral del modelo TRAMP.

Con el objeto de establecer si hTRPM4_{Δ1-177} tiene algún efecto sobre la expresión de genes de la vía de β-catenina y de procesos de transición epitelio mesénquima, se cuantificaron mediante q-PCR los niveles de expresión de algunos genes blanco de β-catenina: *Ccnd1*, *Birc5*, *Cdh1*, *Snai2*, *Zeb1*, y adicionalmente el marcador de EMT: *Vim*.

Se observaron resultados similares a los previamente reportados en los ensayos *in vitro* de Armisén et al. [55], solo en términos de tendencias. Al observar la gran dispersión de los resultados, se usó la prueba F para comparar las varianzas de los datos obtenidos para cada gen, con lo cual se estableció que las varianzas, en

todos los casos (excepto para *Zeb1*) eran significativamente diferentes ($p < 0,05$). Esto implica dificultades en torno al análisis estadístico de los datos, basado en una prueba *t* de Student, en una muestra limitada como la nuestra, pues esta prueba estadística requiere varianzas iguales. Los niveles de expresión de *Ccnd1* y *Birc5* en el lóbulo dorsolateral presentaron tendencias a niveles disminuidos en los ratones $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$, mientras que *Cdh1* a niveles incrementados. No hubo significancia estadística al someter los datos a la prueba *t* de Student ($p > 0,05$) (Figura 16).

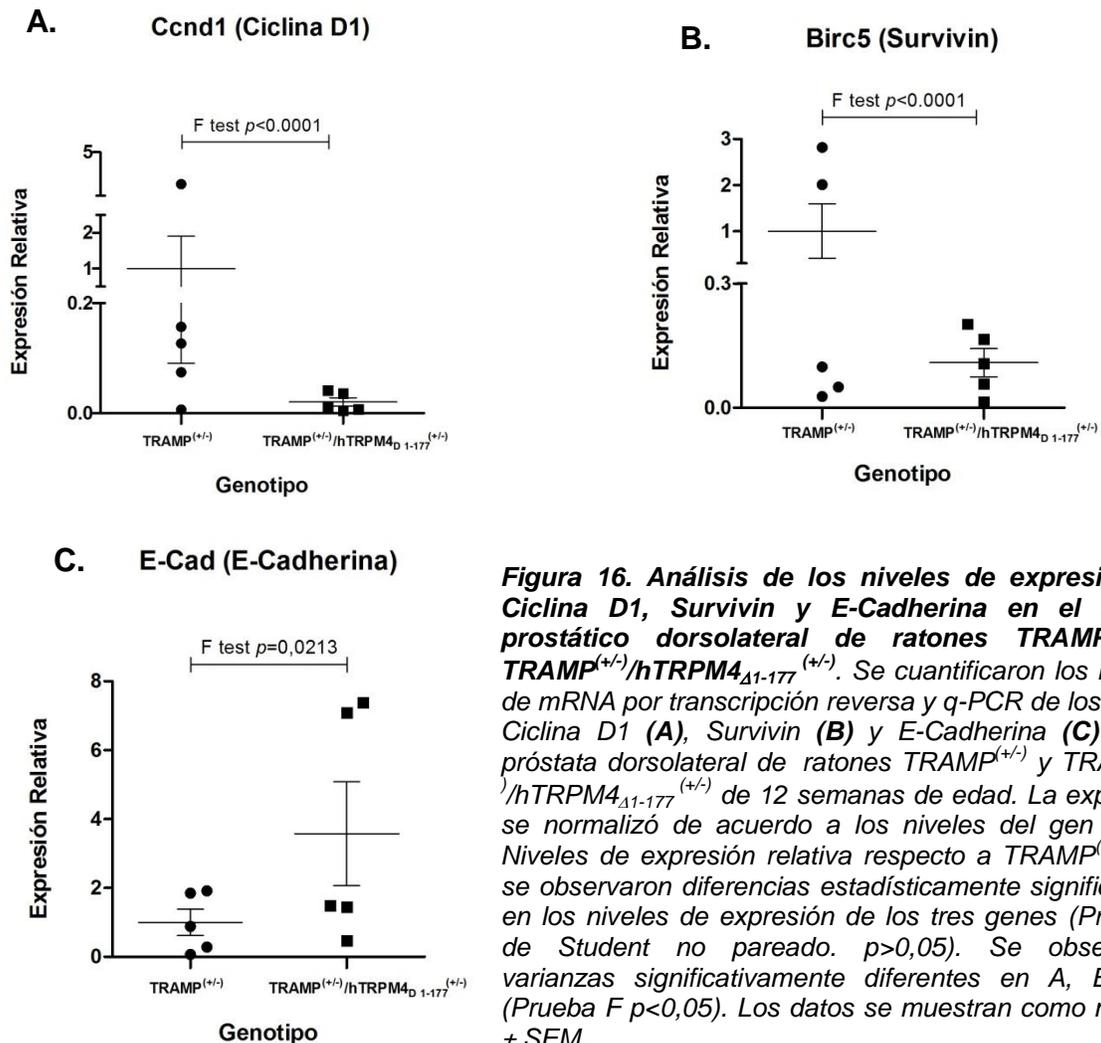


Figura 16. Análisis de los niveles de expresión de Ciclina D1, Survivin y E-Cadherina en el lóbulo prostático dorsolateral de ratones $TRAMP^{(+/-)}$ y $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$. Se cuantificaron los niveles de mRNA por transcripción reversa y q-PCR de los genes Ciclina D1 (A), Survivin (B) y E-Cadherina (C) en la próstata dorsolateral de ratones $TRAMP^{(+/-)}$ y $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ de 12 semanas de edad. La expresión se normalizó de acuerdo a los niveles del gen *Hprt1*. Niveles de expresión relativa respecto a $TRAMP^{(+/-)}$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los tres genes (Prueba *t* de Student no pareado. $p > 0,05$). Se observaron varianzas significativamente diferentes en A, B y C (Prueba F $p < 0,05$). Los datos se muestran como medias \pm SEM.

