



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO EN LA DIFERENCIACIÓN  
NEUROENDOCRINA EN CÁNCER DE PRÓSTATA

TESIS QUE PARA OPTAR POR  
EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

SUSANA DEL ROCIO SOLORZANO ROSALES

DIRECTOR DE TESIS

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA, INSTITUTO NACIONAL  
DE PERINATOLOGÍA-FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, 2019



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.

## RESUMEN

En cáncer de próstata (CaP), las células neuroendocrinas (NE) se han asociado con la progresión de la patología debido a la secreción de neuropéptidos, que son capaces de influir en el comportamiento del microambiente tumoral.

Por otra parte, el sistema GABAérgico se encuentra enriquecido en las células NE-like y contribuye a la progresión de CaP. Además, el ácido gamma aminobutírico (GABA) estimula la secreción del péptido liberador de gastrina (GRP) en órganos periféricos. Con base a lo planteado, el objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de la vía GABAérgica en la secreción de GRP en células NE-like de cáncer de próstata y su efecto parácrino y/o autócrino.

La metodología utilizada para obtener las células NE-like fue a través del silenciamiento de *AR* en células LNCaP por medio de siARN Silencer (Life Technologies) y un siARN control. Las células fueron encubadas por el agonista (Baclofen, Sigma-Aldrich) y antagonista (CGP 35348, Sigma-Aldrich) de GABA por 12 y 2 horas respectivamente. La cuantificación de GRP se realizó por ELISA con un anticuerpo monoclonal específico para GRP (GenScript). Para determinar la capacidad invasiva de GRP secretado, fue usado el método de Transwell. Por último, se colectaron muestras de orina de 10 pacientes; de las cuales se obtuvieron ARN total, haciendo uso del estuche comercial RNAeasy (Quiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación relativa de los genes blanco se llevó a cabo por PCR en tiempo real, usando el equipo ViiATM7 Real-Time PCR.

En este estudio se mostró el papel del receptor GABA tipo B subunidad 1 (GABBR1) en la secreción de GRP en células NE-like de cáncer de próstata. Así mismo, se demostró un aumento en los niveles de GRP, en el medio de las células NE-like tratadas con el agonista GABA<sub>B</sub>, mientras que el bloqueo del receptor con su antagonista, inhibió la secreción del péptido.

Se determinó la capacidad invasiva de las células PC3 y se observó un incremento en las mismas, por efecto de GRP (control positivo) o el medio condicionado proveniente de las células NE-like tratadas con GABA.

Adicionalmente, se confirmó una correlación positiva entre los niveles de GABA y GRP en el suero de pacientes con CaP que, expresaban marcadores NE.

Finalmente, utilizando un conjunto de datos ya publicados y disponibles en cBiopotal, se encontró una correlación negativa entre *GABBR1* y la expresión del receptor de andrógenos (AR) a nivel de expresión ARNm y de proteína en tumores primarios con CaP. Así como una fuerte correlación positiva, entre *GABBR1* y enolasa neuronal específica (*ENO2*) en tumores de CaP con diferenciación neuroendocrina (NEPC). Estos resultados sugieren, la acción que ejerce GABA a través de *GABBR1* para estimular la secreción de GRP en células NE-like, participando en la progresión de cáncer de próstata. Se propone por primera vez a *GABBR1* como un posible blanco terapéutico para el tratamiento de tumores NEPC.

## INDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>FISIOLOGÍA, ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA</b> .....	<b>7</b>
<b>CONTROL ENDOCRINO EN EL CRECIMIENTO DE LA PRÓSTATA</b> .....	<b>11</b>
<b>SÍNTESIS DE LOS ANDRÓGENOS Y MECANISMO DE ACCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>RECEPTOR DE ANDRÓGENOS</b> .....	<b>15</b>
<b>PATOLOGÍAS DE LA PRÓSTATA</b> .....	<b>17</b>
<b>HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA</b> .....	<b>17</b>
<b>CÁNCER DE PRÓSTATA</b> .....	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
<b>CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO</b> .....	<b>34</b>
<b>TRANSFECCIÓN CON ARN PEQUEÑO DE INTERFERENCIA (siARN)</b> .....	<b>34</b>
<b>COLECTA DE MUESTRAS DE PACIENTES</b> .....	<b>34</b>
<b>PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA Y EXTRACCIÓN DE ARN</b> ....	<b>36</b>
<b>ENSAYO DE TIEMPO REAL RT-PCR</b> .....	<b>37</b>
<b>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANÁLISIS CON WESTERN BLOT</b> .....	<b>37</b>
<b>INMUNOFLUORESCENCIA</b> .....	<b>38</b>
<b>PREPARACIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO (MC)</b> .....	<b>38</b>
<b>ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)</b> .....	<b>39</b>
<b>ENSAYO DE PROLIFERACIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>ENSAYO DE INVASIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS</b> .....	<b>41</b>
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>41</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>ESTABLECIMIENTO DE LAS CÉLULAS NE-LIKE POR MEDIO DEL</b> <b>SILENCIAMIENTO DE AR EN LA LÍNEA CELULAR LNCAP</b> .....	<b>42</b>
<b>PRESENCIA DE GABA EN LAS CÉLULAS LNCAP DESPUÉS SILENCIAR AR</b> <b>CON SIARN</b> .....	<b>44</b>
<b>LAS CÉLULAS NE-LIKE SECRETAN VESÍCULAS DE GABA, ACCIÓN</b> <b>MEDIADA POR GABBR1</b> .....	<b>46</b>
<b>GABA EXÓGENO Y ENDÓGENO REGULAN LA SECRECIÓN DE GRP A</b> <b>TRAVÉS DE GABBR1 EN CÉLULAS NE-LIKE</b> .....	<b>48</b>

<b>MODIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD INVASIVA DE LAS CÉLULAS PC3 POR EL MEDIO CONDICIONADO PROVENIENTE LA CÉLULAS NE-LIKE .....</b>	<b>50</b>
<b>GRP NO ESTIMULA PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS ANDRÓGENO INDEPENDIENTE .....</b>	<b>52</b>
<b>CORRELACIÓN POSITIVA ENTRE GABA Y GRP EN PACIENTES CON CARACTERÍSTICAS NE.....</b>	<b>54</b>
<b>CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE <i>GABBR1</i> VS. AR Y <i>GABBR1</i> VS. <i>ENO2</i> EN TUMORES NEPC.....</b>	<b>56</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>68</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO.....</b>	<b>69</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>75</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

## INTRODUCCIÓN

### FISIOLOGÍA, ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA

La próstata (de aproximadamente 3 cm de longitud) es la glándula accesoria más grande del aparato reproductor masculino. Este órgano se sitúa debajo de la vejiga y enfrente del recto, de tal manera que rodea la uretra (Figura 1).

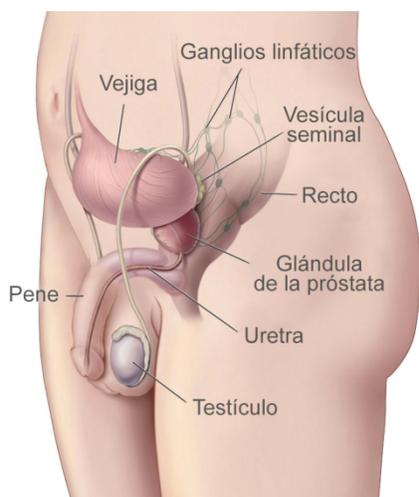
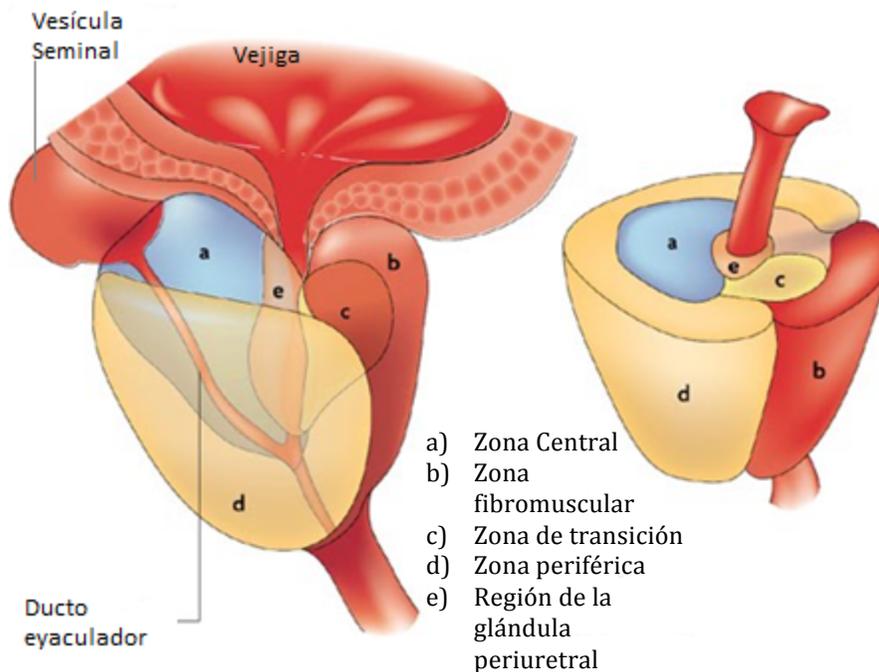


Figura 1 Posición anatómica de la próstata<sup>1</sup>.

La función principal de la próstata, es secretar un líquido blanquecino hacia la uretra llamado líquido prostático. La secreción prostática es alcalina, por lo que neutraliza la acidez de los demás componentes del semen, aumenta la motilidad y fertilidad de los espermatozoides al ser rico en componentes importantes para su mantenimiento. Sus componentes son: ácido cítrico, utilizado por los espermatozoides para producir ATP; diferentes enzimas proteolíticas como el antígeno prostático específico (APE), pepsinógeno, lisozima amilasa e hialuronidasa, encargadas de descomponer las proteínas de la coagulación secretadas por las vesículas seminales; fosfatasa ácida; y seminoplasmina, con capacidad bactericida. Durante la eyaculación, la próstata se contrae junto con el conducto deferente y las vesículas seminales, expulsando su contenido a la uretra. Estas secreciones constituyen alrededor del 25% del volumen total del semen y contribuyen a la motilidad y viabilidad de los espermatozoides<sup>2</sup>.

La nomenclatura más aceptada para describir la estructura de la próstata es la propuesta por John McNeal (1981)<sup>3</sup>. Dividiendo la próstata en tres áreas que son histológicamente y anatómicamente distintas: zona periférica, zona central y zona de transición. Hace algunos años, se incluyó un área más; nombrada fibromuscular<sup>4</sup>. Todas las áreas se encuentran ilustradas en la figura 2.



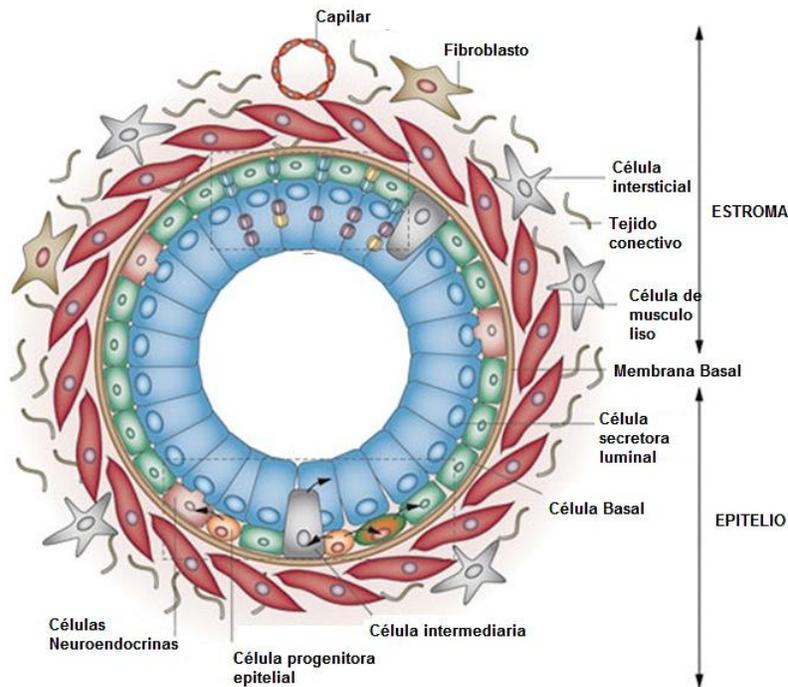
**Figura 2. Anatomía de la próstata.** Adaptada De Marzo y colaboradores (2007)<sup>5</sup>.

- Zona periférica: Constituye la mayor parte de la glándula prostática (70%), surge de los ductos que se desarrollan lateralmente en el mesénquima posterior al segmento uretral distal. La mayoría de los carcinomas prostáticos (70%) se desarrollan en esta región. Además de ser, el área detectada por el examen rectal digital (ERD) por su cercanía con el recto<sup>6</sup>.
- Zona central: Es la región que representa el 25% del volumen prostático, originándose de los conductos agrupados en un área pequeña en la convexidad del veru montanum, rodeando los conductos eyaculadores. Es una zona donde la frecuencia de cáncer es baja (10%)<sup>7</sup>.
- Zona de transición: Surge de los conductos en la uretra proximal; y conforma el 20% de la próstata hasta los 40 años. En esta región se

desarrolla la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) y el 25% de los adenocarcinomas prostáticos<sup>8</sup>.

- Zona fibromuscular: Es una zona gruesa, no glandular que representa un tercio del grueso de la próstata. De constitución principalmente fibromuscular<sup>6</sup>.
- Zona periuretral: El área estrecha de la próstata que consta de conductos cortos adyacentes a la uretra prostática<sup>8</sup>.

El epitelio prostático está compuesto principalmente por dos compartimientos celulares; epitelio y estroma. El compartimento epitelial se divide en: células basales, intermedias, neuroendocrinas (NE) y luminales o secretoras<sup>9</sup>. El compartimento del estroma, arquitectónicamente sirve como soporte estructural y consiste predominantemente de tejido conjuntivo, células del músculo liso y fibroblastos<sup>10</sup>. Todos los tipos celulares se ilustran en la figura 3.



**Figura 3.** Esquema de los tipos celulares en la glándula prostática (Adaptada de Czyz<sup>7</sup>, J. et al. 2012)<sup>11</sup>.

- Células luminales o secretoras: Son responsable de la integridad de la barrera epitelial y la producción de las secreciones prostáticas. Son las

células más numerosas dentro del epitelio prostático, tienen una tasa de proliferación baja y se encuentran totalmente diferenciadas<sup>12</sup>. Entre las proteínas que producen se encuentran; el antígeno prostático específico (APE), fosfatasa ácida y el receptor de andrógenos (AR por sus siglas en inglés). Por lo tanto, son células sensibles a la actividad de los andrógenos<sup>13</sup>. También son ricos en filamentos de queratina (subtipos 8 y 18)<sup>14</sup>.

- Células basales: Son las células más pequeñas del epitelio, representan menos del 10% del número total de células y expresan un perfil distinto del subtipo de queratina (subtipos 5 y 14). Se localizan sobre la membrana basal. Evidencia científica ha demostrado que el compartimiento basal es una fuente de células madres en la próstata. Además de tener una tasa proliferativa baja y estar poco diferenciadas, las células basales son independientes de los andrógenos para su crecimiento<sup>15</sup>.
- Células intermedias: Se les llaman intermedias por poseer características basales y luminales al mismo tiempo, compartiendo subtipos de queratina de ambos tipos celulares. Es poco lo que realmente se sabe acerca de este tipo celular, sin embargo, entre la hipótesis más aceptada sobre su función se encuentra; la que sugiere que las células intermedias cumplen una función amplificadora transitoria, proporcionando una función de amplificación a corto plazo, para las capacidades proliferativas a largo plazo de las células troncales basales<sup>16</sup>.
- Células neuroendocrinas: Su nombre se debe a la capacidad que tienen de liberar hormonas en respuesta de un estímulo neuronal. En la próstata, las células neuroendocrinas se pueden encontrar entre las células secretoras, así como en el urotelio de la uretra prostática<sup>17</sup>. Hay dos tipos de células neuroendocrinas: las primeras llamadas abierta y posee microvellosidades especializadas que sobresalen en la luz; las segundas se cierran con largos procesos similares a dendritas, que se extienden a células epiteliales cercanas y células basales cercanas a nervios aferentes y eferentes<sup>18-20</sup>. Su función principal es la producción de numerosas macromoléculas

bioactivas como; serotonina, péptido liberador de gastrina (GRP por sus siglas en inglés), enolasa neuronal específica (ENO2 por sus siglas en inglés), somatostatina entre otras. Fisiológicamente, esta variedad celular tiene un papel fundamental en el crecimiento, mantenimiento y proliferación celular a través de mecanismos parácrinos y autócrinos, y su importancia se incrementa en procesos patológicos específicos como en Cáncer de Próstata (CaP), por lo que su estudio se ha vuelto de gran importancia en los últimos años<sup>21</sup>.

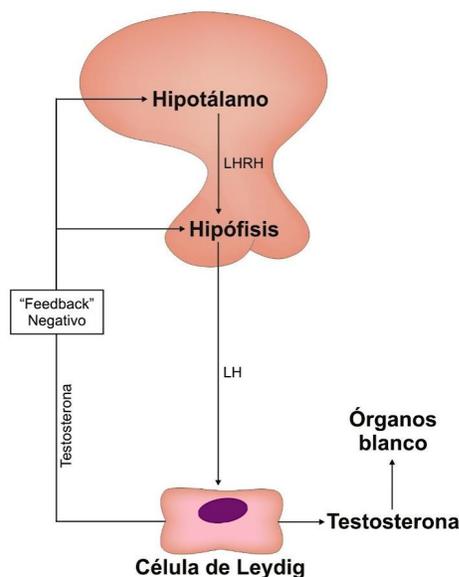
### CONTROL ENDOCRINO EN EL CRECIMIENTO DE LA PRÓSTATA

Las hormonas sexuales masculinas son conocidas como andrógenos, los cuales son los principales esteroides sexuales masculinos y son los responsables del desarrollo fenotípico durante la embriogénesis y la maduración sexual en la pubertad en los varones<sup>22</sup>.

El principal andrógeno circulante es la testosterona, que se convierte dentro de la próstata en un andrógeno más activo; dihidrotestosterona (DHT). La síntesis de los andrógenos se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La testosterona se produce en las células de Leydig en los testículos (90-95%), a partir de la pregnenolona mediante una serie de reacciones reversibles. También puede ser sintetizada por las glándulas adrenales en menor proporción (5%). Sin embargo, una vez que la testosterona es convertida por la 5 $\alpha$ -reductasa en DHT o convertida por aromataasa en estrógenos, el proceso es irreversible. La testosterona se puede convertir en DHT o estrógenos, pero los estrógenos o DHT no se pueden convertir en testosterona. Se cree que los andrógenos, los estrógenos y los esteroides suprarrenales tienen fuertes efectos sobre diferentes células y tejidos del cuerpo, que pueden variar con el desarrollo y la edad. Estos varían desde el desarrollo embrionario hasta la pubertad, y dentro de la adultez hasta el envejecimiento. Por lo tanto, la ablación o los tratamientos de andrógenos tienen una amplia variedad de efectos fisiológicos que serán consideradas más adelante<sup>22</sup>.

La generalidad de la fisiología endocrina de la próstata se muestra en la figura 4.

El hipotálamo libera un pequeño polipéptido de 10 residuos; denominado hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), también llamada hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Bajo la estimulación de LHRH, la hipófisis libera la hormona luteinizante (LH), que se transporta a los testículos y actúa directamente sobre las células de Leydig, para estimular la síntesis de esteroides de novo y liberación de testosterona. La síntesis de testosterona es regulada por una retroalimentación negativa para prevenir la liberación de la LHRH y, en consecuencia, decrecer la sensibilidad de la adenohipófisis a la LHRH<sup>23</sup>.

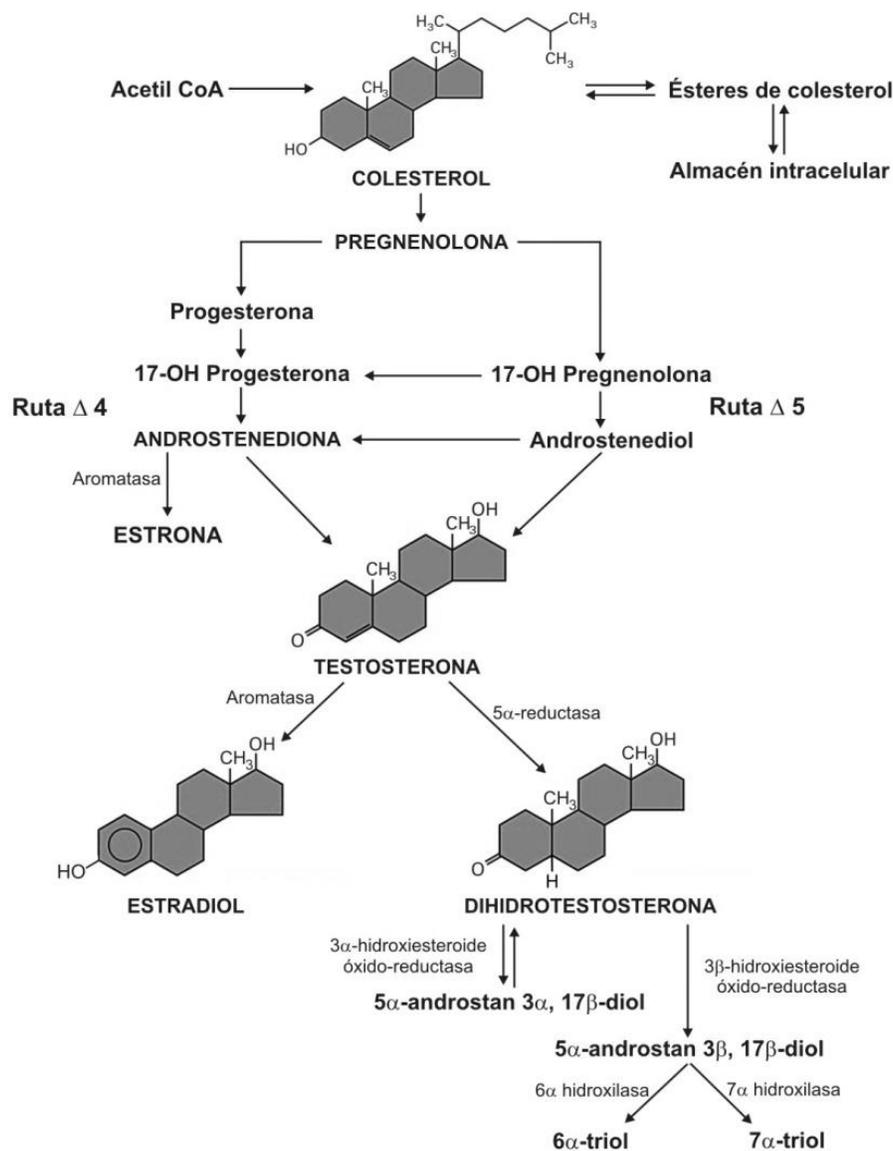


**Figura 4. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.** La síntesis de testosterona es estimulada por la LH, la cual a su vez es regulada por la LHRH. A través de una retroalimentación negativa es regulada la síntesis de testosterona, previniendo así la liberación de la LHRH y, en consecuencia, decrecer la sensibilidad de la adenohipófisis a la LHRH. Adaptada de Bellido, M y colaboradores, 1999<sup>24</sup>.

