



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estandarización del Modelo *in vitro* de Transdiferenciación al
Fenotipo Neuroendócrino a partir de Células de Cáncer de
Próstata**

TESIS

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

PRESENTA

KARLA SANTOYO LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Marisol López López

VOCAL: Profesor: Felipe Cruz García

SECRETARIO: Profesor: Mauricio Rodríguez Dorantes

1er. SUPLENTE: Profesor: Ignacio Camacho Arroyo

2do. SUPLENTE: Profesor: Nancy Monroy Jaramillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

SUPERVISOR TÉCNICO:

cDra. Susana del Rocio Solórzano Rosales

SUSTENTANTE:

Karla Santoyo López

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 La próstata	3
2.1.1 Histología de la próstata	3
2.1.2 Los andrógenos y su papel en el desarrollo de la próstata	5
2.2 Receptor de andrógenos	7
2.3 Cáncer de próstata	9
2.3.1 Historia Natural de la Enfermedad	11
2.3.1.1 Desarrollo de Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CRPC)	12
2.3.1.2 Células Neuroendócrinas en CRPC	15
2.3.2 Neuropeptidos en Cáncer de Próstata	17
2.3.3 Ácido gamma-aminobutírico en Cáncer de Próstata	18
3. Justificación	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	20
5.1 Objetivo General	20
5.2 Objetivos Particulares	20
6. Materiales y Métodos	21
6.1 Cultivo Celular	21
6.2 Inhibición del AR	22
6.3 Extracción de RNA	23

6.4	Retrotranscripción de RNA	24
6.5	qPCR	24
6.6	Cálculo de la expresión relativa de los genes analizados	24
6.7	Análisis Estadístico	25
7.	Resultados	26
7.1	Cultivo Celular en medio suplementado con FBS y CS FBS	26
7.2	Cambios morfológicos después de inhibir el <i>AR</i>	31
7.3	Expresión relativa del <i>AR</i> y <i>KLK3</i>	31
7.4	Expresión relativa de los marcadores neuroendócrinos	32
8.	Discusión	35
9.	Conclusiones	40
10.	Perspectivas	40
11.	Bibliografía	42
	Abreviaturas	55
	Anexo I. RIN	56

1. Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es en México la primera causa de mortalidad por neoplasia en hombres, una de las principales causas del alto índice de mortalidad a causa de CaP es la falta de prevención por parte de los varones, lo que no permite que el cáncer sea detectado en sus etapas tempranas, con lo que el tratamiento y el diagnóstico empeora según el estado de la enfermedad (CDC, 2013; National Cancer Institute, 2014).

Los andrógenos juegan un papel fundamental en el desarrollo tanto de las células sanas como de las cancerígenas en la próstata, promoviendo su proliferación y disminuyendo su tasa apoptótica (Bennett *et al.*, 2010). Si el CaP es diagnosticado cuando el tumor se encuentra confinado en la glándula prostática, este se extrae quirúrgicamente; si el cáncer es diagnosticado una vez que ha invadido otros tejidos fuera de la próstata, el tratamiento de primera elección es el bloqueo androgénico máximo. Sin embargo la mayoría de los pacientes desarrollan resistencia al tratamiento después de aproximadamente 24 meses, con lo que incrementa la concentración del antígeno prostático específico (APE) sanguíneo y el tamaño del tumor, ésta etapa es conocida como Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CRPC) en donde la media de supervivencia no supera un año con quimioterapia (Epstein *et al.*, 2014).

En la mayoría de los casos de CRPC se ha observado un incremento significativo en la población de células neuroendócrinas (NE), por lo que se han propuesto diversos mecanismos para explicar el aumento de esta población, entre ellos la transdiferenciación de células luminales a células con un fenotipo NE-like (similar a células neuroendócrinas) en un medio sin andrógenos (Beltran *et al.*, 2014).

El objetivo de esta tesis fue establecer y estandarizar un modelo *in vitro* de la transdiferenciación neuroendócrina, al determinar el tiempo en que una línea celular derivada de cáncer de próstata (LNCaP) sufre un mayor cambio en su fenotipo después de su transfección con un ARN pequeño de interferencia dirigido contra el mRNA de *AR* (siAR), transformándose en una célula NE-like, para poder emplearlo para realizar estudios genómicos en busca de nuevos blancos para el tratamiento de la enfermedad. Se evaluó la expresión del *AR*, de un gen cuya expresión depende de la actividad del AR (antígeno prostático específico), y un marcador neuroendócrino (enolasa 2), además se evaluó la expresión de la glutamato descarboxilasa 1 al proponerlo como candidato a marcador de la transdiferenciación neuroendócrina; para ello se extrajo el RNA total de las células y se

realizó la retrotranscripción a cDNA para poder llevar a cabo la qPCR usando sondas TaqMan.

Se concluyó que los tiempos adecuados para analizar el proceso de transdiferenciación neuroendócrina fueron a las 48, 72 y 96 horas después de la transfección; el control (grupo FBS) del experimento son células LNCaP en medio RPMI + 10% FBS, y que el control negativo (un siRNA con secuencia azarosa) es un buen control de la transfección hasta las 72 horas, ya que las células empiezan a desarrollar el fenotipo NE-like. Además de que la expresión de la enzima glutamato descarboxilasa 1 (*GAD1*), aumentó conforme pasaba el tiempo después de la transfección, siendo significativa desde las 24 horas después de la transfección.

2. Introducción

2.1 La próstata

La próstata es una glándula que forma parte del aparato reproductor masculino, se sitúa justo debajo de la vejiga, envolviendo la uretra, delante del recto, mide aproximadamente 4 cm de ancho, 3 cm de alto, y 2 cm de profundidad. Anatómicamente se divide en cinco lóbulos (anterior, medio, posterior y dos laterales); además existe otro sistema de división en el que se correlacionan sus características fisiológicas y patológicas, dividiéndose la próstata en la zona periférica, central, transicional, periuretral y el estroma fibromuscular (el cual forma la cápsula) (Figura 1) (De Marzo *et al.*, 2007).

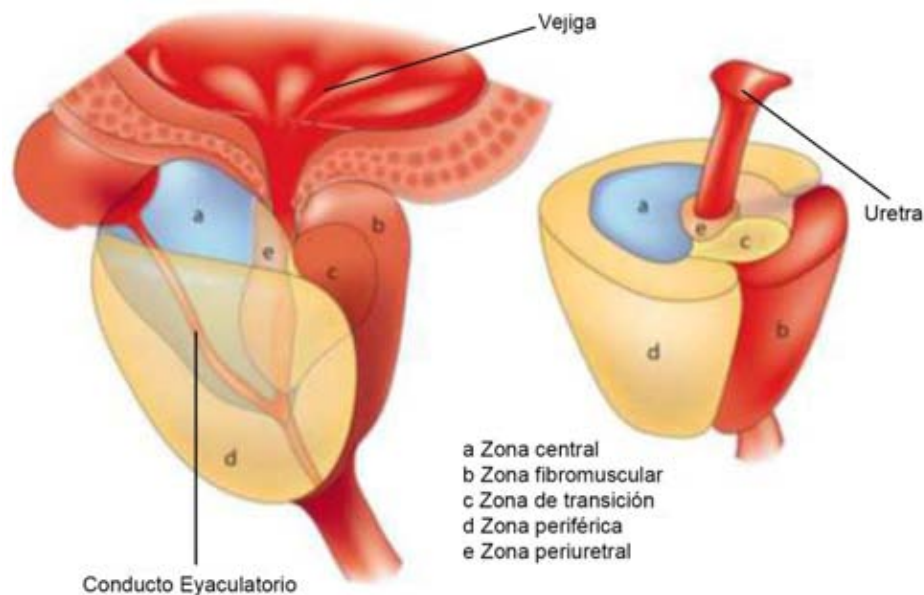


Figura 1. Posición y anatomía de la próstata. En la zona periférica se desarrollan el 68% de los casos de cáncer, en la zona central un 8%, y en la zona de transición un 24%, además de que aquí se desarrolla la mayoría de los casos de Hiperplasia Prostática Benigna (Modificada de De Marzo *et al.*, 2007).

2.1.1 Histología de la próstata

La próstata es un complejo dividido por la membrana basal en dos compartimentos, el estroma fibromuscular y el epitelio glandular o parénquima (Figura 2). El estroma fibromuscular consiste en una matriz de tejido conectivo formado por una amplia variedad celular, como fibroblastos, linfocitos, macrófagos y células de músculo liso. El epitelio glandular está inmerso en una matriz de tejido conectivo organizado por glándulas que se ramifican desde la uretra hasta los acinos secretores, está compuesto por tres tipos

celulares: células epiteliales luminales, células basales y células neuroendócrinas (NE) (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013).

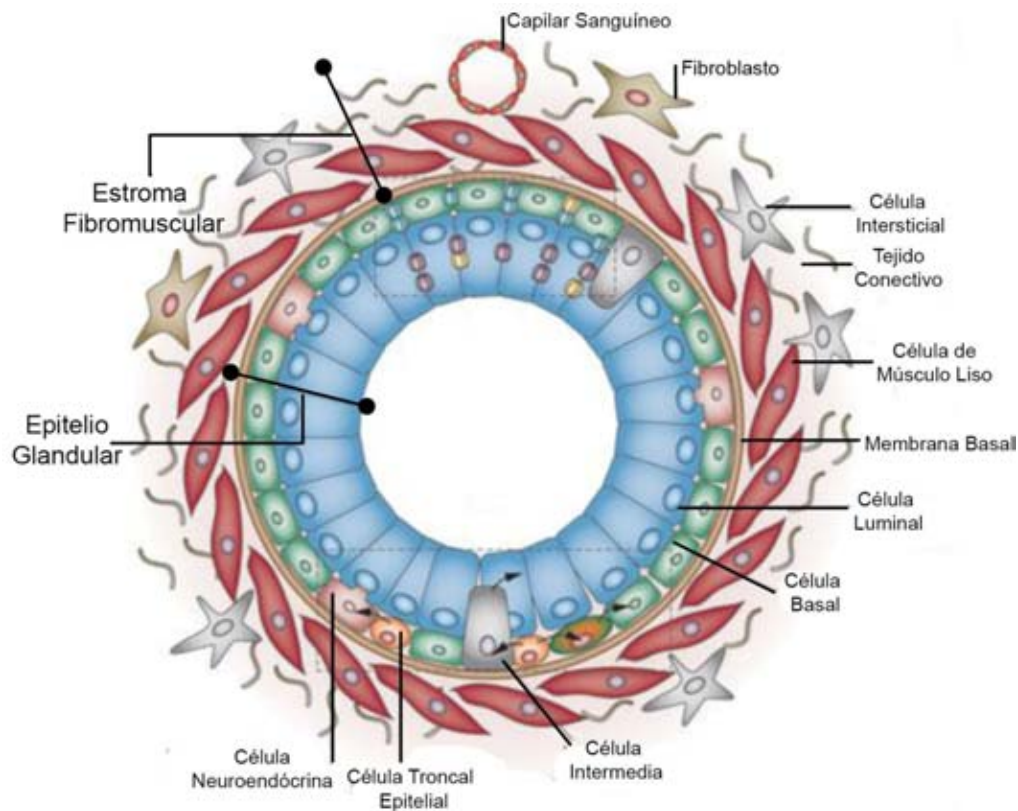


Figura 2. Estructura celular de la próstata (Modificada de Czyż *et al.*, 2012).

Las células epiteliales luminales son las más numerosas, están diferenciadas y secretan una proteína llamada antígeno prostático específico (APE) y fosfatasa ácida a la luz glandular; además expresan niveles elevados de otra molécula llamada Receptor de Andrógenos (AR). Las células epiteliales basales están poco diferenciadas, no tienen actividad secretora, expresan bajos niveles de AR y son independientes de andrógenos. Las células NE, están terminalmente diferenciadas, quiescentes, insensibles a andrógenos y tienen un papel fundamental en el crecimiento, mantenimiento y proliferación de las células adyacentes a través de mecanismos paracrinos (Ramírez-Balderrama *et al.*, 2013). Las células NE producen el neurotransmisor GABA (ácido gamma-aminobutírico) (Erdö *et al.*, 1982; Young y Bordey, 2009) y expresan una serie de proteínas neuronales incluyendo enolasa neuronal específica (*ENO2*) y cromograninas, además de un gran número de neuropéptidos: la bombesina, la neurotensina, la serotonina, la calcitonina, la TSH

(tirotropina), y la PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea) (Abrahamsson, 1999).

La próstata aumenta de tamaño lentamente desde el nacimiento hasta la pubertad (debido al aumento de testosterona en los varones), se expande rápidamente a los 30 años, después de lo cual su tamaño permanece constante hasta los 45 años, cuando vuelve a crecer. A medida que los hombres envejecen, la próstata tiende a aumentar de tamaño. Esto puede provocar que la uretra se angoste y disminuya el flujo de orina, a esto se llama hiperplasia prostática benigna (HPB) (Tortora y Derrickson, 2014).

Los andrógenos (principalmente la 5 α -dihidrotestosterona (DHT), un derivado de la testosterona) activan el Receptor de Andrógenos (AR), el cual media la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y el metabolismo en muchos tejidos, y la actividad secretora de proteínas tales como el APE dentro de la próstata, desempeñando un papel fundamental en el mantenimiento del tejido y su homeostasis (Nelson *et al.*, 2002); sin embargo también está relacionado con el desarrollo de enfermedades como la HPB (Koivisto *et al.*, 2003) y la formación y progresión de CaP (Han *et al.*, 2005).

2.1.2 Los andrógenos y su papel en el desarrollo de la próstata.

En la pubertad, las células neurosecretoras del hipotálamo aumentan la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Esta hormona, a su vez estimula la adenohipófisis para aumentar la secreción de las gonadotropinas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículoestimulante (FSH). La LH estimula las células de Leydig del tejido intersticial de los testículos, para secretar testosterona. A través de retroalimentación negativa, la testosterona suprime la secreción de LH por la adenohipófisis y suprime la secreción de GnRH por las células neurosecretoras hipotalámicas (Figura 3) (Fox, 2011).

La testosterona se sintetiza a partir del colesterol en las células de Leydig y también se forma a partir de la androstenediona secretada por la corteza suprarrenal. Es soluble en lípidos y se difunde fácilmente fuera de las células intersticiales en el líquido intersticial y luego en la sangre. La testosterona libre en sangre entra a la célula, y es convertida por la enzima 5 α -reductasa en un andrógeno con una velocidad de disociación del receptor, la 5 α -dihidrotestosterona (DHT); ambos activan el receptor de andrógenos (AR) (Radmayr *et al.*, 2008).

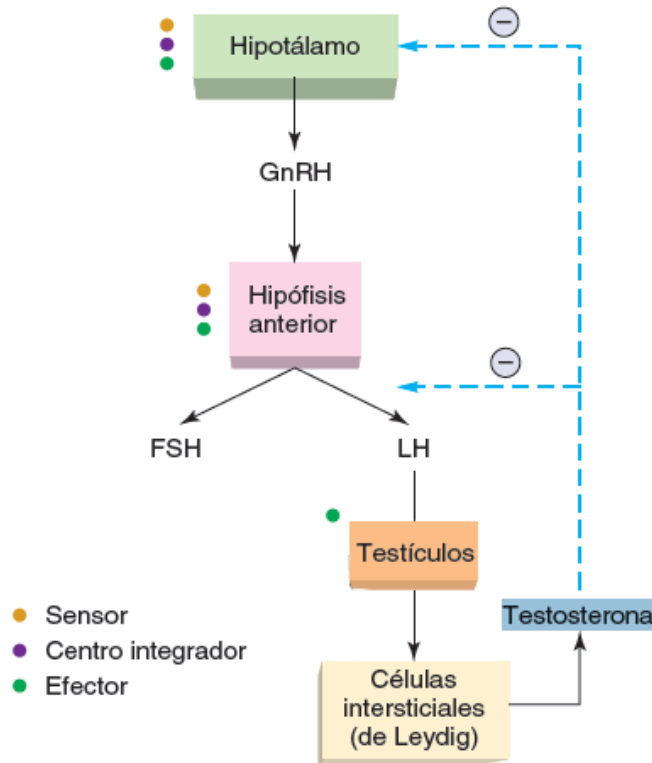


Figura 3. Eje hipotálamo hipófisis testículo (Modificada de Fox, 2011)

Los principales efectos de la activación del AR por andrógenos son:

- El desarrollo prenatal: antes del nacimiento la testosterona estimula el patrón desarrollo de los conductos del sistema reproductivo masculino y el descenso de los testículos. La DHT estimula el desarrollo de los genitales externos.
- El desarrollo de caracteres sexuales masculinos: en la pubertad son responsables del desarrollo y el crecimiento de los órganos sexuales masculinos, además del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos.
- Desarrollo de la función sexual: contribuyen a la conducta sexual masculina, la espermatogénesis y la libido, tanto en hombres como en mujeres (la corteza suprarrenal es la principal fuente de andrógenos en las mujeres).
- El desarrollo, regeneración y funcionamiento normal de las células prostáticas.
- La estimulación del anabolismo: estimulan la síntesis de proteínas, este efecto es evidente en la mayor masa muscular y ósea de los hombres.

- En la vejez, promueve el crecimiento de la zona de transición de la próstata, ocasionando problemas urinarios en los hombres al angostarse la uretra y disminuir el flujo de orina, a esto se llama hiperplasia prostática benigna (HPB) (Tortora *et al.*, 2014)

2.2 Receptor de andrógenos

El Receptor de Andrógenos (AR) es un miembro de la superfamilia de factores de transcripción dependientes de ligandos esteroideos. El AR es una proteína modular organizada en dominios funcionales; consiste en un dominio regulatorio N-terminal (NTD), un dominio de unión a DNA (DBD), un pequeño dominio bisagra (H) y un dominio de unión a ligando (LBD) (Rahman *et al.*, 2004) (Figura 4).