Adicionalmente, en el estudio de los genes blanco de β -catenina involucrados en el proceso de EMT, se observó una tendencia ($p>0,05$) a mayores niveles de expresión en el gen *Snai2* en el lóbulo dorsolateral de los ratones $TRAMP^{(+/-)}$ frente a $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ (Figura 17A). El gen *Zeb1* no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 17B).

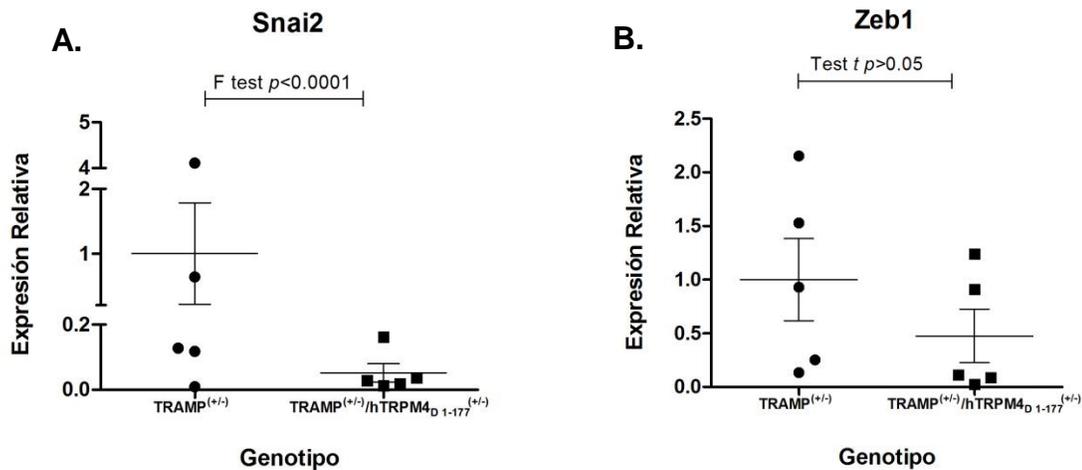


Figura 17. Análisis de los niveles de expresión de *Snai2* y *Zeb1* en el lóbulo prostático dorsolateral de ratones $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ y $TRAMP^{(+/-)}$. Se cuantificaron los niveles de mRNA por transcripción reversa y q-PCR de los genes *Snai2* (A) y *Zeb1* (B) en la próstata dorsolateral de ratones $TRAMP^{(+/-)}$ y $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ de 12 semanas de edad. La expresión se normalizó de acuerdo a los niveles del gen *Hprt1*. Niveles de expresión relativa respecto a $TRAMP^{(+/-)}$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del gen *Zeb1* (Prueba t de Student no pareado. $p > 0,05$). Se observaron varianzas significativamente diferentes en los niveles de expresión del gen *Snai2*. (Prueba F $p < 0,05$). Los datos se muestran como medias \pm SEM.

Los niveles de expresión de *Vim*, marcador mesenquimal que puede ser regulado por *Snai2*, tampoco se vieron significativamente diferentes en los ratones $TRAMP^{(+/-)}/hTRPM4_{\Delta 1-177}^{(+/-)}$ con respecto a los animales $TRAMP^{(+/-)}$ ($p > 0,05$) (Figura 18).

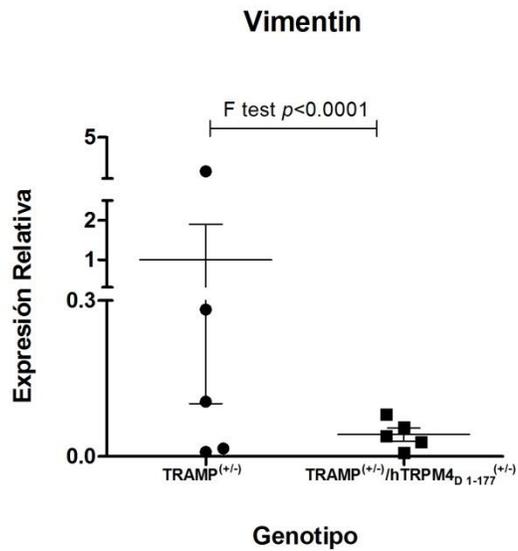


Figura 18. Análisis de los niveles de expresión de Vim en el lóbulo prostático dorsolateral, de ratones TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) y TRAMP^(+/-). Se cuantificaron los niveles de mRNA por transcripción reversa y q-PCR del gen Vim en la próstata dorsolateral de ratones TRAMP^(+/-) y TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) de 12 semanas de edad. . La expresión se normalizó de acuerdo a los niveles del gen Hprt1. Niveles de expresión relativa respecto a TRAMP^(+/-). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de este gen (Prueba t de Student no pareado. $p < 0,05$). Se observó varianzas significativamente diferentes (Prueba F $p < 0,05$). Los datos se muestran como medias \pm SEM.

8. Discusión

Varios miembros de la superfamilia de canales *transient receptor potential* (TRP) han sido implicados en cáncer [42, 43]. Recientemente, se han detectado aumentos significativos en la expresión del canal TRPM4 en el CaP humano. En líneas celulares se ha descrito que este canal iónico aumenta la proliferación, a través de la estabilización y translocación al núcleo de β -catenina, lo que promueve la activación de la expresión de genes pro-oncogénicos [55]. En este trabajo se evaluó el efecto de la ausencia de función de este canal en el desarrollo y progresión tumoral en el modelo murino TRAMP^(+/-).

