



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE GRP EN
CÁNCER DE PRÓSTATA CON FENOTIPO
NEUROENDÓCRINO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA
DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A :

MARISOL MARTÍNEZ ZAMUDIO

ASESOR: DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES

**COASESOR: Q.F.B. ALEJANDRO GUTIÉRREZ
GARCÍA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO
(2017)**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Caracterización funcional de GRP en cáncer de próstata con fenotipo neuroendócrino.

Que presenta la pasante: Marisol Martínez Zamudio

Con número de cuenta: 309680363 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Junio de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	Dra. Jazmín Flores Monroy	
2do. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

DEDICATORIAS

El presente trabajo es dedicado a mi amada madre y hermanas, quienes han sido parte fundamental para mi desarrollo educativo. Ellas son quienes me han dado grandes enseñanzas a lo largo de la vida, así como la motivación de superación que me han llevado a lograr esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de mi familia. María, gracias por tantos años de comprensión, apoyo, y por contagiarme esas ganas de superación personal que tanto te caracterizan. Yazmín, gracias por tus consejos, por enseñarme las virtudes de la paciencia y templanza, y por entender mis conversaciones científicas. Jéssica, gracias por preocuparte por mí, por alimentarme y darme otro hogar; además, te agradezco el apoyo brindado en la revisión de la redacción de esta tesis. José, gracias por el apoyo económico.

A Daniela Ongay por la paciencia, sacrificio y esfuerzo que han significado nuestros años de estudiante. Por creer en mi capacidad cuando yo no lo hacía. Por nunca rendirte e inspirarme a ser una mejor versión de mi misma. Por escucharme y estar ahí, aún en momentos difíciles. Y especialmente por la crítica constructiva sobre este trabajo.

Agradezco a mis compañeros de clase que se convirtieron en mis amigos; en especial a Angélica, Karina y Sandy, ya que gracias a ustedes, he aprendido a trabajar en equipo, a ser más paciente y a recordar que no estoy sola en este proceso. Aunque vamos cada una tomando nuestros caminos, sé que cuento con ustedes; juntas de inicio a fin. También agradezco a mis *roomies* Lara e Itze, por las risas y pláticas en la noche que hicieron de este proceso algo más ameno y menos estresante.

También quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, que me ha dado un espacio, que día a día he decidido aprovechar al máximo; me ha dado experiencias, conocimientos, oportunidades, lecciones, amigos y valores que llevaré conmigo por siempre.

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, y quiero agradecer a mi asesor de tesis, Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, por ofrecerme la oportunidad de ser parte activa de su grupo de investigación. Del mismo modo agradezco sinceramente a la cDra. Susana Solórzano por la confianza, las enseñanzas, los consejos y la guía para realizar este trabajo. Y a los demás integrantes del grupo "Prostate Cancer Team" por el apoyo y la amistad brindada.

Y para finalizar, agradezco de forma sincera la valiosa colaboración a todas y todos quienes de una u otra forma han colocado un granito de arena para el logro de este Trabajo de Grado.

ABREVIATURAS

APC	Alofococianina
APE	Antígeno Prostático Específico
AR	Receptor de andrógenos
AREs	Elementos de respuesta a andrógenos
ATP	Adenosín Trifosfato
BBS	Bombesina
BrdU	5-bromo-2'deoxiuridina
CaP	Cáncer de Próstata
CgA	Cromogranina A
CgB	Cromogranina B
CPRC	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DBD	Dominio de unión al DNA
DHT	Dihidrotestosterona
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ERD	Examinación Rectal Digital
GABA	Ácido Gamma Aminobutírico
GABAB	Receptor de Ácido Gamma Aminobutírico B
Gad1	Ácido glutámico descarboxilasa 1
GFAP	Proteína fibrilar acídica de la glía
GRP	Péptido Liberador de Gastrina
GRPR	Receptor de Péptido Liberador de Gastrina
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IARC	Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IP3	Inositol trifosfato
LBD	Dominio de unión al ligando
LBD	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante

MC	Medio Condicionado
MMP	Metaloproteinasa
NE	Neuroendócrino
NED	Diferenciación Neuroendócrina
NE-like	Células parecidas a las Neuroendócrinas
NSE	Enolasa no específica
NTS	Neurotensina
PBS	Tampón fosfato salino
PPSI	Potencial postsináptico inhibitorio
PTHrP	Proteína relacionada con la hormona paratiroidea
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
SCP2	Proteína transportadora de esterol 2
SEMA6A	Semaforina de transmembrana de tipo I
SFB	Suero Fetal Bovino
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
SNC	Sistema nervioso central
TIMP-1	Inhibidor de tejido de la metaloproteinasa 1
TSH	Hormona estimulante de la tiroides

ÍNDICE

1.	RESUMEN	9
2.	INTRODUCCIÓN	11
2.1.	CÁNCER DE PRÓSTATA	11
2.1.1.	FACTORES DE RIESGO.....	12
2.2.	ANATOMIA DE LA PRÓSTATA Y SU FUNCIÓN.....	13
2.2.1.	HISTOLOGÍA.....	16
2.2.2.	IMPORTANCIA DE LOS ANDRÓGENOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA PRÓSTATA ..	17
2.3.2.1	Mecanismo de acción de los andrógenos	21
2.3.	HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	22
2.3.1.	DIAGNÓSTICO.....	22
2.3.2.	TRATAMIENTO.....	24
2.3.2.1.	Terapia hormonal.....	25
2.4.	CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN (CPRC)	27
2.5.	DIFERENCIACIÓN Y TRANSDIFERENCIACIÓN NEUROENDÓCRINA EN CÁNCER DE PRÓSTATA.....	29
2.6.	NEUROTRANSMISORES Y NEUROPEPTIDOS ASOCIADOS A CÁNCER DE PRÓSTATA.....	32
2.6.1.	ÁCIDO GAMMA AMINOBUTÍRICO (GABA)	32
2.6.2.	NEUROPEPTIDOS.....	33
2.6.2.1.	Péptido liberador de gastrina (GRP).....	34
2.7.	ANTECEDENTES DIRECTOS	35
3.	OBJETIVOS	41
3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	41
3.2.	OBJETIVOS PARTICULARES	41
4.	HIPÓTESIS.....	41
5.	METODOLOGÍA.....	42
5.1.	CULTIVO CELULAR	42
5.2.	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	42
5.3.	ENSAYO DE MIGRACIÓN POR HERIDA.....	43
5.4.	ENSAYO DE INVASIÓN POR TRANSWELL.....	44
6.	RESULTADOS	46

6.1.	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	46
6.2.	ENSAYO DE INVASIÓN POR TRANSWELL.....	49
6.3.	ENSAYO DE MIGRACIÓN.....	52
7.	DISCUSIÓN.....	54
8.	CONCLUSIÓN	63
9.	PERSPECTIVAS	64
10.	REFERENCIAS.....	66
11.	APÉNDICE	72

1. RESUMEN

El cáncer de próstata es un problema de salud pública mundial. En México, se encuentra en el segundo lugar en mortalidad e incidencia de neoplasias en varones. En una etapa de la enfermedad, llamada Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CPRC); donde los pacientes no responden al tratamiento de bloqueo androgénico, las células Neuroendócrinas (NE) incrementan en número mediante la Diferenciación Neuroendócrina (NED). Estas células NE secretan moléculas con propiedades mitogénicas que incrementan la agresividad y progresión de la enfermedad.

Se ha reportado que al silenciar el Receptor de Andrógenos (AR) de células LNCaP, se obtiene un fenotipo similar al NE. Estas células secretan marcadores NE y al estimular el receptor de GABA_B, se incrementa la secreción de GRP al medio. GRP es un neuropéptido promotor de la secreción y motilidad gastrointestinal, el cual también se ha relacionado con el desarrollo de cáncer gástrico; por lo tanto, se cree que tiene actividad en la progresión de CPRC al actuar en la invasión y proliferación celular.

En esta investigación se demostró que GRP no incrementa la proliferación de células de cáncer de próstata Andrógeno-Independiente, sin embargo, aumenta ligeramente su capacidad migratoria y eleva significativamente la invasión de células tanto Andrógeno-Independiente como Andrógeno-Dependiente.³⁴

Con estos resultados se propone que las células con NED, en cáncer de próstata, secretan neuropéptidos con actividad paracrina que confieren las características necesarias para la progresión y agresividad de la enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata representa un problema de salud pública y uno de los problemas médicos más importantes de la población masculina. Siendo así que en el 2012, el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó a los tumores malignos como la tercera causa de mortalidad en la población general del sexo masculino. (Secretaría de Salud, 2016)(International Agency for Research on Cancer, 2012).

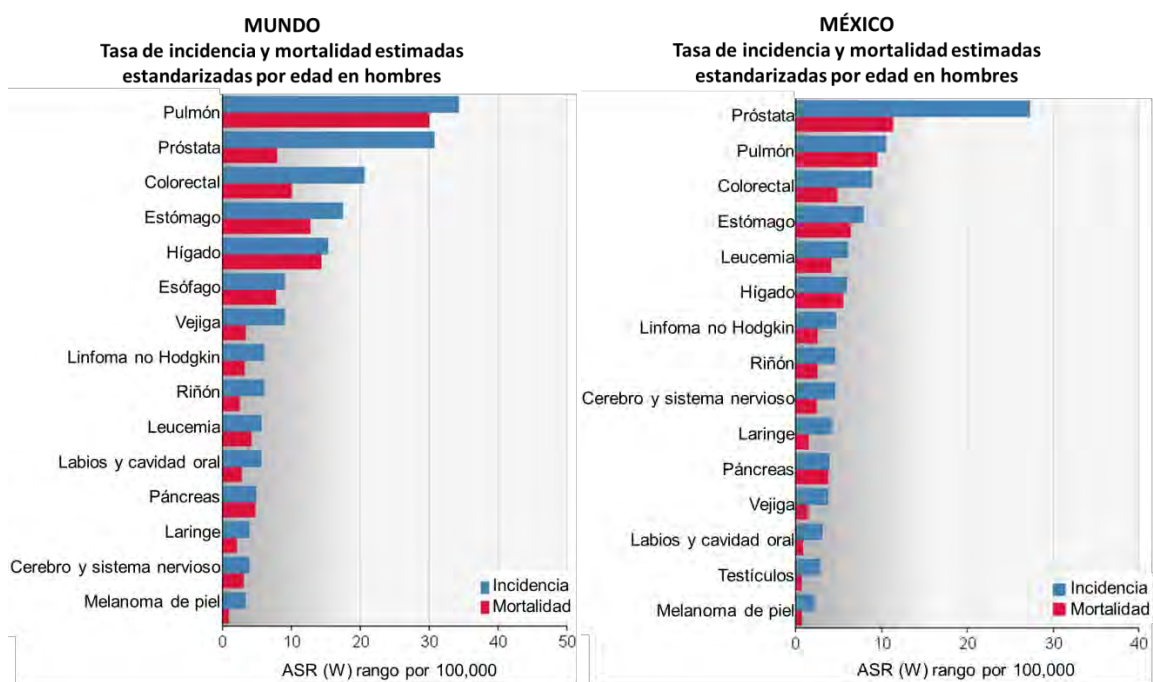


Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad estimadas estandarizadas por edad (W) en hombres por cáncer A) En el mundo; B) En México. Datos de la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (International Agency for Research on Cancer, 2012). W se refiere a la tasa estandarizada en la que la población podría padecer la enfermedad si tuviera una estructura estandarizada de edad.

Como se observa en la Figura 1, en el mundo, el cáncer de próstata es la segunda enfermedad cancerígena más común y la segunda causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos en hombres. El 70% de los casos de cáncer de próstata se presentan en hombres de países desarrollados. Aproximadamente 1 de cada 7 hombres será diagnosticado con cáncer de próstata en el transcurso de

su vida, y se estima que 6 de cada 10 casos se diagnostican en hombre de 65 años o más (International Agency for Research on Cancer, 2012). En México, el cáncer de próstata es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos (16%), y la neoplasia con mayor incidencia en hombres (21%). (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2015).

2.1.1. FACTORES DE RIESGO

De acuerdo con el Programa de Acción contra el Cáncer de Próstata de la Secretaría de Salud (Secretaría de salud, s/f), se han identificado factores de riesgo que aumentan la posibilidad para el desarrollo de la enfermedad, entre ellos se encuentra:

- Edad: La probabilidad de padecer cáncer de próstata aumenta rápidamente después de los 50 años.
- Raza/grupo étnico: Se observa una mayor incidencia entre las personas afroamericanas y del Caribe con ascendencia africana que en los hombres de otros grupos étnicos. El cáncer de próstata ocurre con menor frecuencia en los hombres asiático-americanos e hispano/latinos.
- Antecedentes familiares: Si el padre y el abuelo presentaron cáncer de próstata, el riesgo de presentar esta enfermedad se eleva 9 veces. (Ferris, Garcia, Berbel, & Ortega, 2011)
- Aspectos genéticos: Las mutaciones hereditarias, como del gen BRCA2, puede aumentar el riesgo de padecer cáncer de próstata en algunos hombres (Ortiz-Arazola, Reyes-Aguilar, Grajales-Alonso, & Tenahua-Quitl, 2013).

Hay otros factores con menor efecto en el riesgo de padecer cáncer de próstata, los cuales se enlistan a continuación:

- Alimentación: El excesivo consumo de carcinogénicos como la vitamina A, y oligoelementos como el zinc, cadmio y selenio. Los hombres que consumen elevadas cantidades de carnes rojas y productos lácteos altos en grasa

parecen tener una probabilidad ligeramente mayor de cáncer de próstata (Jeong y col., 2017).

- **Obesidad:** No parece aumentar el riesgo general de padecer esta enfermedad, sin embargo, algunos estudios han encontrado que los hombres obesos tienen un mayor riesgo de presentar cáncer de próstata más agresivos. (Jeong y col., 2017; Ortiz-Arrazola y col., 2013)
- **Ambiente:** El uso de insecticidas agrícolas por habitantes de zonas rurales parece incrementar la incidencia de cáncer de próstata (Ferrís-i-Tortajada y col., 2011). La Academia Nacional de Medicina considera que hay “evidencia limitada/sugestiva” de un vínculo entre la exposición al agente naranja y el cáncer de próstata. El agente naranja fue un químico ampliamente utilizado durante la guerra de Vietnam (The National Academy Sciences of the United States, 2014).
- **Tabaquismo:** Algunas investigaciones han vinculado el tabaquismo con un ligero aumento en la mortalidad a causa de cáncer de próstata, aunque este hallazgo necesita ser confirmado por otros estudios (Cancer. Net Editorial Board, 2016; Ferrís-i-Tortajada y col., 2011; Ortiz-Arrazola y col., 2013; Secretaría de salud, s/f).

2.2. ANATOMIA DE LA PRÓSTATA Y SU FUNCIÓN

La próstata es una glándula única de secreción exocrina, que forma parte del sistema reproductivo y urinario del hombre. Este órgano se sitúa debajo de la vejiga y enfrente del recto, de tal manera que rodea la uretra (Figura 2). A partir de la pubertad comienza a crecer, y aunque su tamaño varía, en la edad adulta alcanza aproximadamente 4 cm de ancho, 3 cm de alto y 2 cm de grosor (Reeves, Everaerts, Murphy, & Costello, 2016). La función principal de la próstata es secretar un líquido blanquecino hacia la uretra llamado líquido prostático. Éste se une a las secreciones de las vesículas seminales, las glándulas bulbouretrales de Cowper y las glándulas periuretrales de Littré para formar el líquido seminal (Shen & Abate-Shen, 2010).

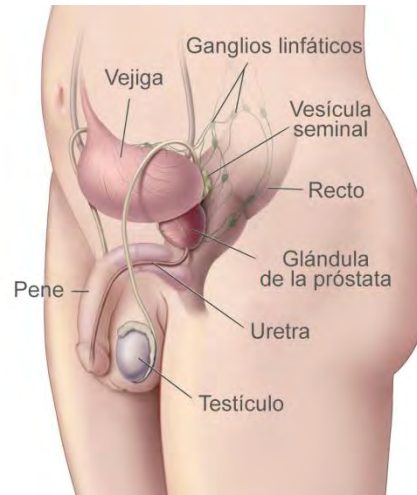


Figura 2 Posición anatómica de la próstata.(National Institute of Cancer, s/f)

La secreción prostática es alcalina, por lo que neutraliza la acidez de los demás componentes del semen, aumenta la motilidad y fertilidad de los espermatozoides al ser rico en componentes importantes para su mantenimiento. Sus componentes son: ácido cítrico, utilizado por los espermatozoides para producir ATP; diferentes enzimas proteolíticas como el antígeno prostático específico (APE), pepsinógeno, lisozima amilasa e hialuronidasa, encargadas de descomponer las proteínas de la coagulación secretadas por las vesículas seminales; fosfatasa ácida; y seminoplasmina, con capacidad bactericida. Durante la eyaculación, la próstata se contrae junto con el conducto deferente y las vesículas seminales, expulsando su contenido a la uretra. Estas secreciones constituyen alrededor del 25% del volumen total del semen y contribuyen a la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Tortora & Derrickson, 2013).

La próstata, como glándula, está constituida por tejido adenomatoso y fibroso; el 30% de su peso es fibromuscular y el resto son elementos glandulares. De acuerdo al modelo de McNeal, la próstata se divide en cuatro zonas diferentes ilustradas en la Figura 3, y cada una de ellas se asocia a distintas patologías (Aaron, Franco, & Hayward, 2016). Estas cuatro zonas son:

- Zona anterior: Conformado por la cápsula prostática, de constitución fibromuscular y sin estructuras glandulares.

- Zona central: Contiene los conductos eyaculadores y representa el 25% del volumen prostático. En esta zona se originan los procesos inflamatorios y se asientan el 8% de los cánceres de próstata. Dado que la zona central es la parte de la próstata que está más alejada del recto, los tumores encontrados en esta región no pueden ser sentidos por el médico mediante una examinación rectal digital (ERD).
- Zona de transición: Se encuentra entre la zona periférica y la zona central; y conforma el 20% de la próstata hasta los 40 años. En esta región se desarrolla la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y el 25% de los adenocarcinomas prostáticos. (Reeves y col., 2016)
- Zona periférica: Constituye la porción posteroinferior de la próstata y es el área del órgano que está más cerca del recto, puede ser fácilmente sentido por el doctor durante una ERD y es la zona más grande de la próstata. La mayoría de los tumores (aproximadamente 75%) se encuentran en esta zona. (Shen & Abate-Shen, 2010)

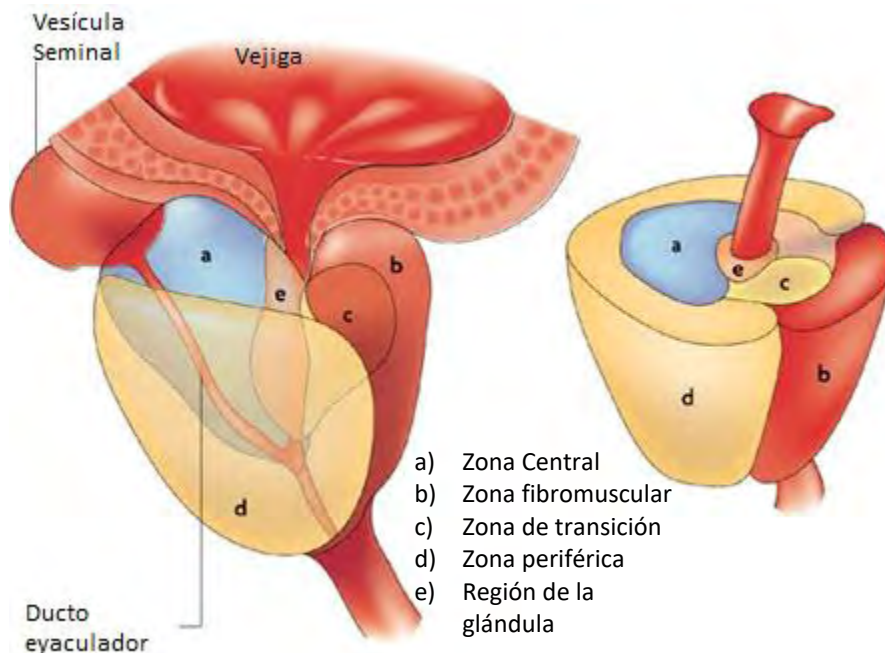


Figura 3. Anatomía de la próstata. Modificado de (De Marzo y col., 2007)

2.2.1. HISTOLOGÍA

El epitelio de la próstata (Figura 4) está integrado por tres variedades celulares, las epiteliales lumbinales, las epiteliales basales y las Neuroendocrinas (NE). Las células epiteliales lumbinales son las más numerosas, están diferenciadas, secretan antígeno prostático específico (APE) y fosfatasa ácida a la luz glandular. Además, expresan receptores androgénicos a niveles elevados; por lo tanto, son dependientes de andrógenos para su sobrevivida. Las células epiteliales basales, por el contrario, están poco diferenciadas, no tienen actividad secretora, están distribuidas en la membrana basal, y su número es menor. Estas células expresan bajos niveles de receptores androgénicos y son independientes de andrógenos para su sobrevivida. El tercer tipo celular consiste en células neuroendocrinas que se ubican entre las células del compartimento basal. Están terminalmente diferenciadas y son insensibles a los andrógenos. En estadios fisiológicos, esta variedad celular tiene un papel fundamental en el crecimiento, mantenimiento y proliferación celular a través de mecanismos paracrinos, y su importancia se incrementa en procesos patológicos específicos, por lo que su estudio se ha vuelto importante en los últimos años (Bishop, Davies, Ketola, & Zoubeidi, 2015; Ramírez-Balderrama y col., s/f).

