



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO EN
LA SECRECIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN CÁNCER
DE PRÓSTATA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA

Alejandra Barrón Hernández



MÉXICO, CDMX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Camacho Arroyo Ignacio
VOCAL: **Profesor:** Canizales Quinteros Samuel
SECRETARIO: **Profesor:** Rodríguez Dorantes Mauricio
1er. SUPLENTE: **Profesor:** Cerbon Cervantes Marco Antonio
2° SUPLENTE: **Profesor:** Ortega Vázquez Alberto

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
LABORATORIO DE ONCOGENÓMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

SUSTENTANTE (S):

Alejandra Barrón Hernández

Índice

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES GENERALES	2
2.1 La Próstata	2
2.1.1 Función y Localización de la Próstata.....	2
2.1.2 Anatomía y células que componen la Próstata.....	3
2.1.3 Desarrollo normal de la próstata.....	5
2.2 Papel de los Andrógenos en la Próstata	5
2.2.2 El Receptor de Andrógenos.....	6
2.3 Anomalías de la Próstata	9
2.3.1 Hiperplasia Prostática Benigna.....	9
2.3.2 Cáncer de Próstata.....	9
2.3.2.1 Historia Natural del Cáncer de Próstata.....	11
2.3.2.2 Cáncer de Próstata Andrógeno Independiente.....	14
2.4 Transdiferenciación Neuroendocrina	16
3. ANTECEDENTES DIRECTOS	18
3.1 Diferencias en las características bioquímicas y el origen de las células tipo NE y las células NE normales.	20
3.2 Participación de los neuropéptidos en el CaP y otros tipos de cáncer	21
3.3 Transdiferenciación NE y el CaP andrógeno independiente	23
4. Planteamiento del Problema	30
5. Hipótesis	31
6. Objetivos	31
I. Objetivo general	31
II. Objetivos particulares	31
7. MATERIALES Y METODOS	32
7.1 Cultivo Celular y Líneas Celulares.....	32
7.2 Microscopía.....	32
7.3 Ensayo de Transfección con siRNA AR o siRNA Control.....	32
7.4 Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por qRT – PCR.....	32
7.5 Extracción de Proteínas y Análisis con Western Blot.....	33
7.6 Tratamientos con fármacos análogos de GABA.....	34
7.7 Análisis de los Neuropéptidos en el Medio de Cultivo por Ensayo ELISA.....	35
8. RESULTADOS	37
8.1 La transfección con un siRNA contra el AR resulta en el silenciamiento del AR e induce el fenotipo parecido al NE en células LNCaP	37

<i>Ensayo de Transfección con siRNA AR o siRNA Control y análisis de la expresión génica por qRT - PCR</i>	37
<i>Extracción de proteínas y análisis con Western Blot</i>	38
8.2 Al estimular el receptor de GABA_B con Baclofen, se produce una secreción diferencialmente significativa del neuropéptido GRP.	41
8.2.1 Tratamiento con Muscimol. Detección de GRP	41
8.2.2 Tratamiento con Muscimol. Detección de Neurotensina	44
8.2.3 Tratamiento con Baclofen. Detección de Neurotensina	46
8.2.4 Tratamiento con Baclofen. Detección de GRP	49
8.3 Al tratar a las células con el antagonista del receptor de GABA_B (CGP 35348), se inhibe la secreción del neuropéptido GRP.	52
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIONES	60
11. REFERENCIAS	62

ABREVIATURAS

cDNA: ADN complementario

AREs: Sitios de unión del receptor de andrógenos/elementos de respuesta a andrógenos

ASR: Tasa estandarizada por edad

ATCC: American Tissue Type Culture Collection

CaP: Cáncer de Próstata

CgA: Cromogranina A

CgB: Cromogranina B

CR2-TAg: Ratones transgénicos que utilizan elementos reguladores del gen criptidina 2 (Defcr2) para expresar en antígeno T largo del virus de simio 40 (TAg) en células de CaP.

DBD: Dominio de unión a ADN

DHT: Dihidrotestosterona

EGF: Factor de crecimiento epidermal

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GRP: Péptido liberador de gastrina

HPB: Hiperplasia Benigna Prostática

IGF1: Factor de crecimiento parecido a insulina

LBD: Dominio de unión a ligando

LH: Hormona luteinizante

LHRH: Hormona liberadora de gonadotropina

NE: Neuroendocrino/Neuroendocrinas

NTD: Dominio NH₂-terminal

NT: Neurotensina

NSE: Neurolasa neuro especifica

PSA: Antígeno Prostático Especifico

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

AR: Receptor de Andrógenos

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RPTP α : Proteína del receptor tirosina fosfatasa α

SHBG: Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales

SFB: Suero Fetal Bovino

TBST/Tween: Buffer de TRIS 1x y Tween 20 al 0.1% a un pH 7.6

TRUS: Ecografía transrectal

V: Vehículo

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

1. RESUMEN

El cáncer de próstata es uno de los tumores malignos más frecuentes que afectan al varón; de acuerdo con estadísticas del GLOBOCAN 2012, se sabe que es la sexta causa de muerte debido a neoplasias malignas y ocupa el segundo lugar en incidencia en hombres a nivel mundial. En México es la primera causa tanto de muerte como de incidencia debido a neoplasias malignas. Después de la terapia de depleción androgénica, la mayoría de los pacientes desarrollan tumores prostáticos andrógeno independientes y es en esta clase de tumores prostáticos donde se ha observado un incremento significativo de células neuroendocrinas. Los hallazgos de diferentes grupos de investigación han propuesto que estas células juegan un papel muy importante en la transición del estado del cáncer de próstata andrógeno dependiente a uno independiente ya que los neuropéptidos secretados por estas células, tales como el péptido liberador de gastrina y la neurotensina, son capaces de actuar de manera autocrina y paracrina en el crecimiento y diferenciación de la próstata cancerosa.

Por otra parte, se han encontrado patrones celulares de expresión del receptor de GABA_A y GABA_B en las células neuroendocrinas y en las células secretoras normales sugiriendo así un medio para la diafonía entre la vía GABAérgica, las células neuroendocrinas y células secretoras normales durante el curso de la tumorigénesis en el cáncer de próstata, sin embargo, sin embargo, los mecanismos relacionados no han sido completamente dilucidados. Es por esto que el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene el sistema GABAérgico en la liberación de neuropéptidos en células parecidas a las neuroendocrinas en cáncer de próstata haciendo uso de un modelo *in vitro* de células LNCaP transdiferenciadas a tipo neuroendocrinas mediante el silenciamiento del receptor de andrógenos.

Lo que se encontró en este trabajo fue que la vía GABAérgica está involucrada en la secreción de GRP, ya que cuando se estimuló el receptor de GABA_B con el fármaco agonista de este receptor, la secreción de GRP fue significativamente mayor por parte de las células transdiferenciadas al fenotipo parecido al neuroendocrino a comparación con las células que no poseen este fenotipo confirmando así por primera vez que sistema GABAérgico participa en la secreción de neuropéptidos en células transdiferenciadas al fenotipo parecido al neuroendocrino en cáncer de próstata.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 La Próstata

2.1.1 Función y Localización de la Próstata.

La próstata es un órgano localizado debajo de la vejiga, delante del recto y se encuentra rodeando la uretra (Figura 1); pertenece al sistema reproductor masculino y está compuesta por una porción glandular, que ocupa aproximadamente dos terceras partes del tejido contenido dentro de la cápsula prostática, y el tercio restante es fibromuscular (Latarjet, M., *et al.* 2004).

La próstata tiene la función de válvula, impide que la orina se filtre al sistema reproductor y durante el coito cierra el paso de la vejiga mientras permite pasar el semen, además produce el líquido que enriquece el semen y nutre a los espermatozoides a fin de hacer estos viables para la fecundación después de la eyacuación. Además de esto, la glándula prostática aporta antígeno prostático específico (PSA, implicado en disolver eficientemente a las semenogelinas 1 y 2 y a la fibronectina del gel seminal que se forma después de la eyacuación, lo cual es importante para llevar a cabo la liberación progresiva de la movilidad de los espermatozoides para la fecundación), fibrinógeno, espermina, zinc (propiedades bactericidas), magnesio y enzimas tales como fosfatasa ácida, fibrinolisisina, transglutaminasa, entre otras (Mendoza, L. 2003).

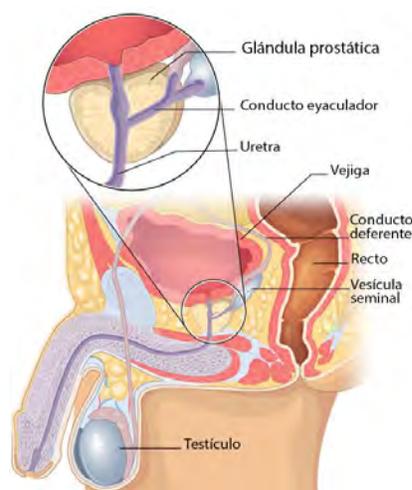


Figura 1. Localización de la próstata. En esta imagen se puede observar la ubicación de la próstata (Adaptado de CDC, 2016).

2.1.2 Anatomía y células que componen la Próstata

Anatómicamente, la próstata se encuentra dividida en 5 zonas (Figura 2), las cuales son:

1. **Zona de Transición:** Ocupa el 5-10% de la glándula, está cerca de la uretra y es en esta región donde se presenta una alta prevalencia de la Hipertrofia Prostática Benigna.
2. **Zona Periférica:** Ocupa el 65% de la glándula, es más susceptible a desarrollar atrofia focal y presenta una prevalencia media-alta en carcinomas prostáticos.
3. **Zona Central:** Rodea los conductos eyaculadores, y ocupa un 25% del total de la glándula.
4. **Zona Periuiretral:** Está próxima al cuello vesical
5. **Zona Fibromuscular:** Conformado por abundantes fibras musculares lisas (Wein, A., et al. 2008).

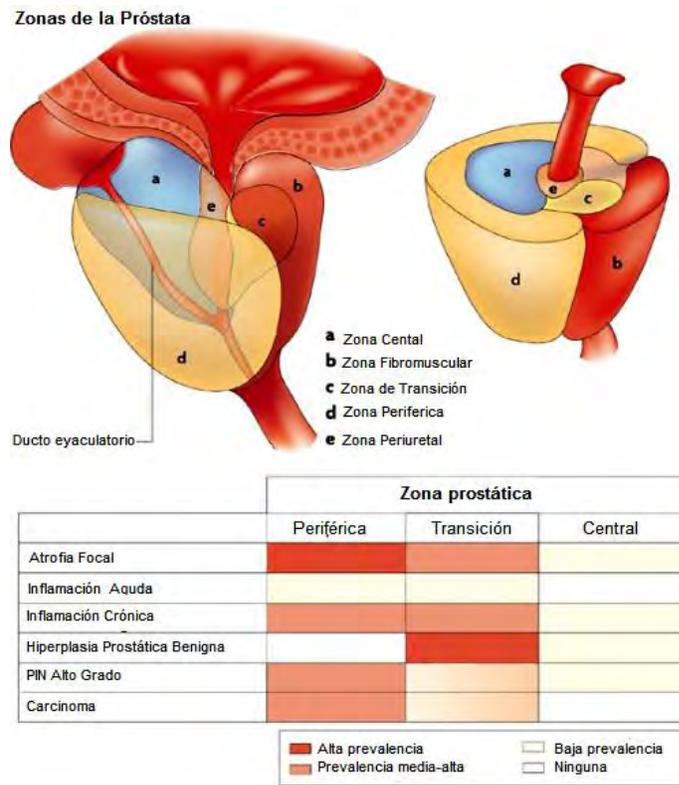


Figura 2. Anatomía de la próstata. En esta figura se puede observar las zonas que componen la glándula prostática, así como la prevalencia que tienen distintos padecimientos de la próstata en cada una (Adaptada de Susaníbar C., 2015).

El epitelio prostático humano se compone de dos tipos principales de células, las células epiteliales y las células del estroma. El *compartimiento del estroma* tiene función de sostén estructural y consiste sobre todo de tejido conectivo, células musculares lisas, fibroblastos y células endoteliales. El *compartimiento epitelial* de la próstata consiste en células epiteliales basales, células epiteliales secretoras luminales (son las más predominantes y son ricas en fosfatasa ácida y antígeno prostático específico) y células neuroendocrinas (NE), estas últimas son las menos abundantes ya que se encuentran en cantidades menores al 1%, están distribuidas a lo largo del compartimiento epitelial en la glándula prostática interpuestas entre las células luminales y las células basales. Las células NE contienen densos gránulos en el citoplasma, poseen propiedades duales endocrinas-neuronales y secretan diversos marcadores tipo neuronales, así como factores estimuladores del crecimiento. Se ha propuesto que estas células se originan de las células epiteliales del endodermo, están terminalmente diferenciadas y se cree que juegan un papel funcional en la regulación de la homeostasis en procesos de crecimiento y diferenciación de las células epiteliales prostáticas normales (Tabla 1 y Figura 3) (Wein, A., *et al.* 2008, y Czyz', Yuan T., *et al.* 2006, Lipianskaya J., Cohen A., *et al.* 2014, J. *et al.* 2012 y Chang D., *et al.* 2015, Ramírez L., *et al.* 2013).

Tabla 1. Células principales que componen a la glándula prostática.

GLÁNDULA PROSTÁTICA			
Células Epiteliales		Células del Estroma	
Basales	Células pluripotenciales pequeñas poco diferenciadas, no tienen actividad secretora, expresan bajos niveles de AR, son ricas en queratina (tipos 4, 5 y 6); representan menos del 10% de la cantidad de células epiteliales. Son el principal tipo celular proliferativo, se localizan entre la membrana basal y la capa de células secretoras.	Musculares Lisas	Células ricas en actina y miosina
Secretoras (luminales)	Estas células tienen una diferenciación terminal, sin división, son ricas en fosfatasa ácida y PSA. Son las más predominantes, expresan niveles elevados de AR, por lo que son dependientes de los andrógenos para su sobrevivencia.	Fibroblastos	Células ricas en vimentina y asociadas con fibronectina
Neuroendocrinas	Células terminalmente diferenciadas. Son las menos abundantes (<1%) y están interpuestas entre los otros dos tipos celulares. Involucradas en la secreción, regulación y diferenciación prostática.	Endoteliales	Asociadas con fibronectina, son positivas para fosfatasa alcalina.

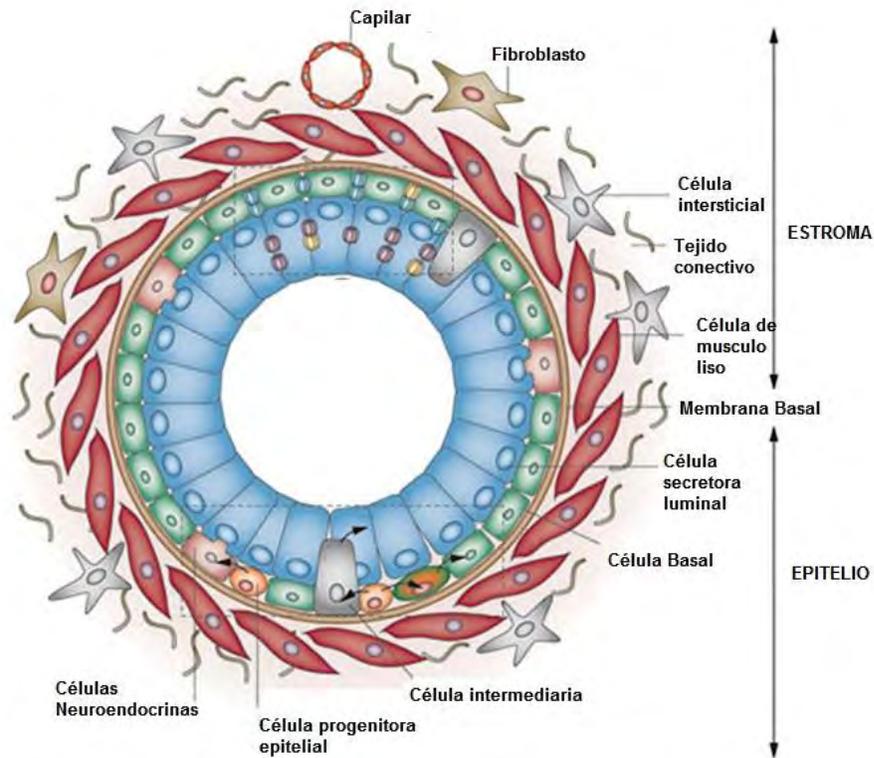


Figura 3. Esquema de los tipos celulares en la glándula prostática (Adaptada de Czyz', J. *et al.* 2012).

2.1.3 Desarrollo normal de la próstata

El tamaño de la próstata varía con la edad. Entre los 35- 40 años consigue su desarrollo final y su tamaño permanece constante hasta una edad aproximada de 45-46 años, a partir de esta edad puede aparecer la Hiperplasia Benigna Prostática (HBP) o Cáncer de Próstata (CaP) (Wein, A., *et al.* 2008).

2.2 Papel de los Andrógenos en la Próstata

Las hormonas sexuales masculinas son conocidas como andrógenos y son los responsables del desarrollo fenotípico durante la embriogénesis y la maduración sexual en la pubertad (Wein, A., *et al.* 2008).

El principal andrógeno circulante es la testosterona, pero es la dihidrotestosterona (DHT), su metabolito más activo, ésta participa en varios procesos biológicos, dentro de los que se incluyen el desarrollo normal del pene, del escroto, de los testículos, de las glándulas

sexuales accesorias y de la presencia de las características sexuales masculinas en la pubertad (Heemers, H. 2007). La próstata es un blanco de los andrógenos, en donde ejercen un papel importante en su desarrollo y crecimiento. Es en esta glándula donde la testosterona es convertida a DHT (Rojas F., *et al.* 2011).

2.2.2 El Receptor de Andrógenos

Los efectos de la testosterona y DHT son mediados a través del receptor de andrógenos (AR), un miembro de la superfamilia de receptora de esteroides de factores de transcripción dependientes de ligando. El AR tiene cuatro dominios funcionales (Wright M., *et al.* 2003):

1) Un *dominio NH₂-terminal* (NTD) o dominio de transactivación el cual es el menos homólogo en secuencia y el más variable en tamaño entre todos los miembros de la familia receptora de esteroides. Este dominio esta principalmente involucrado en la regulación de genes blanco de la transcripción, así como en la regulación transcripcional vía interacciones proteína-proteína como otros factores de transcripción.

2) Un *dominio de unión a ADN* (DBD), es la parte más altamente conservada del receptor, determina la especificidad de la interacción del AR con el ADN. Este dominio consiste de dos dedos de zinc: uno está involucrado en la unión directa con el ADN y contiene la llamada caja P para el reconocimiento específico de los elementos de respuesta a andrógenos, mientras que el otro está implicado en interacciones proteína- proteína y sirve como una unidad estabilizadora para la dimerización de las dos moléculas del receptor.

3) Un *dominio de unión a ligando* (LBD), funciona principalmente para la unión específica y de alta afinidad de los andrógenos. Además, este dominio está involucrado en la localización nuclear, la dimerización del receptor y la interacción con otras proteínas. La secuencia de aminoácidos de esta región posee un 50% de homología con los correspondientes residuos en receptores glucocorticoides, mineralocorticoides y de progesterona.

4) Una *región bisagra*, no conservada y flexible, encargada de unir a al dominio de unión a ligando y al dominio de unión a ADN, así como regular la unión al ADN, la translocación nuclear y la transactivación del AR (figura 4) (Rojas F., *et al.* 2011 y Galani, A., *et al.* 2008).

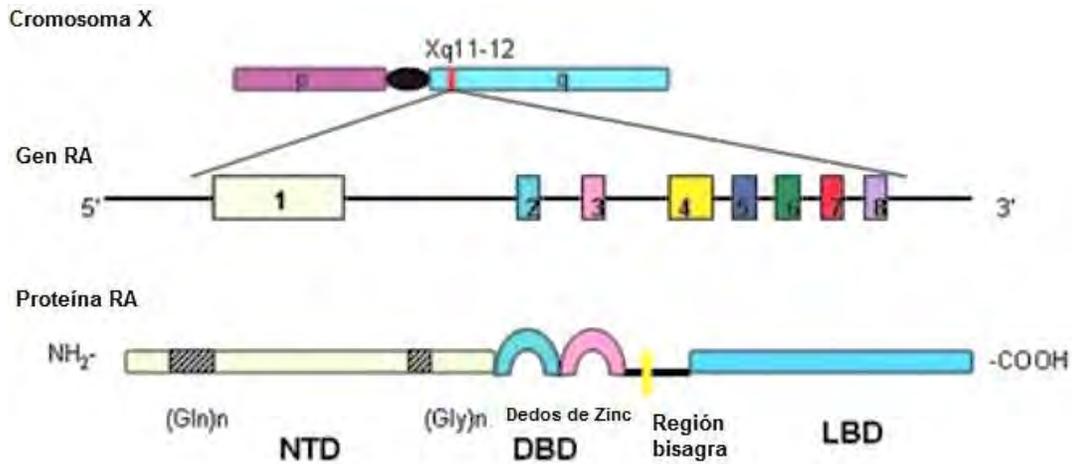


Figura 4. Receptor de Andrógenos Humano. El gen del receptor de andrógenos se encuentra en el brazo largo del cromosoma X (Xq11-12) y es codificado por 8 exones. Similarmente a otros receptores nucleares, consiste en muchos dominios funcionales: el dominio NTD, el dominio DBD, el dominio LBD y una región bisagra (Adaptada de Galani, A., *et al.* 2008).

En la próstata, el efecto de los andrógenos inicia con el transporte de la testosterona desde la circulación hacia la glándula. La testosterona es biotransformada a DHT en el estroma, por la acción de la enzima 5α -reductasa, y transportada por difusión pasiva al citoplasma de la célula epitelial. En el citoplasma, los monómeros del AR están inactivos debido a que están unidos a proteínas llamadas chaperonas, como las Hsp 90, Hsp 70, Hsp 56, p23, TPR (Galani, A., *et al.* 2008).

Estas chaperonas “secuestran” al AR e impiden que se lleve a cabo la actividad transcripcional, pero también inducen una conformación de alta afinidad para el ligando. Cuando la DHT, o la testosterona, se unen al AR éste sufre un cambio conformacional, las chaperonas se disocian y el AR es fosforilado, sólo así se activa y se transloca al núcleo. En el núcleo, el AR se dimeriza y se une a secuencias específicas del DNA conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE) para llevar a cabo la transcripción y posterior síntesis de las proteínas. El AR también interactúa con coactivadores (CoA) o factores de transcripción que ayudan a modular su actividad. La estabilidad del AR es mantenida por la fosforilación y se ha mostrado que el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 (IGF-1) y la interleucina 6 (IL6) participan

aumentando la actividad del AR a través de la fosforilación del mismo receptor o de sus correguladores (CoR). Gracias al mecanismo de acción del AR en la próstata, éste es capaz de regular la expresión de varios genes que conllevan a la síntesis de proteínas implicadas en estimular el desarrollo y mantener el tamaño y función secretora de la próstata. Así, por ejemplo, el gen que codifica para el antígeno prostático específico (PSA) tiene un ARE por lo cual el AR es capaz de reconocer y regular la expresión de este gen e inducir la síntesis de la proteína (Figura 5) (Rojas F., *et al.* 2011).