La evaluación del porcentaje o severidad del PIN es un parámetro frecuentemente utilizado en diversos tipos de estudios, ya que permite investigar la habilidad de tratamientos para prevenir el desarrollo y la progresión del CaP [84-86]. Greenberg et al. [87] describen que las lesiones PIN espontáneas en ratones no transgénicos se pueden observar con baja frecuencia (5% del área total epitelial) a las 12 semanas de edad; no obstante, en ningún caso se observa presencia de adenocarcinoma a esta edad. Por su parte, los ratones TRAMP de 12 semanas presentan una frecuencia de 100% tanto de PIN como de alguna forma de adenocarcinoma. Nuestros resultados son acordes con estas investigaciones, pues se observó alguna forma de PIN en el 100% de los ratones de 12 semanas de edad. La ausencia de diferencias entre TRAMP^(+/-)/hTRPM4 Δ ₁₋₁₇₇^(+/-) y TRAMP^(+/-), tanto a las 12, 22 y 32 semanas de edad, sugiere que el desarrollo y progresión histológica de la neoplasia es igual en los dos grupos estudiados. Sin embargo, la dificultad para identificar los lóbulos prostáticos en dos ratones TRAMP^(+/-) de 32 semanas, debido a

sus tumores de muy alto grado, sugiere una mayor progresión neoplásica frente al ratón TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-), lo cual representa un hallazgo de gran relevancia.

Aunque las diferencias observadas en el peso del AGU no fueron estadísticamente significativas (Figura 15A), su tendencia podría sugerir, en cierta medida, un efecto negativo en la proliferación celular de los ratones TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-), derivado del bloqueo del canal TRPM4. Consistente con esto, los resultados de cuantificación de PCNA demuestran que a las 12 semanas de edad existe un menor grado de proliferación en la próstata dorsolateral de los ratones TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) versus TRAMP^(+/-). Sin embargo, estos datos deberán ser complementados con un estudio de apoptosis, el cual permitirá ajustar el índice proliferativo de acuerdo con la tasa de apoptosis del epitelio prostático en cada ratón.

En el modelo TRAMP^(+/-) se ha descrito previamente que la próstata dorsolateral se afecta con mayor frecuencia debido a la capacidad tejido-específica que tiene el promotor probasin (rPB) en dicho lóbulo; esto sugiere que el posible efecto negativo en la proliferación, es atribuible al efecto dominante negativo de hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-), ya que la expresión de este transgen también es dependiente del promotor rPB. Un aumento en la capacidad proliferativa neoplásica conduce a un incremento en el tamaño tumoral, parámetro de gran importancia, pues puede sugerir progresión neoplásica incluso en ausencia de diferencias histológicas entre los tumores.

En este sentido, se ha informado que otros canales de la familia TRPM tienen un efecto sobre la proliferación celular en diversos tipos de cáncer como TRPM1 en melanoma [88], TRPM2 en neuroblastoma [89] y TRPM7 en CaP. TRPM7 por

ejemplo, promueve la proliferación celular en CaP, mediante el incremento en el influjo de Ca^{2+} , sin que se requiera una alteración en sus niveles de expresión [90]. En cuanto a TRPM4, solo dos estudios han registrado hallazgos sobre su papel en la proliferación celular; Nelson et al. [91] observaron en células madre del folículo dental de ratas que el bloqueo molecular de TRPM4 mediante un shRNA, conduce a una disminución significativa en la proliferación celular [91]. Mientras que en células neoplásicas, los resultados de Armisen et al. [55] demuestran que la regulación negativa de TRPM4 mediante un shRNA reduce la proliferación de células HeLa, una línea celular derivada de cáncer cervicouterino. Este efecto obedecería a la degradación de β -catenina vía GSK-3 β y la consecuente reducción en la transcripción de algunos genes dependientes del complejo β -catenina/Tcf/Lef que promueven la proliferación celular [55].

Si bien nuestros resultados de expresión génica no son concluyentes desde el punto de vista estadístico, estos son bastante consistentes en tanto que todas las tendencias señalan siempre un posible efecto antitumoral en el modelo murino TRAMP, mediado por el bloqueo de Trpm4. El bloqueo de Trpm4 podría conducir a una disminución en la capacidad proliferativa de las células tumorales prostáticas, mediante el impacto que tiene el incremento en el influjo de Ca^{2+} sobre la vía de β -catenina.

Consideramos que tres razones fundamentan dichas limitaciones estadísticas en nuestro estudio: 1) el cálculo del tamaño muestral se limitó con un poder del 80%, a obtener el n mínimo requerido para detectar una diferencia entre las cohortes de una unidad de desviación estándar (un cambio del 50%). 2) La alta dispersión de los

datos de niveles de expresión génica, la cual se refleja en la diferencia significativa entre las varianzas de *Ccnd1*, *Birc5*, *Cdh1*, *Snai2* y *Vim* en los ratones TRAMP^(+/-) /hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) respecto a TRAMP^(+/-). 3) Por lo observado en las varianzas, podemos suponer que los ratones incluidos fueron muestreados de poblaciones distintas.

En cuanto a la primera, podemos afirmar que solo se incluyeron cinco individuos de los seis previstos inicialmente, debido a dificultades técnicas. Adicionalmente nunca se consideró la alta dispersión de los datos, puesto que no existía antecedentes al respecto, lo cual genera dificultades en la aplicación de una prueba estadístico como la prueba *t* de Student, especialmente en muestras pequeñas como la nuestra, por lo cual se requeriría una muestra moderadamente más grande o un análisis de mayor profundidad de los datos.

En cuanto a la segunda razón, la alta dispersión de los datos en parte, se podría explicar desde varios puntos de vista:

- Diferencias en el parentesco de los individuos incluidos en cada grupo, puesto que al ser primos o hermanos se pueden generar sesgos biológicos, fenómeno vinculado también a la impronta genómica derivada del efecto materno, del cual se ha observado en ciertos casos que los animales se pueden comportar biológicamente diferente [92, 93].
- Diferencias en la edad de sacrificio, la cual se estableció en 12 semanas \pm 5 días, podría generar grupos de individuos en extremos opuestos de edad, no obstante, es importante resaltar que a las 12 semanas todos los individuos incluidos ya son adultos sexuales competentes lo cual podría

aminorar las posibles diferencias derivadas de este factor.

