

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



“Efecto de 8-Benzil-1,3,8-Triazaspiro-[4.5]-Decano-2,4-Diona sobre la migración e invasión de células tumorales prostáticas PC3 estimuladas con LDLs”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

P R E S E N T A

GEORGINA QUINTANA GONZÁLEZ

Mexicali, Baja California

Agosto del 2024

Abreviaturas

AKT	Protein Kinase B
CP	Cáncer de próstata
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
GEPIA	Gene Expression Profiling Interactive Analysis
HMG-CoAR	3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A Reductasa
HNF1- α	Hepatocyte Nuclear Factor-1 α
IDOL	Inducible Degradar of LDR
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLR	Receptor de Lipoproteínas de baja densidad
MMPs	Metaloproteinasas de Matriz
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
SFB	Suero Fetal Bovino
SREBP2	Sterol Regulatory Element Binding Protein 2
TEM	Transición Epitelio Mesenquimal
Triazaspirano	8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona

Carta de Dictamen de la Evaluación Escrita del Examen de Grado

Contenido

Abreviaturas	ii
Contenido	iii
Índice de figuras	iv
Resumen	v
1. Introducción	10
2. Marco Teórico	11
2.1. Glándula prostática	11
2.1.1. Anatomía e histología	11
2.1.2. Fisiología	12
2.2. Cáncer de próstata	13
2.2.1. Factores de riesgo	13
2.2.2. Fisiopatología	13
2.2.3. Manifestaciones clínicas	14
2.2.4. Diagnóstico	14
2.2.5. Tratamiento	14
2.3. Impacto de las lipoproteínas en la progresión tumoral	15
2.3.1. Tipos de dislipidemias	15
2.3.2. Captación de LDL	15
2.4. Metabolismo de colesterol en cáncer	16
2.4.1. Relevancia del colesterol para las células cancerosas	16
2.4.2. Alteración del metabolismo en las células cancerosas	16
2.5. Dislipidemias y cáncer de próstata	17
2.5.1. Obesidad y dislipidemia	17
2.5.2. Lipoproteínas de baja densidad y cáncer	17
2.6. Migración e invasión celular	18
2.6.1. Transición epitelio mesenquimal	18
2.6.2. Importancia de las metaloproteinasas	19
2.7. Vías de señalización inductoras de migración en células de cáncer de próstata	19
2.7.1. Papel de la proteína AKT en cáncer de próstata	19
2.8. Azaspiranos y su utilidad en cáncer	20
2.8.1. Potencial de los azaspiranos	20
2.8.2. Azaspiranos en cáncer	20
2.8.3. Triazaspirano	20
3. Antecedentes	21
4. Planteamiento del Problema	22
5. Justificación	23
6. Hipótesis y Objetivos	25
6.2. Objetivo general	25
6.3. Objetivos específicos	25
7. Materiales y Métodos	25
7.1. Diseño del estudio	25
7.2. Materiales	26
7.3. Cultivos celulares	26

7.4. Aislamiento de LDL	26
7.5. Ensayo de cierre de herida	27
7.6. Ensayo de invasión en cámaras Boyden	27
7.7. Inmunodetección	27
7.8. Zimografía	28
7.9. Análisis de la base de datos GEPIA	29
7.10. Análisis estadístico	29
7.11. Aspectos bioéticos	29
7.12. Bioseguridad	30
8. Resultados	30
9. Discusión	41
10. Conclusiones	46
11. Bibliografía	47
Anexos	

Anexo A. Acta de aprobación del Comité de Ética en Investigación.

Anexo B. Formato de la Carta de Consentimiento Informado.

Índice de figuras

Figura 1: Anatomía e Histología de la glándula prostática	11
Figura 2: Triazaspirano	12
Figura 3: Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la migración de células PC3	19
Figura 4: Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la migración de células PC3 en cámaras Boyden	20
Figura 5: Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la invasión de células PC3	20
Figura 6: Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la secreción de MMPs en células PC3	22
Figura 7: Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la expresión proteica de LDLR, PCSK9 y nSREBP2 en células PC3	23
Figura 8: Información de expresión de ARN de los subtipos de LDLR, PCSK9 y SREBP2 en cáncer de próstata y tejido prostático sano obtenida de GEPIA	24
Figura 9: Información de expresión de ARN de los subtipos de AKT en cáncer de próstata y tejido prostático sano obtenida de GEPIA	25

Resumen

Introducción: El cáncer de próstata es el segundo diagnóstico de cáncer más frecuente y la quinta causa de muerte por patologías neoplásicas a nivel mundial. En México en el año 2020 se reportó una incidencia de 26,742 casos, 70% de los cuales son detectados en etapas avanzadas. A pesar de las diversas herramientas terapéuticas disponibles, existe un considerable grupo de pacientes que presentará recurrencia de la enfermedad a pesar de la inicial erradicación del cáncer, riesgo que aumenta cuando se tiene la patología avanzada o cuando se asocia a otras comorbilidades, tales como las dislipidemias. El diseño y generación de tratamientos novedosos con el fin de mejorar el pronóstico de este grupo poblacional toma gran relevancia. Ante la evidencia de nuevas moléculas con potencial actividad antitumoral, surge el interés de su investigación con la posibilidad de su posible aplicación en futuros pacientes con cáncer de próstata.