## SÍNTESIS DE LOS ANDRÓGENOS Y MECANISMO DE ACCIÓN

Del 90 al 95% de los andrógenos son producidos en las células de Leydig en el testículo. Dichas células obtienen el colesterol del plasma, a partir de los ésteres de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LBD). Este colesterol es internalizado a la mitocondria por una proteína transportadora de esteroides (SCP2), donde es transformado en pregnenolona. Posteriormente es transportado al retículo endoplásmico liso, donde se completa la esteroidogénesis<sup>23</sup>.

Como se observa en la figura 5, la síntesis de testosterona se lleva a cabo a través de dos rutas metabólicas: a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona (ruta  $\Delta 5$ ) o a partir de 17-hidroxi-progesterona (ruta  $\Delta 4$ ). La síntesis de los andrógenos se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, donde la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), liberada del hipotálamo, estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) en la adenohipófisis, la cual posteriormente estimula a las células de Leydig para inducir la síntesis de la testosterona. Esta síntesis es regulada por una retroalimentación negativa<sup>25</sup>.



**Figura 5. Metabolismo de esteroides.** La síntesis de testosterona puede llevarse a cabo a partir de la 17-hidroxi-pregnenolona (ruta  $\Delta 5$ ) o de la 17-hidroxi-progesterona (ruta  $\Delta 4$ ). En el humano la vía más importante para la síntesis de testosterona es la ruta  $\Delta 5$ . Adaptado de Rojas-Durán y colaboradores, 2011<sup>23</sup>.

Una vez que la testosterona es sintetizada, es liberada a la circulación sanguínea, donde menos del 2% es libre; el 98% restante se une a diferentes tipos de proteínas plasmáticas para transportarse hacia sus órganos blanco, como la próstata. Entre las proteínas plasmáticas más comunes se encuentran; la albúmina sérica humana (SSBG por su sigla en inglés) (40%) y la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG por sus siglas en inglés) (57%)

La testosterona, una vez que llega a la próstata, ya sea que éste unida o libre (entra por difusión); es convertida en DHT por acción de la  $5\alpha$ -reductasa<sup>22</sup>. Después la DHT o la testosterona se unen al receptor de andrógenos en el citoplasma. Lo cual propicia la dimerización y la activación del AR por una serie de modificaciones post-traduccionales, incluyendo la fosforilación. Estas modificaciones facilitan la formación de homodímeros del receptor y la translocación al núcleo. En el núcleo, el receptor se une a secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (AREs por sus siglas en inglés), en la región promotora de genes blancos. Estos genes blancos del AR incrementan la secreción de APE, así como la síntesis de proteínas implicadas en estimular el desarrollo, supervivencia, crecimiento y función secretora de la próstata (Figura 6)<sup>26</sup>.

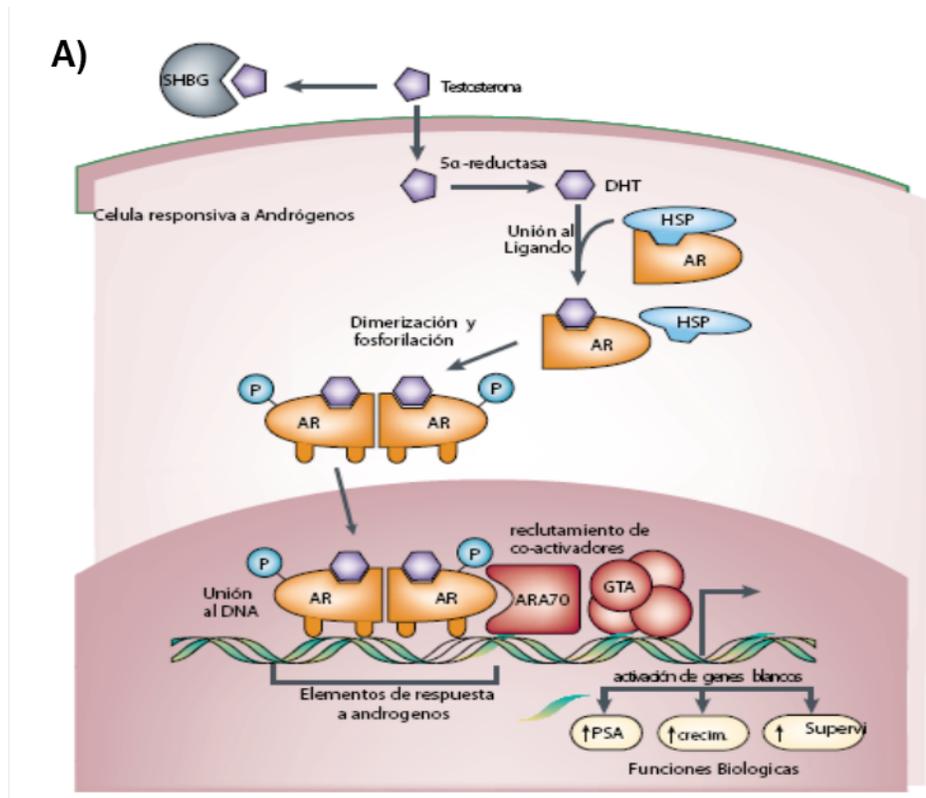


Figura 6. A) Mecanismo de acción de los andrógenos. Adaptado de Feldman & Feldman, 2001<sup>27</sup>.

## RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

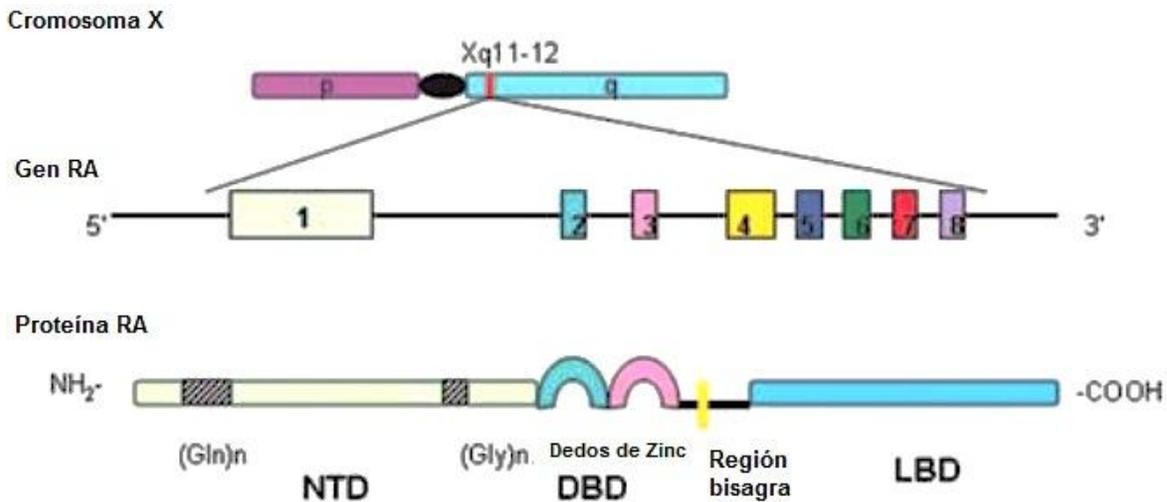
El AR constituye una proteína de 110 kDa, que forma parte de la súper familia de los Receptores Nucleares. Se encuentra codificado en el brazo largo del cromosoma X (Xq11-12). El gen está constituido por 8 exones que codifican una proteína de 919 aminoácidos. La estructura general del receptor es similar a la de cualquier otro tipo de receptores nucleares, consta de cuatro dominios funcionales (Figura 7)<sup>28</sup>:

1. Un *dominio NH2-terminal* (NTD por sus siglas en inglés), encargado de la activación transcripcional, es el dominio más variable entre los receptores nucleares tanto en longitud como en secuencia.
2. Un *dominio de unión a ADN* (DBD por sus siglas en inglés), localizado en la parte central de la molécula del AR, es la región más conservada dentro de la familia de los receptores nucleares y es la que se une al ADN. Está formado por nueve residuos de cisteína, de los cuales ocho están

involucrados en la formación de dos complejos denominado dedos de zinc, cada uno compuesto por cuatro cisteínas unidas a un ión de  $Zn^{+2}$ .

3. Un *dominio de unión al ligando* (LBD por sus siglas en inglés), encargado de la dimerización y activación de la transcripción. Este dominio regula la interacción entre AR y las proteínas de choque térmico (Hsp por sus siglas en inglés) e interactúa con el dominio NTD del receptor para estabilizar la unión del andrógeno. Este dominio se encuentra más conservado, a comparación de otros receptores esteroideos (alrededor del 50%).
4. Una *región bisagra*, no conservada y flexible, encargada de unir a los dominios DBD y LBD, además de regular la unión al ADN, la translocación nuclear y la transactivación del AR (Figura 7).

A pesar de que el AR media los efectos biológicos de los andrógenos para el desarrollo adecuado de las células epiteliales, manteniendo la estructura y función normal de la próstata, también participa en el desarrollo y progresión de patologías de la misma, asociadas con la edad del hombre como son la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el cáncer de próstata (CaP)<sup>23</sup>.



**Figura 7. Receptor de Andrógenos Humano.** El gen del receptor de andrógenos se encuentra en el brazo largo del cromosoma X (Xq11-12) y es codificado por 8 exones. Similarmente a otros receptores nucleares, consiste en cuatro dominios funcionales: el dominio NTD, el dominio DBD, el dominio LBD y una región bisagra. Adaptada de Galani, A y colaboradores, 2008<sup>29</sup>.

## PATOLOGÍAS DE LA PRÓSTATA

### HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

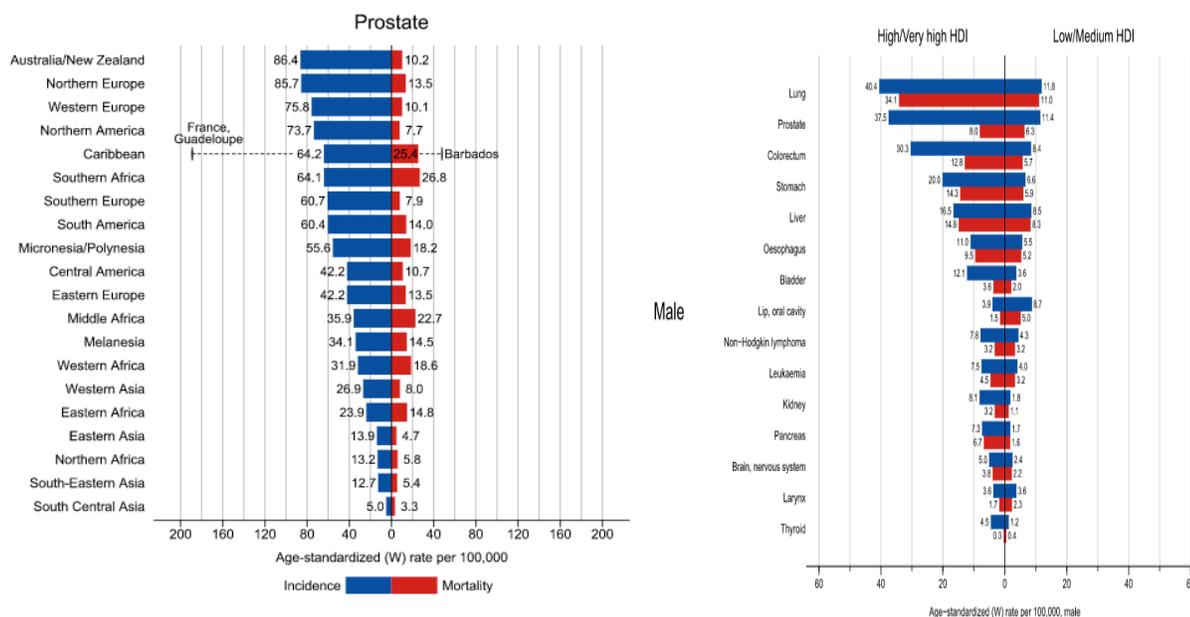
La HPB es uno de los principales diagnósticos que afectan a los hombres de edad avanzada. A la edad de 50 años, aproximadamente el 50% de los hombres serán diagnosticados con HPB; a los 80 años, el 90%. La HPB, se caracteriza por el incremento del número de células epiteliales y estromales en el área periuretral de la próstata, lo cual conduce a un aumento en el tamaño de la glándula. Los hombres que padecen HPB pueden experimentar una gran incomodidad al orinar y pueden desarrollar complicaciones que incluyen infecciones urinarias recurrentes e insuficiencia renal<sup>22</sup>.

### CÁNCER DE PRÓSTATA

#### EPIDEMIOLOGÍA

El CaP es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos en varones. Ocupa el cuarto lugar de todas las enfermedades cancerígenas y es el segundo más común entre hombres. El 70% de los casos de cáncer de próstata se presentan en hombres de países desarrollados. Aproximadamente 1 de cada 7 hombres será diagnosticado con CaP en el transcurso de su vida. Se estima que cada 6 de cada 10 casos, se diagnostican en hombres de 65 años o más. En pocas ocasiones se presenta antes de los 40 años de edad<sup>30</sup>.

En México, el CaP es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos, con un 16% y la neoplasia con mayor incidencia en hombres con un 21%. Los datos más recientes publicados por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), indican una tasa de mortalidad de 13 defunciones por cada 100,000 hombres. Durante el año 2013, se observó en El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), una tasa de mortalidad de 6 defunciones por cada 100,000 hombres de 20 años y más<sup>31</sup>. En la figura 8, se puede observar la tasa de incidencia y mortalidad del CaP a nivel mundial y en México.



**Figura 8. Tasa de incidencia y mortalidad estimadas estandarizadas por edad (W) en hombres por cáncer** Derecha) Tablas de incidencia y mortalidad. Tasas estandarizadas por edad en regiones de índice de desarrollo humano (IDH) alto / muy alto versus regiones de IDH bajo / medio entre en hombres en 2018. Los 15 cánceres más comunes del mundo (W) en 2018 se muestran en orden descendente de la tasa general estandarizada por edad. Izquierda) Tabla de tasas de incidencia y mortalidad específicas por región para los cánceres de próstata en 2018. Las tasas se muestran en orden descendente del mundo (W) tasa estandarizada por edad, y las tasas nacionales más altas estandarizadas por edad para incidencia y mortalidad se superponen<sup>30</sup>.

## FACTORES DE RIESGO

Evidencia sugiere que tanto los factores genéticos como ambientales, desempeñan un papel en el origen y la evolución del cáncer de próstata. Datos epidemiológicos y moleculares, además de los datos obtenidos por las nuevas tecnologías basadas en el análisis de genoma, han identificado una serie de posibles factores de riesgo, asociados con el desarrollo de CaP<sup>22,32</sup>.

- **Edad:** Es poco común que el cáncer de próstata afecte a los hombres menores de 40 años, pero la probabilidad de padecer cáncer de próstata aumenta rápidamente después de los 50 años. Alrededor de 6 de 10 casos de cáncer de próstata se detectan en hombres mayores de 65 años<sup>32</sup>.

- Raza/grupo étnico: El cáncer de próstata ocurre con más frecuencia en los hombres de raza negra y en hombres del Caribe, con ascendencia africana que en los hombres de otras razas. Los hombres de raza negra también tienen más del doble de probabilidades de fallecer debido al cáncer de próstata que los hombres de raza blanca. El cáncer de próstata ocurre con menos frecuencia en los hombres asiático-americanos y en los hispanos/latinos que en los hombres blancos. No están claras las razones de estas diferencias raciales y étnicas<sup>32</sup>.
- Antecedentes familiares: Estudios en gemelos han demostrado que el componente heredado del riesgo de CaP es superior al 40%, sustancialmente más alto que para otros tipos de cáncer<sup>33</sup>. Se ha estimado, que alrededor del 15% de todos los casos de CaP son causados por factores de herencia<sup>34</sup>.
- Alteraciones a nivel genético: Debido al estudio de asociación del genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés), se han podido encontrar mutaciones que están involucradas con la progresión del CaP como; las que implican al gen HOXB13, aquellos pacientes que presentan esta mutación, tienen cinco veces más riesgo de padecerla y el riesgo aumenta ocho veces más en hombres mayores de 55 años o con antecedentes familiares<sup>35</sup>. Otras mutaciones importantes que se han reportado son las que se encuentran en los genes; BRCA1 y BRCA2. Aumentando el riesgo de padecer CaP de 1.8 a 3.5 veces para el primer gen y de 4.6 a 8.6 veces para el segundo<sup>36</sup>. Además, aquellos tumores asociados a BRCA2 presentan un grado más avanzado de la enfermedad y están relacionados con un peor pronóstico<sup>37</sup>.
- Dieta: La función exacta que desempeña la alimentación en el desarrollo del cáncer de próstata no está clara, aunque se han estudiado varios factores. Los hombres que comen más carnes rojas o productos lácteos altos en grasa parecen tener una probabilidad ligeramente mayor de cáncer de próstata. Estos hombres también tienden a comer menos alimentos de origen vegetal como frutas, ensaladas y verduras. Los médicos no han

determinado cuál de estos factores es responsable del aumento en el riesgo<sup>38</sup>.

- **Obesidad:** Se ha sugerido que la obesidad medida por el índice de masa corporal (IMC), es un factor de riesgo para el cáncer de próstata debido a su ocurrencia común en hombres de mediana edad y vínculos claros con el cáncer de colon y de mama<sup>39</sup>. Tres grandes estudios prospectivos, donde se examinó la asociación entre la obesidad y el riesgo a padecer CaP por estadio y/o grado en el momento del diagnóstico, sugirieron que la obesidad está asociada con un menor riesgo a tipos de CaP con un estadio menos agresivo, pero un mayor riesgo a tipos de CaP diagnosticados con un grado más avanzado de la enfermedad. Las razones de esto no están del todo elucidadas<sup>39</sup>.
- **Tabaquismo:** El humo del cigarro, puede ser un factor de riesgo para el CaP, porque es una fuente de exposición de cadmio, aumenta los niveles de andrógenos circulantes y causa estrés oxidativo celular. Un meta-análisis de 24 estudios, donde se incluyeron más de 26,000 pacientes mostro un aumento en la incidencia del 9%-30% en CaP , asociado con el tabaquismo, que se atenuaba e personas que habían dejado de fumar en comparación con fumadores activos<sup>40</sup>.

## DIAGNÓSTICO

El CaP rara vez causa síntomas en una etapa temprana. La presencia de ellos, está relacionado con una enfermedad avanzada o con metástasis. Algunos síntomas en CaP localmente avanzado incluyen; obstrucción urinaria, insuficiencia renal, hematospermia o disminución del volumen de la eyaculación y, rara vez, impotencia. Por otra parte, la manifestación de CaP metastásico incluyen; dolor de huesos, fracturas patológicas, anemia y edema de las extremidades inferiores, entre otros<sup>22</sup>.

Las pruebas diagnóstico utilizados en CaP son; el APE y examen rectal digital (ERD). El diagnóstico histopatológico del CaP, generalmente se realiza mediante biopsia prostática guiada por ultrasonido (TRUS, por sus siglas en inglés)<sup>22</sup>.

## ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO

El APE es un miembro de la familia de calicreínas, que codifica una proteína de tipo serina proteasa que presenta regulación androgénica. Es secretada en altas concentraciones (miligramos por mililitro) dentro del fluido seminal. Durante las últimas décadas se ha utilizado como la prueba diagnóstica por excelencia para la detección de CaP. Se puede medir, usando ensayos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamento (FDA, por su sigla en inglés). Los niveles séricos de APE varían con la edad, grupo étnico y el volumen de la próstata<sup>41</sup>. Por lo anterior, la interpretación de los valores de APE, siempre deben tener en cuenta la edad, la presencia de infección en el tracto urinario o el tipo de afectación de la próstata y los tratamientos dirigidos para combatir dicha afectación<sup>42</sup>. La elección de un umbral para APE en la detección de CaP, siempre ha sido muy controversial. Sin embargo, cuanto mayor es el valor de APE, más probabilidad hay de que exista cáncer de próstata. Se considera que cuando el nivel es mayor a 4 ng/ml, se debe proceder a realizar examen rectal digital en el paciente, por el médico especialista<sup>42</sup>.

## EXAMEN RECTAL DIGITAL

Antes de la disponibilidad de la prueba de APE, los médicos confiaban únicamente en el ERD para la detección temprana del cáncer de próstata<sup>43</sup>. El ERD solo tiene reproducibilidad en manos de examinadores expertos y omite una proporción sustancial de cánceres tempranos. Se realiza, cuando el médico experto introduce el dedo índice (con guantes lubricados), en el recto del paciente para buscar irregularidades en la forma, tamaño y textura de la próstata. Generalmente, se usa la combinación de ambas pruebas (APE y ERD) para una mayor tasa de detección<sup>44</sup>.

## PRUEBAS MOLECULARES

El gen 3 de cáncer de próstata (PCA3), es un ARN mensajero (ARNm) que se sobre-expresa en tejido con cáncer de próstata, comparado con tejido benigno<sup>45</sup>. Actualmente, existen en el mercado pruebas para medir en orina de pacientes el gen *PCA3*, para el diagnóstico de cáncer de próstata<sup>46</sup>, sin embargo aún existen

resultados contradictorios sobre la asociación entre *PCA3* y la agresividad del CaP<sup>47</sup>.

#### BIOPSIA PROSTÁTICA GUIADA POR ULTRASONIDO

El grado histológico es la información más importante, obtenida de la biopsia prostática con aguja (TRUS por sus siglas en inglés) para diagnosticar con seguridad el cáncer de próstata<sup>48</sup>.

#### TRATAMIENTO

##### PROSTATECTOMÍA RADICAL

La mejor manera para tratar el cáncer de próstata confinado aún a la glándula; es la remoción completa de la misma por medio de un procedimiento quirúrgico. La prostatectomía radical, ha sido la única forma de tratamiento durante mucho tiempo para el CaP localizado<sup>49</sup>.

##### RADIOTERAPIA

Es el tratamiento que utiliza energía de alta potencia para eliminar las células cancerosas. Existen dos avances importantes en este tratamiento con respecto al cáncer de próstata. El primero avance fue la generación de aceleradores lineales y técnicas capaces de administrar altas dosis de radiación dentro de la pelvis, respetando al mismo tiempo la tolerancia tisular normal de la pared anterior del recto, uretra y el cuello de la vejiga. El segundo avance se produjo cuando, las técnicas guiadas por imágenes, se introdujeron para su uso durante la inserción de fuentes radiactivas directamente en la glándula prostática<sup>50</sup>.

##### TERAPIA HORMONAL

El tratamiento consiste básicamente en la ablación directa de la fuente de andrógenos; con el fin de inducir apoptosis en ciertas células susceptibles de andrógenos en cáncer de próstata. El tratamiento se puede llevar a cabo quirúrgicamente o farmacéuticamente (castración), el fin es la perturbación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Esta terapia es la piedra angular en el tratamiento del cáncer de próstata metastásico, al incrementar la supervivencia global en los pacientes y retrasar la progresión de la enfermedad, así como la aparición de

síntomas. Aunque también se emplea en forma coadyuvante a las terapias como; la radioterapia, en la enfermedad localizada de alto riesgo y localmente avanzada. Con el objetivo de hacer más susceptibles a las células neoplásicas, en algunas series se administra en forma preparatoria en pacientes candidatos a prostatectomía radical, para tratar de disminuir el volumen tumoral<sup>51</sup>.