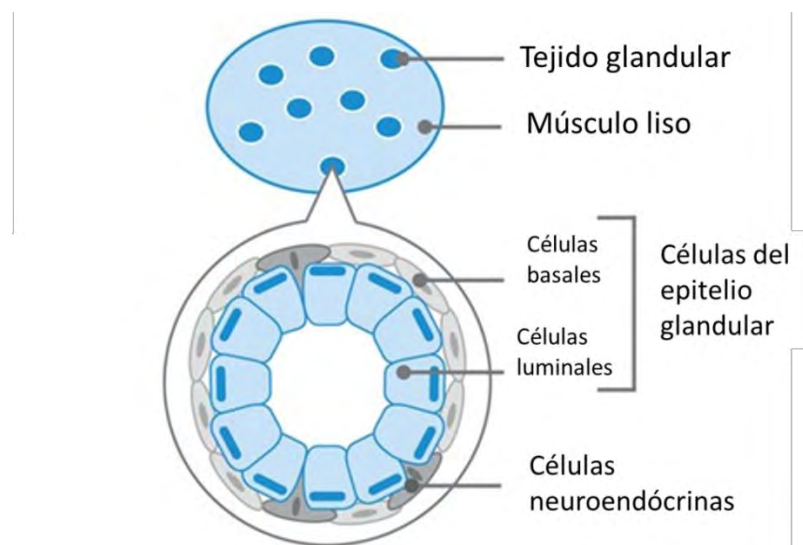


Figura 4. Epitelio glandular de la próstata, modificado de (Prostate Cancer UK, 2016)

Se cree que las células NE tienen un papel parácrino en el crecimiento y diferenciación de la glándula prostática normal, similar a las células NE que residen en el páncreas, sistema respiratorio y gastrointestinal. Estas células no son proliferativas y expresan diversas proteínas neuronales, como enolasa no específica (NSE), cromogranina A y B (CgA, CgB), algunos neuropéptidos como neurotensina, péptido liberador de gastrina (GRP), serotonina, calcitonina, TSH, PTHrP. (Wright, Tsai, & Aebersold, 2003)

Tabla 1. Células de la glándula prostática

Tipo celular	Actividad	Presencia	Dependencia a Andrógenos
Luminal	Actividad secretora de APE y FA. Poco proliferativas.	Son las más numerosas y son poco diferenciadas	Expresan AR. Son Andrógeno-dependientes.
Basal	Sin actividad secretora. Proliferativas	Menos numerosas, se encuentran en la membrana basal.	Expresan bajos niveles de AR, independientes de andrógenos.
Neuroenócrina (NE)	Mantenimiento de la proliferación celular mediante mecanismos paracrinos. No proliferativas.	Se ubican entre las células basales. Representan menos del 1% de las células de la próstata.	Son andrógeno-independientes.

2.2.2. IMPORTANCIA DE LOS ANDRÓGENOS EN EL MANTENIMIENTO DE LA PRÓSTATA

Los andrógenos, del griego andro- άν-ήρ/-δρός “varón” y gen- γεν “que genera”, son las hormonas sexuales masculinas que corresponden a la testosterona, dihidrotestosterona (DHT) y la androstendiona. Estas hormonas esteroideas son derivados del ciclo pentanoperhidrofenantreno, cuya función principal es estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos primarios y secundarios (Chang, 2002; Rojas Durán y col., 2011). El principal andrógeno circulante en el hombre es la testosterona, pero es la DHT su metabolito más activo. La DHT participa en varios procesos biológicos, dentro de los que se incluyen el desarrollo normal del pene, del escroto, de los testículos, de las glándulas sexuales accesorias y de la presencia de las características sexuales secundarias en la pubertad.

Del 90 al 95% de los andrógenos son producidos en las células de Leydig en el testículo. Dichas células obtienen el colesterol del plasma a partir de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LBD). Este colesterol es internalizado a la mitocondria por una proteína transportadora de esteroides (SCP2), donde es transformado en pregnenolona. Posteriormente es transportado al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis.

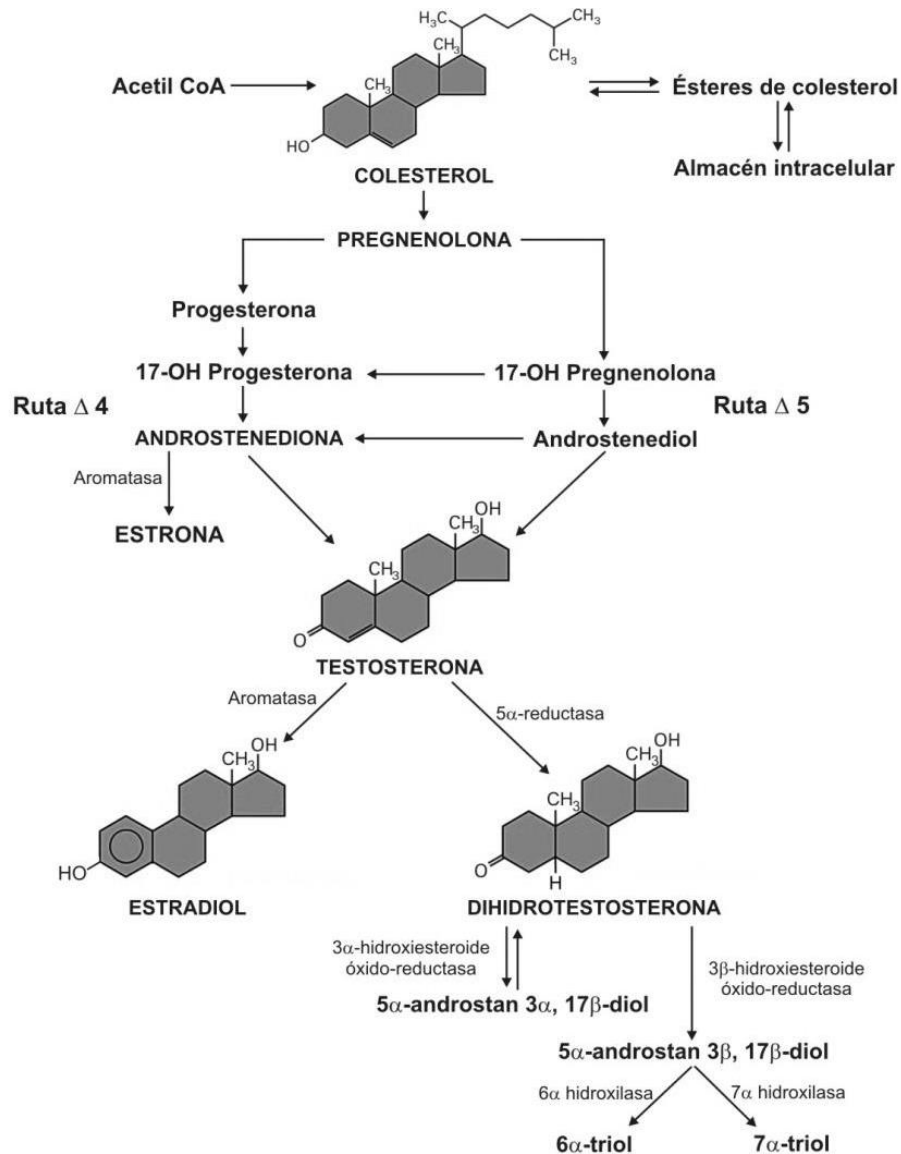


Figura 5. Metabolismo de esteroides. La síntesis de testosterona puede llevarse a cabo a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona (ruta Δ5) o de la 17-hidroxi-progesterona (ruta Δ4). En el humano la vía más importante para la síntesis de testosterona es la ruta Δ5. Adaptado de (Rojas Durán y col., 2011).

Como se observa en la Figura 5, la síntesis de testosterona se lleva a cabo a través de dos rutas metabólicas: a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona (ruta $\Delta 5$) o a partir de 17-hidroxi-progesterona (ruta $\Delta 4$). La síntesis de los andrógenos se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, donde la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), liberada del hipotálamo, estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) en la adenohiófisis, la cual posteriormente estimula a las células de Leydig para inducir la síntesis de la testosterona. Esta síntesis es regulada por una retroalimentación negativa (Oa & Lalosa S, 2014).

En la próstata, el efecto de los andrógenos inicia con el transporte de la testosterona desde la circulación hacia la glándula. Estos andrógenos son necesarios para la función normal de la próstata, ya que son los principales reguladores de la proliferación y la inhibición de la apoptosis (Devlin & Mudryj, 2009). De la misma manera, el cáncer de próstata depende de la estimulación androgénica para el crecimiento y supervivencia celular. Cuando la testosterona entra a las células prostáticas, el 90% es convertido a DHT por la enzima 5- α -reductasa. La DHT es la hormona más activa teniendo afinidad cinco veces más alta que la testosterona para el receptor de andrógenos (AR). El AR tiene efectos importantes durante el transcurso de la vida del hombre, que van desde el desarrollo en la pubertad hasta alteraciones en su regulación que conllevan a efectos como la calvicie o al desarrollo de patologías en la próstata como HPB y el Cáncer de Próstata.

El AR es un receptor, miembro de la superfamilia de receptores nucleares esteroideos, que en estado basal se une a proteínas de choque térmico que previene su unión al DNA (Feldman & Feldman, 2001; Heinlein & Chang, 2004). La proteína AR contiene diversos dominios funcionales, ilustrados en la Figura 6:

- Una región N-Terminal regulatoria.
- Un dominio de unión al DNA (DBD), localizado en la parte central de la molécula del AR, y es la región más conservada dentro de la familia de los receptores nucleares. Este dominio está formado por nueve residuos de cisteína, de los cuales ocho están involucrados en la formación de dos

complejos denominados dedos de zinc, cada uno compuesto por cuatro cisteínas unidas a un ión de Zn^{2+} . Su función es reconocer secuencias consenso específicas del DNA.

- Un dominio bisagra no conservado y flexible. Encargado de unir a los dominios LBD y DBD, también regula la unión al DNA, la translocación nuclear y la transactivación del receptor.
- Un dominio de unión al ligando (LBD), que induce la actividad del receptor mediante agonistas, también es encargado de la dimerización y activación de la transcripción. (Devlin & Mudryj, 2009; Rojas Durán y col., 2011).

En el citoplasma, los monómeros del receptor están inactivos debido a que están unidos a proteínas chaperonas como Hsp90, Hsp 70, Hsp 56, p23 y TPR. Estas chaperonas secuestran al AR e impiden que se lleve a cabo la actividad transcripcional, pero también inducen una conformación de alta afinidad para el ligando (Oa & Lalosa S, 2014; Rojas Durán y col., 2011)

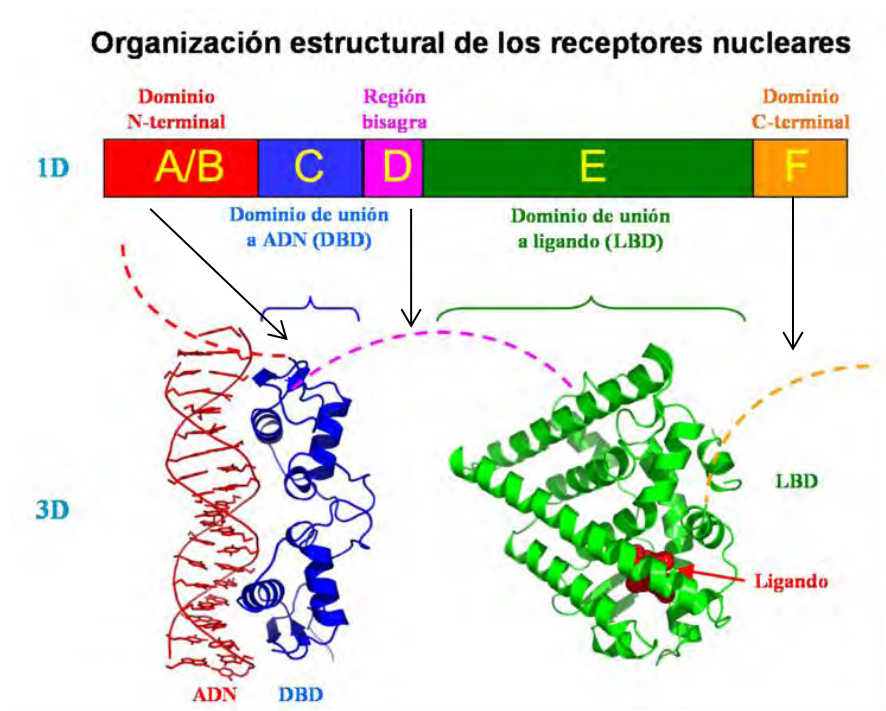


Figura 6. Estructura de un receptor nuclear, recuperado el día 23 de febrero del 2017 de la página https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Estructura_de_los_receptores_nucleares.png

2.3.2.1 Mecanismo de acción de los andrógenos

Cuando los andrógenos son liberados a la circulación sanguínea, se unen a la albúmina (58%), a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) (40%), o se encuentran de forma libre (2%) para alcanzar sus órganos blancos y ejercer su efecto (Zapata y col., 2004). Cuando la DHT, o la testosterona, se une al receptor, éste sufre un cambio conformacional, las chaperonas se disocian y el receptor es fosforilado mediante la proteína quinasa A7. Este cambio conformacional facilita la formación de homodímeros del receptor y la translocación al núcleo (Figura 7). En el núcleo, el receptor se une a secuencias específicas de DNA conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (AREs) en la región promotora de genes blancos. Estos genes blancos del AR incrementan la secreción de APE, así como la síntesis de proteínas implicadas en estimular el desarrollo, supervivencia, crecimiento y función secretora de la próstata (Heinlein & Chang, 2004).

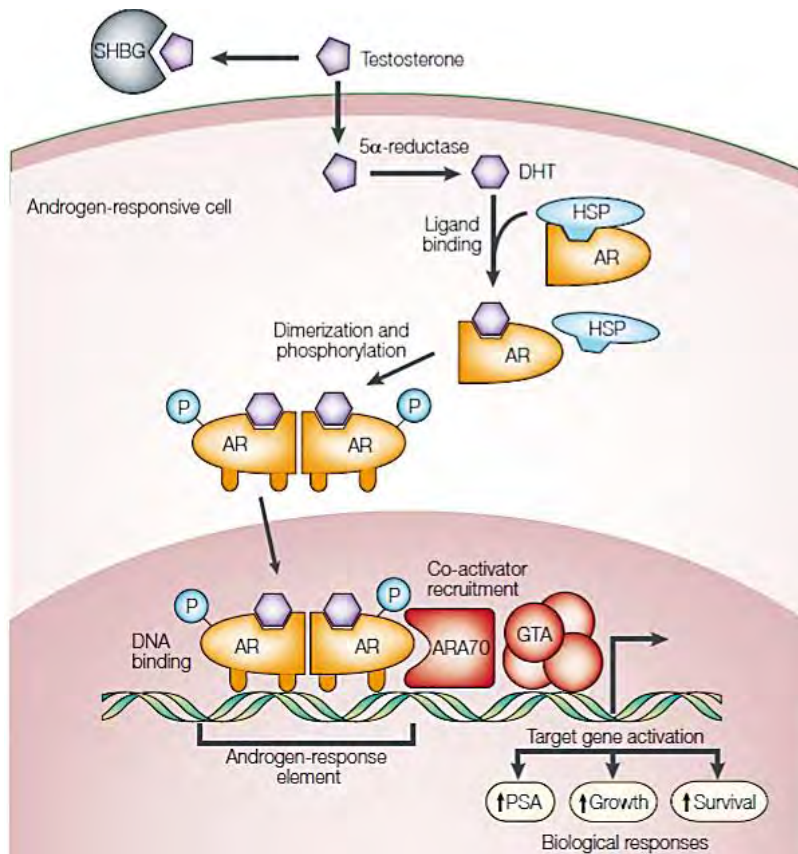


Figura 7. Mecanismo de acción de los andrógenos (Feldman & Feldman, 2001)

2.3. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata se origina cuando las células de este órgano comienzan a crecer descontroladamente. Cuando el cáncer está localizado únicamente en la glándula, suele ser asintomático (Thompson y col., 2007). Sin embargo, en el crecimiento local del tumor puede presentar sintomatología urinaria obstructiva baja, tal como:

- Disminución del flujo urinario
- Urgencia
- Vacilación
- Nicturia
- Vaciado vesical incompleto

Cabe destacar que estos síntomas son inespecíficos y son más indicativos de una HPB en vez de cáncer. La HPB es el incremento del tamaño de la glándula producido por una hipertrofia del estroma y de las células epiteliales de la glándula prostática (Aaron y col., 2016). Este incremento provoca la obstrucción del flujo urinario y la presencia de síntomas miccionales obstructivos/irritativos del tracto urinario inferior (Medina y col., 2015). Otros signos y síntomas que se pueden encontrar son la hematuria (en cáncer de etapa avanzada), y otros inherentes a la metástasis como son dolor en la región lumbar o pélvica, compresión radicular, edema de miembros inferiores causado por compresión ganglionar linfática pélvica y anemia. (Hospital General de México)

2.3.1. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de cáncer de próstata se basa en los síntomas que el paciente presenta, la historia familiar, mediante el examen o tacto rectal y el nivel de Antígeno Prostatico Específico (APE) en sangre. Algunas organizaciones médicas recomiendan a los hombres considerar la detección para cáncer de próstata entre los 50 y 60 años, o antes en caso de tener factores de riesgo (Mayo Clinic, S/A). Los exámenes que se realizan para diagnosticar el cáncer de próstata son los siguientes:

- Examen de APE: El APE, también llamado calireína III, es una glicoproteína con peso de 34 kDa, integrado por 237 aminoácidos cuya síntesis es exclusiva de la próstata. Su función es la disolución del coágulo seminal y en condiciones normales es secretado hacia el lumen por las células epiteliales de ductos y acinos prostáticos (Carlos Sánchez-Martínez, Paredes-Solís, Hernández-Ordóñez, & Rigel Sánchez-Ruvalcaba, 2013). Si bien es normal la presencia de una pequeña cantidad de APE en el torrente sanguíneo, un nivel elevado podría ser indicativo de infección, inflamación, agrandamiento de la próstata o de cáncer. En la práctica, el APE y la fracción libre del APE son determinantes para el diagnóstico. Cuando el médico observa niveles anormales de APE en sangre, procede a realizar un tacto rectal en el paciente. (Mayo Clinic, S/A)
La concentración de APE, es un parámetro continuo, cuanto mayor es el valor, más probabilidades hay de que exista cáncer de próstata. Aunque no hay un valor umbral o límite superior aceptado de forma universal, se considera que cuando es mayor a 4 ng/ml, se debe proceder a realizar un tacto rectal en el paciente, por el médico especialista (Secretaría de Salud, 2016).
- Tacto rectal: La mayoría de las veces el cáncer se localiza en la zona periférica de la próstata y puede ser detectado mediante esta técnica cuando el volumen del tumor es de 0.2 ml o mayor. En este examen, el médico introduce un dedo enguantado y lubricado dentro del ano para examinar la próstata, localizada junto al recto. Si el médico descubre alguna anomalía en la textura, forma o tamaño de la glándula, posiblemente sea necesario realizar otros exámenes, como una biopsia transrectal (Mayo Clinic, S/A). La presencia de una anomalía en el tacto rectal representa cáncer entre 15 al 40% de las ocasiones, dependiendo de la experiencia del examinador. Si el tacto rectal se utiliza para detectar cáncer de próstata no sospechado en hombres asintomáticos, detectará la presencia de cáncer en 0.1-4% de los pacientes (Hospital General de México).
- Biopsia transrectal: La biopsia transrectal con aguja 18G guiada por ultrasonido es el estándar para la obtención de material para examinación histopatológica. Las indicaciones para la biopsia transrectal es APE elevado y tacto rectal

sospechoso. Si el diagnóstico por biopsia es positivo, se debe complementar determinación del estadio del cáncer con una tomografía abdominal con contraste, ecografía o resonancia magnética para valorar la extensión de la enfermedad, si el APE es mayor de 20 mg/dl o existe algún dato de metástasis como dolor óseo está indicada la gammagrafía ósea (Hospital General de México).