Objetivo: Caracterizar el efecto del triazaspirano 8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona sobre células tumorales invasivas PC3 tratadas con lipoproteínas de baja densidad, evaluando los procesos de migración, invasión y homeostasis de lípidos.

Materiales y Métodos: A partir de cultivos celulares tumorales PC3 estimulados con lipoproteínas de baja densidad, se evaluó el efecto inhibitorio del triazaspirano sobre las células en su capacidad de migración celular mediante ensayo de cierre de herida, invasión celular a través del ensayo con cámaras Boyden, secreción de metaloproteinasas de matriz 2 y 9 mediante zimografía y la expresión proteica de moléculas implicadas en la regulación de lípidos (LDLR, SREBP2, PCSK9), así como en la proliferación celular (AKT) por inmunodetección. Los resultados fueron expresados como promedio $\pm$ D.E. de, al menos, tres experimentos independientes para cada ensayo. Los datos se analizaron estadísticamente usando el software GraphPad Prism 8, mediante la prueba ANOVA de una vía comparada mediante la prueba múltiple de Dunette. La probabilidad estadística $p \leq 0.05$ será considerada significativa.

Resultados: Las LDL inducen un aumento en la migración e invasión de células PC3, mientras que el triazaspirano aminoró dichos procesos. A su vez, las LDL disminuyen la

expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos, tales como LDLR y PCSK9, efecto notorio bajo tratamiento con el triazaspirano. Dichos fenómenos se atribuyen al bloqueo de la vía de AKT, la cual podría ser el blanco del triazaspirano en las células PC3, bloqueando así los procesos de migración e invasión.

Conclusiones: El triazaspirano mostró un efecto inhibitorio sobre la migración e invasión inducida por LDLs en células de cáncer de próstata PC3.

1. Introducción

El cáncer de próstata (CP) es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en hombres mexicanos. A pesar de la disponibilidad de diversos tratamientos para la enfermedad, existe el riesgo de presentar una recurrencia, el cual aumenta cuando se detecta el cáncer en etapas avanzadas, lo cual es una realidad para la población mexicana, puesto que en la mayoría de los casos son diagnosticados en estadíos tardíos de la enfermedad, haciendo más difícil su manejo y disminuyendo la posibilidad de erradicar el cáncer (*Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas*, s. f.-a).

Dentro de los factores asociados a un mayor riesgo a padecer la enfermedad, están la edad, antecedentes familiares de CP, raza, dieta, estilo de vida, enfermedades inflamatorias de la glándula prostática y crónico degenerativas, tales como Diabetes Mellitus, Hipertensión Arterial y Obesidad, este último factor engloba a su vez la dislipidemia, la cual se ha visto en diversos estudios en años recientes que existe una correlación positiva entre tener niveles elevados de colesterol en sangre con un aumento del riesgo de padecer CP, así como de tener una enfermedad más agresiva, por lo que el tener una dislipidemia asociada al CP se vuelve un factor predictor negativo (*Prostate Cancer | Concise Medical Knowledge*, s. f.; Raftopoulos et al., 2022).

Para entender la importancia que juega el colesterol en CP, se debe destacar sus funciones intracelulares. El colesterol funciona como precursor de andrógenos, favorece la comunicación intracelular y es un componente integral de la membrana celular al favorecer su remodelación, así como regular propiedades específicas de ella tal como es la fluidez membranal, con todo ello favorece el desarrollo y progresión del CP. La progresión tumoral se asocia a cambios en el metabolismo y vías de señalización de las células cancerosas, que contribuyen a perpetuar la supervivencia del tumor. Los mecanismos intracelulares en condiciones libres de cáncer, son regulados de forma precisa y rigurosa, manteniendo un estado de homeostasis en las células. En CP estos mecanismos reguladores se ven alterados, de tal forma que favorecen la proliferación de

las células cancerosas al aumentar o disminuir la señalización de ciertas vías acorde a las necesidades del tumor (Giunchi et al., 2019; Jiang et al., 2019).

En el contexto de CP en etapas avanzadas, los mecanismos reguladores de dichas células y por lo tanto el comportamiento de estas se encuentra alterado, explicando por qué ciertos tratamientos pierden su utilidad acorde al estadio de la enfermedad en que se encuentre el paciente. El diseño de nuevos tratamientos se vuelve de gran importancia ante la recidiva de la enfermedad de CP, debido a la dificultad que representa regular los mecanismos de las células neoplásicas con un solo agente terapéutico o el obtener adecuada respuesta a un esquema establecido.