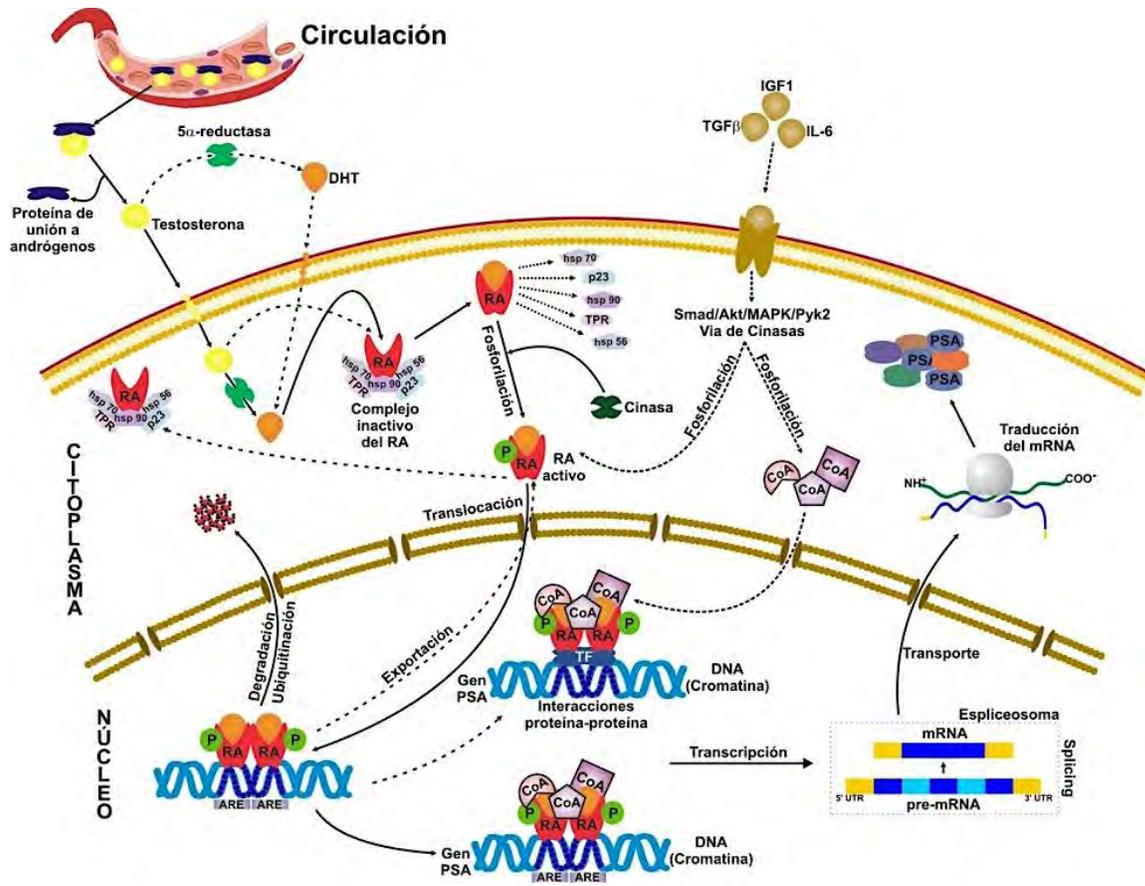


Figura 5. Mecanismo de acción del AR en una célula prostática (Adaptada de Weigel y Moore, *et al.* 2007).

A pesar de que el AR media los efectos biológicos de los andrógenos para el desarrollo adecuado de las células epiteliales, manteniendo la estructura y función normal de la próstata, también participa en el desarrollo y progresión de patologías de la misma asociadas con la edad del hombre como son la HPB y el CaP (Weigel y Moore, *et al.* 2007).

2.3 Anomalías de la Próstata

2.3.1 Hiperplasia Prostática Benigna

Como ya se mencionó anteriormente, a partir de los 40-45 años la próstata puede crecer rápidamente dando lugar a la HPB. La HPB, puede comprimir la uretra y es la responsable de la aparición de síntomas urinarios (problemas al orinar). La frecuencia de aparición de HPB aumenta conforme mayor es la edad del varón (Rodríguez M., *et al.* 2016).

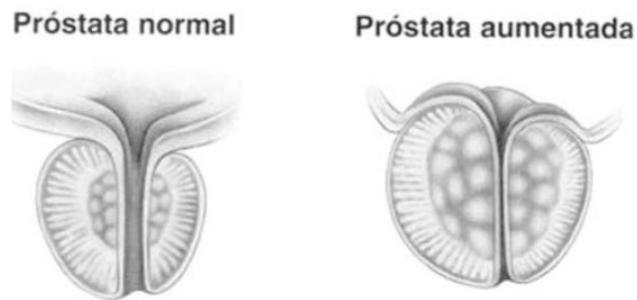


Figura 6. Glándula prostática normal y con hiperplasia benigna (Adaptado de Rodríguez M., *et al.* 2016).

2.3.2 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata es el tumor maligno más frecuente en el varón. Se sabe que este padecimiento es la sexta causa de muerte por neoplasias malignas y ocupa el segundo lugar en incidencia en hombres a nivel mundial. En cuanto a México, representa la primera causa de muerte e incidencia debido a neoplasias malignas en el varón, como se puede observar en la figura 7 (GLOBOCAN, 2012).

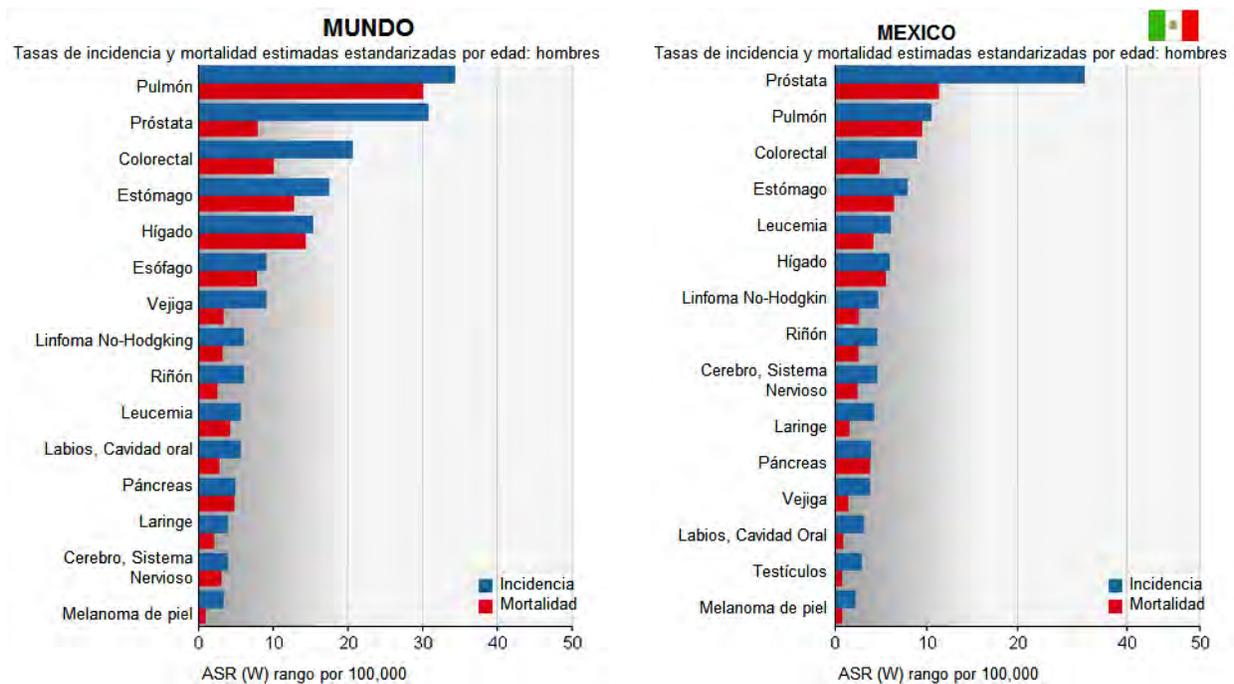


Figura 7. Gráficas de la tasa de incidencia y mortalidad del cáncer en México y a nivel mundial. El ASR hace referencia a la tasa estandarizada por edad, la cual es una medida resumen de la tasa que la población tendría si tuviera una estructura de edad estándar (Adaptada de GLOBOCAN, 2012).

La prevalencia en CaP ha aumentado debido al crecimiento demográfico, el incremento de la expectativa de vida y por los cambios en el estilo de vida de las personas. Existen algunos factores que pueden aumentar el riesgo a desarrollar CaP (Junta editorial de Cáncer, 2014), tales como:

1. Edad: La probabilidad de tener CaP aumenta rápidamente después de los 50 años. Más del 80% de los casos se diagnostican en hombres de 65 años o más.
2. Raza/Origen étnico: El CaP ocurre con más frecuencia en los hombres de raza negra y en hombres del Caribe con ascendencia africana que en los hombres de otras razas.
3. Antecedentes familiares: Parece ser que en el CaP puede haber un factor hereditario o genético.
4. Geografía: El CaP es más común en Norteamérica y en la región noreste de Europa, Australia, y en las islas del Caribe. Es menos común en Asia, Centroamérica y Sudamérica. Las razones aún no son claras, pero se cree que factores como el estilo de vida y el uso más intenso de pruebas de detección en países desarrollados sea la causa.
5. Obesidad
6. Tabaquismo (American Cancer Society, 2015).

2.3.2.1 Historia Natural del Cáncer de Próstata

Las principales herramientas de diagnóstico de CaP son la concentración sérica de PSA, el tacto digital rectal y la biopsia. Es necesario el uso de todas ellas para poder tener un diagnóstico certero de CaP.

1. *Antígeno Prostático Específico*: El PSA tiene un peso de 33 KDa, y se trata de una glicoproteína producida solamente por las células epiteliales prostáticas que lisa el coágulo del material eyaculado. En condiciones fisiológicas normales, el PSA se encuentra en la circulación sistémica en cantidades menores a 1 ng/mL. Sin embargo, el nivel sérico de PSA puede verse aumentado después de la eyaculación o en patologías de la próstata como HPB y CaP. Se ha adoptado ampliamente un valor de corte de 4 ng/mL, ya que la mayoría de los hombres saludables tienen concentraciones de PSA en circulación sistémica menores a 4ng/mL y la probabilidad de tener CaP aumenta a medida que el PSA aumenta. A pesar de esto, más del 20% de los pacientes diagnosticados con CaP tienen niveles de PSA por debajo de este valor, es por eso que esta prueba debe acompañarse del examen digital rectal y de una biopsia para confirmar la presencia o ausencia de CaP (Saenz, E., 2012, Aslam N., *et. al.*,2015 y Schroeder, U., 2012).
2. *Tacto Digital rectal*: El tacto rectal sigue siendo la base del diagnóstico de CaP debido a su pronta disponibilidad, bajo costo y riesgo, además de su contribución para detectar el cáncer en los varones con niveles de PSA normales o mínimamente altos. Este examen también se utiliza para diagnosticar la HBP. En este examen se buscan anormalidades de la próstata, tales como endurecimientos (Saenz, E., 2012).
3. *Biopsia*: La biopsia se realiza con una aguja guiada por ecografía transrectal y es el estándar de oro para la detección del CaP.

Una vez que se ha diagnosticado este padecimiento, la decisión de tratamiento dependerá de varios factores, como lo son el estadio clínico del cáncer (concentración de PSA, grado del tumor, extensión de la próstata afectada por el cáncer y si el cáncer se diseminó hasta otras partes del cuerpo), si el cáncer recién se diagnosticó o reincidió, así como la expectativa de vida del paciente (Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU., 2015).

De manera general al inicio, cuando se tiene un CaP localizado y asintomático, el cual se caracteriza por ser sensible a la castración y no ser metastásico, las terapias por las que se optan son:

- La cirugía para extirpar la próstata, el tejido circundante y las vesículas seminales (prostatectomía radical).
- La radioterapia, en donde se utilizan rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células cancerosas o impedir que crezcan

Cuando se tiene un volumen tumoral más grande, el primer escalón de tratamiento está constituido por la depleción androgénica para tratar de disminuir el volumen tumoral. Su mecanismo de acción se basa en el hecho de que los andrógenos estimulan la síntesis de DNA y proliferación celular y su supresión desencadena el fenómeno de apoptosis. La deprivación androgénica se puede conseguir mediante cuatro mecanismos diferentes como son la inhibición de la síntesis de andrógenos, el bloqueo periférico de los receptores de andrógenos, la depleción de andrógenos en órganos productores y la interacción con los mecanismos de regulación fisiológica de la producción androgénica. A nivel práctico y clínico se traduce en dos posibilidades: la castración quirúrgica o el tratamiento con fármacos hormonales. Algunos fármacos para la deprivación androgénica incluyen:

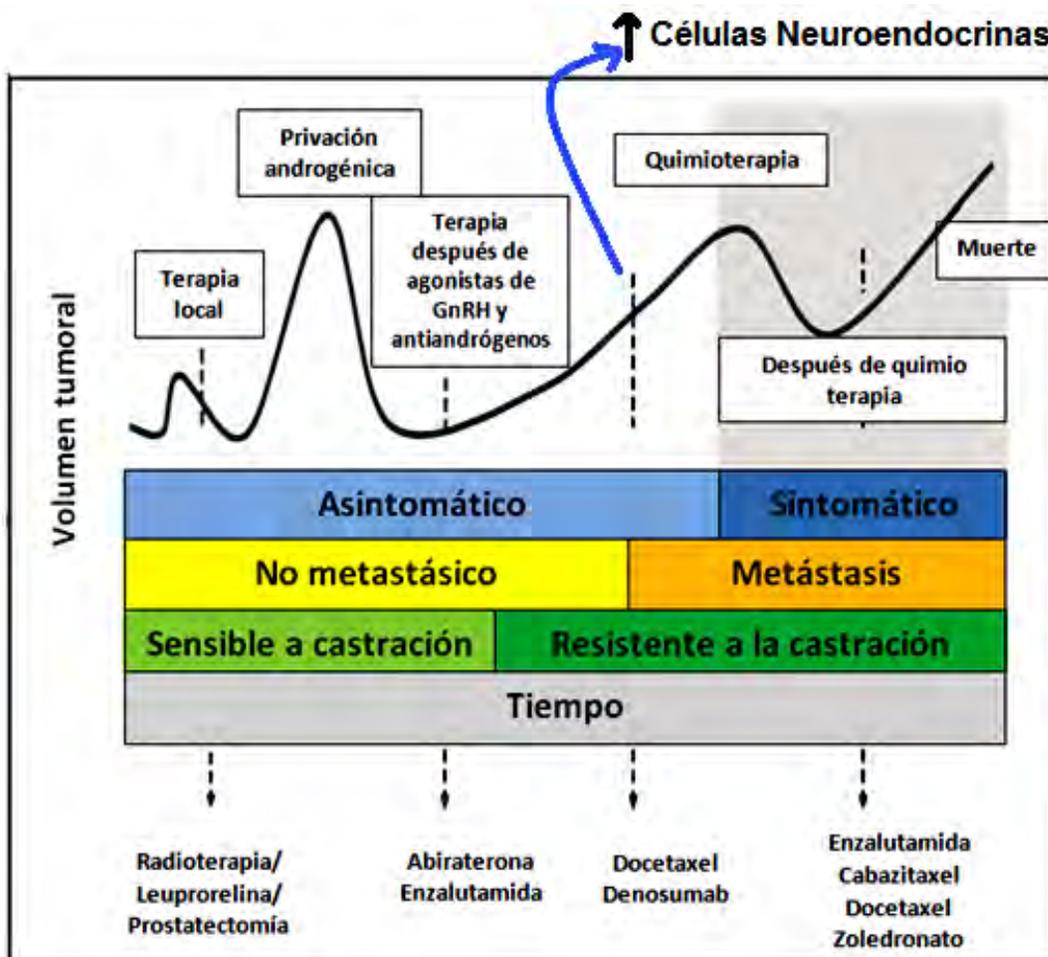
- Estrógenos: Como el dietilestilbestrol
- Los agonistas o análogos de la LHRH los cuales pueden detener la producción de testosterona en los testículos. Algunos ejemplos son la leuprolida, la goserelina, la triptorelina y la buserelina.
- Antiandrógenos para impedir la acción de los mismos. Existen de dos tipos, los esteroides, como acetato de ciproterona, acetato demegestrol, y los no esteroideos, como la flutamida, la bicalutamida, la enzalutamida y la nilutamida.
- Los inhibidores de la esteroideogénesis tales como el ketoconazol y la aminoglutetimida (Rodríguez M., Ferrer E., *et. al.*, 2003).

A pesar de esto, la mayoría de los pacientes tratados con una terapia de depleción androgénica desarrollarán resistencia a este tratamiento en un periodo de 18-24 meses entrando así a una etapa donde el CaP se vuelve independiente de los andrógenos (o resistente a la castración), es en este punto donde se ha observado un incremento

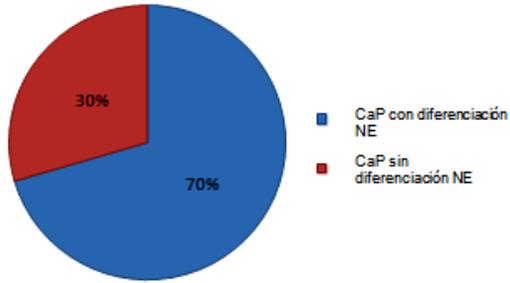
significativo en el número de células NE presentes y este hecho está relacionado a un mal pronóstico y una supervivencia media de menos de un año. De hecho, está bien documentado (Ito T., *et al.*, 2001) que, en un estudio con muestras de 137 pacientes, 70.5% de 68 pacientes tratados con terapia hormonal por un periodo de 13 meses mostraron diferenciación NE, 44% de 25 pacientes tratados con terapia hormonal por un periodo menor a 12 meses mostraron diferenciación NE y el 31.8% de los 44 pacientes son terapia hormonal presentaron diferenciación NE. Estos datos sugieren colectivamente que la terapia de depleción androgénica incrementa la diferenciación NE de las células de CaP.

Cuando el CaP es metastásico, sintomático y andrógeno independiente (o resistente a la castración) el tratamiento por el cual se opta es la quimioterapia (figura 8) (Rodríguez, M., *et al.*, 2013, D'Antonio J., *et al.*, 2008, Matei D., *et al.* 2012 y National Cancer Institute, 2015).

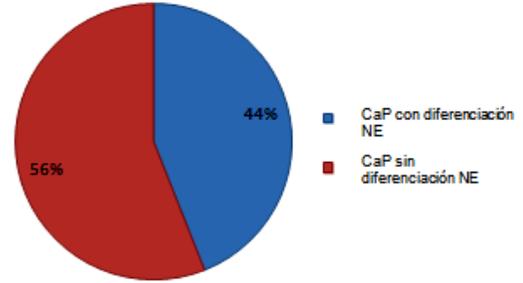
A



B Pacientes que recibieron terapia hormonal por más de 13 meses



Pacientes que recibieron terapia hormonal por menos de 12 meses



Pacientes que no recibieron terapia hormonal

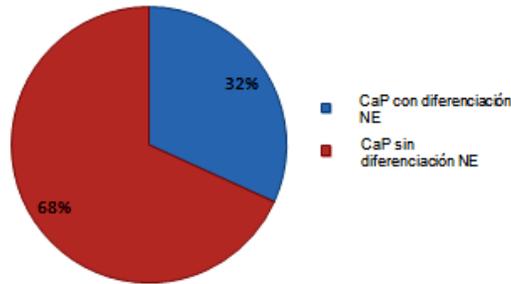


Figura 8. Historia natural, tratamiento del cáncer de próstata y casos de CaP reportados con diferenciación NE. **a)** En esta figura se pueden observar las etapas características del CaP, así como los tratamientos por los que se opta en cada etapa. Cuando el cáncer de próstata se vuelve independiente a andrógenos hay un incremento notable de las células neuroendocrinas. **b)** En un estudio realizado, los pacientes que recibieron terapia hormonal por más de 13 meses mostraron diferenciación NE. Estos datos sugieren colectivamente que la terapia de depleción androgénica incrementa la diferenciación NE de las células de CaP (Ito T., *et al.*, 2001 yD., Matei D., *et al.* 2012).

2.3.2.2 Cáncer de Próstata Andrógeno Independiente

Como se mencionó anteriormente, las células del CaP necesitan de los andrógenos para crecer y sobrevivir. El crecimiento del CaP depende de la proporción de células que proliferan y mueren; los andrógenos son los principales reguladores de esta proporción estimulando proliferación e inhibiendo apoptosis. La depleción androgénica causa la regresión del cáncer porque sin los andrógenos, la proporción de células que proliferan es menor que las que mueren, permitiendo la eliminación de estas células. Sin embargo, en muchos hombres, la terapia de depleción androgénica falla, dando lugar así al CaP andrógeno independiente, el cual es una forma letal de CaP que progresa y da lugar a la metástasis. En este punto, no existe una terapia efectiva (Feldman, B., Feldman, D., 2001).

Existen diversos factores que desencadenan la andrógeno independencia, la modificación genética es uno de ellos. Es posible que, como en muchos otros tipos de cáncer, los tumores prostáticos inicialmente seleccionen cambios genéticos que aumenten la posibilidad de mutaciones posteriores. Investigaciones recientes apoyan la idea de que la terapia de depleción androgénica proporciona una presión selectiva sobre la ruta de señalización de los andrógenos reactivando así el AR. Es por esto que se han caracterizado algunos mecanismos por los cuales se puede llegar a la andrógeno independencia, estos incluyen la amplificación del AR que resulta en la sobreexpresión del AR y la capacidad incrementada de unirse a bajos niveles de andrógenos circulantes dentro del cuerpo, alteraciones estructurales en el AR que induce interacciones promiscuas con otros esteroides, y la activación del AR hormono-independiente inducida por factores de crecimiento (por ejemplo: el factor de crecimiento epidermal) y los neuropéptidos [por ejemplo: neurotensina y el péptido liberador de gastrina (GRP)] (figura 9) (Katsogiannou M., Ziouziou, H.; *et. al.*, 2015 y Feldman, B., Feldman, D., 2001).