- Diferencias aleatorias durante el proceso de extracción de RNA, que involucren cantidades diferentes de tejido estromal, vascular y endotelial, entre otros, aunque las cuantificaciones están normalizadas de acuerdo al gen *Hprt1*. Por su parte, los efectos de degradación del RNA fueron debidamente controlados, excluyendo cualquier muestra con signos de degradación (Figura 8)
- Diferencias en el peso de los animales, puesto que al corresponder a un modelo que posee un transgen hormonalmente regulado, las variaciones en la disposición de lípidos y consecuentemente producción de hormonas puede presentar diferencias significativas en los procesos dependientes de estas moléculas.
- La condición de “macho dominante” fue desconocida en todos los animales estudiados. Especialmente para los estudios de endocrinología se debe establecer esta condición, puesto que este animal cursa habitualmente con un desarrollo sexual distinto, con niveles de testosterona más altos [94]. La probabilidad de obtener un macho dominante en nuestro estudio es de uno por camada generada, por lo cual suponemos que uno o varios de nuestros ratones podrían ser o no machos dominantes.
- Ambiente variable.

Ante esta situación, existen algunas alternativas estadísticas para el tratamiento y análisis de los datos obtenidos en el estudio de expresión génica, entre ellas la transformación logarítmica de los datos especialmente cuando los datos son muestreados de una distribución lognormal, usar una prueba *t* de Student con la

corrección de Welch la cual según varios autores no es tan sensible como se requiere[95, 96], y el incremento de la muestra, entre otros. Aunque ninguna de las soluciones anteriores es ideal, algunas de ellas fueron consideradas, como por ejemplo la corrección de Welch, o la conversión de los datos a una escala logarítmica, con la cual la prueba *t* de Student no arrojó diferencias significativas entre los grupos. Finalmente consideramos que ante tal situación la mejor alternativa para estudios posteriores, será obtener una muestra mucho mayor, que permita discernir con mejor resolución el comportamiento de la expresión génica entre los dos grupos analizados.

Adicionalmente, en este estudio se observó que el grupo más heterogéneo, con mayor varianza corresponde al genotipo TRAMP^(+/-). En este grupo, los niveles de PCNA indican que estos ratones tienen mayor capacidad proliferativa, lo cual podría sugerir que una mayor cantidad de eventos estocásticos como mutaciones, se presentan en el genoma de estos ratones generándose así una amplia variación en el comportamiento neoplásico con diversos niveles de progresiones y agresividad. No obstante, estas variaciones también podrían ser consecuencia de la sobreexpresión de *Trpm4*, pues dos de los animales TRAMP^(+/-) estudiados (ratones R5 y R17), que presentaban los niveles de expresión más altos de *Trpm4* (Figura 6) consistentemente también presentaban los niveles de expresión más altos para los genes *Birc5*, *Snai2* y *Vim* (Figuras 16B, 17A y 18). Este perfil de expresión génica podría a su vez, traducirse en altos grados de progresión y agresividad tumoral, los cuales podrían ser parcialmente contrarrestados en los ratones TRAMP^(+/-) /hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-) gracias al efecto que genera el dominante negativo de hTRPM4_{Δ1-}

177 sobre la proliferación celular y probablemente sobre la metástasis.

Dicho efecto anti-proliferativo podría soportarse en las tendencias a la disminución en los niveles de Ciclina D1 en los ratones TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-). La expresión aberrante de esta proteína ha sido implicada en la patogénesis de varios tipos de cáncer, incluyendo CaP. Aunque no se considera un evento común en los tumores primarios (el 30% de tumores prostáticos expresan Ciclina D1 [97]), su sobreexpresión está presente en los fenotipos más agresivos de la enfermedad [98]. Los niveles de Survivina también presentaron esta tendencia; esta proteína es un importante inhibidor de la apoptosis que no se expresa en las células epiteliales de la próstata, pero se expresa abundantemente en CaP, favoreciendo la resistencia tumoral a diversos estímulos apoptóticos [99]. Se asocia con pobre pronóstico, altos scores Gleason y metástasis a ganglios linfáticos [100]. De manera que los cambios en la expresión de Ciclina D1 y Survivina, derivados del bloqueo de Trpm4 y la posterior inhibición de la vía de β -catenina, estarían afectando la progresión mitótica y la tasa de proliferación celular. Adicionalmente el bloqueo de Trpm4 podría afectar negativamente los mecanismos de crecimiento y proliferación celular independientes de andrógenos, pues se ha descrito que β -catenina podría promover dichos procesos mediante su asociación con el receptor de andrógenos, un regulador clave del crecimiento prostático involucrado en la progresión del CaP [101].

Por su parte, la evaluación de las metástasis tanto pulmonares como ganglionares, ha sido habitualmente empleadas como herramienta para establecer la eficacia de determinados tratamientos en la reducción de la progresión neoplásica.

Por ejemplo, el uso de los fármacos como R-flurbiprofen [102], DFMO [103] e inhibidores de histona deacetilasas [84], entre otros, ha demostrado reducir la incidencia de metástasis en el ratón TRAMP^(+/-). No obstante la evaluación de metástasis ganglionar implica dificultades en la obtención de los ganglios linfáticos en ratones más viejos, en los cuales el contenido graso abdominal es superior, lo cual se observó en uno de los ratones TRAMP^(+/-), por cuanto solo se pudo analizar cinco animales. Por su parte, la evaluación en pulmones puede suponer alguna dificultad en la búsqueda de micrometástasis, siendo necesario, en ocasiones, seccionar el pulmón entero y complementar el estudio con las técnicas inmunohistoquímicas particulares para cada caso.