El interés de mejorar las opciones terapéuticas disponibles es fomentado a su vez por el descubrimiento de nuevas moléculas que podrían funcionar contra células neoplásicas, como es el caso de los azaspiranos, los cuales se ha visto que tienen la capacidad de regular la señalización intracelular y funcionan como antitumorales. Ante dicha evidencia, fue que se optó por estudiar un triazaspirano con potencial actividad antitumoral, para caracterizar su efecto sobre células de CP estimuladas con lipoproteínas de baja densidad, analizando mecanismos de migración, invasión, homeostasis de lípidos y vías de señalización asociadas a la enfermedad (*Definition of Azaspirane - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute, 2011*).

2. Marco Teórico

2.1. Glándula prostática

2.1.1. Anatomía e histología

La próstata (fig. 1) es un órgano del aparato reproductor masculino que se encuentra ubicado en la pelvis, debajo de la vejiga, detrás de la sínfisis del pubis y delante del recto. Se divide en tres zonas: central (25% de la glándula), de transición (10% de la glándula) y periférica (65% de la glándula). Se conforma de un epitelio cilíndrico simple o pseudoestratificado, compuesto por células luminales o secretoras, basales, neuroendocrinas e intermedias.

Anexo al epitelio se encuentra la membrana basal y el estroma, este último conformado por tejido conectivo fibroso, músculo liso, plexo nervioso y vascular (Nelson et al., 2020).

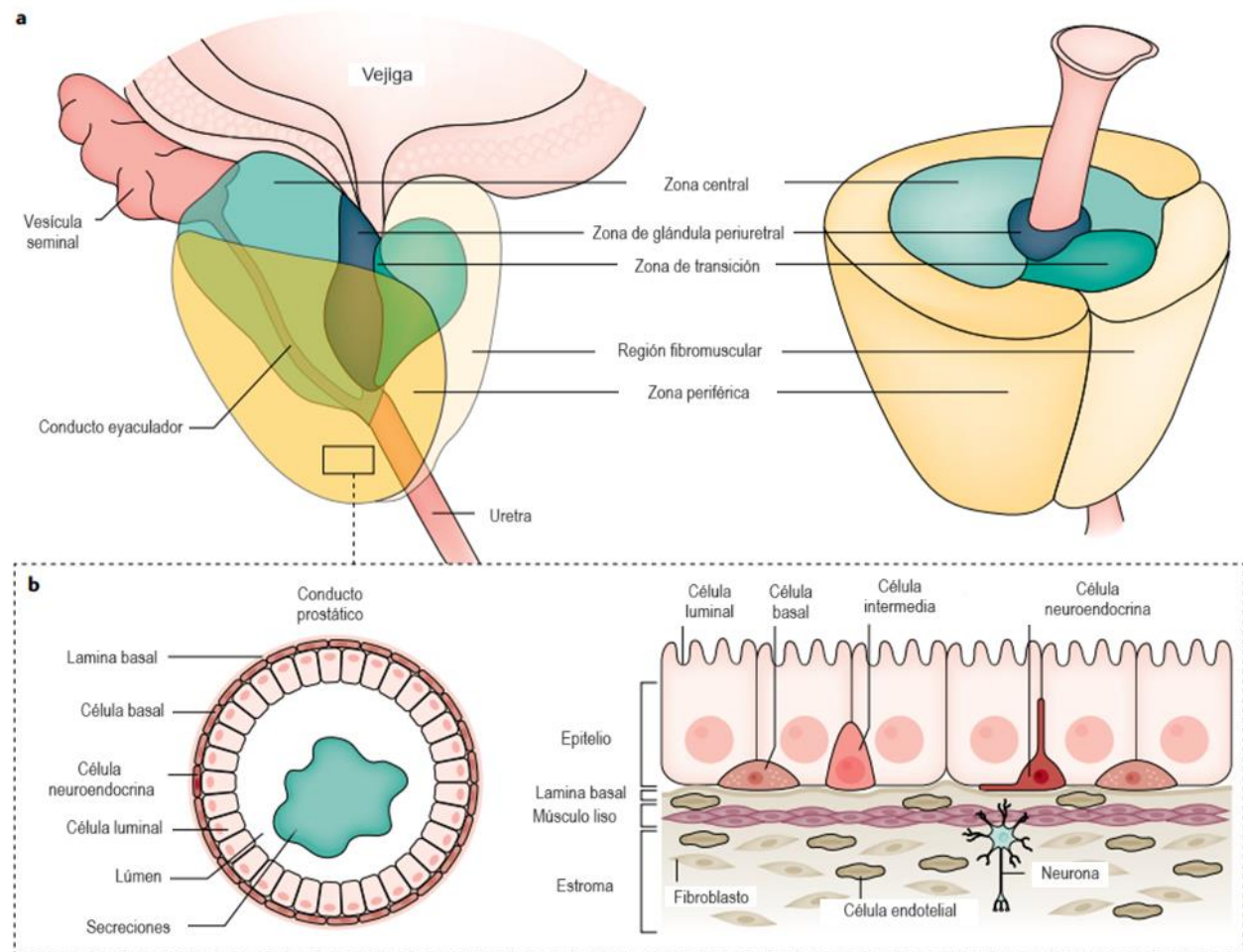


Figura 1. Anatomía e histología de la glándula prostática. Se ilustra la glándula prostática y sus relaciones anatómicas, así como las zonas en las que se divide (central, periférica, de transición) (A). La glándula prostática se conforma de un epitelio simple conformado por células luminales, basales, intermedias y neuroendocrinas, adjuntas a la lámina basal conformada por células basales, músculo liso y estroma (B) (Tomada de Rebello et al., 2021).