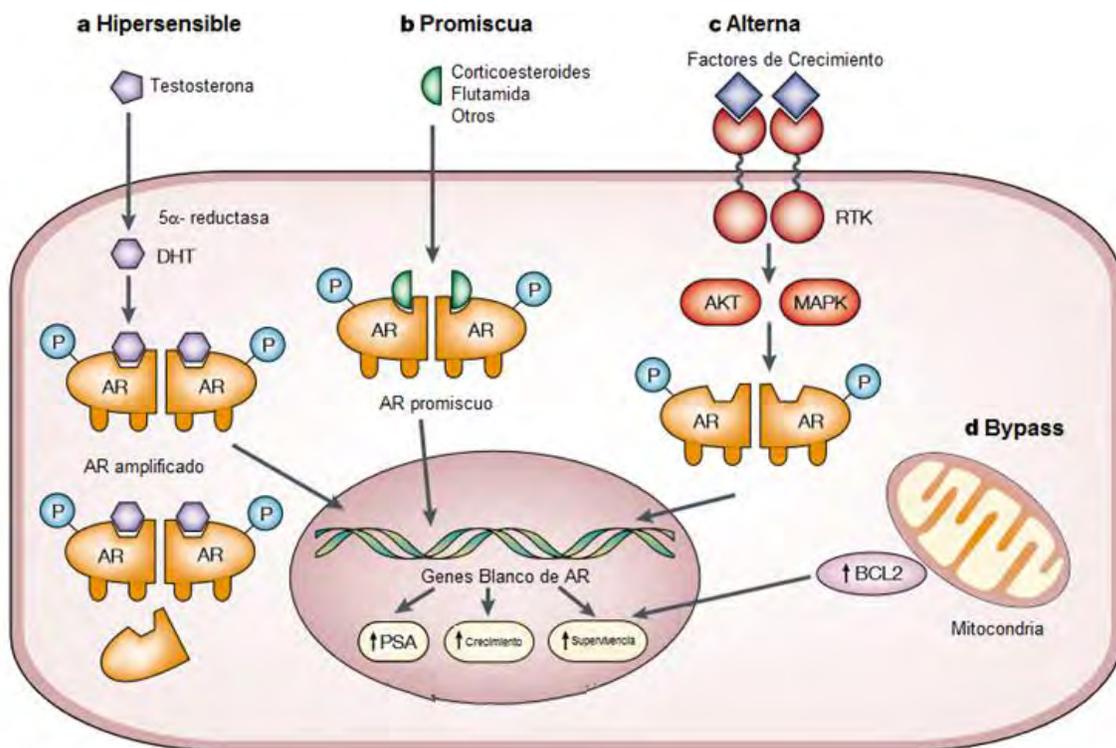


Figura 9. Cuatro posibles mecanismos de andrógeno independencia. **a)** En la ruta hipersensible, más AR es producido (usualmente por amplificación génica), o el AR incrementa su sensibilidad para compensar los bajos niveles de andrógenos, o más testosterona es convertida a un andrógeno más potente, la DHT. **b)** En la ruta

promiscua, la especificidad del AR es ampliada, por lo que puede ser activada por moléculas no androgénicas que están normalmente presentes en la circulación. **c)** En la ruta alterna, receptores tirosina cinasa son activados, y el AR es fosforilado por la ruta de AKT (proteína cinasa B) o por la de MAPK, produciendo un AR ligando independiente. **d)** En la ruta bypass, rutas de supervivencia paralelas, como las que involucran proteínas anti-apoptóticas como BCL2, eliminan la necesidad del AR por su ligando (Adaptada de Feldman, B., Feldman, D., 2001).

2.4 Transdiferenciación Neuroendocrina

Aunque la próstata sana contiene células NE, existe evidencia que soporta la idea de que estas células se someten a una transformación que da lugar al CaP neuroendocrino. Múltiples estudios han sugerido que bajo presión selectiva de la inhibición del AR en estados tardíos del CaP andrógeno independiente, el CaP se puede “transdiferenciar” (Transdiferenciación es un proceso donde las células pueden regresar a un punto donde pueden cambiar de linaje para poder diferenciarse a otro tipo celular) a un CaP neuroendocrino, el cual no depende del AR para sobrevivir y proliferar. Este proceso de transdiferenciación está definido por un número de características patológicas y clínicas, alteraciones morfológicas y moleculares de las células tales como aparición de extensiones tipo dendritas, re arreglos TMPRESS2-ERG, la pérdida del AR y/o regulación de los genes blanco del AR, la pérdida de RB1, la amplificación de *NMYC* y *AURKA*, y la inducción de programas de diferenciación neuronal (Bishop, J., Davies, A., *et al.*, 2015).

Además, las células NE secretan neuropéptidos, tales como el péptido liberador de gastrina (GRP), neurotensina (NT), neurolasa neuro específica (NSE), cromogranina A y B (CgA y CgB) y adrenomedulina. Se ha descrito que estos neuropéptidos inducen efectos mitogénicos como factores de crecimiento paracrinós y autocrinós en las células del CaP vía activación del AR. Además, las células NE pueden promover el crecimiento de tumores sensibles a la castración en ratones que fueron previamente castrados incluso cuando son inyectadas en el lado opuesto del tumor, sugiriendo así mecanismos endocrinos y paracrinós. Datos recientes soportan la idea de una regulación al alta de la ruta neuroendocrina después de la supresión del AR, pero el rol preciso de estas células en la progresión del CaP sigue siendo incierto, es por eso que para fines de esta tesis se abordara esta teoría como mecanismo de andrógeno independencia (Bishop, J., Davies, A., *et al.*, 2015, D’Antonio J., *et al.*, 2008, Shen, R., *et al.* 1997 y Katsogiannou M., Ziouziou, H.; *et al.*, 2015).

Tabla 2. Mecanismos de desarrollo de la andrógeno independencia. En esta tabla se muestra un resumen de los mecanismos por los cuales una célula se puede volver andrógeno independiente.

TIPO	RUTA	DEPENDENCIA DE LIGANDO	DEPENDENCIA DEL AR	MECANISMO
1	Ruta hipersensible	Dependiente de andrógenos	Dependiente de AR	-Amplificación del AR -AR más sensible -DHT incrementada
2	Ruta promiscua	-Pseudo-andrógenos -Antagonistas de andrógenos -Corticoesteroides -Mutaciones en los correguladores	Depende de un AR mutado	-Especificidad del AR a no-andrógenos
3	Ruta alterna	-Andrógeno independiente -Ligando independiente	Dependiente del AR	-Mutaciones en PTEN -Amplificación de <i>HER-2/neu</i> -Al activar PI3K -Al activar MAPK -Co-reguladores mutantes
4	Ruta bypass	Andrógeno independiente	Independiente del AR	Rutas paralelas o alternativas: -Sobreexpresión de <i>BCL2</i> -Activación de otros oncogenes -Inactivación de los genes supresores de tumor
5	Transdiferenciación neuroendocrina	Andrógeno independiente	Dependiente del AR	Células neuroendocrinas que proveen de neuropéptidos, tales como: -NT -GRP

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Como ya se había mencionado, las células NE representan una población muy pequeña del compartimiento epitelial de la glándula prostática normal y se cree que juegan un rol importante en la regulación de su crecimiento y diferenciación; también se ha reportado que existe un incremento en la población de células tipo NE en el CaP, esto se correlaciona con la progresión tumoral, un mal pronóstico y el estado andrógeno independiente; de hecho, muchos reportes han indicado que los niveles de marcadores celulares NE en el suero de pacientes con CaP son marcadores potenciales de diagnóstico y pronóstico de CaP andrógeno independiente, particularmente cuando el PSA es negativo (Yuan T., *et. al.* 2006, Santoni M., *et. al.* 2014).

Las células tipo NE se pueden distinguir de las células epiteliales de su alrededor por el gran número de gránulos secretores intracelulares y las elongaciones tipo dendrita que están extendidas debajo o entre las células epiteliales secretoras adyacentes. Por técnicas de inmunohistoquímica puede localizarse la producción de moléculas neurosecretoras como CgA, CgB, NSE. Estas células expresan y secretan sustancias reportadas como factores de crecimiento (VEGF) y una amplia variedad de neuropéptidos (GRP, somatostatina, NT, NSE, gastrina, entre otros) liberados por exocitosis como hormonas o pro hormonas por fusión de los gránulos con la membrana celular, alcanzado a las células blanco a través de distintos mecanismos, endocrinos, autocrinos o paracrinos, regulando así la secreción diferenciación, desarrollo, crecimiento prostático y muerte celular (los efectos mitogénicos autocrinos y paracrinos de los neuropéptidos contribuyen a la proliferación andrógeno independiente de las células de CaP adyacentes) (Figura 10). Específicamente, se ha reportado que la NT y el GRP actúan como factores de supervivencia y migración para el CaP andrógeno independiente, el GRP induce la expresión de metaloproteinasas y también incrementa la capacidad de invasión de las células. Estos neuropéptidos transmiten sus señales a través de receptores acoplados a proteínas G, los cuales son frecuentemente expresados en CaP y activan aberrantemente el AR en ausencia de andrógenos (Yang J., *et al.* 2009, Lee L., *et al.* 2001, Lipianskaya J., *et. al.* 2014, Santoni M., *et. al.* 2014, Noordzij M., *et al.* 1995, Ramírez L., *et al.* 2013 y Heasley L. 2001).

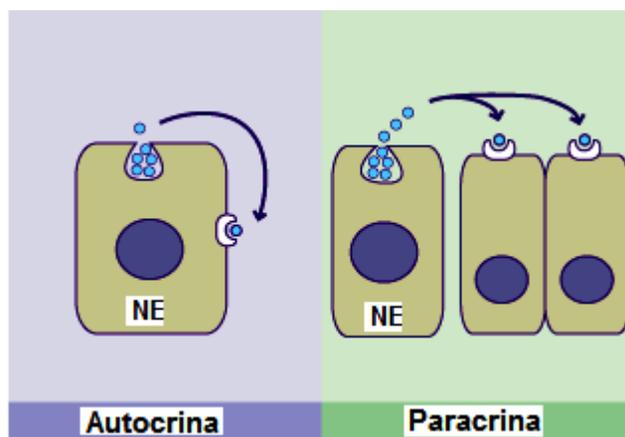


Figura 10. Influencia de una célula neuroendocrina en las células vecinas. La acción de los neuropéptidos liberados de por las células NE pueden ser de manera paracrina en las células vecinas no NE por activación de los receptores de neuropéptidos y autocrina (Adaptado de Noordzij M., *et al.* 1995).

Aunque el origen de las células NE y el mecanismo molecular de su enriquecimiento aún es poco entendido, evidencia reciente incluyendo cultivo celular *in vitro*, modelos animales *in vivo* así como análisis de muestras clínicas indica que las células de CaP pueden someterse a un proceso de transdiferenciación para convertirse en células tipo NE, las cuales adquieren un fenotipo parecido al NE y expresan marcadores NE. El proceso de transdiferenciación de una célula tipo epitelial a una con fenotipo parecido al NE puede ser considerado una consecuencia de presión selectiva inducida por todos los tratamientos causando una caída en los niveles de andrógenos. Los eventos que dirigen la patogénesis de la transdiferenciación NE incluyen la pérdida del AR y la expresión de proteínas reguladas por andrógenos, la inducción de programas neuronales y NE, la pérdida de supresores de tumor (TP53, RB1, PTEN), la activación de programas mitóticos y la inestabilidad genómica. (Shen, R., *et al.* 1997, Yuan T., *et al.* 2007, Yang J., *et al.* 2009, Yuan T., *et al.* 2006, Santoni M., *et al.* 2014, Noordzij M., *et al.* 1995, Chang D., *et al.* 2015, Ramírez L., *et al.* 2013).

3.1 Diferencias en las características bioquímicas y el origen de las células tipo NE y las células NE normales.

Varios investigadores han descrito y caracterizado las células prostáticas NE y sus funciones en estados fisiológicos y patológicos, sin embargo, un tema poco tratado es cómo es que las células tipo NE difieren de las células NE normales. Primeramente, estudios inmunohistoquímicos han mostrado que las células NE expresan citoqueratina 5, un marcador de las células basales, mientras que las células tipo NE muestran características de células secretoras luminales expresando fosfatasa ácida prostática y citoqueratina 18 (específica de las células secretoras luminales). Segundo, comparando a las células NE normales (sin actividad proliferativa y tumorigénica) con las células tipo NE del CaP, estas últimas son altamente agresivas y exhiben actividad tumorigénica. Por último, mientras que las células NE de la próstata normal no expresan la proteína antiapoptótica Bcl-2, las células tipo NE sí lo hacen (confiriéndoles así resistencia a la apoptosis), además de que estas últimas también expresan AMACR, una enzima involucrada en la β -oxidación de ácidos grasos (Tabla 3) (Yuan T., *et al.* 2007 y Ramírez L., *et al.* 2013).

Tabla 3. Comparación de las células NE normales (próstata) y las células tipo NE (CaP).

	CÉLULAS NE NORMALES	CÉLULAS TIPO NE
SIMILITUDES	<ul style="list-style-type: none"> -Carecen de la expresión del AR y PSA -Efectos autocrinos y paracrinos -Actividad no proliferativa -Morfología tipo neuronal -Expresión de marcadores NE (NSE, CgA, CgB, serotonina, NT, GRP) 	
DIFERENCIAS	<ul style="list-style-type: none"> -Expresión de marcadores celulares basales -No agresivas -Sin expresión de Bcl-2 -Expresión baja de GRP 	<ul style="list-style-type: none"> -Expresión de marcadores luminales celulares -Muy agresivas -Expresión de Bcl-2 elevada -Expresión alta de GRP

Las diferencias entre las células tipo NE del CaP y las células NE normales pueden ser atribuidas a sus orígenes, como se muestra en la figura 12. Estudios recientes indican que las células NE, las células basales y luminales se originan de células madre de la capa basal. También es posible que las células NE normales se originen de un linaje celular independiente (origen neurogénico) a diferencia de las células secretoras y basales. Se ha sugerido que las células de adenocarcinoma, pueden someterse a un proceso de transdiferenciación al fenotipo parecido al NE debido a agentes terapéuticos como la depleción androgénica, agentes quimioterapéuticos y la radioterapia (Yuan T., *et al.* 2007, Chang D., *et al.* 2015).

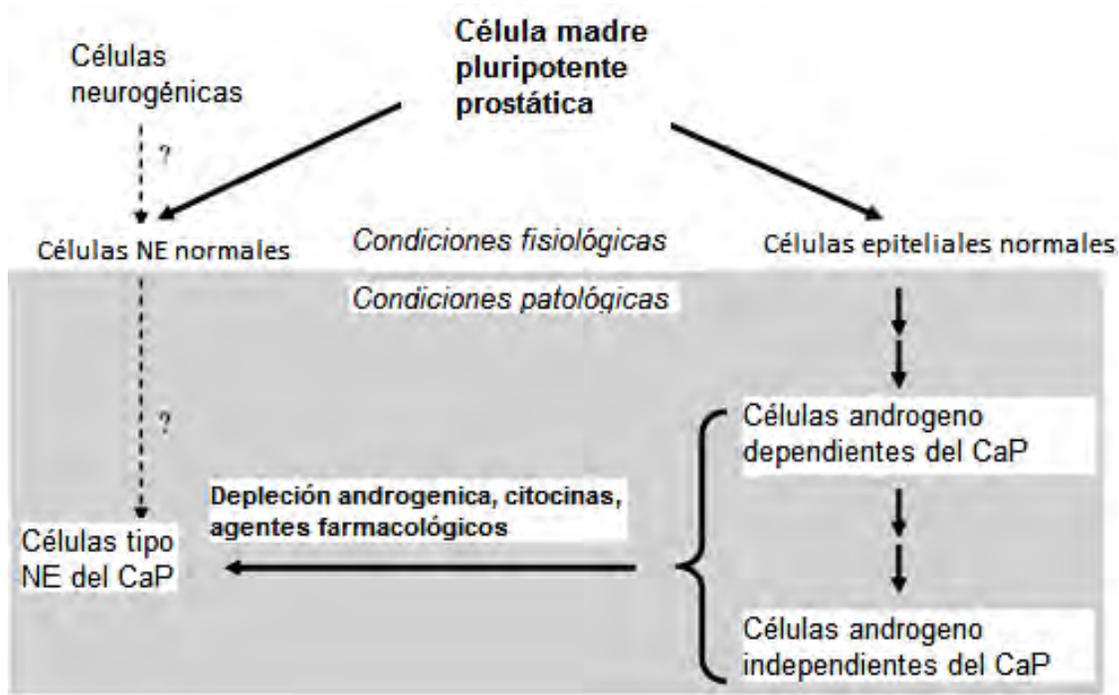


Figura 12. Modelo del origen (es) de las células tipo NE (Adaptado de Yuan T., *et al.* 2007).

3.2 Participación de los neuropéptidos en el CaP y otros tipos de cáncer

Los neuropéptidos funcionan periféricamente como factores autocrinos, paracrinos y endocrinos que regulan diversos procesos fisiológicos y actúan como neurotransmisores o neuromoduladores en el sistema nerviosos. En la mayoría de los casos, los receptores que median la señal de los neuropéptidos son miembros de la superfamilia de proteínas G acopladas a receptores de 7 dominios transmembranales. La señalización autocrina y paracrina dirige la estimulación del crecimiento de las células tumorales, evidencia reciente

sugiere que los neuropéptidos poseen acciones fisiológicas definidas en el cáncer de pulmón, el cáncer gástrico, el cáncer colorrectal, el cáncer pancreático y el CaP. En las siguientes tablas (Tablas 4 y 5) se resume algunos tipos de cáncer en los cuales están involucrados los neuropéptidos (Thomas R., *et al.* 2003, Heasley L. 2001, Schroeder R., *et al.* 2011 y Markwalder R. *et al.*, 1999).

Tabla 4. Participación de los neuropéptidos en distintos tipos de cáncer

TIPO DE CÁNCER	NEUROPEPTIDO INVOLUCRADO	EVIDENCIA REPORTADA
Cáncer Gástrico	Gastrina	El crecimiento de este tipo de cáncer es estimulado por concentraciones farmacológicas y fisiológicas de gastrina o de análogos de gastrina tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> . Se han identificado receptores de gastrina en el cáncer gástrico humano y el tratamiento del adenocarcinoma pobremente diferenciado con gastrina resulta en un incremento del tamaño y peso del tumor, este efecto es bloqueado por antagonistas del receptor de gastrina.
Cáncer Pancreático	Gastrina	Estudios experimentales han demostrado que existen receptores para gastrina en este tipo de cáncer. Estudios <i>in vitro</i> han demostrado que este neuropéptido puede estimular el crecimiento de distintas líneas celulares de este tipo de cáncer, además al aplicar un antagonista del receptor de gastrina se desfavorece la invasividad y metástasis del mismo.
Cáncer Colorrectal	Gastrina NT	La gastrina estimula el crecimiento de este tipo de cáncer el cual posee receptores de gastrina de alta afinidad. La administración del antagonista del receptor de gastrina, proglumida, inhibe el crecimiento de tumores <i>in vivo</i> y prolonga la supervivencia de ratones.
Cáncer de Pulmón	GRP	Existe un gran número de estudios que unen al péptido liberador de gastrina en la regulación de cáncer de pulmón de células pequeñas sugiriendo que este péptido puede actuar de manera autocrina y paracrina para estimular el crecimiento. Antagonistas del receptor de este péptido ha demostrado inhibir la proliferación de las células de este tipo de cáncer.
Cáncer de Mama	Gastrina	Se ha encontrado niveles postprandiales de gastrina incrementados en mujeres con cáncer de mama en estado I y II. Este incremento de gastrina es independiente de la dieta y sugiere que la hipergastrinemia puede contribuir a la carcinogénesis de este tipo de cáncer.
Cáncer de Próstata	NT GRP	Se ha demostrado que grupos de células tipo NE producen y secretan NT después de la depleción androgénica, además se ha demostrado que las células LNCaP expresan el receptor de NT funcional que es estimulado después de la administración de NT provocando así la proliferación de células de CaP en condiciones de ausencia de andrógenos. Estos datos sugieren el uso potencial de antagonistas del receptor de NT como terapia potencial contra el cáncer de próstata andrógeno independiente. Evidencia sugiere que el péptido liberador de gastrina puede afectar el crecimiento del CaP, estos hallazgos sugieren que GRP puede jugar un rol directo en la proliferación de las células de CaP, ya que, de manera similar, al realizar experimentos con antagonistas del receptor de GRP, se disminuyó el volumen de tumores xerográficos de células DU145.

Tabla 5. Información de algunos neuropéptidos.

NEUROPEPTIDO	DONDE SE ENCUENTRA	DESCRIPCIÓN
Péptido liberador de gastrina (GRP)	<i>En humanos:</i> -Estómago -Páncreas -Vesícula biliar y vías biliares -Próstata	Se encuentra ampliamente distribuido en las células neurales y endocrinas del tracto gastrointestinal. El péptido liberador de la gastrina está conformado por 27 aminoácidos con un fragmento terminal C, es análogo al tetradecapéptido bombesina encontrado en anfibios. Ambos péptidos son ligandos naturales del receptor de GRP. Es considerado un neurotransmisor. Actúa como factor de crecimiento tumoral en el cáncer del pulmón a células pequeñas y en CaP.
Neurotensina (NT)	<i>En humanos:</i> -Tracto gastrointestinal - Próstata -Tejido nervioso	La neurotensina es un péptido de 13 aminoácidos que se aisló por primera vez en el hipotálamo. Actúa sobre varias actividades biológicas (glucoreguladoras, hemodinámicas, músculo liso, neuroendocrinas, termoreguladoras y sistemas secretores gástricos).
Gastrina	<i>En humanos:</i> -Estómago	Hormona polipeptídica que estimula la secreción de HCl y pepsinógeno

3.3 Transdiferenciación NE y el CaP andrógeno independiente

Varios grupos de investigación han tratado de dilucidar cómo es que se lleva el proceso de transdiferenciación neuroendocrina y como es que estas células ayudan en la progresión del CaP andrógeno independiente.

Shen, R. y sus colaboradores demostraron que al cultivar células LNCaP (Línea celular de próstata humana, derivada de un sitio metastásico: nódulo linfático supraclavicular izquierdo. Esta línea celular expresa el AR) en un medio de cultivo modificado con cs-FBS (suero fetal bovino Charcoal Stripped, deficiente de hormonas endógenas), éstas adquieren un fenotipo más parecido al de las células NE que al de una célula epitelial prostática. Ellos describieron que este fenómeno no es resultado de la selección de una subpoblación celular original, ya que no hubo evidencia de pérdida celular durante la transición y las células adquirieron cambios morfológicos en masa, por lo que este fenómeno es consistente con el proceso de transdiferenciación programada de las células epiteliales prostáticas a células tipo NE (Shen, R., *et al.* 1997).

Yang J. y su grupo desarrollo un modelo autocrino de neuropéptidos expresando GRP en células LNCaP y la línea resultante, LNCaP-GRP, exhibió un crecimiento andrógeno independiente con motilidad *in vivo* incrementada. Cuando esta línea se implanto ortotópicamente en ratones desnudos castrados, se produjeron tumores agresivos, los cuales expresaron GRP, PSA y AR localizado nuclearmente. Los estudios de inmunoprecipitación de cromatina de clonas LNCaP-GRP sugirieron que GRP activa y recluta el AR al promotor afín en ausencia de andrógenos y que es capaz de activar complejos de receptores tirosina cinasa Src/FAK/Etk. Por lo tanto, este grupo de investigación demostró que GRP es capaz de promover la tumorigénesis *in vivo* e *in vitro* en ambientes libres de andrógenos, y que GRP modula la activación del AR (Yang J., *et al.* 2009).

El grupo de Lee L., encontró una asociación de células NE con el CaP debido a la privación androgénica. Ellos reportaron que las células NE secretan neuropéptidos (como GRP y NT) y estos están directamente relacionados con procesos biológicos como proliferación celular, transformación e invasión. En este artículo se investigó específicamente los efectos biológicos y rutas de señalización de la GRP y NT en la línea celular LNCaP, la cual requiere andrógenos para su crecimiento. Este grupo demostró que ambos neuropéptidos pueden inducir el crecimiento de LNCaP en ausencia de andrógenos, además, la transactivación de genes reporteros dirigidos por el promotor del PSA o un promotor que lleva elementos de respuesta a andrógenos (ARE) indican que la estimulación del crecimiento está acompañada por la activación del AR. Dado que GRP no se une directamente al AR sino más bien se une a proteínas G acopladas al receptor, este grupo reportó eventos de señalización río abajo que podrían interactuar con la ruta AR. Ellos encontraron que Src, FAK y Etk/BMX juegan una parte importante de este proceso. La activación de EtK/Bmx requiere de FAK y Src, los cuales son críticos para el neuropéptido inductor de crecimiento (Lee L., *et al.* 2001).