Los resultados de nuestro estudio histopatológico de metástasis a pulmones (0% tanto en TRAMP^(+/-) como en TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-)) y ganglios linfáticos (40% en TRAMP^(+/-) y 16% en TRAMP^(+/-)/hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-)) fueron notablemente diferentes respecto a reportes anteriores, en los cuales se estima que entre el 42% [82] y el 67% [79] de ratones TRAMP^(+/-) desarrollan metástasis pulmonar, y entre 75% [82] y 100% [79] a ganglios linfáticos, a las 28 semanas edad. No obstante se debe resaltar que habitualmente se usan métodos que facilitan el hallazgo de los focos metastásicos, por ejemplo, el método de la tinta china (India ink) [103], recolección de lesiones macroscópicas [87] y detección inmunohistoquímica del antígeno T [104], entre otros. No se implementó alguno de estos métodos en este estudio. Esperamos a futuro implementar la detección inmunohistoquímica del antígeno T, teniendo en cuenta que varios cortes histológicos para inmunohistoquímica fueron almacenados para su posterior análisis. Dado que las

frecuencias esperadas de metástasis ganglionares a las 32 semanas son superiores al 75%, consideramos que en estos cortes histológicos se debe realizar un análisis de mayor profundidad. Para ello se usará la inmunotinción anti-AMACR, con la cual se ha conseguido un grado de marcación bastante específico y satisfactorio en nuestro laboratorio. Con esto se podrá establecer con precisión la multiplicidad de focos metastásicos en cada nódulo linfático, facilitando la comparación entre los grupos.

Si bien en nuestro estudio no incluimos un ensayo directo de migración celular, las tendencias observadas de metástasis a ganglios linfáticos podrían sugerir, al menos en parte, un papel fundamental del canal TRPM4 en el proceso migratorio (metastásico) de células neoplásicas prostáticas. La importancia del canal TRPM4 en la migración celular ha sido reportada anteriormente en mastocitos y células dendríticas de ratones *Trpm4*^(-/-). Shimizu et al. [105] observaron que el estímulo con antígenos en mastocitos de ratones *Trpm4*^(-/-), contrario a lo que ocurre normalmente en mastocitos *wild-type*, no conduce a migración celular, fenómeno que se observó acompañado de una disminución significativa en los niveles de F-actina con el consecuente incremento de actina globular, de manera que TRPM4 estaría involucrado, mediante la modulación del Ca^{2+} intracelular, en la formación de filamentos de actina del citoesqueleto, permitiendo el proceso migratorio. Los estudios de Barbet et al. [106] por su parte, demuestran que células dendríticas de ratones *Trpm4*^(-/-) presentan una alteración significativa en la migración hacia los ganglios linfáticos dependiente de quimioquinas, lo cual sugiere que el proceso migratorio de dichas células presentaría una alta dependencia de las variaciones del $[Ca^{2+}]_i$ mediadas por TRPM4. Adicionalmente, en nuestro laboratorio hemos

observado que células PC3 (línea celular de cáncer de próstata humano) transfectadas con un shRNA anti-TRPM4 migran significativamente menos respecto a células PC3 con un shRNA Control (Tesis doctoral de Alfredo Sagredo).

Nuestros hallazgos contribuyen parcialmente, a la hipótesis de que TRPM4 juega un papel importante en la capacidad migratoria celular, con lo cual favorecería el fenotipo y la capacidad metastásica en células neoplásicas de próstata. Esta hipótesis se apoya además, en las tendencias del patrón de expresión de tres marcadores importantes de progresión y metástasis en CaP: *Cdh1*, *Snai2* y *Vim*; el incremento en los niveles de *Cdh1* en el lóbulo dorsolateral de los ratones TRAMP^(+/-) /hTRPM4_{Δ1-177}^(+/-), que resulta bastante coherente con los niveles de expresión bajos del gen *Snai2*, sugiere un efecto anti-invasivo y anti-metastásico, derivado del bloqueo de *Trpm4*. *Snai2* está directamente involucrado en el proceso de EMT; su expresión y translocación nuclear conduce a una regulación negativa de marcadores epiteliales como E-Cadherina, su acción resulta en una pérdida directa de la proteína y la consecuente disolución de las uniones intercelulares dependientes de E-Cadherina. Además, *Snai2* genera una sobrerregulación de marcadores mesenquimales, que favorecen la motilidad y migración celular [107]. Uno de estos marcadores de EMT es Vimentina. Aunque su rol en la progresión del cáncer no es clara, su sobre-expresión se correlaciona con el crecimiento tumoral, la invasión y el pobre pronóstico [108]. En el ratón TRAMP, Vimentina presenta un perfil de expresión dependiente de la edad, estando ausente a las ocho semanas, moderadamente expresado en los ratones de 16 semanas cuando las próstatas presentan PIN de alto grado y alcanzando sus picos máximos entre las 24 y 32

semanas de edad, en donde se encuentran focos metastásicos a ganglios linfáticos y otros órganos, lo cual sugiere que Vimentina está involucrada en la progresión del cáncer a un fenotipo agresivo [109].

Nuestros resultados sugieren que la inhibición de Trpm4 podría reducir el alto potencial migratorio y metastásico de las células neoplásicas prostáticas del ratón TRAMP, al bloquear la adquisición de características mesenquimales durante el proceso de EMT, como el incremento en los niveles de *Snai2* y *Vim*, y la disminución de *Cdh1*. En nuestro modelo, mediante el uso de hTRPM4 $_{\Delta 1-177}$ hemos demostrado el revertimiento parcial de algunos cambios moleculares favorables a la progresión neoplásica, y con ello, la retención de algunas de las características epiteliales de las células prostáticas, sugiriendo en parte que este canal iónico puede tener un efecto modulador del proceso EMT y un efecto promotor del potencial migratorio de las células tumorales.

Dada la asociación existente entre los marcadores Ciclina D1, Survivina, *Snai2*, Vimentina y E-Cadherina y la progresión neoplásica, el canal Trpm4 podría considerarse un blanco terapéutico atractivo, cuyo bloqueo conduciría a un perfil de expresión génica desfavorable para el CaP en términos de proliferación y metástasis neoplásica.

Desde el punto de vista metodológico, es importante mencionar que aunque el fenotipo del modelo TRAMP^(+/-) tiene un acervo genético común en todos sus descendientes, con la edad y el desarrollo neoplásico cada animal adquiere ciertos eventos estocásticos que los alejan de esta “homogeneidad genética”, lo cual aunque otorga una gran ventaja por la similitud con lo que ocurre en los tumores prostáticos

humanos, suele complicar el análisis de los resultados en este tipo de estudios, especialmente cuando se cuenta con un número de individuos reducido. La complejidad del modelo se sustenta en el hecho de que se basa en la sobreexpresión de los antígenos T y t del virus SV40 en la próstata [76], los cuales bloquean moléculas importantes como los supresores tumorales p53 y pRb (retinoblastoma 1), e inhiben la PP2A (proteína fosfatasa 2A), de forma que conducen a inestabilidad genética, afectan el ciclo celular, promueven la activación de rutas de transducción de señales mitogénicas y la supervivencia celular tumoral.