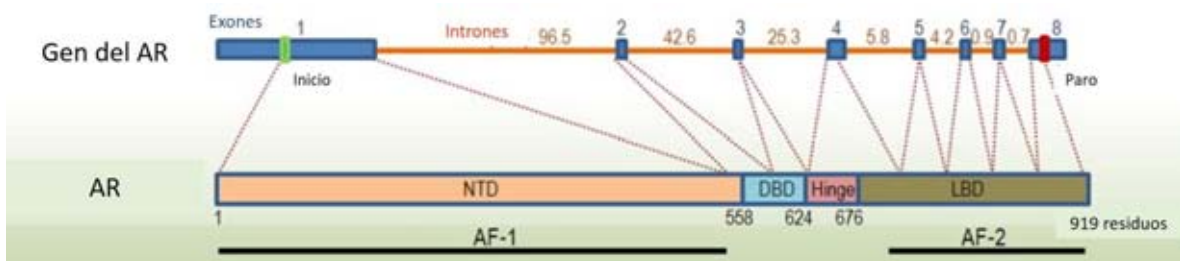


Figura 4. Estructura del Receptor de Andrógenos. (Modificada de Bennett *et al.*, 2010)

El dominio NTD del receptor de andrógenos, cambia su estructura dependiendo de su unión ya sea con proteínas o con DNA; este dominio funciona como plataforma para reclutar y ensamblar co-reguladores y miembros de la maquinaria transcripcional; contiene el sitio AF-1 (función de activación 1) que cuando es separado artificialmente del receptor funciona independientemente del ligando, creando un receptor constitutivamente activo. El dominio DBD es rico en cisteínas, contiene dos dedos de zinc, el primero de ellos tiene como función el reconocimiento de los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en los promotores o enhancers (incrementan la transcripción) de sus genes blanco (van Royen *et al.*, 2007); mientras que el segundo dedo de zinc estabiliza la unión al DNA e interviene en la dimerización del AR (Schoenmakers *et al.*, 1999). La región bisagra interactúa con la filamina A (una proteína de citoesqueleto), facilitando la traslocación del receptor al núcleo (Ozanne *et al.*, 2000). El dominio LBD contiene el sitio AF-2 (función de activación 2), el cual es dependiente de ligando, y una mutación o pérdida del sitio, disminuye

dramáticamente la actividad transcripcional de AR activado por andrógenos (Bevan *et al.*, 1999).

La activación del AR mediante la DHT induce la disociación del receptor de las proteínas de choque térmico (HSP), provocando la homodimerización del receptor, que promueve el reclutamiento de cinasas para la fosforilación de sus residuos de serina lo que permite su traslocación al núcleo. Dentro del núcleo, la unión del AR a AREs tejido específicos permite el reclutamiento de acetiltransferasas de histonas, co-reguladores y la maquinaria transcripcional (Powell *et al.*, 2004) (Figura 5), induciendo o activando la transcripción de genes que regulan funciones de crecimiento y supervivencia celular (Bennett *et al.*, 2010).

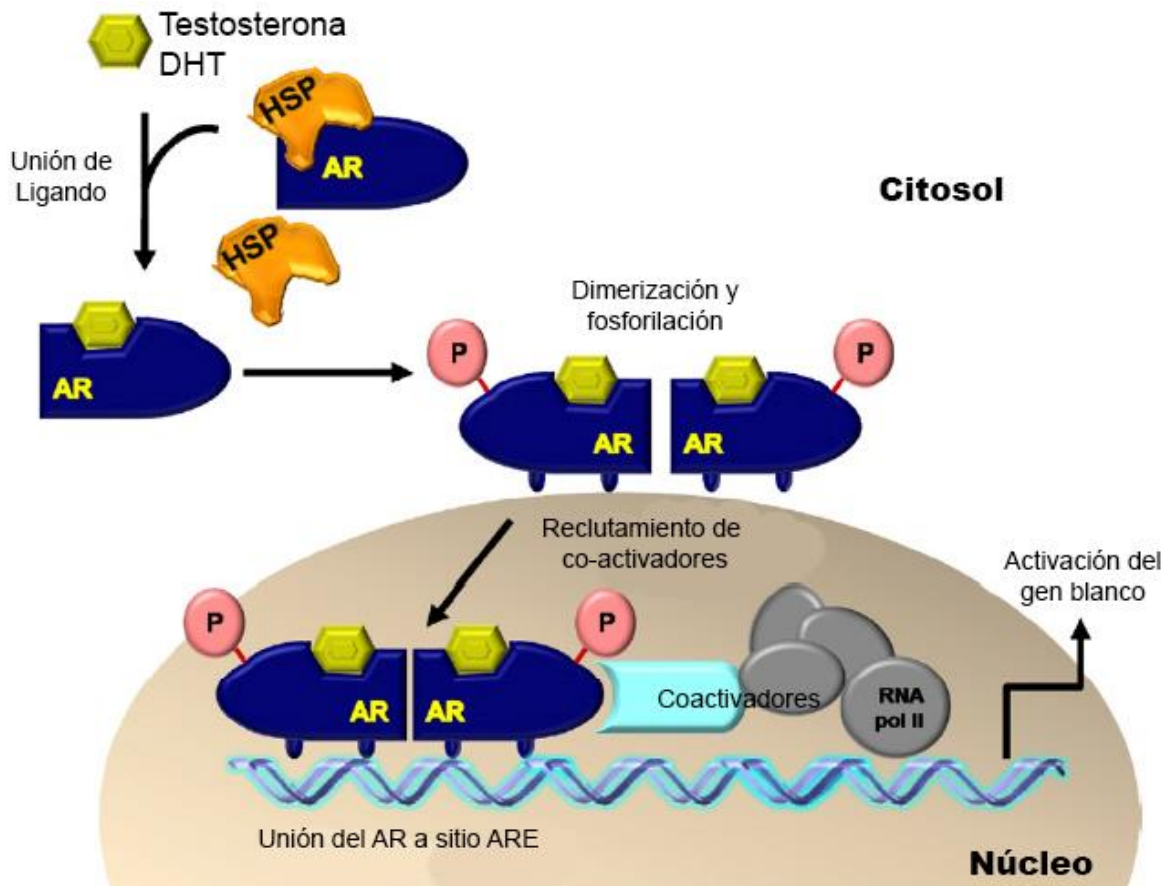


Figura 5. Mecanismo de acción de los andrógenos. La DHT disocia al receptor de las proteínas de choque térmico (HSP), provocando la homodimerización del receptor, translocándose al núcleo. Dentro del núcleo, la unión del AR a AREs tejido específicos permite el reclutamiento de acetiltransferasas de histonas, co-reguladores y la maquinaria transcripcional, lo que regula la expresión de los genes dependientes de andrógenos (Modificado de Li y Al-Azzawi, 2009)

Además de su rol como factor de transcripción, el AR promueve vías de señalización no genómicas, caracterizadas por su velocidad de respuesta (que van desde segundos hasta

minutos). La acción no genómica del AR se origina en la membrana plasmática o en el citoplasma, activando receptores acoplados a proteínas G, promoviendo la salida de calcio al espacio intracelular, y la activación de proteincinasas (Li y Al-Azzawi, 2009).

El incremento de la actividad del AR se asocia a la unión del receptor con distintos tipos de co-activadores capaces de reclutar otros factores de transcripción, como acetiltransferasas de histonas (HAT) relajando la cromatina y uniendo al AR con la maquinaria transcripcional. Las proteínas asociadas a AR (ARA) son un familia muy grande de co-activadores con funciones diversas; ARA70 es la más estudiada y estabiliza la unión entre el ligando y el AR, aumentando su especificidad (Heinlein y Chang, 2002). Por el contrario, los co-represores del AR inhiben la transcripción de los genes responsivos a andrógenos, NCoR y SMRT son los dos ejemplos más estudiados, ambos, reclutan desacetilasas de histonas (HDAC), que promueven el empaquetamiento del DNA (Liao *et al.*, 2003).

2.3 Cáncer de Próstata (CaP)

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células en el organismo. Puede aparecer prácticamente en cualquier parte del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Cuando el cáncer inicia en la próstata es llamado cáncer de próstata (CaP) (OMS, 2014).

En el 2011 la principal causa de morbilidad hospitalaria por cáncer para los hombres se debió a las neoplasias en órganos digestivos (23.9%), le siguen los tumores en órganos genitales (12.2%), siendo el de próstata el más frecuente, y los de órganos hematopoyéticos (9.8%). Según los datos de la OMS, en México durante el 2010, el cáncer de próstata era la causa número uno de mortalidad por neoplasias en hombres (Figura 6) (OMS, 2014).

Los tres factores de riesgo más importantes para desarrolla CaP son la edad, la raza y los antecedentes familiares (National Cancer Institute, 2014). La edad es un factor de riesgo importante; el CaP rara vez se ve en los hombres menores de 40 años y la incidencia aumenta rápidamente con cada década a partir de entonces. (American Cancer Society, 2014). El riesgo de CaP es más alto entre las personas de ascendencia africana, de nivel intermedio entre los caucásicos, y es el más baja entre los japoneses nativos (Altekruse, 2014). Los resultados de varios estudios genómicos sugieren que la historia familiar es un

factor de riesgo importante en el cáncer de próstata (Stanford y Ostrander, 2013; Bratt, *et al.*, 2010).

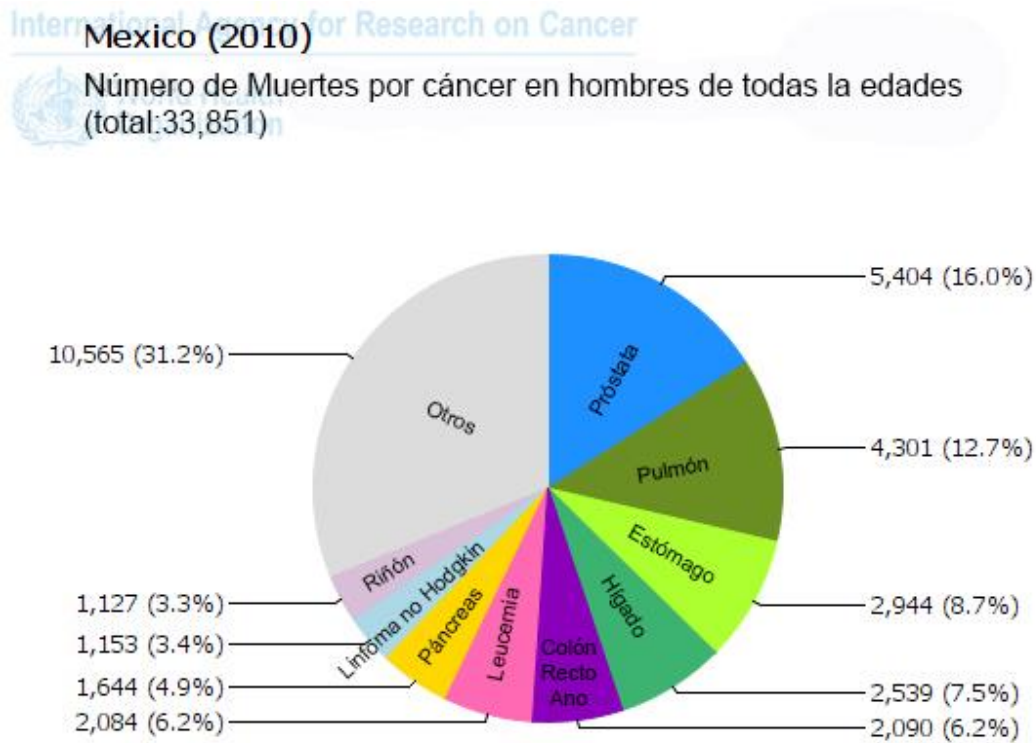


Figura 6. Número de muertes por cáncer en hombres de todas la edades en México durante el 2010. (Modificada de la base de datos de la OMS)

En la zona periférica de la próstata se desarrollan el 68% de los cánceres, en la zona central un 8% y en la zona de transición un 24%; además en la zona transicional se desarrollan la mayoría de los casos de Hiperplasia Prostática Benigna (De Marzo *et al.*, 2007) (Figura 1). La detección de cáncer en la zona periférica es posible mediante el tacto rectal, mientras que los tumores que se desarrollan en las zonas central y transicional se valoran mejor con la ecografía. El 90% de los tumores en CaP son de tipo adenocarcinoma acinar, un tipo de tumor derivado de la transformación de células del revestimiento interno en las glándulas de secreción externa. Otros tipos más raros de CaP son:

- El adenocarcinoma ductal, que inicia en las células alineadas en los ductos de la glándula prostática.

- De células escamosas, inicia en las células planas que recubren la glándula prostática.
- Tumor carcinoide, inicia en las células del sistema neuroendócrino (sistema de células nerviosas y glandulares que sintetizan hormonas y las liberan en el torrente sanguíneo), son extremadamente raros y poco agresivos.
- Sarcoma y carcinoma sarcomatoide, los sarcomas inician en células musculares que crecen rápidamente, el tipo más común en próstata es el leiomiomasarcoma. El carcinoma sarcomatoide es una mezcla de células de sarcoma y de adenocarcinoma. (Cancer Research UK, 2014)

2.3.1 Historia natural de la enfermedad

Los síntomas del cáncer de próstata son distintos en cada persona, siendo los más frecuentes: la dificultad para comenzar a orinar y flujo de orina débil o interrumpido, micción nocturna frecuente, dificultad para vaciar la vejiga por completo, dolor al orinar, sangre en la orina o el semen y dolor persistente en la espalda, las caderas o la pelvis; aunque algunos hombres no presentan ningún síntoma (CDC, 2013). Los pacientes llegan al urólogo debido a alguno de los síntomas antes mencionados; el urólogo solicita al laboratorio una cuantificación de antígeno prostático específico (APE) en sangre, si un hombre presentaba una concentración del APE mayor de 4.0 ng/mL o si se detecta una protuberancia sospechosa en el examen digital del recto, el médico recomienda una biopsia de la próstata y un ultrasonido transrectal para determinar si hay cáncer de próstata (CDC, 2013; National Cancer Institute, 2014). Cuando el CaP es detectado en etapas tempranas, este se encuentra confinado en la glándula prostática, por lo que generalmente es extirpado por métodos quirúrgicos (prostatectomía radical) (Johns Hopkins Medicine, 2015).

En etapas avanzadas, cuando el cáncer ha metastatizado, fuera de la cápsula prostática hacia el sistema linfático y la sangre, el tratamiento indicado es el bloqueo de andrógenos (Denmeade *et al.*, 1996); al igual que las células normales de próstata, las células de CaP requieren de la actividad del AR activado por andrógenos, para el desarrollo y progresión del cáncer, estimulando el crecimiento de las células cancerosas y disminuyendo su tasa de apoptosis (hace más de 70 años, se encontró que los niveles de fosfatasa ácida se reducían de manera significativa después de la castración de los pacientes con CaP

localizado y metastásico, lo que indicaba una dependencia hormonal específica para andrógenos por CaP) (Huggins y Hodges, 1941). Los fármacos tradicionalmente recetados actúan:

- Reduciendo el nivel de andrógenos circulantes (castración química).
 - Análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH): Luprolida y goserelina.
- Bloqueando la actividad del AR.
 - Antagonistas del AR: Flutamida y bicalutamida.
 - Inhibidores de la enzima 5 α reductasa: Finasterida y dutasterida (Shore *et al.*, 2012).

Sin embargo, la disminución de andrógenos no logra erradicar todas las células cancerígenas, por lo que los pacientes tienden a desarrollar resistencia al tratamiento, llegando a una etapa de la enfermedad más avanzada, el cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) (anteriormente denominado "hormorefractario" o "andrógeno-independiente") (Feldman y Feldman, 2001; Newling, 2000) (Figura 7).

2.3.1.1 Desarrollo de Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CRPC)

El CRPC se define como la progresión de la enfermedad a pesar de la disminución de los niveles de la testosterona en sangre (>5 ng/mL o >1.7nmol/L de APE). El tiempo medio de la progresión desde el cáncer dependiente de andrógenos hasta CRPC, es aproximadamente de 24 meses y la media de supervivencia es de menos de un año (Scher *et al.*, 2004). Aunque los mecanismos exactos que conllevan el desarrollo de CRPC aún no se conocen, se sabe que surge cuando las células de CaP se adaptan al ambiente sin andrógenos, cambiando a células andrógeno independientes, ya que pueden mantener la señalización del AR a pesar de los niveles bajos de andrógenos o ya no requieren la activación por esta vía para su supervivencia y proliferación (Mizokami y Namiki, 2014; Nouri *et al.*, 2014; Penning, 2015).

La reactivación del AR es un paso crítico en el desarrollo de CRPC, ya que se ha observado que muchos pacientes con CRPC aún tienen elevación de APE, lo que implica la presencia

de AR activado (Nemes *et al.*, 2014) (Figura 7). Por ello se han propuesto varios mecanismos para la reactivación del receptor:

- Hipersensibilidad. El AR aumenta su capacidad para unirse a niveles inferiores de andrógenos que circulan dentro del cuerpo, así como la disminución del umbral de andrógenos necesarios para la proliferación y supervivencia celular. Se consideran tres vías de hipersensibilidad:
 - Sobreexpresión de AR. Se puede deber a una de las aberraciones genéticas que ocurren en CRPC (80% de los casos presentan un mayor número de copias del gen y 30% exhiben un mayor nivel de expresión) (Waltering *et al.*, 2012; Morken *et al.*, 2014).
 - Aumento de la estabilidad del AR, cuando los niveles de algunos co-activadores del AR como SRC2, SRC3 y ARA70 aumentan, y los niveles de algunos co-represores del AR como el Ebp1 (enhancer binding protein) disminuyen, se facilita la activación del receptor aún con bajos niveles de andrógenos en circulación (Gregory *et al.*, 2001; Chmelar *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008).
 - Síntesis intrácina de andrógenos, algunas células de CRPC pueden sintetizar andrógenos por sí mismas a partir del colesterol y otros precursores (Mitsiades, 2013; Nelson, 2012).
- Mutaciones en el AR, alteraciones estructurales en el receptor, principalmente mutaciones en LBD, que permiten la activación independiente de hormonas del AR inducidas por factores de crecimiento (IGF-I, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento epidérmico) y neuropéptidos (neurotensina, bombesina) (Navarro *et al.*, 2002; Hvamstad *et al.*, 2003).
- Isoformas del AR, variantes de splicing que carecen del LBD, por lo que son receptores constitutivamente activos (Dehm y Tindall, 2011).
- Modificaciones post-traduccionales del AR, la desregulación del factor de crecimiento epidérmico, induce la fosforilación de la Serina 578 del AR (Ponguta *et al.*, 2008); mientras que la tirosina cinasa Src, fosforila tirosinas del receptor (Guo *et al.*, 2006), ambas modificaciones son frecuentes en tumores resistentes a castración (Knudsen y Penning, 2010)

- Otras rutas. Por medio de la activación de vías que inhiben la apoptosis en ausencia de andrógenos, como la sobreexpresión de *BCL2*, *BCLX* o *MCL1*, genes que inhiben la apoptosis (Heinlein y Chang, 2004, Rashid y Chaudhary, 2004).