Estrategias utilizadas en la terapia hormonal:

- Los antagonistas y agonistas de LHRH, se han establecido como el tratamiento dominante en la terapia hormonal, en ausencia de LH, la producción de testosterona en células de Leydig disminuye a niveles de castración. Ejemplo de fármacos: Leuprolida, Goserelina y Triptorelina<sup>52</sup>.
- Otro blanco importante ha sido, la interrupción de la interacción ligando-receptor con compuestos antiandrogénicos. Todos los antiandrogénicos inhiben la acción androgénica al unirse al AR, de manera competitiva. Ejemplo de fármacos: Flutamida, Bicalutamida y Enzalutamida<sup>53</sup>.
- Inhibidores de la síntesis de andrógenos, limitan las reacciones enzimáticas de hidroxilación de los compuestos esteroideos a diferentes niveles. Ejemplo de fármacos: Ketoconazol y Aminoglutetimida<sup>54</sup>.
- La orquiectomía, es la extirpación quirúrgica, total o parcial, de uno o de los dos testículos<sup>22</sup>.

Aunque existe un porcentaje (80%) alto de pacientes que responde favorablemente al tratamiento, desafortunadamente existe otro 20-40% que evoluciona después de 4-5 años de haber iniciado el tratamiento, a un subtipo de cáncer de próstata llamada; Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CPRC), una vez que los tumores progresan, la tasa de supervivencia es de 9 a 18 meses, demostrando ser un subtipo de cáncer mucho más agresivo y letal<sup>55</sup>.

#### CÁNCER DE PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN (CPRC)

El CPRC identifica un grupo heterogéneo de pacientes sintomáticos y asintomáticos, con presencia y ausencia de metástasis, que progresan después de ser sometidos a la terapia hormonal y mantienen niveles de testosterona por debajo de los niveles de castración, 50 ng/dl (actualmente existe una propuesta de

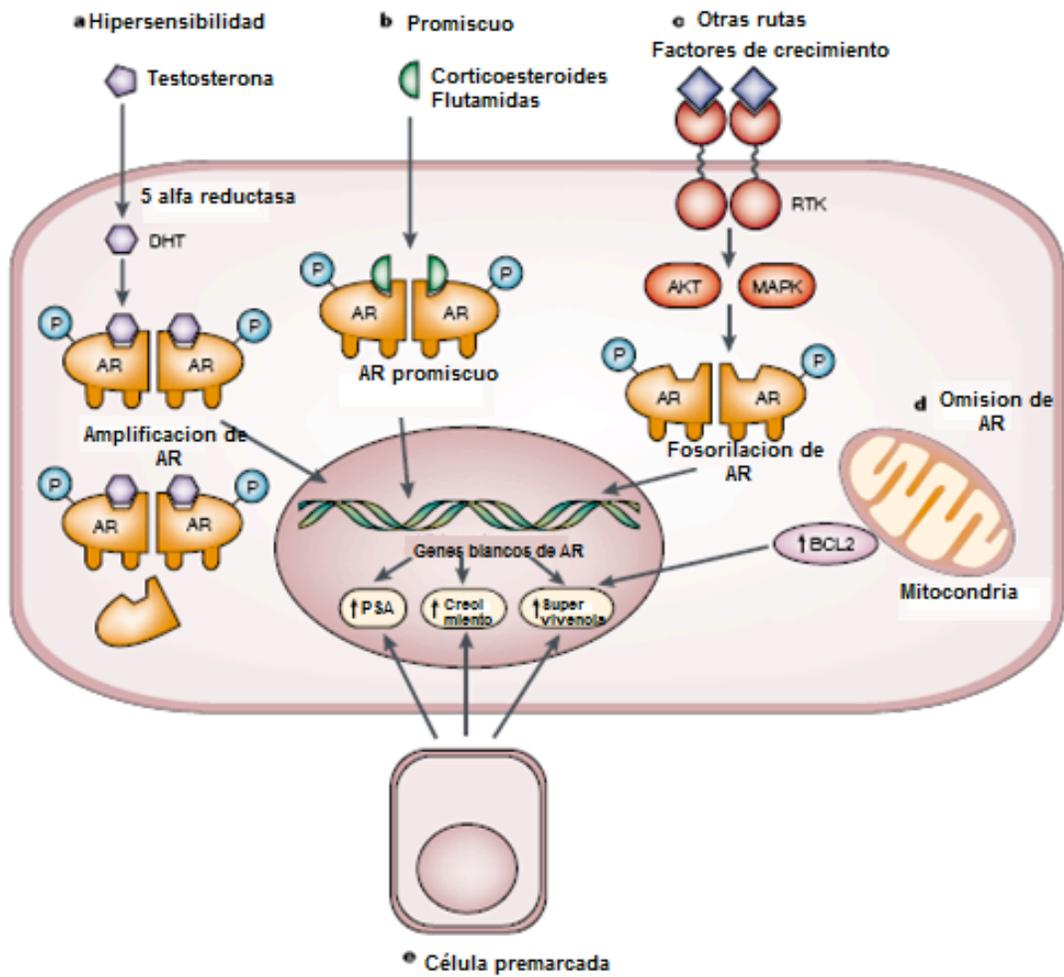
considerar el valor real de nivel de castración, 20 ng/dl). Sin embargo, más de 84% de los tumores diagnosticados con CPRC muestran metástasis<sup>56</sup>.

Hasta el momento, existen pocos tratamientos efectivos para el mismo, el más usado es la quimioterapia con docetaxel, aumentando la tasa de supervivencia más de 30 meses<sup>57</sup>.

Existen diversas hipótesis sobre el mecanismo que conlleva a la CPRC entre ellas destacan las siguientes (Figura 9):

- **Hipersensibilidad del AR:** Es uno de los posibles mecanismos por el cual el cáncer de próstata evade la terapia hormonal, aumentando la sensibilidad a los niveles más bajos de andrógenos, mediante:
  1. Amplificación del AR: La amplificación del gen *AR* se ha asociado aproximadamente al 30% de los tumores con CPRC, estos pacientes tienen 4.5 veces más posibilidades de responder a un tratamiento de segunda línea.
- Incremento de los niveles de andrógenos: Mediante el aumento de la producción local de los andrógenos, para compensar la disminución general de la testosterona circulante. Las células de próstata podrían aumentar la tasa de conversión de testosterona a la hormona DHT, al aumentar la actividad 5 $\alpha$ -reductasa<sup>58</sup>.
- Interacciones promiscuas: Existen muchos casos de tumores CPRC donde no existe una pérdida de la señalización de los andrógenos, sino más bien la adquisición de cambios genéticos que conducen a una activación aberrante del eje de señalización de andrógenos. Entre los cambios más comunes se encuentran; las mutaciones en el gen *AR*, que disminuyen la especificidad de la unión al ligando, permitiendo una activación inapropiada por varios esteroides no androgénicos y antagonistas del propio *AR*<sup>27</sup>.
- **Vía forajida:** Se les llaman receptores forajidos; aquellos que se activan por mecanismos independientes del ligando. En este caso, *AR* puede activarse por fosforilación, a través de vías alternas como; mutaciones del gen *PTEN*, activación de *MAPK*, mutaciones de correguladores, activación del *PI3K*<sup>27</sup>.

- **Vía de evasión:** Los mecanismos hasta ahora discutidos, requieren la activación del AR. Sin embargo, puede haber vías independientes del AR, que pudieran estar propiciando la progresión a CPRC. Entre ellas, se encuentra la que involucra al gen *BCL2*, el cual es capaz de bloquear la apoptosis (muerte celular), permitiendo la supervivencia de las células neoplásicas<sup>58</sup>.
- **Vía de células merodeadoras:** John Isaacs en 1999 postuló, la existencia de una subpoblación de células tumorales independientes de andrógenos, que se encontraban presente incluso antes de que iniciara la terapia. Esa población tiene características de células madres, son independientes de andrógenos, por lo tanto, su tasa de proliferación y apoptosis no se ven afectan durante la ablación de andrógenos<sup>27</sup>.



**Figura 6. Hipótesis sobre los mecanismos que conllevan a CPRC en CaP.** Adaptado de Feldman & Feldman, 2001<sup>27</sup>.

Además, se ha observado un aumento de las células NE en el 50-100% de los tumores CPRC, después de períodos prolongados de tratamiento de depleción androgénica. El fenómeno se ha denominado, diferenciación neuroendocrina (NED) y se ha relacionado con mal pronóstico y tumores más agresivos; es decir con tumores con grados más avanzados de la enfermedad. Por otra parte, no existe un tratamiento bien definido, ya que realmente es poco lo que se conoce sobre el tema, es por eso que ha tomado gran interés durante la última década<sup>59</sup>.

## CANCER DE PROSTATA CON DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA (NEPC)

Es un subtipo más agresivo de cáncer de próstata, el cual puede surgir *de novo*, pero es más común después del tratamiento hormonal. El tumor NEPC difiere histológicamente de los tumores comunes de CPRC, ya que los primeros presentan una gran cantidad de células NE, las cuales no expresan AR o secretan antígeno prostático específico, pero expresan marcadores neuroendocrinos como; cromogranina A (CHGA) y enolasa neuronal específica (ENO2). NEPC son frecuentemente metastásicos hacia órganos viscerales, responden transitoriamente a quimioterapia y la mayoría de los pacientes muestran una sobrevida menor de un año<sup>60</sup>.

Un reciente y muy importante estudio dentro del campo, demostró que los tumores NEPC provienen de una evolución divergente de una o varias células de tumores CPRC, con una presión selectiva de AR (salvaje) en poblaciones sub-clonales, lo que conlleva a la adquisición de nuevos controladores genómicos y epigenéticos, asociados con la disminución de la señalización de AR y plasticidad epitelial<sup>61</sup>.

## TRANSDIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA COMO ORIGEN DE LOS NEPC

Existe una gran aceptación entre los investigadores que estudian cáncer de próstata, sobre la hipótesis de la transdiferenciación como el origen de los NEPC. La transdiferenciación es un mecanismo, donde un fenotipo epitelial-like se convierte a un fenotipo NE-like (más adelante será descrito el término NE-like), que ocurre como consecuencia de la presión selectiva, inducida por los tratamientos que conducen a una disminución de los niveles de andrógenos o bloquean la acción de hormonas esteroideas<sup>62</sup>. Ralph Buttyan y colaboradores fueron los primeros en observar que las células LNCaP se someten a una transdiferenciación NE, cuando se exponían crónicamente a medios sin andrógenos y suprimían su estado NE, cuando los andrógenos eran agregados al medio<sup>63,64</sup>. Muchos laboratorios han confirmado estos hallazgos, además del hecho de que la transdiferenciación implica la reducción de la actividad/expresión del AR<sup>65</sup>.

Existen un gran número de estudios clínicos que reportan un aumento de células NE localizadas dentro de tumores CPRC, así como la presencia de proteínas

como; enolasa neuronal específica (ENO2), cromogranina A (CgA) y péptido liberador de gastrina (GRP), en sueros de pacientes con CPRC<sup>66-68</sup>.

#### CÉLULAS NEUROENDOCRINAS- LIKE EN NEPC

Diversos estudios han abordado el posible origen de las células neuroendocrinas en cáncer de próstata. Se sabe que las células epiteliales de próstata y las células NE son originadas a partir de células madres pluripotenciales localizadas en la capa basal<sup>20</sup>.

Por otro lado, como se ha mencionado, existe un incremento en el número de las células NE en algunos tumores CPRC. A estas células se les ha denominado NE-like, ya que no necesariamente son células NE normales, ya que tienen características bioquímicas diferentes, las cuales son mostradas en la tabla 1<sup>69</sup>.

Se han propuesto dos hipótesis principales para explicar el origen de las células NE-like en CaP. La primera indica, que tienen el mismo origen que las NE normales y que se diferencian a partir de células madres intermedias. Esa diferenciación anormal en CaP, puede estar influenciada por condiciones fisiológicas alteradas; como las que se producen por la depleción de andrógenos, sin embargo, aunque la hipótesis basada en células madres es interesante requiere más investigación ya que aún no se han dilucidado los mecanismos moleculares por los cuales esto ocurre<sup>19</sup>.

La segunda hipótesis sugiere que las células epiteliales de adenocarcinoma, pueden llevar a cabo un proceso de transdiferenciación hacia células NE-like o transdiferenciación neuroendocrina (NED por sus siglas en inglés) en el cual, adquieren un fenotipo similar a las células normales NE y pueden expresar marcadores de dicho linaje NE. Existe evidencia a favor de esta hipótesis. En primer lugar, las células NE-like en CaP comparten la expresión de diversos marcadores con las células epiteliales. En segundo lugar, se ha demostrado la expresión de marcadores epiteliales en líneas celulares derivadas de tumores de células pequeñas, que se caracterizan por su alto contenido de células NE-like.

Adicionalmente, existen casos en los que se ha observado diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer en metástasis a hueso, pero no la presencia de células NE normales, ni se ha observado diferenciación NE en el tumor primario<sup>70</sup>.

Tabla 1. Diferencias y similitudes entre células NE normales y células NE-like.

Características	Células NE normales	Células NE-like
<b>Diferencias</b>	Expresión de marcadores celulares basales	Expresión de marcadores luminales secretores
	No agresivas	Altamente agresivas
	No expresa Bcl-2	Expresa Bcl-2
	No expresa AMACR	Expresa AMACR
<b>Similitudes</b>	No expresa AR y APE Presenta efectos autocrino/paracrino Actividad proliferativa baja Morfología tipo neurona Expresión de marcadores NE (ENO2, CgA, CgB, Seretonina, PTHrP, NT, GRP)	

Obtenido y adaptado de Yuan y colaboradores, 2007<sup>69</sup>.

El desarrollo de la diferenciación neuroendocrina en cáncer de próstata y la producción de neuropéptidos y neurotransmisores, tales como; GRP, ácido gamma aminobutírico (GABA) por las células NE-like, forman parte de un importante mecanismo en el desarrollo de la resistencia a la castración<sup>62</sup>.

## NEUROTRANSMISORES Y NEUROPEPTIDOS ASOCIADOS A CÁNCER DE PRÓSTATA EN LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA

### PÉPTIDO LIBERADOR DE GASTRINA (GRP)

GRP, es un neuropéptido de 27 aminoácidos que es el homólogo mamífero del tetradecapéptido lineal bombesina, originalmente aislado de la piel de las ranas. Comparte homología con la bombesina en su secuencia carboxilo terminal<sup>71</sup>.

Su función principal es la estimulación de la liberación de todas las hormonas gastrointestinales, la secreción intestinal, pancreática y motilidad. Este péptido también estimula el crecimiento de la mucosa gastrointestinal y pancreática<sup>72</sup>.

En humanos, GRP se une con gran afinidad al receptor de GRP (GRPR), un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Las observaciones clínicas, histológicas y experimentales han implicado a GRP y GRPR en la progresión del cáncer de próstata<sup>73</sup>. Logothetis y Hoosein (1992), informaron que el 40% de los pacientes con CPRC presentaban niveles significativamente elevados de GRP en el suero. GRP y GRPR se encuentran sobreexpresados en células NE de tejido, como en líneas celulares de cáncer de próstata<sup>74</sup>. Existen estudios que han reportado a GRP, como mitógeno que estimula la proliferación celular en cáncer de próstata<sup>75</sup>. Así mismo, GRP promueve la expresión de metaloproteinasas<sup>76</sup> y aumenta la migración e invasión de células de CaP promoviendo su progresión<sup>77</sup>.

### ÁCIDO GAMMA AMINOBUTÍRICO (GABA)

GABA es el neurotransmisor inhibitorio más abundante y ampliamente distribuido en todo el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos. Llevando su función a través de la activación de receptores específicos; GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. Los receptores GABA<sub>A</sub> son receptores ionotrópicos, por otra parte, los receptores GABA<sub>B</sub> son metabotrópicos unidos a proteínas G<sup>78</sup>. Sin embargo, la distribución del sistema GABAérgico no se encuentra confinado únicamente al SNC, sino también a órganos periféricos como; páncreas, hígado y próstata, teniendo un papel tejido específico en cada uno de ellos<sup>79</sup>. En caso de la próstata, se han identificado a

GABA y ambos tipos de receptores en células epiteliales, específicamente en células neuroendocrinas<sup>80-82</sup>.

En la búsqueda de características moleculares de la diferenciación NE, propiedades biológicas que ayudarán a explicar mejor su mecanismo muy poco conocido y nuevos marcadores NED, para identificar fenotipos agudos de una población para un tratamiento oportuno, el grupo de investigación de Hu Yan y colaboradores (2002), se dieron a la tarea de crear un modelo *in vivo* que produjera una próstata con diferenciación NE denominado CR2-TAg. Utilizando microarreglos, compararon los patrones de expresión de las células neuroendocrinas del ratón CR2-Tag con respecto a las de un ratón normal, entre los genes diferencialmente expresados más sobresalientes por su *Fold Change* se identificó a *GAD1*, el cual codifica para la enzima GAD<sub>67</sub> que sintetiza GABA a partir de glutamato<sup>82</sup>. Joseph E. Ippolito y colaboradores (2005), continuando con el trabajo descubierto, cuantificaron la concentración del neurotransmisor en muestras de sangre del ratón CR2-TAg por medio de espectrometría de masas, resultando niveles de GABA (27.4±1.0µM) vs. ratones normales (7.3±2.2µM). A partir de las células NE del ratón CR2-Tag, generaron una línea celular denominada PNEC30 a la cual también se le cuantificó niveles de GABA, observando un enriquecimiento de 104 a 136 veces (51.8±7.6 nmol/mg). Además, tumores primarios (39.6±7.8 nmol/mg) vs. próstatas normales (0.38±0.14 nmol/mg)<sup>83</sup>. Concluyendo que la vía GABAérgica podría tener participación importante en la transformación neuroendocrina y tal vez en su actividad parácrina y/o autócrina.

La literatura referente a la vía GABAérgica en próstata es escasa. Sin embargo, Haruchito y colaboradores (2003), reportaron la estimulación de GABA en la expresión de metaloproteinasas y la promoción de la capacidad invasiva en células de cáncer de próstata a través de agonistas del receptor GABA<sub>B</sub>, además de una relación entre la presencia de GAD<sub>67</sub> y niveles de Gleason altos (>7)<sup>84</sup>. Por otra parte, se ha observado la expresión del receptor GABA<sub>A</sub> en líneas celulares

de cáncer de próstata y su influencia en la actividad proliferativa de dichas células<sup>85</sup>.

De manera análoga, las células neuroendocrinas presentes en otros órganos, como el estómago, poseen receptores GABAérgicos. Se ha demostrado que, al ser estimulados dichos receptores, son capaces de liberar neuropéptidos. El grupo de N. Weigert (1998) demostró, que infusiones de GABA exógeno causaban un incremento significativo en la liberación de GRP, al estimular receptores GABAérgicos de células del estómago de rata. Este hallazgo es de gran relevancia, ya que se demostró por primera vez que GABA endógeno y exógeno, contribuyen a la regulación vagal de la liberación de neuropéptidos en el estómago de rata<sup>86</sup>.

Dada la importancia que ha surgido en los últimos años en los tumores NEPC, por su escaso conocimiento y gran impacto en la esperanza de vida de los pacientes que lo padecen. En este trabajo pretende dilucidar si GABA participa en la liberación de GRP en células de CaP con fenotipo tipo NE, y el mecanismo por el cual lleva a cabo este proceso; ya sea por activación de la vía ionotrópica (a través del receptor de GABA<sub>A</sub>) o metabotrópica (a través del receptor de GABA<sub>B</sub>). Esto, haciendo uso de un modelo de transdiferenciación descrito por Wright M y colaboradores (2003)<sup>65</sup>, donde se obtienen células NE-like a partir de células LNCaP sensibles a andrógenos, mediante el silenciamiento del receptor de andrógenos, imitando la depleción de andrógenos en el entorno clínico. Así mismo, observar si existe una correlación de GABA y GRP en sueros de pacientes con CaP y replicarlo *in silico*, con la finalidad de identificar los mecanismos moleculares que intervienen en la progresión de la patología, además de la posible búsqueda de blancos terapéuticos.

## **HIPÓTESIS**

La vía GABAérgica pudiera estar participando en la producción de GRP que actúe de manera parácrina o autócrina en la progresión de cáncer de próstata.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la participación de la vía GABAérgica en la secreción de GRP en células NE-like de cáncer de próstata y su efecto parácrino y/o autócrino.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Transformar las células de CaP en células NE-like.
- Validar el modelo *in vitro*.
- Caracterizar el sistema GABAérgico en las células NE-like.
- Evaluar GRP, en el medio condicionado de las células NE-like expuesta a agonistas de GABA<sub>B</sub>.
- Demostrar el efecto parácrino y/o autócrino del medio condicionado de las células NE-like expuestas a agonistas de GABA<sub>B</sub>.
- Encontrar si existe una correlación de GRP y GABA en sueros de pacientes, así como la expresión de marcadores NE.
- Validar *in silico* los resultados obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO

Las líneas celulares LNCaP y PC3 que provienen de adenocarcinoma de próstata fueron obtenidas de ATCC (The American Type Culture Collection), usadas entre el pase de cultivo 10-12. Las células LNCaP fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) y PC3 en medio DMEM (Corning). Ambos medios contenían 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Corning). Las células se mantuvieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se usó Baclofen (Sigma-Aldrich) como agonista del receptor GABA<sub>B</sub> en diferentes concentraciones (1, 10 y 100 µM) por 12 horas y CGP 35348 (Sigma-Aldrich) como antagonista del receptor GABA<sub>B</sub>. Las células de cáncer fueron pre-tratadas con el antagonista por 2 horas, a diferentes concentraciones (10, 50 y 100 µM) para inhibir la secreción de GRP y después incubadas con agonista (100 µM) por 12 horas.

### TRANSFECCIÓN CON ARN PEQUEÑO DE INTERFERENCIA (siARN)

Las células LNCaP (2X10<sup>5</sup>) fueron cultivadas en medio RPMI libre de rojo de fenol (Sigma-Aldrich). Después, las células fueron transfectadas con el siARN Silencer select (Life Technologies) dirigido a *AR* (siARN ID: s1538) y el siARN control negativo (siARN ID: AM4615), como agente de transfección se utilizó DharmaFECT2 (Dharmacon), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración a la que se utilizaron los siARNs fue de 12.5 nM por experimento. Se cambió el medio de cultivo después de la transfección, cada 24 horas por 96 horas.

### COLECTA DE MUESTRAS DE PACIENTES

Un total de 10 pacientes hombres mexicanos, tratados en el Hospital General Dr. Manuel Gea González entre Julio 2012 y febrero 2013, participaron en el presente estudio, todos los pacientes contaban con su consentimiento informado firmado. El protocolo del estudio se aprobó por el comité de ética del Hospital General Dr. Manuel Gea González (No. CIEI/144/12), con número de registro (28-53-2012). Los criterios de inclusión para el estudio, fueron los siguientes: todos los pacientes

presentaron nódulo palpable, detectados por el examen rectal digital (ERD) y niveles de sangre de APE>2.5 ng/ml. El diagnóstico prosiguió con los ensayos hechos por el patólogo, el cual determinó si la biopsia era maligna dado a sus características histopatológicas. Las 10 muestras fueron diagnósticas con CaP, la escala Gleason de cada espécimen fue detectada cuidadosamente bajo la examinación del microscopio. El grupo control que estaba constituido por pacientes diagnosticados con Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), fueron biopsias que presentaban glándulas benignas y células prostáticas normales. De cada paciente se obtuvo muestras de sangres y orina. Los datos patológicos y clínicos de los pacientes que participaron, se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Información clínica de pacientes.