2.1.2. Fisiología

La función que cumple la próstata es segregar líquido prostático, que constituye el 30% del líquido seminal.

La secreción prostática regula el estado de coagulación, licuefacción y gelificación del líquido seminal. A su vez, las proteínas del líquido prostático están involucradas en la activación de la motilidad de los espermatozoides, su protección contra el pH uretral y vaginal, así como en la interacción entre los espermatozoides y el moco cervical.

En cuanto a la fertilidad, la glándula prostática debe estar presente para garantizar la fertilidad, la próstata es vital para la reproducción. (Nelson et al., 2020).

2.2. Cáncer de próstata

2.2.1. Factores de riesgo

Una patología importante de la glándula prostática es el CP, enfermedad neoplásica con alta incidencia a nivel mundial. Dentro de los factores de riesgo asociados a la patología, se encuentra la edad dentro del rango de 60-70 años, personas provenientes de Estados Unidos, de Europa del oeste o afroamericanos los más afectados, tener un antecedente familiar de CP, padecer enfermedades crónicas degenerativas tales como Diabetes Mellitus, Hipertensión Arterial y Obesidad, antecedente de enfermedades inflamatorias prostáticas y el estilo de vida de la persona, siendo aquellos con sedentarismo y dietas ricas en lípidos, carnes rojas, lácteos y carbohidratos, los que tienen mayor incidencia (*Prostate Cancer Risk Factors*, s. f.).

2.2.2. Fisiopatología

El CP se puede clasificar según la célula que se vea alterada, siendo las células luminales las que se ven principalmente involucradas, por lo que a esta patología se le suele denominar adenocarcinoma prostático. En la glándula deben surgir diversos cambios para llegar a tal enfermedad, cambios estimulados por los factores de riesgo asociados, mutaciones y modificaciones epigenéticas. A partir del tejido prostático normal, se desarrolla una neoplasia intraepitelial prostática en la cual proliferan las células luminales sin perturbar la estructura de la glándula.

Al progresar dichos agresores sobre el epitelio, persiste la hiperplasia celular, dando lugar al adenocarcinoma prostático y después a adenocarcinoma prostático invasivo cuando las células invaden la membrana basal de la glándula. En etapas avanzadas, ocurre el

proceso de metástasis y resistencia a la castración donde las células invaden tejidos y órganos diferentes a la próstata, además de adquirir la capacidad de sobrevivir de forma independiente de la concentración sérica de andrógenos (Salih et al., 2016).

2.2.3. Manifestaciones clínicas

Esta enfermedad está caracterizada por no presentar signos y síntomas en etapas tempranas, esto debido a que la neoplasia surge en la mayoría de los casos en la zona periférica, donde ocurre el crecimiento celular descontrolado sin causar sintomatología. Al progresar la enfermedad y aumentar el tamaño del tumor, puede manifestarse con síntomas obstructivos, de compresión de estructuras anexas o afección de otros órganos por metástasis del tumor. En estos casos los datos clínicos que suelen reportarse son el aumento de la frecuencia urinaria, nicturia, hematuria, disuria, disminución de la función sexual, fatiga, dolor óseo, parálisis de las extremidades (*Prostate Cancer Signs and Symptoms*, s. f.).

2.2.4. Diagnóstico

Una vez que se realiza el diagnóstico de la enfermedad, mediante examen digital rectal, antígeno prostático elevado, estudio de imagen, estudio histopatológico y determinación de la escala de Gleason para cada paciente, se puede optar por un tratamiento en específico según la etapa en la que se diagnostique al paciente. La escala previamente mencionada cumple la función de ser un determinante pronóstico del tejido prostático maligno, entre mayor es el valor, se considera que el tumor tiene un mayor grado de malignidad al estar menos diferenciado, aumentando la probabilidad de desarrollar o tener una enfermedad avanzada metastásica (Munjal & Leslie, 2021).

2.2.5. Tratamiento

Dentro de las opciones terapéuticas disponibles y aprobadas, están la vigilancia pasiva o activa, cirugía, radioterapia, braquiterapia, quimioterapia, terapia hormonal o manejo paliativo. A pesar de dichas opciones, el tratamiento que se considera como curativo es la prostatectomía radical, braquiterapia y radioterapia; a pesar de ser curativo, aproximadamente el 20-30% de los pacientes presentará una recurrencia de la

enfermedad, riesgo que aumenta cuando la enfermedad se diagnostica en etapas avanzadas o si el paciente presenta factores de mal pronóstico asociados a la enfermedad, como son niveles de antígeno prostático detectable o que va en aumento, márgenes quirúrgicos positivos tras cirugía (tejido prostático maligno remanente tras el procedimiento), escala de Gleason con puntuación elevada, estadios avanzados de la enfermedad, que involucre a las vesículas seminales, extensión fuera de la glándula prostática (Michael Kolodziej, 2015; Parker et al., 2020).