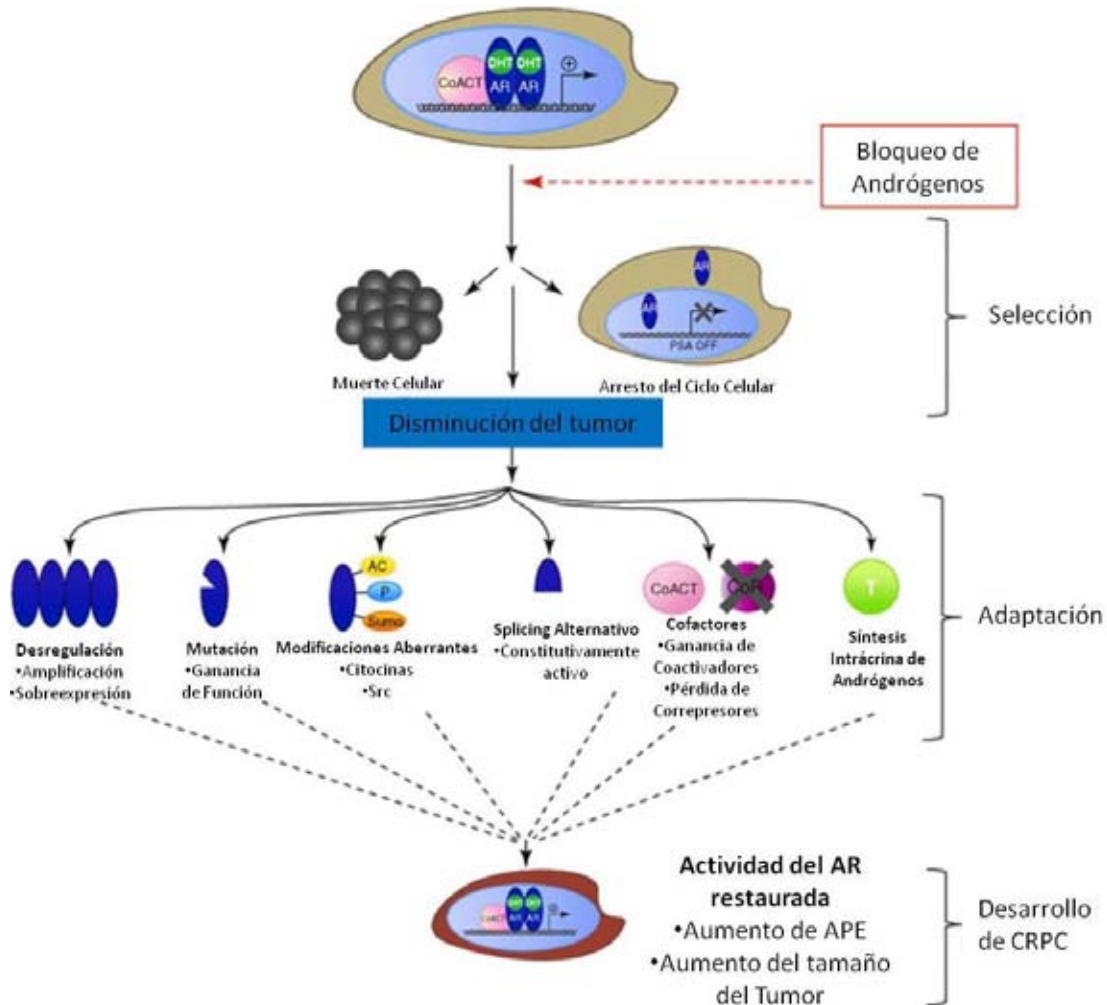


Figura 7. Desarrollo de CRPC. Cuando el cáncer ha metastatizado fuera de la cápsula prostática, el tratamiento indicado es el bloqueo de andrógenos, el cuál promueve la muerte celular de las células dependientes de andrógenos, disminuyendo el tamaño del tumor; sin embargo no todas las células mueren ya que éstas se adaptan a la depleción androgénica, lo que conlleva al desarrollo del Cáncer de Próstata Resistente a Andrógenos (Modificado de Knudsen y Penning, 2010)

Además de la reactivación del AR en CRPC la progresión de la enfermedad también es consecuencia de las diferentes clonas de células tumorales que se desarrollan como respuesta adaptativa de las células de CaP a la terapia, que se dan por procesos de plasticidad epitelio-mesénquimal (EMP) y de diferenciación neuroendócrina (NED) (Nouri *et al.*, 2014). El término NED se refiere al incremento de células neuroendócrinas aisladas, o en grupos pequeños, en CaP (Sun *et al.*, 2009); NED generalmente se determina por

medio de la inmunoreactividad de las muestras de tejido de CaP para algunos marcadores neuroendócrinos como la enolasa neural específica o enolasa 2 (ENO2) y la cromogranina A (di Sant'Agnesse, 1992), en pacientes, los niveles elevados de cromogranina A sérica es un signo altamente relacionado a un mal pronóstico (Berruti *et al.*, 2001). Se ha observado que los niveles de NED en pacientes que han recibido la terapia de depleción androgénica por más de 13 meses son mayores que en aquellos que recibieron terapia por menos de 12 meses (Ito *et al.*, 2001; Hirano *et al.*, 2004). Además se ha observado en ensayos *in vivo*, que la depleción androgénica de ratones desnudos con xenoinjertos de líneas celulares de adenocarcinoma prostático (LNCaP, PC-295, CWR22, y PC-310), incrementa el número de células de CaP que expresan marcadores neuroendócrinos (Burchardt *et al.*, 1999; Jongsma *et al.*, 1999; Jongsma *et al.*, 2000; Huss *et al.*, 2004); éste fenómeno también ocurre en ratones con xenoinjertos de células de pacientes con CaP (Lin *et al.*, 2014).

2.3.1.2 Células Neuroendócrinas en CRPC

En algunos pacientes con CRPC, eventualmente las células de CaP adquieren un fenotipo independiente del AR, en el que expresan niveles casi nulos del receptor y niveles elevados de marcadores neuroendócrinos; como el Cáncer de Próstata Neuroendócrino (NePC) que es un tipo raro de tumor en cuanto a cánceres primarios, pero que se desarrolla con frecuencia en respuesta al tratamiento de inhibición de andrógenos (Epstein *et al.*, 2014; Humphrey, 2012; Mosquera *et al.*, 2013). Las células de NePC son negativas a AR y positivas a marcadores neuroendócrinos, consecuencia de la diferenciación neuroendócrina, es diagnosticado en una etapa más avanzada de la enfermedad, con metástasis a vísceras y es asociado con una esperanza de vida muy corta (Beltran *et al.*, 2014). Con mayor frecuencia se han observado tumores mixtos, con células tanto positivas a AR como negativas a AR (Beltran *et al.*, 2014).

Actualmente no hay un consenso sobre el origen de las células presentes en NePC (Figura 8), ya que las células neuroendócrinas son quiescentes y las células presentes en NePC tienen una tasa de proliferación alta; para ello se ha propuesto tres posibles mecanismos por los cuales se lleva a cabo la diferenciación neuroendócrina; el primer mecanismo propuesto dice que las células provienen del sistema neuroendócrino difuso, y no de las células embebidas en el epitelio glandular (Heldpap y Kollermann, 1999), éste mecanismo

ha sido descartado por la falta de pruebas, el segundo propone que provienen de la diferenciación de células troncales dentro de la próstata, incrementando una población celular con un fenotipo similar a las células neuroendócrinas (NE-like) (Maitland y Collins, 2008; Stein *et al.*, 2008); y finalmente el último mecanismo propone la transdiferenciación de la células epiteliales a células NE-like, en que una célula totalmente diferenciada puede cambiar a otro fenotipo totalmente diferenciado sin generar intermediarios troncales (Carcel-Trullols, 2012), en este caso es una transición epitelial-neuroendócrina (Wright *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2007; Beltran *et al.*, 2014).

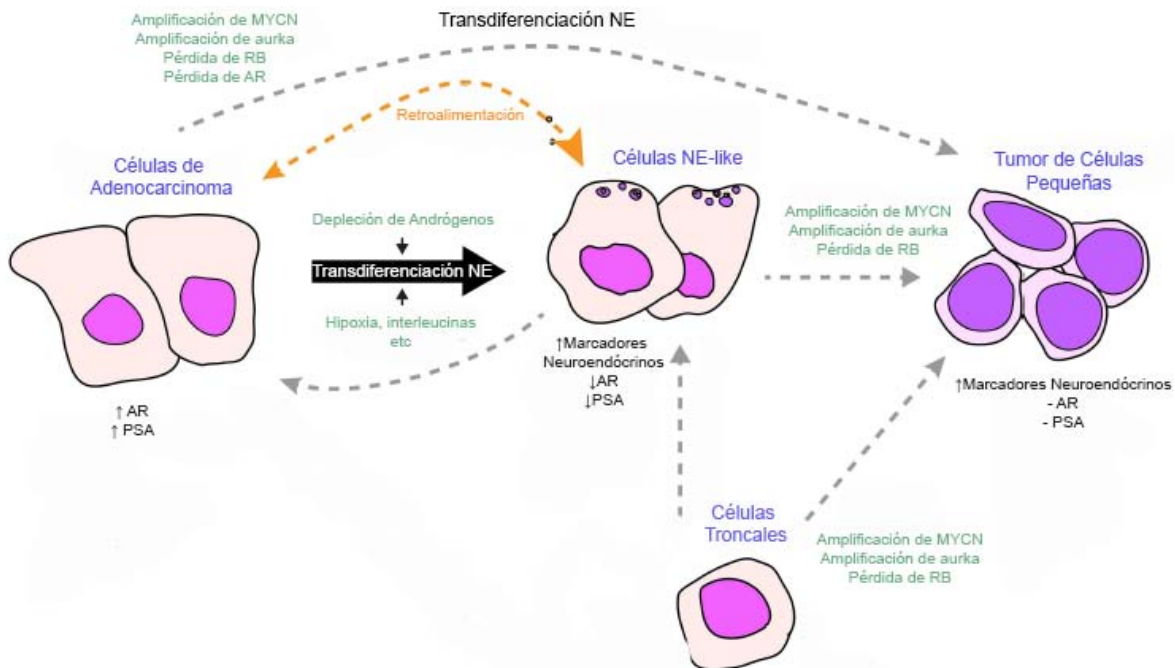


Figura 8. Esquema de los dos posibles mecanismos del incremento del fenotipo NE en la progresión del tumor en CaP. Transdiferenciación neuroendócrina: Algunas células de adenocarcinoma, después de la depleción androgénica, cambian su patrón de expresión génica en respuesta a la presión evolutiva, transdiferenciándose a células NE-like; Diferenciación de células troncales: células troncales presentes en el tumor se diferencian en un fenotipo NE-like o epitelial. La sobreexpresión de genes como AURKA y MYCN, así como la pérdida de RB en las células NE-like, podrían promover la expansión de las poblaciones de este tipo celular, formando tumores de células pequeñas. (Modificado de Terry y Beltran, 2014)

Las células NE-like comparten similitudes morfológicas (proyecciones dendríticas), así como propiedades bioquímicas con las células neuroendócrinas normales, incluyendo la ausencia de AR y APE y la expresión de marcadores neuroendócrinos como la enolasa (ENO2), cromogranina A y B, y algunos neuropéptidos: como la bombesina, la neurotensina, la serotonina, TSH (tirotrópica), y la PTHrP (proteína relacionada con la hormona paratiroidea) que poseen actividad asociada a la proliferación del tumor, su

transformación, y metástasis (Abrahamsson, 1999); también hay diferencias entre estos tipos celulares, como la expresión de marcadores epiteliales (como la fosfatasa ácida prostática, la citoqueratinas 8 y 18, moléculas de adhesión y marcadores de proliferación), *Bcl-2* (un oncogen) y AMACR (un biomarcador de CaP) en células NE-like (Vashchenko y Abrahamsson, 2005; Yuan *et al.*, 2006), los cuáles no se expresan en células NE, sin embargo, este tipo celular expresa marcadores basales como la citoqueratina 5 (Schalken y van Leenders, 2003; Hudson, 2004).

Existen diversas evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* de transdiferenciación neuroendócrina; cuando se inhibe la expresión de AR en la línea celular de adenocarcinoma prostático dependiente de andrógenos LNCaP, esta adquiere un fenotipo NE-like, observado por la presencia de proyecciones similares a dendritas y de granulos citoplasmáticos (Wright *et al.*, 2003), este fenómeno también se observa cuando estas células se mantienen durante largos periodos en un medio libre de andrógenos (Horoszewicz *et al.*, 1983; Shen *et al.*, 1997; Culig *et al.*, 1999; Zelivianski *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2006), o son expuestas algunas citocinas (IL6, IL8 y EGF de unión a la heparina) (Mori *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2014). Estos cambios morfológicos se ven acompañados de un incremento en la expresión de marcadores neuroendócrinos y un descenso en los niveles de AR y APE. La diferenciación neuroendócrina aumenta conforme empeora el estado del CaP (Guate *et al.*, 1997), y es más frecuente en las metástasis óseas que en el foco del tumor primario, sugiriendo que durante el proceso de metástasis ocurre transdiferenciación de las células de CaP (Cheville *et al.*, 2002).

Mediante estudios comparativos del transcriptoma de adenocarcinoma de próstata y tumores CRPC con diferenciación neuroendócrina, se descubrió que proto-oncogenes como AURKA (Aurora cinasa A) y MYCN se encuentran sobreexpresados en los tumores de diferenciación neuroendócrina, mientras que el supresor de tumor RB (retinoblastoma), se pierde en este tipo de tumores (Terry y Beltran, 2014).

2.3.2 Neuropéptidos en cáncer de próstata

Las células neuroendocrinas se caracterizan por sus gránulos neurosecretorios, por la expresión de marcadores neuronales antes mencionados y de neuropéptidos mitogénicos

como la bombesina (también llamada péptido liberador de gastrina GRP), somatostatina, calcitonina y PTHrP; la mayoría de los receptores de éstos neuropéptidos están acoplados a proteínas G, por lo que dentro de la célula activan la adenilciclase para aumentar los niveles de cAMP o la fosfocinasa C para incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular. Se sabe que los neuropéptidos funcionan de manera paracrina y autocrina como factores de crecimiento en algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de próstata (Jongsma *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2009). En cáncer de próstata se ha visto que la bombesina promueve el crecimiento celular y migración en células PC-3 (Aprikian *et al.*, 1998), mientras que la bombesina y la neurotensina en LNCaP promueven la independencia de andrógenos (Lee *et al.*, 2001).

2.3.3 Ácido gamma-aminobutírico (GABA) en cáncer de próstata

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es un importante aminoácido, y el neurotransmisor inhibitorio más importante del sistema nervioso central, es sintetizado a partir de glutamato, a partir de la glutamato descarboxilasa (GAD); controla la secreción en órganos periféricos y a través de los receptores GABA_A afecta el desarrollo celular (proliferación, migración y diferenciación). Particularmente GABA controla la proliferación de muchos tipos celulares, incluyendo las células troncales (Young y Bordey, 2009). Además GABA ha surgido como una molécula de señalización en tumores cerebrales y en la periferia, además de controlar la proliferación de las células cancerígenas (Szczaurka *et al.*, 2002).

Es sabido que en condiciones normales y en condiciones de CaP en la próstata, existe la influencia de la vía GABAérgica, siendo las células neuroendócrinas las que producen el neurotransmisor GABA y tiene receptores GABA_A , los cuáles se ven sobreexpresados en NePC, lo que induce la proliferación celular (Napoleone *et al.*, 1990; Ippolito *et al.*, 2006, Abdul *et al.*, 2008). Los pacientes con CaP metastásico expresan más GABA y GAD en comparación con aquellos sin metástasis o casos con hiperplasia prostática benigna (Azuma *et al.*, 2003). Además el uso de picrotixin (un antagonista de GABA_A) inhibe el crecimiento de células de CaP y la aplicación de agonistas de los receptores GABA_A a varias líneas celulares de próstata aumento la tasa de proliferación (Ippolito *et al.*, 2006).

3. Justificación

El cáncer de próstata representa en México la primera causa de muerte por neoplasias en varones, por lo que es muy importante el estudio de los mecanismos que conllevan al desarrollo de una etapa avanzada de la enfermedad, el cáncer de próstata resistente a castración (CRPC), el cual representa un mal pronóstico para los pacientes. En diversos estudios se han utilizado líneas celulares de CaP para el estudio de los procesos moleculares que promueven el crecimiento de células de CRPC, por ejemplo la línea celular LNCaP la cual es dependiente de andrógenos, sin embargo la disminución de andrógenos hace que estas células cambien (transdiferenciación) a un fenotipo similar a células neuroendócrinas (NE-like), al incrementar la expresión de marcadores neuroendócrinos y observarse un cambio en la morfología celular; esto implica que el proceso de transdiferenciación neuroendócrina (NE) representa una respuesta temprana a la inactivación de AR en el tratamiento de CaP; por lo que es importante estandarizar un modelo *in vitro* de transdiferenciación neuroendócrina para poder elucidar el mecanismo por el que se lleva a cabo el proceso, y poder encontrar nuevos marcadores de la enfermedad para el diagnóstico y nuevos blancos farmacológicos para un mejor tratamiento para los pacientes.