Pt.	Edad	Escala Gleason	APE (ng/ml)	Cirugía	Terapia Hormonal
<b>Hiperplasia Prostática Benigna</b>					
1	62	-	3.3	Prostatectomía	-
2	75	-	5.65	Prostatectomía	-
3	68	-	6.5	Prostatectomía	-
4	72	-	5.53	Prostatectomía	-
5	65	-	16.2	Prostatectomía	-
<b>Cáncer de Próstata</b>					
A	65	3+3	4.87	Prostatectomía	-
B	65	4+4	12	TURP	-
C	64	4+4	4.5	TURP	-
D	83	5+4	31	TURP	+
E	80	3+3	8.4	TURP	+
F	74	3+3	16.0	TURP	-
G**	64	4+4	147	-	+
H*	76	4+3	160	-	+
I*	74	3+3	32	TURP	+
J*	77	3+3	30	TURP	+
* Pacientes con CaP y características NE; **Pacientes con CPRC; TURP; Resección transuretral por sus siglas en inglés.					

## PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE ORINA Y EXTRACCIÓN DE ARN

El procesamiento de las muestras de orina de los pacientes, fue hecha con base a lo ya estandarizado anteriormente en el laboratorio<sup>87</sup>. Una vez que las muestras de orina fueron recolectadas, se mezclaron con 5 ml de buffer RNAlater (Qiagen), como agente estabilizante del ARN. La extracción del ARN se hizo usando el Kit RNeasy Mini (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## ENSAYO DE TIEMPO REAL RT-PCR

El ARN total de las líneas celulares fue obtenido con el Kit RNeasy (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Un total de 800 ng provenientes de las líneas celulares y 250 ng de las muestras de orina (como se describió previamente<sup>87</sup>) de ARN respectivamente, fue utilizado para transcribir a ADNc utilizando el reactivo SuperScript II (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la PCR cuantitativa a tiempo real se ocupó 1 µl del ADNc obtenido de la retrotranscripción; para este ensayo se ocupó el equipo de Life Technologies: Sistema ViiATM7 Real-Time PCR System haciendo uso de sondas TaqMan. Las siguientes sondas fueron utilizadas: *AR* (Hs00171172\_ml), *GAPDH* (Hs02758991\_gl), *KLK3* (Hs01105076\_m1), *PCA3* (Hs01371939\_g1), *GABBR1* (Hs00559488\_m1), *GRPR* (Hs01055872\_m1), *ENO2* (Hs00157360\_m1). Los datos fueron analizados por el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , usando *GAPDH* como gen endógeno.

## EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y ANÁLISIS CON WESTERN BLOT

Las células fueron lisadas con el Buffer RIPA (Sigma-Aldrich), posteriormente se agregaba inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Las proteínas se obtuvieron después de centrifugar el lisado, a 12,500 rpm a una temperatura de 4°C por 30 minutos. La cuantificación se llevó a cabo usando el Kit EZQ Protein Quantitation (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas (30 µg) se separaron por electroforesis en un gel de SDS-PAGE (Bio-Rad). Para visualizar en el gel el peso de las proteínas blanco, se utilizó la escalera SeeBlue Plus2 (Invitrogen). Posteriormente, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF (Millipore) a 20 Volts por 30 minutos. Las membranas fueron previamente activadas con metanol, una vez que terminaba la transferencia eran lavadas con buffer TBS-T y bloqueadas con leche al 5% en buffer TBS-T durante toda la noche a 4°C y en agitación constante. Después de quitar el exceso de leche, se colocaba el anticuerpo primario apropiado, para *AR* (1:500 ab108341), *GABBR1* (1:500 ab75239), *GAD<sub>65</sub>* (1:500 ab26116) de ABCAM, para *GAPDH* (1:20000 5174s),

ENO2 (1:200 9536s), GAD<sub>67</sub> (1:500 3988) obtenidos de Cell Signaling y por último GRP (1:500 sc-271045) de Santa Cruz, toda la noche a 4°C.

Los blots se incubaron con los siguientes anticuerpos secundarios anti-conejo (1:5000 ab99697) obtenidos de ABCAM o anti-ratón (1:300 7076s) de Cell Signaling, respectivamente, ambos conjugados con peroxidasa e incubados a temperatura ambiente por 2 horas. Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas haciendo uso del sustrato Luminata<sup>TM</sup> Forte Western HRP (Millipore<sup>TM</sup>), incubado por 5 minutos y visualizadas en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad). La cuantificación de los resultados se llevó a cabo usando el software ImageJ.

## INMUNOFLUORESCENCIA

Una vez que las células LNCaP eran transfectadas como se menciona previamente, se colectaron cada 24 horas durante 96 horas. Después, se fijaron con 4% (v/v) de paraformaldehído, posteriormente se permeabilizaron con 1% (v/v) de Triton X-100. Más adelante, las células se bloqueaban con 1% de Suero Fetal Bovino en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Después fueron marcadas con anticuerpo policlonal de conejo anti-GABA (1:100 A2052; Sigma-Aldrich), por 1 hora a temperatura ambiente y por anticuerpo monoclonal de ratón anti-AR (1:50 ab9474; ABCAM), incubado toda la noche a 4°C. El anticuerpo anti-GABA se detectó con Alexa Fluor 488 burro anti-conejo (Invitrogen), y el anti-AR se detectó con Alexa Fluor 568 anti-ratón (Invitrogen), ambos incubados por 1 hora. Los núcleos se tiñeron con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen). La inmunofluorescencia se observó usando el Microscopio Confocal (Zeiss LSM 510 Axiovert 200M Laser Scanning).

## PREPARACIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO (MC)

Después de 96 horas de la transfección (LNCaP-siAR y LNCaP-Control), las células se incubaron por 12 horas con diferentes concentraciones de Baclofen (1, 10 and 100µM) o vehículo (agua estéril). Posteriormente al tiempo de incubación, se colectó el medio condicionado y se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos a una

temperatura de 4°C; después el medio fue filtrado a través de membrana de nylon de 0.2 µM, al cual se le agregó inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich), inmediatamente se utilizó para los respectivos ensayos o fue congelado a -80°C hasta posterior uso.

#### ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Se utilizó el ensayo de ELISA para cuantificar la concentración de GRP en los medios condicionados y suero de pacientes. Las muestras de sueros fueron separadas por filtro para centrífuga 3K (Amicon). El ensayo comenzó en platos de 96 pozos (Maxisorp, Nunc), los cuales se cubrían por medio condicionados o GRP sintetizado toda la noche a 4°C. Después, se lavaron tres veces con buffer PBS-Tween, posteriormente se bloquearon por medio de albúmina a temperatura ambiente por 2 horas. Una vez terminado el bloqueo, se incubó con el anticuerpo monoclonal específico para GRP humano (0.5 µg/ml; GenScript) toda la noche a 4°C. Después, se hicieron lavados para agregar el anticuerpo secundario anti-conejo (1:8000 ab996997; ABCAM) conjugado con peroxidasa, incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Las placas de ELISA eran reveladas haciendo uso del sustrato Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific) y posteriormente se leyeron en un espectrofotómetro Epoch Micro plate (BioTek) a una absorbancia de 450 nm. Las concentraciones de GRP se determinaron por medio de una curva estándar, haciendo uso del péptido sintetizado (GRP: GenScript), los resultados fueron presentados en pg/ml.

#### ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Se realizó el ensayo de proliferación celular mediante el kit de Citometría de Flujo con BrdU (*Affymetrix*®). En placas de 6 pozos se sembraron  $1 \times 10^5$  células con medio DMEM blanco (sin el indicador de pH, rojo de fenol) al 10% de SFB. A las 24 horas se realizó el tratamiento de 5 nM de GRP sintetizado (GenScript) (Equivalente al 35% de la concentración de GRP en el MC), en medio blanco y suero Charcoal al 5%, repitiéndolo cada 24 horas. 24, 48, 72 y 96 horas después se realizó lo siguiente:

Se lavaron las células y se les adicionó 10  $\mu$ M de BrdU en medio blanco al 10% de SFB. Las placas se incubaron por 2 horas a 37°C y se cuantificaron  $2 \times 10^5$  células de cada replicado con ayuda de un hematocitómetro, para homogenizar las condiciones y que el número celular no fuera un factor de variabilidad. Las células se centrifugaron a 1700 rpm por 5 minutos y se recuperó el botón.

Posteriormente las células se incubaron por 20 minutos en oscuridad en Buffer de tinción de BrdU (500  $\mu$ l). Se lavaron las células con Buffer de Tinción para Citometría de Flujo (2 ml), se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se incubaron con DNasa I (60  $\mu$ l) por 1 hora en oscuridad a 37°C, se lavaron dos veces con Buffer de Tinción para Citometría de Flujo (2 ml) y se centrifugaron en las mismas condiciones. Al botón celular se le añadieron 4  $\mu$ l del anticuerpo anti-BrdU y se incubó por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después de lavar las células y centrifugarlas nuevamente, el botón se resuspendió con 500  $\mu$ l de PBS y se leyó en el Citómetro BD FACSAria®.

## ENSAYO DE INVASIÓN

Para el ensayo de invasión, se colocaron 100  $\mu$ l de Matrigel (*Corning*®) (a 1 mg/ml) en la cámara superior del inserto Transwell con poros de 8  $\mu$ m y se dejó incubar a 37°C toda la noche para que polimerizara. Las líneas celulares PC3 y LNCaP fueron resuspendidas en medio libre de suero (DMEM o RPMI). En la cámara superior se sembraron  $6 \times 10^4$  células en 200  $\mu$ l de medio blanco libre de suero y las placas se incubaron a 37°C por 6 o 24 horas. A la cámara inferior se adicionaron 700  $\mu$ l de medio condicionado como quimioatrayente. Se recuperaron los insertos y se lavaron con PBS. Posteriormente se fijaron las células con formaldehído (3.7%) por dos minutos, se lavaron los insertos sumergiéndolos en PBS dos veces y se permeabilizaron con metanol al 100% por 20 minutos. Finalmente se tiñeron los insertos con cristal violeta al 0.5% por 15 minutos, se lavaron las membranas con PBS y se retiró el excedente de colorante con un hisopo. Se dejaron secar y se observaron al microscopio. Las células se contaron en ImageJ y se obtuvieron las gráficas correspondientes.

## ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Los niveles de GABA en el lisado de las proteínas de las células, en el medio condicionado y en el suero de pacientes fue determinado por HPLC, descrito previamente por Salazar y colaboradores (1994)<sup>88</sup>. Se agregó ácido perclórico (0.6% de concentración final) a las muestras para homogeneizarlas. Las proteínas fueron sedimentadas en una microcentrífuga. El sobrenadante se neutralizó con KOH y centrifugó nuevamente para sedimentar el precipitado del perclorato de potasio. Los aminoácidos fueron derivatizados con o-ftalaldehído, después de 3 minutos se tomaron 20 µl de la muestra y se inyectó dentro del cromatógrafo líquido Beckman, donde se usaron las columnas de fase reversa (25 cm+4 mm) y un gradiente lineal (desde 25% a 75% de metanol) de mezclas de metanol: 0.1 mM buffer de acetato de potasio, pH 5.5. La identificación y cuantificación de los picos se hizo acorde a su relación con la curva estándar de aminoácidos agregados, siguiendo el patrón del tiempo en el que le tomaría aparecer a cada uno de los aminoácidos, en este caso y por el interés; el tiempo de aparición de GABA.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La expresión de los genes y proteínas obtenidos por RT-qPCR, Western blot y los datos resultado del ensayo de invasión y proliferación fueron analizados por Graph Pad 6.0, se utilizó la prueba de análisis de varianza de dos vías (ANOVA) cuando se comparaban dos grupos y la de una vía (ANOVA) cuando la comparación era entre varios grupos. Para evaluar la correlación entre la expresión de GABBR1 y AR (con expresión de genes y proteínas de TCGA y de la cohorte de pacientes que colectaron en el estudio), se realizó una prueba de asociación entre muestras pareadas, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. La correlación de CPRC y NEPC se evaluó conjunta e independientemente. El lenguaje R para computación estadística (<http://www.R-project.org>) se utilizó para este análisis y la significancia estadística se asignó a  $p < 0.05$ .

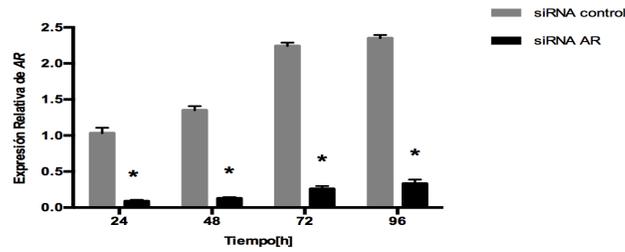
## RESULTADOS

### ESTABLECIMIENTO DE LAS CÉLULAS NE-LIKE POR MEDIO DEL SILENCIAMIENTO DE AR EN LA LÍNEA CELULAR LNCaP

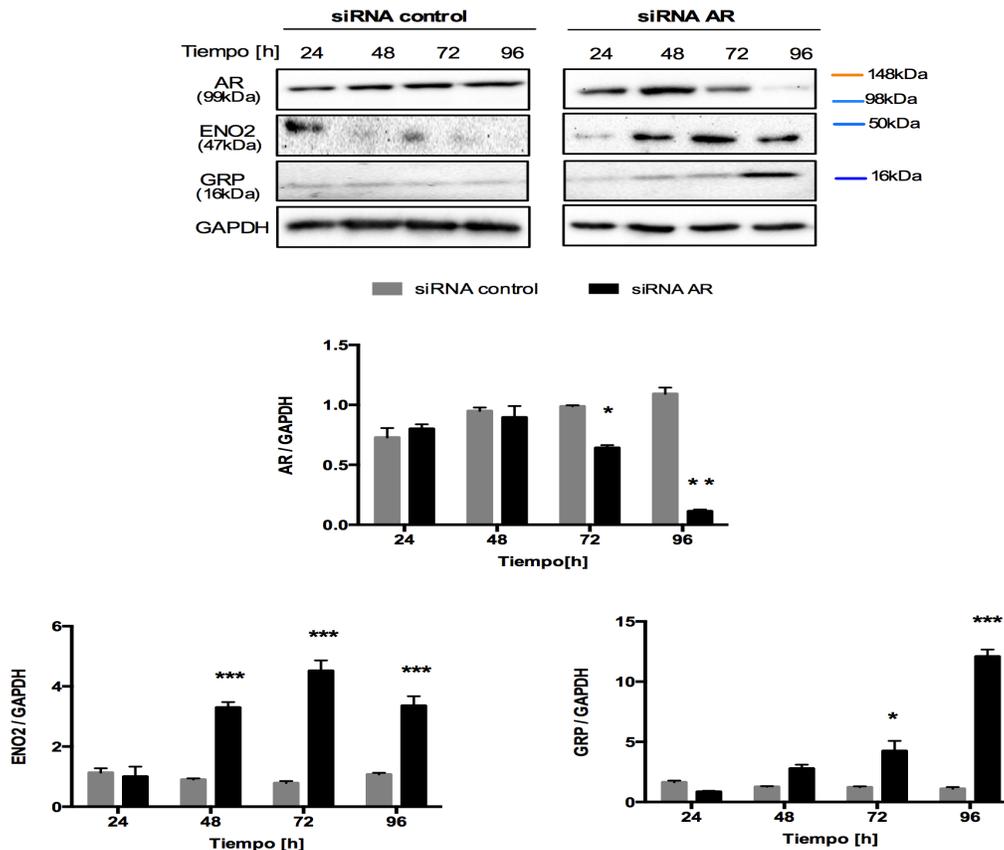
Wright y colaboradores (2003) reportaron que el silenciamiento de *AR* induce la expresión de proteínas específicas neuronales, tales como ENO2, lo cual permite el fenotipo NE en las líneas celulares LNCaP<sup>65</sup>. De igual manera, se decidió utilizar un siARN específico para *AR*, sobre las células LNCaP para establecer el modelo NE-like.

Las células LNCaP transfectadas con el siARN específico para *AR* (siARN-*AR*), mostraron un silenciamiento exitoso del gen *AR* a partir de las 24 horas hasta las 96 horas (>70% silenciamiento), comparado con las células transfectadas con el siARN control (\* $p < 0.0001$ ; Fig. 10a). A nivel de proteína, *AR* no se detectó a partir de las 96 horas (\*\* $p < 0.01$ ); en contraste, los niveles de la proteína de *AR* no tuvieron ningún cambio en las células control (Fig. 10b). Además, se confirmó que el silenciamiento de *AR*, permitió la sobreexpresión a nivel de proteína de ENO2 (\*\* $p < 0.001$ ). Por otra parte, GRP fue evaluado como una proteína NE específica, como se ha descrito anteriormente<sup>71</sup>. Se observó, que los niveles de proteína de GRP se elevaron cuando se silenció *AR* en las células (\* $p < 0.05$  y \*\*\* $p < 0.001$ ) (Fig. 10b).

(a)



(b)

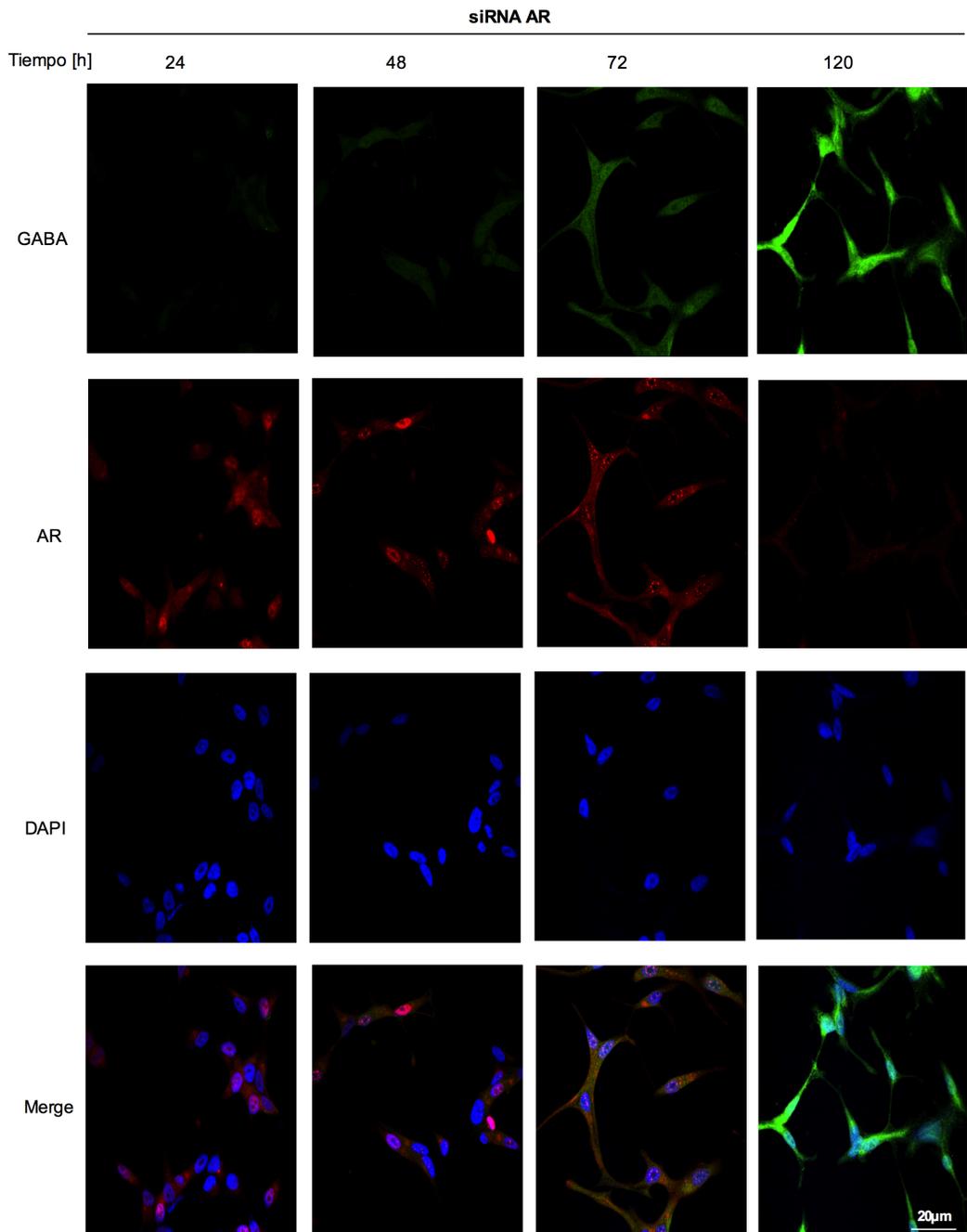


**Figura 10. Establecimiento de la línea NE-like a través del silenciamiento por siARN específico para AR en las células LNCaP.** a) Los niveles de expresión de AR se analizaron mediante RT-qPCR en células LNCaP transfectadas con un siARN específico para AR y un siARN control desde 24 horas hasta 96 horas, en medio RPMI suplementado al 10% SFB. Los experimentos se repitieron cuatro veces. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), \* $p < 0.0001$ . b) Panel superior, se representa un análisis de Western blot donde se muestran los niveles de proteína de AR, ENO2 y GRP en las células LNCaP transfectadas con un siARN específico para AR y un siARN control desde 24 horas hasta 96 horas. GAPDH se utilizó como control de carga. En el panel inferior, se muestran las gráficas que se obtuvieron de los datos de la densitometría de las proteínas, cuantificados por el software ImageJ. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM ( $n=3$ ) \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control.

Estos resultados confirmaron, la hipótesis del vínculo potencial entre la inactivación de AR y el incremento de las células NE en tumores andrógeno-independientes<sup>65</sup>.

#### PRESENCIA DE GABA EN LAS CÉLULAS LNCAP DESPUÉS SILENCIAR AR CON SIARN

Existen estudios que han reportan la sobreexpresión de GABA y sus receptores en células NE en comparación con otros tipos celulares de próstata<sup>83</sup>. Por lo tanto, fue de gran importancia examinar la existencia de GABA en las células LNCaP después de que se silenciará *AR*. Interesantemente, a las 96 horas cuando las células exhibieron niveles casi indetectables de *AR*, se detectó un aumento de los niveles de GABA. En ese tiempo, las células también mostraron cambios morfológicos, reflejados en el aumento de protuberancias y procesos parecidos a dendritas (Fig.11). Las células que fueron transfectadas con el siARN control se mantuvieron sin cambios morfológicos o aumento en los niveles de GABA (Figura Suplementaria 1).