2.3. Impacto de las lipoproteínas en la progresión tumoral

2.3.1. Tipos de dislipidemias

Las principales características de una dislipidemia son el aumento de la concentración sérica de triglicéridos, disminución de lipoproteína de alta densidad (HDL) y aumento de lipoproteína de baja densidad (LDL) (Vekic et al., 2019). Actualmente se recomienda clasificar las dislipidemias con base al elemento lipídico que se encuentre alterado, dando lugar a una las siguientes categorías: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o trastorno mixto (Berberich & Hegele, 2022).

2.3.2. Captación de LDL

Las lipoproteínas, particularmente LDL, son una fuente importante de colesterol para las células, las cuáles mediante endocitosis del receptor de LDL (LDLR), capturan el colesterol. El LDLR es un receptor transmembranal al cual se le unen partículas de LDL, formando un complejo receptor-ligando que es internalizado como vesícula recubierta de clatrin a través de endocitosis; la cubierta de clatrin se despolimeriza, da lugar a la formación de un endosoma temprano que se fusiona con un endosoma tardío, donde las partículas de LDL se disocian del LDLR. En el lisosoma, las proteínas apo-B de LDL son degradadas, los ésteres de colesterol son hidrolizados a ácidos grasos y colesterol (Pirahanchi et al., 2021).

En el caso particular de células de cáncer, el aumento de la adquisición de colesterol representa un método más eficiente que la síntesis de novo de colesterol para cumplir con los requerimientos de lípidos (Huang et al., 2020). La fuente de lípidos exógenos

facilita el proceso de tumorigénesis y metástasis en estas células. La adquisición de lípidos es requerida para la síntesis de membrana y de hormonas, así como la progresión del ciclo celular, necesarios para la alta demanda de las células tumorales por su proliferación acelerada (Butler et al., 2020; *Roles of Lipids in Cancer* | IntechOpen, s. f.).

2.4. Metabolismo de colesterol en cáncer

2.4.1. Relevancia del colesterol para las células cancerosas

El metabolismo de colesterol en células cancerosas contribuye a su proliferación, migración e invasión. Para mantener un adecuado aporte de colesterol, las células aumentan tanto la síntesis de colesterol como su captación (Ding et al., 2019).

2.4.2. Alteración del metabolismo de lípidos en las células cancerosas

La alteración en el metabolismo de lípidos les permite tener un crecimiento acelerado, adecuada supervivencia y metástasis. Algunas de las adaptaciones implican la regulación al alza de la síntesis de colesterol mediante aumento de la expresión de enzimas implicadas en la vía intrínseca de síntesis de colesterol, como la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoAR), enzima reguladora de la síntesis de colesterol. El aumento de la expresión de factores de transcripción implicados en la homeostasis lipídica, como (sterol regulatory element binding protein 2), que se encarga de regular la expresión de enzimas que participan en la síntesis de lípidos, particularmente la homeostasis de colesterol, logrado mediante un aumento en la expresión del LDLR, HMG-CoAR y PCSK9, este último involucrado en la regulación del LDLR, al favorecer su reciclaje y degradación lisosomal (*The role of cholesterol and cholesterol-driven membrane raft domains in prostate cancer* - Anita Hryniewicz-Jankowska, Katarzyna Augoff, Aleksander F Sikorski, 2019, s. f.).

SREBP2 es una proteína que requiere activación proteolítica, se encuentra en la membrana del RE en forma de horquilla, con sus extremos carboxilo (C-terminal) y amino-terminal (N-terminal) hacia el citosol; N terminal corresponde a la porción que actúa como factor de transcripción, mientras que C terminal está unido a la porción Scap de SREBP. Scap es quien funciona como sensor de colesterol y determina la activación

de SREBP; en condiciones de colesterol intracelular elevado, Scap se une a un colesterol, lo cual fomenta que SREBP permanezca unido a la membrana del RE, al anclarse Scap a una proteína llamada Insig. Cuando hay depleción de colesterol, Scap no se une a Insig, por lo que el complejo SREBP-Scap se dirige al aparato de Golgi transportado en vesículas, donde se escinde N terminal, lo cual permite que el factor de transcripción se dirija al núcleo, se una a secuencias de los elementos reguladores de esteroides, y de lugar a la activación de genes involucrados en el suministro de colesterol celular, como el LDLR y HMG-CoA reductasa. (Espenshade & Hughes, 2007).

Además, se ha evidenciado que existe una disminución de la expresión de transportadores intermembrana que se encargan de reducir la concentración de lípidos intracelulares y mantener niveles adecuados de lípidos a nivel intracelular, como son los transportadores “ATP binding cassette subfamily” (ABCA1, ABCG1). Estos son algunos de los mecanismos que se han implicado en fisiopatología de algunas líneas celulares tumorales (Lee et al., 2013).