Yuan T. y sus colaboradores encontraron que la terapia de depleción de andrógenos está asociada a un aumento de células NE en los carcinomas prostáticos; también reportaron que estas células promovían la progresión del CaP y su proliferación andrógeno independiente mediante la secreción de factores de crecimiento. Además, este grupo caracterizo tres subclonas de líneas celulares NE transdiferenciadas de células LNCaP cultivadas en un ambiente sin andrógenos, simulando así la terapia de depleción de andrógenos. Observaron que las subclonas cultivadas adquirían muchas características de las células NE vistas en los carcinomas prostáticos clínicos, como una morfología neuronal, la expresión de múltiples

marcadores NE (como la NSE, CgA, NT), la ausencia del AR y expresión de PSA junto con una alta tumorigenicidad. Estas células representan células terminalmente diferenciadas porque después de 3 meses de ser cultivadas en un ambiente con andrógenos, estas retuvieron el fenotipo parecido al NE y continuaron expresando marcadores NE. Además, este grupo propuso un mecanismo de transdiferenciación NE inducida por la ausencia de andrógenos en células de CaP sensibles a andrógenos. En un ambiente sin andrógenos, las células de CaP sensibles a los mismos pueden expresar un nivel elevado de RPTP α , el cual incrementa la actividad específica de la tirosina cinasa c-Src que permite la activación de la cascada MEK/ERK. Esto resulta en la activación de la expresión génica que facilita el cambio de fenotipo y regula al alza la expresión de muchos marcadores incluyendo NSE, NT, CgA, CgB, entre otros. Además, bajo condiciones de ausencia de andrógenos, las células CaP sensibles a andrógenos se someten a un proceso de transdiferenciación a células tipo neuroendocrinas las cuales secretan factores de crecimiento que estimulan el crecimiento andrógeno independiente y la secreción de PSA de las células de CaP adyacentes (Figura 11) (Yuan T., *et. al.* 2006).

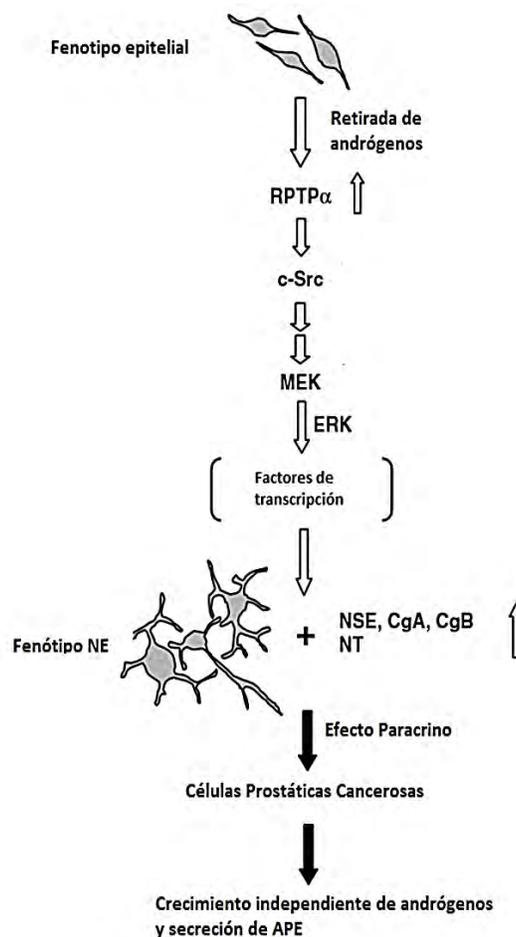


Figura 11. Mecanismo propuesto de transdiferenciación NE inducido por ausencia de andrógenos en células CaP sensibles a andrógenos. En un ambiente de depleción androgénica, las células sensibles a andrógenos del CaP expresan un nivel elevado de RPTP α , el cual incrementa la actividad específica de la tirosina cinasa s-Src lo cual permite la activación de la cascada MEK/ERK. Esto resulta en la activación de la expresión génica que facilita el cambio de fenotipo y regula al alza muchos marcadores NE como lo son NSE, CgA, CgB y NT. NSE: Neurolasina neuro específica; CgA: Cromogranina A; CgB: Cromogranina B; NT: Neurotensina, RPTP α : Receptor de la proteína tirosina fosfatasa α , es un miembro de la subfamilia de proteínas transmembranales tirosina fosfatasa, y es expresada en tejidos de mamíferos; c-Src: tirosina cinasa que se asocia a RPTP α ; (Adaptada de Yuan T., *et. al.* 2006).

M. Wright y su grupo reportó que la ausencia de andrógenos causa que las células de cáncer de próstata andrógeno dependientes adopten un fenotipo parecido alNE pronunciado, sugiriendo que el AR reprime un proceso de transdiferenciación en las células del CaP. En este artículo se mostró que el silenciamiento del AR inducido por un RNA pequeño interferente (siRNA) induce un fenotipo parecido al NE que se manifestó en el crecimiento de elongaciones tipo dendrita tanto en células de CaP humanas LNCaP andrógeno dependiente como en LNCaP andrógeno independientes. El análisis de Western Blot que realizaron reveló que la NSE, un marcador de linaje neuronal, se incrementó en las células LNCaP con el AR silenciado. Finalmente, demostraron que el silenciamiento reducía la capacidad proliferativa en las células LNCaP andrógeno dependientes y andrógeno independientes. Estos datos mostraron que el AR reprime activamente el proceso de transdiferenciación NE intrínseco en células de CaP tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo un potencial vínculo entre la activación del AR y el incremento en la frecuencia de células NE en tumores andrógeno independientes y dando así la explicación del incrementado número de células NE que se encuentra en tumores de pacientes que han sido expuestos por largo tiempo a terapias de abatimiento de andrógenos (Wright M., *et al.* 2003). Tomados en conjunto, estos hallazgos apoyan la teoría de que las células tipo NE juegan un papel muy relevante en la transición del estado del CaP dependiente de andrógenos a uno independiente. Los neuropéptidos (como GRP y NT), secretados por estas células, son capaces de actuar de una manera autocrina y paracrina en el crecimiento y diferenciación de la glándula prostática normal y cancerosa de una manera similar a como lo hacen las células NE que residen dentro del páncreas, el sistema respiratorio y gastrointestinal. Las células tipo NE en CaP expresan diversos neuropéptidos que inducen efectos mitogénicos mediante la activación del receptor de andrógenos en

células vecinas (regulación paracrina) y promueven procesos como el crecimiento, migración y transformación celular ((Yang J., *et al.* 2009, Lee L., *et al.* 2001, Lipianskaya J., *et. al.* 2014, Santoni M., *et. al.* 2014).

Por otra parte, estudios realizados en animales encontraron una relación de GABA con el CaP y el cáncer de estómago. El grupo de Yan Hu realizó experimentos con tejidos de ratones transgénicos que utilizan elementos reguladores del gen criptidina 2 (*Defcr2*) para expresar en antígeno T largo del virus de simio 40 (TAg) en células de CaP. Los ratones con el CR2-TAg desarrollaron neoplasia prostática intraepitelial a las 8 semanas de edad (1 semana después del comienzo de la expresión de TAg). Una fase invasiva siguió de 2-4 semanas después y metástasis a nódulo linfático, hígado, pulmones, cerebro y hueso después de las 16 semanas. Estudios con microarreglos revelaron que 122 mRNAs estaban incrementados dos o más veces en las muestras de próstata CR2-TAg de 16 semanas a comparación con las próstatas normales de ratones, de estos 122 mRNAs, 32 estaban relacionados con neuronas y células tipo NE, específicamente se encontraron genes relacionados a gránulos secretores tales como *Chga* y *Chgb* (los cuales codifican para CgA y CgB respectivamente) y genes relacionados con neurotransmisores como *Gad1* (el cual codifica para la ácido glutámico descarboxilasa). Al realizar ensayos de qRT – PCR y ensayos de inmunohistoquímica en las células tipo NE de las próstatas CR2-TAg y metástasis de hígado en ratones se encontró que la ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y su producto, el ácido γ -aminobutírico (GABA) se encontraban altamente expresados en las células tipo NE neoplásicas transformadas y se encontró el receptor de GABA en las células secretoras adyacentes. GABA está presente en las células NE del estómago y páncreas (células beta) y ha sido implicado en el control de la liberación de hormonas. Dos distintas formas de GAD han sido identificadas en tejidos de mamíferos: GAD65 y GAD67 (nombrados por sus masas moleculares). Cada GAD es codificada por un gen diferente *Gad1* para GAD67 y *Gad2* para GAD65. Como se mencionó, los análisis de microarreglos y qRT – PCR revelaron que los niveles de mRNA de *Gad1* (GAD67) son 40 veces más altos en CR2-TAg de 16 semanas de edad comparados con próstatas normales de la misma edad (Hu Y., Ippolito J., *et al.* 2002).

En los estudios de inmunohistoquímica, para examinar la distribución celular del producto de GAD67 y GABA, en próstatas normales y CR2-TAg, se estableció que GABA estaba presente en cantidades mayores al 80% de las células tipo NE CR2-TAg a las 16 y a las 24

semanas. Después se definieron los patrones de expresión del receptor de GABA. Los receptores de GABA_A son multisubunidades, canales de cloro regulado por ligando, mientras que los receptores de GABA_B son proteínas de 7 dominios transmembranales acoplados a sistemas de segundos mensajeros intracelulares vía proteínas G (Figura 12). El análisis de inmunohistoquímica de próstatas normales de ratón usando anticuerpos específicos para los receptores A y B revelaron que estos receptores son expresados en células secretoras, todas expresando sólo un tipo de receptor yuxtapuesto junto a otra cohorte de células secretoras expresando otro tipo. Éste patrón con los receptores de GABA sugirió así un biomarcador para identificar distintas clonas de células secretoras (Hu Y., Ippolito J., *et al.* 2002).

Con estos hallazgos (la expresión de GABA por parte de las células tipo NE transformadas y la expresión de receptores de GABA en células secretoras) se sugirió por primera vez que larutaGABAérgica podría dar un medio para la diafonía entre estos dos tipos celulares durante el curso de la tumorigénesis (Hu Y., Ippolito J., *et al.* 2002).

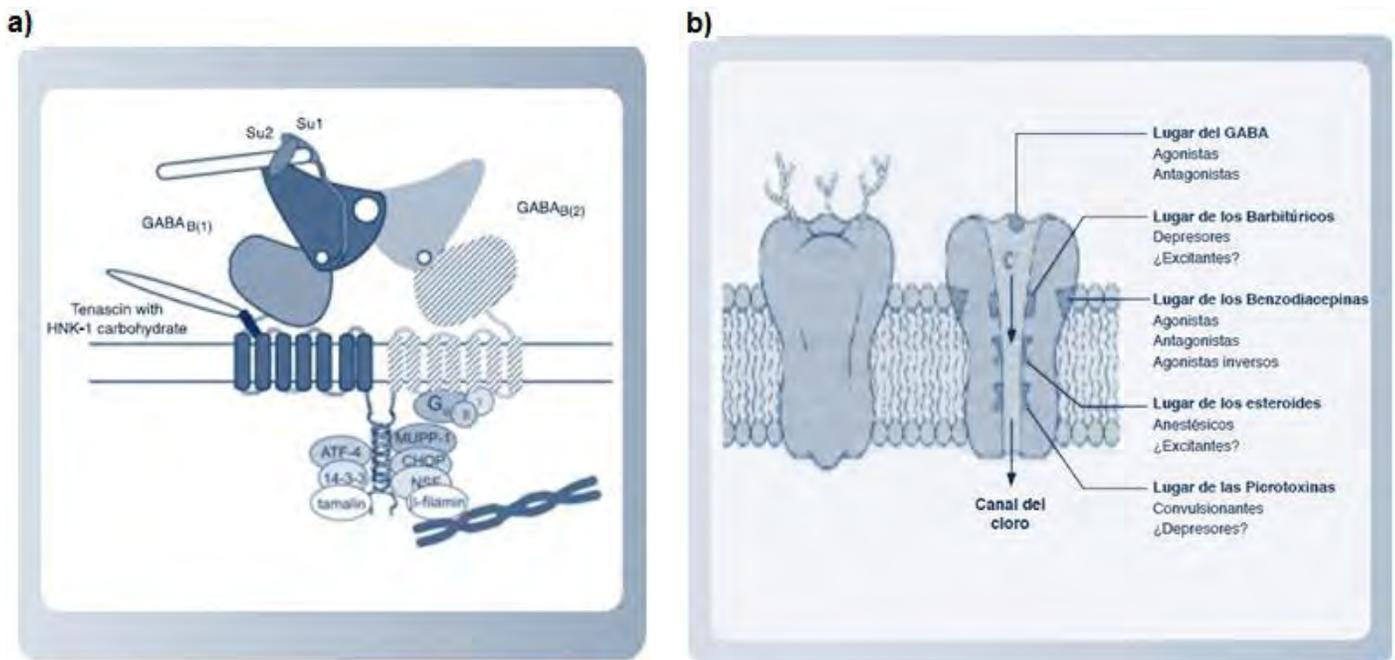


Figura 12. Receptores de GABA. **a)** Receptor GABA_B. **b)** Modelo estructural del receptor de GABA_A unido al canal de Cl⁻.

De manera análoga, las células neuroendocrinas presentes en otros órganos, como en el estómago, poseen receptores GABAérgicos y se ha demostrado que al ser estimulados las células NE son capaces de liberar neuropéptidos. El grupo de N.Weigert demostró que infusiones de GABA exógeno causaban un incremento significativo en la liberación de gastrina al estimular receptores de GABA_A del estómago de rata. Este hallazgo es de gran relevancia ya que se demostró por primera vez que GABA endógeno contribuye a la regulación vagal de la liberación de neuropéptidos en el estómago de rata (Weigert N., Schepp W., *et al.*, 1998).

Con base en estos antecedentes, en este trabajo se pretende dilucidar si GABA participa en la liberación de neuropéptidos en células de CaP con fenotipo parecido al NE, y el mecanismo por el cual lleva a cabo este proceso, ya sea por activación de la vía ionotrópica (a través del receptor de GABA_A) o metabotrópica (a través del receptor de GABA_B). Esto, haciendo uso de un modelo en células transdiferenciadas a células parecidas a NE a partir de células LNCaP sensibles a andrógenos mediante el silenciamiento del receptor de andrógenos (AR) imitando un poco la depleción de andrógenos en el entorno clínico y el modelo de Wright M., *et al.* 2003.

4. Planteamiento del Problema

La terapia de depleción androgénica en un inicio causa la muerte celular apoptótica masiva de las células tumorales prostáticas, sin embargo, es ampliamente conocido que las células que sobreviven a esta terapia se vuelven andrógeno independientes. Es en este punto donde se da un incremento significativo de células tipo neuroendocrinas, lo cual está relacionado con un mal pronóstico y una expectativa de vida del paciente muy corta (12-18 meses).

Se ha descrito en la literatura que los neuropéptidos secretados por las células parecidas a las neuroendocrinas ayudan a procesos de proliferación, transformación e invasión celular facilitando así la andrógeno independencia del cáncer de próstata. También se ha reportado que estas células presentan un incremento de los receptores GABAérgicos.

Análogamente en otros órganos, como en el estómago, se ha demostrado que al estimular la vía GABAérgica se produce la liberación de neuropéptidos, por lo que en este trabajo se pretende determinar si el sistema GABAérgico participa en el mecanismo de liberación de neuropéptidos en cáncer de próstata haciendo uso de un modelo *in vitro* de células transdiferenciadas a tipo neuroendocrinas mediante el silenciamiento del receptor de andrógenos en células LNCaP.

5. Hipótesis

Al realizar tratamientos con fármacos análogos de GABA, habrá un incremento de los neuropéptidos NT y GRP secretados por las células parecidas a las neuroendocrinas, y se probará si esto se da al estimular el receptor de GABA_A o al estimular el receptor de GABA_B, demostrando así su relevancia en la progresión del cáncer de próstata andrógeno independiente.

6. Objetivos

I. Objetivo general

1. Evaluar el papel que tiene el sistema GABAérgico en la liberación de neuropéptidos en células parecidas a las neuroendocrinas en cáncer de próstata.

II. Objetivos particulares

1. Establecer el modelo de células tipo neuroendocrinas partir de la línea celular LNCaP.
2. Validar el modelo *In vitro*.
3. Realizar tratamientos con análogos de GABA a las células del modelo *in vitro*.
4. Analizar diferencias en la secreción del péptido liberador de gastrina y la neurotensina en las células tratadas.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Cultivo Celular y Líneas Celulares

Las células LNCaP fueron obtenidas de la “American Tissue Type Culture Collection” (ATCC) y mantenidas en medio RPMI sin rojo de fenol (Sigma-Aldrich) suplementado con SFB al 10% (Biowest). Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%.

7.2 Microscopía

Las células fueron observadas con un microscopio de luz invertido Nikon eclipse TS100 a un aumento de 10X-20X y fotografiadas con una cámara Nikon D3100 como se describe en los pies de figura correspondientes

7.3 Ensayo de Transfección con siRNA AR o siRNA Control

Para este ensayo se utilizó un siRNA contra el AR y un siRNA control (siRNA no específico) (Ambion). ThermoFisher Scientific). Las células LNCaP fueron sembradas en cajas de seis pozos en una densidad de 180 000 células por pozo, fueron incubadas en medio RPMI sin rojo de fenol suplementado con SFB al 10% durante 48 h. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y transfectadas con el siRNA AR o el siRNA Control a la concentración final de 12.5mM, usando el reactivo de transfección DharmaFECT 2 (Dharmacon). Las células fueron incubadas durante 96h cambiando el medio (RPMI sin rojo de fenol suplementado con SFB al 10%) cada 24 h

7.4 Extracción de ARN total y análisis de la expresión génica por qRT – PCR

El RNA total fue obtenido de las células transfectadas con el siRNA correspondiente haciendo uso de un kit de extracción de RNA (RNAeasy kit de QUIAGEN) y siguiendo las instrucciones del fabricante. En cDNA se obtuvo retrotranscribiendo 1 µg de RNA de las

muestras con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Para la PCR cuantitativa a tiempo real se ocupó 1 μ L del cDNA obtenido de la retrotranscripción; para este ensayo se ocupó el equipo de Life Technologies: Sistema ViiA™7 Real-Time PCR System haciendo uso de sondas TaqMan® (para AR: Hs00171172_ml y para GPDH: Hs02758991_gl). Los datos fueron analizados por el método de cuantificación relativa por comparación de Ct (*threshold cycle*, umbral de detección establecido) “ Δ Ct” que utiliza la siguiente fórmula:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen control}$$

$$2^{-\Delta Ct}$$

Donde,

- Ct (threshold cycle): El número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el threshold (promedio de la desviación estándar de la fluorescencia de los primeros ciclos de la PCR. Umbral de detección de fluorescencia) fijado.
- Ct gen de interés: es el gen que nos interesa cuantificar (en este caso AR).
- Ct gen control: es el gen de expresión constitutivo cuyos niveles no cambian en las condiciones experimentales usadas (en este caso GPDH).

7.5 Extracción de Proteínas y Análisis con Western Blot

Posteriormente a la transfección de las células con los siRNAs correspondientes, las células fueron lavadas con PBS y se les agregó 1 mL de buffer RIPA por cada 5×10^7 células. Se removió las células de las placas de 6 pozos, se transfirieron a tubos de 1.5 mL, y se obtuvo el lisado haciendo uso de un sonicador (30%), centrifugando el lisado y guardando el sobrenadante obtenido. El contenido total de proteínas en los lisados fue cuantificado haciendo uso de un Kit de cuantificación de proteínas (EZQ Protein Quantitation Kit de Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se visualizaron las proteínas a través de un transiluminador UV a 300 nm. Para el Western Blot, se utilizó una cantidad de 20 μ g de los lisados de proteína y se sometieron a un gel SDS-PAGE (Bio-Rad) al 10% (20-300 kDa). Los gels fueron transferidos a membranas de PVDF, las cuales fueron

previamente activadas con Metanol y con buffer de transferencia frío. La transferencia se realizó a 25V por 30 min para el caso del AR y 10V por 30 min para el GPDH y posteriormente fueron bloqueadas con leche al 5% en buffer TBST/Tween durante toda la noche a 4°C y en agitación constante. Después de quitar el exceso de leche, se colocó el anticuerpo primario apropiado, para AR(ABCAM) 1:200 diluido en TBST/Tween - leche al 5% y 1:500 para GPDH (Cell Signaling Technology) diluido en TBST/Tween-leche al 1%, y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron 6 lavados de 20 min con TBST/Tween y se colocó el anticuerpo secundario correspondiente, 1:5000 para GPDH (Anti-Conejo marca ABCAM) y 1:3000 para AR (Anti-Ratón marca Cell Signaling Technology), ambos diluidos en TBST/Tween - leche al 5%. El anticuerpo secundario se incubó durante 2h a temperatura ambiente, y posteriormente se realizaron 6 lavados de 20 min con TBST/Tween. Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas haciendo uso del sustrato Luminata™Forte Western HRP (Millipore™) incubado por 5 min y visualizadas en un fotodocumentador (Bio-Rad).

7.6 Tratamientos con fármacos análogos de GABA

Las células transfectadas con el siRNA correspondiente por 96 h fueron tratadas con dos fármacos agonistas de GABA (ambos de Sigma-Aldrich), Muscimol para estimular el receptor a GABA_A y Baclofen para estimular el receptor a GABA_B. Los tratamientos se realizaron a diferentes condiciones de tiempo de incubación con los fármacos (40 min, 2 h, 6 h, 12 h y 24 h) y a diferente concentración de los mismos (Vehículo, para Muscimol HCl 0.005 M y para Baclofen agua a pH 7.6, 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM).

Para el caso del fármaco antagonista de GABA (Sigma-Aldrich, se utilizó CGP 35348 como antagonista del receptor de GABA_B. Los tratamientos se realizaron por 12h y a diferentes concentraciones de CGP 35348 (Vehículo del fármaco, en este caso agua libre de DNAsas, RNAsas y proteasas, 10 μM, 50 μM y 100 μM). Para los tratamientos con el fármaco agonista se añadió Baclofen 0.1 mM.

7.7 Análisis de los Neuropeptidos en el Medio de Cultivo por Ensayo ELISA

La cantidad de neuropeptidos secretados (GRP y NT) en el medio condicionado después del tratamiento con los fármacos análogos de GABA fue determinada mediante ensayos de ELISA. Todos los ensayos fueron realizados en placas para ELISA de 96 pozos, siguiendo el protocolo del fabricante y haciendo uso de anticuerpos primarios 0.05 µg/mL para NT y GRP (Gen Script). Los anticuerpos secundarios se usaron en una concentración 1:10000 para Neurotensina (Anti- Pollo de ABCAM) y 1:8000 para GRP (Anti-Conejo de ABCAM). Las placas de ELISA fueron reveladas haciendo uso del sustrato Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific) y leyendo la placa en un espectrofotómetro Epoch Micro plate (BioTeK) a una absorbencia de 450 nm.