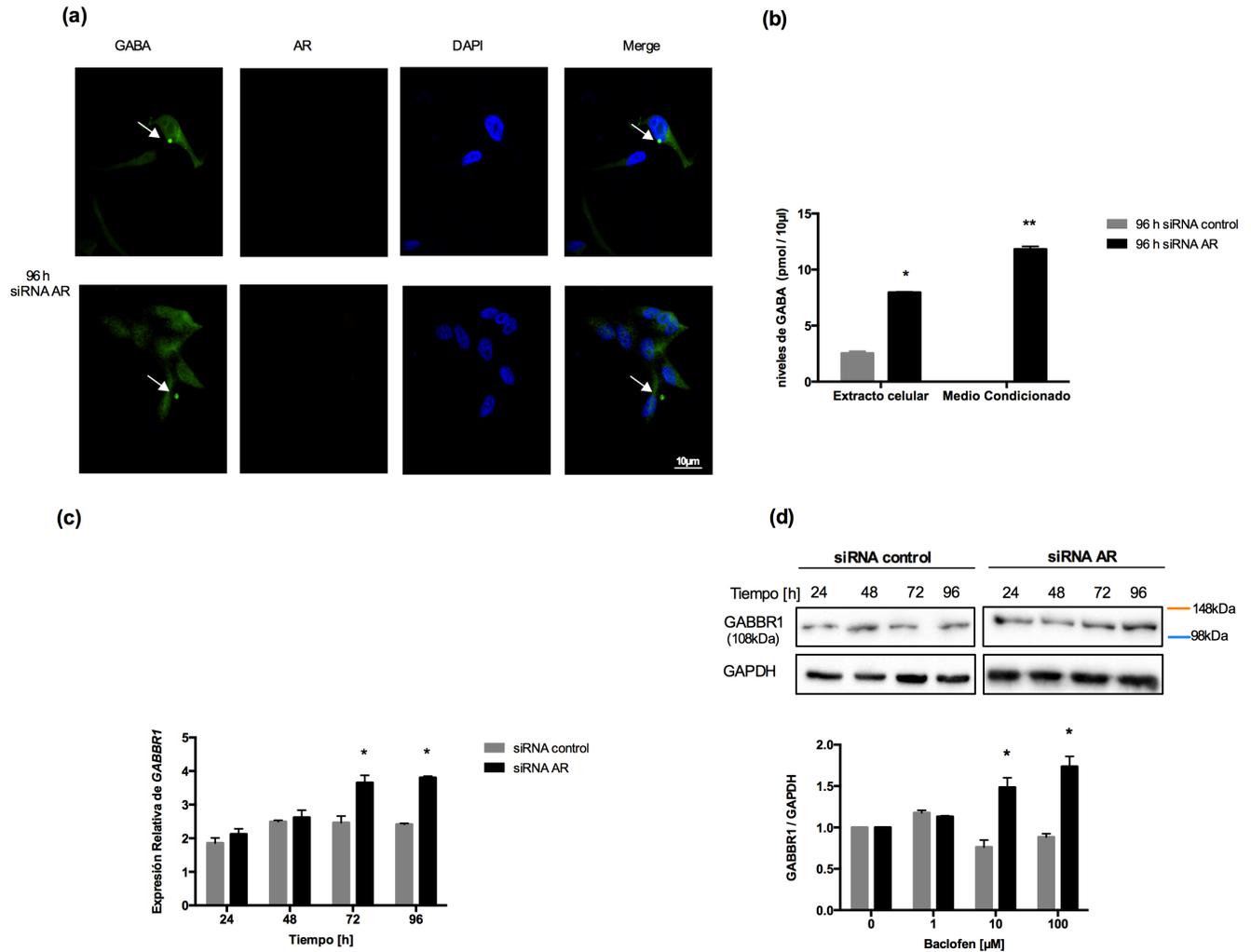
**Figura 11. Los niveles de GABA son inducidos en células NE-like.** Se realizó inmunofluorescencia para examinar los niveles de GABA y AR en las células LNCaP, que fueron transfectadas con un siARN específico para AR desde 24 horas hasta 96 horas. Se utilizó un anticuerpo contra GABA (tinción verde), un anticuerpo anti-AR (tinción roja) y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para marcar los núcleos. Los niveles de GABA aumentaron, después de silenciar AR. Se pueden apreciar cambios morfológicos, entre ellos cabe mencionar, protuberancias tipo dendritas, esas células son las mismas que tuvieron un incremento en los niveles de GABA y un decremento en AR.

Estos resultados, sugirieron que la adquisición del fenotipo NE está relacionada con el aumento de los niveles de GABA, y la pérdida de la expresión y presencia de AR en las células LNCaP.

## LAS CÉLULAS NE-LIKE SECRETAN VESÍCULAS DE GABA, ACCIÓN MEDIADA POR GABBR1

Interesantemente, se encontró que las células LNCaP eran capaz de secretar vesículas de GABA después de 96 horas del silenciamiento de *AR* (Fig. 12a, Fig. Suplementaria 2). Para evaluar más a fondo la secreción de vesículas de GABA en las células NE-like, ya que por primera vez se observaba tal fenómeno, se utilizó HPLC. Se midieron los niveles de GABA en los extractos celulares y el medio condicionado de células con silenciamiento de *AR* y células control a las 96 horas de haber sido transfectadas. Como resultado, se encontraron niveles de GABA en el extracto celular de las células LNCaP silenciadas con siARN-*AR* (\* $p < 0.01$ ; Fig. 12b), pero no hubo presencia de GABA en el medio condicionado de las células transfectadas con el siARN control (\*\* $p < 0.001$ ; Fig. 12b).

Posteriormente, se evaluó la expresión de los receptores de GABA<sub>B</sub>, con base a la evidencia en reportes, que sugieren que estos receptores se encuentran favoreciendo metástasis, particularmente en tumores NEPC<sup>61,84</sup>. Por lo que se midió la expresión de *GABBR1*, la cual fue inducida ~1.2 veces a partir de las 72 horas después del silenciamiento. Los niveles de expresión se mantuvieron hasta las 96 horas después del silenciamiento (\* $p < 0.0001$ ; Fig. 12c). Por lo contrario, los niveles de *GABBR2* no cambiaron a través de los tiempos del silenciamiento de *AR* en LNCaP (Fig. Suplementaria 3). Los niveles de proteínas de *GABBR1* incrementaron ~0.8 veces a las 96 horas después del silenciamiento de *AR* (\* $p < 0.05$ ) (Fig. 12d), cuando *AR* era casi indetectable.



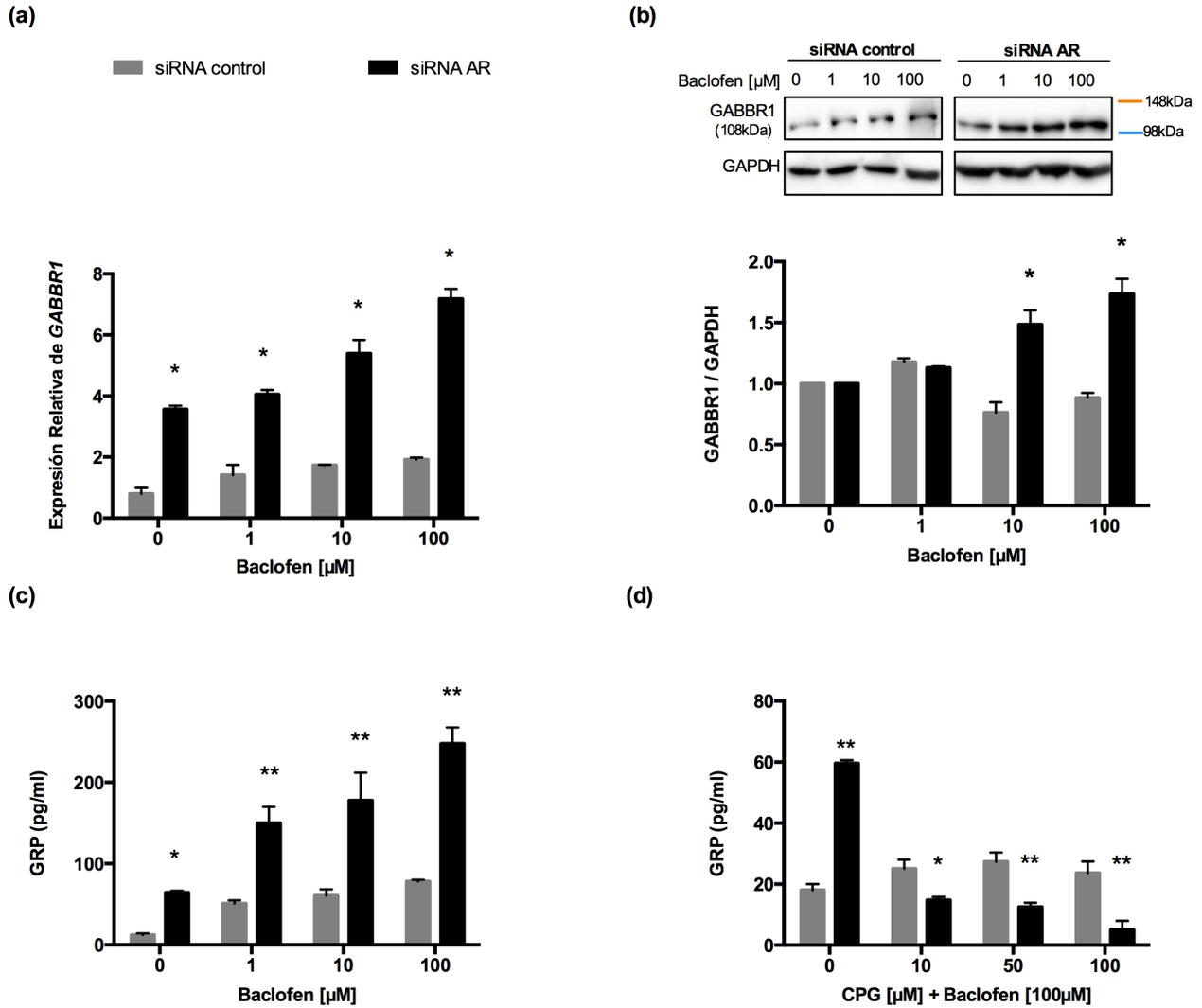
**Figura 12. Secreción de vesículas de GABA en células NE-like mediadas por GABBR1.** a) Se detectaron vesícula de GABA (tinción verde) por inmunofluorescencia, en células LNCaP después de 96 horas de transfección con el siARN-AR. Las vesículas se encuentran indicadas con flechas; se usó el anticuerpo anti-AR (tinción roja) y 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI). b) Se evaluaron los niveles de GABA mediante HPLC en células transfectadas con siARN-AR y siARN control después de 96 horas, a partir de alícuotas de lisado total de proteínas y medio condicionado. Se realizaron los experimentos tres veces por separado. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.001$ . c) Se examinaron los niveles de expresión de *GABBR1* mediante RT-qPCR en células LNCaP transfectadas con siARN-AR y siARN control. Los experimentos fueron hechos por triplicado. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), \* $p < 0.001$ . d) Western blot para el análisis a nivel de proteína de GABBR1, después de la transfección con siARN-AR y siARN control desde 24 horas hasta 96 horas. GAPDH se utilizó como control de carga, se muestran blots representativos de tres experimentos (panel superior). Se muestra GABBR1/GAPDH en la gráfica de barras (panel inferior), \* $p < 0.05$ .

Estos resultados demuestran, que los niveles de GABA y GABBR1 se encuentran sobreexpresados en las células NE-like.

## GABA EXÓGENO Y ENDÓGENO REGULAN LA SECRECIÓN DE GRP A TRAVÉS DE GABBR1 EN CÉLULAS NE-LIKE

Con base a los resultados anteriores, se exploró la posible participación de GABBR1 en la secreción de GRP (implicado en invasión celular), como se había descrito previamente en células endocrinas del estómago<sup>84,86,89</sup>. La estrategia utilizada fue la siguiente; se midieron los niveles de expresión de GABBR1 a nivel génico y proteico en las células NE-like, al ser tratadas con agonista (baclofen) de GABA<sub>B</sub>. Los niveles de expresión de *GABBR1* incrementaron con las diferentes concentraciones de baclofen (\*p<0.0001; Fig.13a). En el análisis de Western blot, los niveles de GABBR1 mostraron incrementos en las células NE-like tratadas con 10 y 100 μM de baclofen (\*p<0.001; Fig. 13b). Además, las concentraciones de GRP eran más altas en el medio de las células NE-like tratadas con baclofen en comparación con las células control (Fig.13c).

Para confirmar la participación del receptor de GABA<sub>B</sub> en la secreción de GRP, se expuso a las células NE-like y control a diferentes concentraciones del antagonista del receptor GABA<sub>B</sub>; CPG 35348 (10,50 y 100 μM) por 12 horas, combinado con baclofen (100 μM), ya que fue la concentración que dio resultados de secreción más aptos. Lo cual confirmó que el antagonista CPG 35348 bloqueaba la secreción de GRP. De hecho, en la concentración más alta de CPG 35348 se inhibió la secreción de GRP (Fig.13d).



**Figura 13. GABA promueve la secreción de GRP mediada por GABBR1 en células NE-like.** a) La expresión de *GABBR1* se evaluó mediante RT-qPCR en células LNCaP transfectadas con siARN-AR y siARN control por 96 horas y después tratadas con baclofen por 12 horas. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), \* $p < 0.0001$ . b) Los niveles de proteína de GABBR1 se analizaron mediante Western blot, con las mismas características de muestras utilizadas para la expresión del gen. GAPDH se utilizó como control de carga. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM ( $n=4$ ) \* $p < 0.001$ . El último resultado se normalizo a 1 con respecto al vehículo. Las concentraciones de GRP, en los medios condicionados de las células transfectadas por siARN-AR y siARN control por 96 horas, se cuantificaron por ELISA ( $n= 3$ /grupo). c) Se midieron las concentraciones de GRP en el medio de ambos tipos de células, incubadas en medio RPMI y se trataron con diferentes concentraciones de Baclofen ( $GABA_B$  agonista) 1 ,10 y 100  $\mu$ M por 12 horas. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), \* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.0001$ . d) Se utilizó antagonista de GABAB (CGP 35348) para tratar a las células con diferentes concentraciones (10, 50 y 100  $\mu$ M) en combinación con baclofen (100  $\mu$ M) por 12 horas. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), \* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.0001$ .

Todos estos resultados sugieren por primera vez, que GABBR1 estimula la secreción de GRP en las células NE-like.

#### MODIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD INVASIVA DE LAS CÉLULAS PC3 POR EL MEDIO CONDICIONADO PROVENIENTE LA CÉLULAS NE-LIKE

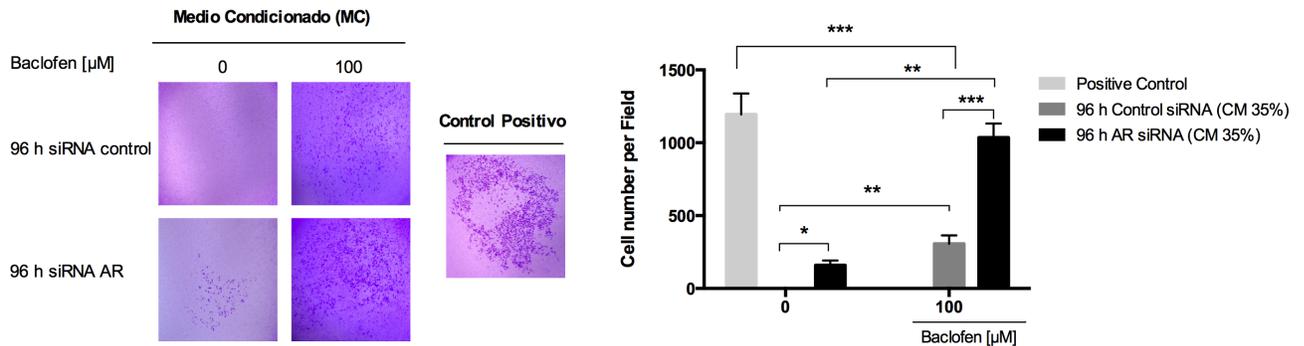
Se colectaron los medios condicionados de las células NE-like y células control, que fueron tratadas sin y con 100  $\mu$ M de baclofen por 12 horas. Por medio del ensayo de invasión utilizando cámaras Transwell, se evaluó si los medios condicionados que contenían concentraciones GRP podían modificar la capacidad invasiva de las células PC3. Para llevar a cabo lo anterior, se usó GRP sintetizado como control positivo para inducir invasión. En la parte superior de la cámara Transwell se sembraron  $6 \times 10^4$  células PC3, suspendidas en 200  $\mu$ l de medio de cultivo. En la parte inferior se adicionaron 700  $\mu$ l del medio condicionado respectivo o de GRP (control positivo). Las placas se incubaron por 6 horas, tiempo previamente publicado en la literatura<sup>90</sup>, como el más óptimo para estimular la invasión en PC3 por GRP.

Como se puede apreciar en la Figura 14a, existe un incremento significativo en la capacidad invasiva de las células PC3, cuando fueron expuestas al medio condicionado proveniente de las células NE-like. Lo que llamó la atención de estos resultados, fue el hecho de que el medio condicionado sin baclofen proveniente de las células NE-like, aumentaba significativamente la capacidad invasiva de las células PC3, en comparación del medio condicionado proveniente de las células control.

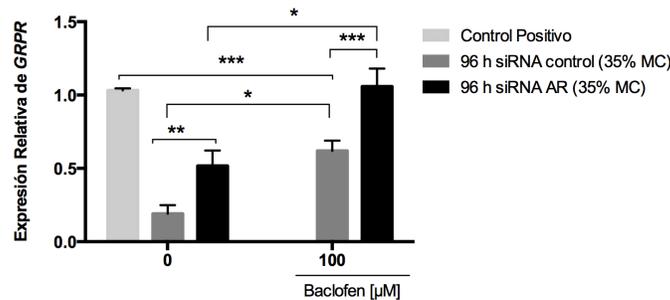
Por otra parte, se incubó las células PC3 con 35% del medio condicionado proveniente de las células NE-like o control, tratadas con y sin baclofen (100  $\mu$ M) durante 24 horas. Una vez que paso el tiempo, se obtuvo el ADNc de las muestras para realizar RT-qPCR y observar los niveles de expresión de *GRPR*. En la figura 14b, se aprecia un aumento significativo en la expresión de *GRPR* en células PC3 tratadas con medio condicionado, proveniente de las células NE-like tratadas con baclofen. Todos estos resultados, sugirieron que GRP secretado por las células

NE-like incrementa la capacidad invasiva de las células PC3 y esto correlaciona con un aumento en la expresión de *GRPR*, lo que podría sugerir que este efecto es mediado a través de GRPR.

(a)



(b)



**Figura 14. El medio condicionado de las células NE-like modifican la capacidad invasiva de las células PC3 a través de GRPR.** a) El ensayo de invasión se realizó usando una cámara Transwell. Se colocaron células PC3 ( $6 \times 10^4$ ), suspendidas en  $200 \mu\text{l}$  de medio de cultivo libre de SFB en la cámara superior. Se añadieron en la parte inferior de la cámara  $700 \mu\text{l}$  de medio condicionado, de las células transfectadas después de 96 horas con siARN-AR y siAR control y tratadas con baclofen ( $100 \mu\text{M}$ ), el tiempo de incubación fue de 6 horas. Los resultados se representan como media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes en pozos por triplicado, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  y \*\*\* $p < 0.0001$ . b) La expresión de *GRPR* fue analizada mediante RT-qPCR. Los resultados se representan como media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes por triplicado, \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.001$  y \*\*\* $p < 0.0001$ . GRP sintetizado se utilizó como control positivo; la concentración que se utilizó para realizar los experimento, representa el 35% del medio condicionado proveniente de las células transfectadas después de 96 horas con el siARN-AR y posteriormente tratadas con baclofen ( $100 \mu\text{M}$ ).

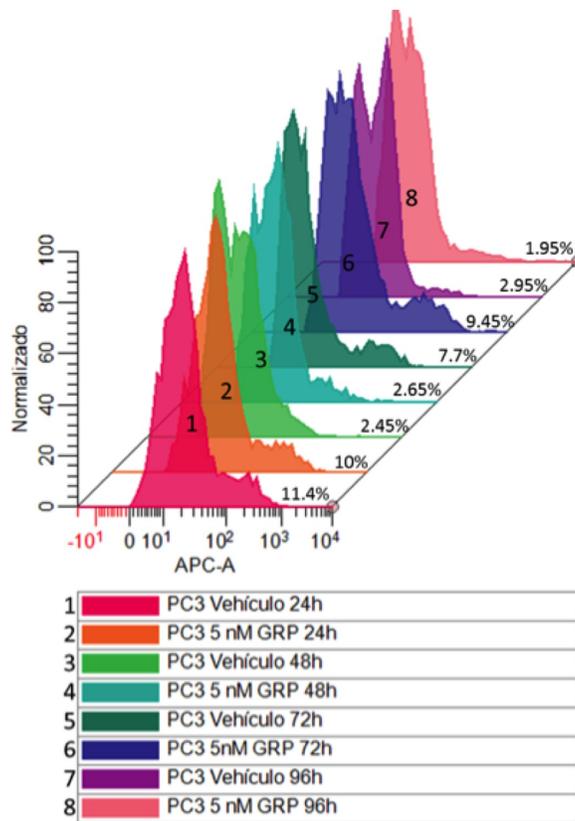
Se obtuvieron resultados similares en las células NE-like, cuando se estimularon con el medio condicionado descrito (Figura suplementaria 4).

## GRP NO ESTIMULA PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS ANDRÓGENO INDEPENDIENTE

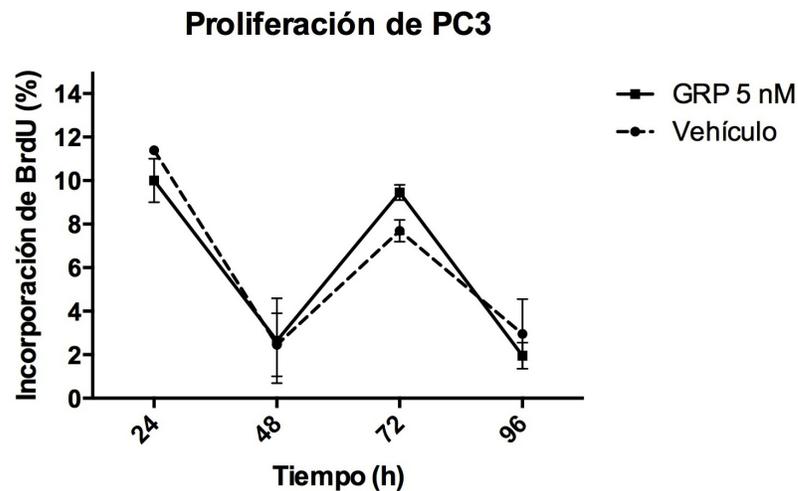
Para determinar si GRP incrementaba la proliferación celular en células andrógeno independiente, se estandarizó primeramente el ensayo con GRP sintetizado, usando la concentración previamente publicada, en varios estudios<sup>89,91,92</sup>.

