



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE
XENOTRANSPLANTE
MURINO DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

T E S I S

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

PRESENTA

DIEGO MEZA SUÁREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, 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: Ignacio Camacho Arroyo

VOCAL: Profesor: Marco Antonio Cerbón Cervantes

SECRETARIO: Profesor: Mauricio Rodríguez Dorantes

1er SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

2º SUPLENTE: Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

LABORATORIO DE ONCOGENÓMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

SUSTENTANTE:

Diego Meza Suárez

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1. Cáncer de próstata.....	4
3.2. Fisiología de la próstata.....	5
3.2.1. Los andrógenos en el desarrollo prostático.....	6
3.3. Diagnóstico del CaP.....	9
3.3.1. Antígeno Prostático Específico.....	9
3.3.2. Tacto rectal.....	10
3.3.3. Biopsia prostática.....	10
3.4. Tratamiento del CaP.....	12
3.4.1. El tratamiento de privación androgénica.....	13
3.5. Los modelos animales en el estudio del CaP.....	16
3.5.1. Modelos murinos en el estudio del cáncer.....	17
3.5.2. Modelos murinos de xenotransplantes.....	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVOS.....	25
6.1. Objetivo general.....	25
6.2. Objetivos particulares.....	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1. Línea celular y animales.....	26
7.2. Implantación de células.....	26
7.3. Castración quirúrgica.....	27
7.4. Antígeno Prostático Específico (PSA).....	28
7.5. Extracción de tejido tumoral.....	28
7.6. Inmunohistoquímica.....	28
7.7. Reimplantación de células.....	28
8. RESULTADOS.....	30
8.1. Variaciones de peso corporal.....	30
8.2. Desarrollo tumoral y cuantificación de PSA en suero.....	31

8.2.1. Ratones sin cambios en el volumen tumoral post-castración.....	32
8.2.2. Ratón con cambio en el volumen tumoral post-castración.....	36
8.2.3. Desarrollo de tumor secundario post-castración.....	37
8.3. Inmunohistoquímica para Receptor de Andrógenos.....	39
9. DISCUSIÓN.....	45
9.1. El peso corporal y la velocidad de desarrollo del tumor.....	45
9.2. El volumen tumoral afecta el resultado de la privación androgénica.....	47
9.3. Utilidad del modelo en el estadio CPRC.....	48
9.4. La privación androgénica y los tumores no establecidos.....	50
9.5. La vascularización en los tumores.....	51
9.6. Inmunohistoquímica.....	52
10. CONCLUSIONES.....	55
11. PERSPECTIVAS.....	55
12. REFERENCIAS.....	56
12.1. Libros.....	56
12.2. Artículos.....	57
12.3. Páginas Web.....	61
12.4. Tesis.....	63
13. ANEXOS SUPLEMENTARIOS.....	64
13.1. Anexo suplementario 1. Castración quirúrgica.....	64
13.2. Anexo suplementario 2. Toma de muestra sanguínea.....	67
13.3. Anexo suplementario 3. Extracción de tejido tumoral.....	69
13.4. Anexo suplementario 4. Resultados obtenidos del monitoreo del ratón R2.....	71

1. ABREVIATURAS

RA	Receptor de Andr6genos
BAM	Bloqueo Androg6nico M6ximo
CaP	C6ncer de Pr6stata
CPRC	C6ncer de Pr6stata Resistente a la Castraci6n
CXI	Volumen tumoral de castraci6n ideal
DHT	5- α -dihidrotestosterona
DNA	6cido desoxirribonucleico
FSH	Hormona Estimulante del Fol6culo
GEM	Ratones gen6ticamente modificados
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
HPB	Hiperplasia Prost6tica Benigna
HSPs	Prote6nas de choque t6rmico
IHC	Inmunohistoqu6mica
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
NK	C6lula "asesina natural"
PR	Prostatectom6a Radical
PSA	Ant6geno Prost6tico Espec6fico
SCID	Inmunodeficiencia Combinada Grave
SHBG	Globulina de uni6n a hormonas sexuales
SNP	Polimorfismo de un solo nucle6tido
THN	Tratamiento Hormonal Neoadyuvante
TPA	Tratamiento de Privaci6n Androg6nica
TR	Tacto Rectal
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial y Vascular

2. RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es la sexta causa de muerte por neoplasias malignas y ocupa el segundo lugar en incidencia en hombres a nivel mundial, mientras que en México representa la primera causa tanto de muertes como de incidencias a causa de las neoplasias malignas en el varón. Mientras que los modelos de estudio en cultivo (*in vitro*) son extremadamente útiles para el entendimiento de la biología del cáncer de próstata, estos no pueden realmente englobar todos los mecanismos que intervienen en el desarrollo y progresión del cáncer cuando éste se encuentra en su microambiente biológico. El desarrollo de modelos *in vivo* que logren abarcar la historia natural de los cánceres humanos y su respuesta clínica a las terapias constituyen uno de los mayores pre-requisitos para trasladar adecuadamente a los pacientes la investigación de terapias que han sido efectivas en modelos animales.

Dado que a la fecha, en México no existe un modelo animal de cáncer de próstata que permita estudiar el microambiente tumoral y los mecanismos moleculares que intervienen en la enfermedad en cada una de sus etapas; el objetivo principal del presente trabajo fue reproducir un modelo de xenotransplante murino de cáncer de próstata. Se utilizaron ratones de fenotipo desnudo a los que se les implantaron células de CaP. Una vez que los ratones desarrollaron tumor, se realizó una castración quirúrgica que emulara una privación de andrógenos en cada uno de ellos. Transcurrido determinado tiempo posterior a la castración, los ratones fueron eutanizados y los tejidos tumorales desarrollados fueron extirpados y conservados para estudiarlos por Inmunohistoquímica con el fin de identificar marcas para el Receptor de Andrógenos (RA).

Se identificó correlación entre el aumento de volumen tumoral y de PSA a volúmenes de tumor menores a 300 mm^3 ; y después de realizar la castración quirúrgica esta correlación cambiaba, donde al realizar la cirugía a volúmenes $<300 \text{ mm}^3$ el PSA disminuía y se mantenía estable por cierto periodo de tiempo, al igual que el volumen tumoral; sin embargo, a volúmenes $>300 \text{ mm}^3$ el PSA se veía afectado con una disminución menor y el volumen tumoral no se afectaba, sino que el volumen seguía incrementándose. Se tuvieron variaciones observables en

la vasculatura tumoral antes y después de realizada la castración, ya que al momento de realizar la cirugía, la coloración tumoral disminuía o se mantenía sin cambios aparentes. En los tejidos extirpados, se identificaron diferencias entre las marcas del RA, indicando así que la expresión del propio RA también se ve afectado por el desarrollo tumoral y la propia privación androgénica.

Con la metodología empleada, se logró establecer el xenotransplante de células de CaP en el 50% de los ratones, así como el monitoreo adecuado del volumen tumoral antes y después de la castración quirúrgica empleando las dimensiones tumorales y la cuantificación de PSA en suero murino, ya que existe correlación significativa entre el PSA cuantificado en el suero murino y el volumen tumoral solo en los casos donde se realiza la castración quirúrgica a menos de 300 mm³. Se observaron diferencias en la expresión del RA en los tejidos tumorales en tejidos pre-castrado y post-castrado con lo cual el modelo da posibilidad de realizar investigación relacionada a la Terapia de Privación Androgénica, así como los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de CaP.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Cáncer de Próstata

El desarrollo de la próstata varía con la edad, esta aumenta de tamaño desde el nacimiento hasta la pubertad y después de los 30 años su tamaño permanece constante hasta una edad aproximada de 45 años que es cuando vuelve a continuar su crecimiento; y es debido a estas variaciones que la próstata no se encuentra exenta de sufrir patologías que afecten su correcto desarrollo y mantenimiento. (Wein, A. J., 2008)

El cáncer de próstata (CaP) se considera uno de los problemas médicos más importantes a los que se enfrenta la población masculina. (Boyle, 2005). El CaP afecta a los varones ancianos con mayor frecuencia que a los jóvenes. Por consiguiente, supone un mayor problema de salud en los países desarrollados, ya que cuentan con una mayor esperanza de vida. Así, alrededor del 15% de los cánceres en varones son CaP en los países desarrollados, en comparación con el 4% en aquellos en vías de desarrollo. (Parkin, Bray & Devesa, 2001)

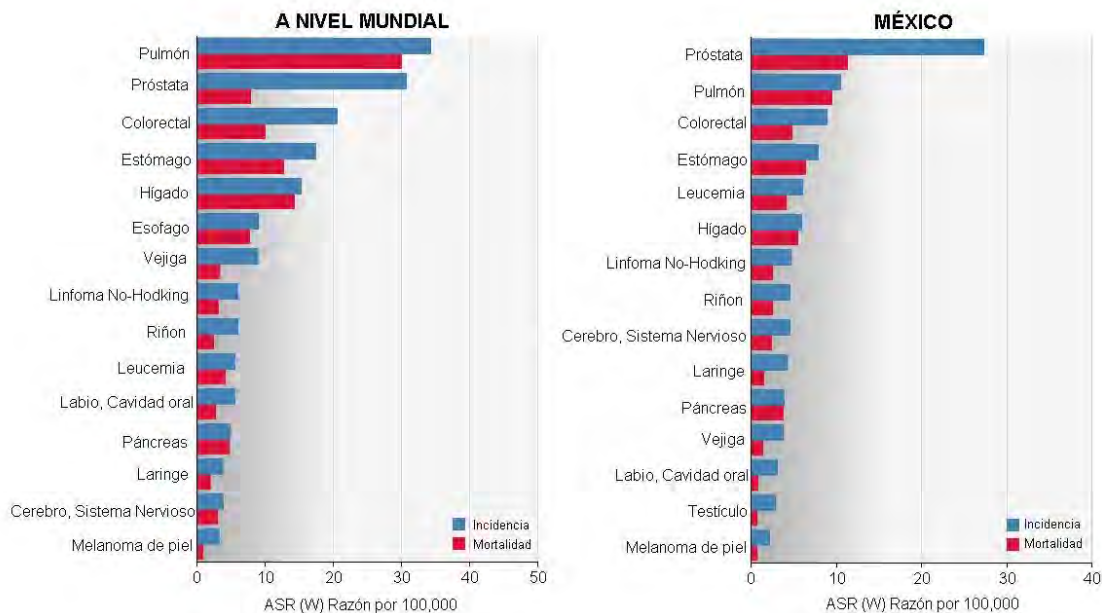


Figura 4. Gráficos de la tasa de incidencia y mortalidad del cáncer en México y a nivel mundial. (Adaptado de World Health Organization, 2012)

Por datos colectados y proporcionados por el proyecto GLOBOCAN de 2012, el CaP es la sexta causa de muerte por neoplasias malignas y ocupa el segundo lugar en incidencias a nivel mundial, mientras que en México, representa la primera causa de muertes e incidencias debido a neoplasias malignas en hombres. (Figura 4) (World Health Organization, 2012)

3.2 FISIOLÓGÍA DE LA PRÓSTATA

La próstata es una glándula perteneciente al sistema reproductor masculino localizada debajo de la vejiga y delante del recto (Figura 5.A). La función principal de la próstata es producir el fluido seminal que nutre y permite la movilidad de los espermatozoides para que estos sean viables durante la fecundación. (Mendoza, L., 2013)

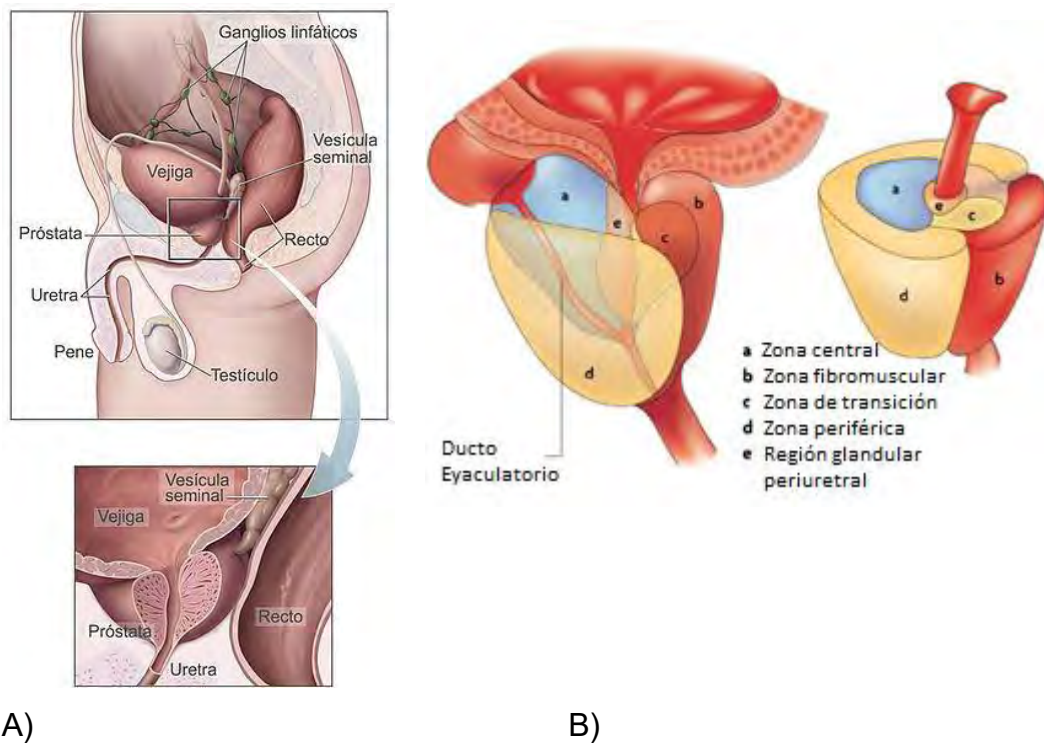


Figura 5. Anatomía de la próstata. A) En esta figura se observa la ubicación de la glándula prostática y B) se pueden observar las zonas que componen la glándula prostática. (Dr. Susaníbar, 2016; Prostate.com, 2016)

Anatómicamente, la próstata se encuentra dividida en 5 zonas (Figura 5.B.), y debido a su relevancia se destacan dos zonas:

1. Zona de transición: Ocupa el 25% de la glándula, está cerca de la uretra y es en esta región donde se presenta una alta prevalencia de la Hiperplasia 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.

Gran parte de la estructura celular de la próstata expresa el receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés) y secreta Antígeno Prostático Específico (PSA, por sus siglas en inglés), de los cuáles el primero se ve implicado en muchas vías de señalización que dirigen la regulación del desarrollo y funcionamiento de la próstata; mientras que el segundo, además de contribuir con su actividad proteolítica a dar fluidez al semen, conformado en su mayoría por proteínas, funge como el biomarcador principal utilizado en la clínica para el diagnóstico de las afecciones prostáticas. (Malm & Lilja, 1995; Loeb & Catalona, 2007)

3.2.1 Los andrógenos en el desarrollo prostático

Las células que conforman la glándula prostática dependen en gran medida de los andrógenos para estimular su crecimiento, función y proliferación. La testosterona, aunque no es una molécula considerada oncogénica, sí es esencial para el crecimiento y la perpetuación de las células en el CaP. Los testículos son el origen de la mayor parte de los andrógenos, de modo que tan sólo el 5%-10% (androstenediona, dihidroepiandrosterona y sulfato de dihidroandrosterona) deriva de la biosíntesis suprarrenal. (Feldman & Feldman, 2001; Heidenrich, A. et al, 2010)

La secreción de la testosterona se encuentra regulada por el eje hipotalámico-hipofisario gonadal. La Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LHRH, por sus siglas en inglés), conocida también como Hormona

Liberadora de Gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), es secretada por el hipotálamo provocando la estimulación de la adenohipófisis para que libere a la hormona luteinizante (LH) y a la hormona estimulante del folículo (FSH). La LH estimula las células de Leydig de los testículos para que secreten testosterona. En el interior de las células prostáticas, la enzima 5- α -reductasa transforma la testosterona en su metabolito más activo, la 5- α -dihidrotestosterona (DHT), siendo 10 veces más potente que la molécula original. La testosterona circulante se aromatiza y se transforma a nivel periférico en estrógenos, los cuales, junto con los andrógenos circulantes, ejercen un control por retroalimentación negativa sobre la secreción hipotalámica de LH (Figura 6). (Heidenrich, A. et al, 2010; Rojas, F. et al., 2011)

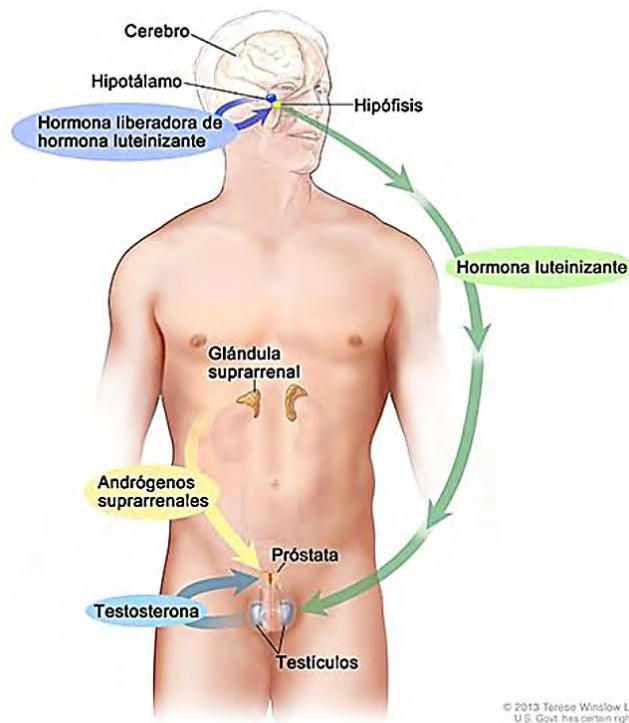


Figura 6. Esquema general de la producción y acción de los andrógenos. (Winslow, 2013).