2.5. Dislipidemias y cáncer de próstata

2.5.1. Obesidad y dislipidemias

Dentro de los factores de riesgo asociados al CP, uno que toma gran importancia debido a su alta incidencia en la población mundial, es la obesidad, enfermedad que suele acompañarse de una dislipidemia. Ambos representan un factor de riesgo modificable para el desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre ellos el CP (Jamnagerwalla et al., 2018).

En condiciones normales, la próstata contiene altos niveles de colesterol, esto se correlaciona con que es un tejido blanco para la actividad de andrógenos, sin embargo se ha reportado un incremento en la concentración de colesterol en el tejido prostático neoplásico en comparación al no neoplásico, denotando la importancia de dicho lípido para esta patología (Hager et al., 2006).

2.5.2. Lipoproteínas de baja densidad y cáncer

Se ha demostrado que las células cancerosas estimuladas con LDL presentan una mayor actividad tumoral, favoreciendo su proliferación, migración e invasión celular. Estos hallazgos se correlacionan con diversos estudios realizados con muestras de sangre de personas con diagnóstico de CP, como es el caso del estudio Finnish realizado en pacientes con diagnóstico de CP, en donde se encontró que mientras más elevados los niveles de triglicéridos y colesterol, los pacientes presentaban escalas de Gleason con valores más elevados, en comparación a los grupos con niveles de lípidos más bajos que presentaban escalas de Gleason con valores menores (Murtola et al., 2019).

Otro estudio realizado por Kachhawa y asociados en el año 2018, estudiaron la relación que existe entre dislipidemias y el riesgo para desarrollar CP, encontrando que existe una correlación positiva entre los niveles de antígeno prostático y los niveles séricos de lipoproteínas de baja densidad, con lo que establecieron que el tener hipercolesterolemia a expensas de LDL aumenta el riesgo de padecer cáncer de próstata (Kachhawa et al., 2018).

2.6. Migración e invasión celular

2.6.1. Transición epitelio mesenquimal

La metástasis es una característica relevante de los tumores malignos, así como la principal causa de muerte por cáncer (Kwakwa & Sterling, 2017). Dicho proceso está determinado por la capacidad que poseen las células cancerígenas de migración y subsecuente invasión de los tejidos. Estos mecanismos ocurren una vez que las células tienen una transición epitelio mesenquimal (TEM), donde disminuye la expresión de proteínas epiteliales, tales como E-cadherina y aumentan la expresión de proteínas mesenquimales como N-cadherina y vimentina, que le permitirán a la célula su movilización y el tumor dejará de ser localizado. Dentro de los factores que promueven dichos mecanismos, el colesterol-LDL se ha visto implicado en el proceso de migración, al encontrarse presente en los frentes de migración de las células en movimiento, esto logrado mediante su translocación hacia adhesiones focales en dichos frentes (Dongre & Weinberg, 2019).

2.6.2. Importancia de las metaloproteinasas de matriz

La movilización de las células está determinado a su vez por la acción de integrinas y metaloproteinasas de matriz (MMPs). Las integrinas son receptores transmembrana heterodiméricos que unen proteínas de la matriz extracelular, promoviendo la supervivencia, proliferación y migración de células tumorales prostáticas (Alberts et al., 2002).

Las MMPs tienen una actividad proteolítica contra elementos de la matriz extracelular, se encargan de degradar moléculas de adhesión celular, por lo tanto modulan la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, generando una remodelación de los tejidos y permitiendo el avance de las células hacia sitios anexos y lejanos (Gialeli et al., 2011).

2.7. Vías de señalización inductoras de migración en células de cáncer de próstata

2.7.1. Papel de la proteína AKT en cáncer de próstata

Las células de CP tienen alteración de algunas vías de señalización que les permite su adecuada supervivencia, como lo es la vía en la que está implicada AKT (Protein Kinase B). El aumento de la expresión de AKT se ha visto implicado en los mecanismos de crecimiento celular, migración y regulación del metabolismo. La vía de señalización que se ha visto con mayor implicación en el metabolismo de lípidos en células de cáncer, es la vía PI3K/AKT. AKT tiene tres subtipos, cada uno encargado de diferentes funciones: AKT1 (proliferación celular, crecimiento celular, apoptosis y metabolismo de glucosa), AKT2 (metabolismo de glucosa y lípidos) y AKT3 (proliferación, diferenciación, apoptosis y tumorigénesis). La señalización de AKT se encuentra activada de forma irregular en cáncer, su consecuente activación contribuye al desarrollo y progresión de esta patología (Miao et al., 2022).

La desregulación de la vía de señalización de AKT y el aumento de la actividad de dicha proteína se ha correlacionado con la agresividad tumoral, particularmente en cáncer de próstata niveles elevados de dicha vía se asocian al desarrollo del tumor, progresión de la enfermedad y al desarrollo de CP resistente a la castración (Nitulescu et al., 2018).