2.3.2. TRATAMIENTO

Las alternativas para el tratamiento de cáncer de próstata dependen de varios factores; tales como el punto de diagnóstico, la rapidez del crecimiento del cáncer, si el tumor es órganoconfinado o no, el estado general de salud de la persona y las ventajas y posibles efectos secundarios del tratamiento. Si se diagnostica cáncer de próstata en una etapa temprana, usualmente los médicos recomiendan solo monitoreo de la progresión de la enfermedad mediante exámenes de APE en sangre, exámenes de tacto rectal y posiblemente biopsias. Algunas veces, la enfermedad puede controlarse de esta manera por años mientras la progresión se mantenga lenta (National Human Genome Research Institute, 2002). Si los exámenes revelan que el cáncer avanza, se puede optar por un tratamiento para el cáncer de próstata, tal como la cirugía o la radiación.

La cirugía para el cáncer de próstata implica extraer la glándula prostática (prostatectomía radical), así como un poco del tejido circundante y algunos ganglios linfáticos para evitar metástasis. La prostatectomía radical continúa siendo el estándar de oro como tratamiento contra el cáncer de próstata y está indicado en los tumores localizados a la glándula (Thompson y col., 2007).

La radioterapia utiliza energía de alta potencia para eliminar las células cancerosas. La radioterapia para el cáncer de próstata puede administrarse desde el exterior del cuerpo (radiación por rayo externo) o administrada desde el interior del cuerpo mediante implantación de semillas radioactivas (braquiterapia) (Prostate Cancer UK, 2016).

La quimioterapia utiliza fármacos para eliminar las células que se reproducen rápidamente, entre ellas las células cancerosas. La quimioterapia puede

administrarse por vía intravenosa en una vena del brazo o por vía oral. Este tratamiento puede ser una alternativa de tratamiento para los hombres con cáncer de próstata metastásico y para el cáncer que no responde a la terapia hormonal (National Human Genome Research Institute, 2002).

2.3.2.1. Terapia hormonal

La otra terapia utilizada contra el cáncer de próstata es la terapia hormonal, de ablación androgénica o bloqueo androgénico; la cual impide al cuerpo sintetizar andrógenos y su interacción con el receptor androgénico. Como ya se mencionó, los andrógenos estimulan los receptores androgénicos de la próstata y son transportados dentro de las células epiteliales, donde llevan a cabo la mayor parte de sus funciones, como la inducción de la proliferación y supervivencia celular. Por lo anterior, el bloqueo androgénico permite inducir apoptosis en ciertas células susceptibles del Cáncer de Próstata (Y. Pu y col., 2016).

Esta terapia es la piedra angular en el tratamiento del cáncer de próstata metastásico, al incrementar la supervivencia global en los pacientes y retrasar la progresión de la enfermedad así como la aparición de síntomas. Aunque también se emplea en forma coadyuvante a las terapias con intento curativo como la radioterapia externa y braquiterapia en la enfermedad localizada de alto riesgo y localmente avanzada. Con el objetivo de hacer más susceptibles a las células neoplásicas, en algunas series se administra en forma preparatoria en pacientes candidatos a prostatectomía radical, para tratar de disminuir el volumen tumoral. (Arroyo-Kuribreña, Soto-Vega, Muñoz-Pérez, Contreras, & Varela-Cabrera, 2012)

La terapia hormonal se puede llevar a cabo mediante:

- Medicamentos agonistas o antagonistas de la LHRH, la cual impiden que los testículos reciban los mensajes para producir testosterona. Algunos ejemplos de los fármacos utilizados son: Leuprolida, Goserelina, Abarelix y Degarelix.
- Antagonistas androgénicos, que impiden a la testosterona llevar a cabo su acción en la célula cancerosa, al frenar la actividad del AR. Los antagonistas disponibles en la actualidad incluyen: Flutamida, Bicalutamida y Enzalutamida.

- Orquiectomía o extirpación de testículos. (Mayo Clinic, S/A)
- Inhibidores de la esteroideogénesis que interfieren con la síntesis de andrógenos al limitar las reacciones enzimáticas de hidroxilación de los compuestos esteroideos a diferentes niveles. Los compuestos principales de este grupo son el Ketoconazol y la Aminoglutetimida. (Arroyo-Kuribreña y col., 2012)

Como se observa en la Figura 8, la terapia de ablación androgénica causa la regresión de tumores dependientes de andrógenos al reducir los niveles de andrógenos en suero e inhibiendo la actividad del AR, promoviendo la apoptosis. (National Human Genome Research Institute, 2002) Sin embargo, en más del 80% de los casos, las células cancerosas escapan de este tratamiento y reaparecen como Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CPRC) alrededor de los 18 a 24 meses después del inicio del tratamiento, (Bishop y col., 2015; Matei y col., 2012; Wright y col., 2003).

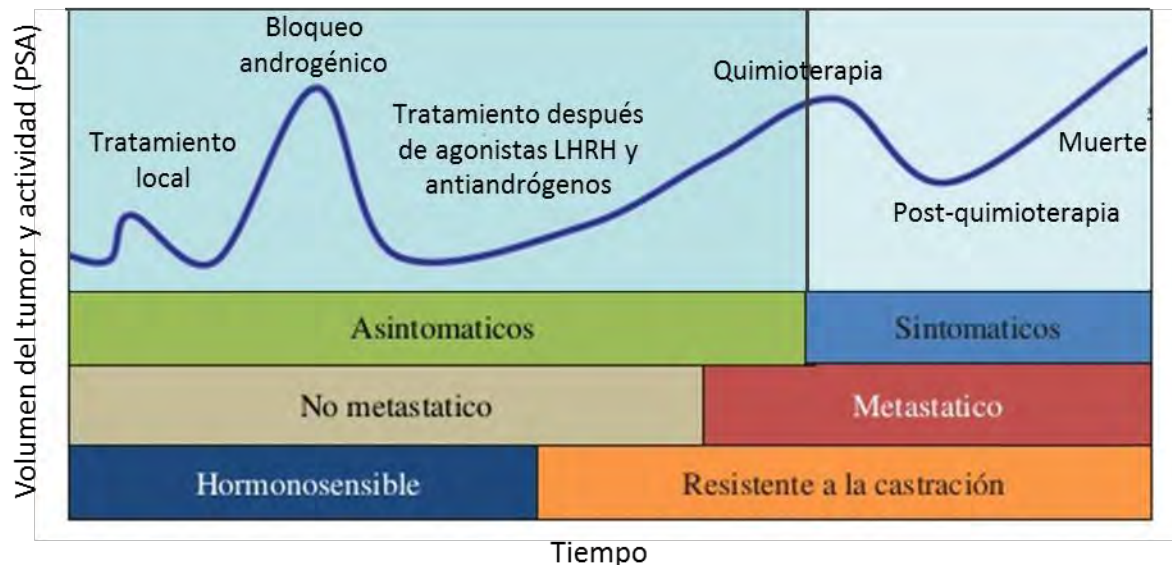


Figura 8. Historia natural del cáncer de próstata. Modificado de Figg 2010 (Referente)

En el CPRC las células proliferan en ausencia de andrógenos *in vivo*; además el cáncer es más agresivo y causa metástasis, llevando así a la muerte de los pacientes rápidamente (Feldman & Feldman, 2001). Hasta el momento se sabe

poco sobre los mecanismos moleculares que llevan a la Andrógeno-Independencia. Por lo tanto, es de interés investigar cuáles son las vías involucradas en la progresión de CPRC.

2.4. CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN (CPRC)

El CPRC se define como la progresión de la enfermedad a pesar de la terapia de bloqueo androgénico y puede presentar elevaciones continuas de los niveles de APE en sangre, progresión de la enfermedad, y/o la aparición de nueva metástasis. (Saad & Hotte, 2010). Los eventos moleculares que llevan a la transición de un estado andrógeno dependiente a uno independiente, o resistente a la castración, permanece desconocido. No se sabe si las células andrógeno dependiente adquieren la habilidad de proliferar a niveles bajos de andrógenos o si estos niveles bajos proveen de una presión selectiva que resulta en el crecimiento de una población menor de las células tumorales que son andrógeno-independiente (Heinlein & Chang, 2004).

Hay diferentes mecanismos posibles mediante los cuales, un cáncer de próstata puede llevar a un CPRC. Estos mecanismos son:

- 1) Hipersensibilidad del AR mediante sobreexpresión o amplificación de AR, o incremento de la producción local de andrógenos.
- 2) Interacciones promiscuas, donde se presentan mutaciones del AR que requieren bajos niveles de andrógenos o que sea activado por otros ligandos esteroideos.
- 3) Activación de AR mediante ligandos no esteroideos tales como factores de crecimiento y citocinas (Devlin & Mudryj, 2009).
- 4) Expresión alterada de coactivadores o corepresores de AR
- 5) Activación alternativa de la cascada de señalización de andrógeno que facilite la proliferación e inhiba la apoptosis, incluso en la ausencia de andrógenos y el AR. (Feldman & Feldman, 2001)

- 6) Presencia de isoformas de AR que son andrógeno independiente, como procesos proteolíticos del receptor o empalme alternativo donde no se presenta el dominio de unión a ligando (LBD) (Devlin & Mudryj, 2009).
- 7) John Isaacs en 1999 postuló que una subpoblación de células epiteliales tumorales andrógeno-independientes existen desde antes del tratamiento, por lo tanto la terapia de ablación de andrógenos no afecta su tasa de proliferación y muerte. De acuerdo a esta teoría, en esta terapia, las células dependientes de andrógenos son eliminadas y las células madre epiteliales malignas andrógeno-independiente, permanecerán viables. Estas células continúan proliferándose y finalmente resultan en la recaída de la enfermedad y de CPRC (Feldman & Feldman, 2001).

Tabla 2. Vías por las que se lleva al CPRC.

	Vía	Dependencia a ligando	Dependencia al AR	Mecanismos
1	Hipersensibilidad de AR	Andrógeno dependiente.	AR dependiente	Amplificación de AR, sensibilidad del AR, incremento de DHT.
2	AR promiscuo	Pseudo-andrógenos, antagonistas de andrógenos, corticoesteroides.	Dependencia a un mutante del receptor	Disminución de la especificidad del receptor, estimulación ilícita por moléculas no androgénicas, flutamida (antagonista que actúa como agonista).
3	Ruta alterna	Andrógeno independiente, ligando independiente.	AR dependiente	PTEN mutante, HER-2 amplificado, PI3K y MAPK activados.
4	Expresión alterada de coactivadores y corepresores	Andrógeno independiente.	AR dependiente	Sobreexpresión de coactivadores y disminución de la expresión de corepresores.
5	Activación de vías alternativas de AR	Andrógeno independiente.	AR independiente	Vías de señalización de supervivencia paralelas o alternativas, sobreexpresión de BCL2, activación de otros oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores.
6	Isoformas de AR	Andrógeno independiente.	AR dependiente	Splicing alternativo sin presencia del LBD, procesos proteolíticos del receptor.
7	Tipo celular andrógeno independiente	Andrógeno independiente.	AR independiente	Células madre epiteliales malignas.

(Modificado de Feldman & Feldman, 2001)

. Además de los mecanismos descritos, se sabe que la terapia de ablación androgénica también contribuye al incremento de diferenciación neuroendócrina (NED) en cáncer de próstata (Ismail A, Landry, Aprikian, & Chevalier, 2002).

2.5. DIFERENCIACIÓN Y TRANSDIFERENCIACIÓN NEUROENDÓCRINA EN CÁNCER DE PRÓSTATA

La diferenciación es la restricción progresiva del desarrollo potencial de las células y el incremento de la especialidad en la función que lleva a la formación de células especializadas, tejidos y órganos. El término de Diferenciación Neuroendócrina (NED, por sus siglas en inglés) en cáncer de próstata se refiere a la presencia de células NE dispersas individualmente o en pequeños nidos en los adenocarcinomas prostáticos convencionales (Sun, Niu, & Huang, 2009). Estas células NE promueven un cambio irreversible de un tipo de células diferenciadas a otro mediante la transdiferenciación, donde hay un cambio en el fenotipo y hay modificaciones discretas en la programación de la expresión de ciertos genes (Shen, Burke, & Tosh, 2004).

La transdiferenciación neuroendócrina es un mecanismo donde un tipo celular diferenciado se convierte a otro tipo de células diferenciadas sin pasar a través de un estado pluripotente o tipo celular progenitor. Esta transdiferenciación se da mediante la regulación a la baja de sus propios genes específicos celulares y la activación de los genes específicos del otro tipo celular; a través de este mecanismo puede cambiar a otro linaje celular (Jopling, Boue, & Belmonte, 2011; Xu y col., 2014).

Como se mencionó, en la próstata normal, las células NE aparentemente están involucradas en la regulación del crecimiento de las células epiteliales y la diferenciación en una manera andrógeno independiente. En carcinoma de próstata, la población de células NE se incrementa, lo que se relaciona con la progresión tumoral, pobre pronóstico y la etapa hormono refractaria. El papel de las células NE en la progresión de cáncer de próstata se ha demostrado por el hecho de que esas células expresan y secretan una variedad de neuropéptidos

que tienen efectos mitogénicos en células de cáncer adyacentes, lo que contribuye a la proliferación de células de cáncer (Yang y col., 2009).

Aunque el origen de las células NE y el mecanismo molecular de enriquecimiento celular NE durante la progresión del cáncer de próstata aún no han sido dilucidados por completo, existe evidencia (*in vitro*, *in vivo* y análisis de muestras clínicas), que indica que las células de cáncer de próstata llevan a un proceso de transdiferenciación para convertirse en células parecidas a las NE, las cuales adquieren un fenotipo NE y expresan marcadores NE (Yuan, Veeramani, & Lin, 2007).

Hay estudios que revelan que las células parecidas a las NE, o NE-like, presentan propiedades bioquímicas similares a las células NE de una próstata normal, como la expresión de marcadores NE y la falta de AR y APE. Estos reportes también sugieren diferencias existentes entre cáncer de próstata con fenotipo neuroendócrino (CaP NE-like) y las células NE normales, las cuales están resumidas en la Tabla 3 (Yuan y col., 2007).

Tabla 3. Diferencias y similitudes entre células NE normales y células NE-like.

Características	Células NE normales	Células NE-like
Diferencias	<ul style="list-style-type: none"> - Expresión de marcadores celulares basales - No agresivas - No expresa Bcl-2 - No expresa AMACR 	<ul style="list-style-type: none"> - Expresión de marcadores luminales secretores - Altamente agresivas - Expresa Bcl-2 - Expresa AMACR
Similitudes	<ul style="list-style-type: none"> - No expresa AR y APE - Presenta efectos autocrino/paracrino - Actividad proliferativa baja - Morfología tipo neuronal - Expresión de marcadores NE (NSE, CgA, CgB, Seretonina, PTHrP, NT, GRP) 	

NSE, Enolasa no específica; Cga, cromogranina A; CgB, cromogranina B; PTHrP, proteína relacionada con la hormona paratiroidea; NT, neurotensina; Bcl-2, proteína 2 de célula B de linfoma; AMACR, alfa-metilacil Co A racemasa (Yuan y col., 2007).

Aunque las características NE se han detectado en el 4% de los pacientes con cáncer de próstata, se estima que del 40-70% de los CPRC adquieren NED. Por otra parte, hay estudios que indican que el desarrollo de NED conlleva a una fase más agresiva del cáncer a través de la secreción y producción de neuropéptidos (Hu, Ippolito, Garabedian, Humphrey, & Gordon, 2002) que permiten el crecimiento y supervivencia de células andrógeno independientes vía paracrina, contribuyendo a la metástasis y al crecimiento del tumor resistente a la castración (Yang y col., 2009).

En experimentos previos, se han utilizado modelos animales para definir las características moleculares de las células NE prostáticas. El grupo de Hu y colaboradores en el 2002 crearon un modelo murino transgénico que utiliza elementos reguladores del gen criptidina 2 (Defcr2, CR2) para expresar el antígeno T largo del virus del simio 40 (SV40 TAg) en células NE prostáticas de ratón. Los ratones con el transgen CR2-SV40 Tag desarrollaron neoplasia prostática intraepitelial (precursor del cáncer de próstata) a las 8 semanas de edad (1 semana después del comienzo de la expresión de TAg) y progresó rápidamente de la semana 12 a la 16. La mayoría de los ratones murieron a los 6 meses con metástasis en nódulos linfáticos regionales, hígado, pulmón, cerebro y hueso, y observaron una amplificación de células NE en los tumores primarios (Hu, Ippolito, Garabedian, Humphrey, & Gordon, 2002).

De los tumores de los ratones transgénicos del grupo de Hu, se obtuvo la línea celular PNEC, la cual presenta procesos similares a las neuritas y expresan una variedad de productos que también producen las células NE de próstata de los tumores (Ippolito y col., 2005, 2006). Posteriormente realizaron análisis de microarreglos de expresión de los tumores primarios y de la línea celular, obtenidas por dicho grupo, en donde encontraron que la ácido glutámico descarboxilasa 1 (Gad1) está incrementada. Esta enzima es responsable de la conversión del ácido glutámico a ácido gamma aminobutírico (GABA), el mayor inhibidor neurotransmisor del SNC. Tanto GABA como Gad1 se habían descrito previamente en células NE de estómago y páncreas de rata, y se ha descrito que

regula la secreción de neuropéptidos como Somatostatina, Gastrina, y Bombesina, (Weigert, Schepp, Haller, & Schusdziarra, 1998).