La acción específica de los andrógenos a nivel celular inicia con el transporte de la testosterona al lugar de acción a través de la circulación sanguínea en donde se encuentra unida a globulinas de unión hormonas sexuales

(SHBG, por sus siglas en inglés). La testosterona es metabolizada a DHT en el estroma de las células prostáticas por la enzima 5- α -reductasa y transportada por difusión pasiva al citoplasma de la célula epitelial. Es en este lugar donde los monómeros de RA se encuentran inactivos al estar unidos a proteínas de choque térmico, (HSPs). Las HSPs 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 RA, este sufre un cambio conformacional, las HSPs se disocian y el RA es fosforilado. Siendo fosforilado se transloca al núcleo donde se dimeriza y es entonces cuando el receptor se puede unir a elementos de respuesta a andrógenos (AREs, por sus siglas en inglés) ubicados en las regiones promotoras de genes blanco. La activación (o represión) de los genes blanco lidera respuestas biológicas como el crecimiento, supervivencia y la producción del PSA, principalmente (Figura 7). (Feldman & Feldman, 2001; Rojas & Manzo, 2011)

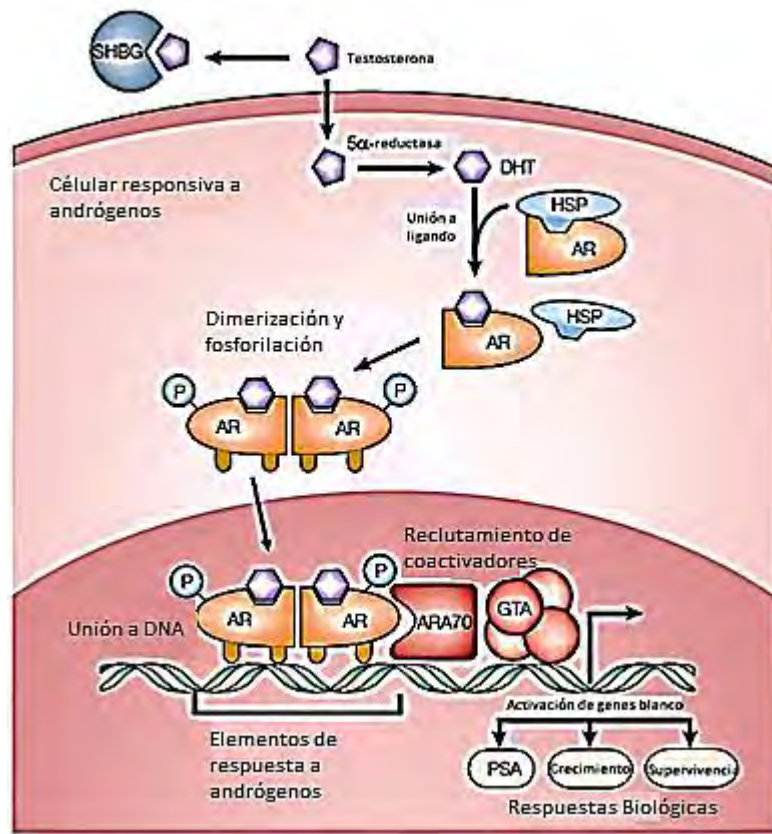


Figura 7. Mecanismo de acción del RA en una célula prostática. (Editado de Feldman & Feldman, 2001)

3.3 DIAGNÓSTICO DEL CaP

En la mayoría de los casos, los individuos únicamente acuden a la clínica cuando presentan algunos de los síntomas característicos de la HPB y del CaP, como lo son el retraso para iniciar la micción, flujo intermitente o sensación de vaciamiento incompleto de la vejiga. Es entonces cuando se sigue el protocolo básico para dar un diagnóstico de CaP el cual consiste en la medición de PSA en suero, en la realización del tacto rectal (TR) y el análisis de biopsia de la próstata. (Thorpe & Neal, 2003)

La HPB se refiere a un crecimiento no maligno de la próstata observada comúnmente en la mayoría de los hombres de edad avanzada. Aproximadamente inicia a los 40 años de edad, sin embargo, la prevalencia histológica de HPB que ha sido estudiada en infinidad de autopsias es aproximadamente del 10% en hombres alrededor de los 30 años, 20% para hombres alrededor de los 40 años, 50% a 60% para hombres alrededor de los 60 años y 80% a 90% para hombres alrededor de los 70 y 80 años de edad. (Roehrborn, 2005) Para la edad de 50 años, la mitad de los hombres en el mundo pueden presentar HPB detectable histológicamente y tan solo un cuarto de ellos presentarán síntomas clínicos; mientras que 1 de cada 6 hombres americanos desarrollarán CaP durante su vida. Por lo tanto, el interés en el desarrollo y funcionamiento de la próstata antes y después de la patología es muy importante a nivel mundial. (Antony & van der Schoor, 2014)

3.3.1 Antígeno Prostático Específico (PSA)

El PSA es una glicoproteína, compuesta de 237 aminoácidos, que es producida casi exclusivamente por las células epiteliales de la próstata. Las variaciones en los niveles séricos de PSA pueden ser indicativas de algún trastorno prostático, sin embargo, estas alteraciones no necesariamente indican el desarrollo de cáncer, ya que las concentraciones séricas pueden aumentar en presencia de HPB, prostatitis y otras enfermedades no malignas. (Heidenrich, A. et al, 2010)

La concentración de PSA total es un parámetro continuo: cuanto mayor es el valor, más probabilidades hay de que exista CaP. Esto significa que no hay un valor umbral o límite superior aceptado de forma universal, sin embargo, se consideran valores de cuantificación mayores a 4 ng/mL como indicadores de mayor probabilidad de presentar afecciones en la próstata. (Heidenrich, A. et al, 2010)

3.3.2 Tacto Rectal

La mayor parte de los CaP se localizan en la zona periférica de la próstata y pueden detectarse mediante tacto rectal (TR). Un TR sospechoso es una indicación absoluta para realizar una biopsia de próstata. En aproximadamente el 18% de todos los pacientes se detecta un CaP a partir de un TR sospechoso aislado; en pacientes con un valor de PSA de hasta 2 ng/ ml tiene un valor predictivo positivo del 5 %-30 %. (Heidenrich, A. et al, 2010)

3.3.3 Biopsia Prostática

La necesidad de una biopsia de próstata ha de determinarse en función de la concentración de PSA, un TR sospechoso o ambos. También debe tenerse en cuenta la edad biológica del paciente, las posibles enfermedades concomitantes y las consecuencias terapéuticas.

El primer valor elevado de PSA no debería conllevar a una biopsia inmediata. El valor de PSA debe comprobarse al cabo de unas semanas con el mismo análisis en condiciones normalizadas (es decir, sin eyaculación ni manipulación, como sondaje, cistoscopia o resección transuretral, y sin infección urinaria) en el mismo laboratorio diagnóstico, utilizando los mismos métodos. (Heidenrich, A. et al, 2010)

- **PSA**
- **Tacto Rectal**
- **Biopsia**

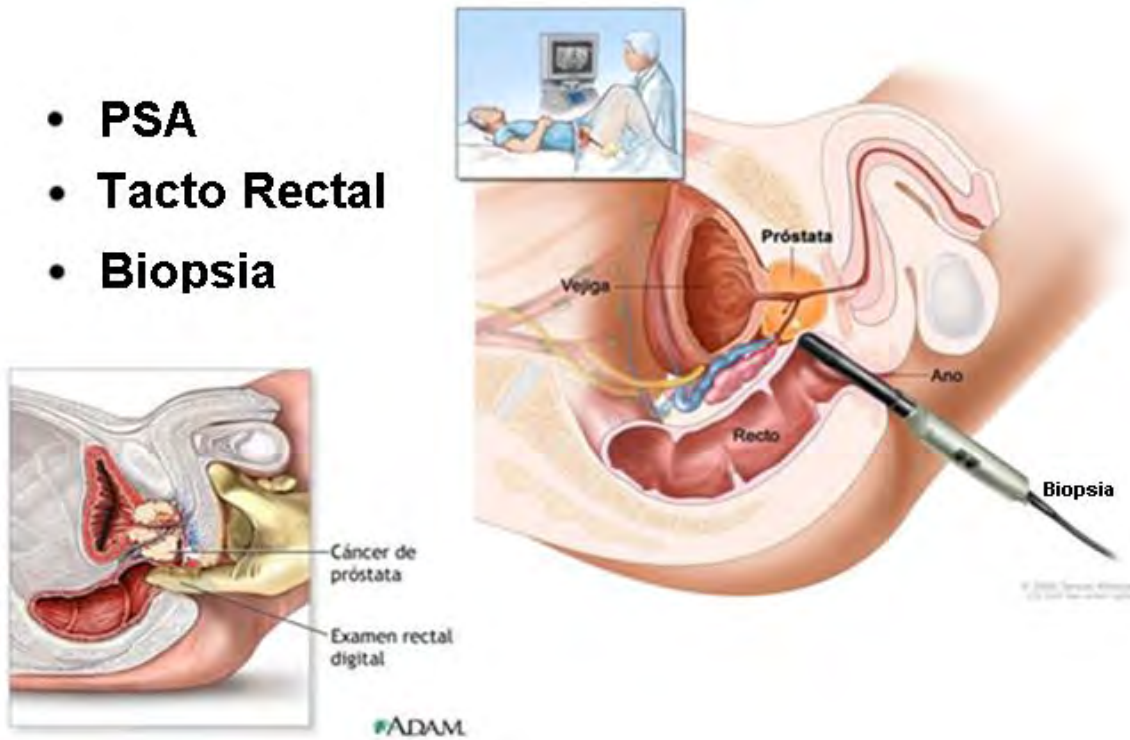


Figura 8. Pruebas de laboratorio usualmente empleadas para el diagnóstico del cáncer de próstata. Donde PSA, Antígeno Prostático Específico.

3.4 TRATAMIENTO DEL CaP

Una vez que se ha diagnosticado el CaP, la decisión de tratamiento dependerá de varios factores. Al inicio, cuando se tiene un CaP localizado y asintomático, el cual es sensible a la castración y no es metastásico, las terapias por las que se optan son la cirugía, la radioterapia y/o el tratamiento hormonal. (Feldman & Feldman, 2001)

El tratamiento quirúrgico de CaP consiste en una prostatectomía radical (PR), que supone la extirpación de toda la próstata entre la uretra y la vejiga, así como la resección de ambas vesículas seminales junto con el tejido adyacente. En varones con CaP localizado y una esperanza de vida ≥ 10 años, el objetivo de una PR por cualquiera de sus variantes es la erradicación de la enfermedad. (Heidenrich, A. et al, 2010) Por otro lado, la radioterapia es usada como tratamiento inicial para los cánceres de bajo grado que aún se encuentran confinados en la glándula o inclusive si el cáncer no fue removido completamente o presenta recurrencia después de la PR. (Radiation therapy for prostate cancer, 2016).

Aunque el Tratamiento de Privación Androgénica (TPA), es aún un tema de debate para los beneficios que puede ofrecer en el tratamiento del CaP al inicio o durante la progresión de la enfermedad, en la Guía Clínica del Cáncer de Próstata de la Asociación de Urología Europea publicada en 2010 se indica el tratamiento hormonal como útil en cuanto a la disminución de los síntomas de la enfermedad en estadios avanzados, sin embargo, no hay pruebas concluyentes de que prolongue la esperanza de vida. (Feldman & Feldman, 2001; Heidenrich, A. et al, 2010) Cuando las células prostáticas se encuentran privadas de la estimulación de los andrógenos, sufren apoptosis; de esta forma, se considera útil este efecto en la terapia y cualquier tratamiento que provoque finalmente una supresión de la actividad androgénica se denomina tratamiento de privación androgénica (TPA). (National Cancer Institute, 2016)

3.4.1 El Tratamiento de Privación Androgénica.

En 1941, Huggins y Hodges evaluaron el efecto favorable de la castración quirúrgica y la administración de estrógenos sobre la progresión del CaP metastásico. Demostraron por primera vez la respuesta del CaP a la privación androgénica y de esta forma establecieron el inicio de la TPA. (Huggins & Hodges, 1941; 1972)

La privación androgénica puede lograrse mediante las siguientes formas:

- Supresión de la secreción de andrógenos testiculares mediante castración quirúrgica o médica.
- Inhibición de la acción de los andrógenos circulantes a nivel de sus receptores en las células prostáticas con compuestos competidores que se denominan antiandrógenos.

Además, en algunos de los casos, estos dos métodos pueden combinarse para poder lograr el bloqueo androgénico máximo (BAM) cuando el CaP es aún asintomático, no metastásico y hormonosensible.

I. Castración Quirúrgica

La castración quirúrgica sigue siendo el método de referencia de TPA con el que se valoran todos los demás tratamientos. La eliminación de la fuente testicular de andrógenos origina un descenso considerable de las concentraciones de testosterona aunque persiste una concentración muy baja de ella. Teniendo en consideración las diferencias entre laboratorios clínicos para el establecimiento de los valores de referencia, la concentración de testosterona total en suero en la etapa adulta a partir de los 20 años se ubica entre 240-1,300 ng/dL, y a partir de los 50 años se establece entre 180-740 ng/dL. El valor medio de la testosterona tras la castración quirúrgica se ha establecido en un valor de 20 ng/dl. (Polascik *et al*, 1999; Heidenrich *et al*, 2010)

II. Agonistas y antagonistas de la LHRH

Los agonistas de la LHRH de acción retardada (buserelina, goserelina, leuprorelina y triptorelina) se han utilizado en el CaP avanzado durante más de 15 años y, en la actualidad representan una de las principales formas de TPA. Son análogos sintéticos de la LHRH lo cual estimula la liberación de LH y FSH, y promueve a su vez la producción de testosterona. La exposición crónica a estos agonistas provoca, con el tiempo, una regulación a la baja de los receptores de LHRH, con la consecuente supresión de la secreción de LH y FSH y la producción de testosterona, haciendo que esta última disminuya a cifras de castración al término del tratamiento. Los antagonistas de la LHRH se unen de manera inmediata y competitiva a los receptores de LHRH de la hipófisis dando como resultado la rápida disminución de las concentraciones de LH, FSH y testosterona. (Heidenrich et al, 2010)

III. Antiandrógenos

Los antiandrógenos compiten con la testosterona y la DHT a nivel del receptor presente en el núcleo de la célula prostática, lo que favorece la apoptosis e inhibe el crecimiento del CaP. Estos compuestos orales se clasifican según su estructura química en esteroideos, por ejemplo, acetato de ciproterona (ACP), acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, y no esteroideos o puros, como la nilutamida, flutamida y bicalutamida. Ambos tipos compiten con los andrógenos a nivel del receptor. (Heidenrich et al, 2010)

Aunque la TPA causa regresión de los tumores, muchos de los pacientes eventualmente desarrollan un cáncer independiente de andrógenos o resistente a la castración (CPRC). El CPRC es una forma letal del CaP que progresa de manera más agresiva que el CaP dependiente de andrógenos y que por lo general logra generar metástasis. (Feldman & Feldman, 2001) La mayoría de los pacientes desarrollan un CPRC dentro de los primeros 2-3 años posteriores al inicio de la TPA y es ahora catalogado como la progresión de la enfermedad a pesar de la castración química o quirúrgica. El paradigma relacionado a este estadio se enfoca actualmente en entender que la vía androgénica continúa teniendo un

papel importante en el funcionamiento y desarrollo del CPRC. Incluso, mientras que otras vías de señalización pueden estar contribuyendo a promover la resistencia a la castración, el RA permanece como la molécula más importante en la continuidad del CPRC aunque los niveles de testosterona en el organismo sean muy bajos. (Chandrasekar, Yang, Gao & Evans, 2015)

En la figura 9 se engloban los pasos que se siguen para llevar a cabo la terapia de privación androgénica.

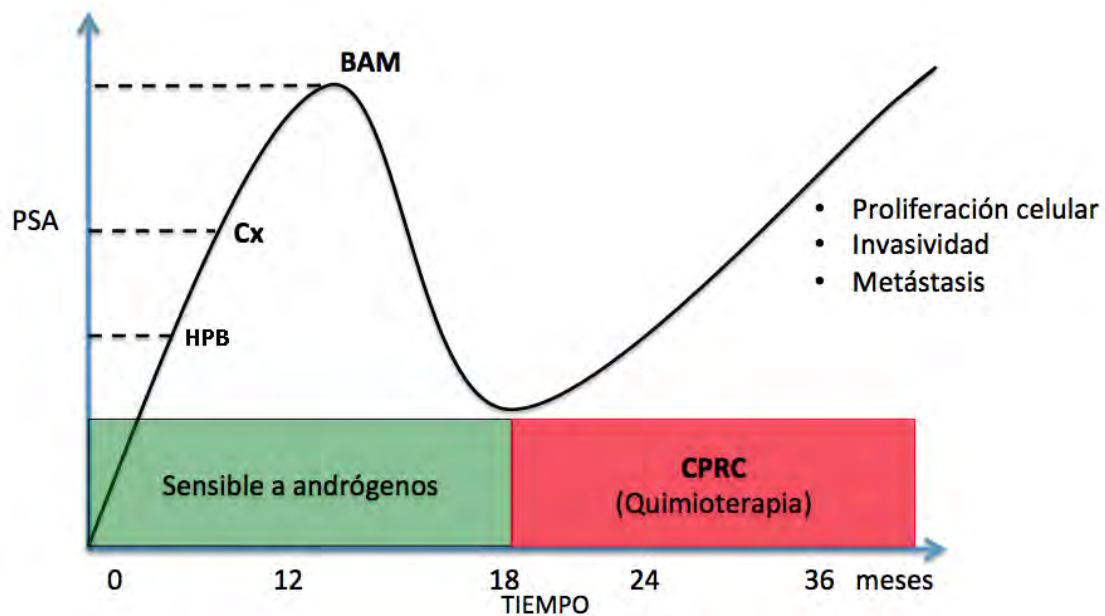


Figura 9. Progreso natural del CaP. Se presentan los niveles de PSA en suero usualmente vistos en la clínica con respecto al tiempo de desarrollo de la enfermedad. Donde HPB, Hiperplasia Prostática Benigna; BAM, Bloqueo Androgénico Máximo; Cx, cirugía; CPRC, CaP Resistente a la castración.