2.8. Azaspiranos y su utilidad en cáncer

2.8.1. Potencial de los azaspiranos

Los azaspiranos son moléculas que están siendo estudiadas para el manejo de ciertas neoplasias, al tener potencial de bloquear su crecimiento y prevenir su progresión, mediante su acción como inhibidor de la traducción de señales de las células neoplásicas.

2.8.2. Azaspiranos en cáncer

Los efectos de los azaspiranos en enfermedades neoplásicas se han demostrado en algunos estudios donde se trabaja con dichas moléculas y líneas celulares tumorales de hepatocarcinoma, mieloma múltiple y cáncer de mama. Un ejemplo de la evidencia obtenida, son los resultados del estudio de Mohan y asociados elaborado en el 2014, donde se demostró la utilidad de un azaspirano en hepatocarcinoma celular, demostrando que inhibe la vía de Src y es capaz de modular la vía de señalización de JAK2 (Janus Kinase 2) y STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), disminuyendo la proliferación de dichas células tumorales (Mohan et al., 2014).

2.8.3. Triazaspirano

La molécula propuesta a caracterizar en el presente estudio es el 8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona (triazaspirano). Dicha molécula ha mostrado tener actividad biológica mediante ensayos de docking, cumpliendo con las reglas de Lipinski y ADME, sin demostrar toxicidad. Con base en las características demostradas mediante dichas herramientas, se ha establecido que el trizaspirano ejerce su actividad en la vía FAK/Src, al disminuir niveles de expresión del estado fosforilado de dichas proteínas, modulando la migración e invasión de células tumorales prostáticas (Vasconcelos-Ulloa et al., 2023).

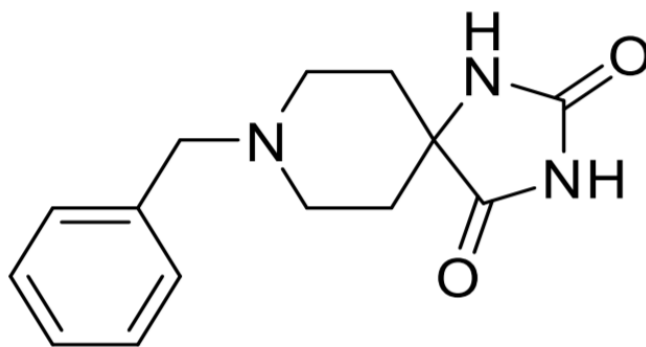


Figura 2. Triazaspirano. Nombre químico de la molécula: 8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona. Se encuentra estructurada por dos anillos unidos a través de un átomo de carbono (espiro), los cuales contienen un total de tres nitrógenos. Particularmente esta molécula se conforma por dos estructuras cíclicas acopladas (piperidona e hidantoína), en donde la piperidona es portadora de un radical bencilo.

3. Antecedentes

El CP es una enfermedad neoplásica con alta incidencia a nivel mundial, registrándose en el año 2020, 1'414,259 casos nuevos según estadísticas de GLOBOCAN, así como 26,742 casos nuevos en México para el mismo año (*Cancer Today*, s. f.), siendo el 70% de los casos detectados en etapas avanzadas de la enfermedad. En México representa la primera causa de muerte en hombres mayores de 65 años (Estado, s. f.).

Cuando la enfermedad es detectada en su estado primario confinado dentro de la próstata, con las opciones terapéuticas disponibles, es posible mantener la neoplasia localizada y erradicar la enfermedad. En casos de enfermedad avanzada, la privación de andrógenos es la opción terapéutica ideal, realizada mediante métodos quirúrgicos o mediante castración farmacológica. Sin embargo, el efecto de la supresión androgénica en la progresión del CP se agota y la enfermedad eventualmente progresará de ser “sensible a la castración” a ser “resistente a la castración”, donde las células son independientes de las concentraciones de testosterona sérica. En dichos casos se opta por añadir o cambiar a otras opciones terapéuticas como la quimioterapia que brinda una supervivencia de 1-2 año (Cornford et al., 2017).

Por lo tanto, uno de los principales retos en el tratamiento de pacientes con CP avanzado es la resistencia terapéutica a la deprivación de andrógenos y a la quimioterapia. Aproximadamente el 90% de los pacientes con CP resistente a la castración desarrollan metástasis ósea, lo cual puede producir morbilidad a expensas de dolor, fracturas patológicas, compresión de médula y falla medular, así como efectos paraneoplásicos como anemia, pérdida de peso, fatiga, hipercoagulabilidad y que sean propensos a desarrollar infecciones. El estado de resistencia al tratamiento disminuye la calidad de vida de la persona y aumenta su riesgo de mortalidad a causa de la enfermedad (Saad & Hotte, 2010).

Para poder encontrar soluciones a la resistencia terapéutica, es necesario comprender no solo las vías de señalización derivadas del receptor de andrógenos, sino otros mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la resistencia, lo que permitirá la identificación de nuevos blancos terapéuticos y con esto el desarrollo de nuevos fármacos. El descubrimiento y generación de nuevas moléculas con propiedades antitumorales con efectos secundarios leves o nulos es de vital importancia, puesto que permitirá mejorar el pronóstico y calidad de vida de los pacientes que presentan esta enfermedad (Byar, 1972).