2.6. NEUROTRANSMISORES Y NEUROPEPTIDOS ASOCIADOS A CÁNCER DE PRÓSTATA

2.6.1. ÁCIDO GAMMA AMINO BUTÍRICO (GABA)

El Ácido Gamma Amino Butírico (GABA) es el mayor neurotransmisor inhibitorio en mamíferos y es sintetizado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (EC 4.1.1.15). Una vez liberado GABA, éste interacciona con receptores específicos. A la fecha se han caracterizado dos tipos de receptores: 1) los receptores ionotrópicos ($GABA_A$ y $GABA_c$), canal dependiente de ligando, y los receptores metabotrópicos ($GABA_B$) acoplados a las proteínas G. (Mendoza Pati. o, 2008)

Los receptores $GABA_A$ son glucoproteínas heteropentaméricas constituidas por la combinación de subunidades polipeptídicas múltiples. Se han descrito siete clases de subunidades polipeptídicas (α , β , γ , δ , ϵ , θ y ρ)(Alfaro, n.d.). La forma más frecuente de receptores $GABA_A$ están constituidos por cinco subunidades (2α , 2β y γ), como se informó previamente, este receptor está acoplado al canal de cloro (receptor canal dependiente de ligando), su interacción con dicho canal incrementa la conductancia al cloro, lo que da lugar a una hiperpolarización que determina un potencial postsináptico inhibitorio (PPSI). En contraste, el receptor $GABA_B$, es un receptor metabotrópico heterodímero ($B1$ y $B2$) acoplado a la proteína G que inhibe a la adenilciclasa, la formación de inositol trifosfato (IP3) y, a su vez inhibe la entrada de Ca^{2+} y facilita la salida de K^+ de la célula. El agonista del receptor $GABA_B$ es el Baclofen, fármaco de utilidad como relajante muscular (Alfaro, s/f; Mendoza Patiño, 2008; Padgett & Slesinger, 2010).

GABA puede funcionar como factor trófico durante el desarrollo del sistema nervioso, al controlar la proliferación, migración, diferenciación y muerte celular. Por otra parte, se ha encontrado que muchos tejidos no neuronales contienen receptores GABA, donde tienen un rol en el desarrollo y maduración de tejidos fuera del sistema nervioso, como en las células endócrinas el estómago y en las

células beta del páncreas (Abdul, Mccray, & Hoosein, 2008; Azuma, y col., 2003; Hu, Ippolito, Garabedian, Humphrey, & Gordon, 2002).

Se ha comprobado que GABA participa en la regulación de la motilidad intestinal al estimular la contracción de músculos intestinales; activando así la liberación de acetilcolina de las neuronas colinérgicas vecinas. También se ha visto que regula las funciones gástricas endócrinas y exócrinas. Recientemente GABA y GAD han sido localizadas en las fibras nerviosas de la mucosa gástrica y capas de submucosa, así como en las células epiteliales de las glándulas gástricas. Específicamente se han localizado al receptor GABA_A en las células epiteliales del cuerpo gástrico y el antro en modelos animales. Al estimular este receptor con un agonista, además de estimular la secreción ácida del estómago, se estimula la liberación de gastrina y bombesina, e inhibe la secreción de somatostatina de la mucosa antral (Weigert, Schepp, Haller, & Schusdziarra, 1998).

En cáncer de próstata, GABA actúa como un factor de promoción de metástasis, ya que se ha encontrado que en pacientes con cáncer de próstata metastásico los niveles de GABA y GAD son mayores comparado con pacientes sin metástasis o HPB. Por otra parte, se ha reportado que GABA, al activar el receptor de GABA_B, eleva la habilidad invasiva de la línea celular de cáncer de próstata C4-2 al incrementar la producción de metaloproteinasas (Abdul, Mccray, & Hoosein, 2008). Mediante técnicas inmunohistoquímicas de tumores del modelo del ratón transgénico de Hu y colaboradores, se detectó que más del 80% de las células NE de la próstata presentan GABA, mientras que los receptores de GABA_A y GABA_B se presentan en las células secretoras (Hu y col., 2002). Esto indicaría que podría existir un mecanismo de comunicación paracrina entre las células NE transformadas y las células normales secretoras durante la tumorigénesis (Hu y col., 2002; Ippolito y col., 2005).

2.6.2. NEUROPEPTIDOS

Los neuropéptidos son moléculas, que además de tener una función como neurotransmisor o neuromodulador en el sistema nervioso, son hormonas que pueden ser liberadas por células no neuronales que tienen función periférica como

factores paracrinos y endocrinos (Heasley, 2001). Estas moléculas han sido identificadas como factores de crecimiento potenciales de tipo paracrino y autocrino en cáncer de pulmón, gastrointestinal, pancreático, cerebro y próstata en el humano (Rozenfurt, 2002; Yang y col., 2009).

En el cáncer de próstata, se ha demostrado que los neuropéptidos promueven el crecimiento celular, migración y expresión de proteasa en células PC3, así como andrógeno independencia en células LNCaP. Sin embargo, su efecto biológico en cáncer de próstata no ha sido explicado claramente. Se ha reportado anteriormente que las células con NED secretan un largo número de neuropéptidos, entre los cuales se incluyen el péptido liberador de gastrina (GRP), neurotensina, serotonina, calcitonina, la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) (Cindolo, Cantile, Vacherot, Terry, & de la Taille, 2007). Estos neuropéptidos poseen un amplio rango de actividades celulares asociadas con la proliferación tumoral, transformación y metástasis. Por lo tanto, se ha hipotetizado que estas células promueven el desarrollo y crecimiento del CPRC a través de la secreción de neuropéptidos que inducen el crecimiento de células tumorales periféricas (Li y col., 2009; Wright y col., 2003).

2.6.2.1. Péptido liberador de gastrina (GRP)

GRP es un péptido de 27 aminoácidos amidado (UniProt, P07492), derivado de la molécula precursora proGRP1-125, y es el equivalente mamífero de la bombesina, que fue descubierta por primera vez en la piel de ranas. En general, GRP estimula la liberación de hormonas gastrointestinales, la secreción y crecimiento de la mucosa gastrointestinal y pancreática, así como la motilidad intestinal. En adición, GRP es un factor trófico potencial del tracto gastrointestinal y del páncreas, además se han encontrado evidencias de que contribuye al desarrollo de cáncer gástrico (Thomas, Hellmich, Townsend, & Evers, 2003). Existen tres receptores descritos para la familia de este neuropéptido en mamíferos, los cuales son GRP-R, receptor de neuromedina B y receptor tipo 3 de bombesina, de los cuales el más importante es el GRP-R.

En la próstata normal GRP-R se expresa a niveles muy bajos; sin embargo, se ha detectado la expresión elevada de GRP y de GRP-R en pacientes con cáncer de próstata, principalmente en CPRC y metástasis (Ischia, Patel, Bolton, Shulkes, & Baldwin, 2014). Además, se sabe que la línea celular de cáncer de próstata humana PC3 de metástasis a hueso, la cual es altamente agresiva y andrógeno independiente, expresa 500 veces más receptores de GRP que LNCaP, la cual es una línea celular andrógeno dependiente. Por lo tanto se cree que está involucrado en mecanismos de resistencia a la castración y que confiere motilidad e invasividad en cáncer de próstata (Ischia y col., 2014; Yang y col., 2009).

2.7. ANTECEDENTES DIRECTOS

Anteriormente se ha descrito que la línea celular sensible a andrógenos LNCaP, proveniente de cáncer de próstata metastásico a nódulo linfático, presenta la capacidad de transdiferenciarse a un fenotipo similar al NE (NE-like) cuando son sometidas a un ambiente pobre de andrógenos. Estas células adquieren un fenotipo neuronal, el cual está descrito como la presencia de prolongaciones tipo dendritas, gránulos citoplasmáticos y la expresión de múltiples marcadores como enolasa no específica (NSE), proteína fibrilar acídica de la glia (GFAP), cromogranina A (CgA), gastrina y neurotensina (NTS) (Yuan y col., 2006, 2007; Zelivianski y col. 2001). Este fenómeno se observa más elevado mientras más prolongado sea el tiempo de la terapia de ablación androgénica (Ito y col., s/f) y se ha descrito *in vitro* e *in vivo* en humanos y modelos animales.

Replicando la metodología establecida por Wright en el 2003 (Wright y col., 2003), Solórzano y colaboradores (Solórzano y col., en proceso) reportan que el silenciamiento del AR en LNCaP (mediante un siRNA específico contra AR) (Figura 9) induce la transdiferenciación NE, que se observa cuando las células adquieren una morfología NE-like y expresan marcadores NE (Wright y col., 2003; Yuan y col., 2007).

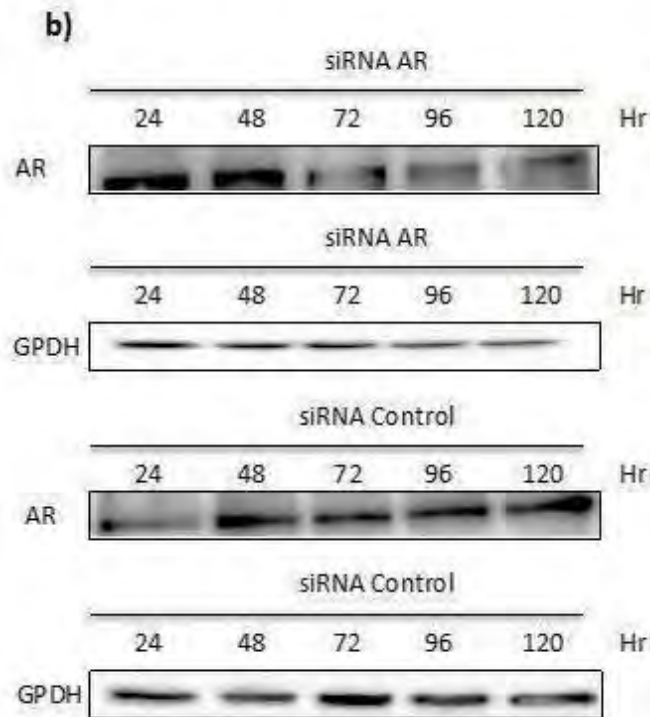
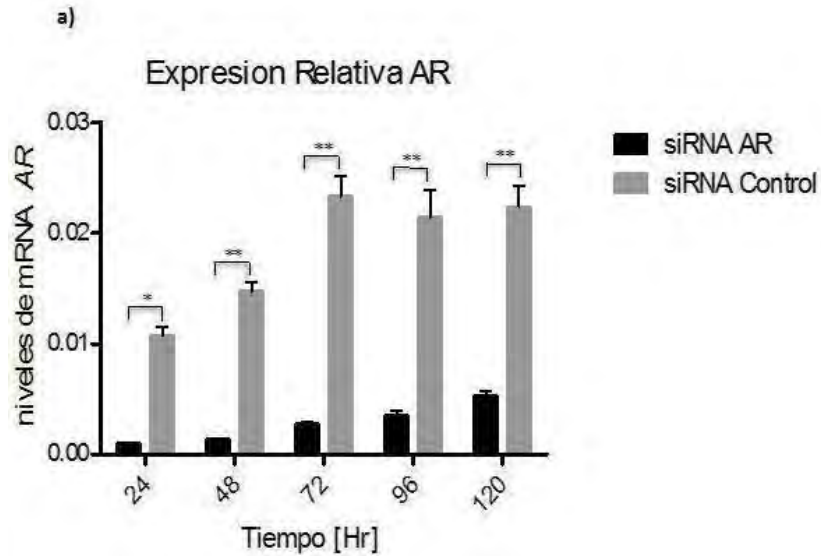


Figura 9. Silenciamiento de AR en células LNCaP mediante un siRNA contra el AR. (a) Análisis de RT-qPCR, AR se logró silenciar a partir de las 24 hasta las 120 h. Las barras indican \pm SEM; * $P < 0.0001$, ** $P < 0.0005$. (b) Análisis por Western Blot para medir los niveles de proteína de AR en células siRNA AR, dónde se ve una disminución a las 72 y 96 horas. Realizando triplicados biológicos. (Modificado de Solórzano, 2017)

Entre los marcadores NE que se evaluaron mediante RT-qPCR para comprobar que este modelo es exitoso, se encuentran NTS y semaforina de transmembrana (SEMA6A), los cuales se incrementaron significativamente a partir de las 72 y 48 horas postransfección respectivamente. En el mismo modelo, se midió la presencia de GABA y AR mediante inmunofluorescencia, (Figura 10). A las 96 horas después de la transfección, además de un cambio morfológico, GABA se encuentra a su máximo nivel y AR está completamente silenciado. De la misma manera se observó la formación de vesículas de GABA en estas células.

Para tratar de elucidar la participación de GABA como posible modulador en la liberación de neuropéptidos en este modelo NE, Solórzano y colaboradores encontraron que el tratamiento con un agonista del receptor de GABA_B aplicado durante 12 h a células con fenotipo NE (aquellas donde se silenció AR por 96 h) incrementa significativamente la secreción de GRP, como se ve en la Figura 11 (a) donde se utilizó la técnica de ELISA para medir la secreción del neuropéptido en el medio (Medio Condicionado).

Se comprobó que la secreción previamente mencionada era propia del efecto del fármaco en el receptor de GABA_B al combinar el tratamiento con un antagonista de dicho receptor. Como se observa en la Figura 11 (b), hay una clara disminución de la secreción de GRP. Esto expone, por primera vez, que existe una posible función de GABA y GABA_B en Cáncer de Próstata y la secreción de GRP, el cual tiene un papel potencial en el desarrollo de las características agresivas en el cáncer de próstata con diferenciación neuroendócrina.

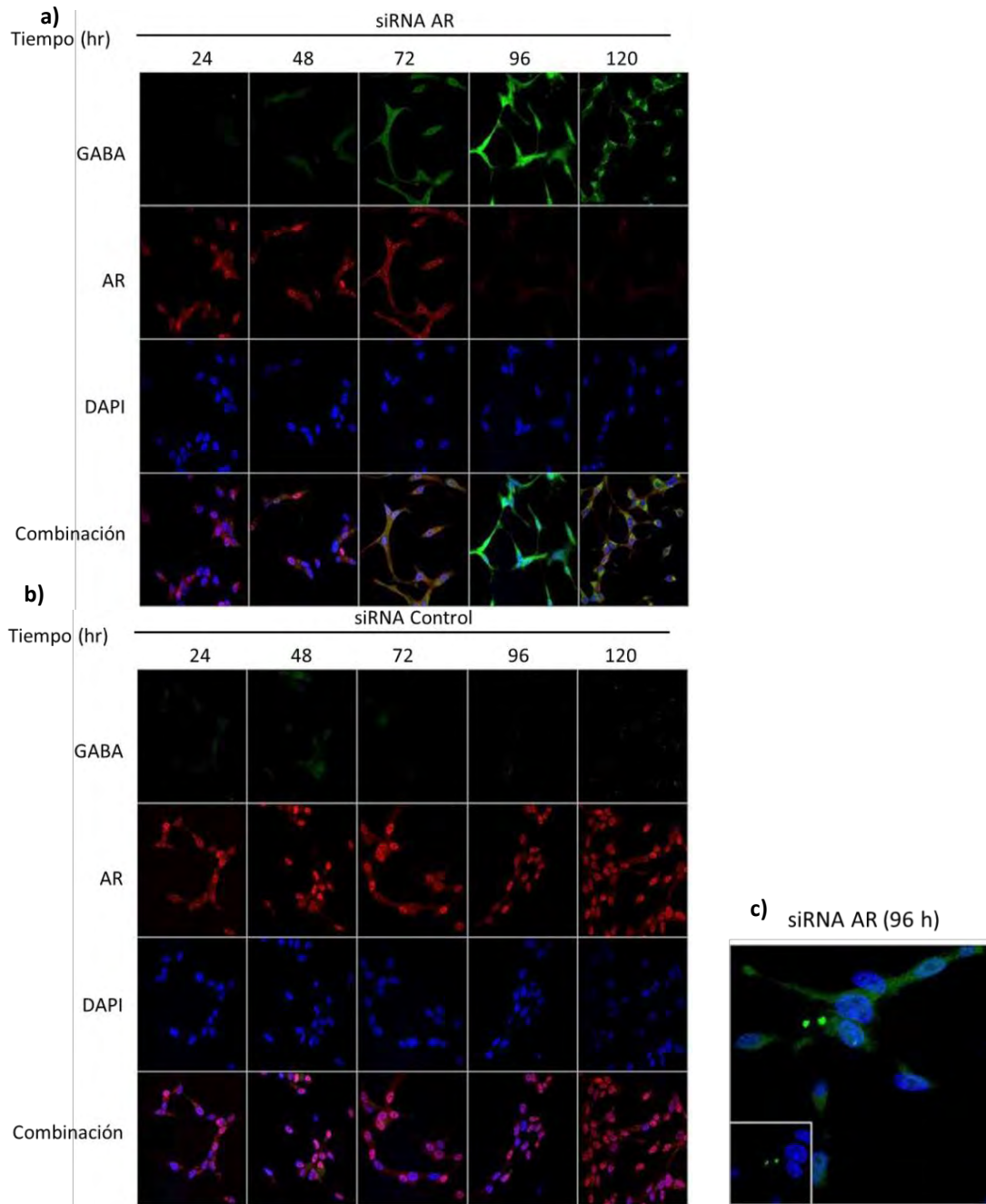


Figura 10. Inmunofluorescencia para examinar los niveles de GABA y AR en células LNCaP con el AR silenciado y células control en un curso temporal. Se observa GABA e color verde, AR rojo, y DAPI de azul, el cual tiñe al núcleo. Los niveles de GABA se incrementan en las células con el AR silenciado. (a) Además de observarse cambios morfológicos, las células formaron protuberancias parecidas a axones principalmente cuando la proteína de AR desaparecía y GABA incrementaba sus niveles. (b) No se encuentra presencia de GABA en células control, los niveles de AR se mantuvieron constantes. Realizando triplicados biológicos. (c) Se observó la formación de vesículas de

GABA en el citoplasma de células después de 96 horas de silenciar el AR (Solórzano, 2017).

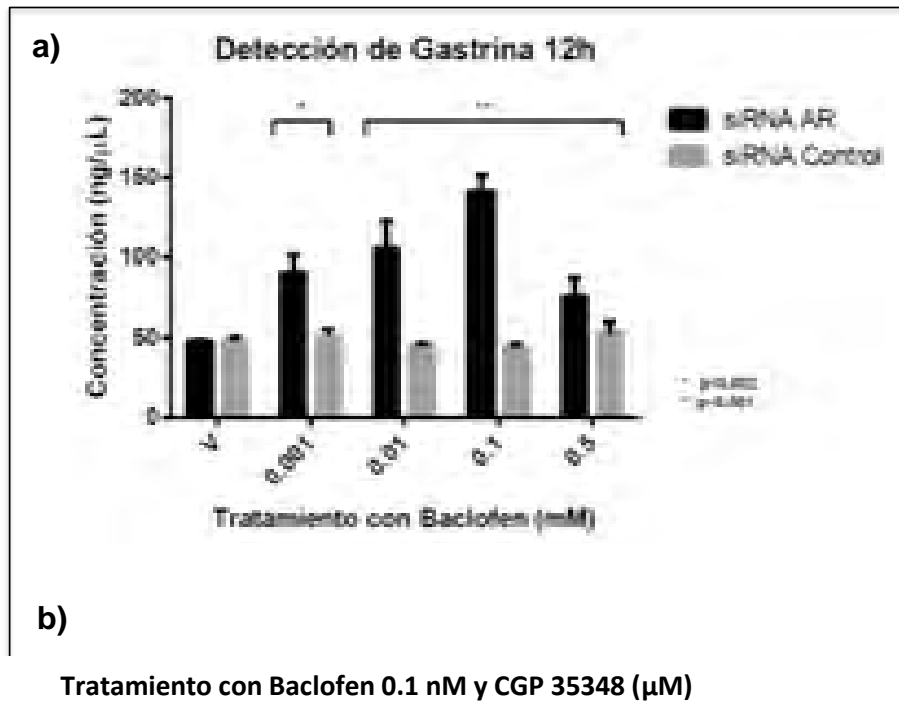
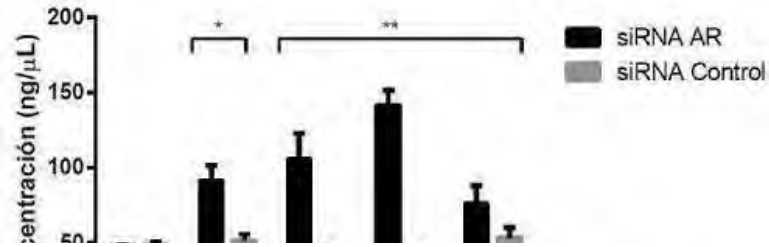


Fig
cél
sec
P<
a d
cor
Re:

En
act
inv
Pa

determinar primeramente si dicha molécula *per se* contribuye en la agresividad de

la enfermedad. De esta manera se determinará si las células con diferenciación neuroendócrina actúan de manera parácrina al secretar moléculas que confieren dichas características que se encuentran en etapas más agresivas del cáncer.