(Editado de Cruz Hernández, 2016)

3.5 LOS MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DEL CaP

Mientras que los modelos en cultivo (*in vitro*) son extremadamente útiles para el entendimiento de la biología del cáncer de próstata, estos no pueden realmente englobar todos los mecanismos que intervienen en el desarrollo y progresión del cáncer cuando éste se encuentra en su microambiente biológico. (Lamb & Zang, 2005; Ittmann, Huang, Radaelli, Martin, Signoretti, Sullivan, & Cardiff, 2013; Wu, Gong, Roy-Burman, Lee & Culig, 2013; Simmons, Elshafae, Keller, McCauley & Rosol, 2014; Cunningham & You, 2015)

El desarrollo de modelos *in vivo* que logren abarcar la historia natural de los cánceres humanos y su respuesta clínica a las terapias constituyen uno de los mayores pre-requisitos para trasladar adecuadamente la investigación de terapias del laboratorio, que han sido efectivos en modelos animales, al paciente (Figura 10). (Cekanova & Rathore, 2014)

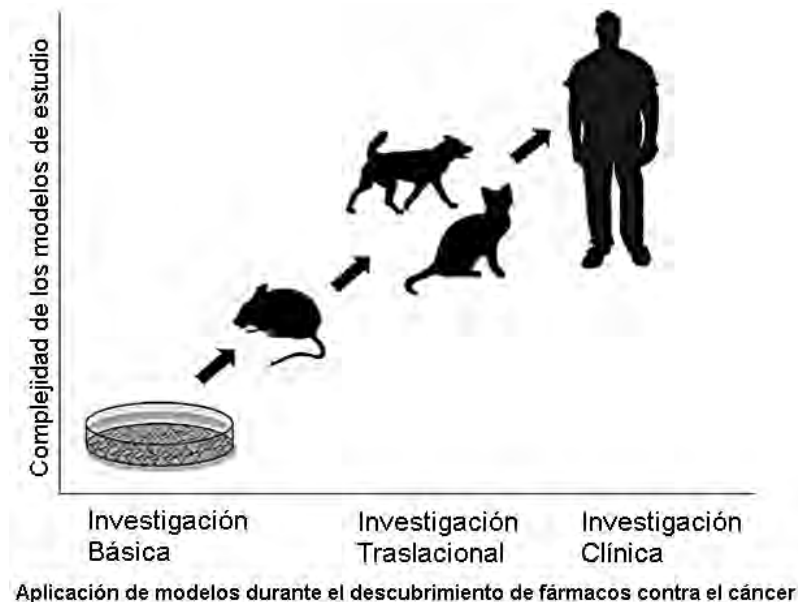


Figura 10. Importancia de los modelos animales en el descubrimiento de fármacos para detección y tratamiento del cáncer. (Editado de Cekanova & Rathore, 2014)

La mayoría de los animales y primates, excluyendo a humanos, no desarrollan espontáneamente CaP, por lo cual el uso convencional de algunas especies animales ha sido considerado y limitado a las que desarrollan espontáneamente la patología como lo son ratas, ratones, perros y humanos.

En 2014 se tuvo un estimado de 1.6 millones de humanos diagnosticados con cáncer en los Estados Unidos de América, en comparación con los 6 millones de perros y gatos que también fueron diagnosticados en el mismo año. La amplia población de mascotas con cáncer brinda la oportunidad de estudiar los casos espontáneos de cáncer de manera similar a los que ocurren en el humano. Los perros desarrollan tumores en una frecuencia doble que los humanos, mientras que los gatos los desarrollan en una frecuencia a la mitad que la de los humanos. Las ventajas que ofrecen estos modelos son: sistema inmune intacto, tumores heterogéneos, desarrollo de enfermedades recurrentes y resistentes a fármacos, y posibilidad de metástasis; e incluso los mismos oncogenes y supresores de tumores contribuyen al desarrollo de cáncer tanto en perros como en humanos. (Cekanova & Rathore, 2014)

3.5.1 Modelos murinos en el estudio del cáncer

Mucha de la investigación sobre genética del cáncer humano recae en los modelos murinos, ya que estos han revolucionado la habilidad en el estudio de la función de genes y proteínas in vivo y para entender mejor las vías de señalización implicados en el desarrollo del cáncer. (Cekanova & Rathore, 2014)

En la tabla 1 se mencionan algunas ventajas y desventajas relacionadas al uso de ratones en la investigación sobre el cáncer.

I. Modelos de cáncer por inducción química.

Este tipo de modelos consisten en exponer al ratón a agentes químicos que simulan la influencia de factores ambientales y provocan alteraciones genéticas. Para este tipo de modelos, el desarrollo del cáncer se lleva a cabo con la exposición a carcinógenos, entre los que destacan la N-butil-N-(4-hidroxi-butil) nitrosamina, la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, la N-etil-N-nitrosourea, el azoximetano, el benzopireno, el uretano, y fibras de asbestos. Este tipo de modelos no son muy empleados debido a que requieren secuenciación masiva

para identificar las mutaciones causales del desarrollo del cáncer, lo cual resulta muy laborioso y tardado. (Cekanova & Rathore, 2014)

Ventajas	Desventajas
Tamaño pequeño que facilita su cuidado	No necesariamente refleja las características biológicas, genéticas y epigenéticas de los tumores humanos
Ciclo de vida corto. Tiempo de gestación corto.	Mayor rapidez metabólica que el humano. Tolerancia a altas concentraciones de fármacos.
Larga historia de uso para investigación científica	Algunas vías de señalización funcionan de manera diferente al humano
Posibilidad de manipulación y análisis genético	Modelos metastásicos muy raros
Similitud fisiológica y molecular con el humano	
Genes que se derivan de un ancestro común con el humano	
Genoma ya secuenciado	
Mantenimiento poco costoso	

Tabla 1. Ventajas y desventajas generales de los modelos de cáncer humano basados en ratón. (Cekanova & Rathore, 2014, De Jesús-Monge, 2016)

II. Modelos de cáncer en ratones genéticamente modificados (GEM)

Estos modelos emplean la ingeniería genética para modificar un grupo o determinado oncogén o supresor de tumores para provocar el desarrollo de un cáncer espontáneo. Los sistemas usualmente usados corresponden a Cre-Lox, el de regulación de promotores dependientes de tetraciclinas y los de sitio-específicos mediados por Flp. Estos modelos son creados por la microinyección de DNA en el pronúcleo de cigotos fertilizados y el transgén es integrado en el genoma.

Los ratones generados transgénicamente para contener clonas de oncogenes o los ratones *knockout* diseñados para tener falta de genes supresores de tumores, han tenido un impacto muy importante en la investigación oncológica y la translación a estudios preclínicos. La mayor desventaja de estos modelos es la falta de control en los niveles de expresión génica, y la integración aleatoria de los transgenes puede resultar en fenotipos inesperados. (Cekanova & Rathore, 2014)

III. Xenotransplantes

Uno de los modelos en ratón empleado en la actualidad es el de xenotransplantes, donde se injertan células o tejidos externos a un nuevo recipiente biológico, usualmente ratones inmunocomprometidos, lo cual permite que la posibilidad de rechazo del tejido o de las células humanas sea limitada. Sin embargo, su principal desventaja es que no se puede estudiar el rol del sistema inmunológico en la progresión del tumor; este aspecto se menciona con mayor detalle en la sección 3.6.2.

IV. Ensayos de metástasis

Los ensayos de metástasis consisten en la colocación de células tumorales en la circulación sistémica del ratón y en el análisis de su capacidad para colonizar órganos distantes. Su limitación es que solo estudia la etapa tumoral de colonización metastásica, ignorando así en análisis de las etapas previas.

3.5.2 Modelos murinos de xenotransplantes

Los tipos más comunes de ratones inmunocomprometidos usados en la investigación del cáncer son los ratones atímicos desnudos [Foxn1nu] y los ratones con Inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID, por sus siglas en inglés). Los ratones atímicos desnudos tienen una mutación en el gen Foxn1 lo cual resulta en una falla del desarrollo del timo, por lo cual no hay diferenciación ni maduración de linfocitos T. Los ratones SCID tienen un polimorfismo de nucleótido simple (SNP, por sus siglas en inglés) a lo largo del gen del polipéptido catalítico

de la proteína-cinasa dependiente de DNA (Prkdc), lo que resulta en una falla completa del sistema inmune debido a la ausencia de linfocitos atípicos T y B. Esta deficiencia de sistema inmunitario permite la implantación de células tumorales humanas. Sin embargo, la inmunidad innata, en particular las células “natural killers” (NK), puede limitar el crecimiento tumoral en ratones inmunodeficientes desnudos y de esta forma no ser útiles para estudios de metástasis. (Talmadge, Singh, Fidler & Raz, 2007; Richmond & Su, 2008; Cekanova & Rathore, 2014)

Como lo describe Cekanova & Rathore (2014), este tipo de modelos permite el estudio y desarrollo in vivo de terapia anti-cancerígena, así como de agentes de monitoreo. La mayor desventajas de los modelos de xenotransplantes que limita la translación rápida a la investigación clínica incluyen: efectividad y especificidad de los fármacos anticancerígenos dirigidas a solo ciertos tipos de cáncer, la vascularización superficial de los tumores xenotransplantados y la falta de interacción tumor-estroma, además de que debido al sistema inmunitario comprometido de los modelos murinos, no se representa completamente el comportamiento natural que ocurre en los cánceres humanos.

Cunningham & You (2015) describen que existen 3 modelos de xenotransplantes murinos actualmente utilizados en el CaP: subcutáneos, ortotópicos y bajo la cápsula subrenal (SRC, por sus siglas en inglés), éste último aún en desarrollo. A continuación se describen los dos primeros tipos de modelos de xenotransplantes:

- Subcutáneos: desarrollados por primera vez utilizando la inserción de tejido prostático de pacientes en el lomo de ratones desnudos a finales de 1970 por Schroder y colaboradores en “Erasmus University Rotterdam”. Lo cual dio como resultado la primera línea celular tumoral transplantable, PC-82. Las ventajas de ésta modelo incluyen fácil acceso a la zona de implante y menor demanda de experiencia técnica, así como la cantidad del tejido tumoral que puede ser introducida. El rendimiento es muy bajo, debido a la

pobre vascularización del tejido dérmico, encontrando en la literatura un rendimiento de entre el 3% hasta el 58%. (Figura 11)

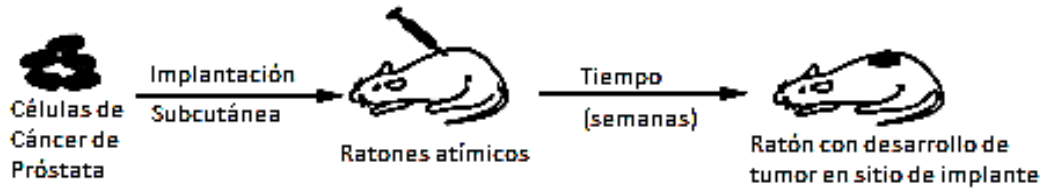


Figura 11. Implantación de células de CaP para modelo de xenotransplante subcutáneo. (Editado de Thalmann *et al.*, 1994)

- Ortotópicos: Stephenson *et al.* Introdujeron este modelo en 1992. El modelo permite la introducción del tejido prostático canceroso humano dentro de la próstata del ratón y como parte de sus ventajas se incluye la relevancia de la interacción entre el tejido implantado y el órgano de origen de la patología, además del incremento en la posibilidad de metástasis. El rendimiento es más favorable, reportándose cerca del 72%. Además, ofrece la ventaja de implantar tejidos tumorales con un mayor rango de agresividad, permitiendo el estudio de invasión y metástasis. Sus principales desventajas se basan en las habilidades que se requieren para llevar a cabo la cirugía y la limitada cantidad de tejido que puede ser introducida en la próstata del ratón (Figura 12).

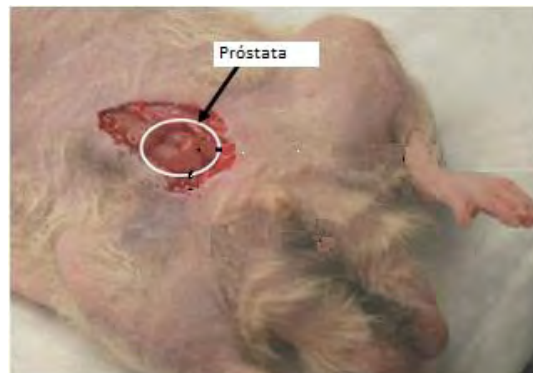


Figura 12. Exposición de la próstata en rata para implantación de células para xenotransplante ortotópico. (Editado de Tumati *et al.* 2013)

Sin embargo, se debe tener en cuenta que los modelos de xenotransplantes murinos de CaP no mimetizan al 100% todos los aspectos involucrados en el desarrollo del cáncer de próstata, por ejemplo, en el humano la enfermedad se puede dar en diferentes zonas dependiendo el individuo, donde frecuentemente comienza en la zona de transición para la hiperplasia prostática benigna; mientras que por otro lado, en la próstata de rata y de ratón existen 4 lóbulos diferentes: anterior, dorsal, lateral y ventral (Figura 13). (Lamb & Zhang, 2005; Simmons *et al.*, 2014)

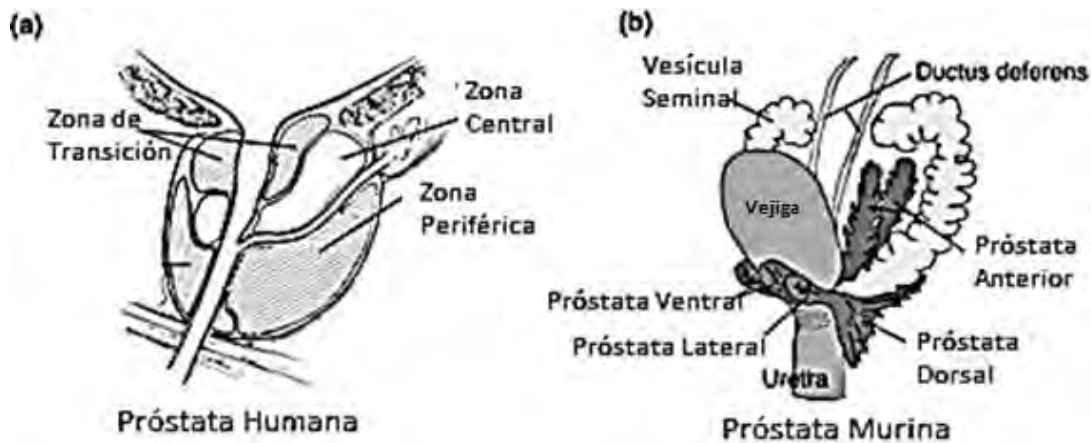


Figura 13. Vista esquemática de la anatomía de la próstata, a) humana; y b) murina. (Kaiser, S., 2005)

Los lóbulos dorsales y laterales son los más similares a la zona periférica de la próstata humana, pero este concepto se basa en información descriptiva y no a caracterizaciones moleculares. En algunas cepas de ratas, el desarrollo tumoral es dependiente de andrógenos, mientras que en perros es usualmente independiente de andrógenos y con falta en la producción de PSA, en contraste con las etapas tempranas de la enfermedad en humanos que es andrógeno-dependiente con constante producción de PSA. (Lamb & Zhang, 2005; Simmons *et al.*, 2014)

Por las razones antes mencionadas, la enfermedad no se llega a estudiar en su mayoría directamente en la próstata de los modelos animales y se opta por el empleo de modelos subcutáneos.

Horoszewicz *et al.* (1983), realizaron un modelo de xenotransplante subcutáneo en ratones desnudos para evaluar la respuesta hormonal. Después de la implantación de las células LNCaP, el desarrollo del tumor fue favorecido por los andrógenos. Sin embargo, una vez que el tumor se estableció, el desarrollo tumoral fue similar sin importar si los ratones eran machos o hembras o la manipulación hormonal sugiriendo que los cultivos celulares consisten de células que son heterogéneas en su respuesta a las hormonas. Lo cual fue fundamentado en evidencia reportada donde en ratas castradas, la progresión del adenocarcinoma de próstata de Dunning a un estado resistente a la castración es debido a la heterogeneidad del inóculo original y por un proceso de selección acelerado *in vivo*.

En 2002, Marianne D. Sadar, *et al.*, describen el establecimiento de un modelo murino parecido al xenotransplante de CaP en ratones inmunosuprimidos, con el fin de implementar un modelo apropiado en el cual no exista contaminación del tumor en desarrollo por parte de las células del hospedero empleando fibras huecas que permitan el desarrollo del tumor pero manteniéndolo excluido del ambiente hospedero. Además, describen las alteraciones en cuanto a niveles de PSA en el suero de los ratones como reflejo del desarrollo tumoral antes y después de haber realizado una castración quirúrgica a cada uno de los ratones, mimetizando de ésta forma lo que ocurre con la TPA y evaluando la progresión a un CaP resistente a la castración (Figura 14).

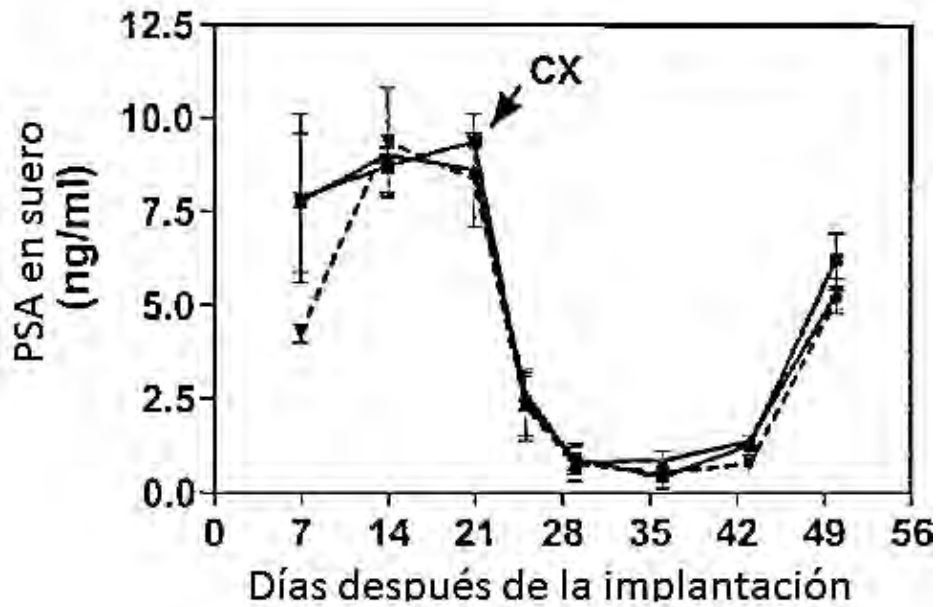


Figura 14. Seguimiento de PSA antes y después de privación androgénica. Se distingue el punto marcado como CX como el periodo de tiempo en el que se realizó la cirugía de castración. Tomado y modificado de Sadar, (2002).