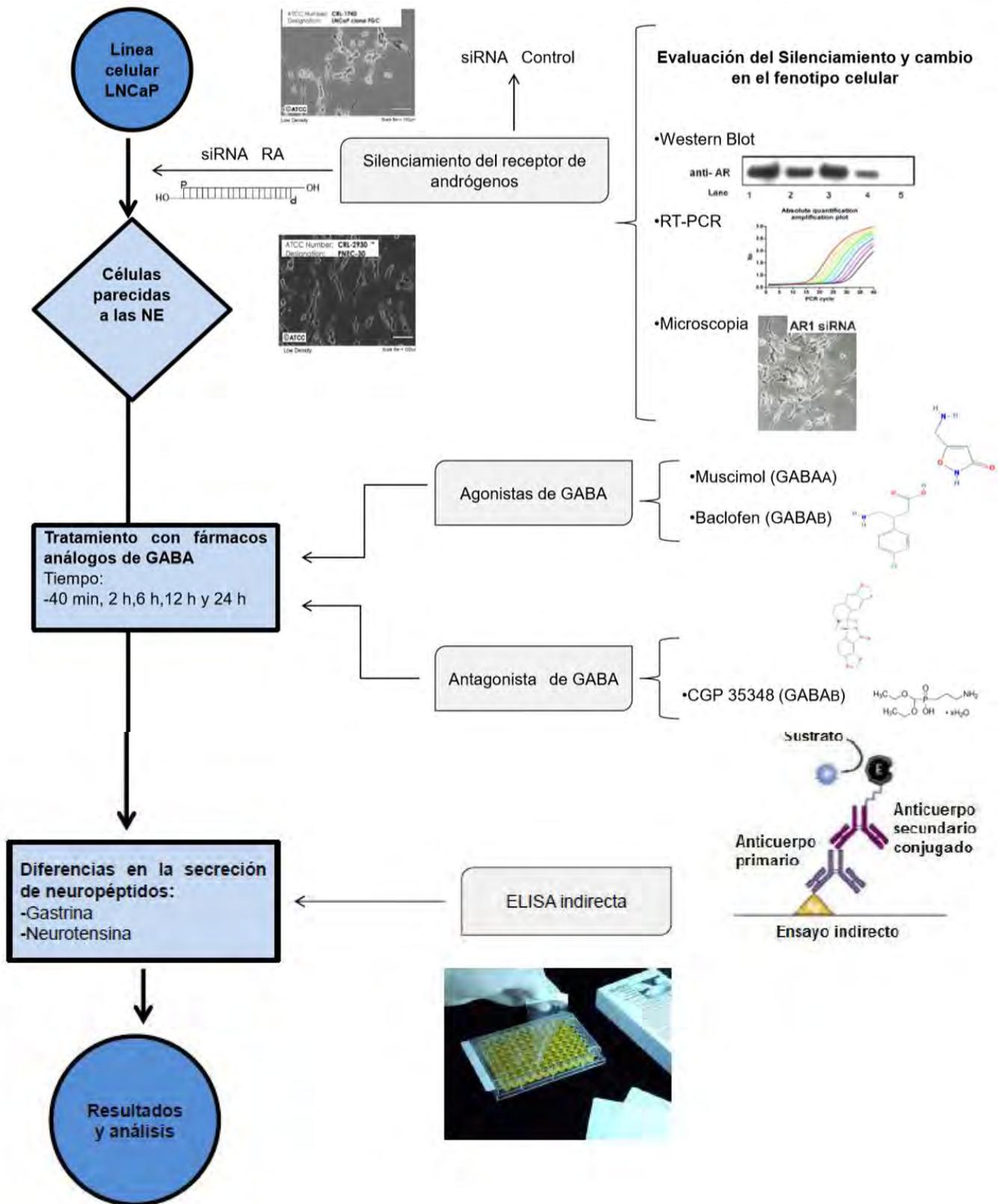


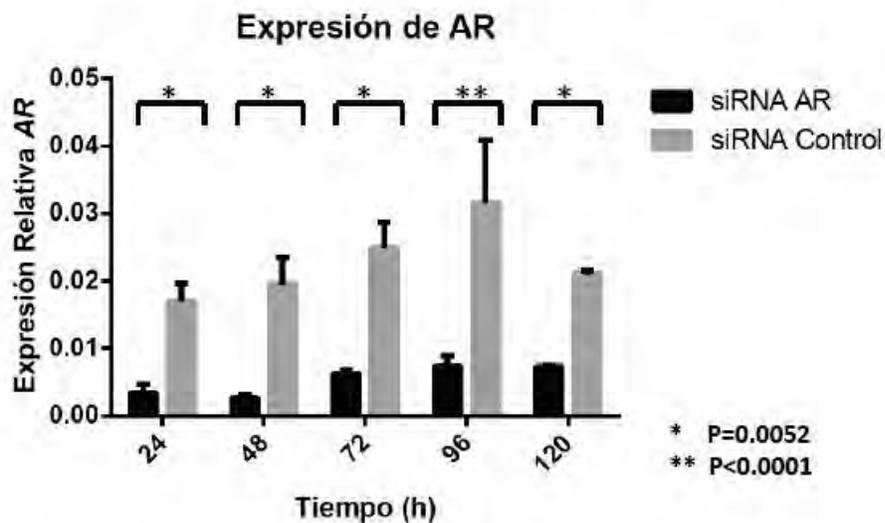
Diagrama 1. Metodología general a emplear para los experimentos *in vitro*.

8. RESULTADOS

8.1 La transfección con un siRNA contra el AR resulta en el silenciamiento del AR e induce el fenotipo parecido al NE en células LNCaP

Ensayo de Transfección con siRNA AR o siRNA Control y análisis de la expresión génica por qRT - PCR

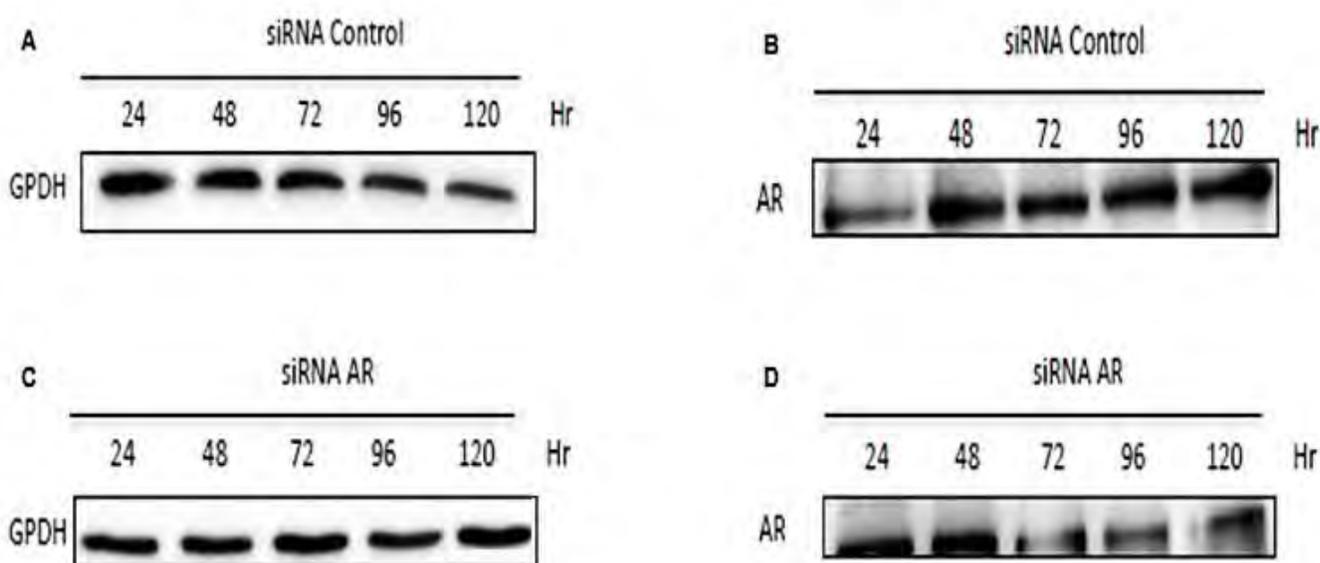
Para este ensayo, se transfectaron las células LNCaP con el siRNA AR o siRNA Control con el fin de abatir la expresión del AR. Posteriormente se extrajo el RNA a las 24, 48, 72, 96 y 120 h después de la transfección para poder confirmar la inhibición del AR, con este RNA se realizó una qRT-PCR para cuantificar los niveles de expresión del mRNA del AR. Como se puede observar en la gráfica 1, el silenciamiento del RA de las células tratadas con el siRNA AR fue efectivo ya que el nivel de expresión del AR es mucho menor comparado con las células tratadas con el siRNA Control y este silenciamiento se mantiene conforme el tiempo transcurre, desde 24 h hasta 120 h después de la transfección.



Gráfica 1. Expresión relativa del AR en un ensayo de qRT-PCR. En esta gráfica se puede observar que la expresión relativa del receptor de andrógenos de las células tratadas con el siRNA AR es menor comparándola con la expresión relativa del receptor de andrógenos de las células tratadas con el siRNA Control. También podemos observar como el silenciamiento se mantiene hasta las 120 h.

Extracción de proteínas y análisis con Western Blot

Después de la transfección de las células LNCaP con el siRNA AR o siRNA control, se extrajeron proteínas a los tiempos de transfección 24, 48, 72, 96 y 120 h y estas muestras se analizaron mediante la técnica de Western Blot usando GPDH como control de carga. Como se puede observar en la figura 13. Las figuras A (GPDH) y B corresponden a la muestra obtenida de las células tratadas con el siRNA control, en la figura B se puede observar como la cantidad de proteína detectada del AR se mantiene constante conforme el tiempo transcurre; las figuras C (GPDH) y D corresponden a la muestra obtenida de las células tratadas con el siRNA AR, en el caso de la figura D y E se puede observar como disminuye la cantidad de proteína detectada del AR conforme el tiempo transcurre. Con este experimento se pudo comprobar que el silenciamiento del AR fue efectivo ya que la cantidad de proteína del AR detectada fue menor para las células tratadas con el siRNA AR.



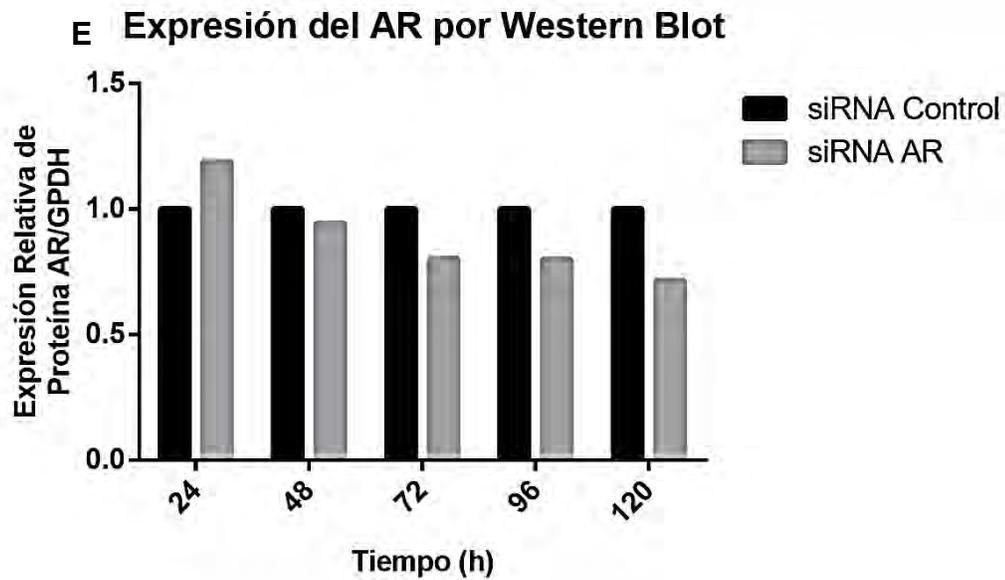


Figura 13. Expresión del AR en un ensayo de Western Blot. Las muestras obtenidas de las células LNCaP tratadas con el siRNA Control, se pueden observar en las siguientes figuras: **A)** en esta figura se muestra el control de carga GPDH, el cual es constante en todos los tiempos, **B)** se puede observar como la cantidad detectada de proteína del AR se mantiene constante hasta el tiempo de 120 h. Las muestras obtenidas de las células LNCaP tratadas con el siRNA AR, se pueden observar en las siguientes figuras: **C)** control de carga GPDH, el cual es constante en todos los tiempos, **D)** se puede observar como disminuye la cantidad detectada de AR conforme el tiempo transcurre, **E)** Análisis por densitometría de los resultados obtenidos en el western blot, se puede observar como disminuye la expresión relativa de la proteína del AR/GPDH conforme el tiempo transcurre hasta las 120 h.

Cambio morfológico de las células

En cuanto a los cambios morfológicos detectados, como se puede observar en la figura 14, consisten básicamente en la aparición de elongaciones tipo dendritas y numerosos gránulos citoplasmáticos en las células tratadas con el siRNA AR (silenciamiento del AR), mientras que las células tratadas con el siRNA Control mantienen su fenotipo conforme el tiempo de transfección aumenta.

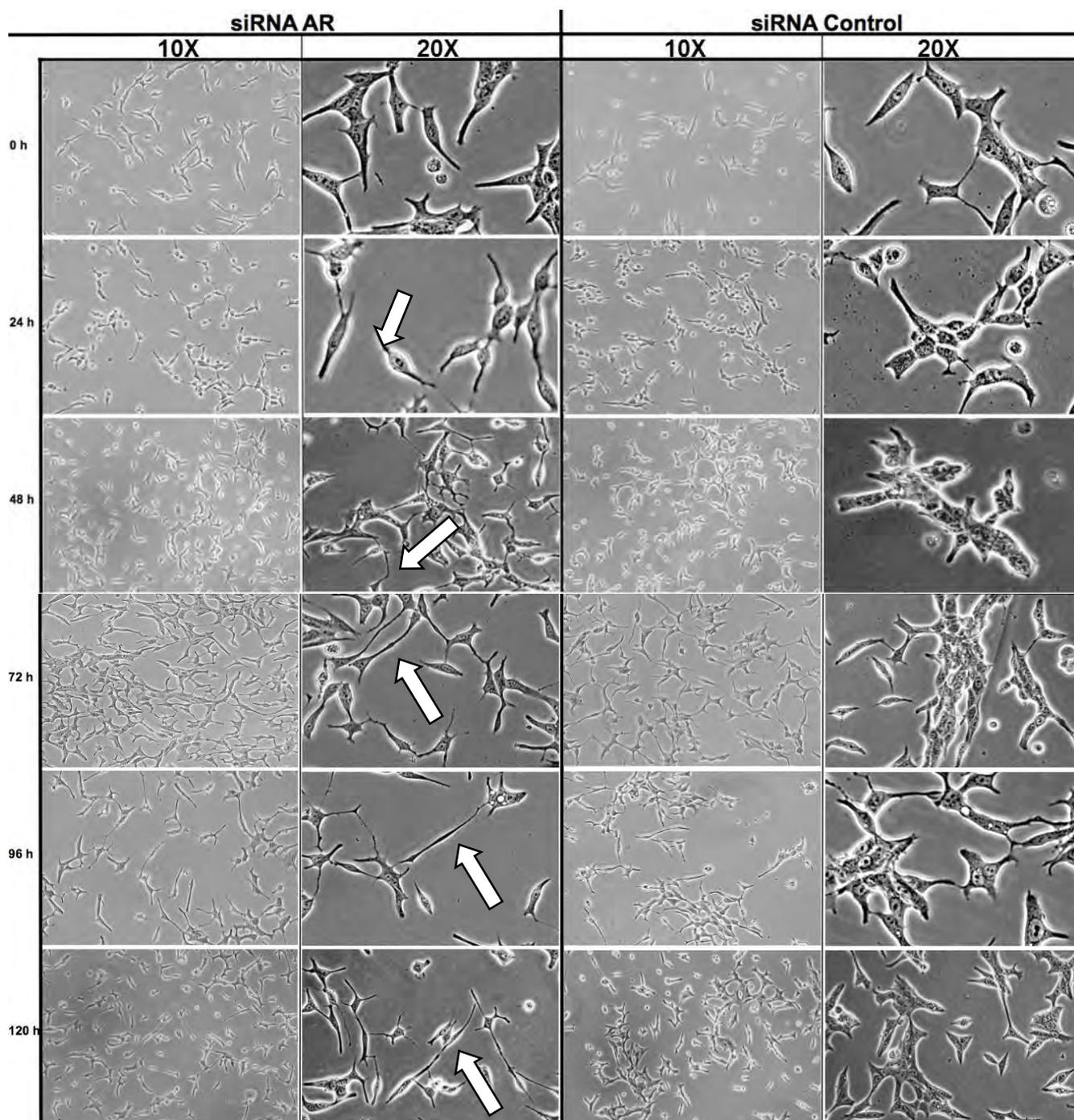
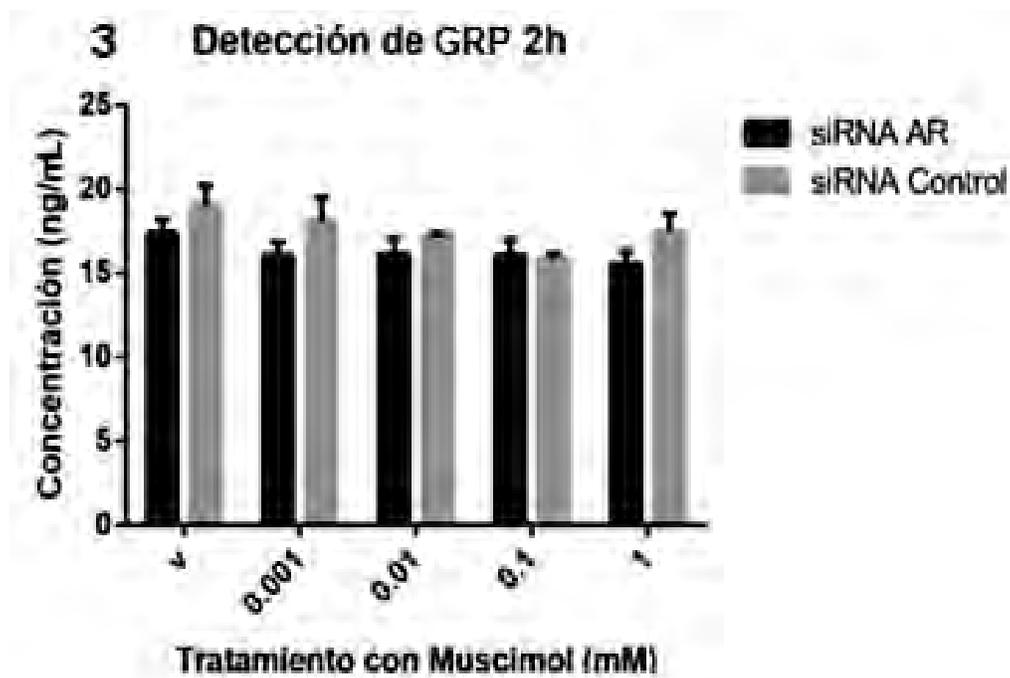
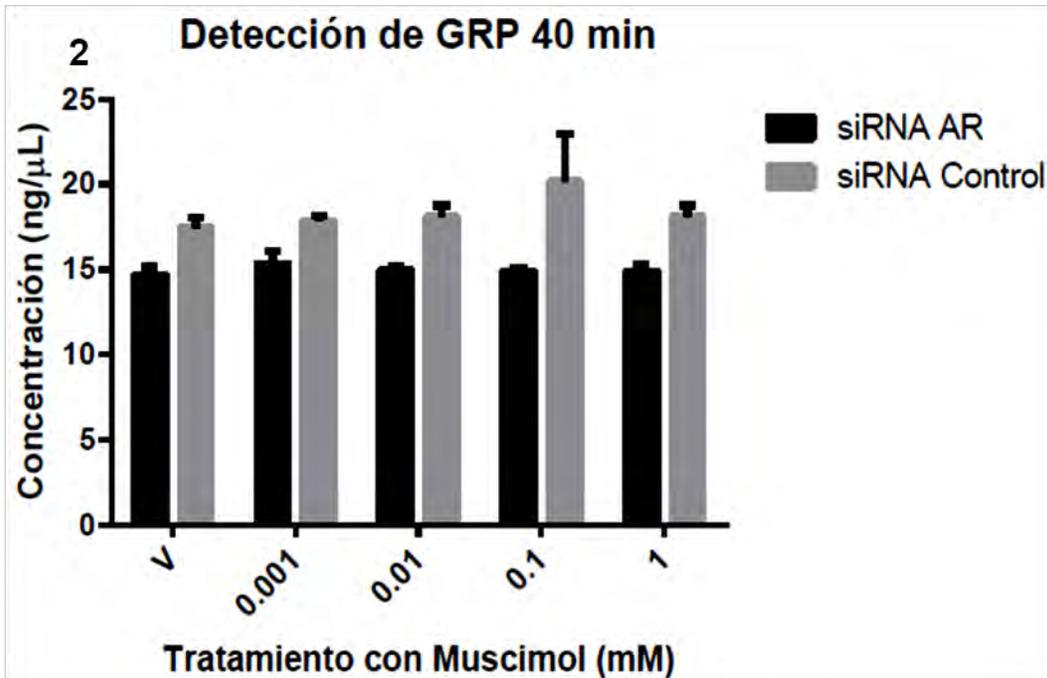


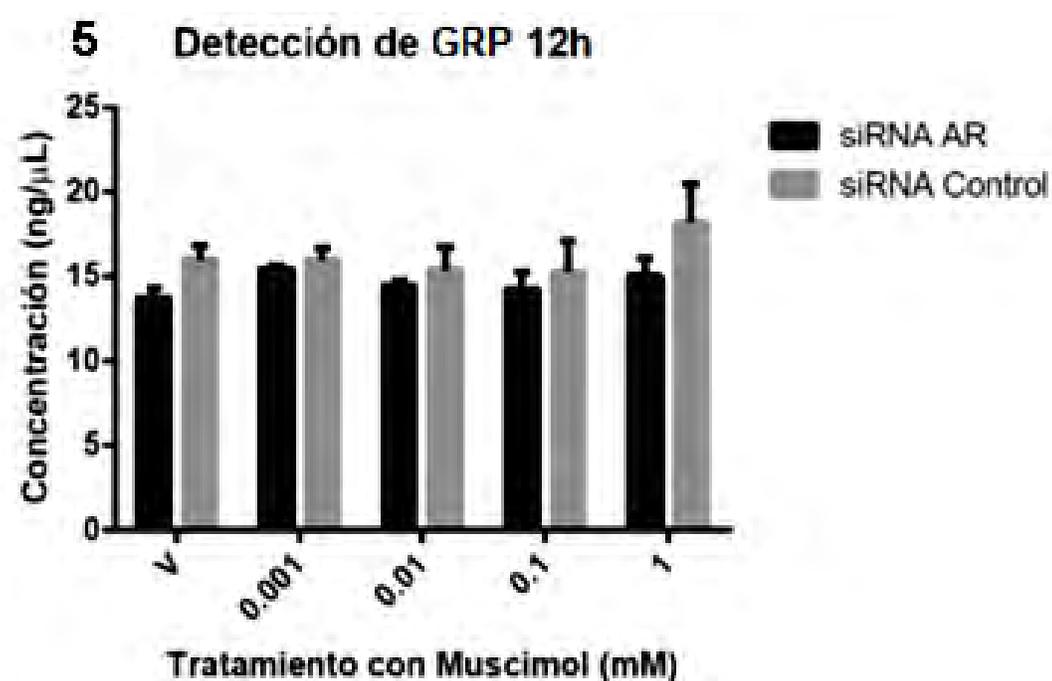
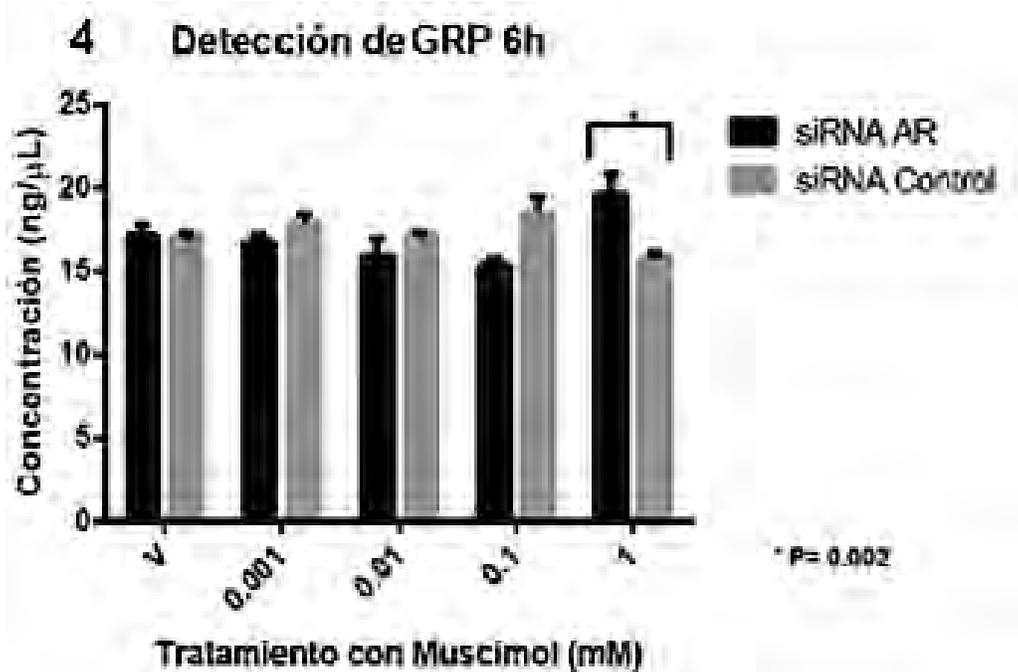
Figura 14. Cambios morfológicos de la línea celular LNCaP después de la transfección con el siRNA AR o siRNA Control a distintos tiempos. Como se puede observar en las figuras, conforme el tiempo de transfección con el siRNA AR aumenta (hasta las 120h), se da un cambio en la morfología de las células, las cuales adquieren un gran número de gránulos citoplasmáticos y elongaciones tipo dendritas. Para el caso de las células transfectadas con el siRNA Control, el fenotipo propio de las células LNCaP se mantiene hasta las 120h.