La concentración del neuropéptido GRP sintetizado utilizado en la mayoría de los experimentos es de 5nM, lo que es equivalente al 20% del encontrado en el Medio Condicionado (Figura 11), y, al mismo tiempo, es la utilizada para dichos ensayos de acuerdo a la literatura encontrada (Bologna, Festuccia, Muzi, Biordi, & Ciomei, 1990; Festuccia y col., 1998; Larrán y col., 1996; Levine y col., 2003; Osamu Nagakawa, Ogasawara, Murata, Fuse, & Saiki, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad funcional de GRP en células de cáncer de próstata.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si GRP incrementa la capacidad proliferativa de células de Cáncer de Próstata Andrógeno-Independiente.
- Evaluar si GRP tienen un papel en la invasión de células de Cáncer de Próstata dependientes o independientes de andrógenos.
- Determinar si GRP funge como un agente promotor de la migración de células de Cáncer de Próstata Andrógeno-Independiente y Dependiente.

4. HIPÓTESIS

Si las células de CPRC secretan GRP, entonces se determinará la participación parácrina de GRP en la proliferación, invasión y migración celular asociado a la agresividad del Cáncer de próstata con diferenciación neuroendócrina.

5. METODOLOGÍA

5.1. CULTIVO CELULAR

Se utilizaron líneas celulares LNCaP y PC3 obtenidas del ATCC (*American Type Culture Collection*), las cuales derivan de metástasis de carcinoma prostático a nódulo linfático supraventricular y hueso respectivamente. Las células fueron mantenidas en medio RPMI, en el caso de LNCaP, y en DMEM para PC3, suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) a 37°C y 5% de CO₂.

5.2. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Se realizó el ensayo de proliferación celular mediante el kit de Citometría de Flujo con BrdU (*Affymetrix*®). En placas de 6 pozos se sembraron 100,000 células con medio DMEM blanco (sin el indicador de pH, rojo de fenol) al 10% de SFB. A las 24 horas se realizó el tratamiento de 5nM de GRP sintetizado (*GenScript*®) (Equivalente al 20% de la concentración de GRP en el MC) en medio blanco y suero Charcoal al 5%, repitiéndolo cada 24 horas. 24, 48, 72 y 96 horas después se realizó lo siguiente:

1. Se lavaron las células y se les adicionó 10 µM de BrdU en medio blanco al 10% de SFB. Las placas se incubaron por 2 horas a 37°C y se cuantificaron 200,000 células de cada replicado con ayuda de un hematocitómetro, para homogenizar las condiciones y que el número celular no fuera un factor de variabilidad. Las células se centrifugaron a 1700 rpm por 5 minutos y se recuperó el botón.
2. Posteriormente las células se incubaron por 20 minutos en oscuridad en Buffer de tinción de BrdU (500 µL). Se lavaron las células con Buffer de Tinción para Citometría de Flujo (2mL), se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante.
3. Las células se incubaron con DNasa I (60 µL) por 1 hora en oscuridad a 37°C, se lavaron dos veces con Buffer de Tinción para Citometría de Flujo (2 mL) y se centrifugaron en las mismas condiciones.

4. Al botón celular se le añadieron 4 μ L del anticuerpo anti-BrdU y se incubó por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Después de lavar las células y centrifugarlas nuevamente, el botón se resuspendió con 500 μ L de PBS y se leyó en el Citómetro BD FACSAria®.

Como control de la técnica se utilizaron células LNCaP tratadas con medio RPMI rojo con 10% de SFB (Control positivo) o con medio RPMI blanco con 5% de suero Charcoal (control negativo) por 24, 48, 72 y 96 horas. El procedimiento fue el mismo al anterior descrito. Para el control positivo se sembraron 80,000 células, para el control negativo 200,000 células, debido a que el control negativo prolifera menos que el control positivo, y para obtener el número celular establecido en la estandarización, se tuvo que sembrar un mayor número de éstas.

5.3. ENSAYO DE MIGRACIÓN POR HERIDA

1. Por triplicado, se sembraron 230,000 células LNCaP por pozo en placas de 6 pozos con recubrimiento de Poly-L-lisina en RPMI blanco al 10% SFB; o 100,000 células PC3 por pozo en placas de 12 pozos mantenidas en medio DMEM blanco al 10% de SFB.
2. Cuando el cultivo presentó un 90% de confluencia, se realizó una herida en el cultivo de forma vertical con una punta de 10 μ L. Se removió el medio y se lavó gentilmente con PBS. Posteriormente se adicionó el medio (RPMI o MEM blanco 1% SFB) con GRP sintetizado (GGTVLTKMYPRGNHC) a una concentración de 5, 8 nM, o vehículo (H_2O).
3. En el caso de LNCaP se tomaron fotografías a las 0, 8 y 24 hrs. Repitiendo el tratamiento cada 24 horas, se continuó recolectando imágenes hasta las 72 horas o el cierre la herida.
4. En el caso de PC3, se tomaron fotografías cada 3 horas hasta las 12 horas, repitiendo el tratamiento cada 12, se siguieron recolectando imágenes hasta las 34 horas.
5. Las fotografías se analizaron con ImageJ y el paquete "MRI-WHT"

5.4. ENSAYO DE INVASIÓN POR TRANSWELL

1. Para el ensayo de invasión, se colocaron 100 μL de Matrigel (*Corning*[®]) (a 1 mg/mL) en la cámara superior del inserto Transwell con poros de 8 μm y se dejó incubar a 37°C toda la noche para que polimerizara. En la Figura 12 se observa un diagrama del ensayo.

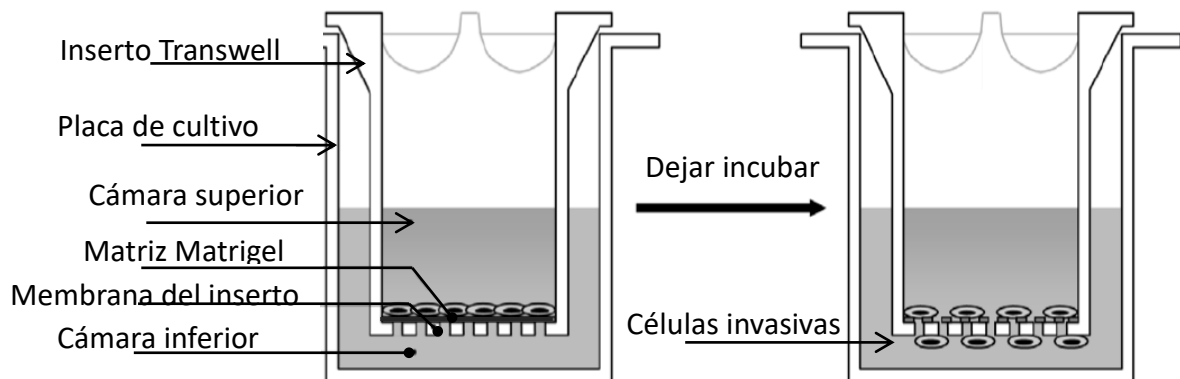


Figura 12. Diagrama del ensayo de invasión. Recuperado y modificado de la página www.gbo.com/bioscience (bioscience, 2005)

2. A la cámara inferior se adicionaron 700 μL de medio blanco libre de suero con GRP sintetizado a una concentración de 5nM. Como control negativo se utilizó el vehículo de la molécula (H_2O). En la cámara superior se sembraron 60,000 células en 200 μL de medio blanco libre de suero y las placas se incubaron a 37°C por 5 o 18 horas.
3. Se recuperaron los insertos y se lavaron con PBS. Posteriormente se fijaron las células con formaldehído (3.7%) por dos minutos, se lavaron los insertos sumergiéndolos en PBS dos veces y se permeabilizaron con metanol al 100% por 20 minutos.
4. Finalmente se tiñeron los insertos con cristal violeta al 0.5% por 15 minutos, se lavaron las membranas con PBS y se retiró el excedente de colorante con un hisopo. Se dejaron secar y se observaron al microscopio. Las células se contaron en ImageJ y se obtuvieron las gráficas correspondientes.

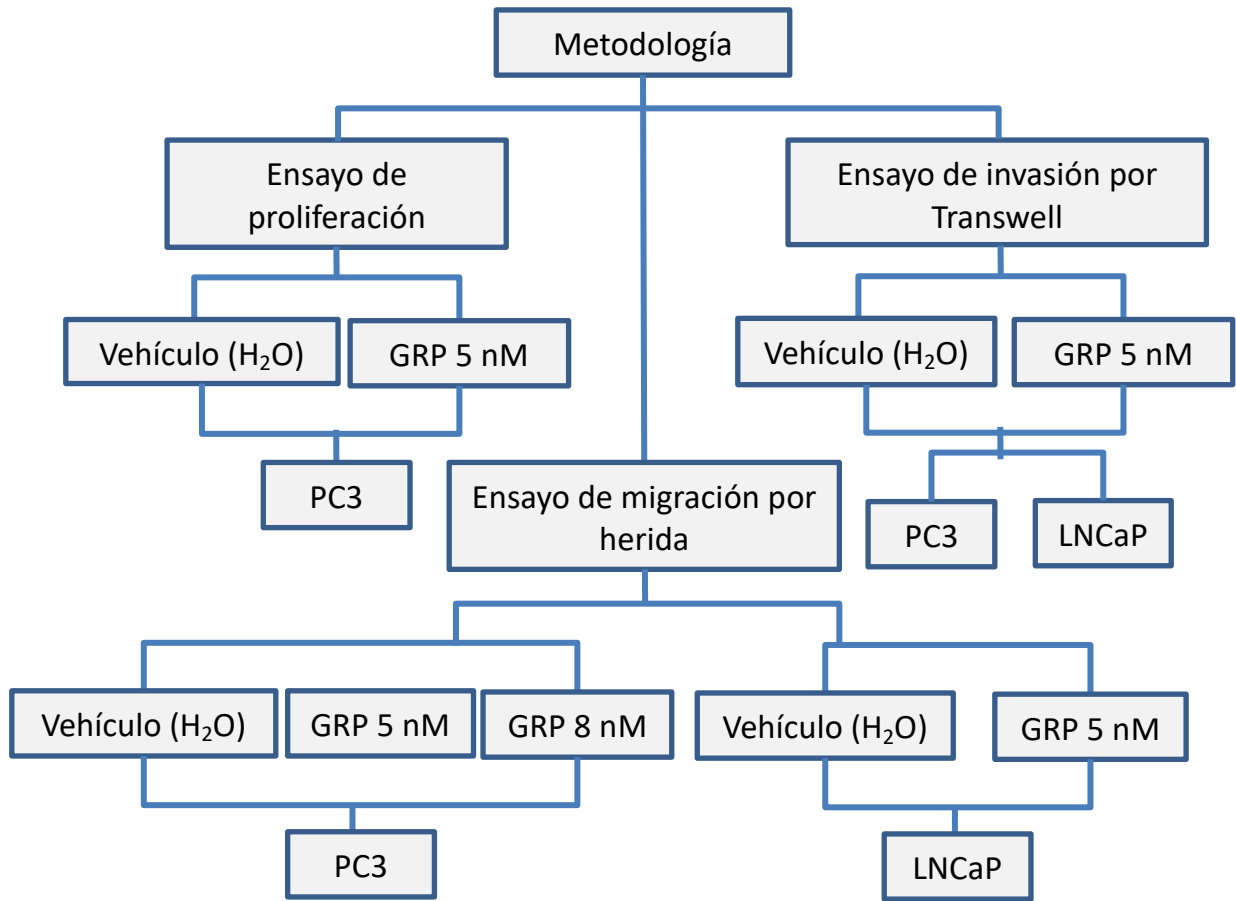


Figura 13. Metodología general empleada.

6. RESULTADOS

6.1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Para la estandarización de la técnica, como control positivo, se sembraron 80,000 células LNCaP mantenidas en medio RPMI rojo con 10% de SFB por 24, 48, 72 y 96 horas. Para el control negativo, se sembraron 200,000 células LNCaP en medio RPMI blanco con 5% de Suero Charcoal por 24, 48, 72 y 96 horas. Pasado el tiempo correspondiente, se cuantificaron 200,000 células, las cuales fueron incubadas con 5-bromo-2'deoxiuridina (BrdU), un análogo sintético de la timidina, el cual se incorpora en el nuevo DNA genómico sintetizado durante la fase S de la mitosis. Después de la desnaturalización del DNA, las células fueron teñidas con un anticuerpo Anti-BrdU conjugado a un fluorocromo (APC) y leídas mediante citometría de flujo. La incorporación de BrdU es equivalente a la cantidad de DNA sintetizado. Como se observa en la Figura 14, después de realizar un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), se encontró diferencia significativa entre el control positivo y el negativo de la técnica a todos los tiempos evaluados (* $P < 0.0001$). Lo que significa que la técnica funciona adecuadamente para evaluar la proliferación celular.

Posteriormente; para determinar si GRP incrementa la proliferación en células Andrógeno-Independiente, se sembraron 100,000 células PC3 mantenidas en medio DMEM blanco con 5% de Suero Charcoal y 5nM de GRP sintetizado por 24, 48, 72 y 96 horas. Como control negativo del experimento se utilizó el vehículo (H_2O) como el estímulo. En cada uno de los tiempos se cuantificaron 200,000 células y se realizó el procedimiento previamente descrito. Como se observa en la Figura 15, el porcentaje de células en proliferación no varía entre los tratamientos; es decir, no hay diferencia significativa en la proliferación celular de PC3 entre los tratamientos de vehículo y GRP a los tiempos evaluados; por lo que se puede concluir que GRP a 5 nM aparentemente no estimula la proliferación de PC3.

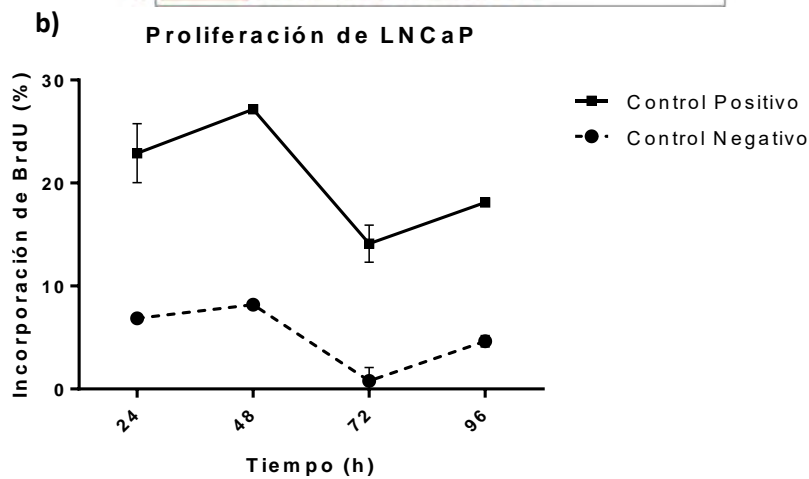
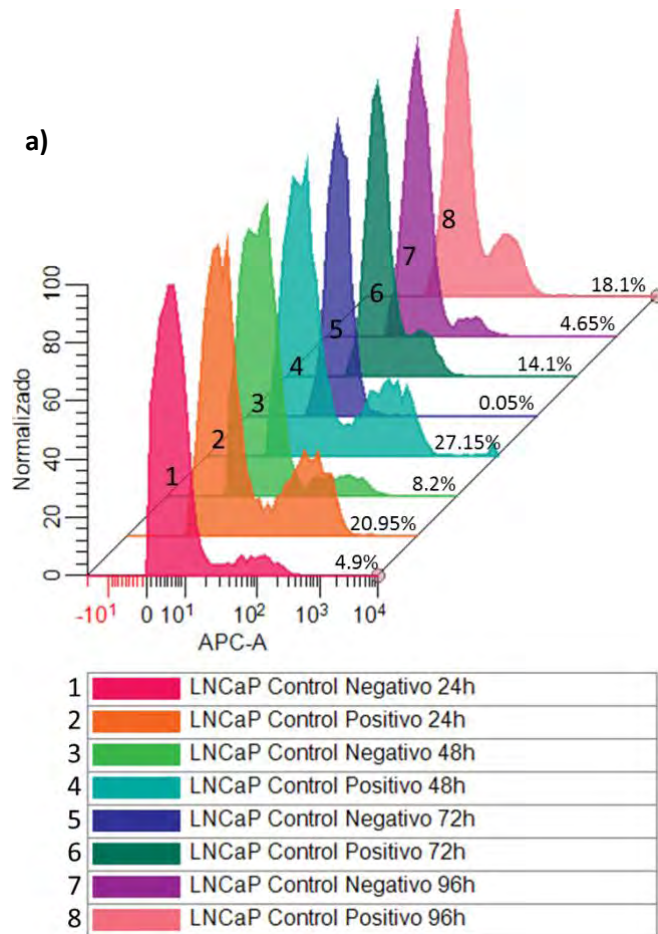


Figura 14. Estandarización de la técnica de proliferación por Citometría de Flujo mediante la detección de BrdU en células LNCaP. En la imagen (a) se observan los gráficos arrojados por el citómetro, correspondientes al control de la técnica. El primer pico representa a la población celular que no incorporó BrdU, por lo tanto, no dan una señal positiva a APC; el segundo pico representa a las células que incorporaron BrdU, dado por la señal de APC. Al lado de cada condición se observa el promedio del porcentaje de incorporación de BrdU. Cada condición se realizó por duplicado. (b) Representación gráfica del porcentaje de incorporación de BrdU a diferentes tiempos. (* $P < 0.0001$, ANOVA de dos vías).