Los modelos de xenotransplantes murinos, han aportado grandes beneficios en la investigación realizada sobre el CaP, así como en el rol central del RA y los cambios comunes que se dan en la progresión de la patología. (Hu, Ippolito, Garabedian, Humphrey & Gordon, 2002) Por lo tanto, la implementación de modelos animales en el campo de investigación básica continúa siendo uno de los puntos de partida en el abordaje de las patologías que afectan al ser humano.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente no se conocen los mecanismos moleculares específicos por los cuáles se desarrolla el cáncer de próstata; en la investigación clínica actual se utilizan diferentes modelos in vitro e in vivo, siendo los modelos in vivo una herramienta indispensable en el estudio del CaP usando un modelo de xenotransplantes. A la fecha en México no existe un modelo de xenotransplantes para el estudio del CaP y que permita estudiar el microambiente tumoral y los mecanismos moleculares que intervienen en la enfermedad.

5. HIPÓTESIS

Dado que a la fecha no existe un modelo murino de xenotransplantes para CaP en México, entonces es posible reproducir y establecer un modelo con células de CaP en ratones inmunosuprimidos.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Reproducir un modelo animal de xenotransplante subcutáneo para el estudio del CaP.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Inducir el desarrollo tumoral por parte de células de CaP en ratones inmunodeprimidos de fenotipo desnudo para modelo de xenotransplante.
2. Definir el rendimiento de desarrollo tumoral.
3. Monitorear las dimensiones del tumor desde el momento del implante, así como después de realizar una castración quirúrgica.
4. Monitorear los niveles de PSA en suero murino y establecer si hay correlación con el desarrollo tumoral.
5. Evaluar la existencia del RA en tejido tumoral pre-castrado y post-castrado.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 LÍNEA CELULAR Y ANIMALES

Se utilizaron células de la línea LNCaP, las cuales fueron obtenidas de la American Tissue Type Culture Collection (ATCC), estas células fueron mantenidas y cultivadas en monocapa en placas de cultivo de 10 cm y se empleó medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS. Se mantuvieron en incubadora (ULTIMA II) a 37°C y atmosfera al 5% CO₂. Se contó con 9 ratones machos “desnudos” (cepa nu/nu) de 6-8 semanas de edad adquiridos en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ). Todos los ratones fueron aislados en condiciones libres de patógenos, con intervalos de luz/oscuridad 12/12 horas, con agua y alimento *ad libitum*. Los ratones fueron pesados y monitoreados en cuanto a salud al momento de ser empleados y posteriormente durante el resto del experimento y el manejo de los mismos se realizó en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la cual describe las consideraciones técnicas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

7.2 IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS

Las células a implantar fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH 7 y fueron dispersadas empleando 1.5 mL de tripsina al 0.1% por caja de cultivo de 10 cm dejando incubar a 37°C y atmosfera al 5% CO₂ durante 1 minuto. El efecto de la tripsina fue detenido adicionando 0.5 mL de medio de cultivo con 5% de FBS y colocado en tubos de poliestireno de 50 mL. Posterior a la tripsinización, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente con medio RPMI-1640 libre de rojo de fenol suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, para los lavados se centrifugaron los tubos a 1100 rpm durante 2 minutos. Se realizó el conteo celular empleando un hematocitómetro. Una vez contadas, las células se llevaron a un volumen adecuado con medio donde la cantidad de células fuera la necesaria para inocular a cada uno de los ratones que conforman cada grupo de manera subcutánea la cantidad de 5×10^6 células. La implantación de las células se realizó en el lomo de los ratones implantando un volumen de 100 µL conformado de 50% de Matrigel como soporte celular.

De los 9 ratones disponibles, se tomaron 3 ratones como grupo control (sin implante celular) y a los 6 ratones restantes se les realizó el implante celular. Después de la implantación, el tumor de los ratones se midió cada semana y utilizando la siguiente formula se determinó el volumen tumoral (Medina et al, 2008):

$$VT = D \times d^2 \times \frac{\pi}{6}$$

Donde

VT: Volumen del tumor (mm³)

D: Diámetro mayor

D: Diámetro menor (mm)

En la literatura se reporta un promedio de volumen tumoral de entre 250-300 mm³ adecuado para realizar la privación androgénica o inclusive iniciar con tratamientos farmacológicos cuando estos son requeridos, sin embargo para observar las variaciones que pudiera tener el efectuar antes o después de haber llegado a éste volumen, se registró el tiempo en que tardó el tumor subcutáneo en ser palpable y cuando el volumen tumoral calculado correspondió a aproximadamente 300 mm³ o sobrepasara este volumen se realizó la castración quirúrgica para cada uno de los ratones y se continuó con su monitoreo semanal.

7.3 CASTRACIÓN QUIRÚRGICA

Durante la cirugía de castración, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano/oxígeno utilizando una unidad de inhalación para roedores (Bickford, Wales Center, NY).

Se realizó una pequeña incisión abdominal de manera que se lograra ingresar a cavidad abdominal, una vez en ella, los testículos fueron externalizados para realizar la adecuada ligación de los conductos y posteriormente el corte de los testículos. La piel fue suturada y los ratones se mantuvieron en observación durante las horas posteriores a la cirugía hasta confirmar una recuperación satisfactoria. (Ver Anexo Suplementario 1)

7.4 ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)

Semanalmente se realizó la obtención de muestra sanguínea por corte del extremo de la cola y goteo de la sangre (aprox. 100 μ L) en tubos de poliestireno (BD Microtainer #365967). No se requirió anestesia para el procedimiento. Las muestras fueron procesadas, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y el suero fue colectado en un tubo de poliestireno nuevo para cuantificación de PSA empleando un ELISA tipo sándwich (Abnova #KA0208). (Ver Anexo Suplementario 2)

7.5 EXTRACCIÓN DE TEJIDO TUMORAL

En cuanto el volumen tumoral llegó a valores mayores de 1,000 mm³ se procedió a realizar el sacrificio del ratón por dislocación cervical y la extracción del tejido tumoral, así como de la limpieza y corte de este último (Ver Anexo Suplementario 3). Uno de los cortes de cada muestra fue conservado en formalina para inmunohistoquímica del RA y otra porción quedó congelada a -80°C para análisis posteriores.

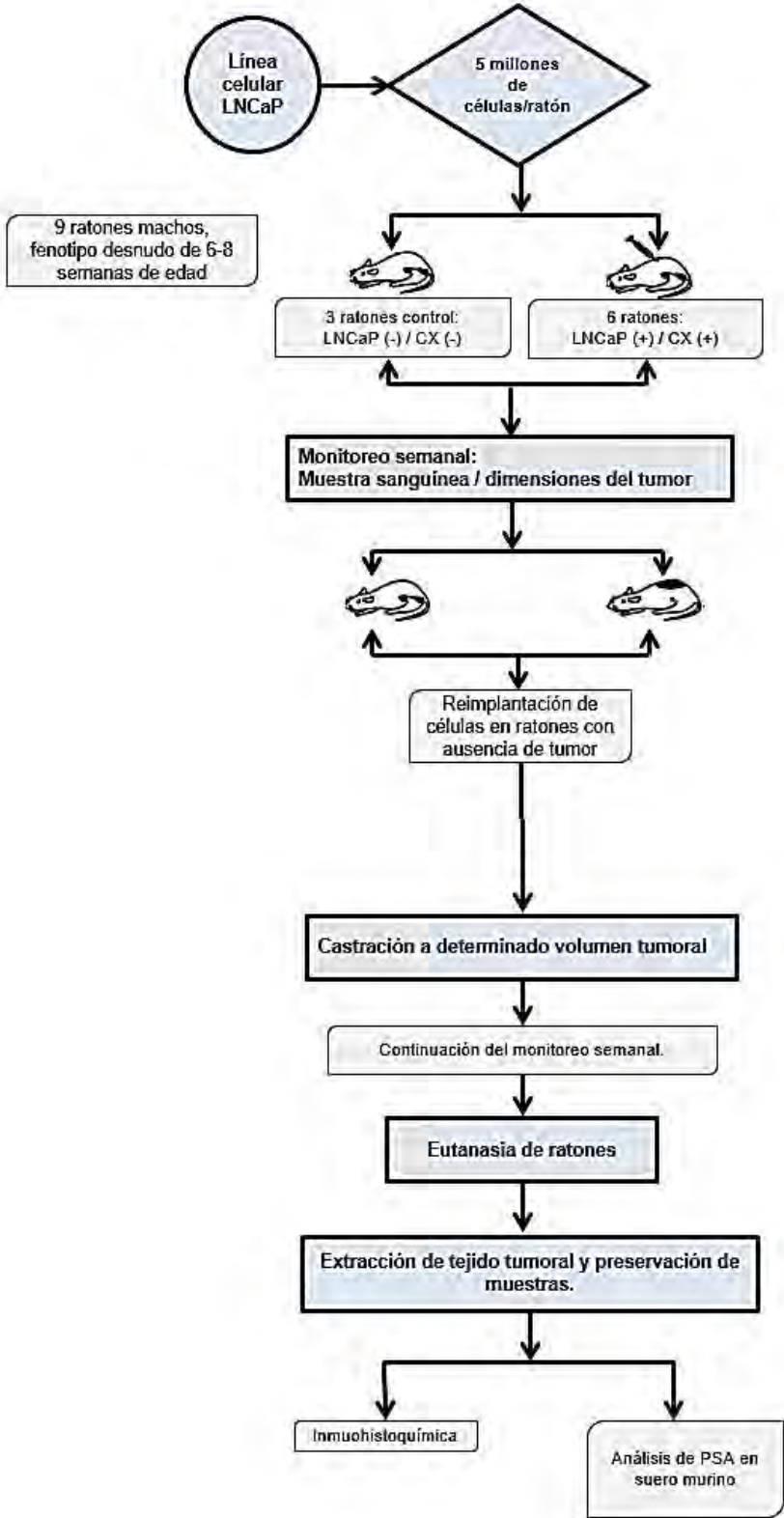
7.6 INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

Los tejidos tumorales extraídos fueron sumergidos en un volumen suficiente de formalina, el cual consiste en una solución de formol al 10% en agua que se presenta como un líquido claro, incoloro que ejerce su acción fijadora de tejidos al coagular a las proteínas, manteniendo la adecuada estructura de los tejidos y facilitando la coloración posterior. Las muestras fueron entregadas al área de microscopía del INMEGEN donde se realizó el proceso correspondiente para tinción del RA.

7.7 REIMPLANTACIÓN DE CÉLULAS

Se realizó una segunda implantación de la misma cantidad de células en los ratones que no hubieran desarrollado cuerpo tumoral después de 5 semanas desde el primer implante, siguiendo el mismo monitoreo, los criterios de la castración quirúrgica y sacrificio descritos anteriormente.

Diagrama general de la metodología empleada.



8. RESULTADOS

De los 6 ratones con implante (A3, V2, R2, A1, V1 y R1), solo tres de ellos (A3, V2, y R2) desarrollaron un tumor posterior a la 4ª semana en el sitio del implante, por lo cual estos tres ratones fueron identificados como ratones con único implante, y los ratones restantes (A1, V1 y R1) fueron identificados como ratones con segundo implante. En los gráficos subsecuentes, cada ratón se idéntica de la forma anteriormente descrita.

8.1 VARIACIONES DE PESO CORPORAL

En el Gráfico 1 se observa el comportamiento de los pesos corporales para cada uno de los ratones identificados como los de primer implante desde el momento en que se realizó la implantación de células hasta el final de su monitoreo 19 semanas después.

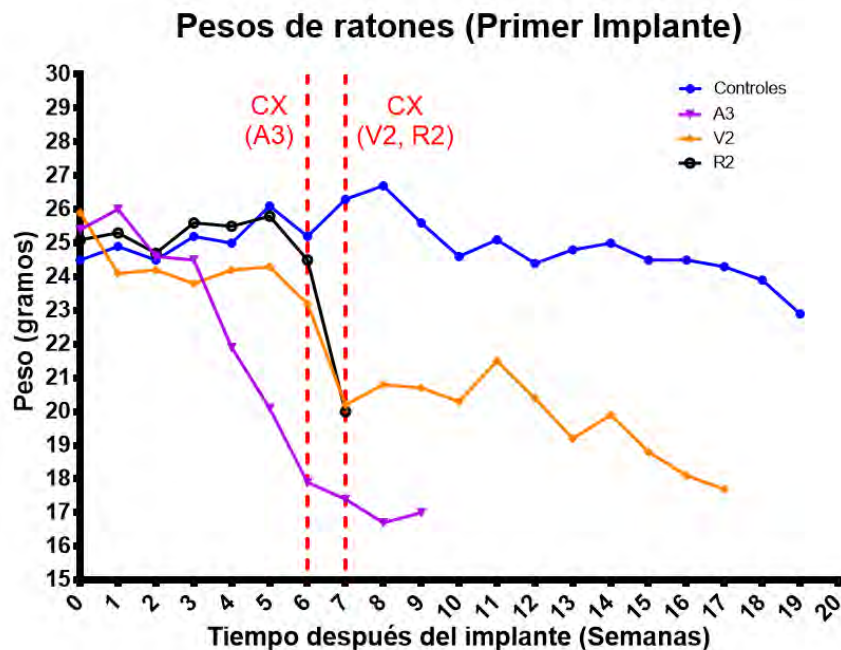


Gráfico 1. Comportamiento de la variación de peso corporal. Único implante.

En el Gráfico 2 se observa el comportamiento de los pesos corporales para cada uno de los ratones identificados como los de segundo implante desde el

momento en que se realizó la segunda implantación de células hasta el final de su monitoreo 22 semanas después.

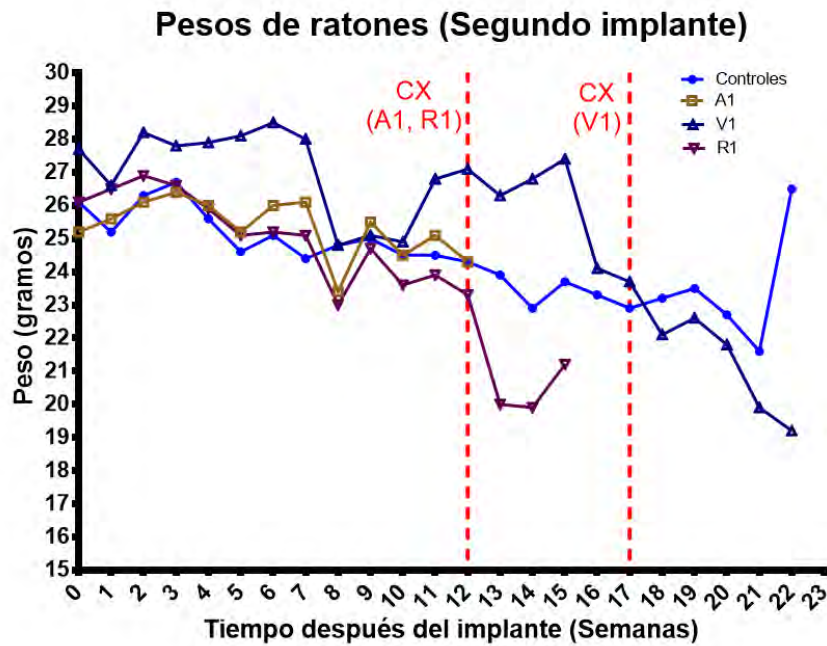


Gráfico 2. Comportamiento de la variación de peso corporal. Segundo implante.

8.2 DESARROLLO TUMORAL Y CUANTIFICACIÓN DE PSA EN SUERO

Para los gráficos en los que se presenta el volumen tumoral y la cuantificación de PSA en suero, las escalas de los ejes Y se presentan de manera logarítmica para facilitar la visualización de los datos entre cada uno de los gráficos, así como su comparación entre ellos. Además, en cada gráfico se incluye la señalización del volumen tumoral de castración ideal (CXI) que fue determinado al inicio del experimento después de haber revisado la literatura al respecto, dicho valor de volumen ideal se estableció en 300 mm³.

Los 3 ratones empleados como controles no presentaron indicios de desarrollo tumoral en el lomo durante el transcurso del experimento y la cuantificación de PSA para cada uno de ellos en el suero resultó negativa, por lo tanto estos valores no se presentan en los gráficos. Además, los resultados de cada ratón se ordenaron de acuerdo a la similitud de su comportamiento a lo largo del experimento.

En la quinta semana posterior al primer implante, el ratón R2 presentó desarrollo tumoral y se realizó la castración quirúrgica en el momento en el que el volumen tumoral se encontraba en el CXI. Por cuestiones técnicas al momento de realizar la cirugía, el ratón R2 falleció durante el procedimiento; las imágenes y gráfico correspondiente del desarrollo tumoral se pueden observar en el Anexo Suplementario 4. A pesar de este percance, el tejido tumoral fue extraído y estudiado con IHC, el resultado se muestra en el apartado correspondiente.

Los tres ratones (A1, V1 y R1) que no desarrollaron tumor fueron reimplantados con la misma cantidad de células que al principio del experimento. Después de realizar la segunda implantación de células, el desarrollo del volumen tumoral ahora tardó en aparecer 8 semanas en comparación con los ratones que solo tuvieron un único implante, el cual apareció en tan solo 4 semanas.

8.2.1 Ratones sin cambios en el volumen tumoral post-castración

En los gráficos 3 y 4 se observan los seguimientos semanales realizados a los desarrollos tumorales de los ratones identificados como A3 (único implante) y R1 (segundo implante), respectivamente, así como las variaciones en los niveles de PSA en cada suero. El tumor del ratón A3 fue medible a partir de la tercera semana posterior a la realización del implante, siendo este tumor el más rápido en aparecer y posteriormente en aumentar su tamaño en las semanas siguientes. El ratón identificado como R1 presentó cuerpo tumoral medible en la octava semana posterior al implante y el nivel de PSA en suero fue incrementándose a la par con el volumen tumoral.

La castración quirúrgica para ambos ratones fue realizada en un tiempo del experimento (semana 6 y 12, respectivamente) en el que el volumen tumoral se encontraba por arriba del CXI, encontrando así que aunque el volumen tumoral no se vio afectado en ninguno de los ratones después de haber realizado la castración, la concentración de PSA en el suero sí se vio afectada, el cual disminuyó después de la cirugía y en las semanas siguientes se mantuvo sin ningún cambio. Observando las imágenes del tumor desarrollado en el lomo de los ratones, la coloración de los mismos no se vio afectada después de la cirugía de

castración (Figuras I y II). El ratón A3 fue eutanazado 3 semanas posteriores a la castración ya que el volumen tumoral era excesivo para continuar con el experimento.