8.2 Al estimular el receptor de GABA_B con Baclofen, se produce una secreción diferencialmente significativa del neuropéptido GRP.

8.2.1 Tratamiento con Muscimol. Detección de GRP

Las células con fenotipo parecido al neuroendocrino (aquellas con el AR silenciado por el siRNA AR) y las células LNCaP (aquellas con el siRNA Control, las cuales funcionaron como control negativo) fueron tratadas con el fármaco agonista del receptor de GABA_A (Muscimol) a diferentes concentraciones del mismo, las cuales fueron 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, así como con el vehículo del fármaco (HCl 0.05 M), el cual funciona como control negativo. Como se puede observar en las gráficas 2-5, el tiempo de tratamiento varió desde los 40 min hasta las 12 h; se detectó la secreción de GRP en el medio condicionado obtenido después del tratamiento con el fármaco y en general, no se obtuvieron diferencias significativas en la secreción de este neuropéptido en las células con fenotipo parecido al neuroendocrino comparándolas con las células LNCaP.

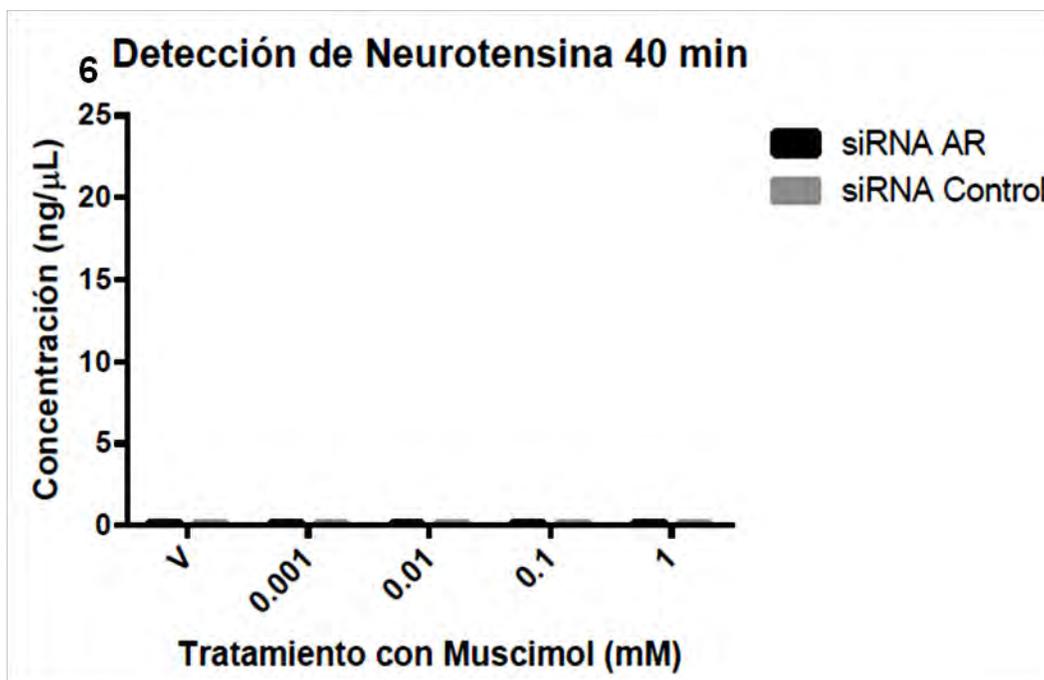


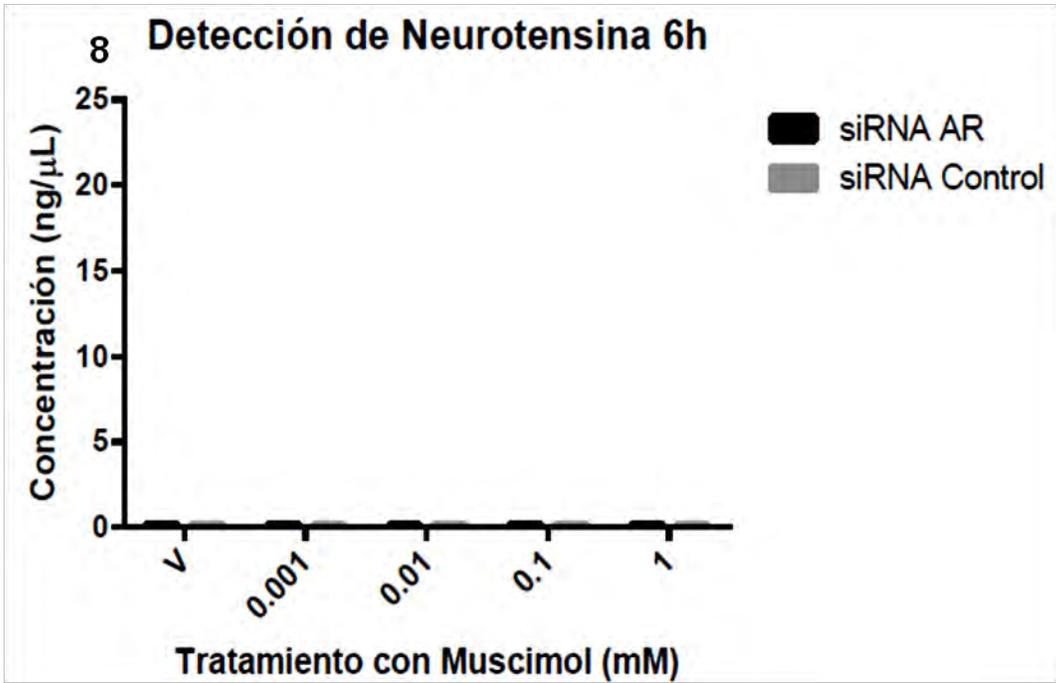
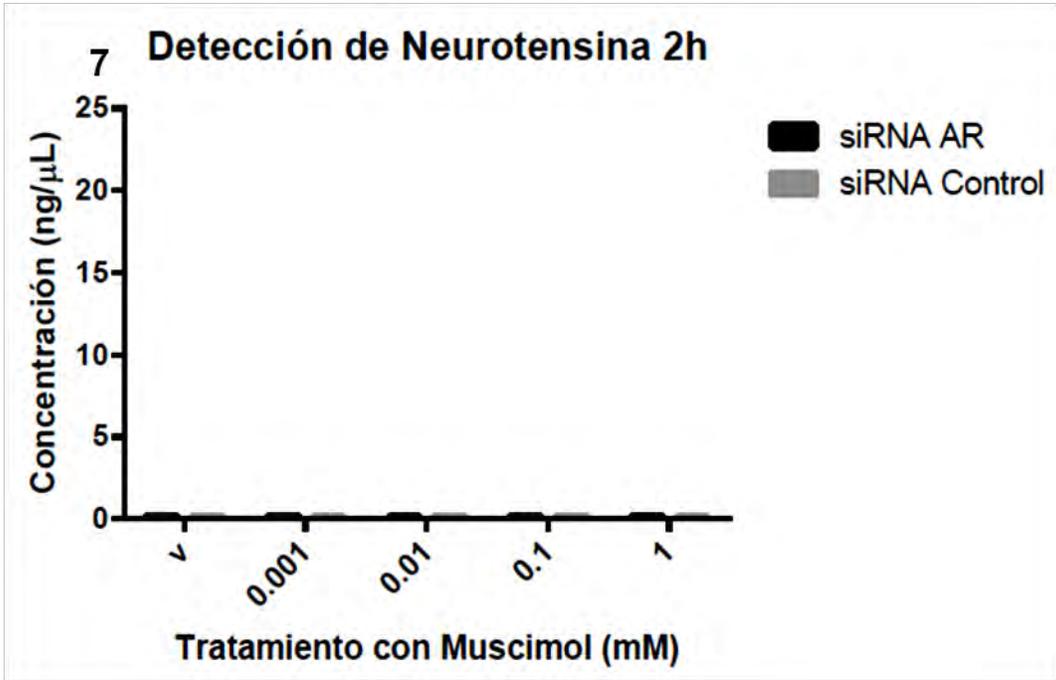


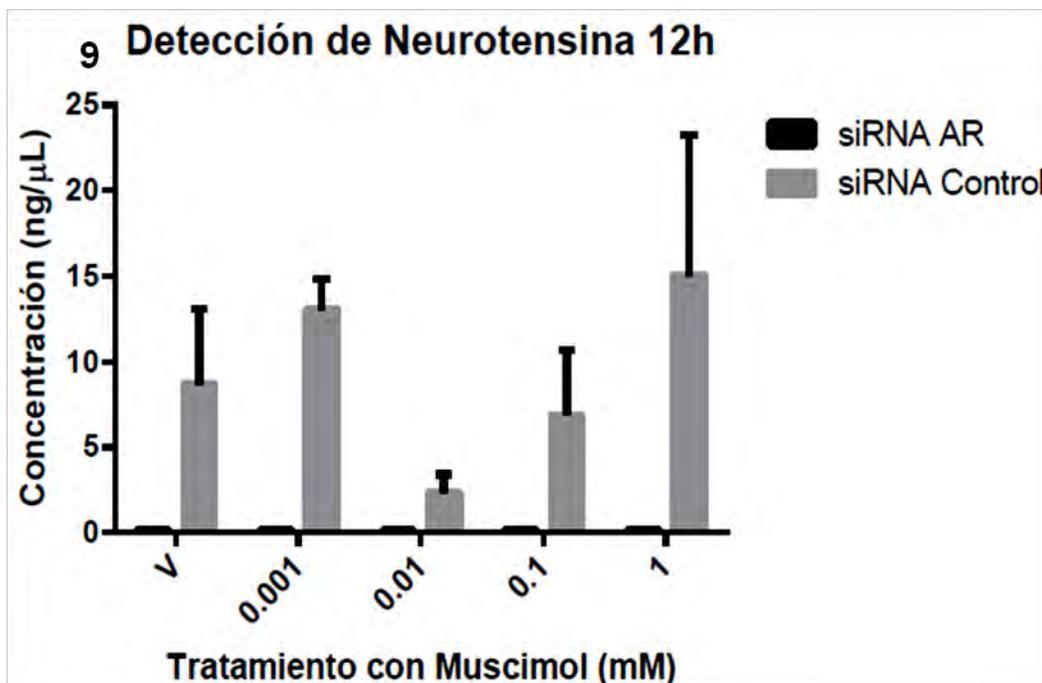
Gráficas 2-5. Detección de GRP en el medio condicionado obtenido de las células tipo neuroendocrinas y células LNCaP tratadas con diferentes concentraciones de Muscimol (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM) y vehículo del fármaco (HCl 0.05 M, abreviado como V) a diferentes tiempos. 2. Detección de GRP a los 40 min de tratamiento con Muscimol, 3. Detección de GRP a las 2h de tratamiento con Muscimol, 4. Detección de GRP a las 6h de tratamiento con Muscimol, 5. Detección de GRP a las 12h de tratamiento con Muscimol. En general no se observa diferencias significativas en la secreción de este neuropéptido a ningún tiempo y a ninguna concentración de fármaco.

8.2.2 Tratamiento con Muscimol. Detección de Neurotensina

De manera análoga al experimento anterior, en este experimento, las células con fenotipo parecido al neuroendocrino (aquellas con el AR silenciado por el siRNA AR) y las células LNCaP (aquellas con el siRNA Control, las cuales funcionaron como control negativo) fueron tratadas con el fármaco agonista del receptor de GABA_A (Muscimol) a diferentes concentraciones del mismo, las cuales fueron 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, así como con el vehículo del fármaco (HCl 0.05 M), el cual funcionó como control negativo. Como se puede observar en las gráficas 6-9, el tiempo de tratamiento varió desde los 40 min hasta las 12 h; se detectó la secreción de neurotensina en el medio condicionado obtenido después del tratamiento con el fármaco y en general, no se obtuvieron diferencias significativas en la secreción de este neuropéptido en las células con fenotipo parecido al neuroendocrino comparándolas con las células LNCaP.





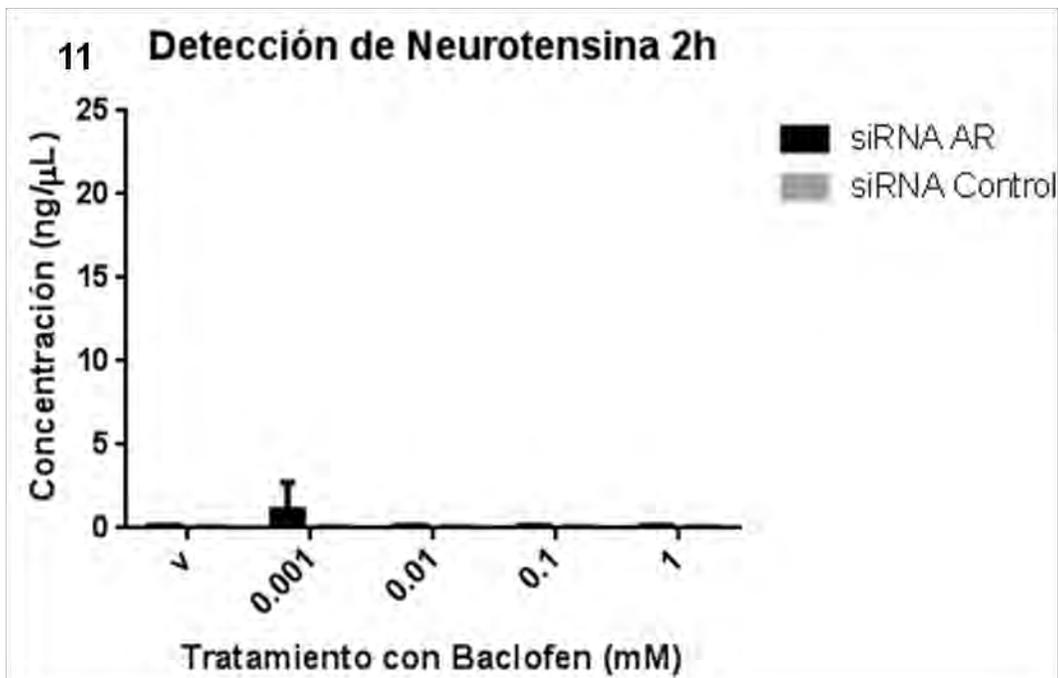
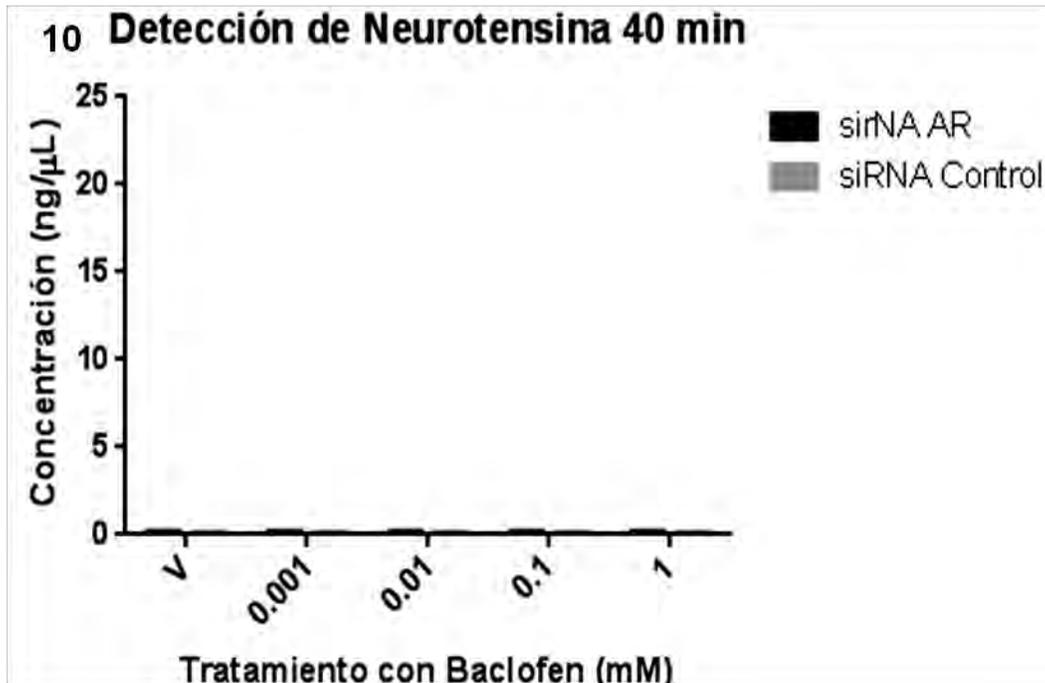


Gráficas 6-9. Detección de neurotensina en el medio condicionado obtenido de las células tipo neuroendocrinas y células LNCaP tratadas con diferentes concentraciones de Muscimol (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM) y vehículo del fármaco (HCl 0.05 M, abreviado como V) a diferentes tiempos. 6. Detección de neurotensina a los 40 min de tratamiento con Muscimol, 7. Detección de neurotensina a las 2h de tratamiento con Muscimol, 8. Detección de neurotensina a las 6h de tratamiento con Muscimol, 9. Detección de neurotensina a las 12h de tratamiento con Muscimol. En general no se observan diferencias significativas en la secreción de este neuropéptido a ningún tiempo y a ninguna concentración de fármaco.

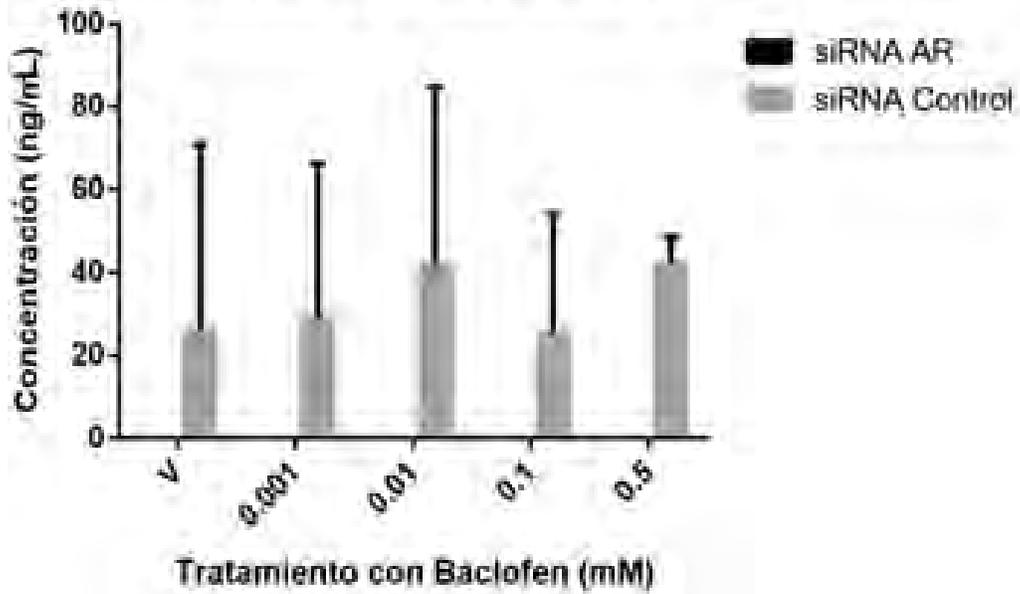
8.2.3 Tratamiento con Baclofen. Detección de Neurotensina

En este experimento, las células con fenotipo parecido al neuroendocrino (aquellas con el AR silenciado por el siRNA AR) y las células LNCaP (aquellas con el siRNA Control, las cuales funcionaron como control negativo) fueron tratadas con el fármaco agonista del receptor de GABA_B (Baclofen) a diferentes concentraciones del mismo, las cuales fueron 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM, así como con el vehículo del fármaco (H₂O pH 7.6), el cual funcionó como control negativo. La concentración máxima de Baclofen para los tiempos de incubación 6 y 12 h fue de 0.5 mM, ya que se observó un efecto tóxico para las células LNCaP (tratadas con el siRNA Control). Como se puede observar en las gráficas 10-13, el tiempo de tratamiento varió desde los 40 min hasta las 12 h; se detectó la secreción de neurotensina en el medio condicionado obtenido después del tratamiento con el fármaco y en

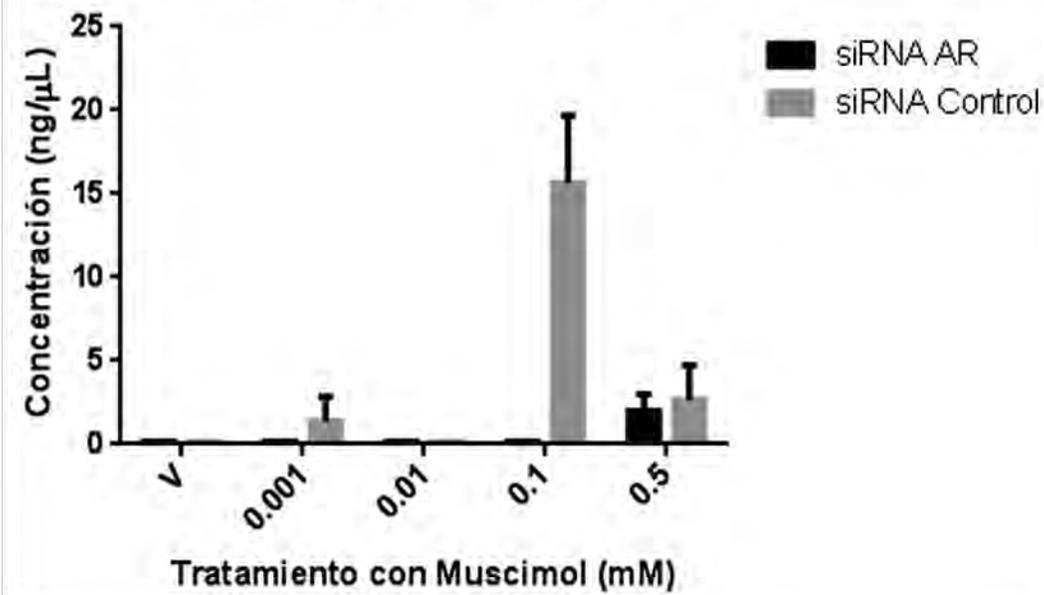
general, no se obtuvieron diferencias significativas en la secreción de este neuropéptido en las células con fenotipo parecido al neuroendocrino comparándolas con las células LNCaP.