4. Hipótesis

Si se suprime el receptor de andrógenos en células LNCaP, se inducirá la transdiferenciación neuroendócrina de las células y aumentará la expresión de marcadores neuroendócrinos, así como la disminución en la expresión de *KLK3*.

5. Objetivos

5.3 Objetivo General

Estandarizar el modelo *in vitro* de transdiferenciación de células LNCaP a células con un fenotipo neuroendócrino (NE-like) mediante la supresión del receptor de andrógenos.

5.4 Objetivos Particulares

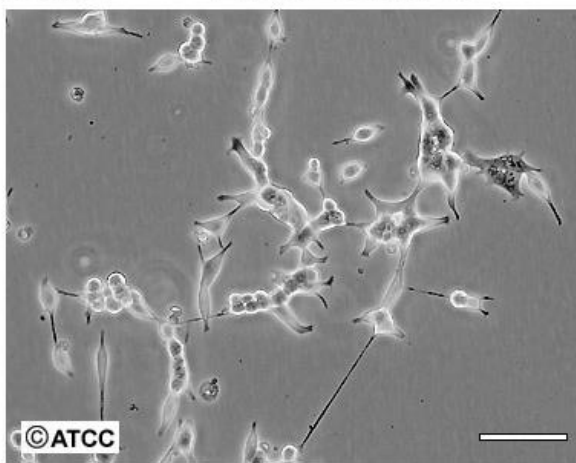
- Estandarizar la transfección de un siRNA del AR (siAR) en la línea celular LNCaP.
- Observar los cambios fenotípicos de las células LNCaP a diferentes tiempos de la transfección.
- Determinar los tiempos adecuados de respuesta a la transfección mediante la cuantificación de la expresión del receptor de andrógenos y uno de los genes cuya transcripción es activada por el AR, el *KLK3*, a nivel transcripcional.
- Cuantificar la expresión del marcador neuroendócrino enolasa 2.
- Cuantificar la expresión de la glutamato descarboxilasa, como un posible marcador de transdiferenciación neuroendócrina.

6. Materiales y Métodos

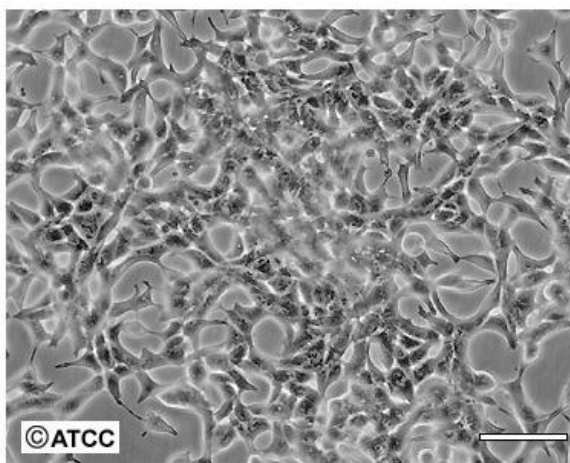
6.1 Cultivo Celular

Para el modelo experimental, se usó la línea celular LNCaP del ATCC (American Type Culture Collection), son células hipotetraploides, derivadas de metástasis de carcinoma prostático al nódulo linfático; tienen una morfología epitelial, son positivas a AR y ER (receptor de estrógenos), son responsivas a la DHT, produce APE y fosfatasa ácida prostática, son adherentes y no producen una capa celular uniforme, su tiempo de duplicación es de 34 horas (Figura 9).

Número ATCC: **CRL-1740**
Nombre: **LNCaP clona FGC**



Baja Densidad



Alta Densidad

Figura 9. Células de LNCaP al microscopio. Escala de la barra 100µm. Imagen tomada del ATCC.

Para determinar las condiciones necesarias para el control del diseño experimental, se comparó el efecto del medio RPMI sin rojo de fenol + 10% FBS con el efecto del medio RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS en las células, durante la transfección de las células con siRNA, se uso RPMI sin rojo de fenol debido a que ya que se ha observado que el rojo de fenol tiene un parecido estructural con algunos estrógenos no esteroideos y tiene actividad estrogénica significativa en las concentraciones en la que se encuentra en el medio de cultivo y las células LNCaP expresan receptor de estrógenos (Berthois *et al.*, 1986); se siguió el esquema de la Figura 10, utilizando 6 cajas de 6 pozos; al tiempo -72h, a la mitad de los pozos se le cambió por el medio RPMI sin rojo de fenol + 10% FBS y a la otra mitad por el medio RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS. Se siguieron todas la condiciones descritas en el esquema, a

excepción de que en el tiempo 0h, solo se cambió el medio a todos los pozos por RPMI sin rojo de fenol pero sin transfectar; demás que desde el tiempo 0h hasta las 120h, se extrajo el RNA cada 24 horas de cada condición, por triplicado.

- Se sembraron células LNCaP en placas de cultivo celular de 100mm x 20mm con 8mL de medio RPMI con rojo de fenol (Sigma Aldrich), suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) (Gibco®), se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.
- Se sembraron cajas de 6 pozos con recubrimiento de Poly-D-lisina (Greiner bio-one), con 150'000 células y 2mL de medio RPMI con rojo de fenol + 10% FBS por pozo.
- 48 horas después, se lavaron las células con PBS 1x y se cambió el medio por RPMI sin rojo de fenol suplementado con 10% FBS tratado con carbón activado (CS FBS) (Gibco®) (el cuál es un suero filtrado con carbón activado, el cual remueve agentes no polares tal como agentes lipofílicos como virus, algunos factores de crecimiento, hormonas y citocinas, independientemente de su peso molecular, este tratamiento tiene poco efecto en los niveles de sales, glucosa, aminoácidos, etc), se conservaron en este medio por 72 horas.
- Para los controles del experimento (FBS) se usaron 3 cajas, a las que no se les cambió el medio, por lo que se dejaron en medio RPMI sin rojo de fenol + 10% FBS durante las siguientes 72 horas.

6.2 Inhibición del AR

- Para abatir la expresión del AR, se transfectaron las células sembradas en RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS, con dos diferentes siRNA comerciales: un control negativo de transfección (Negativo) y uno específico para el receptor de andrógenos (siAR s1538) (Thermo Fisher Scientific), con una concentración final de 12.5nM, con 3µL de reactivo de transfección DharmaFECT 2 Transfection Reagent (Dharmacon), y en un volumen total de 2mL, usando el medio RPMI sin rojo de fenol y sin ningún tipo de suero como medio; para cada condición se evaluaron los tiempos 24, 48, 72, 96 y 120 horas, por triplicado. 24 horas después de la transfección se lavaron las

células con PBS, y se cambió nuevamente el medio por medio RPMI sin rojo de fenol +10% CS FBS, se cambió el medio cada 24 horas con las cajas restantes.

- Se extrajeron las células de 3 pozos en medio RPMI sin rojo de fenol 10% FBS el día de la transfección (las muestras obtenidas corresponden al tiempo 0) con una solución de Tripsina al 1% (Trypsin 10x de Gibco®), a los pozos del (control) FBS, se les cambió el medio por RPMI sin rojo de fenol y sin ningún tipo de suero; 24 horas después de la transfección, se lavaron las células con PBS y se cambió el medio por RPMI sin rojo de fenol + 10% FBS; se cambió cada 24 horas con las cajas restantes (Figura 10).

6.3 Extracción de RNA total

Se extrajo RNA total de la células usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada 24 horas se cosecharon las células del grupo FBS (LNCaP en medio RPMI sin rojo de fenol 10% FBS), las células transfectadas con siAR (en medio RPMI sin rojo de fenol 10% CS FBS) y las células transfectadas con el control negativo (en medio RPMI sin rojo de fenol 10% CS FBS).

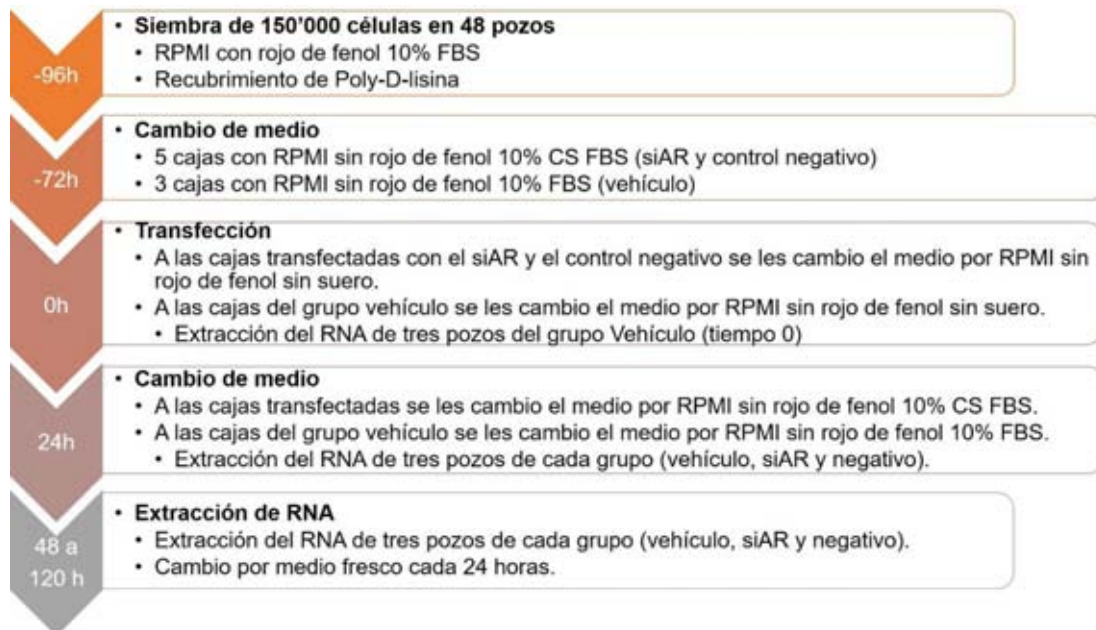


Figura 10. Esquema para la preparación de las células para la transfección. Se detalla el número de cajas sembradas por cada grupo experimental, así como los días en que se cambiaba el medio de las células.

Se cuantificó la concentración de RNA de cada muestra con el NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific™) y se conservaron a -80°C. Para conocer la calidad del RNA obtenido se realizó la electroforesis de 1µL de las muestras del control del experimento en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. La integridad de las muestras de RNA, fueron analizadas con el Chip Eukaryote Total RNA Nano (Agilent) para obtener su RIN (Número de Integridad del RNA) (Anexo II). El RIN es un algoritmo empleado para calcular la integridad del RNA, a partir de las mediciones de la subunidades ribosomales 28S y 18S, por medio de electroferogramas obtenidos con una separación electroforética en microcapilar (Schroeder *et al.*, 2006).

6.4 Retrotranscripción

Se realizó una reacción de retrotranscripción, a fin de obtener cDNA a partir de 1µg de RNA de las muestras, con el kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.5 qPCR

Se preparó la reacción con TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), con 1µL del cDNA obtenido de la retrotranscripción, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron las sondas TaqMan®: Hs02758991_g1 (*GAPDH*) como control endógeno, Hs00171172_m1 (*AR*), Hs01105076_m1 (*KLK3*) un gen responsivo a la actividad de AR que codifica para la proteína APE, HS01065893_m1 (*GAD1*) y Hs00157360_m1 (*ENO2*), estos últimos como marcadores neuroendócrinos. Se llevó a cabo la reacción en el sistema ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

6.6 Cálculo de la expresión relativa de los genes analizados

Por medio del Ct se puede saber en que ciclo la fluorescencia de la reacción de qPCR sobrepasa el umbral, y así poder comparar la expresión de un gen de interés en función de un gen constitutivo (en este caso *GAPDH*), mediante la diferencia de ambos valores Ct:

$$\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gen constitutivo}}$$

Para normalizar los resultados se calcula la diferencia entre los valores de ΔCt , de la muestra y el control negativo (tiempo 0):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{tiempo 0}}$$

Finalmente se determina la expresión relativa del gen de interés, calculando el antilogaritmo base 2 de $-\Delta\Delta Ct$:

$$\text{Expresión relativa del gen de interés: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

6.7 Análisis Estadístico

A través del programa GraphPad Prism Software, se analizaron los promedios y desviaciones estándar de las $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculadas. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía y T de Tukey.

7. Resultados

7.1 Cultivo celular en medio suplementado con FBS y CS FBS

Se observaron las células al microscopio, para determinar si había un cambio en la morfología celular. Al tiempo de 0h no hubo ningún cambio evidente. Sin embargo, incremento la tasa proliferación en las células con RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS, aunque no se cuantificó. Al tiempo 120h se observó un cambio en la morfología de las células con RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS, ya que estas desarrollaban proyecciones dendríticas (señaladas con flechas rojas), características de las células NE-like (figura 11).

Se extrajo el RNA total de las células, y se compararon los niveles de expresión de los marcadores epiteliales (*AR* y *KLK3*) y neuroendócrinos (*ENO2* y *GAD1*). La expresión relativa del *AR* en células con FBS y en células con CS FBS, no es significativamente diferente entre ambos grupos al tiempo 0h; en células con FBS disminuye significativamente a partir de las 24h respecto a las muestras del mismo grupo al tiempo 0h. Sin embargo, no hay diferencia significativa entre las muestras que van desde las 24h hasta las 120h; mientras que en las células sembradas con CS FBS disminuyen significativamente los niveles del *AR* a partir de las 48h respecto a las muestras al tiempo 0h, además no hay diferencia significativa entre las muestras del grupo que van desde el tiempo 48h hasta las 120h (figura 12.a).

En cuanto a la expresión del gen *KLK3*, en las células sembradas con FBS al tiempo 0h, la expresión es significativamente diferente al resto de las muestras analizadas, en las células en FBS, se mantiene una expresión constante del *KLK3*, al no haber diferencia significativa entre los valores del grupo que van desde el tiempo 24h hasta las 120h; mientras que en las células sembradas con CS FBS, los niveles de *KLK3* disminuyeron significativamente entre las muestras al tiempo 0h y las 24h, además no hay diferencia significativa entre las muestras del grupo que van desde el tiempo 24h hasta las 120h (figura 12.b).

En el caso de la expresión del marcador neuroendócrino *ENO2*, en las células en FBS no hay un incremento significativo en la expresión del gen durante el tiempo monitoreado; mientras que en las células con CS FBS, la expresión relativa de *ENO2* incrementa a partir de las 96h respecto al tiempo 0h del mismo grupo, aunque estos valores son significativamente mayores a partir de las 72h respecto al tiempo 0h del grupo en FBS (figura 12.c).

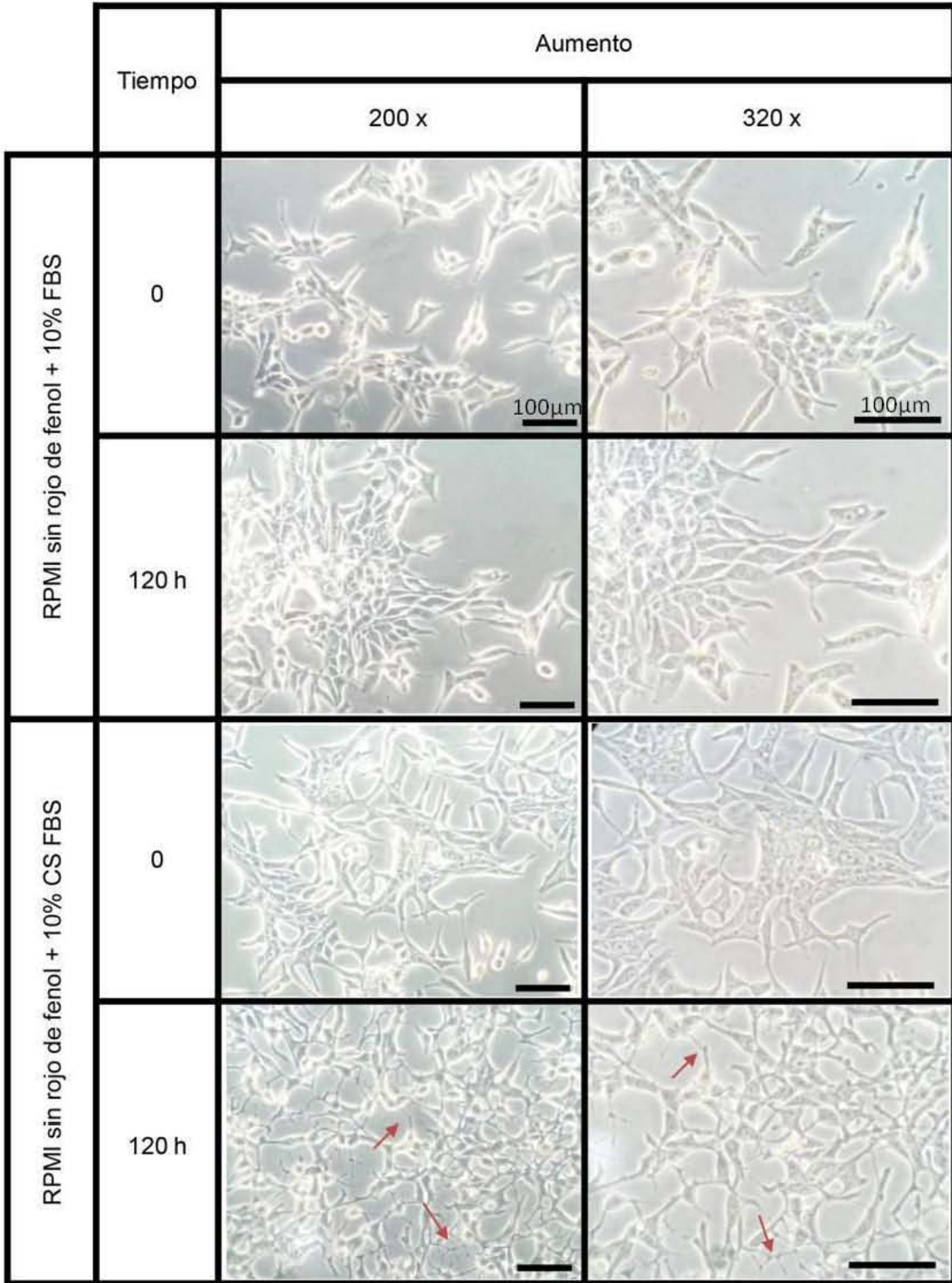


Figura 11. Cambio morfológico de las células. Comparación al microscopio entre las células LNCaP en RPMI sin rojo de fenol con 10% FBS (cuadros superiores) y 10% de CS FBS (imágenes inferiores). Con flechas rojas se señalan proyecciones dendríticas.