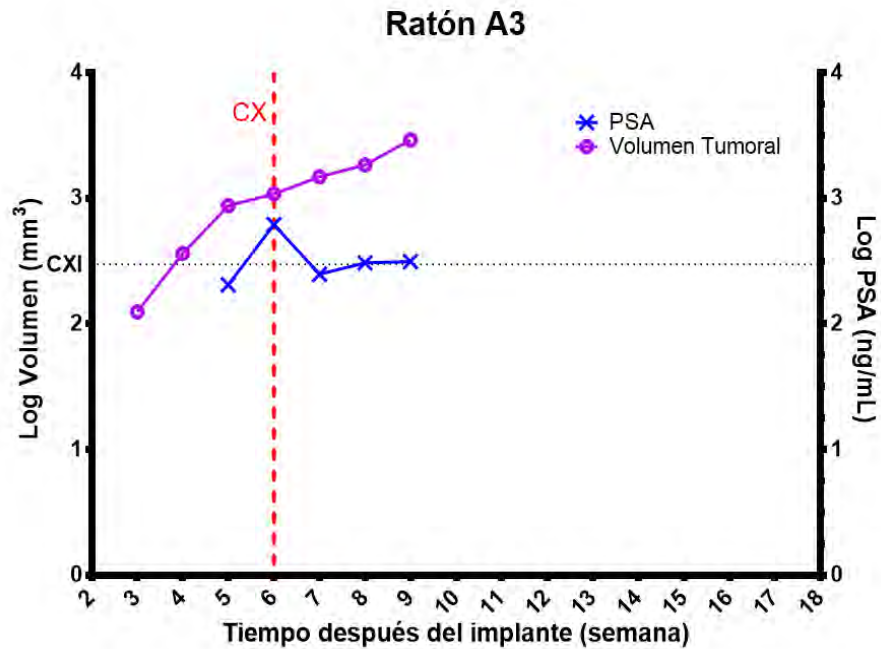


Gráfico 3. Esquema de desarrollo tumoral y cuantificación de PSA en el suero para el ratón A3. Único implante.



Figura I. Seguimiento semanal de apariencia tumoral para el ratón A3.

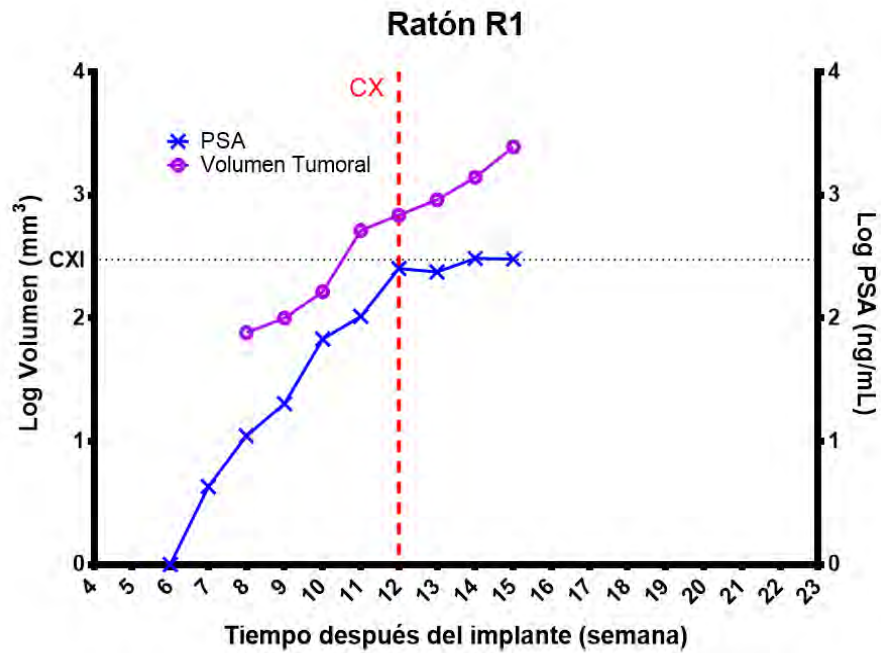


Gráfico 4. Esquema de desarrollo tumoral y cuantificación de PSA en el suero para el ratón R1. Segundo implante.



Figura II. Seguimiento semanal de apariencia tumoral para el ratón R1.

Por otro lado, el ratón A1 perteneciente al grupo con un segundo implante presentó desarrollo paulatino del tumor con concentraciones de PSA muy correlacionadas (Gráfico 5); sin embargo, al realizar la cirugía al llegar a (300

mm³) el ratón fallece y no es posible continuar con su monitoreo. La coloración del tumor en el lomo del ratón se presentaba de color morado indicando vascularización del área del tumor (Figura III).

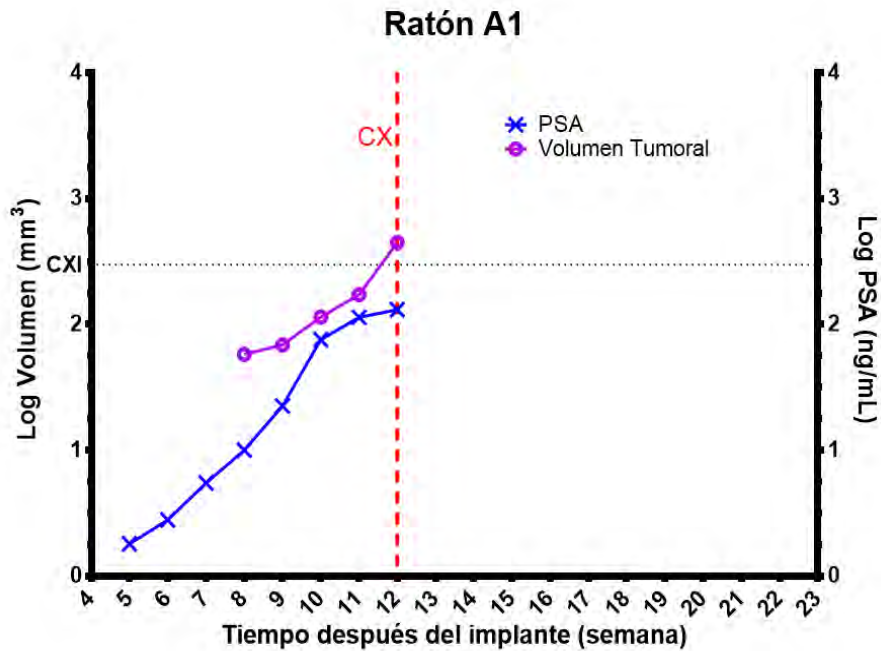


Gráfico 5. Esquema de desarrollo tumoral y cuantificación de PSA en el suero para el ratón A1. Segundo implante.



Figura III. Seguimiento semanal de apariencia tumoral para el ratón A1.

8.2.2 Ratón con cambio en el volumen tumoral post-castración

En la quinta semana posterior al primer implante, el ratón V2 del grupo de implante único, presentó desarrollo tumoral mucho más lento que el ratón A3 y se realizó la castración quirúrgica en el momento en el que el volumen tumoral se encontraba en el volumen de CXI (300 mm^3).

Durante la observación semanal del ratón V2, el volumen tumoral se mantuvo estático durante aproximadamente 8 semanas para posteriormente volver a incrementarse, la concentración de PSA en el suero disminuyó considerablemente en las 5 semanas posteriores a la cirugía para volver a repuntar a valores observados previos a la cirugía (Gráfico 6). Además, como se observa en las imágenes del tumor en el lomo del ratón (Figura IV), el tumor desde su crecimiento se encontraba con una coloración morada sugiriendo nuevamente una extensa vascularización, y es interesante como después de haber realizado la cirugía de castración en la semana 7, ésta coloración disminuyó inclusive hasta la semana 14 que fue el momento en el que el aspecto del tumor en el lomo del ratón comenzó a cambiar y a partir de la semana 16 se comenzó a observar la aparición de laceraciones en la piel.

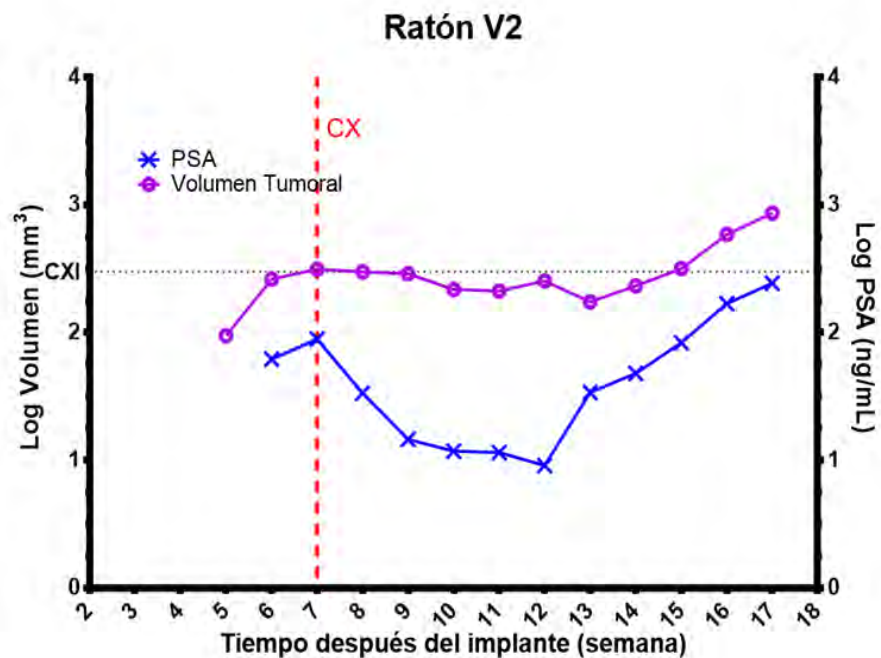


Gráfico 6. Esquema de desarrollo tumoral y cuantificación de PSA en el suero para el ratón V2. Único implante.



Figura IV. Seguimiento semanal de apariencia tumoral para el ratón V2

8.2.3 Desarrollo de tumor secundario post-castración

El desarrollo tumoral del ratón V1 perteneciente al grupo de ratones con segundo implante permaneció casi estático desde el primer indicio de tumor en la semana 8 posterior al implante celular, las variaciones en cuanto a su tamaño fueron menores al igual que las concentraciones de PSA en suero en esas semanas (Gráfico 7). Por tal motivo, se decidió realizar la castración para este ratón una vez que habían transcurrido 17 semanas desde el implante celular. Sorprendentemente, después de 2 semanas de haber realizado la cirugía de castración apareció un segundo tumor localizado en el cuello del ratón, el cual en primer instancia en la semana 19 se observó completamente de coloración morada y después de 4 días la coloración disminuyó, el volumen tumoral aumentó aceleradamente pero con coloración disminuida similar a como la que presentó el ratón V2 en las semanas posteriores de realizada la cirugía. Además, el tumor inicial que presentaba éste ratón comenzó a incrementar su tamaño aunque de forma lenta, y ambos tumores comenzaron a presentar laceraciones en la piel (Figura V).

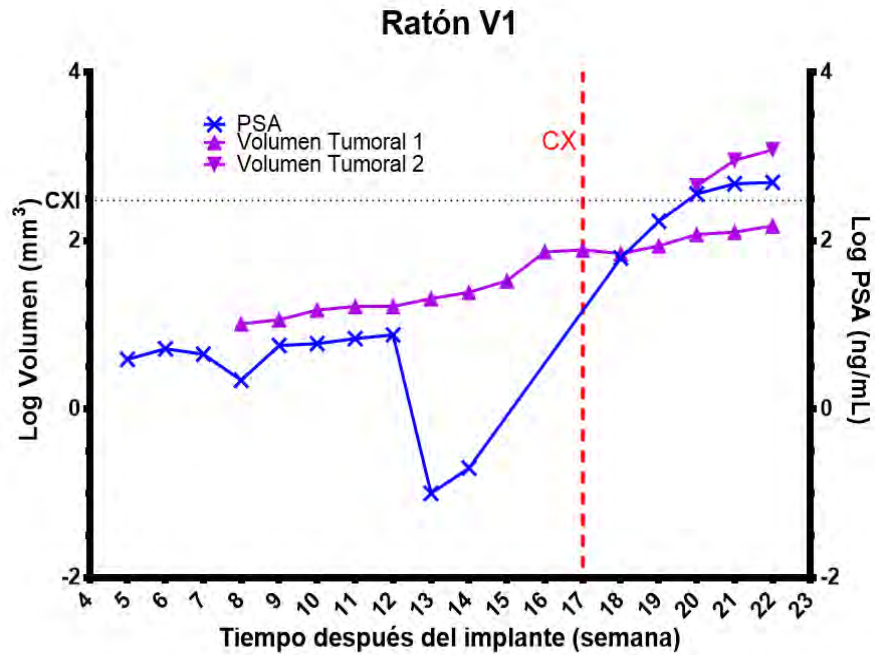


Gráfico 7. Esquema de desarrollo tumoral y cuantificación de PSA en el suero para el ratón V1. Único implante.



Figura V. Seguimiento semanal de apariencia tumoral para el ratón V1.

8.3 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Cada uno de los tejidos tumorales extraídos de los ratones fue embebido en formalina y posteriormente colocado en parafina para obtener cortes adecuados para su tratamiento de IHC para el RA.

Las imágenes presentadas en esta sección se obtuvieron después de aplicar la técnica de tinción de los tejidos empleando hematoxilina y el correspondiente anticuerpo para el RA. Dada la naturaleza de la tinción, en cada una de las imágenes se observan estructuras de coloración púrpura o rosa que corresponden al núcleo celular y el citoplasma, respectivamente; mientras que las estructuras en las que se observa una coloración café indican la presencia del RA.

Se realizó una tinción control tomando el epidídimo extraído de una de las cirugías de castración de los ratones, el resultado de la tinción se observa en la Figura VI. Al comparar ambos tejidos, se distingue mayor tinción correspondiente al RA en el tejido del epidídimo, lo cual indica mayor expresión y actividad del receptor en éste sitio anatómico; mientras que en el tejido testicular, se observa una menor tinción relativa.

Aunque estas tinciones no permiten identificar la producción de testosterona como tal, sí permiten estandarizar la técnica de tinción empleada para su uso en los tejidos de los tumores extirpados.

Control Positivo para Receptor de Andr6genos

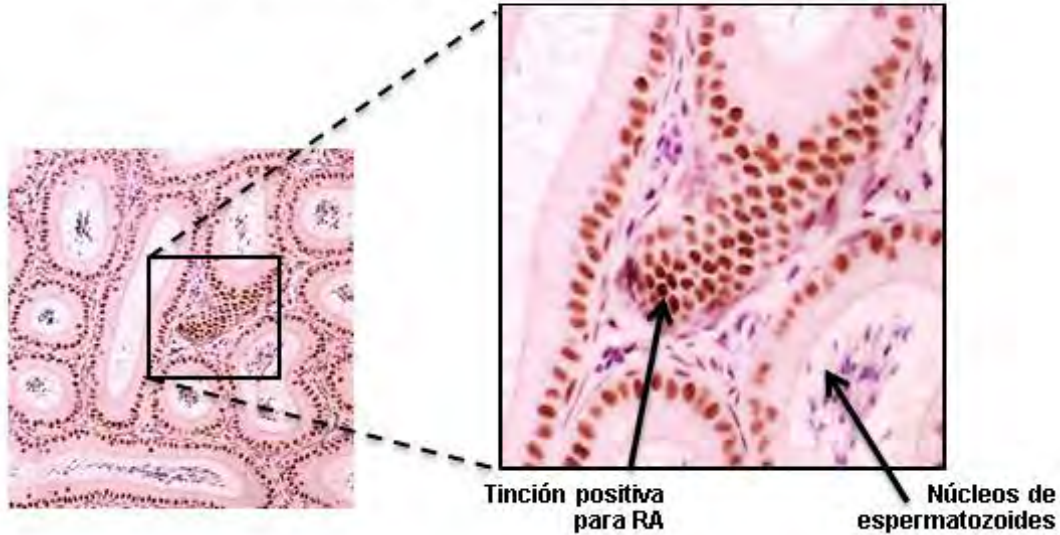


Figura VI. Tinción por IHC para RA en epidídimo.

Imagen 10X y zoom

Por otra parte, al realizar la misma tinción para el RA en los tejidos tumorales extirpados se observan diferencias en cuanto a la presencia del RA antes y después de la privación androgénica en cada uno de los tejidos. En la Figura VII y VIII se presentan las distintas imágenes obtenidas para cada uno de los tejidos.

Es importante recordar como fue el comportamiento de desarrollo tumoral en cada uno de los ratones para poder analizar más a fondo las diferencias que se observan en cada uno de los tejidos; por lo tanto, se presenta un resumen del comportamiento del desarrollo tumoral de cada ratón seguido de las imágenes de IHC correspondientes.

- Ratones con único implante

- Ratón R2:

El tumor fue medible después de 5 semanas desde el implante celular. El tumor fue extraído cuando aún se encontraba en un ambiente hormonal y al presentar un volumen cercano al CXI después de 7 semanas desde el implante.

- Ratón A3:
El tumor fue medible después de 3 semanas desde el implante celular. La privación androgénica se realizó en un volumen superior al CXI (1086.9 mm³). El nivel de PSA descendió y se mantuvo constante en las semanas siguientes. El tumor fue extraído 3 semanas después de la privación al contar con un volumen de 2922.3 mm³.

- Ratón V2
El tumor fue medible después de 5 semanas desde el implante celular. La privación androgénica se realizó en un volumen cercano al CXI (313.7 mm³). El nivel de PSA descendió y se mantuvo a la baja durante las siguientes 6 semanas para volver entonces a aumentar. El tumor fue extraído 10 semanas después de la privación al contar con un volumen de 657.3 mm³.

En la Figura VIII se observa como los tejidos correspondientes a los ratones R2 y A3 no presentan tinción significativa para el RA (color café), además de que la estructura celular se observa poco organizada; es importante mencionar que estos tejidos se obtuvieron cuando el tumor tenía tan solo 0 y 3 semanas después de realizada la privación androgénica, en comparación con el tejido obtenido del ratón V2, el cual después de la privación androgénica se mantuvo desarrollándose durante 10 semanas antes de ser extraído. La tinción para el RA en este último tejido fue muy abundante y la estructura del tejido se encontraba más deteriorada.