Se sembraron ( $1 \times 10^5$ ) células PC3, mantenidas en medio DMEM blanco con 5% de Suero Charcoal y 5 nM de GRP sintetiza, desde 24 hasta 96 horas. Como control negativo del experimento se utilizó el vehículo ( $H_2O$ ). En cada uno de los tiempos se cuantificaron ( $2 \times 10^5$ ) células y se realizó el procedimiento descrito en materiales y métodos. Como se observa en la figura 15, el porcentaje de células en proliferación no varía entre los tratamientos; es decir, no hay diferencia significativa en la proliferación celular de PC3 entre los tratamientos con GRP y vehículo a través del tiempo, por lo que se puede concluir que GRP a 5nM aparentemente no estimula la proliferación de PC3. Por lo tanto, no se prosiguió a utilizar los medios condicionados, ya que no hubo cambios entre los tiempos, al ser estimulados con el control positivo.

a)



b)

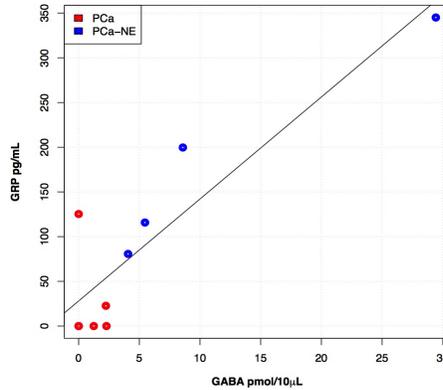


**Figura 15. Proliferación de PC3 estimulada con GRP evaluada por Citometría de Flujo mediante detección de BrdU.** a) Se observan los gráficos arrojados por el citómetro. El primer pico representa a la población celular que no incorporó BrdU, por lo tanto, no dan una señal positiva a APC; el segundo pico representa a las células que incorporaron BrdU, dado por la señal de APC. Al lado de cada condición se observa el promedio del porcentaje de incorporación de BrdU. Cada condición se realizó por duplicado. b) Representación gráfica del porcentaje de incorporación de BrdU a diferentes tiempos. Se realizaron los experimentos tres veces por separado. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). No existió diferencia significativa.

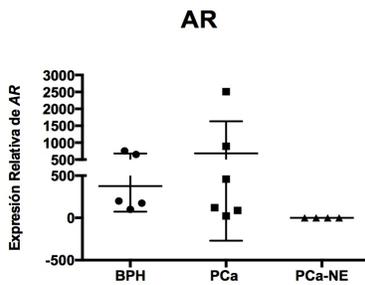
## CORRELACIÓN POSITIVA ENTRE GABA Y GRP EN PACIENTES CON CARACTERÍSTICAS NE

Para evaluar si existía una correlación entre GABA y GRP en pacientes, se evaluaron los sueros de diez pacientes con CaP. Como resultado, se observó una correlación positiva entre GABA y GRP en todas las muestras (coeficiente de correlación  $[r]=0.894$ ;  $p=0.0004$ ). Las medias  $\pm$  SEM, de las concentraciones séricas fueron las siguientes: GRP,  $88.92 \pm 35.91$  pg/ml; y GABA,  $5.33 \pm 2.8$  pmol/10  $\mu$ l. La sorpresa resultó, cuando se separaron las muestras en dos grupos de acuerdo con sus características moleculares, el grupo positivo a marcadores NE mostró una correlación positiva más fuerte ( $r=0.961$ ;  $p=0.03$ , Fig.16a).

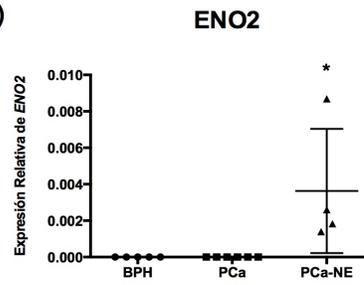
(a)



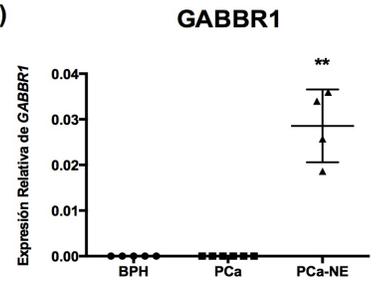
(b)



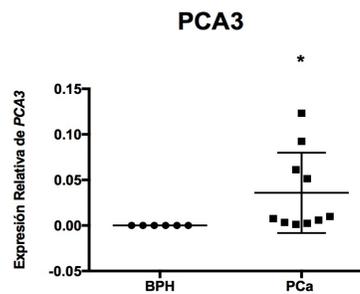
(c)



(d)



(e)



**Figura 16. Los niveles de GABA se correlacionan positivamente con los niveles de GRP en pacientes con marcadores NE.** a) Se encontró una correlación positiva entre los niveles de GABA y GRP en pacientes con CaP ( $r=0.894$ ;  $p=0004$ ;  $n=10$ ), cuando los pacientes se separaron dada sus características en CaP-NE, se halló una fuerte correlación positiva ( $r=0.961$ ;  $p=0.03$ ;  $n=4$ ). b,c,d) La expresión relativa de los genes *AR*, *ENO2* ( $*p<0.05$ ), *GABBR1* ( $**p<0.001$ ) en HPB vs. CaP y HPB vs. CaP-NE, respectivamente. Los niveles de expresión de *AR*, no fueron significativamente diferentes entre los grupos. e) Los niveles de expresión del gen *PCA3* fueron significativamente más altos en pacientes con CaP en comparación con pacientes con HPB ( $*p<0.05$ ).

Para segregar la población se midieron los niveles de expresión del marcador neuroendocrino *ENO2*, además de *AR* y *GABBR1*, en muestras de orina de pacientes con CaP ( $n=10$ ) y como grupo control se utilizó muestras de orina de pacientes con hiperplasia prostática benigna (HPB) ( $n=5$ ). El grupo al cual se le denominó CaP-NE mostró los niveles más bajo de expresión de *AR*, en

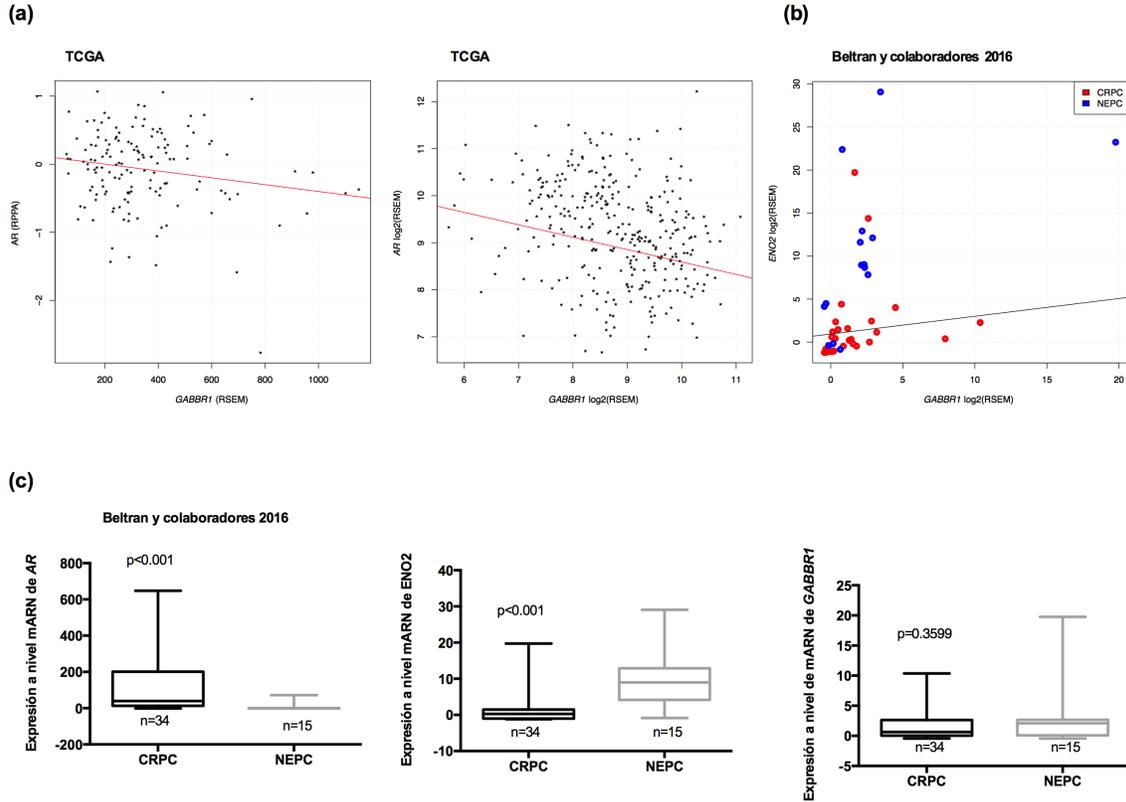
comparación con los otros dos grupos (CaP y HPB) (Fig.16b). El grupo CaP-NE demostró tener los niveles de expresión más elevados de *ENO2* (\* $p < 0.05$ ; Fig.16c) y un incremento en los niveles del gen *GABBR1* (\*\* $p < 0.001$ ; Fig.16d). Como control para el diagnóstico de CaP se evaluó la expresión de *PCA3* por RT-qPCR en muestras de orina de pacientes con CaP y HPB (\* $p < 0.05$ ; Fig.16e)<sup>87</sup>.

Teniendo en cuenta el número limitado de muestras, estos resultados sugirieron una fuerte correlación entre GABA y GRP en pacientes con características NE en CaP.

#### CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE *GABBR1* VS. AR Y *GABBR1* VS. *ENO2* EN TUMORES NEPC

Para evaluar de manera más profunda el papel de *GABBR1* en la progresión de CPRC a NEPC, se analizaron *in silico* los niveles de ARNm y proteína de AR, además de la expresión de *GABBR1* en datos de muestras diagnosticadas con CaP primario, provenientes de “The Cancer Genome Atlas Research Network”<sup>93</sup>. Lo que se descubrió fue un hallazgo bastante interesante, se encontró una correlación significativamente negativa entre la expresión de *GABBR1* y AR a nivel proteínico ( $r = -0.179$ ;  $p = 0.03$ ,  $n = 146$ , Fig.17a, panel de la izquierda) y a nivel de expresión génica ( $r = -0.274$ ;  $p = 0.003677^4$ ;  $n = 333$ ; Fig.17a, panel de la derecha).

Además, se examinaron un conjunto de datos generados por Beltran y colaboradores (2016)<sup>61</sup>, que incluían muestras de CPRC ( $n = 34$ ) y NEPC ( $n = 15$ ) para evaluar la regulación de *GABBR1* en NED. Es importante destacar, que se halló una correlación positiva entre la expresión de *GABBR1* y uno de los marcadores NE más utilizados (*ENO2*) en muestras CPRC ( $r = 0.539$ ;  $p = 0.22$ ;  $n = 15$ ; Fig.17b) en comparación con las muestras CPRC ( $r = 0.233$ ;  $p = 0.22$ ;  $n = 32$ ; Fig.17b).



**Figura 17. La expresión de *GABBR1* se correlaciona negativamente con la expresión de *AR* y positivamente con la expresión de *ENO2* en NEPC.** a) La expresión de *GABBR1* y *AR* a nivel de proteína se correlaciona de manera negativa, panel de la izquierda ( $r=-0.179$ ;  $p=0.03$ ;  $n=146$ ) y a nivel de expresión del gen *AR*, panel de la derecha ( $r=-0.274$ ;  $p=0.003677^{-4}$ ;  $n=333$ ). Los datos utilizados de expresión de genes y niveles de proteínas<sup>93</sup> para hacer las gráficas, se adquirieron de cBioPortal<sup>94,95</sup>. Se utilizó los datos generados por RNA-seq de un estudio previamente publicado, el cual cuenta con 49 muestras de CPRC<sup>61</sup>, con o sin diferenciación NE, datos obtenidos de cBioPortal<sup>94,95</sup>. b) La expresión de *GABBR1* y *ENO2* está correlacionada positivamente en grupo NEPC ( $r=0.539$ ;  $p=0.03$ ;  $n=15$ ), en comparación con el grupo CPRC ( $r=0.223$ ;  $p=0.22$ ;  $n=32$ ). c) Se representan graficados los valores de expresión de *AR*, *ENO2*, *GABBR1*, comparando los grupos NEPC y CPRC.

Adicionalmente, se observó que los niveles de expresión de *AR* se encontraban sub-expresado en NEPC en comparación con CPRC (Fig. 17c), por otra parte, la expresión de *ENO2* se halló sobreexpresado en NEPC en comparación con CPRC (Fig.17c). Estos resultados sugirieron una correlación negativa entre la expresión de *GABBR1* y *AR* a nivel génico y proteico en pacientes con CaP, pero una correlación positiva entre la expresión de *GABBR1* y *ENO2* (marcadores NE) en pacientes con NEPC.

## DISCUSIÓN

Este estudio tuvo como objetivo revelar el papel de GABA en la secreción de GRP, mediada por GABBR1, en células NE/NE-like de cáncer de próstata. Se mostró por primera vez que GABA exógeno y endógeno, estimulaban la secreción de GRP en células NE/NE-like y por consecuencia promovieron la invasión de las células andrógeno independiente.

La biología de los tumores NEPC sigue siendo un enigma para científicos y médicos. Por esa razón la necesidad urgente, de un mejor entendimiento de los eventos moleculares implicados en la transformación a NEPC, para proporcionar una solución terapéutica adecuada a pacientes con dicho padecimiento.

Existe una gran aprobación entre los investigadores que estudian CaP acerca de, que la transdiferenciación de un fenotipo epitelio-like a NE-like representa, un proceso biológico que se puede considerar consecuencia de la presión selectiva inducida, por los tratamientos que conducen al bloqueo androgénico.

Ralph Buttyan y colaboradores (1987), fue el primer grupo de investigación en observar que las células LNCaP se someten a transdiferenciación NE, cuando se exponen crónicamente a la ausencia de andrógenos y suprimen el fenotipo NE, al restaurar la exposición de los mismos<sup>63</sup>. Muchos laboratorios han confirmado este hallazgo, además de demostrar que en la mayoría de los casos la transdiferenciación implica la reducción en la expresión y/o actividad de AR, lo que conlleva a la progresión de CaP<sup>65</sup>. Además, estudios clínicos han reportado que, la diferenciación neuroendocrina (NED) se incrementa dentro de los tumores CPRC, además del aumento de los niveles de péptidos neuroendocrinos como; ENO2 y cromograninas en suero de pacientes con CPRC. Como se evidencia, la NED se asocia con la progresión de CaP, hacia una patología más avanzada y letal<sup>66-68,96,97</sup>.

Recientemente, Beltrán y colaboradores (2016), demostraron que la evolución divergente de NEPC está asociada con la reducción de la expresión AR, en una o más células de CPRC, mediante evolución clonal lineal o independiente<sup>61</sup>.

Wright y colaboradores (2003), descubrieron que AR era requerido para reprimir el proceso de transdiferenciación neuroendocrina en células de CaP *in vitro*. Además, sugirieron que AR podría estar reprimiendo activamente un proceso análogo de transdiferenciación en células de CaP *in vivo*<sup>65</sup>. Replicando su metodología se confirmó que, en la mayoría de los casos, la transdiferenciación se encuentra asociada con la reducción de la expresión de AR<sup>65</sup>. Además, se corroboró que las células NE-like expresaban marcadores NE como; ENO2 y GRP.

Otro hallazgo sumamente interesante en este estudio, fue la detección de niveles elevados de GABA después del silenciamiento de AR en las células. Así mismo, la capacidad de las células NE-like para secretar vesículas de GABA, las cuales enriquecían los medios condicionados de las mismas, en comparación de los medios condicionados de las células control. Previamente, se había reportado la presencia de GABA y sus dos receptores; GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub><sup>82</sup> en células NE-like provenientes de muestras con CaP. Por otra parte, Ippolito y colaboradores (2005), desarrollaron ratones transgénicos llamados; CR2-TAg, capaces de producir tumores NEPC. En ellos, encontraron altos niveles de GABA en la próstata y sangre en comparación de las muestras de ratones normales<sup>83</sup>.

Al convertirse GABA en un tema crítico en esta investigación, fue importante descubrir el mecanismo por el cual estaba sucediendo su incremento en las células NE-like. GABA es un aminoácido neurotransmisor sintetizado a partir de la descarboxilación del glutamato por la enzima descarboxilasa de ácido glutámico (GAD); se tienen identificado dos isoformas<sup>78</sup>. Por consecuencia en éste estudio, se midieron los niveles de las proteínas GAD<sub>65</sub> y GAD<sub>67</sub> en las células NE-like sin embargo, no se detectó presencia de ninguna de las dos proteínas en las muestras. Se incluyeron controles positivos para cada uno de los anticuerpos, descartando que la ausencia de señal fuera por la técnica usada (Figura Suplementaria 5). Como resultado, se sugirió que la síntesis de GABA es GAD-

independiente en las células NE-like, consistente con lo descrito por Ippolito y colaboradores<sup>98</sup>.

Ippolito y colaboradores (2006), a través de una metodología *in silico* construyeron el metaboloma de las células NE del ratón CR2-TAg, sus resultados demostraron que la síntesis de GABA era GAD-independiente. Descubrieron que la síntesis de GABA era a través de una proteína diamino oxidasa llamada; proteína 1 de unión-amilorida (Abp1). En esta vía alterna, la ornitina decarboxilasa convierte a la ornitina componente del ciclo de la urea, en putrescina que después se metaboliza a 4-aminobutanal por Abp1. Posteriormente, Aminobutanal se metaboliza en GABA por aldehído deshidrogenasa<sup>98</sup>.

Además, en el estudio presentado, se detectaron altos niveles de GABBR1 a nivel ARNm y proteína en células NE-like, lo que sugirió que GABBR1 podría tener un papel importante en la señalización GABAérgica de las células NE-like.

El receptor GABA<sub>B</sub> ha sido implicado en metástasis de CaP al promover la producción de metaloproteinasas (MMP), además de ser capaz de estimular invasión de células andrógeno independiente<sup>84</sup>, es importante recordar que NEPC se encuentran fuertemente asociados con tumores metastásicos y resistentes al tratamiento<sup>99</sup>.

Otra característica importante de los tumores que muestran NED, es la producción de péptidos con características NE como; GRP, que tiene un papel esencial en el desarrollo a resistencia a la castración, ya que actúa como factor mitógeno, morfogénico y pro-antigénico. Estudios han demostrado altos niveles de GRP en pacientes con CaP, después de que son sometidos a tratamiento de depleción androgénica<sup>100-103</sup>. Sin embargo, aún no era claro cómo la secreción de GRP se incrementaba en CaP avanzado, ni cómo la señalización de GRP/GRPR contribuía a la progresión de CPRC.

Estudios han reportado la capacidad de GABA exógeno y endógeno de estimular la secreción de péptidos como; gastrina, somatostatina y GRP en células NE de estómago de rata<sup>86</sup>. Los resultados mostrados en este estudio, dieron lugar para

hipótesis que, la secreción de GABA y GRP podría estar regulada por la activación de GABBR1 en células NE-like de CaP. De hecho, antagonista del receptor GABA<sub>B</sub> inhibieron la secreción de GRP inducida por baclofen en las células NE-like. Indicando que la regulación era mediada por GABBR1, también se descubrió que baclofen incrementaba los niveles de expresión y proteína de GABBR1 de manera dosis dependiente en células NE-like. Interesantemente se encontró que las vesículas de GABA (endógeno) secretado por las células NE-like, eran capaces de estimular GRP. Por primera vez, se describía una regulación autócrina de las células NE-like en la secreción de GRP, provocado por GABA.

Los receptores GABA<sub>B</sub> son metabotrópicos acoplados a proteínas G, al activarse existe liberación de la subunidad Gβγ que inhibe los canales de Ca<sup>+2</sup> y activa los canales de K<sup>+</sup>. Así mismo, libera las subunidades Gα<sub>i</sub>/Gα<sub>o</sub> que tienen la capacidad de inhibir la enzima adenilciclase (AC), la cual a su vez reduce los niveles de adenosinmonofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>) y la actividad de proteína quinasa A (PKA)<sup>104</sup>. Por otra parte, se sabe que bombesina (péptido homólogo de GRP, son biológicamente y inmunológicamente equivalentes ) en células de estómago; se une a receptores acoplados a proteínas G que estimulan la enzima AC y aumentan los niveles de AMP<sub>c</sub> intracelular, lo que conduce a flujos de calcio, sodio y potasio, modulación de los receptores del factor de crecimiento y expresión de los protooncogenes c-fos y c- myc<sup>105</sup>. Cuando se une a las células G, la transducción de la señal de bombesina finalmente produce segundos mensajeros de fosfatidilinositol, mediando la fusión vesicular intracelular con la membrana plasmática y, por lo tanto, regulando la secreción de gastrina de las células G en el antro del estómago<sup>106</sup>. La bombesina activa la proteína quinasa C (PKC). En neuronas corticales e hipocámpales, se demostró que la proteínas de fusión sensible a NEM (NSF) interactúa con los dominios C-terminal de GABAB1 y GABAB2, lo cual permite el reclutamiento de PKC. Los datos indicaron que la asociación de receptores GABA<sub>B</sub> con NSF es un requisito previo para reclutar PKC al receptor tras la activación del agonista. Las funciones precisas de NSF y PKC en este complejo proceso aún no se han determinado del todos. Se cree que, NSF

podría ser necesario para desenmascarar los sitios de fosforilación del receptor o participar en la activación de PKC<sup>107</sup>.

Hasta la fecha no existe un mecanismo descrito por el cual, GABA<sub>B</sub> pudiera inducir la síntesis de GRP, sin embargo la activación PKC a través de NFS podría ser la clave. Actualmente nuestro laboratorio se encuentra trabajando para dilucidar tal mecanismo.

El neuropéptido GRP, se ha identificado como un potente factor de proliferación que actúa de manera autócrina y parácrina en CaP. Sin embargo, existen resultados contradictorios previamente publicados. Utilizando una concentración previamente publicada<sup>69,91,92,99</sup>, se demostró que GRP no altera la proliferación de PC3 en ninguno de los tiempos evaluados.

El grupo de Bologna en 1989, sometió a células PC3 a concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 5 nM de GRP por 24 horas y posteriormente realizaron un conteo celular mediante un hematocitómetro, con lo cual indicaron que GRP incrementa la proliferación celular de PC3 de manera dosis dependiente<sup>91</sup>. Larran y colaboradores (1996), estimularon a las células con concentraciones de 1, 5 y 10 nM de GRP, evaluaron la proliferación celular por 24, 48 y 72 horas mediante ensayos de MTT y observaron que GRP incrementaba la proliferación celular de manera dosis dependiente<sup>92</sup>.

Por otra parte, el grupo de Levine en el 2003 no encontró diferencia significativa en la proliferación celular de PC3 tratadas con 100 nM de GRP hasta por 120 horas, realizando conteo celular mediante hematocitómetro. Este tratamiento fue realizado a diferentes condiciones de medio de cultivo y concentración de SFB<sup>89</sup>.

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

debido a que para realizar un conteo acertado se requiere un número elevado de células, así como, que la solución a cuantificar esté correctamente homogénea, y que las células no formen agregados<sup>108</sup>.