Lo anterior podría justificar, en parte, tanto las diferencias entre las frecuencias de metástasis a pulmones y ganglios linfáticos observadas en este estudio y las reportadas en otros estudios, como las diferencias entre las varianzas de los datos de expresión génica.

Adicionalmente, los resultados de expresión génica obtenidos en la próstata ventral no fueron sujeto de análisis en este estudio dado que en este lóbulo no se expresa rPB, lo cual fue evidente histopatológicamente en la ausencia de neoplasia a las 12 semanas en este lóbulo.

9. Conclusiones

Nuestros resultados en conjunto, sugieren que el efecto dominante negativo de hTRPM4 $_{\Delta 1-177}$ en este modelo (TRAMP $^{+/-}$ /hTRPM4 $_{\Delta 1-177}^{+/-}$) conduciría a una actividad antitumoral observable en términos de la reducción de la capacidad proliferativa establecida por la cuantificación inmunohistoquímica del marcador PCNA a las 12 semanas y las tendencias en los cambios en la expresión de genes que contribuyen al fenotipo hiperproliferativo y metastásico como: *Ccnd1*, *Birc5*, *Snai2* y *Cdh1* que es importante en las adhesiones célula-célula dependientes de Ca $^{2+}$.

Lo observado hasta el momento da cuenta del importante papel que estaría jugando Trpm4 en el desarrollo y progresión del CaP. Teniendo en cuenta que la metástasis es la principal causa de muerte por CaP en los pacientes y que la patogénesis de la metástasis es dinámica y compleja, el bloqueo de Trpm4 podría considerarse un blanco farmacológico de gran utilidad en un futuro próximo. Para ello esperamos poder continuar la segunda fase de nuestro proyecto, en donde incrementaremos en número de individuos a analizar, basándonos en las varianzas observadas en este estudio, e incorporaremos un nuevo modelo murino que sobreexpresa el canal TRPM4 y con el que pretendemos confirmar los hallazgos generados hasta el momento en este campo de estudio.

10. Bibliografía

1. Strobe, S.A. and G.L. Andriole, *Prostate cancer screening: current status and future perspectives*. Nat Rev Urol, 2010. **7**(9): p. 487-93.
2. ACS and NCCN *Prostate Cancer Treatment: guidelines for patients*. 2007. **4**, 1-62.
3. Zhu, X.Y., et al., *Risk-Based Prostate Cancer Screening*. European Urology, 2012. **61**(4): p. 652-661.
4. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
5. ACS, *Cancer Facts & Figures 2010*, 2010: Atlanta.
6. Crawford, E.D., *Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer*. Urology, 2009. **73**(5 Suppl): p. S4-10.
7. Minsal, *Guía Clínica: próstata en personas de 15 años y más*, 2010: Santiago, Chile.
8. Dunn, M.W. and M.W. Kazer, *Prostate cancer overview*. Semin Oncol Nurs, 2011. **27**(4): p. 241-50.
9. Ferris-i-Tortajada, J., et al., *[Constitutional risk factors in prostate cancer]*. Actas Urol Esp, 2011. **35**(5): p. 282-8.
10. Zeegers, M.P., A. Jellema, and H. Ostrer, *Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis*. Cancer, 2003. **97**(8): p. 1894-903.
11. Bruner, D.W., et al., *Relative risk of prostate cancer for men with affected relatives: Systematic review and meta-analysis*. International Journal of Cancer, 2003. **107**(5): p. 797-803.
12. Kalish, L.A., W.S. McDougal, and J.B. McKinlay, *Family history and the risk of prostate cancer*. Urology, 2000. **56**(5): p. 803-6.
13. Mastalski, K., et al., *Substantial family history of prostate cancer in black men recruited for prostate cancer screening: results from the Prostate Cancer Risk Assessment Program*. Cancer, 2008. **113**(9): p. 2559-64.
14. Chen, Y.C., et al., *Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era*. Prostate, 2008. **68**(14): p. 1582-91.
15. Kral, M., et al., *Genetic determinants of prostate cancer: a review*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2011. **155**(1): p. 3-9.
16. Rowley, K.H. and M.D. Mason, *The aetiology and pathogenesis of prostate cancer*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 1997. **9**(4): p. 213-8.
17. Crawford, E.D., et al., *A retrospective analysis illustrating the substantial clinical and economic burden of prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2010. **13**(2): p. 162-7.
18. Prevarskaya, N., L. Zhang, and G. Barritt, *TRP channels in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(8): p. 937-46.
19. Ramsay, A.K. and H.Y. Leung, *Signalling pathways in prostate carcinogenesis: potentials for molecular-targeted therapy*. Clin Sci (Lond), 2009. **117**(6): p. 209-28.
20. Bott, S.R., et al., *Molecular changes in prostatic cancer*. Surg Oncol, 2005.