En la Figura IX, se observa abundante tinción del RA para los tejidos obtenidos de los ratones A1 y R1, mientras que para el tejido del tumor del ratón V1 no fue posible distinguir tinción del RA debido a que el tejido se encontraba muy deteriorado. Así mismo, en la imagen correspondiente al tejido del ratón R1 el tejido empieza a presentar señales de deterioro.

TINCIÓN DE IHC SOBRE TEJIDOS TUMORALES CON PRIMER IMPLANTE

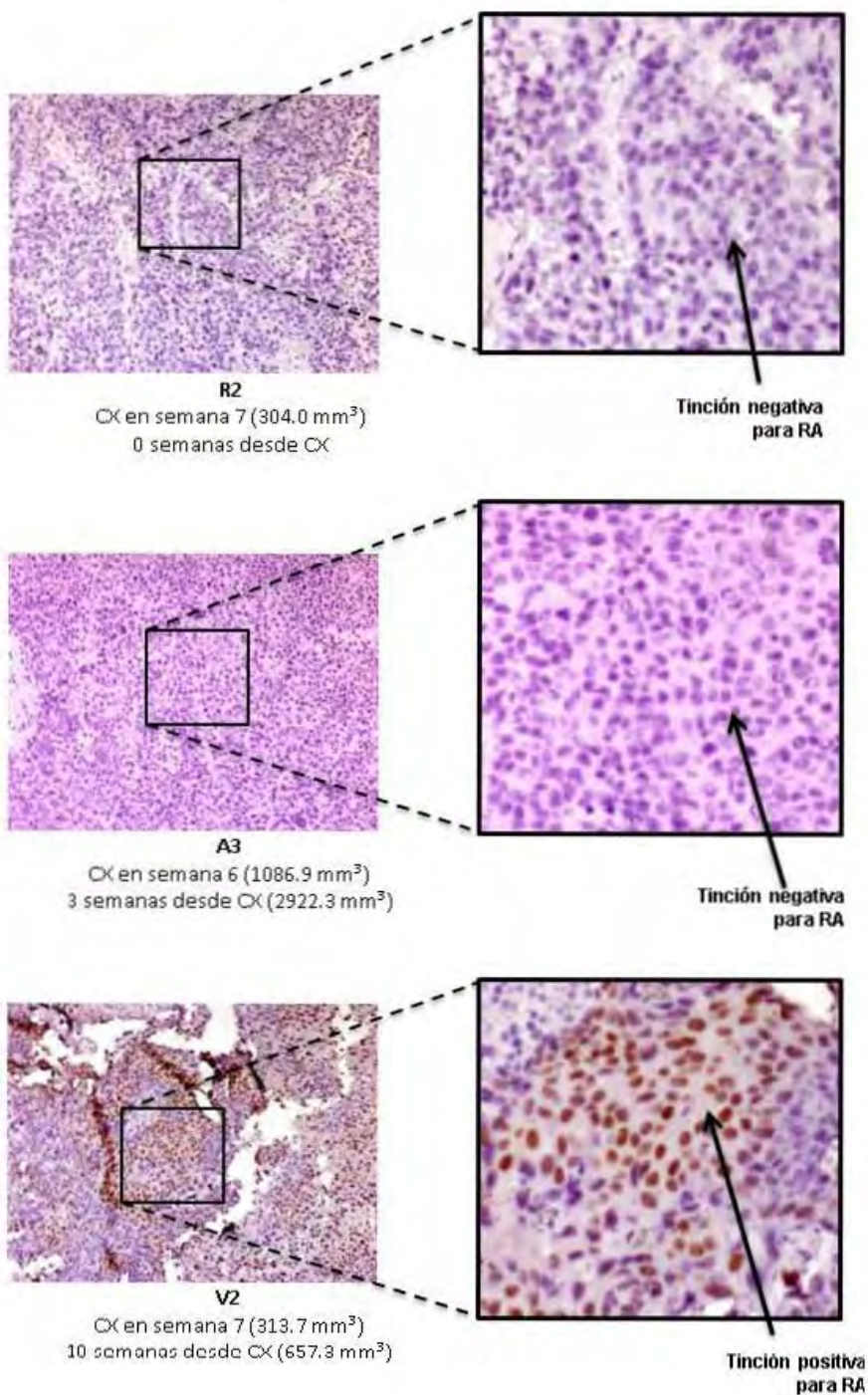


Figura VII. Imágenes de IHC de tejidos tumorales. Ratones con único implante. Se presentan las imágenes de IHC para el RA de cada uno de los tejidos extirpados, así como la información relevante de tiempo de obtención del tejido después de la cirugía y el volumen tumoral en ese momento. Imágenes originales a 10x.

- Ratonés con segundo Implante

- Ratón A1:

El tumor fue medible después de 8 semanas desde el implante celular. El tumor fue extraído cuando aún se encontraba en un ambiente hormonal y al presentar un volumen cercano al CXI después de 12 semanas desde el implante.

- Ratón R1:

El tumor fue medible después de 8 semanas desde el implante celular. La privación androgénica se realizó en un volumen superior al CXI (688.3 mm^3) en la semana 12 después del implante. El nivel de PSA no descendió, pero se mantuvo constante en las semanas siguientes. El tumor fue extraído 3 semanas después de la privación al contar con un volumen de 2467.9 mm^3 .

- Ratón V1

El tumor inicial se mantuvo sin cambios durante 17 semanas posteriores al implante. Se optó por realizar la privación androgénica cuando el tumor contaba con 77.9 mm^3 . Tres semanas posteriores a la privación apareció un segundo tumor medible en 447.6 mm^3 . El nivel de PSA aumentó considerablemente después de realizada la privación androgénica. El primer tumor alcanzó un volumen de 150.5 mm^3 y el segundo tumor un volumen de 1201.2 mm^3 . Solo se cuenta con el tejido y la respectiva IHC para el segundo tumor que apareció.

TINCIÓN DE IHC SOBRE TEJIDOS TUMORALES CON SEGUNDO IMPLANTE

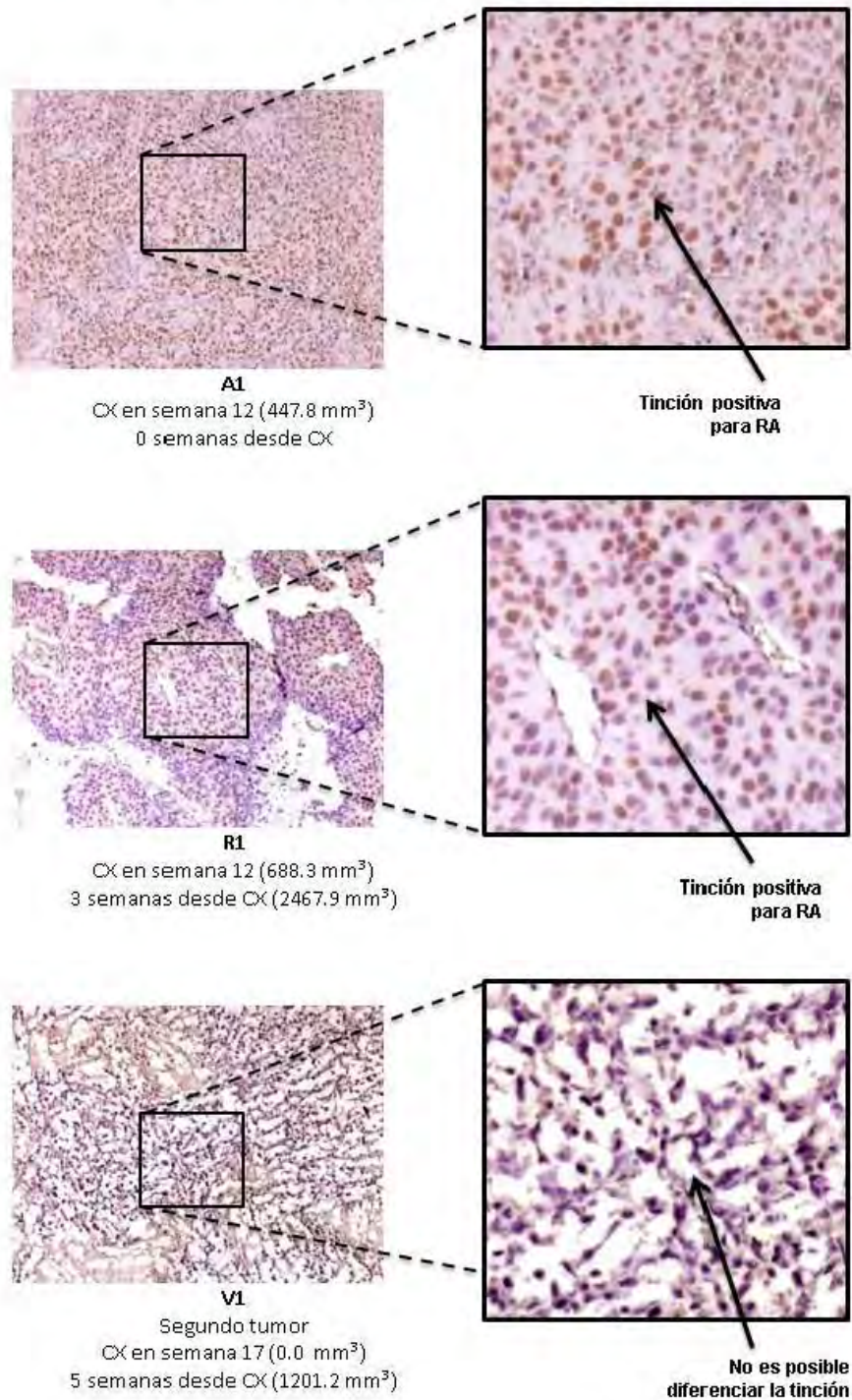


Figura VIII. Imágenes de IHC de tejidos tumorales. Ratones con segundo implante. Se presentan las imágenes de IHC para el RA de cada uno de los tejidos extirpados, así como la información relevante de tiempo de obtención del tejido después de la cirugía y el volumen tumoral en ese momento. Imágenes originales a 10x.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se establecieron las condiciones experimentales para un modelo piloto de xenotransplante murino de CaP con el cual se establece uno de los primeros modelos animales de este tipo en México. Principalmente, los resultados nos indican la factibilidad de establecer el modelo incluso con tan solo una muestra de 9 ratones con un rendimiento de al menos un 50% de los ratones implantados (Cunningham & You, 2015), y en general, los resultados obtenidos brindaron datos referentes al monitoreo del desarrollo tumoral, así como de los efectos que ocasiona la privación androgénica mediante una castración quirúrgica sobre el desarrollo del mismo tumor; además de las implicaciones que tiene el haber encontrado marcas heterogéneas del receptor de andrógenos en cada uno de los tejidos de los tumores extirpados.

Los modelos de xenotransplantes, en particular los que usan células LNCaP, han sido de gran utilidad en el establecimiento y entendimiento de la tumorigénesis prostática, el rol central del receptor de andrógenos y un gran número de cambios genéticos comunes en el CaP. Aunque tal vez no sea el ideal, aún es usado en muchas aplicaciones científicas pre-clínicas y básicas *in vitro* e *in vivo* en muchos laboratorios que evitan los costos y largos periodos de tiempo que conllevan los sistemas de modelos transgénicos. (Xingu Yu, 2013) A continuación se discuten a profundidad los aspectos más importantes observados en los resultados del proyecto.

9.1 EL PESO CORPORAL Y LA VELOCIDAD DE DESARROLLO DEL TUMOR

Los ratones fueron monitoreados semanalmente en cuanto a peso corporal, para observar las diferencias que pudieran existir entre los ratones que recibieron un único implante y los que recibieron un segundo implante. El peso corporal de los ratones del grupo control se mantuvo por arriba del peso recomendado (más de 20 gramos), aunque éste fue modificándose y

disminuyendo conforme el experimento avanzaba debido al aumento en la edad de los ratones.

Al comparar el peso corporal de los ratones de único implante contra los de segundo implante, se observa que los primeros disminuyeron muy rápidamente su peso corporal a medida que el volumen tumoral aumentaba; esto fue muy probablemente debido a errores técnicos al momento de realizar la implantación celular al no contar con la mezcla de Matrigel y paquete celular adecuadamente homogeneizada, provocando que algunos ratones al realizar la primera implantación recibieran una cantidad mayor de células, lo cual ocasionó el acelerado desarrollo tumoral en algunos de ellos y el nulo desarrollo en otros. Además, dado que los ratones desnudos aún conservan la inmunidad innata en su sistema, esto pudo haber contribuido a anular o demorar el desarrollo tumoral en los ratones, teniendo en cuenta los diferentes tiempos en los que se hizo visible el tumor en cada uno de ellos.

Iwaga *et al.* (2002) describen el uso de la línea celular LNCaP para un modelo de xenotransplante para caracterizar un modelo celular de CaP con desarrollo independiente de andrógenos. Este grupo utilizó diferentes cultivos de la misma línea celular que contaban con diferentes números de pase y encontraron que las células con pases mayores a 81 desarrollaban con mayor rapidez que las células con pases que rondaban el número 33 a pesar de haber sido cultivadas en las mismas condiciones. Esto es muy importante ya que la mayoría de la literatura consultada no menciona el número de pase al que correspondían las células implantadas en los modelos de xenotransplantes utilizados, lo cual podría ser explicación para las variantes en cuanto a velocidad de desarrollo tumoral en cada uno de ellos, así como del propio desarrollado en el presente proyecto.

Por otro lado, el paquete celular en cada uno de los implantes se obtuvo de la recolección de diferentes cultivos de la misma línea celular LNCaP, sin embargo, muchos de los cultivos celulares pueden presentar poblaciones heterogéneas, fenotípicamente hablando, que compiten por recursos que faciliten su supervivencia, haciendo que algunos fenotipos predominen sobre otros. En el

desarrollo experimental no se realizó una caracterización de las células empleadas para asegurar la homogeneidad fenotípica, lo cual podría haber dado lugar a las diferencias de crecimiento de los tumores, aunado a las diferencias intrínsecas de cada uno de los recipientes biológicos que no se pueden controlar y que afectan irremediablemente los resultados obtenidos.

9.2 EL VOLUMEN TUMORAL AFECTA EL RESULTADO DE LA PRIVACIÓN ANDROGÉNICA

Desde 1983, Horoszewicz *et al.*, describieron los efectos de las manipulaciones hormonales en tumores provenientes establecidos en xenotransplantes. En su modelo establecido con células LNCaP recabaron observaciones de la incidencia y periodo de tiempo para desarrollar tumores. Ellos describieron que bajo condiciones de deficiencia androgénica, el porcentaje de animales que desarrollaban tumor era significativamente reducido. Cuando la deficiencia de andrógenos era reestablecida por implantes subcutáneos de propionato de testosterona, la incidencia de los tumores se incrementaba a niveles similares a los de los ratones intactos (que no tenían deficiencia de andrógenos). Además, mencionaron que la formación de los tumores LNCaP es responsiva a los andrógenos, pero del crecimiento como tal es independiente de la función gonadal una vez que el tumor se establece.

Los ratones que no fueron implantados con células tuvieron niveles indetectables de PSA, como era esperado, ya que el PSA es una proteína humano-específica que es secretada por las células epiteliales prostáticas. Esto facilitó el uso de un kit comercial para detección de PSA en suero sin que hubiera interferencias de matriz. En general, lo que se logró observar con cada uno de los gráficos de cuantificación de PSA y de volumen tumoral reflejan lo observado por Horoszewicz en 1983, es que al inicio del experimento antes de realizar la privación androgénica, los valores de PSA se incrementan conforme el volumen tumoral también aumenta, esto entonces hace referencia a que la medición de uno u otro, PSA o volumen tumoral, es un buen indicador para realizar el seguimiento del experimento. Sin embargo, las diferencias que se observan en los gráficos

para los ratones como el A3 o R1, a los cuales se les realizó la privación androgénica cuando el volumen tumoral era mayor al ideal ($>300 \text{ mm}^3$), en comparación con los demás ratones, indican que ciertamente el volumen tumoral es un factor importante a considerar cuando se efectúa la privación androgénica para poder observar algún cambio en su tamaño. Aunado a esto, aunque los niveles de PSA para los ratones A3 y R1 sí disminuyeron o se mantuvieron estáticos después de la privación androgénica, se pierde la correlación entre el volumen tumoral y el PSA que se tenía previo a la privación, ocasionando así que el monitoreo y la información obtenida difiera si se emplea el volumen tumoral o la cuantificación de PSA para monitorear el experimento.

Lo anterior queda respaldado al observar el comportamiento del volumen tumoral y PSA para el ratón V2, al cual se le realizó la privación androgénica al llegar a un volumen tumoral ideal, con lo cual la relación que guardaron entre sí los valores de PSA y de volumen tumoral se mantuvo muy estrecha y con un comportamiento muy parecido incluso antes y después de la cirugía, indicando nuevamente que el volumen tumoral al momento de la cirugía es importante en el experimento para llevar a cabo un monitoreo adecuado empleando uno u otro factor, el PSA o el volumen tumoral. (Gleave *et al.*, 1992)

9.3 UTILIDAD DEL MODELO EN EL ESTADIO DE CPRC

Como se describió en la introducción, la producción de PSA es el resultado de la expresión de genes en respuesta a la activación de los Elementos de Respuesta a Andrógenos cuando hay andrógenos presentes que interactúan con el RA; de esta forma los cambios observados en los niveles de PSA reflejan cualitativamente la activación que puede tener el RA al haber proliferación celular en el xenotransplante y por ende nos puede dar un indicio del comportamiento del tumor.

El ratón V2 fue implantado con la misma cantidad de células en un único implante y su desarrollo tumoral fue paulatino, la cirugía de privación androgénica fue llevada a cabo cuando el volumen tumoral se encontraba próximo al ideal, permitiendo así el monitoreo más completo del experimento. Como se mencionó

anteriormente, en el ratón V2 la producción de PSA se encontraba a la par incrementándose conforme lo hacía el volumen tumoral, pero al realizarse la privación androgénica, se pierden los andrógenos encargados de regular el desarrollo del tumor en crecimiento, y es por esto que el crecimiento tumoral se detiene por un intervalo muy largo de tiempo (7 semanas) haciendo que el volumen tumoral permanezca constante sin sufrir cambios significativos. El PSA es importante en este momento del desarrollo tumoral ya que al estar disminuido nos indica que no se están expresando como antes los genes relacionados a los Elementos de Respuesta a Andrógenos, y entonces la(s) vía(s) de señalización relacionada(s) se encuentran interrumpidas. Ante lo observado anteriormente, cabe recalcar que Gleave *et al.* (1992) reportaron que la privación androgénica en los ratones con tumores LNCaP producía un descenso acelerado en los niveles de PSA independiente de los cambios en el volumen tumoral; sin embargo, en algunos de los ratones estos niveles se mantenían estables durante aproximadamente 2 semanas, posteriormente se incrementaban al cabo de 3 semanas posteriores a la castración sin la necesidad de administrar testosterona exógena. Aquí es donde se enfocan las diferencias en cuanto al intervalo de tiempo para que estos niveles de PSA se volvieran a incrementar, difiriendo así entre lo establecido por Gleave y el modelo desarrollado en el presente trabajo. Por otro lado, Sadar *et al.* (2002) describe el mismo comportamiento de los niveles de PSA posteriores a la privación androgénica, sin embargo, el incremento de PSA se dio después de 4 semanas de haber realizado la castración.