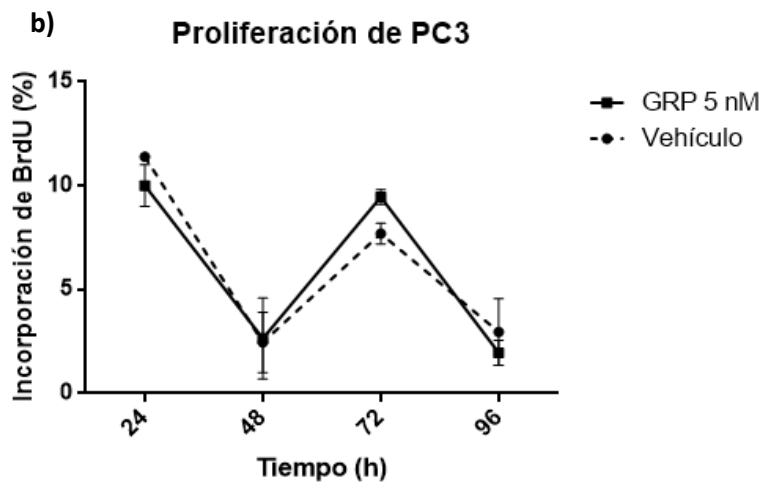
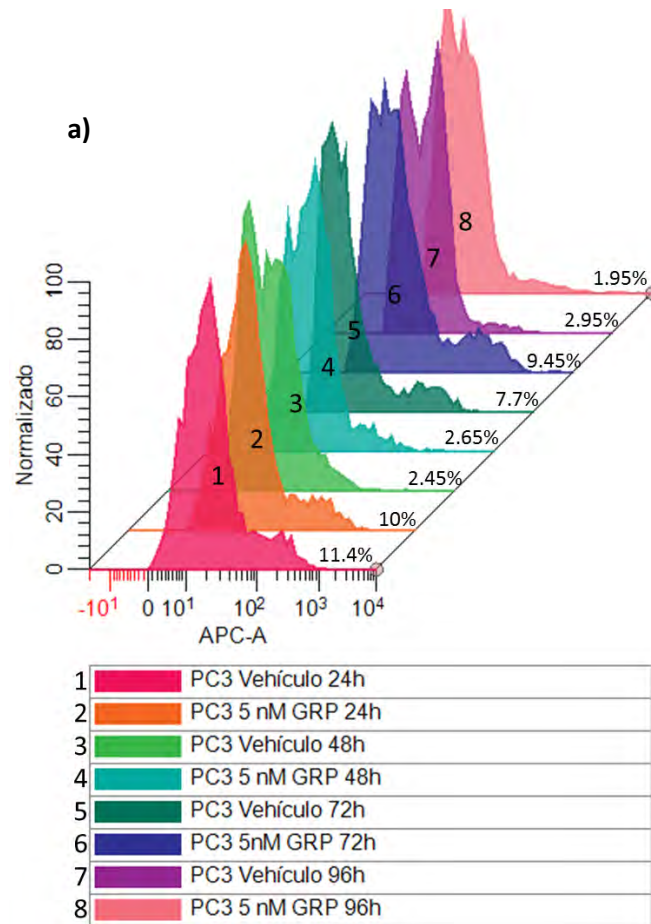


Figura 15. Proliferación de PC3 estimulada con GRP evaluada por Citometría de Flujo mediante detección de BrdU. En la imagen (a) se observan los gráficos arrojados por el citómetro. El primer pico representa a la población celular que no incorporó BrdU, por lo tanto, no dan una señal positiva a APC; el segundo pico representa a las células que incorporaron BrdU, dado por la señal de APC. Al lado de cada condición se observa el promedio del porcentaje de incorporación de BrdU. Cada condición se realizó por duplicado. (b) Representación gráfica del porcentaje de incorporación de BrdU a diferentes tiempos, el cual es directamente proporcional a la proliferación celular. ANOVA de dos vías, $\alpha=0.05$.

6.2. ENSAYO DE INVASIÓN POR TRANSWELL

Para el ensayo de invasión se sembraron 60,000 células en la parte superior de una cámara Transwell previamente recubierta con 100 μ L de Matrigel (1 mg/mL), en la cámara inferior se adicionaron 700 μ L de medio DMEM blanco libre de suero con GRP 5nM o 10.5 μ L de H₂O (vehículo). Las placas se incubaron por 5 horas, que, de acuerdo a la literatura (O Nagakawa y col., 1998), es el tiempo óptimo para observar la invasión de PC3 dada por GRP; sin embargo, se prolongó el experimento a 18 horas para determinar que el efecto dado fuera propio de la acción del péptido, sin que el factor tiempo influyera en los resultados. Pasado el tiempo, se obtuvieron los insertos, se fijaron y tiñeron. Posteriormente se tomaron fotografías en un microscopio estereoscópico (Leica®) y se analizaron por ImageJ.

En la Figura 16a se observan los insertos de las células que invadieron la membrana, a simple vista se puede distinguir que las células tratadas con GRP tienen una mayor capacidad invasiva que las tratadas con el vehículo en los dos tiempos evaluados. En la Figura 16b, se puede apreciar de manera gráfica el número de células que invadieron al otro lado de la membrana. Este número celular se obtuvo al cuantificarlas por ImageJ, donde se comprobó que GRP a una concentración de 5 nM incrementa la invasión de células PC3 tanto a las 5 (50 células del vehículo contra 1122 células del tratamiento con GRP) como a las 18 horas (2083 células del tratamiento del vehículo contra 3360 células del tratamiento con GRP) después del inicio del tratamiento. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA, *P \leq 0.001 GRP vs. Vehículo y **P \leq 0.0001 GRP vs. Vehículo), con lo que se concluye que GRP aparentemente tiene un papel en el incremento de la invasión de células PC3.

Dado la heterogeneidad de un tumor, en la etapa de progresión a CPRC por NED aún podrían existir células sensibles a andrógenos; por lo tanto, se evaluó la capacidad de GRP de incrementar la invasión de células Andrógeno-Dependientes. Para este experimento, se sembraron 60,000 células LNCaP en la cámara superior de un inserto Transwell y se realizó la misma metodología que la utilizada con las células PC3.

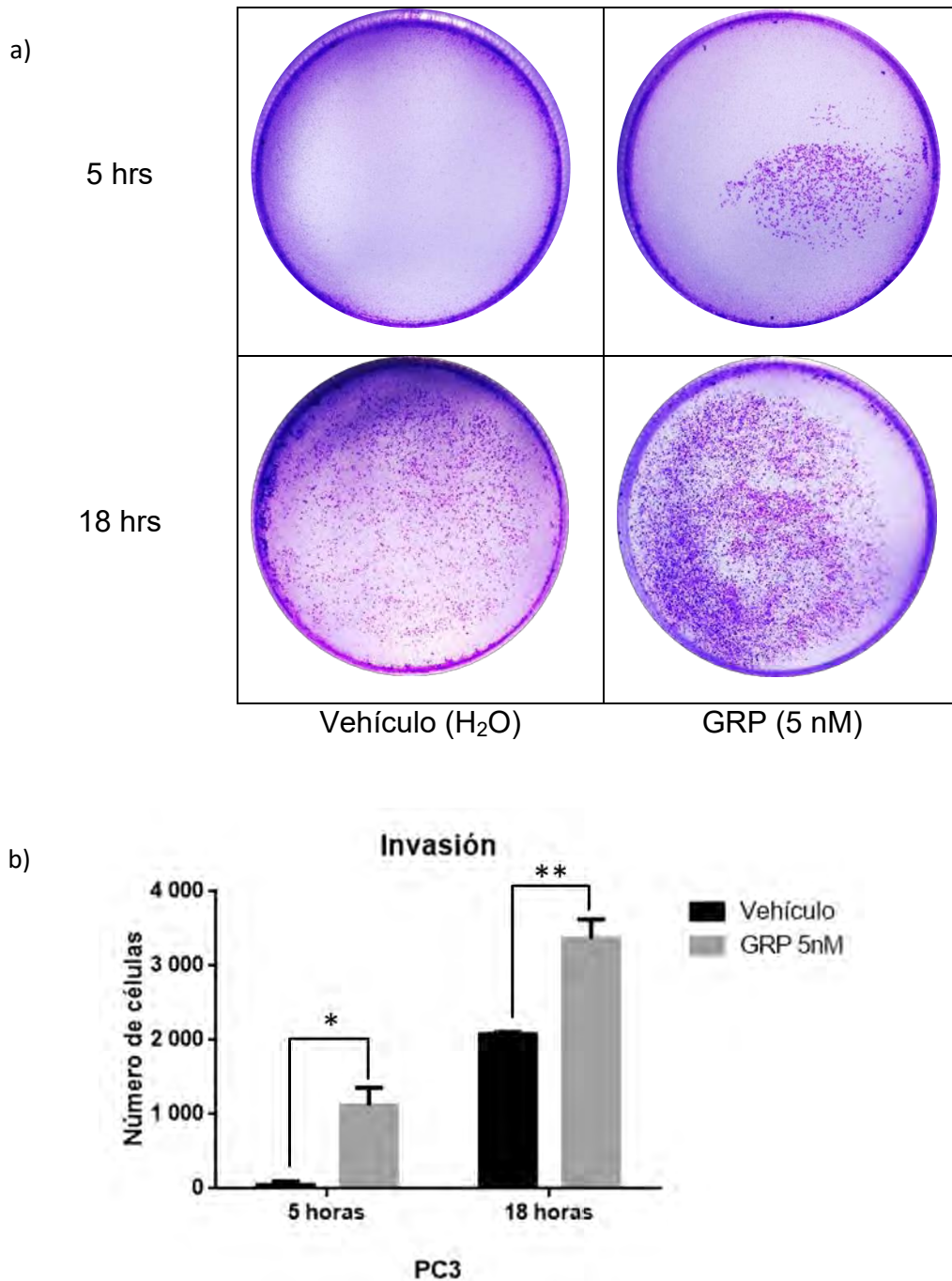


Figura 16. GRP induce la invasión de células PC3. (a) Imágenes de los insertos obtenidos de células PC3 que invadieron 5 y 18 horas después de ser tratadas con 5 nM de GRP o vehículo. (b) Representación gráfica del número de células que cruzaron la membrana, se observa que GRP a 5 nM incrementa significativamente la capacidad invasiva de PC3 tanto a las 5 como 18 horas después del inicio del tratamiento. (* $P \leq 0.001$ GRP vs. Vehículo y ** $P \leq 0.0001$ GRP vs. Vehículo, ANOVA de dos vías)

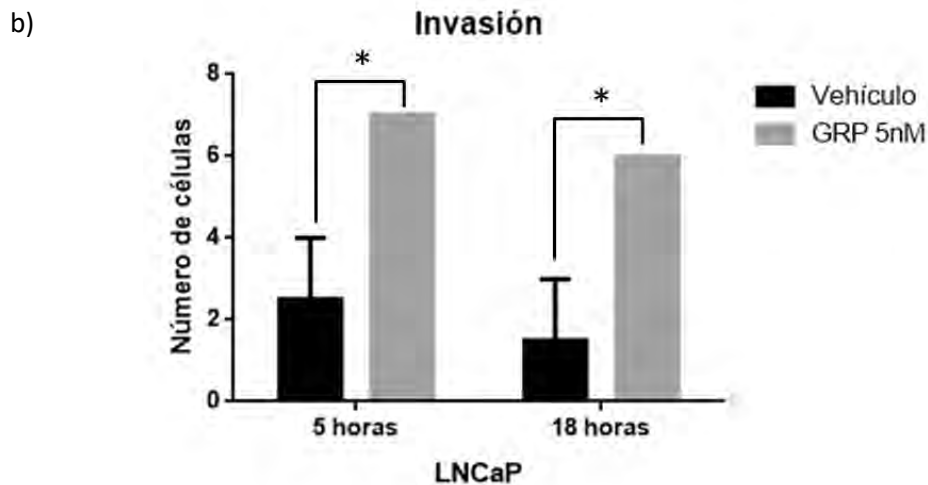
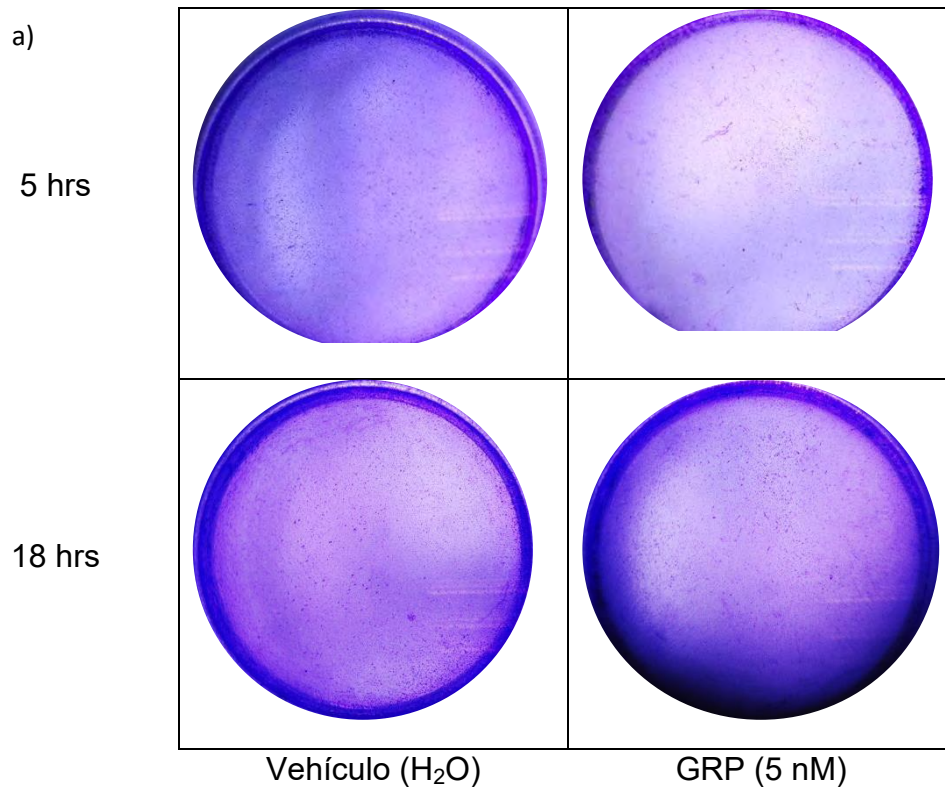


Figura 17. GRP induce la invasión de células LNCaP. (a) Imágenes de los insertos obtenidos de células LNCaP que invadieron 5 y 18 horas después de ser tratadas con 5 nM de GRP o vehículo. (b) Conteo de células invasivas mediante ImageJ. (c) Representación gráfica del número de células que cruzaron la membrana, se observa que GRP a 5 nM incrementa significativamente la capacidad invasiva de LNCaP tanto a las 5 como 18 horas después del inicio del tratamiento. (ANOVA de dos vías, * $P \leq 0.05$ GRP vs. Vehículo)

En la Figura 17 a se observan los insertos de los tratamientos con el vehículo o con GRP a 5 nM. A simple vista es difícil de diferenciar si el tratamiento con el

neuropéptido incrementa la invasión celular. Sin embargo, las células se cuantificaron mediante ImageJ y se realizó una representación gráfica del promedio de células invasivas, que se observa en el inciso b de la misma figura. El tratamiento con GRP 5 nM incrementa significativamente la capacidad invasiva de LNCaP 5 y 18 horas después del tratamiento, con un promedio de células de 2.5 en el vehículo contra 7 células del tratamiento con GRP, y 1.5 células en el tratamiento con vehículo contra 6 del tratamiento con GRP respectivamente (ANOVA, *P ≤ 0.05 GRP vs. Vehículo). Se concluye que GRP 5 nM puede incrementar significativamente la capacidad invasiva de células LNCaP Andrógeno-Independiente.

6.3. ENSAYO DE MIGRACIÓN

Para evaluar si GRP incrementa la migración de células Andrógeno-Independiente, se estandarizó el ensayo de herida, en donde se realiza una herida en un cultivo de células PC3 en monocapa con una confluencia del 90-95% con ayuda de una punta de 10 µL. Posterior a la realización de la herida, se realizó el tratamiento correspondiente en medio DMEM blanco al 1% de SFB con GRP a 5 u 8 nM, como control se utilizó el vehículo del neuropéptido (24 µL de H₂O). Se tomaron fotografías en un lapso de tiempo hasta las 34 horas, repitiendo el tratamiento cada 12 horas. Las imágenes fueron analizadas mediante ImageJ y el programa "MRI-WHT". Como se observa en la gráfica de la Figura 18, GRP incrementa significativamente la migración de PC3 a partir de las 32 horas post-tratamiento. (ANOVA, *P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01).

Posteriormente, se quiso determinar si GRP incrementa la migración de células Andrógeno-Dependiente, por lo tanto se realizó el ensayo de herida en LNCaP, en este caso solo se evaluó la concentración de 5nM, debido a que a mayores concentraciones, la solución de GRP estresó a las células, impidiendo la obtención de fotografías adecuadas para su análisis. En la Figura 19 se observa que GRP a 5 nM aparentemente no incrementa la migración de LNCaP.

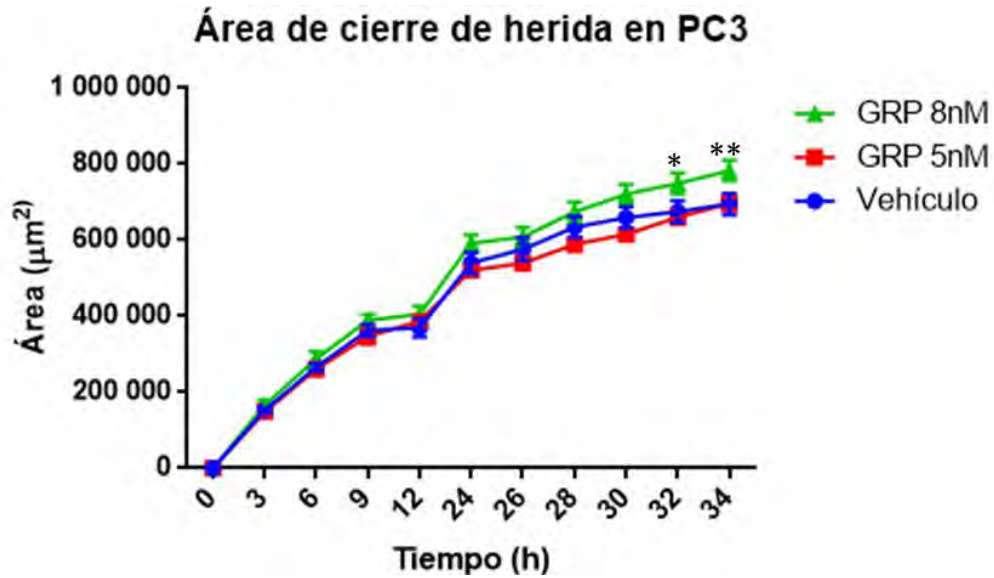


Figura 18. Migración de PC3 mediante ensayo de herida. Las células fueron tratadas con 5nM, 8nM de GRP o vehículo (H₂O) al momento de realizar la herida, se tomaron fotografías hasta las 34 horas y se analizaron mediante ImageJ. Se observa una disminución del área de herida, siendo ésta significativamente diferente en el tratamiento con 8nM de GRP contra el Vehículo a partir de las 32 horas. Las barras indican \pm SEM (ANOVA, *P \leq 0.05, ** P \leq 0.01).

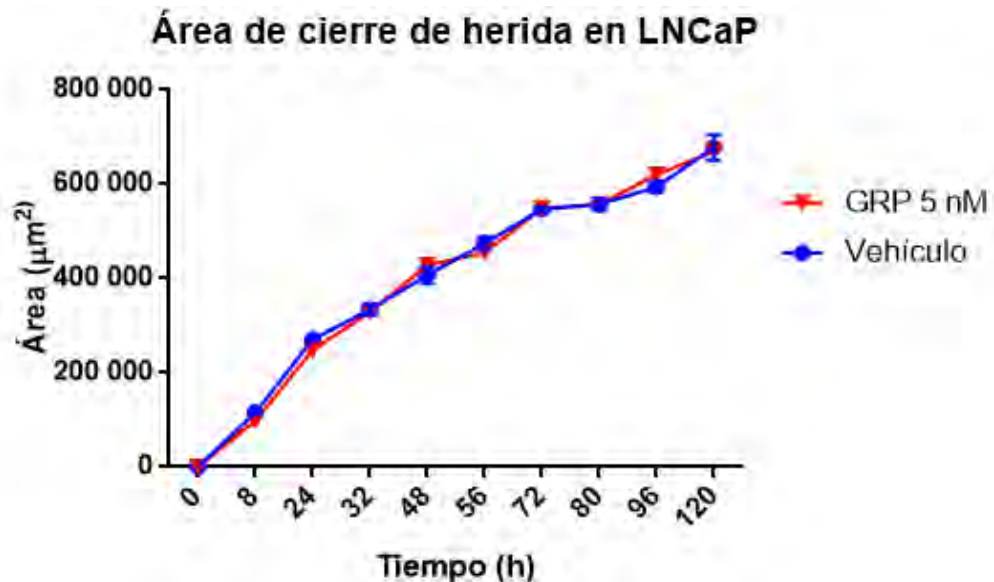


Figura 19. Migración de LNCaP mediante ensayo de herida. Las células fueron tratadas con 5 nM de GRP o vehículo (H₂O) al momento de realizar la herida. Se tomaron fotografías y se analizaron mediante ImageJ. No se encontró diferencia significativa a ningún tiempo (ANOVA, $\alpha=0.05$). Las barras indican \pm SEM.