- 14(2): p. 91-104.
21. Quinn, D.I., S.M. Henshall, and R.L. Sutherland, *Molecular markers of prostate cancer outcome*. Eur J Cancer, 2005. **41**(6): p. 858-87.
 22. van der Poel, H.G., *Molecular markers in the diagnosis of prostate cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **61**(2): p. 104-39.
 23. Yamanaka, M., et al., *Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate*. International Journal of Cancer, 2003. **106**(3): p. 382-7.
 24. Yegnasubramanian, S., et al., *Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(6): p. 1975-86.
 25. Maruyama, R., et al., *Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(2): p. 514-9.
 26. Luo, J., et al., *Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(8): p. 2220-6.
 27. Rubin, M.A., et al., *alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer*. JAMA, 2002. **287**(13): p. 1662-70.
 28. Re, A., et al., *Silencing of GSTP1, a prostate cancer prognostic gene, by the estrogen receptor-beta and endothelial nitric oxide synthase complex*. Mol Endocrinol, 2011. **25**(12): p. 2003-16.
 29. Rogers, C.G., et al., *Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme a racemase protein*. J Urol, 2004. **172**(4 Pt 1): p. 1501-3.
 30. Black, P.C., et al., *Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer*. Prostate, 2007. **67**(7): p. 743-56.
 31. Wilson, S., et al., *The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells*. Biochem J, 2005. **388**(Pt 3): p. 967-72.
 32. Dhanasekaran, S.M., et al., *Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer*. Nature, 2001. **412**(6849): p. 822-6.
 33. Tomlins, S.A., et al., *ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice*. Eur Urol, 2009. **56**(2): p. 275-86.
 34. Lotan, T.L., et al., *PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(20): p. 6563-73.
 35. McMenamin, M.E., et al., *Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4291-6.
 36. Yoshimoto, M., et al., *PTEN genomic deletions that characterize aggressive prostate cancer originate close to segmental duplications*. Genes Chromosomes Cancer, 2012. **51**(2): p. 149-60.
 37. Shapovalov, G., et al., *TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells*. Cell Calcium, 2011. **50**(3): p. 295-302.
 38. Thebault, S., et al., *Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2038-47.
 39. Gkika, D. and N. Prevarskaya, *Molecular mechanisms of TRP regulation in tumor growth and metastasis*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(6): p. 953-8.
 40. Li, M. and Z.G. Xiong, *Ion channels as targets for cancer therapy*. Int J Physiol

- Pathophysiol Pharmacol, 2011. **3**(2): p. 156-66.
41. Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba, *Ion channels and the hallmarks of cancer*. Trends Mol Med, 2010. **16**(3): p. 107-21.
 42. Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba, *Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(8): p. 609-18.
 43. Gkika, D. and N. Prevarskaya, *TRP channels in prostate cancer: the good, the bad and the ugly?* Asian J Androl, 2011. **13**(5): p. 673-6.
 44. Van Haute, C., D. De Ridder, and B. Nilius, *TRP channels in human prostate*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 1597-611.
 45. Gohar, O., *The Transient Receptor Potential (TRP) Ion Channels: A Remarkable Multifunctional Superfamily*. Modulator, 2005. **20**: p. 20-23.
 46. Nilius, B., et al., *Transient receptor potential cation channels in disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 165-217.
 47. Owsianik, G., et al., *Structure-function relationship of the TRP channel superfamily*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2006. **156**: p. 61-90.
 48. Voets, T., et al., *Sensing with TRP channels*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(2): p. 85-92.
 49. Everaerts, W., B. Nilius, and G. Owsianik, *The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease*. Prog Biophys Mol Biol, 2010. **103**(1): p. 2-17.
 50. Cai, R., et al., *Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells*. International Journal of Cancer, 2009. **125**(10): p. 2281-7.
 51. Shi, Y., et al., *Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer*. Gut, 2009. **58**(11): p. 1443-50.
 52. Yang, S.L., et al., *Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer*. Oncogene, 2009. **28**(10): p. 1320-8.
 53. Fraser, S.P. and L.A. Pardo, *Ion channels: functional expression and therapeutic potential in cancer*. Colloquium on Ion Channels and Cancer. EMBO Rep, 2008. **9**(6): p. 512-5.
 54. Venkatachalam, K. and C. Montell, *TRP channels*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 387-417.
 55. Armisen, R., et al., *TRPM4 enhances cell proliferation through up-regulation of the beta-catenin signaling pathway*. J Cell Physiol, 2011. **226**(1): p. 103-9.
 56. Narayan, G., et al., *Gene dosage alterations revealed by cDNA microarray analysis in cervical cancer: identification of candidate amplified and overexpressed genes*. Genes Chromosomes Cancer, 2007. **46**(4): p. 373-84.
 57. Suguro, M., et al., *Expression profiling analysis of the CD5+ diffuse large B-cell lymphoma subgroup: development of a CD5 signature*. Cancer Sci, 2006. **97**(9): p. 868-74.
 58. Ashida, S., et al., *Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 5963-72.
 59. Liu, P., et al., *Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4011-9.
 60. Singh, J., et al., *Annotation of androgen dependence to human prostate*

- cancer-associated genes by microarray analysis of mouse prostate*. Cancer Lett, 2006. **237**(2): p. 298-304.
61. Abriel, H., et al., *TRPM4 channels in the cardiovascular system: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Biochem Pharmacol, 2012. **84**(7): p. 873-81.
 62. Jaggi, M., et al., *Aberrant expression of E-cadherin and beta-catenin in human prostate cancer*. Urol Oncol, 2005. **23**(6): p. 402-6.
 63. Yu, X., et al., *Wnt/beta-catenin activation promotes prostate tumor progression in a mouse model*. Oncogene, 2011. **30**(16): p. 1868-79.
 64. Tomita, K., et al., *Cadherin switching in human prostate cancer progression*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3650-4.
 65. Schmalhofer, O., S. Brabletz, and T. Brabletz, *E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 151-66.
 66. Cobaleda, C., et al., *Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development*. Annu Rev Genet, 2007. **41**: p. 41-61.
 67. Launay, P., et al., *TRPM4 regulates calcium oscillations after T cell activation*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1374-7.
 68. Cheng, H., et al., *TRPM4 controls insulin secretion in pancreatic beta-cells*. Cell Calcium, 2007. **41**(1): p. 51-61.
 69. Marigo, V., et al., *TRPM4 impacts on Ca²⁺ signals during agonist-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **299**(2): p. 194-203.
 70. Becerra, A., et al., *Transient receptor potential melastatin 4 inhibition prevents lipopolysaccharide-induced endothelial cell death*. Cardiovasc Res, 2011. **91**(4): p. 677-84.
 71. Bostwick, D.G. and M.K. Brawer, *Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer*. Cancer, 1987. **59**(4): p. 788-94.
 72. Nawijn, M.C., A.M. Bergman, and H.G. van der Poel, *Genetically Engineered Mouse Models of Prostate Cancer*. Eur Urol Suppl, 2008. **7**: p. 566-575.
 73. Valkenburg, K.C. and B.O. Williams, *Mouse models of prostate cancer*. Prostate Cancer, 2011. **2011**: p. 895238.
 74. Báez, P. and R. Armisén, *Actualización en cáncer de próstata: generalidades y diagnóstico* Medicina & Laboratorio, 2012. **18**(7-8): p. 333-354.
 75. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 292-306.
 76. Valkenburg, K.C. and B.O. Williams, *Mouse Models of Prostate Cancer*. Prostate Cancer, 2011. **2011**.
 77. Hensley, P.J. and N. Kyprianou, *Modeling prostate cancer in mice: limitations and opportunities*. J Androl, 2012. **33**(2): p. 133-44.
 78. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Animal models relevant to human prostate carcinogenesis underlining the critical implication of prostatic stem/progenitor cells*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1816**(1): p. 25-37.
 79. Gingrich, J.R., et al., *Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse*. Cancer Res, 1996. **56**(18): p. 4096-102.
 80. Gingrich, J.R., et al., *Androgen-independent prostate cancer progression in the TRAMP model*. Cancer Res, 1997. **57**(21): p. 4687-91.