Además, como se reporta en la literatura, es en este intervalo de tiempo en el que los andrógenos gonadales ya no regulan el desarrollo tumoral y entonces debe de realizarse un cambio en la señalización molecular del tumor para que éste pueda seguir desarrollando en el ambiente libre de hormonas al que se le ha sometido. Este *switch* necesario en el tumor para poder continuar con su desarrollo tardó en establecerse 5 semanas en el ratón V2 si consideramos el seguimiento del nivel de PSA en suero; posterior a este tiempo, el nivel de PSA comenzó a incrementarse rápidamente y en estrecha relación con el volumen tumoral que también comenzó a incrementarse nuevamente, lo cual indica que el

tumor fue capaz de dirigir su crecimiento en el ambiente libre de andrógenos. Esta fase del monitoreo del ratón es el estadio de interés en la clínica conocido actualmente como CaP Resistente a la Castración.

La recurrencia bioquímica de PSA, una proteína codificada por un gen regulado por el RA medible en suero, es evidencia de que el CPRC no es hormono-sensible. Como se reporta en la literatura, cuando se adicionan anti-andrógenos de primera generación, como flutamida o bicalutamida, al tratamiento de los pacientes con enfermedad avanzada (en la mayoría de los casos metastásica), se nota inicialmente una disminución del PSA sérico indicando una respuesta directa al bloqueo del RA. Sin embargo, los niveles de PSA se vuelven a elevar nuevamente a pesar de la terapia anti-andrógenos, sugiriendo que los fármacos han empezado a funcionar como agonistas del RA. (Chandrasekar, Yang, Gao & Evans, 2015)

9.4 LA PRIVACIÓN ANDROGÉNICA Y LOS TUMORES NO ESTABLECIDOS

Ya que no se tiene información concluyente que reporte que los modelos de xenotransplantes con células LNCaP pueden generar metástasis, lo ocurrido con el ratón V1 hace pensar que el primer implante realizado se mantuvo estático inicialmente y posteriormente comenzó a desarrollar un tumor que permaneció sin crecimiento, para que finalmente tras haber realizado la cirugía de castración se desarrollara un segundo tumor en el sitio del segundo implante.

El tumor primario fue medible hasta 13 semanas posteriores al primer implante y debido a que su aumento de tamaño fue muy lento, se decidió realizar la cirugía de castración en la semana 17 desde el primer implante (semana 12 desde el segundo implante). Después de una semana de haber realizado la cirugía apareció un segundo tumor en el sitio del segundo implante y este demoró 13 semanas en aparecer; dicho evento sugirió que al llevarse a cabo la privación androgénica, ambos tumores que se encontraban en equilibrio sufrieron cambios en las vías de señalización para poder continuar con su supervivencia. Sin embargo, este cambio no se llevó a cabo de manera paulatina y resultó ser muy

agresivo, es por eso que no se observó un periodo estático como lo observado en el ratón V2, sino que el desarrollo tumoral para ambos tumores se exacerbó e inclusive al llegar a la semana 22 desde el segundo implante, el volumen del segundo tumor fue de 1200 mm³.

9.5 LA VASCULARIZACIÓN EN LOS TUMORES

La angiogénesis es un proceso regulado minuciosamente por la interacción dinámica entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos que controlan la proliferación, migración e invasión de las células endoteliales. Así, la neovascularización tumoral contribuye a la progresión del cáncer facilitando su crecimiento y metástasis. La iniciación de la secreción de proteínas angiogénicas por las células tumorales es importante en la hiperpermeabilidad vascular, secreción de proteasas, rompimiento de la membrana basal capilar y la migración y proliferación endotelial. (Bindukumar *et al.*, 2005)

El incremento en la densidad de microvascularización en los tejidos tumorales ha sido correlacionado con un incremento en la etapa y grado tumoral, metástasis y decrecimiento de la supervivencia en los pacientes. Siendo así, la microvascularización en el CaP ha sido investigado como un marcador potencial para identificar pacientes con un alto riesgo de progresión y recurrencia después de una prostatectomía radical. La viabilidad, integridad y potencial proliferativo de las células endoteliales de la próstata humana, así como en otros órganos, han demostrado ser dependientes de los andrógenos en circulación y de la expresión de VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial y Vascular, por sus siglas en inglés). Sin embargo, la producción constitutiva de VEGF en la próstata humana parecen estar reguladas por los andrógenos, sugiriendo que la expresión mediada por el RA del VEGF puede regular el balance entre la estabilidad vascular y la angiogénesis en la red vascular prostática. (Montecinos V., Godoy A., Hinklin J., Vethanayagam R. & Smith G, 2012)

En los ratones con desarrollo tumoral se observó cierta coloración morada en los sitios donde se encontraba el tumor, lo cual indicaba existencia de vascularización; además, los niveles de PSA se encontraban altos durante la

presencia de estas coloraciones moradas, cambiando únicamente cuando se realizó la cirugía de castración en el CXI, donde la coloración disminuyó levemente para volver a incrementarse cuando el PSA en suero también se incrementaba. A pesar de que el PSA es aún uno de los biomarcadores empleados en el diagnóstico del CaP al asociarse la enfermedad a niveles altos de PSA, numerosos reportes en la literatura sugieren que el PSA tiene actividad anti-angiogénica y que se encuentra regulado a la baja en el tejido de carcinoma prostático. Así, los bajos niveles de PSA en los tejidos se encuentran frecuentemente asociados con una forma más agresiva de CaP. (Bindukumar *et al*, 2005). Ante esta información, la relación entre los niveles de PSA medibles y el desarrollo del tumor deberán ser estudiados con mayor detalle en los experimentos posteriores en los que se reproduzca el modelo animal con el fin de contribuir a elucidar qué papel tiene el PSA en la progresión del CaP si no solo fuese un biomarcador.

9.6 INMUNOHISTOQUÍMICA

Un alto porcentaje de especímenes clínicos de cánceres prostáticos humanos muestran expresión del Receptor de Andrógenos tanto en tumores primarios como en tumores recurrentes posteriores a la privación androgénica. (Sadar M., 2002) Para determinar si los tumores desarrollados expresaban al RA después de haber realizado la privación androgénica se realizaron cortes de tejido que fueron sometidos a Inmunohistoquímica para buscar marcas del RA. Considerando que los ratones A3, R1 y A1 no tuvieron cambios en el volumen tumoral después de realizada la privación androgénica, se esperaría que presentaran los mismos patrones de tinción; sin embargo, solo el ratón A3 no presentaba tinción observable para el RA. Se debe considerar que el tumor en el ratón A3 desarrolló con rapidez por lo que es posible sugerir que su desarrollo no se basó en vías asociadas al RA. Los tejidos tumorales de los ratones R1 y A1 indican la presencia del RA en el tejido y que claramente se encuentra expresado antes y después de realizar la privación hormonal. Comparando los tejidos de A1 y A3; y aunque ambos tejidos se extirparon aproximadamente al tener el mismo

volumen tumoral ($2,700 \text{ mm}^3$) y cuando se tenían 3 semanas post-cirugía para ambos, la diferencia se observa en el volumen tumoral al momento de la castración, donde el volumen del tumor fue de 688.3 y 1086.9 mm^3 , respectivamente. Ninguno de los volúmenes tumorales se vio afectado tras haber realizado la privación androgénica, sin embargo, el RA continuó expresado en el ratón R1 sugiriendo que su regulación intratumoral aún dependía de la función del RA.

El ratón V2 fue privado del ambiente hormonal cuando el volumen tumoral estaba muy próximo (313.7 mm^3) al ideal establecido en la metodología, su volumen tumoral se mantuvo estático durante las 7 semanas posteriores a la intervención quirúrgica, al igual que se presentó la disminución del nivel de PSA en suero. Pasadas las 7 semanas, el volumen tumoral se incrementó, así como también el PSA en el suero; al haber elevación del PSA en el suero, el indicio de que el RA se encontrara activo fue muy probable y quedó respaldado con la tinción de IHC donde el RA se encuentra ampliamente expresado en el tejido. La expresión del RA en el tejido sugiere que su regulación después de 10 semanas desde la privación androgénica está siendo mediada por el efecto de otras moléculas diferentes a los andrógenos que se unen de manera poco específica al receptor, indicando así nuevamente que la vía de señalización del RA permanece activa y que el modelo desarrollado no es insensible a la activación del receptor. (Sadar M., 2002; Cai C., 2011; Marques R., 2011; Chandrasekar, 2015)

Numerosos estudios muestran que la mayoría de los tumores primarios y cánceres en estadios avanzados expresan el RA a pesar del estadio y el grado, o la sensibilidad hormonal. Sin embargo, la mayoría de los reportes han mostrado una proporción heterogénea en la tinción del RA en el epitelio prostático. (Mohler J., 2009) Estos hallazgos sugieren que la variabilidad del contenido de RA incrementa con la progresión de la enfermedad y puede en parte contribuir a la resistencia hormonal. La ausencia del mRNA del RA y la expresión proteica ha sido mostrada en las líneas celulares DU145 y PC3 que son independientes de andrógenos. La pérdida de la expresión de RA en estas líneas celulares parece ocurrir a nivel transcripcional por metilaciones CpG del promotor de RA y

desacetilaciones de histonas, en lugar de modificaciones a nivel genómico como mutaciones o deleciones. (Chin S., Dickinson J, Holloway A., 2011) Estas alteraciones epigenéticas del RA pueden jugar un papel importantel en el desarrollo de la resistencia a la castración en CaPs que no expresan RA. Además, mientras que la expresión del RA en las células de CaP ha sido el enfoque de varios estudios, muchos otros han reportado que la pérdida de la expresión de RA en las células estromales alrededor de las células epiteliales malignas pueden conllevar al desarrollo de la resistencia a la castración. (Devlin & Mudryj, 2009)

Al observar la imagen de IHC del tejido tumoral del segundo tumor que apareció del ratón V1 se observa gran cantidad de necrosis que imposibilita la identificación del RA. Recordando que este tumor apareció de manera repentina después de haber realizado la cirugía de castración, lo observado sugiere que el desarrollo tumoral fue demasiado agresivo y concuerda con lo descrito en la literatura sobre el fenotipo observado en los tumores de pacientes con CPRC. Y en comparación con el tumor obtenido del ratón A3, el cual no se describió como un tumor resistente a la castración, este se mantuvo con determinada estructura celular en el tejido, indicando una vez más que el tumor del ratón V1 estaba desarrollando de forma más agresiva ante la falta de andrógenos a pesar de que el tumor A3 era casi del doble de tamaño.

10. CONCLUSIONES

- Es posible establecer un modelo animal de xenotransplante subcutáneo para el estudio del CaP.
- Es posible monitorear el desarrollo tumoral empleando las dimensiones del mismo así como los niveles de PSA en suero.
- Existe correlación significativa entre el PSA cuantificado en el suero murino y el volumen tumoral solo en los casos donde se realiza la castración quirúrgica a menos de 300 mm³.
- Se observan diferencias en la expresión del RA en los tejidos tumorales en tejidos pre-castrado y post-castrado.
- El modelo da posibilidad de realizar investigación relacionada a la Terapia de Privación Androgénica, así como los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de CaP.

11. PERSPECTIVAS

- Posible selección y caracterización fenotípica de las células a implantar.
- Implantación de diferentes cantidades de células.
- Castración quirúrgica a volumen tumoral <300 mm³.
- Extracción de tejidos tumorales a diferentes intervalos de tiempo.
- Análisis de tejidos extraídos por PCR en tiempo real para genes de moléculas de interés (Receptor de andrógenos, PSA)

12. REFERENCIAS

12.1 LIBROS

1. Figg, W., Chau, C., & Small, E. (2010). Drug management of prostate cancer. New York: Springer.
2. Fish, R. (2008). Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.
3. Heidenreich, A., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M. D., Matveev, V., Mottet, N., Schmid, H-P., van de Kwast, T. H., Wiegel, T., Zattoni, F. (2010). Guía clínica sobre el cáncer de próstata. *European Association of Urology 2010*.
Disponible en: <http://uroweb.org/wp-content/uploads/01-GUIA-CLINICA-SOBRE-EL-CANCER-DE-PROSTATA.pdf>
4. Karp, G. & Araiza Mart.nez, M. (2010). Biología celular y molecular. 6a. ed: McGraw-Hill.
5. Mendoza, L. (2013). Cáncer de Próstata. Información actualizada sobre el cáncer de próstata y sobre las opciones terapéuticas. Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=IxIBQpkMPvUC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=cribado+del+cancer+de+prostata+luis+mendoza&source=bl&ots=Rim7VPHvNj&sig=j7lFnrL6gNXKNMv2cb-DZZ5QXvA&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiPg8-f3_POAhVEGR4KHRgmCNYQ6AEIKDAA#v=onepage&q=cribado%20del%20cancer%20de%20prostata%20luis%20mendoza&f=false
6. Wein, A. J. (2008). Campbell-Walsh. Urología. Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=Rc4NFKLJL4sC&pg=PA1882&lpg=PA1882&dq=Biolog%C3%ADa+molecular,+endocrinolog%C3%ADa+y+fisiolog%C3%ADa+de+la+pr%C3%B3stata+y+las+ves%C3%ADculas+seminales&source=bl&ots=03ZnBfkhGZ&sig=6HE8Y6dq76oEw-QAUvtXhB5cBe8&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi2_ZLL4PPOAhUG7WMKHRxRBpAQ6AEIHTAA#v=onepage&q=Biolog%C3%ADa%20molecular%2C%20endocrinolog%C3%ADa%20y%20fisiolog%C3%ADa%20de%20la%20pr%C3%B3stata%20y%20las%20ves%C3%ADculas%20seminales&f=false

12.2 ARTÍCULOS

7. Abate-Shen, C. & Shen, M. M. (2002). Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet*, 18(5), S1-5.
8. Antony, L., van der Schoor, F., Dalrymple, S. L., & Isaacs, J. T. (2014). Androgen Receptor (AR) Suppresses Normal Human Prostate Epithelial Cell Proliferation via AR/ β -catenin/TCF-4 Complex Inhibition of c-MYC Transcription. *The Prostate*, 74(11), 1118–1131. <http://doi.org/10.1002/pros.22828>
9. Bindukumar, B., Schwartz, S. A., Nair, M. P. N., Aalinkeel, R., Kawinski, E., & Chadha, K. C. (2005). Prostate-Specific Antigen Modulates the Expression of Genes Involved in Prostate Tumor Growth. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(3), 241–252.
10. Cai, C., He, H., Chen, S., Coleman, I., Wang, H., & Fang, Z. et al. (2011). Androgen Receptor Gene Expression in Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor Through Recruitment of Lysine-Specific Demethylase 1. *Cancer Cell*, 20(4), 457-471. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.001>
11. Cao, B., Qi, Y., Yang, Y., Liu, X., Xu, D., Guo, W., & Dong, Y. (2014). 20(S)-Protopanaxadiol Inhibition of Progression and Growth of Castration-Resistant Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 9(11), e111201. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111201>
12. Castanares, M. A., Copeland, B. T., Chowdhury, W. H., Liu, M. M., Rodriguez, R., Pomper, M. G., & Foss, C. A. (2016). Characterization of a Novel Metastatic Prostate Cancer Cell Line of LNCaP Origin. *The Prostate*, 76(2), 215–225. <http://doi.org/10.1002/pros.23115>
13. Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 1911–1922. <http://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>
14. Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational*

- Andrology and Urology*, 4(3), 365–380. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02>
15. Chin, S., Dickinson, J., & Holloway, A. (2011). Epigenetic regulation of prostate cancer. *Clinical Epigenetics*, 2(2), 151-169. <http://dx.doi.org/10.1007/s13148-011-0041-7>
 16. Cunningham, D., & You, Z. (2015). In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *Journal of Biological Methods*, 2(1), e17. <http://doi.org/10.14440/jbm.2015.63>
 17. Devlin, H. & Mudryj, M. (2009). Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. *Cancer Letters*, 274(2), 177-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.06.007>
 18. Diamandis, E., Yousef, G., & Olsson, A. (2004). An update on human and mouse glandular kallikreins. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 258-260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.12.013>
 19. Feldman, B., Feldman D. (2001) The development of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Nature Reviews. Cáncer*, 1,34-45.
 20. Gleave, M. E., Hsieh, J. T., Wu, H. C., von Eschenbach, A. C. & Chung, L. W. (1992). Serum prostate specific antigen levels in mice bearing human prostate LNCaP tumors are determined by tumor volume and endocrine and growth factors. *Cancer Res*, 52(6),1598-605.
 21. Gustavsson, H., Tešan, T., Jennbacken, K., Kuno, K., Damber, J.-E., & Welén, K. (2010). ADAMTS1 alters blood vessel morphology and TSP1 levels in LNCaP and LNCaP-19 prostate tumors. *BMC Cancer*, 10, 288. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-10-288>
 22. Hanahan, D. & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 23. Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A. & Murphy, G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 43 (4),1809-18.
 24. Hu, Y., Ippolito, J., Garabedian, E., Humphrey, P. and Gordon, J. (2002). Molecular Characterization of a Metastatic Neuroendocrine Cell Cancer Arising