Por otra parte, los ensayos colorimétricos de reducción de tetrazolio (MTT, MTS, XTT, etc), son menos sensibles a los fluorescentes y limitan la capacidad de detectar cambios sutiles en el número celular. Y aunque la sensibilidad de esta técnica puede mejorarse al optimizar la concentración de MTT y el tiempo de incubación de acuerdo al tipo celular, la posibilidad de manipular dicho tiempo de incubación es limitada debido a las características citotóxicas del reactivo. Además, existen agentes endógenos y exógenos que pueden interferir con la actividad enzimática o química de la reducción de MTT, lo que conduce a incremento de ruido o artefactos del ensayo. Algunos ejemplos de agentes que llevan a la no reducción enzimática de MTT a formazan son; ácido ascórbico, vitamina A y coenzima A. Además, aunque el ensayo de MTT resulta generalmente en una correlación del número de células viables, la tasa de reducción de tetrazolio refleja la actividad metabólica, y esta actividad puede cambiar con las condiciones de cultivo (pH, contenido de glucosa en el medio, etc.) y el estado fisiológico de las células<sup>108</sup>.

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

Por otra parte, GRP se ha visto implicado en migración e invasión celular activando la expresión de proteasas en CaP<sup>109</sup>. En este estudio, se observó invasividad mediada por *GRPR*. Efecto inducido por GRP, obtenido de los medios condicionados de las células NE-like. Los resultados obtenidos coinciden con los publicados por el grupo de Nagakawa en 1998 y 2001, donde reportaron que GRP incrementa la capacidad invasiva de PC3 de manera dosis dependiente<sup>90,110</sup>. En

conjunto, los resultados obtenidos de los experimentos de migración e invasión indican que PC3 es más sensible a la acción de GRP en comparación con LNCaP, y que este neuropéptido actúa principalmente a nivel de invasión celular probablemente mediante mecanismos de activación proteolítica de la matriz extracelular<sup>71</sup>.

Específicamente, se ha visto que GRP *in vivo* induce la activación de MMP-9 (Gelatinasa B) y TIMP-1. TIMP-1 es un inhibidor de las metaloproteinasas que también está relacionado con la proliferación celular, con un pronóstico pobre en diversos modelos *in vivo* de tumor<sup>99</sup>. Este inhibidor tiene un papel regulador al limitar y localizar más eficientemente la proteólisis de algunos sitios específicos, tales como sitios de contacto focal o áreas de contacto célula-célula o célula-membrana basal. El conjunto de la actividad de MMP-9 y TIMP-1 puede modular la proteólisis pericelular al regular la distribución y activación proteolítica<sup>111</sup>. Ischia y colaboradores (2014) reportaron que GRP induce la fosforilación de tirosinas cinasas no específicas como Src, FAK y Etk, moléculas conocidas por tener un papel importante en la motilidad en cáncer de próstata<sup>103</sup>.

Estos hallazgos apoyan fuertemente, una correlación entre la NED y el incremento del potencial metastásico en los tipos de cáncer de próstata insensibles a andrógenos. Teniendo presente que, la invasión es un paso crítico que conduce a tumores más letales, asociados con tipos de cáncer con metástasis.

Otro descubrimiento fundamental en este estudio, fue la fuerte correlación que se encontró por primera vez entre GABA y GRP en sueros de pacientes con CaP, particularmente en aquellos que expresaban marcadores NE. Cuatro de diez pacientes, grupo que se denominó CaP-NE, mostraron bajos niveles de expresión AR y altos niveles de ENO2, comparados con los grupos de pacientes con CaP y HPB, consistente con los pacientes con NEPC en previos estudios<sup>61,112</sup>. Además, esos cuatro pacientes presentaron incremento en los niveles de expresión de GABBR1.

Los genes AR, ENO2 y GABBR1, fueron cuantificados en la orina de pacientes,

método que fue estandarizada previamente en el laboratorio<sup>87</sup>. Como control, se utilizó la expresión del gen *PAC3*, el cual ha tenido un papel significativo como marcador de diagnóstico no invasivo en orina. El gen *PCA3* es un ARNm específico de próstata no codificante, cuya expresión se encuentra anormalmente elevada en neoplasias prostáticas, en comparación con tejidos adyacentes no neoplásicos<sup>45</sup>.

Los cuatro pacientes a los cuales se les denominó CaP-NE, exhibieron una escala alta de Gleason en comparación con lo que no tenían características NE. Azuma y colaboradores (2003), observaron un incremento en niveles de GABA en aquellos pacientes que presentaban metástasis y tumores con escalas >7 Gleason, comparado con pacientes con CaP sin metástasis y pacientes con HPB<sup>84</sup>.

Yashi y colaboradores (2002), detectaron en sueros de pacientes que mostraban resistencia al bloqueo androgénico, niveles elevados de ProGRP<sup>113</sup>. También hallaron aumento en los niveles ProGRP, en aquellos pacientes con CaP que se volvían andrógeno independiente, en contraste con los pacientes con CaP que mantenían dependencia androgénica<sup>113</sup>. Sería sumamente interesante hacer un seguimiento de los pacientes CaP-NE, que mostraron incremento en la expresión de *GABBR1* y *ENO2* para evaluar su progresión. Este estudio, es el primero en encontrar una correlación directa entre los niveles de GABA y GRP, particularmente en un grupo con características NE. Sin embargo, es necesario un mayor número de muestras para proporcionar un análisis estadístico más robusto.

Otro punto importante que se debe remarcar en este estudio, es la asociación negativa que se encontró entre *GABBR1* y la expresión de *AR* en CaP. Funcionalmente se mostró que, *AR* se encontraba sub-expresado, en cambio *GABBR1* estaba sobre-expresado en pacientes que mostraban marcadores NE. Consistente con los resultados *in vitro* que se presentan, donde al silenciar *AR* en células de CaP mostraban un aumento de *GABBR1* a nivel ARNm y proteína.

Además, *in silico* se confirmó la correlación negativa de ambos genes (*AR* y *GABBR1*), en un gran número de datos de tumores primarios de CaP. Como se menciona arriba, la presencia de NED implica reducción de la activa y/o expresión de AR. Una gran cantidad de estudios han sugerido que los genes implicados en la progresión a NEPC, se encuentran relacionados o están controlados por la pérdida de la expresión y/o actividad de AR<sup>114</sup>.

Consistente con el hallazgo de la correlación negativa, se observó una correlación fuertemente positiva entre la expresión de *GABBR1* y *ENO2* en muestras de NEPC. Las muestras de CPRC y NEPC mostraron expresión de *GABBR1*, aunque la tendencia en la expresión fue mayor en muestras con NEPC. Este resultado podría ser interpretados, por el hecho de que entre las muestras incluidas en el grupo NEPC, algunos tumores contaban con baja señalización de AR y baja escala de Gleason, pero dado a la complejidad de recolección de este tipo de muestras, se mantuvieron dentro del estudio<sup>61</sup>.

Finalmente, este trabajo demostró una correlación negativa entre la expresión de *GABBR1* y AR (expresión y proteína). Se sabe que, una vez que CPRC progresa a NEPC, las células CaP pierden la expresión y/o actividad de AR, lo que las hace resistente a cualquier fármaco que se pueda dirigir al receptor de andrógenos<sup>71</sup>. *GABBR1* puede representar una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de tumores resistentes a la castración en etapa tardía, aquellos que han perdido la expresión y/o actividad de AR y han adquirido un fenotipo NE. De acuerdo con los resultados obtenidos, se propone que *GABBR1* se expresa cuando las células tienen un fenotipo NE bien definido, lo que incluye la presencia de marcadores NE y la pérdida de expresión y/o actividad de AR.

## CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que GABA a través de la activación de GABBR1 en células NE-like, estimula la secreción de GRP, la cual a su vez incrementa la invasión de células andrógeno independiente, contribuyendo a la progresión del cáncer de próstata.

El mecanismo molecular exacto, por el cual está actuando el eje GABA/GABBR1 para llevar a cabo la secreción de GRP, sigue siendo un campo de estudio importante que requiere una mayor investigación.

En cierto sentido, CaP representa una situación única en la que, el sistema NE es imitado progresivamente por las células cancerígenas y eventualmente corrompido para adaptarse y progresar a través de los tratamientos. Si bien las estrategias terapéuticas se han centrado en bloquear el eje andrógeno/AR, actualmente se pretende tener como blanco los componentes que están implicado en la NED para proporcionar nuevas soluciones terapéuticas en el tratamiento de pacientes con CaP, con estadio más letal y doloroso. Por eso la necesidad de investigaciones y estudios clínicos para mejorar las modalidades de tratamiento, al probar nuevos agentes prometedores en el tratamiento de pacientes con esta condición. Por lo tanto, los resultados de este estudio contribuyen a un mejor entendimiento de los tumores NEPC. Así mismo, se propone a GABBR1 como un posible blanco terapéutico en los tumores NEPC.

## PERSPECTIVAS

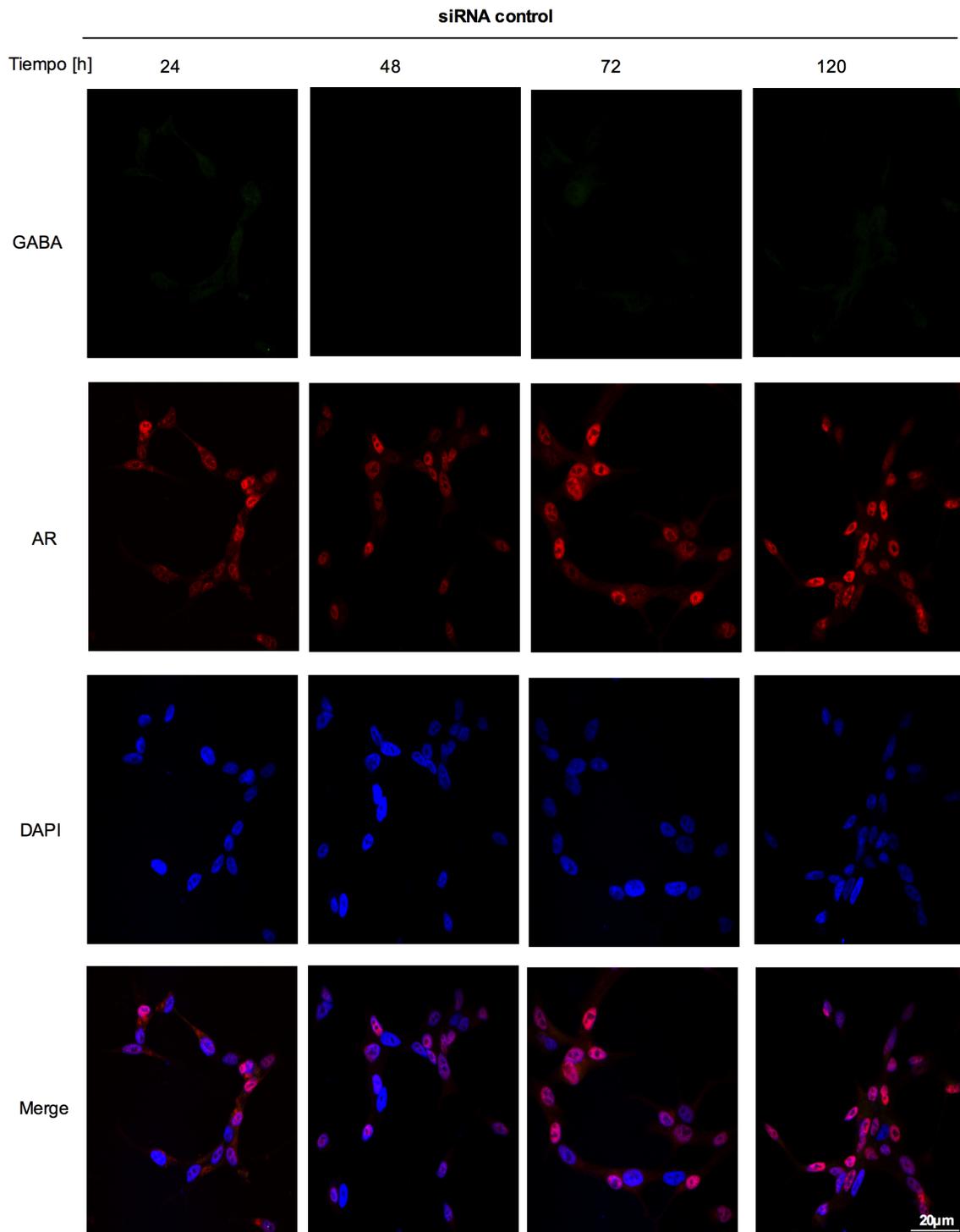
Entre las perspectivas a futuro de este proyecto se contempla utilizar el modelo *in vivo* llamado CR2-TAg mencionado anteriormente, con el fin de replicar los resultados obtenidos como; la medición de GRP en la sangre y en la próstata de dichos ratones. Además, de probar el antagonista de GABBR1; baclofen para reducir los niveles de GRP, medir los niveles a nivel génico y proteico de GABBR1 antes y después de suministrar el fármaco.

Identifica los tipos de MMP's que alteran su expresión, presencia o actividad en el modelo *in vivo* después del tratamiento con baclofen.

Estudiar el papel funcional de GABBR1 en el modelo *in vivo*, así como en una corte más grande de tumores con marcadores y sin marcadores neuroendocrinos.

Establecer una correlación entre pacientes, que durante un prolongado tiempo hayan sido tratados con agonistas de GABA<sub>B</sub> y padezcan cáncer de próstata. Estudiando el tiempo de exposición y el tipo de cáncer de próstata que padecen, ya sea metastásico o no metastásico. Lo anterior, a través de un estudio prospectivo, con la información en repositorios de casos clínicos de un hospital.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



**Figura Suplementaria 1. siARN Control.** Los niveles de GABA son indetectables y los niveles de AR se mantienen constantes a través de los tiempos después de la transfección con el siARN control, sin cambios morfológicos.

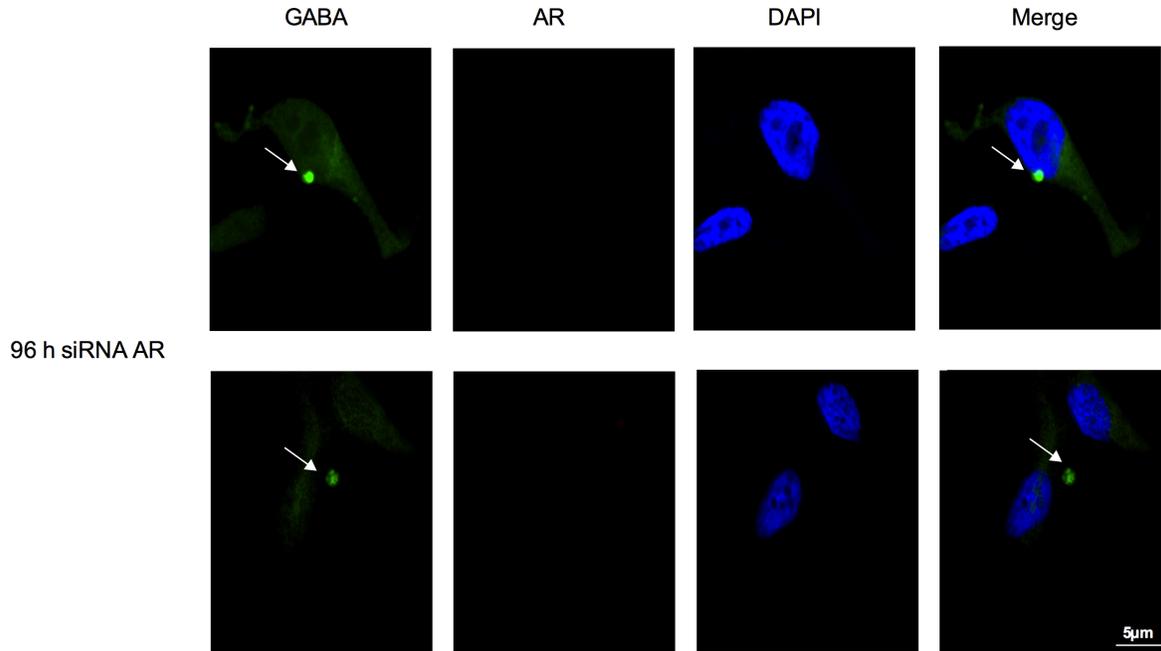


Figura Suplementaria 2. Aumento de la Figura 12a (escala\_ 5  $\mu$ m).

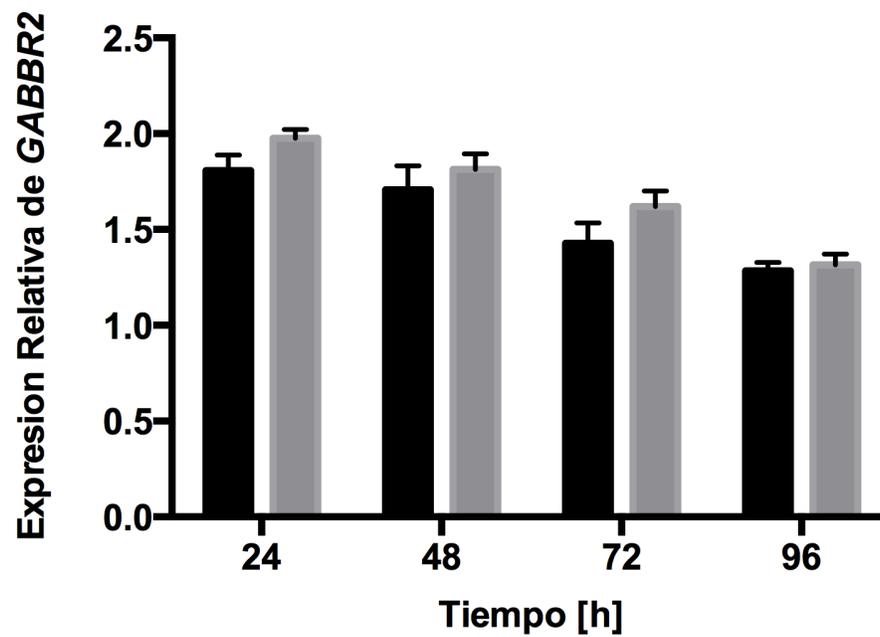
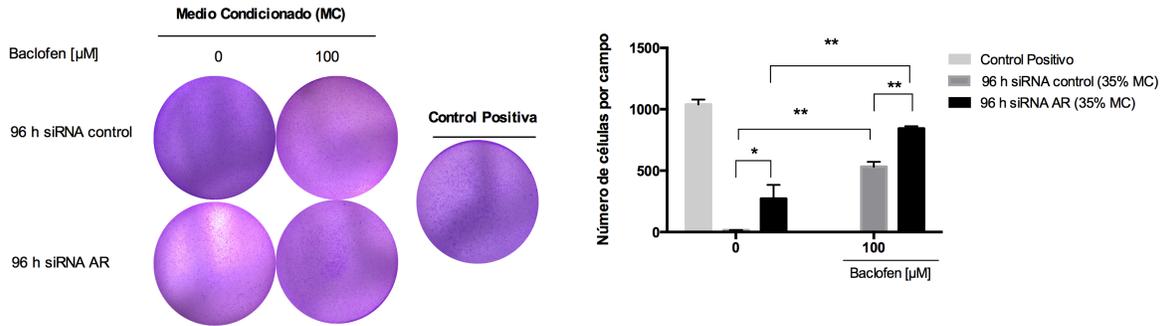
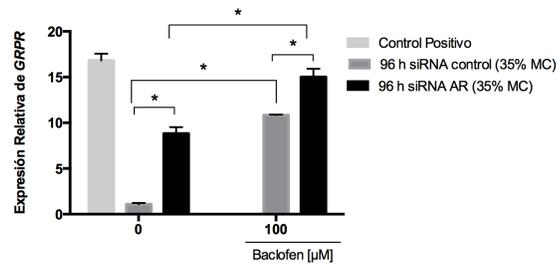


Figura Suplementaria 3. Niveles de expresión de *GABBR2*. Los niveles de expresión de *GABBR2* fueron cuantificados por RT-qPCR en células LNCaP transfectadas por siARN-AR y siARN control, desde 24 horas hasta 96 horas, en medio RPMI suplementado con 10% de SFB. Los experimentos se repitieron por triplicado. Las diferencias entre los grupos se compararon mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). No se observaron cambios significativos.

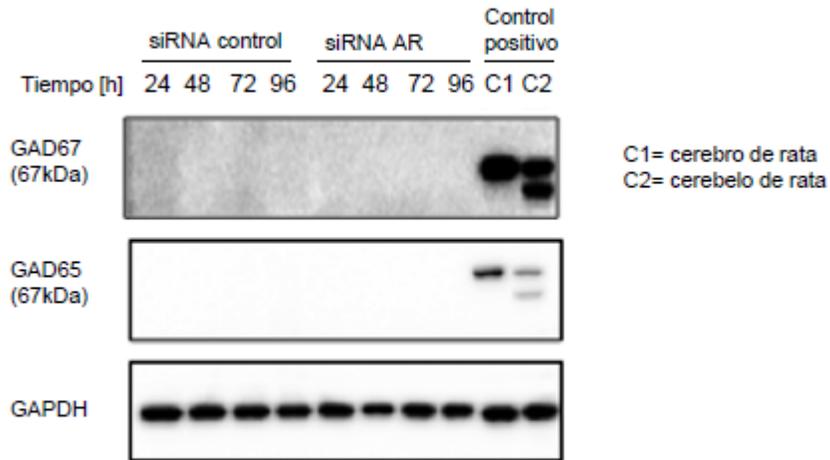
(a)



(b)



**Figura Suplementaria 4. El medio condicionado afecta la capacidad invasiva de las células NE-like a través de GRPR.** a) El ensayo de invasión se realizó con cámaras Transwell.  $6 \times 10^4$  células transfectadas con siARN-AR durante 96 horas, suspendida en 200µl de medio de cultivo sin SFB, se colocaron en la cámara superior. En la parte inferior de la cámara se agregó 700µl del medio condicionado provenientes de las células transfectadas después de 96 horas con siARN-AR y siAR control y tratadas con baclofen (100 µM), el tiempo de incubación fue de 24 horas. Los resultados se representan como media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes en pozos por triplicado, \* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.0001$ . b) La expresión de GRPR se analizó por RT-qPCR. Los resultados se representan como media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, \* $p < 0.0001$ . GRP sintetizado se utilizó como control positivo; la concentración que se utilizó para realizar los experimento, representa el 35% del medio condicionado proveniente de las células transfectadas después de 96 horas con el siARN-AR y posteriormente tratadas con baclofen (100 µM).



**Figura Suplementaria 4. GABA se sintetiza GAD-independiente.** Se realizó un análisis Western blot para detectar los niveles de GAD<sub>67</sub> y GAD<sub>65</sub> en las células LNCaP transfectadas con un siARN específico para AR y un siARN control desde 24 horas hasta 96 horas. GAPDH se utilizó como control de carga. Como controles positivos específicos de los anticuerpos se utilizaron lisado de cerebro y cerebelo de rata. No hubo detección de ninguna de las dos proteínas en las muestras.