81. Hafeez, B.B., et al., *Genetic ablation of PKC epsilon inhibits prostate cancer development and metastasis in transgenic mouse model of prostate adenocarcinoma*. *Cancer Res*, 2011. **71**(6): p. 2318-27.
82. Shukla, S., et al., *Blockade of beta-catenin signaling by plant flavonoid apigenin suppresses prostate carcinogenesis in TRAMP mice*. *Cancer Res*, 2007. **67**(14): p. 6925-35.
83. Berman-Booty, L.D., et al., *A review of the existing grading schemes and a proposal for a modified grading scheme for prostatic lesions in TRAMP mice*. *Toxicol Pathol*, 2012. **40**(1): p. 5-17.
84. Sargeant, A.M., et al., *OSU-HDAC42, a histone deacetylase inhibitor, blocks prostate tumor progression in the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3999-4009.
85. Suttie, A., et al., *A grading scheme for the assessment of proliferative lesions of the mouse prostate in the TRAMP model*. *Toxicol Pathol*, 2003. **31**(1): p. 31-8.
86. Shanmugam, M.K., et al., *Ursolic acid inhibits the initiation, progression of prostate cancer and prolongs the survival of TRAMP mice by modulating pro-inflammatory pathways*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32476.
87. Kaplan-Lefko, P.J., et al., *Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model*. *Prostate*, 2003. **55**(3): p. 219-37.
88. Guo, H., J.A. Carlson, and A. Slominski, *Role of TRPM in melanocytes and melanoma*. *Exp Dermatol*, 2012. **21**(9): p. 650-4.
89. Chen, S.J., et al., *Role of TRPM2 in cell proliferation and susceptibility to oxidative stress*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013. **304**(6): p. C548-60.
90. Sun, Y., et al., *Increase in serum Ca²⁺/Mg²⁺ ratio promotes proliferation of prostate cancer cells by activating TRPM7 channels*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(1): p. 255-63.
91. Nelson, P., et al., *Transient receptor potential melastatin 4 channel controls calcium signals and dental follicle stem cell differentiation*. *Stem Cells*, 2013. **31**(1): p. 167-77.
92. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. *Nat Genet*, 2003. **33 Suppl**: p. 245-54.
93. Reik, W. and J. Walter, *Genomic imprinting: parental influence on the genome*. *Nat Rev Genet*, 2001. **2**(1): p. 21-32.
94. Novotny, M., S. Harvey, and B. Jemiolo, *Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus**. *Experientia*, 1990. **46**(1): p. 109-13.
95. Hayes, A.F. and L. Cai, *Further evaluating the conditional decision rule for comparing two independent means*. *Br J Math Stat Psychol*, 2007. **60**(Pt 2): p. 217-44.
96. Moser, B.K. and G.R. Stevens, *Homogeneity of Variance in the Two-Sample Means Test*. *The American Statistician*, 1992. **46**(1): p. 19-21.
97. Kallakury, B.V., et al., *The prognostic significance of p34cdc2 and cyclin D1 protein expression in prostate adenocarcinoma*. *Cancer*, 1997. **80**(4): p. 753-63.
98. Gumbiner, L.M., et al., *Overexpression of cyclin D1 is rare in human prostate carcinoma*. *Prostate*, 1999. **38**(1): p. 40-5.

99. Fukuda, S. and L.M. Pelus, *Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(5): p. 1087-98.
100. Shariat, S.F., et al., *Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma*. Cancer, 2004. **100**(4): p. 751-7.
101. Kypta, R.M. and J. Waxman, *Wnt/beta-catenin signalling in prostate cancer*. Nat Rev Urol, 2012.
102. Wechter, W.J., et al., *E-7869 (R-flurbiprofen) inhibits progression of prostate cancer in the TRAMP mouse*. Cancer Res, 2000. **60**(8): p. 2203-8.
103. Gupta, S., et al., *Chemoprevention of prostate carcinogenesis by alpha-difluoromethylornithine in TRAMP mice*. Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5125-33.
104. Wikstrom, P., C. Lindahl, and A. Bergh, *Characterization of the autochthonous transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) as a model to study effects of castration therapy*. Prostate, 2005. **62**(2): p. 148-64.
105. Shimizu, T., et al., *TRPM4 regulates migration of mast cells in mice*. Cell Calcium, 2009. **45**(3): p. 226-32.
106. Barbet, G., et al., *The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(10): p. 1148-56.
107. Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev, *Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors*. Trends Mol Med, 2008. **14**(5): p. 199-209.
108. Satelli, A. and S. Li, *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(18): p. 3033-46.
109. Adhami, V.M., et al., *Involvement of vimentin in prostate cancer progression and invasion: A study in transgenic TRAMP model that closely mimics human disease*. AACR Meeting Abstracts, 2004. **2004**(1): p. 481-.