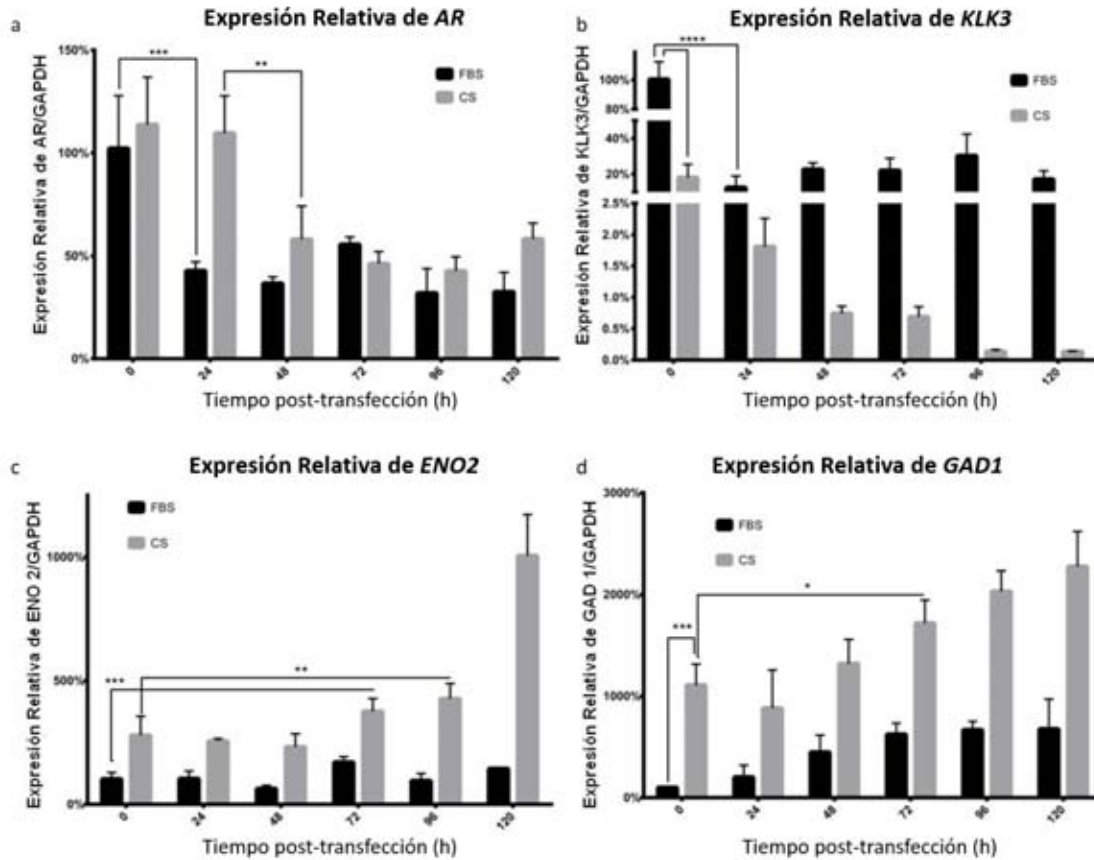


Figura 12. Expresión relativa de los genes AR (a), KLK3 (b), ENO2 (c) y GAD1 (d), de las células sembradas en RPMI sin rojo de fenol + 10% FBS (barras negras) y el medio RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS (barras grises) n=3.

Para la expresión de *GAD1*, en las células en FBS no hay un incremento significativo en la expresión del gen durante el tiempo monitoreado; mientras que en las células con CS FBS, la expresión relativa de *ENO2* incrementa significativamente a partir de las 72h respecto al tiempo 0h del mismo grupo, aunque estos valores son significativamente mayores a partir del tiempo 0h respecto al tiempo 0h del grupo en FBS (figura 12.d).

En base a estos resultados se decidió usar las muestras de RNA obtenidas de células sembradas con RPMI sin rojo de fenol + 10% FBS como control del experimento (grupo FBS), ya que no hay ningún cambio en su morfología durante el tiempo monitoreado, y los valores de expresión relativa de los marcadores epiteliales aunque varían, se mantienen constantes después de las 24h, una vez que se agrega suero nuevamente al medio; mientras que los marcadores neuroendócrinos no aumentan su expresión significativamente, durante el tiempo en el que se llevará a cabo el resto del experimento.

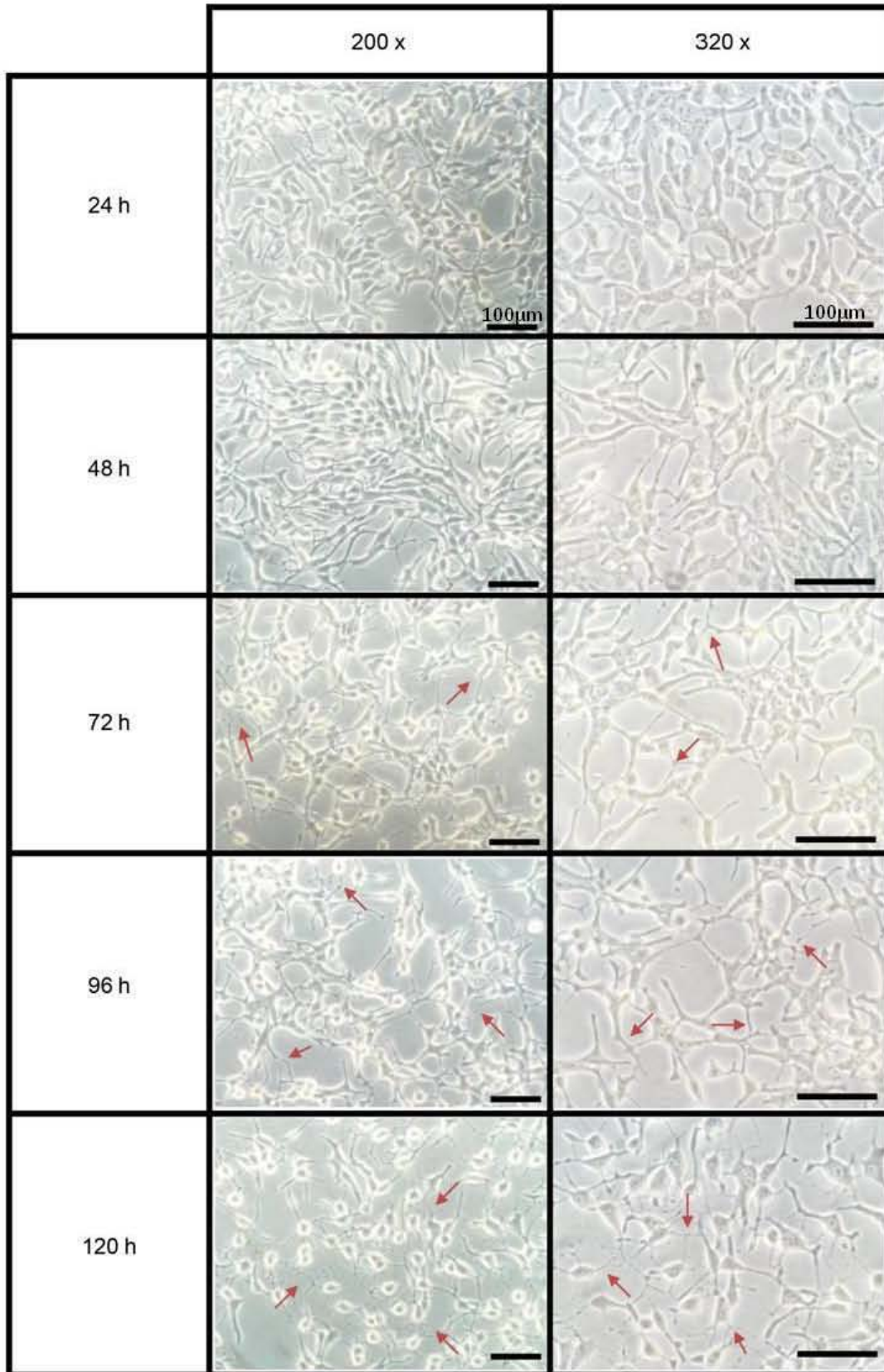


Figura 13. Curso temporal de las células transfectadas con siAR, desde las 24 a las 120 horas.
 Las proyecciones dendríticas están señaladas con flechas rojas. Escala de la barra 100µm.

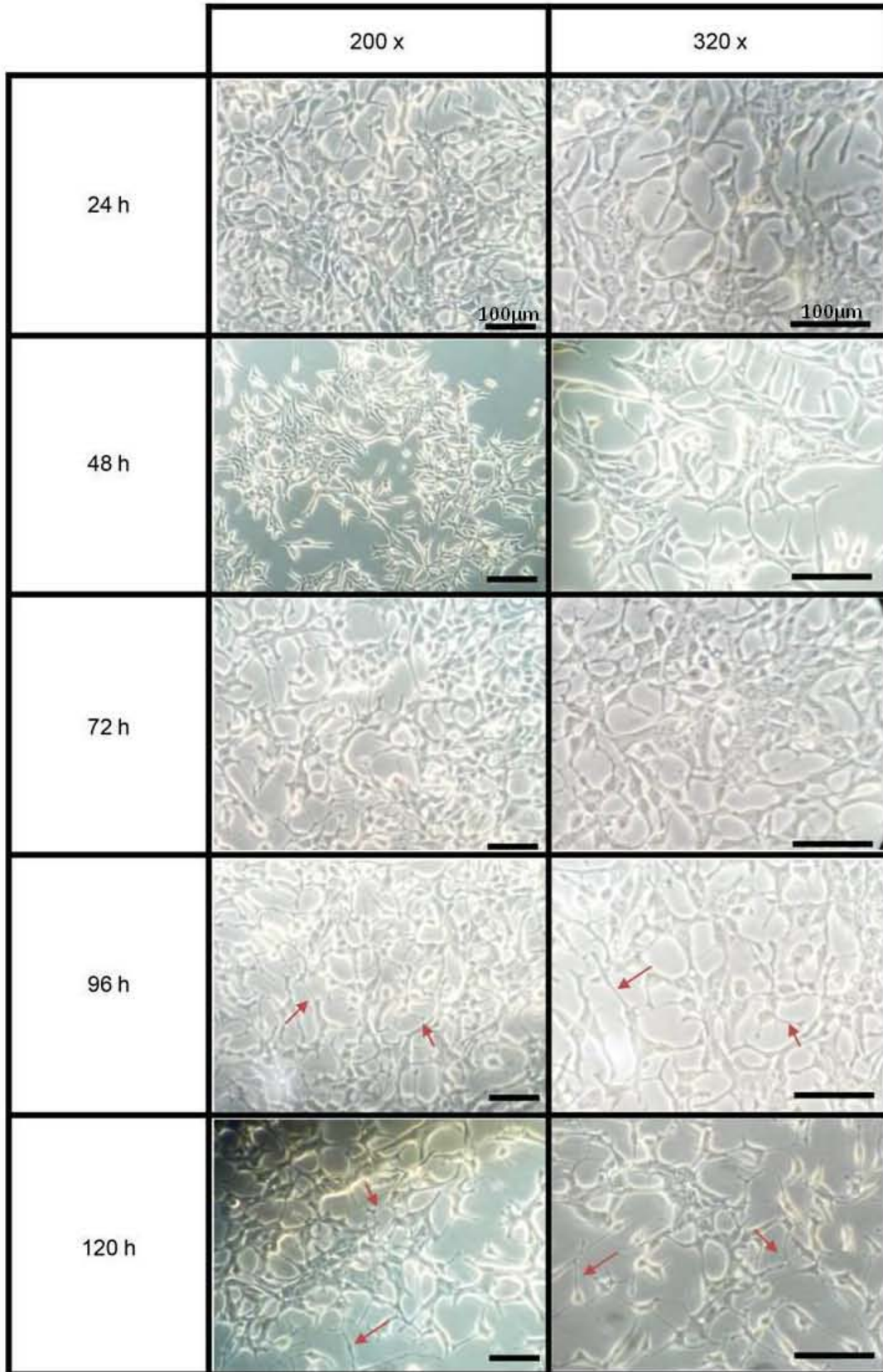


Figura 14. Curso temporal de las células transfectadas con la secuencia azarosa (control Negativo), desde las 24 a las 120 horas. Las proyecciones dendríticas están señaladas con flechas rojas. Escala de la barra 100µm.

7.2 Cambios morfológicos en la células con el AR silenciado

Para determinar la contribución del AR en la transdiferenciación neuroendócrina, se realizó la transfección de las células LNCaP según lo descrito en la Figura 9, con un siRNA (siAR) para disminuir su expresión, paralelamente se transfectaron células con el siRNA de secuencia azarosa, como control negativo de la transfección. El primer parámetro que se comparó fueron los cambios morfológicos al microscopio, en las células transfectadas con el siAR, al tiempo 0h no hay cambios morfológicos evidentes respecto a las células del grupo FBS, sin embargo a partir de las 72 h, empezó a observarse un cambio en la morfología de algunas células LNCaP, al empezar a formar proyecciones dendríticas, este cambio es más notorio a las 120 h (Figura 13). En las células del control negativo, no se observó cambio en su morfología hasta las 96 horas, aunque no es tan marcado como en el caso de las células transfectadas con siAR (Figura 14).

7.3 Expresión relativa del AR y *KLK3*

Se extrajo el RNA total de las células de los dos grupos experimentales el siAR (células transfectadas con el siAR en RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS) y el control negativo (células transfectadas con una secuencia azarosa en RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS) y del grupo FBS (células en RPMI sin rojo de fenol + 10% FBS). Se cuantificó el RNA, y se realizó un RT PCR con 1µg de RNA.

Para poder confirmar la inhibición del AR, se realizó una qPCR para cuantificar los niveles de expresión del mRNA del receptor en los tres grupos experimentales; además evaluamos la expresión de un gen responsivo a la actividad del AR al contener un sitio ARE, el gen *KLK3* que se traduce en la proteína del APE.

En la figura 15.a, los niveles de expresión del receptor de andrógenos, en las muestras del grupo siAR, decrecen a lo largo del ensayo a partir de las 24h, después de la transfección la diferencia entre el grupo siAR y el tiempo 0 es significativa; sin embargo, en el control (FBS) también decrece a las 24h (durante ese tiempo el medio no tenía suero), siendo significativo respecto al tiempo 0. La diferencia entre la expresión del grupo siAR y el control (FBS) a los mismos tiempos, sólo es significativa de las 24 a las 72h. La diferencia entre el control negativo y el tiempo 0 fue significativa desde las 24 hasta las 72h. Sin embargo, la

expresión relativa del *AR* en el control negativo aumentó al tiempo 96 y 120h, siendo significativo respecto a muestras del mismo grupo en tiempos inferiores, además de dejar de ser significativa la diferencia respecto al tiempo 0.

En el caso del análisis de la expresión del gen *KLK3* (figura 15.b), después del tiempo 0 disminuye significativamente la expresión del *KLK3*, incluso el control FBS (barras negras). A pesar de que a las 24 horas se restauró el FBS en el medio, no recupera lo niveles basales, manteniéndose en por abajo del 40% de expresión relativa respecto al tiempo 0h. En las células transfectadas con siAR hay una mayor disminución en los niveles de expresión de *KLK3* (menor al 1% de expresión relativa en el control FBS) que en las células del control negativo, aunque la diferencia no es significativa entre los grupos transfectados; hay una tendencia, tanto en el siAR como en el control negativo, a disminuir la expresión del *KLK3* a lo largo del tiempo post-transfección.

7.4 Expresión relativa de los marcadores neuroendócrinos

La expresión de la enolasa 2 aumenta significativamente en las células transfectadas con el siAR (Figura 16.a), además de que esta diferencia es significativa a partir de las 48 h después de la transfección; esta diferencia es clara al comparar con el control FBS y con las células del control negativo. Sin embargo la expresión de la enolasa 2 en el control negativo también aumento respecto al control con FBS, aunque la diferencia es significativa a partir de las 96 h después de la transfección, pero sus niveles de expresión son significativamente inferiores que en el grupo siAR.

La expresión de la glutamato descarboxilasa 1 (figura 16.b) incrementó significativamente desde las 24 h después de la transfección en el caso de las células transfectadas con el siAR; su expresión a las 120 h es aproximadamente 400 veces mayor que a las 0 horas, aunque cabe destacar que la expresión de *GAD1* en el control FBS, también aumenta a lo largo del tiempo, siendo a partir de las 96 horas la diferencia es significativa respecto al tiempo 0. También en el caso de las células del control negativo, hay un incremento en su expresión, aunque no es significativo hasta las 96 horas.