7. DISCUSIÓN

En esta investigación se estandarizó el ensayo de BrdU por citometría de flujo para evaluar la proliferación celular, ya que es un método preciso en donde se mide directamente la síntesis de DNA. Antes de realizar las mediciones en las células PC3 con el agente mitogénico GRP, se estandarizó la técnica utilizando células LNCaP mantenidas en medio RPMI rojo al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (control positivo) y células LNCaP en medio RPMI blanco con 5% de suero Charcoal (control negativo).

El SFB es un suplemento usado en cultivo celular *in vitro* que tiene bajos niveles de anticuerpos y contiene factores de crecimiento favorables para la proliferación celular. Mientras que el Suero Charcoal, es SFB tratado con carbón vegetal, donde se eliminan moléculas no polares lipofílicas (como ciertos virus, factores de crecimiento, hormonas y citoquinas), este proceso es independiente del peso molecular, sin embargo, tiene poco efecto sobre la concentración de iones, glucosa y aminoácidos del suero (ThermoFisher, s/f).

Por lo tanto, al mantener un cultivo celular en medio con Suero Charcoal, la proliferación de dichas células se verá disminuida. Asimismo, se usó medio blanco en vez de con rojo de fenol en el control negativo, ya que se ha visto que las células LNCaP andrógeno-dependientes pueden captar las moléculas de rojo de fenol mediante el receptor de andrógenos, promoviendo la expresión de genes involucrados en la proliferación celular (Ermler, Scholze, & Kortenkamp, 2010).

En esta técnica se utiliza un análogo de timidina, la bromodeoxiuridina (BrdU), la cual se incorpora a la nueva cadena de DNA de las células que están en la fase S del ciclo celular. Posteriormente, las células son fijadas, permeabilizadas con el agente de fijación y permeabilización, y el DNA es desnaturalizado (DNasa I) para generar DNA de cadena simple, requerido para que el anticuerpo anti-BrdU acceda a su antígeno. Este anticuerpo está marcado con un fluorocromo específico, APC, el cual permite, por citometría de flujo, la medición de BrdU asociado por célula. El incremento en la proliferación en todos los tiempos

evaluados (Figura 14) indica que la técnica de citometría para proliferación mediante BrdU funciona adecuadamente.

Para determinar el papel de GRP en la proliferación celular en Cáncer de Próstata se utilizó la línea PC3, la cual pertenece a cáncer de próstata humano con metástasis a hueso, es andrógeno independiente y expresa elevados niveles del receptor de GRP, aproximadamente 4×10^5 receptores por célula (F. Pu y col., 2015). Estas características son favorables para los objetivos de esta investigación, ya que se buscó estimular a las células con el ligando de dicho receptor, GRP. Además, se utilizó esta línea celular característica de metástasis a hueso y andrógeno independiente ya que, como se dijo anteriormente, el Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CPRC) se define como la progresión de la enfermedad después de la terapia de bloqueo androgénico, en donde se pueden detectar niveles elevados de APE en sangre, la progresión de la enfermedad pre-existente o la aparición de una nueva metástasis. Esta metástasis ocurre a hueso en aproximadamente el 90% de los pacientes en esta etapa de la enfermedad (Saad & Hotte, 2010).

Además, se ha visto que la NED contribuye al desarrollo de CPRC, y se ha postulado que existe una comunicación parácrina entre los diferentes tipos celulares presentes en el tumor. Anteriormente se ha demostrado que bombesina, un análogo de GRP, es secretada por las células neuroendócrinas y tiene efectos quimiotácticos y mitogénicos en células tumorales *in vivo* e *in vitro* (Lee, Guan, Qiu, & Kung, 2001); de esta manera se propone que este neuropéptido tiene un papel importante en la progresión de cáncer de próstata. Solórzano y colaboradores reportan que en células LNCaP con fenotipo NE estimuladas con un análogo del receptor GABA_B se incrementa la secreción de GRP, un neuropéptido con características mitogénicas en la mucosa gastrointestinal y diversos tipos de neoplasias, como son pulmón y páncreas (Patel, Shulkes, & Baldwin, 2006). Por lo tanto, para demostrar directamente el involucramiento de GRP en el crecimiento de células andrógeno independiente, presentes en CPRC, se midió el efecto de esta molécula sintetizada en la proliferación de PC3.

Como se observa en la Figura 15, 5 nM de GRP no alteran la proliferación de PC3 en ninguno de los tiempos evaluados. Para este experimento se utilizó dicha concentración del neuropéptido, ya que es equivalente a la que se encontraría en una solución del 20% del medio condicionado de células LNCaP estimuladas con Baclofen (Figura 11). De acuerdo a la literatura, estos parámetros se encuentran dentro de la ventana de concentraciones adecuadas para los experimentos posteriores (Bologna y col., 1990; Festuccia y col., 1998; Larrán y col., 1996; Yuan y col., 2006).

Anteriormente se ha evaluado la actividad de este neuropéptido, y su análogo, Bombesina, en la proliferación de PC3, en estas investigaciones se han encontrado resultados contradictorios entre sí. El grupo de Bologna en 1990, sometió a células PC3 a concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 5 nM de GRP por 24 horas y posteriormente realizaron un conteo celular mediante un hematocitómetro, con lo cual indicaron que GRP incrementa la proliferación celular de PC3 de manera dosis-dependiente. Larran y colaboradores, estimularon a las células con concentraciones de 1, 5 y 10 nM de bombesina, evaluaron la proliferación celular por 24, 48 y 72 horas mediante ensayos de MTT y observaron que bombesina incrementa la proliferación celular de manera dosis-dependiente (Larrán y col., 1996).

Por otra parte, el grupo de Levine en el 2003 no encontró diferencia significativa en la proliferación celular de PC3 tratadas con 100 nM de Bombesina hasta por 120 horas, realizando conteo celular mediante hematocitómetro. Este tratamiento fue realizado a diferentes condiciones de medio de cultivo y concentración de SFB (Levine y col., 2003).

Como se observa, las técnicas utilizadas en investigaciones pasadas, las cuales son conteo celular y ensayos colorimétricos, no son tan sensibles como citometría de flujo. Al realizar el conteo celular mediante un hematocitómetro a un tiempo inicial, el número de células en cada placa debe ser idéntico, y la cuantificación a los tiempos posteriores debe ser correcta, lo cual, aun realizando la cuantificación adecuadamente, tiene un rango de error elevado. Esta técnica carece de precisión

debido a que para realizar un conteo acertado se requiere un número elevado de células, así como, que la solución a cuantificar esté correctamente homogénea, y que las células no formen agregados.

Por otra parte, los ensayos colorimétricos de reducción de tetrazolio (MTT, MTS, XTT, etc), son menos sensibles a los fluorescentes y limitan la capacidad de detectar cambios sutiles en el número celular. Y aunque la sensibilidad de esta técnica puede mejorarse al optimizar la concentración de MTT y el tiempo de incubación de acuerdo al tipo celular, la posibilidad de manipular dicho tiempo de incubación es limitada debido a las características citotóxicas del reactivo. Además, existen agentes endógenos y exógenos que pueden interferir con la actividad enzimática o química de la reducción de MTT, lo que conduce a incremento de ruido u artefactos del ensayo. Algunos ejemplos de agentes que llevan a la no reducción enzimática de MTT a formazán son ácido ascórbico, vitamina A y coenzima A. Además, aunque el ensayo de MTT resulta generalmente en una correlación del número de células viables, la tasa de reducción de tetrazolio refleja la actividad metabólica, y esta actividad puede cambiar con las condiciones de cultivo (pH, contenido de glucosa en el medio, etc.) y el estado fisiológico de las células (Riss, 2014; van Tonder, Joubert, & Cromarty, 2015).

La ventaja del ensayo de citometría de BrdU, contra los utilizados en la literatura, es que es un indicador directo de proliferación, ya que detecta la cantidad de BrdU incorporado por cada célula que está en proliferación activa en el tiempo de incubación con el análogo de timidina. Además, las mediciones realizadas por citometría de flujo, son más sensibles, ya que se leen 10 mil eventos (células) por replicado y de esas se obtiene la tasa de incorporación de BrdU.

Por lo tanto, determinamos que GRP a una concentración de 5 nM no afecta la proliferación de PC3 al ser tratadas por 24, 48, 72 y 96 horas; y aunque se presentan datos contradictorios a los anteriormente publicados, nuestros resultados son más confiables, ya que se realizaron con una técnica más sensible y precisa.

Mientras que la migración celular se define como el proceso por el cual las células se mueven de una localidad a otra; la invasión celular es un sello distintivo del cáncer, en el cual se separan de su lugar de origen a través de la membrana basal y el tejido intersticial. Cuando una de ellas tiene capacidad invasiva, migra a través de un tejido tridimensional, implicando esto un cambio en la estructura del tejido y, eventualmente, la destrucción del mismo (Friedl & Gilmour, 2009) mediante la migración, la adhesión y proteólisis de los componentes de la matriz extracelular (Friedl & Wolf, 2003). De esta manera, para determinar si GRP incrementa la migración o la invasión celular, se realizaron ensayos por herida y con Matrigel, respectivamente.

La heterogeneidad tumoral en CPRC se refiere a la existencia de células con diferencia moleculares en la actividad del AR. Como se dijo anteriormente, en el proceso de NED, las células NE secretan moléculas que contribuyen al desarrollo de CPRC mediante una comunicación parácrina entre los diferentes tipos celulares de un tumor. Estos tipos celulares pueden tener el AR inactivo o activo (Hotte & Saad, 2010; Matei y col., 2012). Estos últimos se refieren a aquellas células que sobrevivieron a la terapia de bloqueo androgénico mediante mecanismos de hipersensibilidad o sobreexpresión del receptor.

Por consiguiente, para los ensayos de migración e invasión se utilizaron las líneas celulares PC3 y LNCaP, las cuales son andrógeno independiente y dependiente respectivamente. Para entender así el papel de GRP en células AR negativas y metastásicas, y en células sensibles a andrógenos; cubriendo de esta manera la actividad de dicho neuropéptido en un tumor heterogéneo o en diferentes etapas de la enfermedad.

El ensayo de herida permite evaluar la polarización, generación de fuerza y mecanismos de cohesión célula-célula para estudiar el movimiento de una monocapa confluyente sobre una superficie 2D (Friedl & Gilmour, 2009). Como se observa en la Figura 18, GRP a 8 nM, donde se repitió el tratamiento cada 12 horas, se incrementa significativamente la migración en PC3 a partir de las 32

horas. Por otra parte, GRP al 5 nM no promueve la migración en monocapa en LNCaP (Figura 19).

En la literatura no se encontraron ensayos de herida para GRP, por lo tanto, se utilizó la concentración anteriormente usada en el de proliferación. Conviene subrayar que algunos autores aplican el ensayo de Transwell sin Matrigel para evaluar la motilidad celular, el cual fue imposible de realizar en el laboratorio debido a que se necesita fibronectina o laminina como factor de adhesión celular. Sin embargo, las concentraciones del neuropéptido para demostrar un incremento significativo de la migración, es mayor al aplicado en esta investigación (Tabla 4). Por lo tanto se sugiere en el futuro, repetir el ensayo de migración por herida a mayores concentraciones de GRP, o realizar el de Transwell con fibronectina.

Para el ensayo de invasión se utilizó Matrigel de Corning®, el cual es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelberth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas de la matriz extracelular, como Laminina (su componente principal), colágeno IV, proteoglicanos de sulfato de heparina, entactina/nidógeno y factores de crecimiento. Este compuesto simula a la matriz extracelular que una célula invasiva es capaz de degradar. En las Figura 16 y Figura 17 se observa que GRP incrementa la invasión celular de PC3 y, en menor medida, de LNCaP respectivamente. En las figuras anteriormente nombradas, se puede observar que las células PC3 tratadas con el control negativo tienen capacidad invasiva *per se*, al ser altamente agresivas, lo que se observa con mayor facilidad a las 18 horas del tratamiento; sin embargo, la invasión celular es significativamente mayor al ser tratadas con GRP.

Tabla 4. Comparación de ensayos realizados con la literatura.

Ensayo	Técnica utilizada	Observaciones	Concentración de BBS/ GRP	Resultados	Referencia
P R O L I F E R A C I Ó N	Detección de BrdU por citometría de flujo	Altamente sensible y precisa	5 nM	GRP no incrementa proliferación	(Martínez, 2017)
	Conteo por hematocímetro	Elevado error humano	0.1, 0.5, 1 y 5 nM	GRP incrementa proliferación (dosis-dependiente)	(Bologna y col., 1990)
			100 nM	BBS no incrementa la proliferación de PC3	(Levine y col., 2003)
	MTT	Factores exógenos y endógenos pueden alterar los resultados, poco sensible	1, 5, 10 nM	BBS incrementa proliferación (dosis-dependiente).	(Larrán y col., 1996)
M I G R A C I Ó N	Herida	Más barato, menos sensible	5 nM en LNCaP, 5 y 8 nM en PC3	GRP incrementa migración de PC3.	(Martínez, 2017)
	Transwell con fibronectina como factor trófico y de adhesión	Más caro, más sensible	10, 100, 1000 nM	GRP incrementa la motilidad de LNCaP y PC3.	(O Nagakawa y col., 1998; Osamu Nagakawa y col., 2001)
			0.35, 3.5, 35 nM	BBS incrementa migración de PC3 y, en menor medida, de LNCaP	(Festuccia y col., 1998)
I N V A S I Ó N	Transwell con Matrigel	Ideal para el análisis de la invasión celular.	5 nM	GRP incrementa invasión de PC3 y LNCaP	(Martínez, 2017)
			De 0.1 a 1000 nM	GRP incrementa invasión de PC3 (dosis-dependiente).	(O Nagakawa y col., 1998; Osamu Nagakawa y col., 2001)

(Realizado por Martínez, 2017). GRP: Péptido liberador de gastrina; BBS: Bombesina; BrdU: 5-bromo-2'deoxiuridina.

Los resultados obtenidos coinciden con los publicados por el grupo de Nagakawa en 1998 y 2001, donde reportan que GRP incrementa la capacidad invasiva de PC3 de manera dosis-dependiente (O Nagakawa y col., 1998; Osamu Nagakawa y col., 2001). En conjunto, los resultados obtenidos de los experimentos de migración e invasión indican que PC3 es más sensible a la acción de GRP en comparación con LNCaP, y que este neuropéptido actúa principalmente a nivel de invasión celular. (F. Pu y col., 2015) probablemente mediante mecanismos de activación proteolítica de la matriz extracelular.

Se ha descrito que bombesina/GRP está involucrada en la transducción señales mediante los receptores de GRP localizados en la membrana celular. Esto provoca la movilización de calcio intracelular, promoviendo el crecimiento e invasión mediante el incremento de la actividad proteolítica de las metaloproteinasas (MMP) (Lee y col., 1995). Las MMP de matriz extracelular son un grupo de enzimas que pueden romper proteínas como colágeno, las cuales se encuentran en los espacios intercelulares de los tejidos. Dado que estas enzimas necesitan moléculas de calcio o zinc como cofactores, se llaman metaloproteinasas. Estas enzimas están involucradas en angiogénesis y metástasis (National Cancer Institute, s/f)

Específicamente, se ha visto que Bombesina *in vivo* induce la activación de MMP-9 (Gelatinasa B) y TIMP-1. TIMP-1 es un inhibidor de las metaloproteinasas que también está relacionado con la proliferación celular, con un pronóstico pobre en diversos modelos *in vivo* de tumor (Festuccia y col., 1998). Este inhibidor tiene un papel regulador al limitar y localizar más eficientemente la proteólisis de algunos sitios específicos, tales como sitios de contacto focal o áreas de contacto célula-célula o célula-membrana basal. El conjunto de la actividad de MMP-9 y TIMP-1 puede modular la proteólisis pericelular al regular la distribución y activación proteolítica. (Friedl & Wolf, 2003) (Yang y col., 2009) Ischia y col. (Ischia y col., 2014) reportan que GRP induce la fosforilación de tirosinas cinasas no específicas como Src, FAK y Etk, moléculas conocidas por tener un papel importante en la motilidad en cáncer de próstata.

Juntos, estos datos sugieren que las células con transdiferenciación neuroendócrina pueden liberar factores, como GRP, que sostienen la invasión y migración de células andrógeno independientes y la invasión en células andrógeno dependientes mediante la posible activación de MMP's, contribuyendo a la metástasis y avance de la enfermedad.

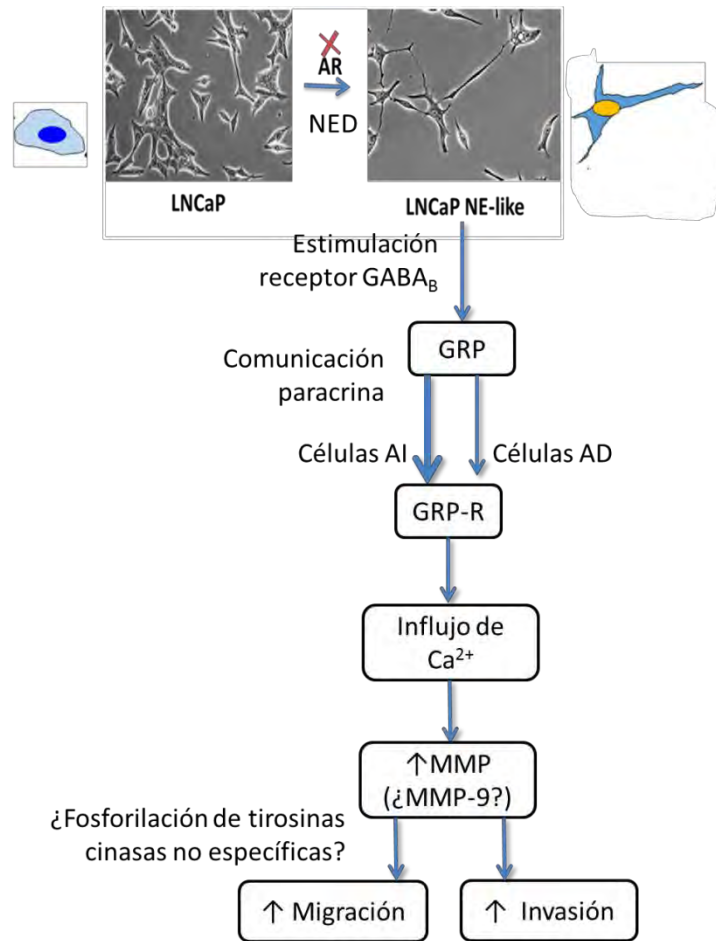


Figura 20. Diagrama del posible mecanismo dado por GRP.

8. CONCLUSIÓN

- GRP a una concentración de 5 nM no estimula la proliferación de células PC3.
- GRP a 8 nM incrementa la capacidad migratoria de células PC3 después de las 32 horas con el tratamiento.
- GRP a 5 nM incrementa la invasión de células PC3, y, en menor medida de células LNCaP a las 5 y 18 horas después del tratamiento.
- Al ser liberada por las células con fenotipo NE, GRP tiene un potencial paracrino entre los diferentes tipos celulares, promoviendo así el avance de la enfermedad en cáncer de próstata resistente a la castración.