12 Detección de Neurotensina 6h



13 Detección de Neurotensina 12h

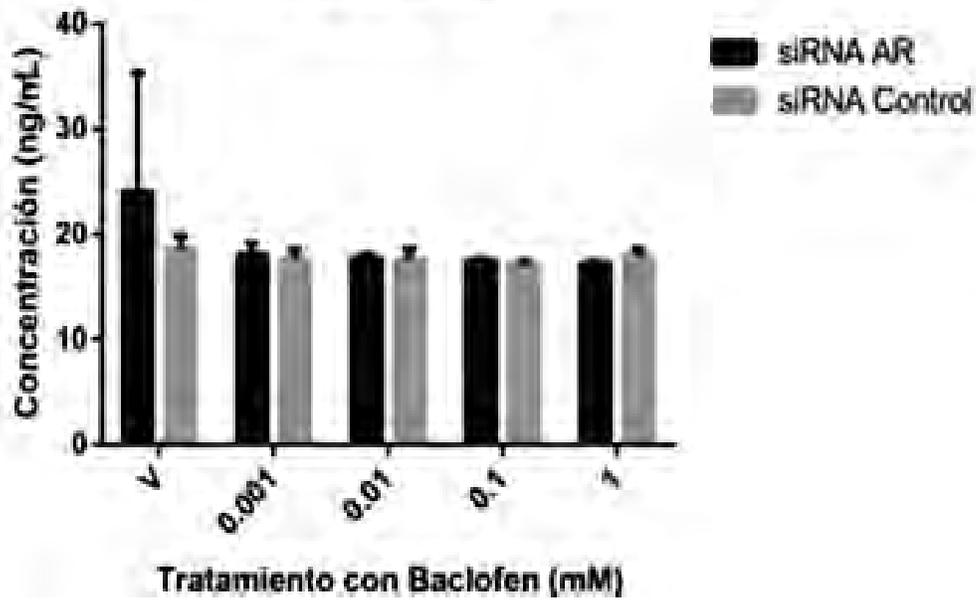


Gráficas 10-13. Detección de neurotensina en el medio condicionado obtenido de las células tipo neuroendocrinas y células LNCaP tratadas con diferentes concentraciones de Baclofen (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM) y vehículo del fármaco (H₂O pH 7.6, abreviado como V) a diferentes tiempos. **10.** Detección de neurotensina a los 40 min de tratamiento con Baclofen, **11.** Detección de neurotensina a las 2h de tratamiento con Baclofen, **12.** Detección de neurotensina a las 6h de tratamiento con Baclofen, **13.** Detección de neurotensina a las 12h de tratamiento con Baclofen. En general no se observa diferencias significativas en la secreción de este neuropéptido a ningún tiempo y a ninguna concentración de fármaco.

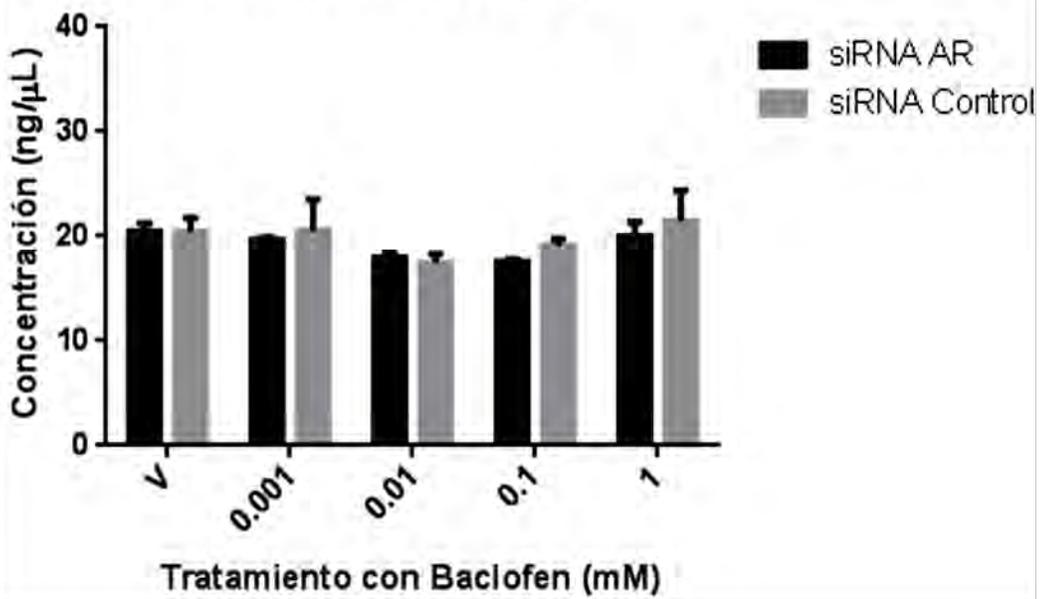
8.2.4 Tratamiento con Baclofen. Detección de GRP

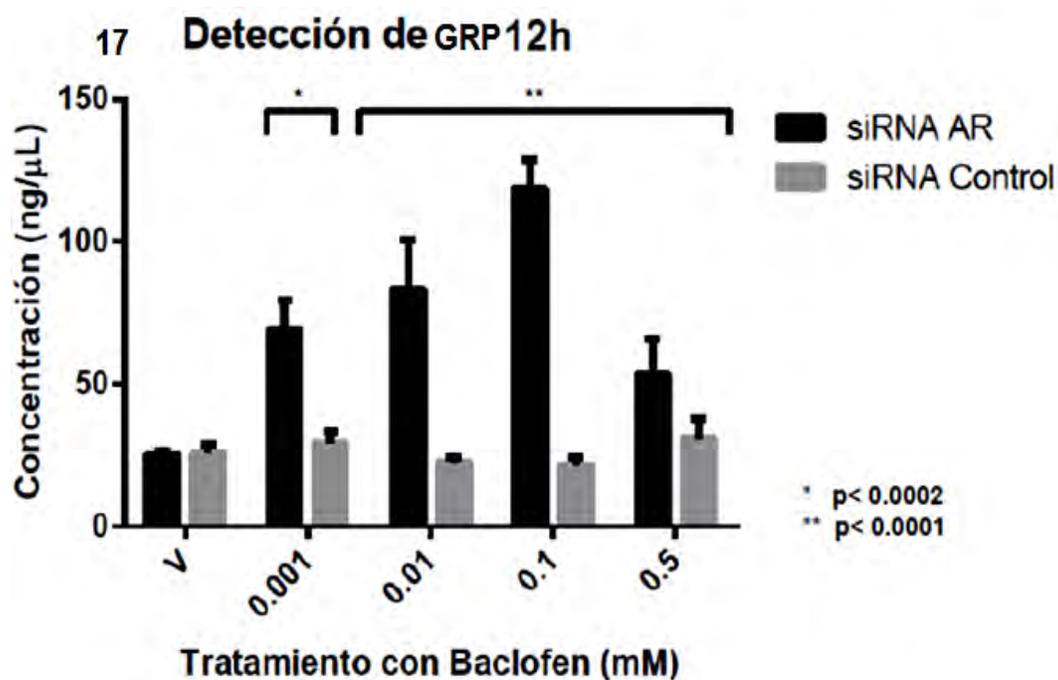
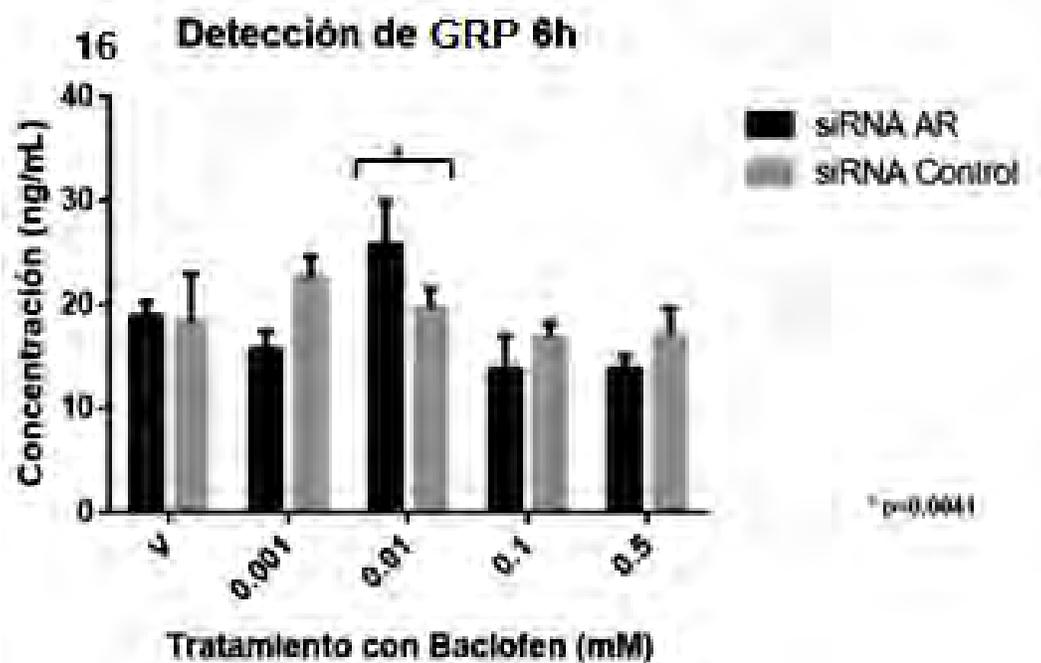
Las células con fenotipo parecido al neuroendocrino (aquellas con el AR silenciado por el siRNA AR) y las células LNCaP (aquellas con el siRNA Control, las cuales funcionaron como control negativo) fueron tratadas con el fármaco agonista del receptor de GABA_B (Baclofen) a diferentes concentraciones del mismo, las cuales fueron 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM, así como con el vehículo del fármaco (H₂O pH 7.6), el cual funcionó como control negativo. Como se puede observar en las gráficas 14-18, el tiempo de tratamiento varió desde los 40 min hasta las 24 h; se detectó la secreción de GRP en el medio condicionado obtenido después del tratamiento con el fármaco. Como ya se había mencionado y como se puede observar en las siguientes gráficas, los experimentos de los tiempos 6, 12 y 24 h fueron tratados con una concentración máxima de 0.5 mM ya que se observó que la concentración de 1 mM de Baclofen era tóxica para las células LNCaP (tratadas con el siRNA Control). Para la condición de tratamiento con Baclofen durante 12h se puede observar como hubo secreción significativamente mayor por parte de las células con fenotipo parecido al NE a comparación de las células LNCaP sin este fenotipo, particularmente resalta la concentración 0.1 mM, ya que esta fue donde se observó mayor secreción de GRP por parte de las células tratadas con Baclofen.

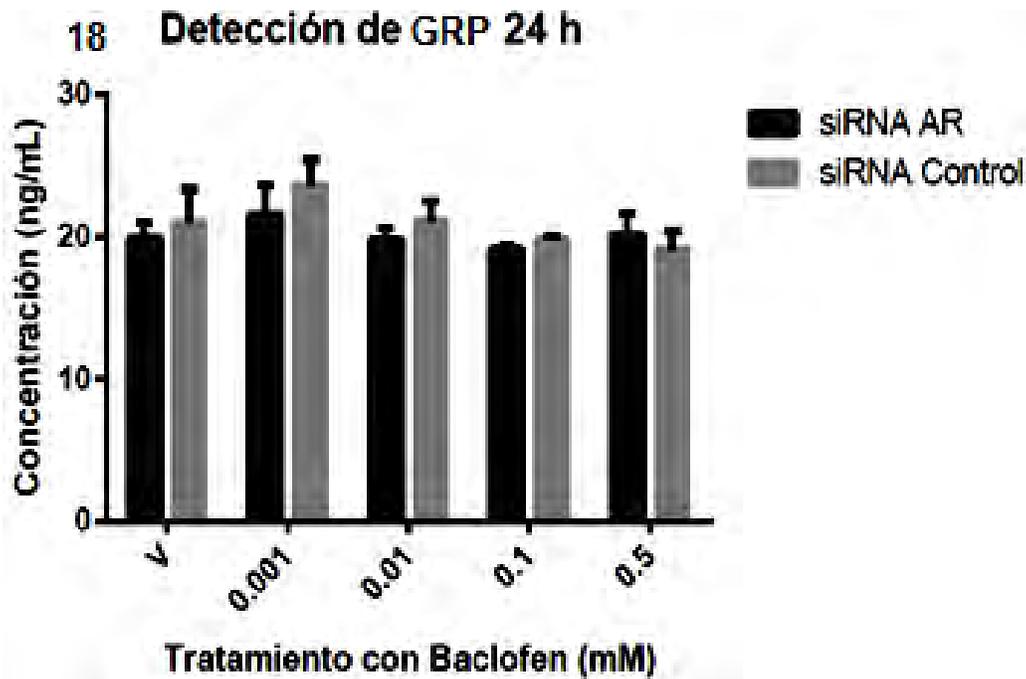
14 Detección de GRP 40 min



15 Detección de GRP 2h





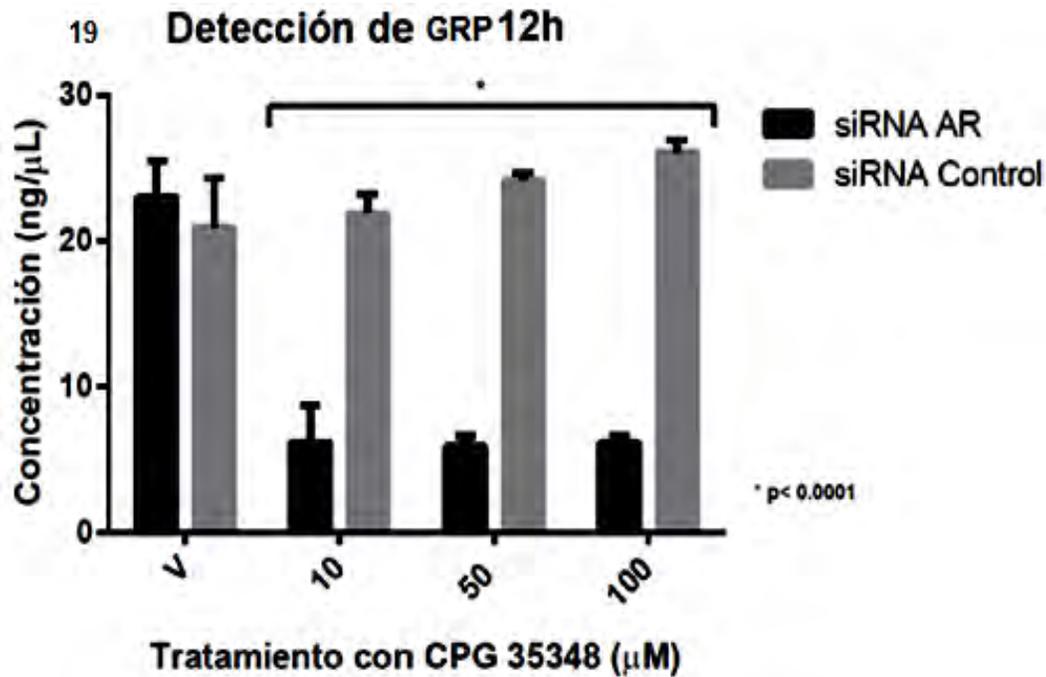


Gráficas 14-18. Detección de GRP en el medio condicionado obtenido de las células tipo neuroendocrinas y células LNCaP tratadas con diferentes concentraciones de Baclofen (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM) y vehículo del fármaco (H₂O pH 7.6, abreviado como V) a diferentes tiempos. 14. Detección de GRP a los 40 min de tratamiento con Baclofen, 15. Detección de GRP a las 2h de tratamiento con Baclofen, 16. Detección de GRP a las 6h de tratamiento con Baclofen, 17. Detección de GRP a las 12h de tratamiento con Baclofen, 18. Detección de GRP a las 24h de tratamiento con Baclofen. Como se puede observar en la gráfica 17, al tiempo de incubación 12h con el fármaco agonista del receptor de GABA_B hay un incremento significativo en la secreción del neuropéptido GRP, particularmente con la concentración 0.1 mM del fármaco.

8.3 Al tratar a las células con el antagonista del receptor de GABA_B (CGP 35348), se inhibe la secreción del neuropéptido GRP.

Una vez determinada la concentración de Baclofen y el tiempo de tratamiento del mismo al cual se observa la mayor secreción de GRP (Baclofen 0.1 mM por 12 h) se continuó con los experimentos con el fármaco antagonista del receptor de GABA_B, CGP 35348. Las células con fenotipo parecido al neuroendocrino (aquellas con el AR silenciado por el siRNA AR) y las células LNCaP (aquellas con el siRNA Control, las cuales funcionaron como control negativo) fueron tratadas con el fármaco CGP 35348 a diferentes concentraciones del

mismo, las cuales fueron 10 μM , 50 μM y 100 μM (en combinación Baclofen 0.1 mM), así como con el vehículo del fármaco (H_2O), el cual funcionó como control negativo. Como se puede observar en la gráfica 19, la secreción de GRP fue mucho menor en las células con fenotipo parecido al NE que en las células LNCaP tratadas con el siRNA Control. La secreción de GRP cuando solo se agregó el vehículo se mantuvo constante tanto en las células LNCaP tratadas con el siRNA AR como en las células LNCaP tratadas con siRNA Control.



Gráfica 19. Detección de GRP en el medio condicionado obtenido de las células tipo neuroendocrinas y células LNCaP tratadas con diferentes concentraciones de CPG 35348 (10 μM , 50 μM y 100 μM , a todas se les añadió Baclofen 0.1 mM) y vehículo del fármaco (H_2O , abreviado como V). Como se puede observar, en todas las concentraciones de fármaco CPG 35348 se observa una disminución estadísticamente significativa de la secreción de GRP por parte de las células con fenotipo parecido al NE (células tratadas con el siRNA AR), excepto con el vehículo, donde la secreción de GRP se mantuvo constante.

9. DISCUSIÓN

El CaP es uno de los tumores malignos más frecuentes que afectan al varón, y actualmente ocupa una de las primeras causas de muerte en hombres debido a neoplasias malignas a nivel mundial (GLOBOCAN, 2012). Los andrógenos, en un inicio son críticos para el desarrollo del tejido prostático canceroso, es por esto que una de las principales terapias contra el CaP es la depleción androgénica, la cual busca disminuir los niveles androgénicos y/o bloquear el RA, esto en un inicio causa la muerte celular apoptótica masiva de las células; sin embargo, en la mayoría de los pacientes (del 70 al 80%) los tumores se vuelven andrógeno independientes reanudando su crecimiento. Es en este estadio donde se ha reportado que existe un incremento significativo de células neuroendocrinas y esto está relacionado con un mal pronóstico y una expectativa de vida muy baja (Ito T., *et al.*, 2001, Matei D., *et al.* 2012, Ziouziou, H.; *et. al.*, 2015). Una de las hipótesis para explicar estos hallazgos y como se establece el cáncer de próstata andrógeno independiente es la de la transdiferenciación neuroendocrina. A la fecha no existe mucha información al respecto de este proceso en CaP es por esto que esta hipótesis fue parte del trabajo de esta tesis. Investigar más al respecto de la transdiferenciación NE es crucial para poder entender mejor este proceso y en un futuro poder desarrollar nuevos blancos terapéuticos contra el CaP andrógeno independiente.

Las células tipo neuroendocrinas son muy agresivas y secretan neuropéptidos (como GRP y NT) que actúan de manera autocrina y paracrina favoreciendo la proliferación, supervivencia y transformación de las células de CaP *in vitro* (Bishop, J., Davies, A., *et al.*, 2015, D'Antonio J., *et. al.*, 2008, Shen, R., *et al.* 1997). Aún no ha sido demostrado, pero se ha sugerido que las células parecidas a las NE contribuyen al desarrollo del CaP andrógeno independiente de la misma manera en tumores prostáticos *in vivo* (Wright M., *et al.* 2003). Por otra parte, se ha descrito que el receptor de andrógenos es crucial en la regulación del proceso de transdiferenciación neuroendocrina, de hecho, se sabe que este receptor controla directamente el proceso de transdiferenciación neuroendocrina en células LNCaP andrógeno dependientes y andrógeno independientes. Cuando la expresión del AR es apagada, las células cambian su morfología, aparecen extensiones tipo dendrita y numerosos gránulos citoplasmáticos (similares a los que se observan en una neurona), indicando que el AR *per se* reprime directamente el proceso de transdiferenciación NE en células de CaP *in vitro* (Wright M., *et al.* 2003).

El objetivo de este trabajo fue determinar la participación del sistema GABAérgico en células de CaP, por lo que fue necesario establecer y estandarizar el modelo de células tipo NE a partir de la línea celular LNCaP. De manera similar al experimento de Wright M., *et al.* 2003, se logró inhibir la expresión del AR mediante el uso de un RNA de interferencia (siRNA) contra el mismo para poder obtener las células parecidas a las NE. Como se puede observar en la gráfica 1, en un experimento de qRT-PCR, mediante el uso de un siRNA contra el AR el silenciamiento del receptor es estable hasta las 120 h post transfección. Para este experimento se usaron dos siRNAs, uno contra el AR y otro que funcionó como control negativo, este último siRNA es una secuencia aleatoria comercial que no se une a ningún mRNA y su única función fue corroborar que la presencia del siRNA no afectara las condiciones experimentales de trabajo ni la respuesta celular. Para confirmar que el silenciamiento no solo había sido a nivel de mRNA, también se analizó la cantidad de proteína de AR mediante el uso de western blot. Como se puede observar en la figura 13, por este método también es destacable la disminución del receptor debido al silenciamiento del mismo, la cual fue estable hasta el tiempo 120 h. En las células LNCaP tratadas con el siRNA AR disminuyó la cantidad de AR detectado, mientras que con las células LNCaP tratadas con el siRNA control se mantuvo la expresión del AR. Con estos resultados se determinó que nuestro modelo de transdiferenciación funciona adecuadamente.

Además de monitorear la expresión del AR, también se observaron los cambios morfológicos de las células. Como se puede observar en la figura 14, la línea celular LNCaP que fue transfectada con el siRNA AR fue adquiriendo la morfología clásica de una célula tipo NE (aparición de elongaciones tipo dendrita) y esto se mantuvo hasta el tiempo post transfección 120h. Las células LNCaP tratadas con el siRNA control conservaron la morfología típica de esta línea celular.