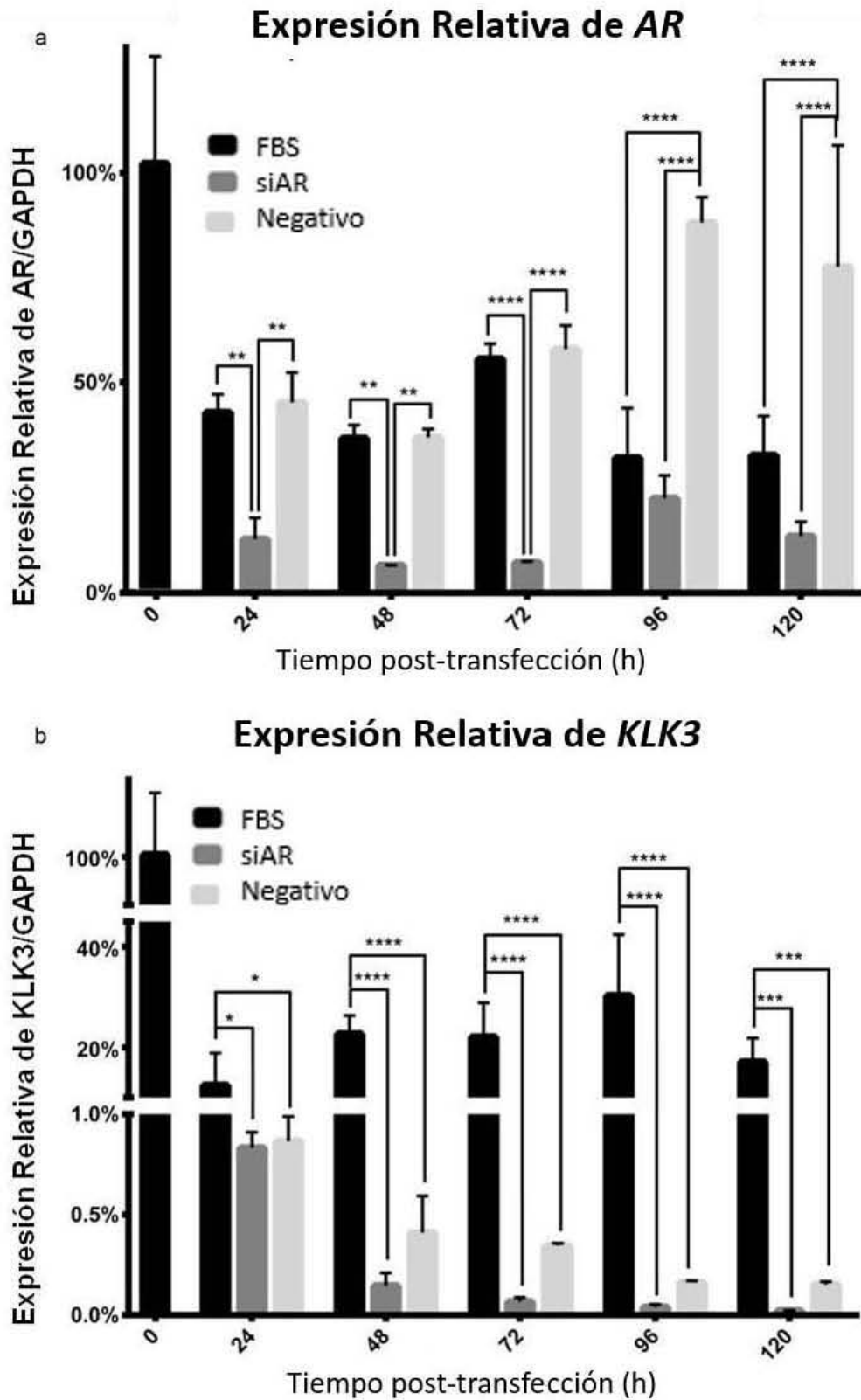


Figura 15. Expresión Relativa de marcadores de LNCaP, *AR* (a) y *KLK3* (b), de las células sembradas en RPMI sin rojo de fenol + 10% FBS (barras negras), transfectadas con el siAR (barras gris medio) y transfectadas con el control Negativo (barras gris claro) n=3

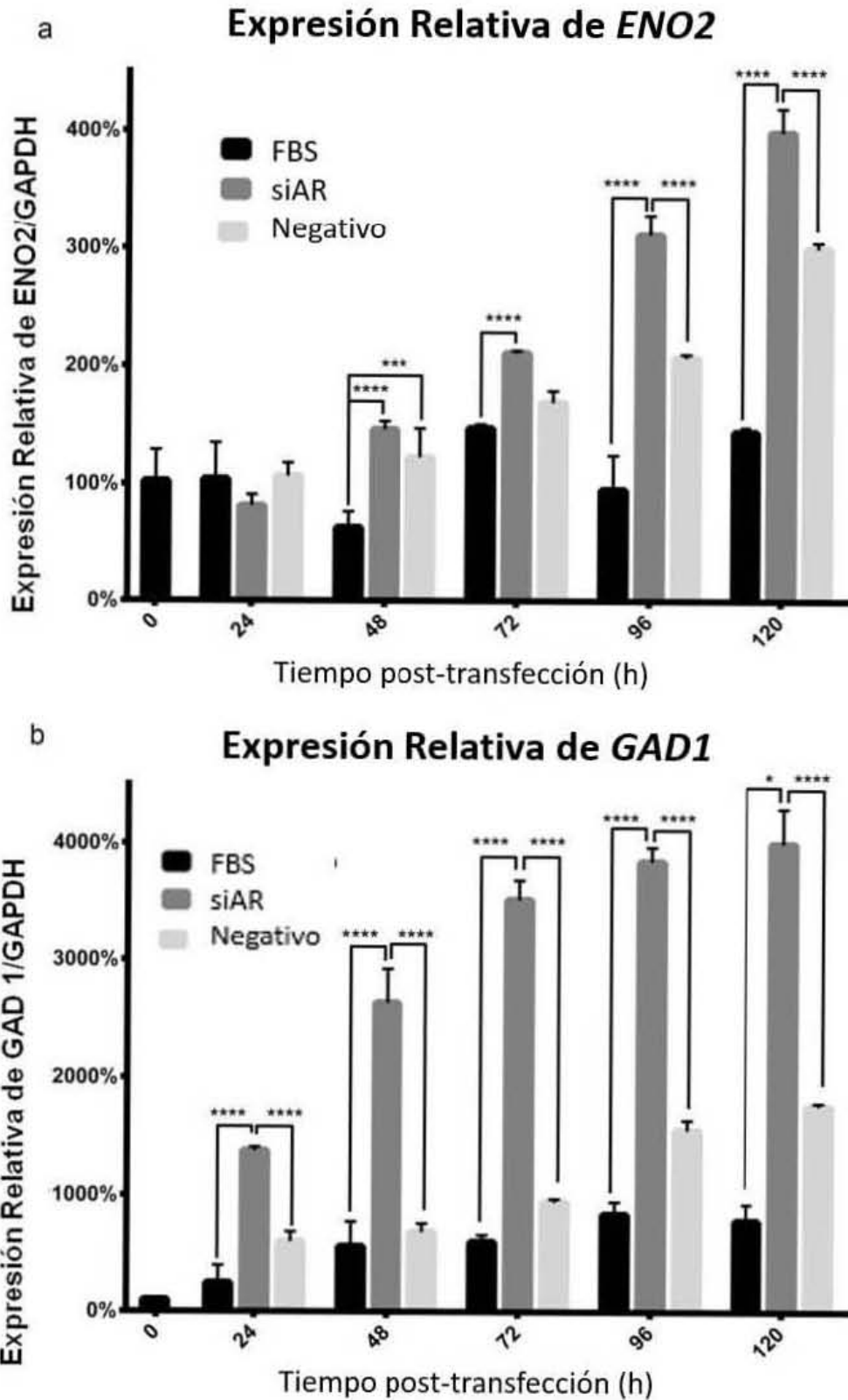


Figura 16. Expresión Relativa de marcadores neuroendócrinos, *ENO2* (a) y *GAD1* (b), del control FBS (barras negras), transfectadas con el siAR (barras gris medio) y el control Negativo (barras gris claro) n=3

8. Discusión

Debido a que el cáncer de próstata en nuestro país es la primera causa de mortalidad por neoplasia según datos de la OMS, es importante su estudio para poder elucidar los mecanismos que llevan al cáncer de próstata resistente a castración (CRPC), el cual se desarrolla en respuesta al tratamiento de bloqueo androgénico máximo; en algunos cánceres del tipo CRPC incrementa el número de células neuroendócrinas, que como describió Yang *et al.* (2009), secretan neuropéptidos que actúan como factores de crecimiento en algunos tipos de cáncer. Sin embargo, no se sabe cómo aumenta el número de células neuroendócrinas si éstas son quiescentes, por lo que se proponen diferentes caminos por los que se lleva a cabo la diferenciación neuroendócrina. El trabajo desarrollado en esta tesis se enfocó a la teoría de la transdiferenciación neuroendócrina, propuesta por Wright *et al.* (2003), en donde las células epiteliales cambian a un fenotipo similar al neuroendócrino (NE-like). Para llevar a cabo métodos genómicos y así analizar las diferencias en el transcriptoma durante la transdiferenciación, es importante estandarizar un modelo *in vitro* de transdiferenciación neuroendócrina, así como determinar los tiempos necesarios para que las células LNCaP cambien su fenotipo mediante un curso temporal de este fenómeno.

Se seleccionó en primer lugar un control (FBS) que fuera confiable para normalizar los resultados obtenidos de la expresión relativa mediante qPCR, ya que el hecho de que las células LNCaP estarían más de 5 días en un medio RPMI sin rojo de fenol + 10% CS FBS (un medio libre de hormonas), como Wright *et al.* (2003) reportó que era posible que estas empezaran a cambiar su fenotipo a NE-like; por lo que se comparó el efecto del cambio de suero a FBS o CS FBS, en la expresión de los genes de estudio, para saber si el tiempo en que las células se mantienen en medio libre de andrógenos es suficiente para que las células se diferencien.

Al microscopio se identificaron cambios en la morfología de las células con los distintos medios utilizados. En el caso del CS FBS, a las 120 horas se desarrollaron proyecciones similares a dendritas (Figura 11 panel inferior), además que a las 0 y 24 h, la expresión del AR es mayor que en las células que crecen en FBS (Figura 12.a barras grises), aunque a las 72 h decaen estos niveles, debido a que a las 0 h se retiró totalmente el suero del medio y se reincorporó hasta las 24h; sin embargo, se observa una tendencia al aumento en la expresión del AR, que corresponde con lo reportado por Morken *et al.* (2014), en donde la

célula sobreexpresa el receptor como vía de resistencia a la depleción androgénica, para poder captar los andrógenos remanentes en el medio.

Los niveles de *KLK3* son bajos en la células con CS FBS (Figura 12.b barras grises), desde las 0 h, pero este comportamiento se debe a que el receptor no se encuentra activado por andrógenos como menciona Powell *et al.* (2004), y el *KLK3* es un gen responsivo al AR, y sólo puede ser sintetizado en su presencia al tener 3 sitios AREs en su secuencia, aunque después de las 24 h estos niveles decaen aún más, posiblemente es debido a pequeñas cantidades de andrógenos que quedan en las células que podían activar el AR, que disminuyen al paso del tiempo gracias a los lavados diarios con PBS.

Además, en la cuantificación de los marcadores neuroendócrinos estudiados *ENO2* y *GAD1* en la células con CS FBS (Figura 12.c y d respectivamente barras grises), se observa un aumento en la expresión de los transcritos conforme avanza el tiempo en el ensayo. El aumento de la expresión de los marcadores neuroendócrinos, aunado al cambio en la morfología, ya habían sido reportados con anterioridad desde 1983 por Horoszewicz *et al.*, pero considerando periodos largos de tiempo (hasta el pase 50), sólo Wright *et al.* (2003) reportan que este proceso se lleve a cabo en una semana.

Aunque los niveles de *AR* y *KLK3* en la células cultivadas con FBS (Figura 12.a y b respectivamente barras negras) se mantienen por arriba de las células con CS FBS, la caída en los niveles de expresión de ambos mRNA es significativa, debido a que pasan 24 horas después de la transfección las células sin ningún tipo de suero, lo que implica ausencia de andrógenos y otros factores de crecimiento necesarios para homeostasis celular, no se esperaba un efecto tan drástico en la expresión del receptor en un tiempo tan corto, aunque si se esperaba un descenso en la expresión de *KLK3*, debido a que sin andrógenos el AR no se encuentra activado y no se expresan los genes dependientes del receptor. En el caso de la expresión del marcador *ENO2* (Figura 12.c barras negras) en la células cultivadas con FBS, ésta no cambia significativamente respecto al tiempo; en cambio la expresión de *GAD1* (Figura 12.d barras negras) cambia significativamente a las 72 h respecto a 0h.

No se consideró usar células en FBS como control al tiempo 0h, ya que se buscaba introducir el mínimo de variantes metodológicas posibles, y tampoco se podía agregar FBS o CS FBS al tiempo 0h en las células transfectadas, debido a que los factores de crecimiento que contiene pueden interferir en la transfección.

Las células transfectadas con siAR, cambian significativamente su morfología a partir de las 72h después de la transfección (Figura 13), observándose en la mayoría de la población proyecciones dendríticas. Presentan una disminución significativa de la expresión del AR (Figura 15.a barras gris medio) a partir de las 24h; sin embargo esta diferencia dejó de ser significativa a partir de las 96h, con sus símiles temporales en FBS, aunque aún son significativamente diferentes a 0h, por lo que podemos suponer que aún la expresión del AR se encuentra abatida.

En el caso de las células transfectadas con el control Negativo (Figura 14), se esperaba que el fenotipo de las células empezara a cambiar a un fenotipo NE-like, debido a los resultados obtenidos al comparar células en FBS y CS FBS, aunque este cambio se observó en un tiempo menor (96h) y de manera más pronunciada (figura 14), con un mayor número de proyecciones dendríticas, que en las células sin transfectar en CS FBS a las 120h (figura 10). Además se observa un cambio en su expresión de AR (Figura 15.a barras gris claro), ya que a partir de las 96 horas después de la transfección estos comienzan a subir y ya no son significativamente diferentes al tiempo 0h, probablemente este comportamiento se deba a que las células se encuentran en un medio sin andrógenos (CS FBS), y éstas a fin de captar andrógenos, por muy baja que sea la concentración, sobreexpresan el receptor, estos resultados ya habían sido reportados a nivel proteínas por Morken *et al.* (2014)

En cuanto a la expresión de *KLK3* (Figura 15.b barras gris medio para siAR y gris claro para el control negativo), se observa una disminución mayor en las células transfectadas con siAR, ya que la ausencia del receptor hace imposible la expresión del *KLK3*; también en las células transfectadas con el control negativo se observa una disminución en la expresión de *KLK3*, debido a que al encontrarse en un medio ausente de andrógenos, el AR no podría ser activado. Sin embargo, los valores de *KLK3* no decrecen tanto como con las células transfectadas con siAR, debido a que las células transfectadas con el control negativo siguen expresando el AR (figura 15 a. barras gris claro), por lo que pueden captar trazas de andrógenos del medio, aunque la diferencia entre ambos grupos no es estadísticamente significativa. El analizar la expresión de este gen, sirvió para corroborar que el modelo empleado realmente simula un ambiente libre de andrógenos, como en los pacientes que son castrados químicamente y progresan a CRPC.

La expresión de los marcadores neuroendocrinos fue significativamente mayor en las células transfectadas respecto al control con FBS (figura 16), además de observarse una

tendencia de aumento en la expresión en función del tiempo. Aunque en el caso de *ENO2*, se observa un incremento significativo de su expresión en las células transfectadas con siAR, en las células transfectadas con el control Negativo también fue significativamente mayor respecto al control FBS a partir de las 96h, el mismo fenómeno se observa al evaluar la expresión del marcador *GAD1*.

El aumento de la expresión de los marcadores neuroendócrinos en las células transfectadas con el control Negativo, se puede deber a la transdiferenciación que sufren a un fenotipo neuroendócrino, debido al ambiente libre de andrógenos, que simula el tratamiento de depleción androgénica en pacientes, que conlleva a CRPC y al aumento en la diferenciación neuroendócrina como reportó Ito *et al.* (2001), incluso Huss y Lin (2004) han reportado en ensayos *in vivo* que basta castrar al ratón con xenoinjertos de líneas celulares de CaP o células de pacientes, para empezar a expresar marcadores neuroendócrinos; sin embargo se observa que, la transdiferenciación *in vitro* de las células LNCaP, ocurre en un menor tiempo cuando además de estar en un ambiente libre de andrógenos, se silencia el AR, lo cual corresponde a lo reportado anteriormente por Wright *et al.* (2003), en cuanto a que el AR inhibe la transdiferenciación neuroendócrina.

GAD1 parecer ser un buen marcador neuroendócrino, debido a que su expresión aumenta dramáticamente en las células transfectadas con siAR (Figura 16.b barras gris medio), Ippolito y Abdul (2006) reportaron que las células neuroendócrinas expresaban *GAD1*; si bien la diferenciación neuroendócrina aumenta conforme empeora el estado del CaP, y durante el proceso de metástasis ocurre transdiferenciación de las células de CaP (Cheville *et al.*, 2002), era una posibilidad que las células NE-like (que están implicadas en los procesos antes señalados fueran positivos a *GAD1*, ya que Azuma *et al.* (2003) habían reportado que los pacientes con CaP metastásico expresan más *GAD*. Sin embargo la expresión de *GAD1* también aumenta en el control FBS, lo cual podría ser un indicio de estrés ante la ausencia de suero durante las 24 horas correspondientes a la transfección en las células control más que de transdiferenciación, aunque el incremento no es tan dramático como en las células transfectadas con siAR o con el control Negativo, en que la expresión aumenta cientos de veces, siendo una opción de estudio si las células NE-like por medio de la vía GABA-érgica, promueven la tasa de proliferación de otras células como reportó Abdul *et al.* (2008).

Debido a que se comprobó que mantener el medio en CS FBS a tiempos cortos induce que las células cambien su fenotipo, es necesario repetir el experimento manteniendo en FBS

las células después de la transfección, para poder estudiar el proceso de transdiferenciación al silenciar el *AR*, sin tener interferencia del medio sin andrógenos (CS FBS).

Finalmente, es importante considerar que los tumores no están compuestos de un solo tipo celular, y que las subclonas que surgen en respuesta al tratamiento, como reportó Nouri y Jongsma (2014), tienen diversos papeles en el mantenimiento, crecimiento y propagación de la enfermedad.