9. PERSPECTIVAS

- En este trabajo se lograron estandarizar técnicas para determinar la actividad proliferativa, migratoria e invasiva de GRP sintetizado en células de Cáncer de Próstata. En el futuro se espera que, gracias a la estandarización de estas técnicas, se pueda evaluar el Medio Condicionado de células LNCaP con fenotipo neuroendócrino tratadas con un agonista del receptor de GABA_B para determinar si tanto GABA como las moléculas secretadas por estas células, entre las que se encuentra GRP, incrementan la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de células de cáncer de próstata.
- Dado que los resultados para evaluar la migración celular puede variar si se usa un ensayo de herida, donde se determina la motilidad en monocapa, o un ensayo de Transwell, la cual es una técnica más sensible; se sugiere, para experimentos futuros, pretratar los insertos Transwell con agentes de adhesión. Estos agentes, como fibronectina o laminina, permiten que las células que logran migrar y atravesar la membrana, permanezcan adheridas a la parte inferior del inserto. De esta forma se podrá cuantificar y determinar de mejor manera la migración celular. Otra forma, aunque menos sensible, para evaluar la migración celular, es realizar un ensayo de MTT, tal como describe el grupo de Festuccia (Festuccia y col., 1998). Ellos sometieron a las células que, después del tratamiento atravesaron la membrana y se depositaron en la cámara inferior del inserto, con una solución de MTT. Después del tiempo de incubación leyeron la absorbancia y determinaron el porcentaje de células que atravesaron la membrana.
- Para experimentos posteriores se aconseja evaluar la invasión de LNCaP a mayores tiempos, para obtener un número mayor de células invasivas y obtener una visión más amplia con respecto al factor del tiempo en este tipo celular.
- Se recomienda realizar un stock de GRP de mayor concentración, para que al realizar los experimentos, la cantidad de vehículo utilizado sea menor y el estrés celular por la dilución del medio de cultivo sea mínima.

- Dado que en la literatura se describe que GRP altera la actividad de MMP's, se podrían realizar experimentos (RT-PCR, western blot, zimografía) para determinar cuál o cuáles MMP's alteran su expresión, presencia o actividad en células de Cáncer de Próstata después del tratamiento con GRP.
- Otra forma de guiar esta investigación es midiendo los niveles de expresión del receptor de GRP en células de Cáncer de Próstata después del tratamiento con GRP, así como en células LNCaP con fenotipo NE después de ser tratadas con un agonista de GABA. Si se incrementa la presencia del receptor, indicaría que existe una regulación positiva sobre esta vía; y se podría investigar más sobre su importancia en la progresión de la enfermedad.
- También, en un futuro se podría medir la expresión del neuropéptido y su receptor en muestras de sangre o tejido de pacientes sanos, con HPB y cáncer de próstata con o sin NED para saber si hay alguna correlación entre las diferentes etapas de la enfermedad y la expresión de dichas moléculas. Y si es el caso, postularlos como posibles blancos terapéuticos o de diagnóstico.

10. REFERENCIAS

- Aaron, L., Franco, O. E., & Hayward, S. W. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia, (43), 279-288. doi:10.1016/j.ucl.2016.04.012
- Alfaro, E. V. (s/f). RECEPTORES GABA GABA RECEPTORS.
- Arroyo-Kuribreña, J. C., Soto-Vega, E., Muñoz-Pérez, M., Contreras, J. M., & Varela-Cabrera, J. A. (2012). Bloqueo androgénico en cáncer de próstata: Revisión de la literatura. *Rev Mex Urol*, 72(4), 182–196.
- bioscience. (2005). *A quantitative cell migration assay using ThinCert™ cell culture inserts. grelner blo-one*. Recuperado a partir de www.gbo.com/bioscience
- Bishop, J. L., Davies, A., Ketola, K., & Zoubeidi, A. (2015). Regulation of tumor cell plasticity by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, 22(3), R165-82. doi:10.1530/ERC-15-0137
- Bologna, M., Festuccia, C., Muzi, P., Biordi, L., & Ciomei, M. (1990). Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer*, 63(9), 1714–1720. doi:10.1002/1097-0142(19900501)63:9<1714::AID-CNCR2820630912>3.0.CO;2-H
- Cancer. Net Editorial Board. (2016). *Cáncer de próstata: Factores de riesgo y prevención*. Recuperado el 8 de noviembre de 2016, a partir de <http://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-prstata/factores-de-riesgo-y-prevencion>
- Carlos Sánchez-Martínez, L., Paredes-Solís, C. A., Hernández-Ordóñez, O. F., & Rigel Sánchez-Ruvalcaba, I. (2013). El antígeno prostático específico. Su papel en el diagnóstico del cáncer de próstata. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 51(2), 124–6.
- Chang, C. (2002). *Androgens and Androgen Receptor: Mechanisms, Functions, and Clinical Applications*. Kluwer Academic Publisher.
- Cindolo, L., Cantile, M., Vacherot, F., Terry, S., & de la Taille, A. (2007). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: from lab to bedside. *Urologia internationalis*, 79(4), 287–96. doi:10.1159/000109711
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(4), 256–269. doi:10.1038/nrc2090
- Devlin, H.-L., & Mudryj, M. (2009). Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence. *Cancer letters*, 274(2), 177–86. doi:10.1016/j.canlet.2008.06.007
- Feldman, B. J., & Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 34–45. doi:10.1038/35094009
- Ferris, J., Garcia, J., Berbel, O., & Ortega, J. (2011). Factores de riesgo constitucionales en el cáncer de próstata. *Constitutional risk factors in prostate cancer*, 35(5), 282–288. doi:10.1016/j.acuro.2010.12.009

- Festuccia, C., Guerra, F., D'Ascenzo, S., Giunciuglio, D., Albini, A., & Bologna, M. (1998). In vitro regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *International Journal of Cancer*, 75(3), 418–431. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19980130)75:3<418::AID-IJC16>3.0.CO;2-4
- Friedl, P., & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 445–457. doi:10.1038/nrm2720
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 362–374. doi:10.1038/nrc1075
- Heasley, L. E. (2001). Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*, 20(13), 1563–9. doi:10.1038/sj.onc.1204183
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews*, 25(2), 276–308. doi:10.1210/er.2002-0032
- Hospital General de México. (s.f.). *Guía de diagnóstico y tratamiento del servicio de urología*. Recuperado el 27 de octubre de 2016, de http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/urolo/1cancerprostata.pdf
- Hotte, S. J., & Saad, F. (2010). Current management of castrate-resistant prostate cancer. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 17 Suppl 2(Suppl 2), S72-9. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20882137>
- Hu, Y., Ippolito, J. E., Garabedian, E. M., Humphrey, P. A., & Gordon, J. I. (2002). Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 277(46), 44462–74. doi:10.1074/jbc.M205784200
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2015). Cáncer de próstata. Recuperado el 8 de noviembre de 2016, a partir de <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata>
- International Agency for Research on Cancer, I. (2012). GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2012. Recuperado a partir de http://globocan.iarc.fr/Pages/DataSource_and_methods.aspx
- Ippolito, J. E., Merritt, M. E., Bäckhed, F., Moulder, K. L., Mennerick, S., Manchester, J. K., ... Gordon, J. I. (2006). Linkage between cellular communications, energy utilization, and proliferation in metastatic neuroendocrine cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12505–10. doi:10.1073/pnas.0605207103
- Ippolito, J. E., Xu, J., Jain, S., Moulder, K., Mennerick, S., Crowley, J. R., ... Gordon, J. I. (2005). An integrated functional genomics and metabolomics approach for defining poor prognosis in human neuroendocrine cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9901–6. doi:10.1073/pnas.0500756102
- Ischia, J., Patel, O., Bolton, D., Shulkes, A., & Baldwin, G. S. (2014). Expression and function of gastrin-releasing peptide (GRP) in normal and cancerous urological tissues. *BJU international*, 40–7. doi:10.1111/bju.12594

- Ismail A, H. R., Landry, F., Aprikian, A. G., & Chevalier, S. (2002). Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *The Prostate*, 51(2), 117–25. doi:10.1002/pros.10066
- Ito, T., Yamamoto, S., Ohno, Y., Namiki, K., Aizawa, T., Akiyama, A., & Tachibana, M. (s/f). Up-regulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer after androgen deprivation therapy, degree and androgen independence. *Oncology reports*, 8(6), 1221–4. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11605036>
- Jeong, I. G., Yoo, S., Lee, C., Kim, M., You, D., Song, C., ... Kim, C.-S. (2017). Obesity as a Risk Factor for Unfavorable Disease in Low-risk Prostate Cancer and Its Relationship with Anatomic Location of Tumor. *The Journal of Urology*. doi:10.1016/j.juro.2017.01.073
- Jopling, C., Boue, S., & Belmonte, J. C. I. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(2), 79–89. doi:10.1038/nrm3043
- Larrán, J., Salido, M., Aparicio, J., López, A., de Palacio, M. L., & Vilches, J. (1996). In vitro characterization of bombesin and calcitonin on the proliferation of PC3, DU 145 and LNCaP cancer prostatic cell lines. *The International journal of developmental biology, Suppl 1*, 275S–276S. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087795>
- Lee, L. F., Guan, J., Qiu, Y., & Kung, H. J. (2001). Neuropeptide-induced androgen independence in prostate cancer cells: roles of nonreceptor tyrosine kinases Etk/Bmx, Src, and focal adhesion kinase. *Molecular and cellular biology*, 21(24), 8385–97. doi:10.1128/MCB.21.24.8385-8397.2001
- Levine, L., Lucci, J. A., Pazdrak, B., Cheng, J.-Z., Guo, Y.-S., Townsend, C. M., & Hellmich, M. R. (2003). Bombesin Stimulates Nuclear Factor κB Activation and Expression of Proangiogenic Factors in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 63(13). Recuperado a partir de <http://cancerres.aacrjournals.org/content/63/13/3495.long>
- Li, Y., Chen, H. Q., Chen, M. F., Liu, H. Z., Dai, Y. Q., Lv, H., ... Qi, L. (2009). Neuroendocrine differentiation is involved in chemoresistance induced by EGF in prostate cancer cells. *Life sciences*, 84(25–26), 882–7. doi:10.1016/j.lfs.2009.03.021
- Matei, D.-V., Renne, G., Pimentel, M., Sandri, M. T., Zorzino, L., Botteri, E., ... de Cobelli, O. (2012). Neuroendocrine differentiation in castration-resistant prostate cancer: a systematic diagnostic attempt. *Clinical genitourinary cancer*, 10(3), 164–73. doi:10.1016/j.clgc.2011.12.004
- Mayo Clinic. (S/A). *Cáncer de próstata*. Recuperado a partir de <http://www.mayoclinic.org/espanol/enfermedades-y-tratamientos/cancer-de-prostata>
- Medina, J. S., Reina, G. R., Alba, D. V., Salamanca, J. I. M. de, Vela, I. C., & Rodríguez, J. C. (2015). Patología prostática no tumoral. Hiperplasia prostática benigna. Prostatitis. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(83), 4939–4949. doi:10.1016/j.med.2015.07.001
- Mendoza Patiño, N. (2008). *Farmacología médica*. Médica Panamericana.

- Nagakawa, O., Ogasawara, M., Fujii, H., Murakami, K., Murata, J., Fuse, H., ... Azuma, I. (1998). Effect of prostatic neuropeptides on invasion and migration of PC-3 prostate cancer cells. *Cancer letters*, 133(1), 27–33. doi:10.1016/S0304-3835(98)00186-4
- Nagakawa, O., Ogasawara, M., Murata, J., Fuse, H., & Saiki, I. (2001). Effect of prostatic neuropeptides on migration of prostate cancer cell lines. *International Journal of Urology*, 8(2), 65–70. doi:10.1046/j.1442-2042.2001.00250.x
- National Cancer Institute. (s/f). NCI Dictionary of Cancer Terms. Recuperado el 11 de abril de 2017, a partir de <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?crid=44211>
- National Institute of Cancer. (s/f). Significado de los cambios en la próstata: Guía de salud para los hombres - National Cancer Institute. Recuperado el 2 de octubre de 2016, a partir de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata/significado-cambios-en-la-prostata>
- Oa, L., & Lalosa S. (2014). Implicancias fisiopatológicas del receptor androgénico. Mutaciones, polimorfismos y patologías asociadas Pathophysiological Implications of Androgen Receptor. Mutations, Polymorphisms and Pathologic Associations.
- Ortiz-Arazola, G. L., Reyes-Aguilar, A., Grajales-Alonso, I., & Tenahua-Quitl, I. (2013). Identificación de factores de riesgo para cáncer de próstata. *Enfermería Universitaria*, 10(1), 3–7. doi:10.1016/S1665-7063(13)72621-6
- Padgett, C. L., & Slesinger, P. A. (2010). GABAB Receptor Coupling to G-proteins and Ion Channels. *En Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* (Vol. 58, pp. 123–147). doi:10.1016/S1054-3589(10)58006-2
- Pu, F., Qiao, J., Xue, S., Yang, H., Patel, A., Wei, L., ... Yang, J. J. (2015). GRPR-targeted Protein Contrast Agents for Molecular Imaging of Receptor Expression in Cancers by MRI. *Scientific reports*, 5, 16214. doi:10.1038/srep16214
- Pu, Y., Xu, M., Liang, Y., Yang, K., Guo, Y., Yang, X., & Fu, Y. X. (2016). Androgen receptor antagonists compromise T cell response against prostate cancer leading to early tumor relapse. *Sci Transl Med*, 8(333), 333ra47. doi:10.1126/scitranslmed.aad5659
- Ramírez-Balderrama, L., López-Briones, S., Daza-Benítez, L., Macías, M. H., López-Gaytán, T., & Pérez-Vázquez, V. (s/f). [Neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma]. *Gaceta médica de México*, 149(6), 639–45. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24276187>
- Reeves, F., Everaerts, W., Murphy, D. G., & Costello, A. (2016). The Surgical Anatomy of the Prostate. *En Prostate Cancer* (pp. 253–263). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-800077-9.00029-3
- Riss, T. (2014). Is Your MTT Assay Really the Best Choice? Recuperado a partir de <https://www.promega.com/~pdf/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice/>
- Rojas Durán, F., Manzo Denes, J., Soto Cid, A. H., Aranda Abreu, G. E., Juárez Aguilar, E., Coria Ávila, G. A., ... Hernández, M. E. (2011). El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. *eNeurobiología*, ISSN-e 2007-3054, Vol. 2, N.º. 4, 2011, 15 págs., 2(4), 1–15.

- Rozengurt, E. (2002). Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 13(3), 128–34. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893527>
- Saad, F., & Hotte, S. J. (2010). Guidelines for the management of castrate-resistant prostate cancer. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada*, 4(6), 380–4. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21191494>
- Secretaría de salud. (s/f). Programa de Acción: Cáncer de Próstata.
- Shen, M. M., & Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development*, 24(18), 1967–2000. doi:10.1101/gad.1965810
- Solórzano, S. (2017). No Title. *En proceso*.
- The National Academy Sciences of the United States. (2014). Veterans and Agent Orange: Update 2014. Recuperado a partir de <http://www.nationalacademies.org/hmd/Reports/2016/Veterans-and-Agent-Orange-Update-2014.aspx>
- ThermoFisher. (s/f). Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum. Recuperado el 11 de mayo de 2017, a partir de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs/specialty-serum/charcoal-stripped-fbs.html>
- Thomas, R. P., Hellmich, M. R., Townsend, C. M., & Evers, B. M. (2003). Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues. *Endocrine reviews*, 24(5), 571–99. doi:10.1210/er.2002-0028
- Thompson, I., Thrasher, J. B., Aus, G., Burnett, A. L., Canby-Hagino, E. D., Cookson, M. S., ... AUA Prostate Cancer Clinical Guideline Update Panel. (2007). Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *The Journal of urology*, 177(6), 2106–31. doi:10.1016/j.juro.2007.03.003
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología*.
- van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8, 47. doi:10.1186/s13104-015-1000-8
- Weigert, N., Schepp, W., Haller, A., & Schusdziarra, V. (1998). Regulation of gastrin, somatostatin and bombesin release from the isolated rat stomach by exogenous and endogenous gamma-aminobutyric acid. *Digestion*, 59(1), 16–25. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9468094>
- Wright, M. E., Tsai, M.-J., & Aebersold, R. (2003). Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(9), 1726–37. doi:10.1210/me.2003-0031
- Xu, L., Zhang, K., Wang, J., Takahashi, K., Yamanaka, S., Takahashi, K., ... Mitchell, I. (2014). Exploring the Mechanisms of Differentiation, Dedifferentiation, Reprogramming and

Transdifferentiation. *PLoS ONE*, 9(8), e105216. doi:10.1371/journal.pone.0105216

Yang, J. C., Ok, J., Busby, J. E., Borowsky, A. D., Kung, H.-J., & Evans, C. P. (2009). Aberrant activation of androgen receptor in a new neuropeptide-autocrine model of androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer research*, 69(1), 151–60. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0442

Yuan, T.-C., Veeramani, S., Lin, F.-F., Kondrikou, D., Zelivianski, S., Igawa, T., ... Lin, M.-F. (2006). Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocrine-related cancer*, 13(1), 151–67. doi:10.1677/erc.1.01043

Yuan, T.-C., Veeramani, S., & Lin, M.-F. M.-F. (2007). Neuroendocrine-like prostate cancer cells: Neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells, 14(3), 531–547. doi:10.1677/ERC-07-0061

Zapata, P. D., Colas, B., López-Ruiz, P., Ropero, R. M., Martín, R. M., Rodríguez, F. J., ... Angulo, J. C. (2004). Fosfotirosina fosfatasa shp-1, somatostatina y cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 28(4), 269–285. doi:10.1016/S0210-4806(04)73075-2

11. APÉNDICE

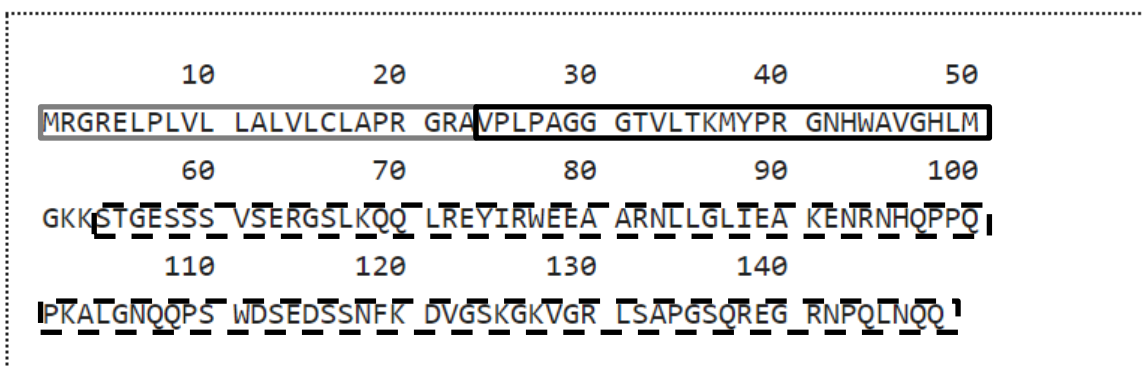


Figura 21. Secuencia de GRP (UniProt P07492). En el recuadro gris (del aminoácido 1 al 23) se encuentra la secuencia de la señal del péptido. En el recuadro negro (del aminoácido 24 al 50) se encierra la secuencia del péptido GRP, y en los recuadros punteados (del aminoácido 54 al 148) se encuentra la secuencia del propéptido. La secuencia del neuropéptido sintetizado (GGTVLTkMYPRGNHC) representa del aminoácido 30 al 43; el aminoácido terminal es Cisteína, necesario para la síntesis de anticuerpos mediante la conjugación al carrier KLH.