Tomando en conjunto los resultados descritos anteriormente, se puede observar que las células adquirieron el fenotipo parecido al NE. Es importante mencionar que para tener una mayor certeza de que esto es cierto, debieron realizarse experimentos complementarios, los cuales no se realizaron en esta tesis, pero fueron determinados previamente en este laboratorio por Santoyo K., 2015; en estos experimentos se estableció el modelo de células tipo NE, para esto, se evaluó la expresión de los marcadores epiteliales (*AR* y *KLK3*, gen responsivo a la actividad del AR que codifica para PSA) y neuroendocrinos (*ENO2*, que

codifica para el marcador neuroendocrino enolasa neuro específica y *GAD1*, que codifica para la enzima ácido glutámico descarboxilasa) mediante qRT-PCR a diferentes condiciones de cultivo, y usando siRNAs AR y Control. Lo que se encontró fue que la expresión relativa del AR disminuyó desde el tiempo 24 h post transfección cuando se trataron a las células con el siRNA AR, mientras que con el siRNA control se mantuvo la expresión del receptor; la expresión de el gen *KLK3* disminuyó con ambos siRNAs debido a que es un gen responsivo a los andrógenos y el AR no se encontraba activado gracias a que los lavados diarios con PBS disminuyeron los andrógenos remanentes en el medio de cultivo (que podrían activar el AR). En cuanto a los marcadores neuroendocrinos, tanto *ENO2* como *GAD1* fueron incrementando su expresión desde las 24h hasta las 120 h post transfección con el siRNA AR; las células tratadas con el siRNA control también comenzaron a aumentar los niveles de expresión de estos genes después de las 96 h post transfección debido a la transdiferenciación que sufren a un fenotipo parecido al NE ya que fueron cultivadas en un ambiente sin andrógenos. Es por esto que el tiempo adecuado para obtener el modelo de células tipo NE es a las 96 h después de la transfección con los siRNAs (Santoyo K. 2015). Con estos antecedentes y el modelo bien establecido, se continuaron con los experimentos de la participación del sistema GABAérgico en el CaP.

Como ya se había discutido anteriormente, el grupo de Yan Hu al realizar experimentos con ratones transgénicos CR2-Tagdesarrollaron CaP de manera muy rápida y presentaron un incremento de células parecidas a las NE. Hu encontró una expresión mucho mayor de GABA y los receptores de GABA en las células NE transformadas y las células secretoras en los tumores prostáticos a comparación con la próstata de ratones normales (Hu Y., Ippolito J., *et al.* 2002). Además de manera análoga, en el estómago de rata, el grupo de N. Weigert demostró que al estimular los receptores GABAérgicos, particularmente el receptor de GABA_A, se liberaban neuropéptidos (gastrina) (Weigert N., Schepp W., *et al.*, 1998). Tomando en conjunto estos dos antecedentes nos llevaron a la idea de que el sistema GABAérgico estaba involucrado de manera importante en la progresión del CaP.

Para probar esta hipótesis, se realizaron tratamientos con los fármacos análogos de GABA, el objetivo fue descubrir si el sistema GABAérgico estaba involucrado en la liberación de neuropéptidos en las células transdiferenciadas a tipo NE. Para poder estandarizar el modelo de tratamiento con los fármacos, fue necesario probar diferentes condiciones de tiempo y

concentración de fármaco análogo de GABA. La hipótesis consistía en que, si al estimular el receptor de GABA_A con el fármaco agonista Muscimol o el receptor de GABA_B con el fármaco agonista Baclofen se detectaba la liberación de los neuropéptidos GRP y/o NT, entonces el sistema GABAérgico en las células tipo NE participaría de manera importante en la progresión del CaP andrógeno independiente.

Para el caso de Muscimol, se probaron las siguientes concentraciones: 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM y el vehículo del fármaco; y los tiempos de tratamiento: 40 min, 2 h, 6 h y 12 h. Para el caso de GRP, no se observaron diferencias significativas en la secreción de este neuropéptido entre las células con fenotipo parecido al NE (estas células fueron las que se trataron con el siRNA AR) y las células LNCaP tratadas con el siRNA Control en ninguna condición. Para el caso de neurotensina, tampoco se detectó secreción de este neuropéptido en las células con fenotipo parecido al NE a ningún tiempo de tratamiento. Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que el receptor de GABA_A no está involucrado en la liberación de GRP y neurotensina en las células transdiferenciadas al fenotipo parecido al NE.

Para el caso de Baclofen, de igual manera se probaron las concentraciones: 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM 1 mM y el vehículo del fármaco; y los tiempos de tratamiento: 40 min, 2 h, 6 h, 12 h y 24 h. Con este fármaco se tuvieron que repetir los experimentos con la concentración máxima de 0.5 mM ya que la concentración de 1mM presento toxicidad en las células tratadas con el siRNA control; debido a que las células con fenotipo parecido al NE no presentaron este problema, este hecho es indicativo de que estos dos tipos celulares presentan fenotipos distintos y por lo tanto la respuesta al fármaco es diferente. Para el caso de neurotensina, al igual que con el experimento anterior, no se detectó secreción de este neuropéptido en las células con fenotipo parecido al NE a ningún tiempo y a ninguna concentración de Baclofen. Con estos resultados se podría concluir que el receptor de GABA_B no está involucrado en la secreción de neurotensina en las células transdiferenciadas al fenotipo parecido al NE.

Por último, para el caso de la secreción de GRP, se detectaron niveles de secreción de este neuropéptido significativamente mayores a partir de las 12h de tratamiento con Baclofen en las células transdiferenciadas al fenotipo parecido al NE a comparación de las células LNCaP tratadas con el siRNA control. En el caso de las células tratadas con el siRNA control la

secreción de GRP se mantiene constante a cualquier tiempo de tratamiento con Baclofen (la concentración de GRP detectada siempre se encuentra en un valor aproximado de 20 ng/ μ L), este resultado es esperado, ya que estas células no están transdiferenciadas al fenotipo parecido al NE y la hipótesis de este trabajo es que cuando la transdiferenciación NE ocurre, hay un incremento de los receptores GABAérgicos y al ser estimulados da como consecuencia una mayor secreción de GRP lo cual puede ayudar a las células a continuar con su crecimiento en condiciones de depleción androgénica. Estos resultados en conjunto confirman que al estimular el receptor de GABA_B, se produce la secreción de GRP, especialmente con la concentración de fármaco 0.1 mM.

A partir de las 24 h de tratamiento con el fármaco, se esperaba que la secreción de GRP por parte de las células con fenotipo parecido al NE aumente, sin embargo y contrario a lo esperado, esto no ocurrió. Una posible explicación a este hecho es que las células con fenotipo parecido al NE poseen receptores para ciertos neuropéptidos lo cual les confiere la capacidad de presentar actividad autocrina. De hecho, de acuerdo con datos reportados por Schroeder R. y Markwalder R., el receptor de GRP se encuentra sobreexpresado en las células malignas del CaP, mientras que en las células de la próstata normal o de la HPB presentan baja o nula expresión de este receptor. Con estos datos se propone que las células transdiferenciadas al fenotipo parecido al NE pueden utilizar el GRP para poder proliferar y continuar creciendo, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para poder comprobar esta hipótesis (Markwalder R. and Reubi J., 1999., Schroeder R., *et al.*2011).

Para poder demostrar que el receptor de GABA_B está involucrado en la secreción de neuropéptidos, se realizaron tratamientos con el fármaco antagonista de este receptor, el CGP 35348, al tiempo de tratamiento 12h, en combinación con una concentración de Baclofen de 0.1 mM (debido a que a estas condiciones se detectó la mayor secreción de GRP) y una concentración de CGP 35348 de: 10 mM, 50 mM, 100 mM y el vehículo del fármaco. Si el receptor de GABA_B está involucrado en la secreción de GRP, al tratar a las células con un antagonista de este receptor, se presentaría una disminución del neuropéptido GRP. Como se puede observar en la gráfica 19, todas las concentraciones de CGP 35348 disminuyeron drásticamente la secreción de GRP en las células transdiferenciadas al fenotipo parecido al NE a comparación de las células LNCaP tratadas con el siRNA control, las cuales se mantienen en un rango constante de secreción de GRP (aproximadamente 20

ng/ μ L, de manera similar a los experimentos con Baclofen 0.1 mM). Estos resultados confirmaron que el receptor de GABA_B está directamente relacionado con la secreción de GRP.

El GRP se ha reportado como un factor de crecimiento en ciertos tipos de cáncer; este neuropéptido y su receptor son sobreexpresados en CaP y pueden estimular el crecimiento de líneas celulares de CaP e incluso se ha reportado que este neuropéptido puede estar involucrado en la progresión del CaP avanzado y en la diferenciación NE (Ischia J., *et al.* 2014); por otro lado, los receptores de GRP representan un blanco molecular de diagnóstico y terapéutico en el CaP, como es el caso de los antagonistas de los receptores de GRP Demobesina 4 y 1 (Cescato R., *et al.* 2008). En este trabajo se demuestra por primera vez que se demuestra que el sistema GABAérgico participa en la secreción de neuropéptidos en células transdiferenciadas al fenotipo parecido al NE en CaP además de que el receptor de GABA_B podría representar un posible nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de pacientes que presenten CaP andrógeno independiente con transdiferenciación NE, por lo que es necesario estudiar más a fondo la participación de esta vía GABAérgica en CaP así como las proteínas involucradas en la misma para que en un futuro estos hallazgos puedan ser aplicados al diagnóstico y tratamiento de pacientes que presentan CaP andrógeno independiente.

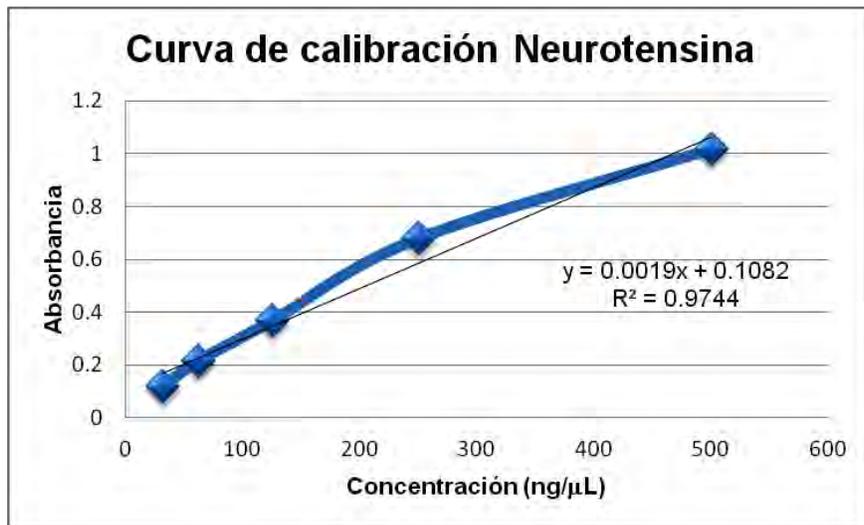
10. CONCLUSIONES

- La vía GABAérgica está involucrada en la secreción de GRP, ya que al estimular el receptor de GABA_B hay una secreción significativamente mayor de GRP por parte de las células LNCaP transdiferenciadas al fenotipo parecido al neuroendocrino a comparación de las células que no tienen este fenotipo.
- El efecto inducido por el Baclofen es inhibido por el fármaco antagonista del receptor de GABA_B, el CGP 35348, ya que disminuye la cantidad de GRP secretado por parte de las células LNCaP transdiferenciadas al fenotipo parecido al neuroendocrino a comparación de las células que no tienen este fenotipo.
- En células con fenotipo parecido al NE el sistema GABAérgico, específicamente el receptor de GABA_B participa en la secreción de neuropéptidos y esto contribuye en la progresión del CaP andrógeno independiente

ANEXO 1

Curva de calibración de Neurotensina y Péptido Liberador de Gastrina

	Neurotensina	GRP
ng/ μ L	Absorbancia	
500	1.015333	2.476333
250	0.677	1.292333
125	0.365667	0.480333
62.5	0.213667	0.164333
31.25	0.116	0.072



11. REFERENCIAS

1. Abrahamsson PA, Di Sant'Agnesse PA (1993). Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *J Androl*, **5**, pp. 307-314
2. Abrahamsson PA, Lilja H (1989). Partial characterization of a thyroid-stimulating hormone-like peptide in neuroendocrine cells of the human prostate gland. *Prostate***14**, pp. 71-78
3. American Cancer Society. (03/12/2015). Cáncer de Próstata. 11/Octubre/2015, de *American Cancer Society* Sitio web: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/cancer-de-prostata-early-diagnosis>
4. American Cancer Society. (2015). Factores de Riesgo del Cáncer de Próstata. Enero 18, 2016, de *American Cancer Society* Sitio web: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/cancer-de-prostata-causes-risk-factors>
5. Aslam N., Nadeem K., *et al.* (2015). Cancer Prostate; Treatment response on the level of prostate specific antigen (PSA). *Professional Medical Journal*, **22** (7), pp. 938-943.
6. ATCC. (1977). LNCaP clone FGC (ATCC® CRL-1740™). 29/Octubre/2015, de ATCC Sitio web: <http://www.atcc.org/Products/All/CRL-1740.aspx#history>
7. Bellido M., Reproducción en el varón. En *Fisiología Humana*. Edited by Tresguerres JAF. Madrid, España: McGRAW-Hill-Interamericana; (1999), pp. 1033-1047.
8. Bishop, J., Davies, A., *et al.* (2015). Regulation of tumor cell plasticity by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, **22** (3), pp. R165-R182.
9. Cescato R., *et al.* (2008). Bombesin Receptor Antagonists May Be Preferable to Agonists for Tumor Targeting. *The Journal of Nuclear Medicine*, **49** (2), pp. 318-326
10. Chang D., Richard Choo R., *et al.* (2015). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a mechanism of radioresistance and treatment failure. *Genitourinary Oncology*, **5** (90), pp. 1-10.
11. Czyz', J. *et al.* (2012) The role of connexins in prostate cancer promotion and progression *Nat. Rev. Urol.* doi:10.1038/nrurol.2012.14

12. D'Antonio J., Monzon F., *et al.* (2008). Longitudinal Analysis of Androgen Deprivation of Prostate Cancer Cells Identifies Pathways to Androgen Independence. *The prostate*, **68**, pp. 698-714.
13. Feldman, B., Feldman, D. (2001). The Development of Androgen- Independent Prostate Cancer. *Nature Reviews. Cancer*, **1**, pp. 34-45.
14. Flórez J. Farmacología humana, quinta edición, Barcelona: Elsevier Masson, 2008: 503-505
15. Galani, A., Kitsiou-Tzeli, S., Sofokleous, C., *et al.* (2008). Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *HORMONES*, **7**(3), pp. 217-229.
16. Heasley L. (2001). Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*,**20**, pp. 1563-1569
17. Heemers HV, Tindall DJ: Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 2007, **28**, pp. 778-808.
18. Hu Y., Ippolito J., *et al.* (2002). Molecular Characterization of a Metastatic Neuroendocrine Cell Cancer Arising in the Prostates of Transgenic Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, **277** (46), pp. 44462–44474.
19. Instituto Nacional del Cáncer. (2015). Cáncer de Próstata: Tratamiento. Enero 19,2016, de NIH. Sitio web: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata/paciente/tratamiento-prostata-pdq>
20. Ippolito J., Xu J., *et al.*(2005). An integrated functional genomics and metabolomics approach for defining poor prognosis in human neuroendocrine cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102** (28), pp. 9901-9906.
21. Ischia J., *et al.* (2014). Expression and function of gastrin-releasing peptide (GRP) in normal and cancerous urological tissues. *BJUI International*, **113**, pp. 40-47.
22. Ito T, Yamamoto S, Ohno Y, Namiki K, Aizawa T, Akiyama A & Tachibana M., *et al.*(2001). Up-regulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer after androgen deprivation therapy, degree and androgen independence. *Oncology Reports*,**8**, pp. 1221–1224.

23. Joy C. Yang, Joon-ha Ok, J. Erik Busby, Alexander D. Borowsky, *et al.* (2009). Aberrant activation of androgen receptor in a new neuropeptide autocrine model of androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res*, **69** (1), pp. 151-160.
24. Jopling, C., *et al.* (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **12**, pp. 79-89.
25. Junta Editorial de Cáncer.Net. (2014). Cáncer de próstata: Factores de riesgo y prevención. Enero 18, 2016, de Cáncer.Net Sitio web: <http://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata/factores-de-riesgo-y-prevencion>
26. Katsogiannou M., Ziouziou, H., *et al.* (2015). The hallmarks of castration-resistant prostate cancers. *ELSEVIER. Cancer Treatment Reviews*, **41**, pp. 588-597.
27. Latarjet, M., Ruiz, A., *et al.* (2004). Próstata y Glándulas. En Anatomía Humana (pp. 1598-1607). México: Ed. Médica Panamericana.
28. Lee L., Guan J., *et al.* (2001). Neuropeptide-Induced Androgen Independence in Prostate Cancer Cells: Roles of Non receptor Tyrosine Kinases Etk/Bmx, Src, and Focal Adhesion Kinase. *Molecular and Cellular Biology*, **21** (24), pp. 8385-8397.
29. Lipianskaya J., Cohen A., *et al.* (2014). Androgen-deprivation therapy-induced aggressive prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *Asian Journal of Andrology*, **16**, pp. 541-544.
30. Matei D., Renne G., *et al.* (2012). Neuroendocrine Differentiation in Castration-Resistant Prostate Cancer: A Systematic Diagnostic Attempt. *Clinical Genitourinary Cancer*, **10** (3), pp. 164-173.
31. Markwalder R. and Reubi J. (1999). Gastrin-releasing Peptide Receptors in the Human Prostate: Relation to Neoplastic Transformation. *Cancer Research*, **59**, pp. 1152–1159.
32. Meivar I., Ferber S. (2003). New organs from our own tissues: liver-to-pancreas transdifferentiation. *Endocrinology and Metabolism*, **14** (10), pp. 460-466.
33. Mendoza, L. (2013). Introducción. Cribado del cáncer de próstata. En *Cáncer de Próstata. Información actualizada sobre el cáncer de próstata y sobre las opciones terapéuticas* (pp. 1-12). México: authorhouse.

34. NIH. (31/Julio/2015). Cáncer de próstata: Tratamiento. 11/Octubre/2015, de National Cancer Institute of the United States of America. Sitio web: <http://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq>
35. Noordzij M., Steenbrugge G., *et al.* (1995). Neuroendocrine cells in the normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Urology Research*, **22**, pp. 333-341.
36. Páramo C., Álvarez E., Cromogranina A. (2008). La familia cromogranina secretogranina. *Endocrinol Nutr.* **55** (Supl 6), pp. 2-8.
37. Rang H.P., M.M Dale. (2008). Aminoácidos transmisores. En RANG y DALE. Farmacología (pp. 476-487). España: ELSEVIER.
38. Ramírez L., López S., *et al.* (2013). Diferenciación neuroendocrina en adenocarcinoma de próstata. *Gaceta Médica de México*, **149**, pp. 639-645.
39. Rodríguez, M., *et al.* (2003). Tratamiento Multidisciplinario actual del Cáncer de Próstata Metastásico. *Actas Urológicas Esp*, **27 (10)**, pp. 767-782.
40. Rodríguez M., *et al.* (2016). Patologías benignas de la próstata: prostatitis e hiperplasia benigna. *Rev Biomed*, **18**, pp. 47-59.
41. Rojas F., Manzo, J., *et al.* (2011). El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. *Neurobiología.*, **2** (4), pp. 1-15.
42. Santoni M., Conti A., *et al.*(2014). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: Novel morphological insights and future therapeutic perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*, **17**, pp. 630-637.
43. Santoyo K. (2015). Estandarización del Modelo *in vitro* de Transdiferenciación al Fenotipo Neuroendócrino a partir de Células de Cáncer de Próstata (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
44. Saenz, E. Exactitud Diagnostica del Antígeno Prostático Específico para la Predicción de Cáncer de Próstata en Pacientes que Acuden al CMN 20 de noviembre ISSSTE. Tesis (Médico Especialista en Urología). México, DF, Universidad Nacional de México, Facultad de Medicina, 2012. 60 p.
45. Schroeder, U. Prevalencia de Cáncer de Próstata por Biopsia Transrectal en Correlación con el Nivel de Antígeno Prostático Específico en Suero. Tesis (Médico Especialista en Urología). México, DF, Universidad Nacional de México, Facultad de Medicina, 2012. 56 p.

46. Schroeder R., *et al.* (2011). Gastrin-releasing peptide receptor-based targeting using bombesin analogues is superior to metabolism-based targeting using choline for in vivo imaging of human prostate cancer xenografts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **38**, pp. 1257–1266.
47. Seggal I., Powers S., *et al.* (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, pp.4673-4677
48. Shen, R., A., Dorai, T., *et al.* (1997). Transdifferentiation of Cultured Human Prostate Cancer Cells to a Neuroendocrine Cell Phenotype in a Hormone-Depleted Medium. *Urology Oncology*, **3**, pp. 67-75.
49. Sisakhtnezhad, S. & Matin, M. (2012). Transdifferentiation: a cell and molecular reprogramming process. *Cell Tissue Res*, **348**, pp. 379-396
50. Synowitz M., Ahmann P., *et al.* (2001). GABA_A-receptor expression in glioma cells is triggered by contact with neuronal cells. *European Journal of Neuroscience*, **14**, pp. 1294-1302.
51. Thomas R., Hellmich M., *et al.* (2003). Role of Gastrointestinal Hormones in the Proliferation of Normal and Neoplastic Tissues. *Endocrine Reviews*, **24** (5), pp. 571-599.
52. Valverde Alfaro, E. (2014). RECEPTORES GABA. 21/Octubre/2015, de Hospital Nacional Psiquiátrico Sitio web: <http://www.binasss.sa.cr/bibliotecas/bhp/cupula/v24n1-2/art2.pdf>
53. Weigel, N., Moore, and N., Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol* 2007, Vol: 21, pp. 2311-2319.
54. Weigert N., Schepp W., *et al.* (1998). Regulation of Gastrin, Somatostatin and Bombesin Release from the Isolated Rat Stomach by Exogenous and Endogenous Gamma-Aminobutyric Acid. *Digestion*, **59**, pp. 16-25.
55. Wein, A., Kavoussi, L., Partin, A., Novick, A., (2008). Biología molecular, endocrinología y fisiología de la próstata y las vesículas seminales. En *Campbell-Walsh Urología/ Campbell-Walsh Urology*(pp. 2675-3114). Argentina: Ed. Médica Panamericana.
56. Wikipedia. (2016). Próstata. 14/03/2016, de Wikipedia Sitio web: <https://es.wikipedia.org/wiki/Pr%C3%B3stata>
57. World Health Organization. (2012). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. 05/Oct/2015, de International Agency for Research on Cancer Sitio web: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

58. Wright M., Tsai M., *et al.* (2003). Androgen Receptor Represses the Neuroendocrine Transdifferentiation Process in Prostate Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, **17** (9), pp. 1726-1737.
59. Yan Hu, Joseph E. Ippolito, Emily M. Garabedian, *et al.* (2002). Molecular Characterization of a Metastatic Neuroendocrine Cell Cancer Arising in the Prostates of Transgenic Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, **277** (46), pp. 44462-44474.
60. Yang J., *et al.* (2009). Aberrant Activation of Androgen Receptor in a New Neuropeptide Autocrine Model of Androgen-Insensitive Prostate Cancer. *Cancer Research*, **69**: (1), pp. 152-161.
61. Yuan T., Veeramani S., *et al.* (2007). Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocrine-Related Cancer*, **14**, pp. 531-547
62. Yvonne B. Sullivan, Douglas E. Hughes, *et al.* (2006). Importance of siRNA negative control selection: Evaluation of non-specific protein knockdown by negative control siRNA. 03/Noviembre/2015, de Thermo Scientific Sitio web: <http://dharmacon.gelifsciences.com/uploadedFiles/Resources/sirna-negative-controls-poster.pdf>