9. Conclusiones

- El mejor control del modelo *in vitro* propuesto, son las células LNCaP en RPMI sin rojo de fenol +10% FBS.
- Durante los tiempos post-transfección el mantener un medio libre de hormonas (CS FBS) en el control negativo, acelera el cambio de morfología en las células a NE-like.
- 24 horas después de la transfección los niveles de expresión de *AR* y *KLK3* disminuyeron al tiempo 0 en las células transfectadas con el siAR, y estos niveles se mantienen sin diferencia significativa durante el tiempo monitoreado.
- *ENO2* incrementó su expresión significativamente hasta 48 horas después de la transfección en las células transfectadas con siAR;
- *GAD1* es un buen marcador neuroendócrino, ya que su expresión aumentó rápida y significativamente, a partir de las 24 horas.
- Los tiempos clave para analizar el proceso de transdiferenciación neuroendócrina, es a las 48, 72 y 96 horas después de la transfección.

10. Perspectivas

- Repetir el curso temporal manteniendo el FBS, para verificar si el cambio de suero por CS FBS favorece el cambio de morfología celular aún en el control negativo.
- Repetir el modelo propuesto, pero muestreando cada 12 horas, entre los tiempos 48, 72 y 96 horas después de la transfección, para acortar el rango de los tiempos claves propuestos.
- Realizar un estudio genómico (microarreglos por ejemplo) de las muestras obtenidas a las 48, 72 y 96 horas después de la transfección para obtener un mayor número de genes que cambien su expresión durante el proceso de transdiferenciación.
- Hacer pruebas de proliferación y viabilidad, con células a las 48, 72 y 96 horas.

- En muestras de pacientes con NePC diagnosticado, analizar la expresión de *GAD1*, para ver si nuestros resultados son extrapolables a la clínica.

11. Bibliografia

1. Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *The Prostate*, 39(2), 135-148.
2. Abdul, M., Mccray, S. D., & Hoosein, N. M. (2008). Expression of gamma-aminobutyric acid receptor (subtype A) in prostate cancer. *Acta Oncologica*, 47(8), 1546-1550.
3. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.
4. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2014*. Atlanta: American Cancer Society; 2014
5. Aprikian, A. G., Han, K., Guy, L., Landry, F., Begin, L. R., & Chevalier, S. (1998). Neuroendocrine differentiation and the bombesin/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. *The Prostate*, 36(S8), 52-61.
6. Azuma, H., Inamoto, T., Sakamoto, T., Kiyama, S., Ubai, T., Shinohara, Y., ... & Watanabe, M. (2003). γ -Aminobutyric acid as a promoting factor of cancer metastasis; induction of matrix metalloproteinase production is potentially its underlying mechanism. *Cancer research*, 63(23), 8090-8096.
7. Beltran, H., Rickman, D. S., Park, K., Chae, S. S., Sboner, A., MacDonald, T. Y., ... & Rubin, M. A. (2011). Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer Discovery*, 1(6), 487-495.
8. Beltran H, Mosquera JM, Rubin MA. Neuroendocrine prostate cancer. *Prostate cancer: A comprehensive perspective*. London: Springer; 2013. pp. 277–282

9. Beltran, H., Tomlins, S., Aparicio, A., Arora, V., Rickman, D., Ayala, G., ... & Rubin, M. A. (2014). Aggressive Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 20(11), 2846-2850.
10. Bennett, N. C., Gardiner, R. A., Hooper, J. D., Johnson, D. W., & Gobe, G. C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(6), 813-827.
11. Berman-Booty, L. D., & Knudsen, K. (2014). Models of neuroendocrine prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, ERC-14.
12. Berruti, A., Dogliotti, L., Mosca, A., Gorzegno, G., Bollito, E., Mari, M., ... & Angeli, A. (2001). Potential clinical value of circulating chromogranin A in patients with prostate carcinoma. *Annals of oncology*, 12(suppl 2), S153-S157.
13. Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (1986). Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(8), 2496-2500.
14. Bevan, C. L., Hoare, S., Claessens, F., Heery, D. M., & Parker, M. G. (1999). The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Molecular and cellular biology*, 19(12), 8383-8392.
15. Bratt, O., Garmo, H., Adolfsson, J., Bill-Axelson, A., Holmberg, L., Lambe, M., & Stattin, P. (2010). Effects of prostate-specific antigen testing on familial prostate cancer risk estimates. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(17), 1336-1343.
16. Burchardt, T., Burchardt, M., Chen, M. W., Cao, Y., De La Taille, A. L. E. X. A. N. D. R. E., Shabsigh, A., ... & Buttyan, R. (1999). Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *The Journal of urology*, 162(5), 1800-1805.
17. Cancer Research UK (2014). *Types of Prostate Cancer*. Recuperado el 7 de septiembre de 2014 de: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/prostate-cancer/about/prostate-cancer-types>

18. Carcel-Trullols, J., Aguilar-Gallardo, C., Garcia-Alcalde, F., Pardo-Cea, M. A., Dopazo, J., Conesa, A., & Simón, C. (2012). Transdifferentiation of MALME-3M and MCF-7 Cells toward Adipocyte-like Cells is Dependent on Clathrin-mediated Endocytosis. *SpringerPlus*, 1(1), 1-12.
19. Centers of Disease Control and Prevention (2013). *How Is Prostate Cancer Diagnosed?* Recuperado el 19 de noviembre de 2014 de: http://www.cdc.gov/cancer/prostate/basic_info/diagnosis.htm
20. Centers of Disease Control and Prevention (2013). *What Are the Symptoms of Prostate Cancer?* Recuperado el 19 de noviembre de 2014 de: http://www.cdc.gov/cancer/prostate/basic_info/symptoms.htm
21. Chang, P. C., Wang, T. Y., Chang, Y. T., Chu, C. Y., Lee, C. L., Hsu, H. W., ... & Kung, H. J. (2014). Autophagy Pathway Is Required for IL-6 Induced Neuroendocrine Differentiation and Chemoresistance of Prostate Cancer LNCaP Cells. *PloS one*, 9(2), e88556.
22. Cheville, J. C., Tindall, D., Boelter, C., Jenkins, R., Lohse, C. M., Pankratz, V. S., ... & Blute, M. L. (2002). Metastatic prostate carcinoma to bone. *Cancer*, 95(5), 1028-1036.
23. Chmelar, R., Buchanan, G., Need, E. F., Tilley, W., & Greenberg, N. M. (2007). Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *International Journal of cancer*, 120(4), 719-733.
24. Cleutjens, K. B., van der Korput, H. A., van Eekelen, C. C., van Rooij, H. C., Faber, P. W., & Trapman, J. (1997). An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Molecular Endocrinology*, 11(2), 148-161.
25. Culig, Z., Hoffmann, J., Erdel, M., Eder, I. E., Hobisch, A., Hittmair, A., ... & Klocker, H. (1999). Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor blocker bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *British Journal of Cancer*, 81(2), 242.
26. Czyż, J., Szpak, K., & Madeja, Z. (2012). The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nature Reviews Urology*, 9(5), 274-282.

27. 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.
28. Dehm, S. M., & Tindall, D. J. (2011). Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-related cancer*, 18(5), R183-R196.
29. Denmeade, S. R., Lin, X. S., & Isaacs, J. T. (1996). Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *The prostate*, 28(4), 251-265.
30. di Sant'Agnese, P. A. (1992). Neuroendocrine differentiation in carcinoma of the prostate. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer*, 70(1 Suppl), 254-268.
31. Epstein, J. I., Amin, M. B., Beltran, H., Lotan, T. L., Mosquera, J. M., Reuter, V. E., ... & Rubin, M. A. (2014). Proposed Morphologic Classification of Prostate Cancer With Neuroendocrine Differentiation. *The American journal of surgical pathology*. 38, 756-767.
32. Erdő, S. L., Nemet, L., & Szporny, L. (1982). The occurrence of GABA in vas deferens, prostate, epididymis, seminal vesicle and testicle of the rat. *Acta biologica Hungarica*, 34(4), 435-437.
33. Feldman, B. J., & Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 34-45.
34. Fox, S. I. (2011). *Fox. Fisiología humana*. (12° ed.) México: McGraw-Hill Interamericana.
35. Franco, R., Chieffi, P., Perdonà, S., Facchini, G., & Caraglia, M. (2013). Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer. In *Prostate Cancer: Shifting from Morphology to Biology* (pp. 87-109). Springer Netherlands.
36. Gregory, C. W., He, B., Johnson, R. T., Ford, O. H., Mohler, J. L., French, F. S., & Wilson, E. M. (2001). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer research*, 61(11), 4315-4319.

37. Guate, J. L., Escaf, S., Menendez, C. L., Del Valle, M., & Vega, J. A. (1997). Neuroendocrine cells in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: effect of hormonal treatment. *Urologia internationalis*, 59(3), 149-153.
38. Guo, Z., Dai, B., Jiang, T., Xu, K., Xie, Y., Kim, O., ... & Qiu, Y. (2006). Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer cell*, 10(4), 309-319.
39. Han, G., Buchanan, G., Ittmann, M., Harris, J. M., Yu, X., DeMayo, F. J., ... & Greenberg, N. M. (2005). Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1151-1156.
40. Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocrine reviews*, 23(2), 175-200.
41. Helpap, B., & Köllermann, J. (1999). Undifferentiated carcinoma of the prostate with small cell features: immunohistochemical subtyping and reflections on histogenesis. *Virchows Archiv*, 434(5), 385-391.
42. Hirano, D., Okada, Y., Minei, S., Takimoto, Y., & Nemoto, N. (2004). Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *European urology*, 45(5), 586-592.
43. Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., ... & Murphy, G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research*, 43(4), 1809-1818.
44. Hudson, D. L. (2004). Epithelial stem cells in human prostate growth and disease. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 7(3), 188-194.
45. Huggins, C., & Hodges, C. V. (1941). Studies on prostatic cancer. *Cancer research*, 1, v297.
46. Humphrey PA 2012 Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology* **60** 59-74.

47. Huss, W. J., Gregory, C. W., & Smith, G. J. (2004). Neuroendocrine cell differentiation in the CWR22 human prostate cancer xenograft: association with tumor cell proliferation prior to recurrence. *The Prostate*, 60(2), 91-97.
48. Hvamstad, T., Jordal, A., Hekmat, N., Paus, E., & Fosså, S. D. (2003). Neuroendocrine serum tumour markers in hormone-resistant prostate cancer. *European urology*, 44(2), 215-221.
49. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization (s.f), *Mexico (2010) Number of cancer deaths: Male, all ages (total: 33,851)*, Lyon: IARC. Recuperado el 20 de septiembre de 2014 de la base de datos en línea Cancer Mortality Database (IARC) en Internet: <http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm>
50. 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*, 103(33), 12505-12510.
51. Ito, T., Yamamoto, S., Ohno, Y., Namiki, K., Aizawa, T., Akiyama, A., & Tachibana, M. (2001). Up-regulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer after androgen deprivation therapy, degree and androgen independence. *Oncology reports*, 8(6), 1221-1224.
52. Johns Hopkins Medicine (2015). Radical Prostatectomy. Recuperado el 24 de junio de 2015 de: http://www.hopkinsmedicine.org/healthlibrary/test_procedures/urology/radical_prostatectomy_92,P09111/
53. Jongsma, J., Oomen, M. H., Noordzij, M. A., Van Weerden, W. M., Martens, G. J., van der Kwast, T. H., ... & van Steenbrugge, G. J. (1999). Kinetics of neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *The American journal of pathology*, 154(2), 543-551.
54. Jongsma, J., Oomen, M. H., Noordzij, M. A., Romijn, J. C., van der Kwast, T. H., Schröder, F. H., & van Steenbrugge, G. J. (2000). Androgen-independent growth is induced by neuropeptides in human prostate cancer cell lines. *The Prostate*, 42(1), 34-44.

55. Jongsma, J., Oomen, M. H., Noordzij, M. A., Van Weerden, W. M., Martens, G. J., van der Kwast, T. H., ... & van Steenbrugge, G. J. (2000). Androgen deprivation of the prohormone convertase-310 human prostate cancer model system induces neuroendocrine differentiation. *Cancer research*, *60*(3), 741-748.
56. Knudsen, K. E., & Penning, T. M. (2010). Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *21*(5), 315-324.
57. 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), 8385-8397
58. Li, J., & Al-Azzawi, F. (2009). Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas*, *63*(2), 142-148.
59. Liang, H., Studach, L., Hullinger, R. L., Xie, J., & Andrisani, O. M. (2014). Down-regulation of RE-1 silencing transcription factor (REST) in advanced prostate cancer by hypoxia-induced miR-106b~ 25. *Experimental cell research*, *320*(2), 188-199.
60. Liao, G., Chen, L. Y., Zhang, A., Godavarthy, A., Xia, F., Ghosh, J. C., ... & Chen, J. D. (2003). Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(7), 5052-5061.
61. Lin, D., Wyatt, A. W., Xue, H., Wang, Y., Dong, X., Haegert, A., ... & Wang, Y. (2014). High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development. *Cancer research*, *74*(4), 1272-1283.
62. Lipianskaya, J., Cohen, A., Chen, C. J., Hsia, E., Squires, J., Li, Z., ... & Huang, J. (2014). Androgen-deprivation therapy-induced aggressive prostate cancer with neuroendocrine differentiation. *Asian journal of andrology*.
63. Koivisto, P. A., Schleutker, J., Helin, H., Ehren-van Eekelen, C., Kallioniemi, O. P., & Trapman, J. (1999). Androgen receptor gene alterations and chromosomal gains and losses in prostate carcinomas appearing during finasteride treatment for benign prostatic hyperplasia. *Clinical cancer research*, *5*(11), 3578-3582.

64. Krijnen, J. L. M., Janssen, P. J. A., de Winter, J. R., Van Krimpen, H., Schröder, F. H., & Van der Kwast, T. H. (1993). Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor?. *Histochemistry*, 100(5), 393-398.
65. Maitland, N. J., & Collins, A. T. (2008). Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(17), 2862-2870.
66. Mitsiades, N. (2013). A road map to comprehensive androgen receptor axis targeting for castration-resistant prostate cancer. *Cancer research*, 73(15), 4599-4605.
67. Mizokami, A., & Namiki, M. (2014). Reconsideration of progression to CRPC during androgen deprivation therapy. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*.
68. Mori, R., Xiong, S., Wang, Q., Tarabolous, C., Shimada, H., Panteris, E., ... & Pinski, J. K. (2009). Gene profiling and pathway analysis of neuroendocrine transdifferentiated prostate cancer cells. *The Prostate*, 69(1), 12-23.
69. Morken, J. D., Packer, A., Everett, R. A., Nagy, J. D., & Kuang, Y. (2014). Mechanisms of resistance to intermittent androgen deprivation in prostate cancer patients identified by a novel computational method. *Cancer research*, canres-3162.
70. Mosquera JM, Beltran H, Park K, MacDonald TY, Robinson BD, Tagawa ST, Perner S, Bismar TA, Erbersdobler A, Dhir R, *et al.* 2013 Concurrent AURKA and MYCN gene amplifications are harbingers of lethal treatment-related neuroendocrine prostate cancer. *Neoplasia* 15 1-10.
71. Napoleone, P., Bronzetti, E., Cavallotti, C., & Amenta, F. (1990). Predominant epithelial localization of type A gamma-aminobutyric acid receptor sites within rat seminal vesicles and prostate glands. *Pharmacology*, 41(1), 49-56.
72. National Cancer Institute (2014). *Genetics of Prostate Cancer (PDQ®)*. Recuperado el 19 de noviembre de 2014 de: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/prostate/HealthProfessional>

73. National Cancer Institute (2014). *Prostate-Specific Antigen (APE) Test*. Recuperado el 19 de noviembre de 2014 de: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/APE>
74. Navarro, D., Luzardo, O. P., Fernández, L., Chesa, N., & Díaz-Chico, B. N. (2002). Transition to androgen-independence in prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 81(3), 191-201.
75. Nelson, P. S. (2012). Molecular states underlying androgen receptor activation: a framework for therapeutics targeting androgen signaling in prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 30(6), 644-646.
76. Nelson, P. S., Clegg, N., Arnold, H., Ferguson, C., Bonham, M., White, J., ... & Lin, B. (2002). The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11890-11895.
77. Nemes, A., Tomuleasa, C., & Kacso, G. The androgen receptor remains a key player in metastatic hormone-refractory prostate cancer. Implications for new treatments. *Journal of Balkan Union of Oncology*, 19(2), 357-64.
78. Nouri, M., Ratther, E., Stylianou, N., Nelson, C. C., Hollier, B. G., & Williams, E. D. (2014). Androgen-targeted therapy induced epithelial mesenchymal plasticity and neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer: an opportunity for intervention. *Name: Frontiers in Oncology*, 4, 370.
79. Newling, D. W. W. (2000). Maximum androgen blockade: a case study report. *Prostate Cancer & Prostatic Diseases*, 3(3).
80. Organización Mundial de la Salud (2014). *Cáncer*. Recuperado el 19 de noviembre de 2014 de: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
81. Ozanne, D. M., Brady, M. E., Cook, S., Gaughan, L., Neal, D. E., & Robson, C. N. (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Molecular endocrinology*, 14(10), 1618-1626.