## **ABREVIATURAS**

### ABREVIATURAS

- AC (Adenilciclase)
- ADN (Ácido Desoxirribonucleico)
- ADNc (ADN complementario)
- AMP<sub>c</sub> (adenosinmonofosfato cíclico)
- APE (Antígeno Prostático Específico)
- AR (Receptor de Andrógeno, por sus siglas en inglés)
- AREs (Elementos de Respuesta a Andrógenos, pos siglas en inglés)
- ARN (Ácido Ribonucleico)
- ARNm (ARN mensajero)
- CaP (Cáncer de Próstata)
- CHGA (Cromogranina A)
- CPRC (Cáncer de Próstata Resistente a Castración)
- DAG (Diacilglicerol)
- DBD (Dominio de Unión a ADN, pos siglas en inglés)
- DHT (Dehidrotestosterona)
- ENO2 (Enolasa Neuronal Especifica)
- ERD (Examen Rectal Digital)
- FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, por sus siglas en inglés)
- GABA (Ácido Gamma-Aminobutírico)
- GABA<sub>A</sub> (Receptor de GABA tipo A)
- GABA<sub>B</sub> (Receptor de GABA tipo B)
- GABBR1 (Receptor de GABA tipo B subunidad 1)
- GABBR2 (Receptor de GABA tipo B subunidad 2)
- GAD1 (Glutamato Descarboxilasa tipo1)
- GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropina, por sus siglas en inglés)
- GRP (Péptido Liberador de Gastrina, por sus siglas en inglés)
- GRPR (Receptor de GRP)
- GMP<sub>c</sub> (guanosín monofosfato cíclico)

GWAS (Estudio de Asociación del Genoma Completo, por siglas en inglés)  
HPB (Hiperplasia Prostática Benigna)  
HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, por siglas en inglés)  
HSP (Proteínas de Choque Térmico, por sus siglas en inglés)  
IMC (Índice de Masa Corporal)  
IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social)  
INCAN (Instituto Nacional de Cancerología)  
LBD (Dominio de Unión al Ligando, por siglas en inglés)  
LH (Hormona Luteinizante)  
LHRH (Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante, por sus siglas en inglés)  
NE (Neuroendocrina)  
NED (Diferenciación Neuroendocrina, por sus siglas en inglés)  
NE-like (Células parecidas a las Neuroendocrinas)  
NEPC (Cáncer de Próstata con Diferenciación Neuroendocrina)  
NTD (Dominio NH<sub>2</sub>-terminal, por siglas en inglés)  
PCA3 (Gen Antígeno 3 de Cáncer de Próstata)  
PKA (Proteína quinasa A)  
SCN (Sistema Nervioso Central)  
SCP<sub>2</sub> (Proteína Transportadora de Esteroles)  
SFB (Suero Fetal Bovino)  
SHBG (Globulina Transportadora de Hormonas Sexuales, por siglas en inglés)  
siARN (ARN pequeño de interferencia, por siglas en inglés)  
SSBG (Albúmina Sérica Humana, por sus siglas en inglés)  
TRUS (Biopsia Prostática Guiada por Ultrasonido, por sus siglas en inglés)  
TURP (Resección transuretral por sus siglas en inglés)

## REFERENCIAS

- 1 Cáncer, I. N. d. <<https://http://www.cancer.gov/espanol>> (
- 2 Tortora, G. a. D., B. *Principios de Anatomía y Fisiología* 13a edn, (2013).
- 3 McNeal, J. E. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate* **2**, 35-49 (1981).
- 4 Timms, B. G. Prostate development: a historical perspective. *Differentiation; research in biological diversity* **76**, 565-577, doi:10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x (2008).
- 5 De Marzo, A. M. *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer* **7**, 256-269, doi:10.1038/nrc2090 (2007).
- 6 Walker, J. W. The Surgical Anatomy of the Normal and Enlarged Prostate, and the Operation of Suprapubic Prostatectomy. *British medical journal* **2**, 62-66 (1904).
- 7 Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development* **24**, 1967-2000, doi:10.1101/gad.1965810 (2010).
- 8 Aaron, L., Franco, O. E. & Hayward, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *The Urologic clinics of North America* **43**, 279-288, doi:10.1016/j.ucl.2016.04.012 (2016).
- 9 De Marzo, A. M., Nakai, Y. & Nelson, W. G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urologic oncology* **25**, 398-400, doi:10.1016/j.urolonc.2007.05.007 (2007).
- 10 Peehl, D. M. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocrine-related cancer* **12**, 19-47, doi:10.1677/erc.1.00795 (2005).
- 11 Czyz, J., Szpak, K. & Madeja, Z. The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nature reviews. Urology* **9**, 274-282, doi:10.1038/nrurol.2012.14 (2012).
- 12 De Marzo, A. M., Coffey, D. S. & Nelson, W. G. New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urology* **53**, 29-39; discussion 39-42 (1999).
- 13 Shappell, S. B., Boeglin, W. E., Olson, S. J., Kasper, S. & Brash, A. R. 15-lipoxygenase-2 (15-LOX-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma. *The American journal of pathology* **155**, 235-245, doi:10.1016/S0002-9440(10)65117-6 (1999).
- 14 van Leenders, G. J. *et al.* Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *The American journal of pathology* **162**, 1529-1537, doi:10.1016/S0002-9440(10)64286-1 (2003).
- 15 Huss, W. J., Gregory, C. W. & Smith, G. J. Neuroendocrine cell differentiation in the CWR22 human prostate cancer xenograft: association with tumor cell proliferation prior to recurrence. *The Prostate* **60**, 91-97, doi:10.1002/pros.20032 (2004).

- 16 De Marzo, A. M., Knudsen, B., Chan-Tack, K. & Epstein, J. I. E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. *Urology* **53**, 707-713 (1999).
- 17 Szczyrba, J. *et al.* Neuroendocrine Cells of the Prostate Derive from the Neural Crest. *The Journal of biological chemistry* **292**, 2021-2031, doi:10.1074/jbc.M116.755082 (2017).
- 18 di Sant'Agnes, P. A. Calcitoninlike immunoreactive and bombesinlike immunoreactive endocrine-paracrine cells of the human prostate. *Archives of pathology & laboratory medicine* **110**, 412-415 (1986).
- 19 Abrahamsson, P. A. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocrine-related cancer* **6**, 503-519 (1999).
- 20 Vashchenko, N. & Abrahamsson, P. A. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *European urology* **47**, 147-155, doi:10.1016/j.eururo.2004.09.007 (2005).
- 21 Bishop, J. L., Davies, A., Ketola, K. & Zoubeidi, A. Regulation of tumor cell plasticity by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* **22**, R165-182, doi:10.1530/ERC-15-0137 (2015).
- 22 Wein, A. K., Louis. Partin, Alan. Peters, Craig. *CAMPBELL-WALSH UROLOGY* 11 edn, (2016).
- 23 Rojas-Durán, F. M.-D., Jorge. Soto-Cid, Abraham. Aranda-Abreu, Gonzalo. Juárez-Aguilar, Enrique. Coria-Avila, Genaro Alfonso. Todelo-Cárdenas, Rebeca. Locia-Espinoza, José. Hernández, Maria Elena. . El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. *eNeurobiología* **2**, 15 (2011).
- 24 Bellido, M. *Reproducción en el varón*. 1033-1047 (1999).
- 25 Luu-The, V. & Labrie, F. The intracrine sex steroid biosynthesis pathways. *Progress in brain research* **181**, 177-192, doi:10.1016/S0079-6123(08)81010-2 (2010).
- 26 Heinlein, C. A. & Chang, C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews* **25**, 276-308, doi:10.1210/er.2002-0032 (2004).
- 27 Feldman, B. J. & Feldman, D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature reviews. Cancer* **1**, 34-45, doi:10.1038/35094009 (2001).
- 28 Levalle, O. *et al.* Recombinant human follicle-stimulating hormone administration increases testosterone production in men, possibly by a Sertoli cell-secreted nonsteroid factor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **83**, 3973-3976, doi:10.1210/jcem.83.11.5177 (1998).
- 29 Galani, A., Kitsiou-Tzeli, S., Sofokleous, C., Kanavakis, E. & Kalpini-Mavrou, A. Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *Hormones* **7**, 217-229 (2008).
- 30 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **68**, 394-424, doi:10.3322/caac.21492 (2018).
- 31 Social, I. M. d. S. Cáncer de próstata. (2015).
- 32 Society, A. C. *Cancer* <<https://http://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2015.html>> (2015).

- 33 Lichtenstein, P. *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine* **343**, 78-85, doi:10.1056/NEJM200007133430201 (2000).
- 34 Carter, P. *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 4285-4289 (1992).
- 35 Witte, J. S. *et al.* HOXB13 mutation and prostate cancer: studies of siblings and aggressive disease. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **22**, 675-680, doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-1154 (2013).
- 36 Castro, E. & Eeles, R. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian journal of andrology* **14**, 409-414, doi:10.1038/aja.2011.150 (2012).
- 37 Castro, E. *et al.* Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 1748-1757, doi:10.1200/JCO.2012.43.1882 (2013).
- 38 Park, S. Y. *et al.* Circulating fatty acids and prostate cancer risk in a nested case-control study: the Multiethnic Cohort. *Cancer causes & control : CCC* **20**, 211-223, doi:10.1007/s10552-008-9236-4 (2009).
- 39 Giovannucci, E. *et al.* Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Annals of internal medicine* **122**, 327-334 (1995).
- 40 Huncharek, M., Haddock, K. S., Reid, R. & Kupelnick, B. Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *American journal of public health* **100**, 693-701, doi:10.2105/AJPH.2008.150508 (2010).
- 41 Morgan, T. O. *et al.* Age-specific reference ranges for serum prostate-specific antigen in black men. *The New England journal of medicine* **335**, 304-310, doi:10.1056/NEJM199608013350502 (1996).
- 42 Makarov, D. V. & Partin, A. W. Prostate-Cancer Risk Stratification via Early PSA Testing. *Reviews in urology* **9**, 91-92 (2007).
- 43 Okotie, O. T. *et al.* Characteristics of prostate cancer detected by digital rectal examination only. *Urology* **70**, 1117-1120, doi:10.1016/j.urology.2007.07.019 (2007).
- 44 Thompson, I. M. *et al.* Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Journal of the National Cancer Institute* **98**, 529-534, doi:10.1093/jnci/djj131 (2006).
- 45 Nakanishi, H. *et al.* PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *The Journal of urology* **179**, 1804-1809; discussion 1809-1810, doi:10.1016/j.juro.2008.01.013 (2008).
- 46 Sokoll, L. J. *et al.* A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine test: pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **389**, 1-6, doi:10.1016/j.cca.2007.11.003 (2008).

- 47 Whitman, E. J. *et al.* PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *The Journal of urology* **180**, 1975-1978; discussion 1978-1979, doi:10.1016/j.juro.2008.07.060 (2008).
- 48 Harvey, C. J., Pilcher, J., Richenberg, J., Patel, U. & Frauscher, F. Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *The British journal of radiology* **85 Spec No 1**, S3-17, doi:10.1259/bjr/56357549 (2012).
- 49 Bill-Axelsson, A. *et al.* Radical prostatectomy versus watchful waiting in localized prostate cancer: the Scandinavian prostate cancer group-4 randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute* **100**, 1144-1154, doi:10.1093/jnci/djn255 (2008).
- 50 Ballo, M. T., Zagars, G. K., Pollack, A., Pisters, P. W. & Pollack, R. A. Desmoid tumor: prognostic factors and outcome after surgery, radiation therapy, or combined surgery and radiation therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **17**, 158-167, doi:10.1200/JCO.1999.17.1.158 (1999).
- 51 Zhu, J., Wang, Y., Xu, S. & Sun, Z. Intermittent androgen blockade or continuous androgen blockade in advanced prostate cancer: a meta-analysis of efficacy, quality of life and side effects. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* **17**, 350-356 (2012).
- 52 Weckermann, D. & Harzmann, R. Hormone therapy in prostate cancer: LHRH antagonists versus LHRH analogues. *European urology* **46**, 279-283; discussion 283-274, doi:10.1016/j.eururo.2004.05.006 (2004).
- 53 Bohl, C. E., Gao, W., Miller, D. D., Bell, C. E. & Dalton, J. T. Structural basis for antagonism and resistance of bicalutamide in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6201-6206, doi:10.1073/pnas.0500381102 (2005).
- 54 Kruit, W. H., Stoter, G. & Klijn, J. G. Effect of combination therapy with aminoglutethimide and hydrocortisone on prostate-specific antigen response in metastatic prostate cancer refractory to standard endocrine therapy. *Anti-cancer drugs* **15**, 843-847 (2004).
- 55 Wang, Q. *et al.* Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell* **138**, 245-256, doi:10.1016/j.cell.2009.04.056 (2009).
- 56 Kirby, M., Hirst, C. & Crawford, E. D. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *International journal of clinical practice* **65**, 1180-1192, doi:10.1111/j.1742-1241.2011.02799.x (2011).
- 57 Tucci, M., Scagliotti, G. V. & Vignani, F. Metastatic castration-resistant prostate cancer: time for innovation. *Future oncology* **11**, 91-106, doi:10.2217/fon.14.145 (2015).
- 58 Devlin, H. L. & Mudryj, M. Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence. *Cancer letters* **274**, 177-186, doi:10.1016/j.canlet.2008.06.007 (2009).
- 59 Matei, D. V. *et al.* Neuroendocrine differentiation in castration-resistant prostate cancer: a systematic diagnostic attempt. *Clinical genitourinary cancer* **10**, 164-173, doi:10.1016/j.clgc.2011.12.004 (2012).

- 60 Beltran, H. *et al.* Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer discovery* **1**, 487-495, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0130 (2011).
- 61 Beltran, H. *et al.* Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med* **22**, 298-305, doi:10.1038/nm.4045 (2016).
- 62 Terry, S. & Beltran, H. The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Frontiers in oncology* **4**, 60, doi:10.3389/fonc.2014.00060 (2014).
- 63 Horoszewicz, J. S. *et al.* LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research* **43**, 1809-1818 (1983).
- 64 Shen, R. *et al.* Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. *Urologic oncology* **3**, 67-75 (1997).
- 65 Wright, M. E., Tsai, M. J. & Aebbersold, R. Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Molecular endocrinology* **17**, 1726-1737, doi:10.1210/me.2003-0031 (2003).
- 66 Cussenot, O. *et al.* Plasma neuroendocrine markers in patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *The Journal of urology* **155**, 1340-1343 (1996).
- 67 Hirano, D., Okada, Y., Minei, S., Takimoto, Y. & Nemoto, N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *European urology* **45**, 586-592; discussion 592, doi:10.1016/j.eururo.2003.11.032 (2004).
- 68 Sasaki, T. *et al.* Changes in chromogranin a serum levels during endocrine therapy in metastatic prostate cancer patients. *European urology* **48**, 224-229; discussion 229-230, doi:10.1016/j.eururo.2005.03.017 (2005).
- 69 Yuan, T. C., Veeramani, S. & Lin, M. F. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocrine-related cancer* **14**, 531-547, doi:10.1677/ERC-07-0061 (2007).
- 70 Roudier, M. P. *et al.* Phenotypic heterogeneity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone. *Human pathology* **34**, 646-653 (2003).
- 71 Qiao, J. *et al.* Activation of GRP/GRP-R signaling contributes to castration-resistant prostate cancer progression. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.11326 (2016).
- 72 Guo, Y. S. & Townsend, C. M., Jr. Roles of gastrointestinal hormones in pancreatic cancer. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery* **7**, 276-285, doi:10.1007/s005340000070276.534 (2000).
- 73 Wen, X., Chao, C., Ives, K. & Hellmich, M. R. Regulation of bombesin-stimulated cyclooxygenase-2 expression in prostate cancer cells. *BMC molecular biology* **12**, 29, doi:10.1186/1471-2199-12-29 (2011).
- 74 Logothetis, C. & Hoosein, N. The inhibition of the paracrine progression of prostate cancer as an approach to early therapy of prostatic carcinoma. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* **16H**, 128-134 (1992).
- 75 Pinski, J., Halmos, G. & Schally, A. V. Somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 inhibit the growth of

- androgen-independent DU-145 human prostate cancer line in nude mice. *Cancer letters* **71**, 189-196 (1993).
- 76 Sehgal, I. & Thompson, T. C. Neuropeptides induce Mr 92,000 type IV collagenase (matrix metalloprotease-9) activity in human prostate cancer cell lines. *Cancer research* **58**, 4288-4291 (1998).
- 77 Hoosein, N. M., Logothetis, C. J. & Chung, L. W. Differential effects of peptide hormones bombesin, vasoactive intestinal polypeptide and somatostatin analog RC-160 on the invasive capacity of human prostatic carcinoma cells. *The Journal of urology* **149**, 1209-1213 (1993).
- 78 Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G. & Soares, J. C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* **8**, 721-737, 715, doi:10.1038/sj.mp.4001362 (2003).
- 79 Young, S. Z. & Bordey, A. GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiology* **24**, 171-185, doi:10.1152/physiol.00002.2009 (2009).
- 80 Erdo, S. L., Nemet, L. & Szporny, L. The occurrence of GABA in vas deferens, prostate, epididymis, seminal vesicle and testicle of the rat. *Acta biologica Hungarica* **34**, 435-437 (1983).
- 81 Napoleone, P., Bronzetti, E., Cavallotti, C. & Amenta, F. Predominant epithelial localization of type A gamma-aminobutyric acid receptor sites within rat seminal vesicles and prostate glands. *Pharmacology* **41**, 49-56, doi:10.1159/000138698 (1990).
- 82 Hu, Y., Ippolito, J. E., Garabedian, E. M., Humphrey, P. A. & Gordon, J. I. Molecular characterization of a metastatic neuroendocrine cell cancer arising in the prostates of transgenic mice. *The Journal of biological chemistry* **277**, 44462-44474, doi:10.1074/jbc.M205784200 (2002).
- 83 Ippolito, J. E. *et al.* An integrated functional genomics and metabolomics approach for defining poor prognosis in human neuroendocrine cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9901-9906, doi:10.1073/pnas.0500756102 (2005).
- 84 Azuma, H. *et al.* Gamma-aminobutyric acid as a promoting factor of cancer metastasis; induction of matrix metalloproteinase production is potentially its underlying mechanism. *Cancer research* **63**, 8090-8096 (2003).
- 85 Abdul, M., McCray, S. D. & Hoosein, N. M. Expression of gamma-aminobutyric acid receptor (subtype A) in prostate cancer. *Acta Oncol* **47**, 1546-1550, doi:10.1080/02841860801961265 (2008).
- 86 Weigert, N., Schepp, W., Haller, A. & Schusdziarra, V. Regulation of gastrin, somatostatin and bombesin release from the isolated rat stomach by exogenous and endogenous gamma-aminobutyric acid. *Digestion* **59**, 16-25 (1998).
- 87 Salido-Guadarrama, A. I. *et al.* Urinary microRNA-based signature improves accuracy of detection of clinically relevant prostate cancer within the prostate-specific antigen grey zone. *Molecular medicine reports* **13**, 4549-4560, doi:10.3892/mmr.2016.5095 (2016).
- 88 Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S. & Tapia, R. Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of gamma-aminobutyric acid. *Neurochemistry international* **24**, 363-368 (1994).

- 89 Levine, L. *et al.* Bombesin stimulates nuclear factor kappa B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer research* **63**, 3495-3502 (2003).
- 90 Nagakawa, O. *et al.* Effect of prostatic neuropeptides on invasion and migration of PC-3 prostate cancer cells. *Cancer letters* **133**, 27-33 (1998).
- 91 Bologna, M., Festuccia, C., Muzi, P., Biordi, L. & Ciomei, M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* **63**, 1714-1720 (1989).
- 92 Larran, J. *et al.* In vitro characterization of bombesin and calcitonin on the proliferation of PC3, DU 145 and LNCaP cancer prostatic cell lines. *The International journal of developmental biology* **Suppl 1**, 275S-276S (1996).
- 93 Cancer Genome Atlas Research, N. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* **163**, 1011-1025, doi:10.1016/j.cell.2015.10.025 (2015).
- 94 Gao, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling* **6**, pl1, doi:10.1126/scisignal.2004088 (2013).
- 95 Cerami, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery* **2**, 401-404, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095 (2012).
- 96 Wafa, L. A. *et al.* Comprehensive expression analysis of L-dopa decarboxylase and established neuroendocrine markers in neoadjuvant hormone-treated versus varying Gleason grade prostate tumors. *Human pathology* **38**, 161-170, doi:10.1016/j.humpath.2006.07.003 (2007).
- 97 Jin, R. J. *et al.* NE-10 neuroendocrine cancer promotes the LNCaP xenograft growth in castrated mice. *Cancer research* **64**, 5489-5495, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3117 (2004).
- 98 Ippolito, J. E. *et al.* Linkage between cellular communications, energy utilization, and proliferation in metastatic neuroendocrine cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 12505-12510, doi:10.1073/pnas.0605207103 (2006).
- 99 Festuccia, C. *et al.* In vitro regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *International journal of cancer* **75**, 418-431 (1998).
- 100 Gonzalez, N., Moody, T. W., Igarashi, H., Ito, T. & Jensen, R. T. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* **15**, 58-64, doi:10.1097/MED.0b013e3282f3709b (2008).
- 101 Ohki-Hamazaki, H., Iwabuchi, M. & Maekawa, F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *The International journal of developmental biology* **49**, 293-300, doi:10.1387/ijdb.041954ho (2005).
- 102 Patel, O., Shulkes, A. & Baldwin, G. S. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1766**, 23-41, doi:10.1016/j.bbcan.2006.01.003 (2006).
- 103 Ischia, J., Patel, O., Bolton, D., Shulkes, A. & Baldwin, G. S. Expression and function of gastrin-releasing peptide (GRP) in normal and cancerous

- urological tissues. *BJU international* **113 Suppl 2**, 40-47, doi:10.1111/bju.12594 (2014).
- 104 Chalifoux, J. R. & Carter, A. G. GABAB receptor modulation of synaptic function. *Current opinion in neurobiology* **21**, 339-344, doi:10.1016/j.conb.2011.02.004 (2011).
- 105 Moreno, P. *et al.* A possible new target in lung-cancer cells: The orphan receptor, bombesin receptor subtype-3. *Peptides* **101**, 213-226, doi:10.1016/j.peptides.2018.01.016 (2018).
- 106 LaPelusa, A. & Jan, A. in *StatPearls* (2019).
- 107 Nishimune, A. *et al.* NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* **21**, 87-97, doi:10.1016/s0896-6273(00)80517-6 (1998).
- 108 van Tonder, A., Joubert, A. M. & Cromarty, A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes* **8**, 47, doi:10.1186/s13104-015-1000-8 (2015).
- 109 Markwalder, R. & Reubi, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer research* **59**, 1152-1159 (1999).
- 110 Nagakawa, O., Ogasawara, M., Murata, J., Fuse, H. & Saiki, I. Effect of prostatic neuropeptides on migration of prostate cancer cell lines. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* **8**, 65-70 (2001).
- 111 Yang, J. C. *et al.* Aberrant activation of androgen receptor in a new neuropeptide-autocrine model of androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer research* **69**, 151-160, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0442 (2009).
- 112 Kim, J. *et al.* FOXA1 inhibits prostate cancer neuroendocrine differentiation. *Oncogene* **36**, 4072-4080, doi:10.1038/onc.2017.50 (2017).
- 113 Yashi, M., Muraishi, O., Kobayashi, Y., Tokue, A. & Nanjo, H. Elevated serum progastrin-releasing peptide (31-98) in metastatic and androgen-independent prostate cancer patients. *The Prostate* **51**, 84-97, doi:10.1002/pros.10063 (2002).
- 114 Tzelepi, V. *et al.* Modeling a lethal prostate cancer variant with small-cell carcinoma features. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 666-677, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1867 (2012).