- in the Prostates of Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44462-44474.
25. Ittmann, M., Huang, J., Radaelli, E., Martin, P., Signoretti, S., Sullivan, R., & Cardiff, R. D. (2013). Animal models of human prostate cancer: The Consensus Report of the New York Meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Research*, 73(9), 2718–2736. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4213>
 26. Igawa, T., Lin, F., Lee, M., Karan, D., Batra, S., & Lin, M. (2002). Establishment and characterization of androgen-independent human prostate cancer LNCaP cell model. *The Prostate*, (50): 222-235
 27. Karr, J.F., Kantor, J. A., Hand, P. H., Eggensperger, D. L., Schlom, J. (1995). The presence of prostate-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate-specific antigen in a transfected murine cell line. *Cancer Res*, 55(11), 2455-62.
 28. Lamb, D. & Zhang, L. (2005). Challenges in Prostate Cancer Research: Animal Models for Nutritional Studies of Chemoprevention and Disease Progression. *The Journal Of Nutrition*, 135(12), 3009S-3015S. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/135/12/3009S.long>
 29. Loeb, S. & Catalona, W. (2007). Prostate-specific antigen in clinical practice. *Cancer Letters*, 249(1), 30-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.022>
 30. Malm, J. & Lilja, H. (1995). Biochemistry of prostate specific antigen, PSA. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 221, 15-22.}
 31. Marques, R., Dits, N., Erkens-Schulze, S., van IJcken, W., van Weerden, W., & Jenster, G. (2011). Modulation of Androgen Receptor Signaling in Hormonal Therapy-Resistant Prostate Cancer Cell Lines. *Plos ONE*, 6(8), e23144. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023144>
 32. Medina, L., Herrera-Penilla, B., Castro-Morales, M., García-López, P., Jurado, R., & Pérez-Cárdenas, E. et al. (2008). Use of an orthovoltage X-ray treatment unit as a radiation research system in a small-animal cancer model. *J Exp Clin Cancer Res*, 27(1), 57. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-9966-27-57>

33. Mohler, J. L. (2008). A role for the androgen receptor in clinically localized and advanced prostate cancer. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 22(2), 357–372. <http://doi.org/10.1016/j.beem.2008.01.009>
34. Montecinos, V., Godoy, A., Hinklin, J., Vethanayagam, R., & Smith, G. (2012). Primary Xenografts of Human Prostate Tissue as a Model to Study Angiogenesis Induced by Reactive Stroma. Recuperado el 10 de Enero de 2017
35. Richmond, A. & Su, Y. (2008). Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Disease Models And Mechanisms*, 1(2-3), 78-82. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.000976>
36. Roehrborn, C. G. (2005). Benign Prostatic Hyperplasia: An Overview. *Reviews in Urology*, 7(Suppl 9), S3–S14.
37. Rojas, F., Manzo, J., *et al.* (2011). El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. *Neurobiología*. 2 (4), 1-15.
38. Sadar, M. D., Akopian, V. A., Beraldi, E. (2002). Characterization of a New *in Vivo* Hollow Fiber Model for the Study of Progression of Prostate Cancer to Androgen Independence. *Mol Cancer Ther*, 1, 629-637
39. Simmons, J., Elshafae, S., Keller, E., McCauley, L., & Rosol, T. (2014). Review of Animal Models of Prostate Cancer Bone Metastasis. *Veterinary Sciences*, 1(1), 16-39. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci1010016>
40. Talmadge, J., Singh, R., Fidler, I., & Raz, A. (2007). Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *The American Journal Of Pathology*, 170(3), 793-804. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2007.060929>
41. Thalmann, G., Anezinis, P., Chang, S., Zhou, H., Kim, E., & Hopwood, V. *et al.* (1994). Androgen-independent Cancer Progression and Bone Metastasis in the LNCaP Model of Human Prostate Cancer. *Cancer Research*, 54(10), 2577-2581. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/54/10/2577.long>
42. Thorpe, A. & Neal, D. (2003). Benign prostatic hyperplasia. *The Lancet*, 361(9366), 1359-1367. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13073-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13073-5)

43. Tong, K. L., Chan, K. L., AbuBakar, S., Low, B. S., Ma, H. Q., & Wong, P. F. (2015). The In Vitro and In Vivo Anti-Cancer Activities of a Standardized Quassinoids Composition from *Eurycoma longifolia* on LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*, 10(3), e0121752. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0121752>
44. Tumati, V., Mathur, S., Song, K., Hsieh, J., Zhao, D., Takahashi, M. & Saha, D. (2013). Development of a locally advanced orthotopic prostate tumor model in rats for assessment of combined modality therapy. *International Journal of Oncology*, 42, 1613-1619. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2013.1858>
45. Wu, X., Gong, S., Roy-Burman, P., Lee, P., & Culig, Z. (2013). Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocrine Related Cancer*, 20(4), R155-R170. <http://dx.doi.org/10.1530/erc-12-0285>

12.3 PÁGINAS WEB

46. American Cancer Society. (2015). Pruebas para detectar el cáncer de próstata. Revisado el 11/Octubre/2015, de American Cancer Society. Sitio web: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeprostata/guiadetallada/cancer-de-prostata-early-diagnosis>
47. Cancer today. (2016). Gco.iarc.fr. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=29&type=0&sex=0>
48. Dr. Susaníbar: *Cáncer de próstata: anatomía*. (2016). *Urologiaperuana.blogspot.mx*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <http://urologiaperuana.blogspot.mx/2011/07/cancer-de-prostata-anatomia.html>
49. De Jesús-Monge, W. (2016). El ratón como base de modelos de cáncer humano: Una valiosa herramienta en la investigación oncológica - Revista Galenus. Galenusrevista.com. Recuperado el 28 de Diciembre de 2016, de <http://www.galenusrevista.com/El-raton-como-base-de-modelos-de,445.html>
50. Fact Sheets by Population. (2016). Globocan.iarc.fr. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx

51. Kaiser, S.: Identification and Characterization of the Ion Channel TRPM8 in Prostate Cancer. (2005). Edoc.hu-berlin.de. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/kaiser-simone-2004-06-10/HTML/chapter1.html>
52. National Cancer Institute. (2016). Prostate Cancer Treatment (PDQ)-Patient Version. Revisado el 25/Enero/2016, de National Cancer Institute. Sitio web: <http://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq>
53. NCI Dictionary of Cancer Terms. (2016). National Cancer Institute. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=46710>
54. PROSTATE.COM – What is Prostate Cancer?. (2016). Prostate.com. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <http://www.prostate.com/patient/ProstateCancerBasics/WhatIsProstateCancer.aspx>
55. Radiation therapy for prostate cancer. (2016). Cancer.org. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-treating-radiation-therapy>
56. *TTFB - Clinical: Testosterone, Total, Bioavailable, and Free, Serum.* (2016). *Mayomedicallaboratories.com*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/83686>
57. *UCSF Animal Care & Use Program - A&A: Species Specific Considerations.* (2016). *iacuc.ucsf.edu*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de http://www.iacuc.ucsf.edu/Proc/awA&A_SS.asp
58. What Is Cancer?. (2016). National Cancer Institute. Recuperado el 3 de Septiembre de 2016, de <http://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
59. 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

12.4 TESIS

60. Cruz Hernández Carlos D. (2016). Acción de la proteína SFRP1, mediada por el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en cáncer de próstata. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Ciudad de México, México.

13. ANEXOS SUPLEMENTARIOS

13.1 Anexo suplementario 1. Cirugía de castración.

Como se mencionó en la metodología, los ratones debían ser anestesiados durante la cirugía usando la mezcla isoflurano/oxígeno mencionado anteriormente. Cada ratón era colocado boca-arriba y sujetado de las extremidades empleando cinta adhesiva. Se realiza un pequeño corte en la piel del abdomen de manera que éste corte solo vaya en una sola dirección, posteriormente se sujeta la musculatura abdominal y se levanta unos cuantos centímetros para poder realizar otro corte con el fin de ingresar a cavidad abdominal. Una vez expuesta la cavidad abdominal, por el corte formado se exponen los testículos (Imagen 1.1.).



Imagen 1.1. Externalización de testículos.

Una vez que los testículos han quedado expuestos, se procedió a realizar la ligación de los conductos empleando hilo de seda (Imagen 1.2, 1.3 y 1.4).



Imagen 1.2.



Imagen 1.3.



Imagen 1.4.

Una vez que se realizó la ligación de los conductos, se realiza el corte de los testículos y cuando se aseguró que no hubiera hemorragia, se procedió a suturar únicamente la piel (Imagen 1.5).



Imagen 1.5. Apariencia final de sutura.

13.2 Anexo Suplementario 2. Toma de muestra sanguínea por corte del extremo de la cola.

Para la toma de muestra sanguínea se utilizó un tubo de poliestireno de 50 mL para elaborar una trampa con la cual se pudiera tener expuesta la cola del ratón y facilitara su manejo.

Después, empleando una hoja de bisturí se realizó un corte en el extremo de la cola y para colectar la sangre se emplearon los tubos MicroTainer y se colecta un volumen máximo de sangre total de 400 μ L. Para permitir la salida continua de sangre se realiza un movimiento de “ordeñamiento” en la cola, y cada gota que sale se colecta rápidamente para evitar la coagulación de la misma en la punta donde se realizó el corte. Es importante limpiarse los guantes con una solución de alcohol al 70% constantemente durante la toma de la muestra.

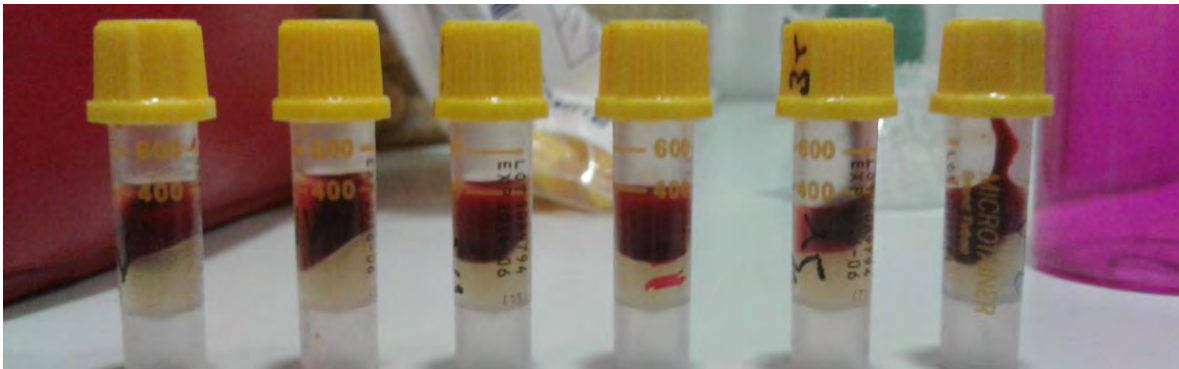


Imagen 2.1. Muestras de sangre previas a separación de suero.

Una vez terminada la colecta, se toma una gasa estéril y se impregna de alcohol al 70% o benzal y se cubre la punta de la cola para detener la salida de sangre. Para los muestreos posteriores, es importante solo realizar un corte con el bisturí para retirar únicamente la costra formada por el corte anterior evitando acortar la cola demasiado.

Al terminar la colecta de la muestra sanguínea, los tubos se centrifugan a 1,000 rpm durante 5 minutos y el suero se colecta en un tubo de poliestireno del tamaño adecuado. Se puede generar hemolisis en la sangre al realizar la colecta de la

misma, sin embargo al realizar la cuantificación del PSA en el suero, ésta hemolisis no interfirió con la detección.

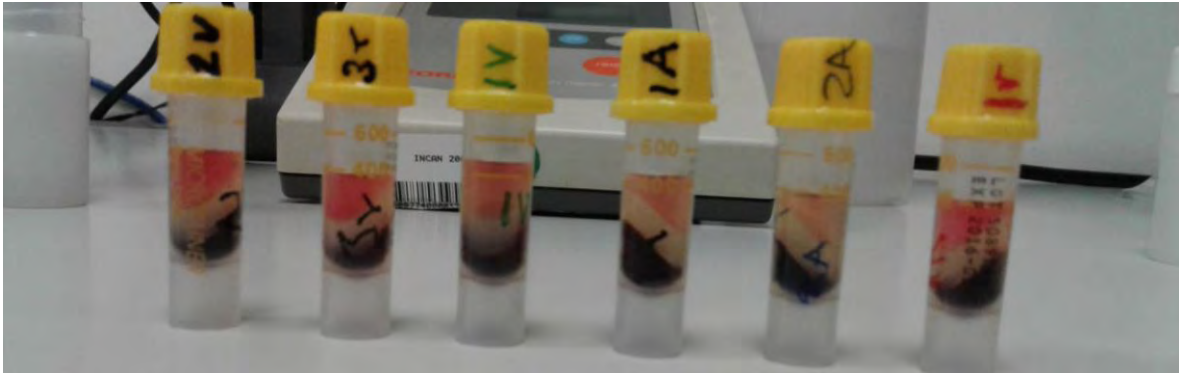


Imagen 2.2. Muestras de sangre posteriores a la obtención de suero.

13.3 Anexo suplementario 3. Extracción de tejido tumoral.

Para la extracción del tejido tumoral se realizan cortes con tijeras alrededor del cuerpo tumoral con el fin de separar la piel circundante al tumor (Imagen 3.1, 3.2 y 3.3)



Imagen 3.1.



Imagen 3.2.



Imagen 3.3.

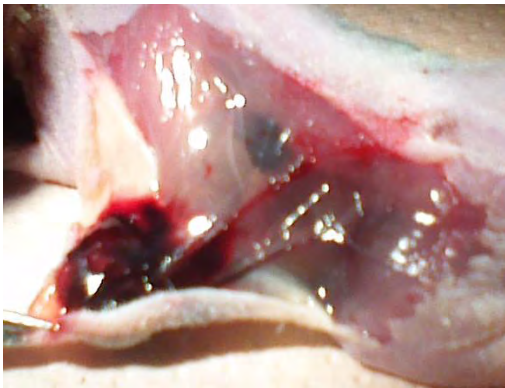


Imagen 3.4.



Imagen 3.5.

En algunos casos, es posible extirpar el tejido tumoral de manera muy sencilla al momento de cortar el tejido cutáneo que lo cubre (Imagen 3.4 y 3.5), sin embargo, en algunos casos, el tejido no se desprende tan fácilmente de la piel y es necesario limpiarlo (Figura 3.6).



Imagen 3.6.

La limpieza del tejido se realiza en una superficie adecuada que se encuentre en contacto con hielo y con la ayuda de un bisturí y unas pinzas se retira poco a poco la piel que se encuentra adherida (Imagen 3.7, 3.8 y 3.9).



Imagen 3.7.



Imagen 3.8.



Imagen 3.9.

Una vez que se tienen los tejidos limpios de piel, se cortan en porciones adecuadas dependiendo el fin que se les vaya a dar, en este caso para extracción de RNA, inmunohistoquímica y extracción de proteínas.

En caso de no ser analizados al momento, las porciones se colocan en hielo seco y posteriormente a -80°C . Si las muestras son procesadas posterior a la extracción, cada porción será colocada en condiciones adecuadas:

- Para extracción de RNA se sumergirá en TRIzol.
- Para extracción de proteínas se colocará en buffer RIPA adicionado con inhibidor de proteasas.
- Para inmunohistoquímica el tejido se fijara en formalina.

13.4 Anexo Suplementario 4. Resultados obtenidos del monitoreo del ratón R2

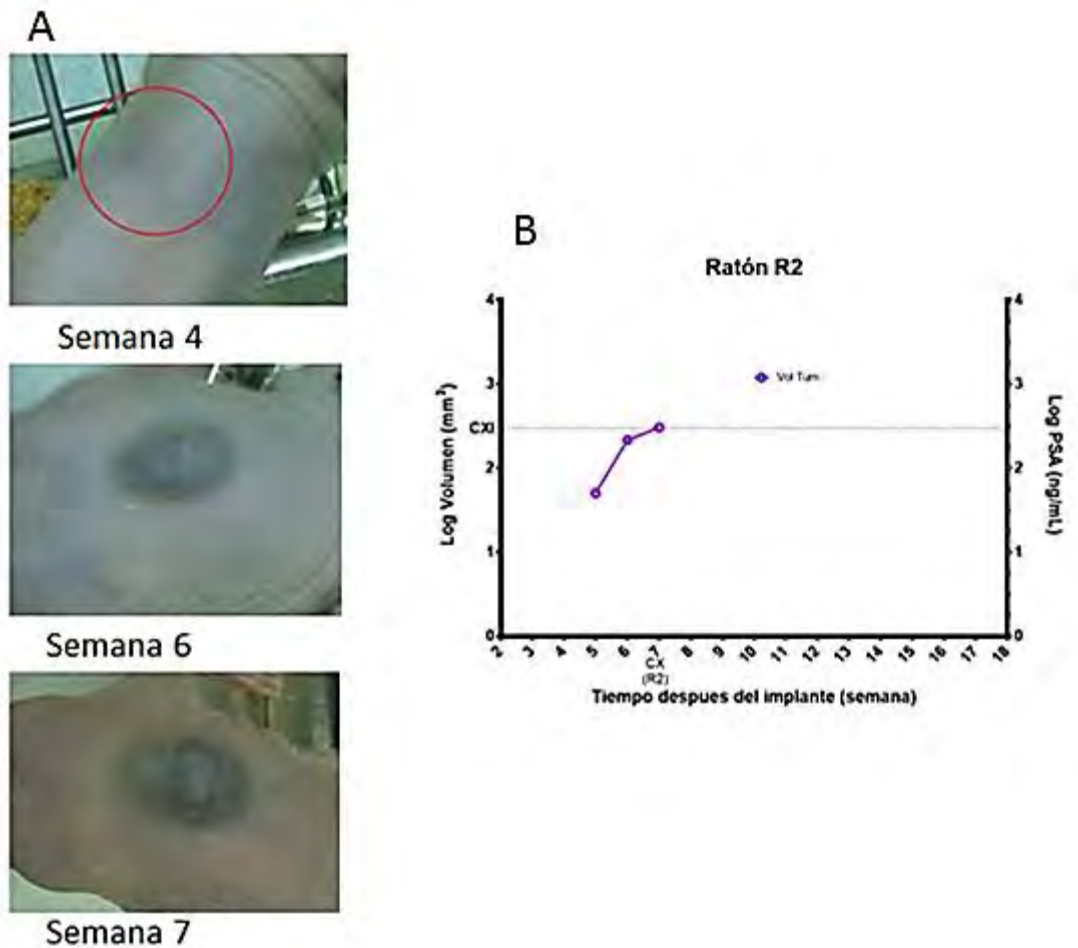


Imagen 4.1. Resultados generales del desarrollo tumoral para el ratón R2. A) Seguimiento semanal de apariencia de tumor; B) valores de la cuantificación de PSA en el suero y volumen tumoral.