82. Penning, T. M. (2015). Mechanisms of drug resistance that target the androgen axis in castration resistant prostate cancer (CRPC). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.
83. Pernicová, Z., Slabáková, E., Fedr, R., Jaro, J., Suchánková, T., Bouchal, J., ... & Sou, K. (2014). The role of high cell density in the promotion of neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Molecular cancer*, *13*(1), 113.
84. Ponguta, L. A., Gregory, C. W., French, F. S., & Wilson, E. M. (2008). Site-specific androgen receptor serine phosphorylation linked to epidermal growth factor-dependent growth of castration-recurrent prostate cancer. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(30), 20989-21001.
85. Powell, S. M., Christiaens, V., Voulgaraki, D., Waxman, J., Claessens, F., & Bevan, C. L. (2004). Mechanisms of androgen receptor signalling via steroid receptor coactivator-1 in prostate. *Endocrine-related cancer*, *11*(1), 117-130.
86. Radmayr, C., Lunacek, A., Schwentner, C., Oswald, J., Klocker, H., & Bartsch, G. (2008). 5-alpha-reductase and the development of the human prostate. *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*, *24*(3), 309.
87. Rahman, M., Miyamoto, H., & Chang, C. (2004). Androgen Receptor Coregulators in Prostate Cancer Mechanisms and Clinical Implications. *Clinical cancer research*, *10*(7), 2208-2219.
88. Ramírez-Balderrama, L., López-Briones, S., Daza-Benítez, L., Macías, M. H., López-Gaytán, T., & Pérez-Vázquez, V. (2013). Diferenciación neuroendocrina en adenocarcinoma de próstata. *Gaceta Médica de México*, *149*, 639-45.
89. Rashid, M. H., & Chaudhary, U. B. (2004). Intermittent androgen deprivation therapy for prostate cancer. *The oncologist*, *9*(3), 295-301.
90. Riegman, P. H. J., Vlietstra, R. J., Suurmeijer, L., Cleutjens, C. B. J. M., & Trapman, J. (1992). Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics*, *14*(1), 6-11.
91. Schalken, J. A., & van Leenders, G. (2003). Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology*, *62*(5), 11-20.

92. Shen, R., Dorai, T., Szaboles, M., Katz, A. E., Olsson, C. A., & Buttyan, R. (1997, April). Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 3, No. 2, pp. 67-75). Elsevier.
93. Scher, H. I., Eisenberger, M., D'Amico, A. V., Halabi, S., Small, E. J., Morris, M., ... & Soule, H. R. (2004). Eligibility and outcomes reporting guidelines for clinical trials for patients in the state of a rising prostate-specific antigen: recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. *Journal of clinical oncology*, 22(3), 537-556.
94. Schoenmakers, E., ALEN, P., Verrijdt, G., PEETERS, B., Verhoeven, G., Rombauts, W., & Claessens, F. (1999). Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. *Biochem. J*, 341, 515-521.
95. Schuur, E. R., Henderson, G. A., Kmetec, L. A., Miller, J. D., Lamparski, H. G., & Henderson, D. R. (1996). Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 7043-7051.
96. Shore, N. D., Abrahamsson, P. A., Anderson, J., Crawford, E. D., & Lange, P. (2012). New considerations for ADT in advanced prostate cancer and the emerging role of GnRH antagonists. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 16(1), 7-15.
97. Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7(1), 3.
98. Sotomayor, P., Godoy, A., Smith, G. J., & Huss, W. J. (2009). Oct4A is expressed by a subpopulation of prostate neuroendocrine cells. *The Prostate*, 69(4), 401-410.
99. Stanford, J. L., & Ostrander, E. A. (2013). Familial prostate cancer. *Epidemiologic reviews*, 23(1), 19-23.
100. Stein, M. E., Bernstein, Z., Abacioglu, U., Sengoz, M., Miller, R. C., Meirovitz, A., ... & Kuten, A. (2008). Small cell (Neuroendocrine) carcinoma of the prostate: etiology, diagnosis, prognosis, and therapeutic implications-A retrospective study

- of 30 patients from the rare cancer network. *The American journal of the medical sciences*, 336(6), 478-488.
101. Sun, Y., Niu, J., & Huang, J. (2009). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *American journal of translational research*, 1(2), 148.
 102. Szczaurska, K., Mazurkiewicz, M., & Opolski, A. (2002). [The role of GABA-ergic system in carcinogenesis]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczonej*, 57(5), 485-500.
 103. Tan, H. L., Sood, A., Rahimi, H. A., Wang, W., Gupta, N., Hicks, J., ... & Lotan, T. L. (2014). Rb loss is characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20(4), 890-903.
 104. Terry, S., Maillé, P., Baaddi, H., Kheuang, L., Soyeux, P., Nicolaiew, N., ... & Vacherot, F. (2013). Cross modulation between the androgen receptor axis and protocadherin-PC in mediating neuroendocrine transdifferentiation and therapeutic resistance of prostate cancer. *Neoplasia*, 15(7), 761-IN22.
 105. Terry, S., & Beltran, H. (2014). The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Frontiers in oncology*, 4.
 106. Tortora, G. J., & Derrickson B. H. (2014). Principles of Anatomy and Physiology (14th ed.) USA: Wiley.
 107. van Royen, M. E., Cunha, S. M., Brink, M. C., Mattern, K. A., Nigg, A. L., Dubbink, H. J., ... & Houtsmuller, A. B. (2007). Compartmentalization of androgen receptor protein–protein interactions in living cells. *The Journal of cell biology*, 177(1), 63-72.
 108. Vashchenko, N., & Abrahamsson, P. A. (2005). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *European urology*, 47(2), 147-155.
 109. Walsh P.C. (1980)- Radical prostatectomy for the treatment of localized prostatic carcinoma. *Urologic Clinics of North America*, 7, 583–591

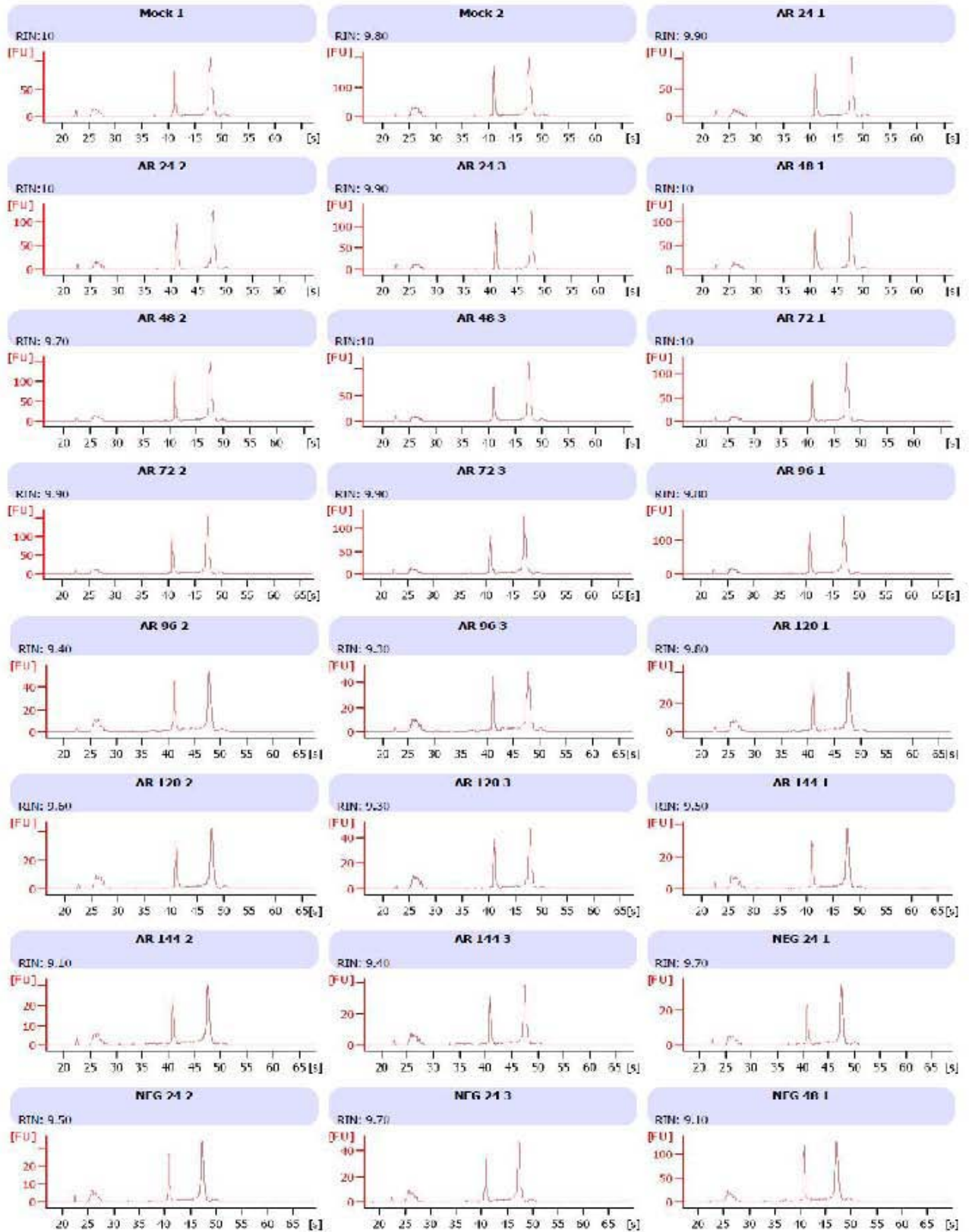
110. Waltering, K. K., Urbanucci, A., & Visakorpi, T. (2012). Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 360(1), 38-43.
111. Wright, M. E., Tsai, M. J., & Aebbersold, R. (2003). Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 17(9), 1726-1737.
112. Yang, J. C., Ok, J. H., 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), 151-160.
113. Young, S. Z., & Bordey, A. (2009). GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology*, 24(3), 171-185.
114. 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), 151-167.
115. Yuan, T. C., Veeramani, S., & Lin, M. F. (2007). Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocrine-related cancer*, 14(3), 531-547.
116. Zelivianski, S., Verni, M., Moore, C., Kondrikov, D., Taylor, R., & Lin, M. F. (2001). Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1539(1), 28-43.
117. Zhang, Y., Linn, D., Liu, Z., Melamed, J., Tavora, F., Young, C. Y., ... & Hamburger, A. W. (2008). EBP1, an ErbB3-binding protein, is decreased in prostate cancer and implicated in hormone resistance. *Molecular cancer therapeutics*, 7(10), 3176-3186.
118. Zhu, Y., Liu, C., Cui, Y., Nadiminty, N., Lou, W., & Gao, A. C. (2014). Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *The Prostate*, 74(11) 1086–1094.

Abreviaturas

ANOVA	Análisis de Varianza
APE	Antígeno Prostático Específico
AR	Receptor de Andrógenos
ARA	Proteína Asociada a AR
ARE	Elemento de Respuesta a AR
AURKA	Aurora Cinasa A
CaP	Cáncer de Próstata
cDNA	DNA Complementario
CRPC	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración
CS FBS	Suero Fetal Bovino Tratado con Carbón Activado
DBD	Dominio de Unión al DNA (del AR)
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ENO2	Enolasa 2
FBS	Suero Fetal Bovino
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GABA	Ácido Gamma-Aminobutírico
GAD1	Glutamato Descarboxilasa 1
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropina
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HSP	Proteínas de Choque Térmico
LBD	Dominio de Unión a Ligando
LH	Hormona Luteinizante
LNCaP	Cáncer de Próstata con Metástasis a Nódulo Linfático
NE	Neuroendócrino
NED	Diferenciación Neuroendócrina
NE-like	Similar a Célula Neuroendócrina
NePC	Cáncer de Próstata Neuroendócrino
NTD	Dominio N-terminal (del AR)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	PCR Cuantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RIN	Número de Integridad de RNA
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
siAR	siRNA contra el AR
siRNA	RNA Pequeño de Interferencia

Anexo I. RIN

Electroferogramas



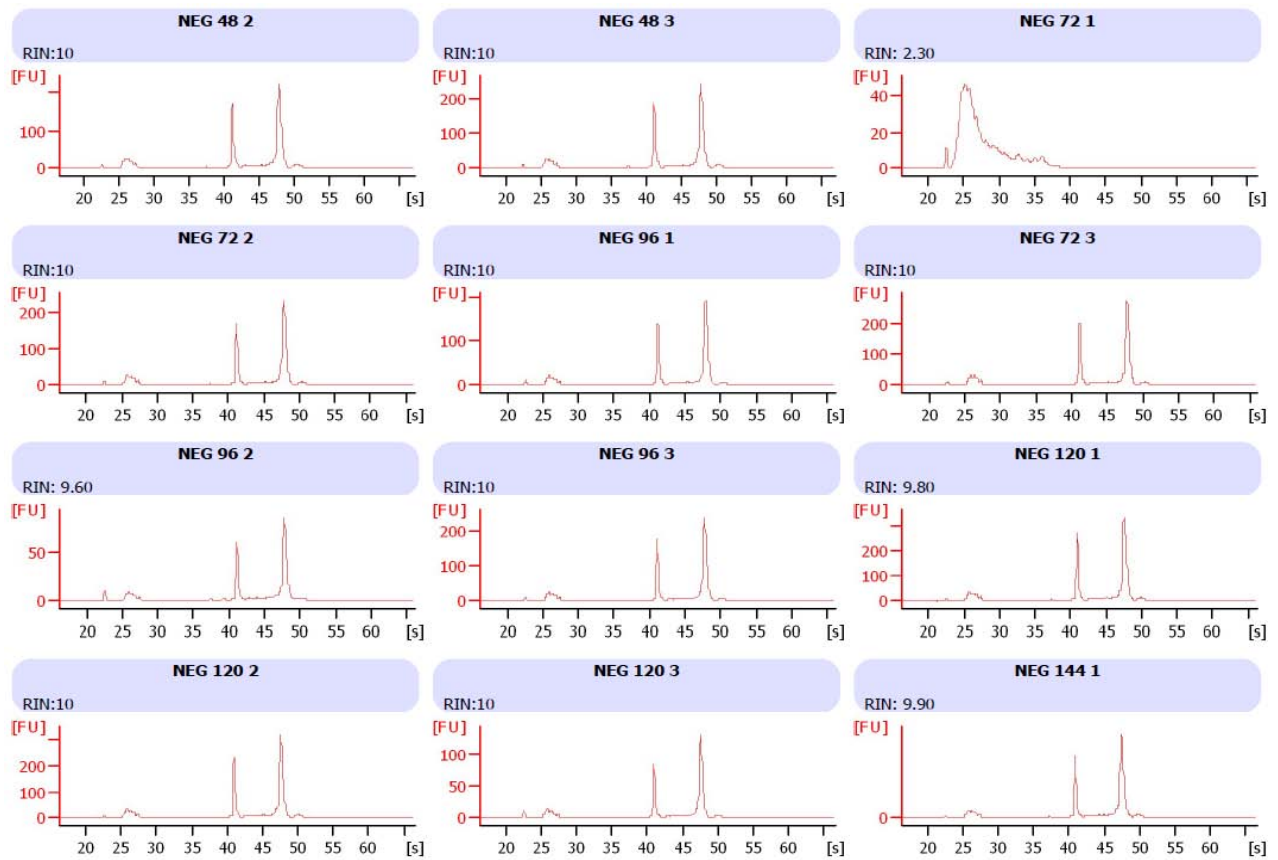
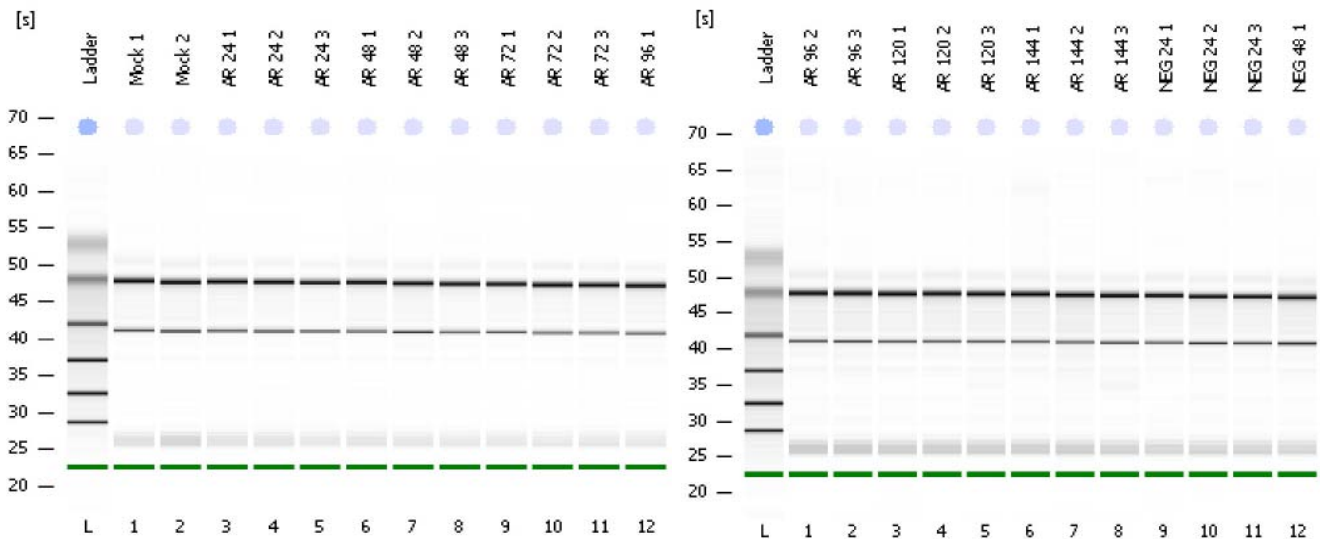


Figura 17. Electroferogramas del RNA total

Imagen del Gel



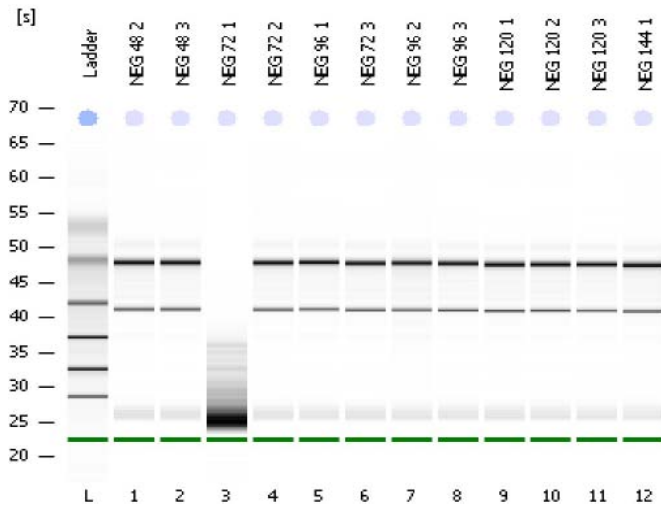


Figura 18. Simulación de gels de integridad a partir de los datos obtenidos de los electroferogramas.