Con base a la alta afinidad de los azaspiranos por ciertas células tumorales, surge el interés del estudio del 8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona, como posible herramienta terapéutica para el futuro manejo de pacientes con CP, el cual posee actividad antitumoral. El triazaspirano en cuestión fue desarrollado de forma sintética a partir de la hidantoína, en el laboratorio del Dr. Rivero en el Instituto Tecnológico de Tijuana. Es un compuesto que tras su estudio se ha visto que tiene la capacidad de atravesar membranas celulares y posee potencial actividad biológica (Rivero et al., 2011; Santiago-Ruiz et al., 2016).

4. Planteamiento del problema

En México el CP cobra gran importancia debido a su alta incidencia de 26 742 casos nuevos en el año 2020, ocupando el primer lugar en incidencia de cáncer en hombres

mexicanos. De acuerdo con información del Instituto Nacional de Salud Pública, el CP es la primera causa de cáncer y de mortalidad por cáncer en hombres mexicanos. La mayor parte de los casos detectados se encuentran en etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que el manejo se vuelve limitado y la probabilidad de presentar pobre respuesta a este o una recurrencia se vuelve considerable (*Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas*, s. f.-b). Otro factor a considerar es el factor de riesgo de la obesidad, enfermedad con altas cifras estadísticas en el país.

Según datos de ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición) 2022, se reporta una prevalencia de obesidad abdominal del 81%, sobrepeso del 38.3% y obesidad del 36.9%, condición que presentó un aumento del 21.4% en la población mexicana (Campos-Nonato et al., 2023; Consumidor, s. f.). Aproximadamente el 60-70% de las personas con obesidad tienen a su vez una dislipidemia asociada, por lo que la probabilidad de padecer en conjunto CP y una dislipidemia es alta, otorgando a estas personas con ambos diagnósticos, un peor pronóstico (Feingold, 2000).

Es por esto que existe la necesidad de seguir investigando y desarrollando nuevos fármacos, con la finalidad de brindar nuevas y mejores opciones terapéuticas. Con base en el pobre factor predictor de supervivencia que implica el diagnóstico de CP en etapas avanzadas y el tener una dislipidemia asociada, existe la creciente necesidad e interés sobre la generación y diseño de tratamientos novedosos que mejoren el pronóstico de este grupo de personas.

5. Justificación

El CP es el segundo diagnóstico más frecuente realizado en hombres y la quinta causa de muerte a nivel mundial. Basado en estimados de GLOBOCAN del 2020, se reportaron 1 414 259 nuevos casos de CP a nivel mundial en el 2020, con mayor prevalencia en países desarrollados, reflejándose las diferencias en cuanto a las herramientas diagnósticas disponibles en dichos países a diferencia de los países en desarrollo, así como la cultura de detección oportuna de la enfermedad (*Global Cancer Observatory*, s. f.).

Actualmente existe un incremento en la incidencia de CP en países en desarrollo, esto atribuido al acceso a servicios médicos, así como el aumento en la documentación y el reporte de casos. A pesar de que la incidencia va a la alza, la mayoría de los casos de CP se detectan cuando el cáncer está confinado dentro de la próstata (Rawla, 2019).

En México la situación es distinta, a pesar de que la incidencia del CP es tres veces menor al observado en Estados Unidos, la mortalidad es similar, representando la primera causa de cáncer y de mortalidad por cáncer en hombres. El 70% se detecta en etapas avanzadas a diferencia de otros países en donde la detección oportuna del CP mediante la cuantificación del antígeno prostático y exploración física es realizada de forma rutinaria, permitiendo realizar un diagnóstico en etapas tempranas (Salud, s. f.).

Es por ello que la investigación continua en el ámbito oncológico permite dilucidar nuevas estrategias para la detección temprana de las enfermedades malignas, así como el desarrollo de las opciones terapéuticas disponibles, todo con el objetivo de mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes oncológicos. A su vez, un mayor conocimiento en cuanto a las vías de transducción de señales y los factores en el ambiente celular, mediante los cuáles las células tumorales proliferan, permiten la investigación y generación de nuevos blancos terapéuticos y/o moléculas con actividad antitumoral.

Con base en los efectos mostrados por los azaspiranos sobre diferentes líneas celulares tumorales, se propone el uso del triazaspirano con potencial actividad antitumoral contra células de CP, con la ventaja de que éstos son de fácil obtención, poseen buen rendimiento y su síntesis tiene un bajo costo. Actualmente no existen reportes en la literatura en relación al estudio del posible efecto inhibitorio de moléculas del tipo triazaspiranos sobre la migración, invasión y metabolismo de lípidos de células tumorales prostáticas en tratamiento con LDLs.

Ante la evidencia reciente sobre moléculas como los azaspiranos, que han demostrado actividad antitumoral en algunos tipos de cáncer, se consideró a los triazaspiranos como

posible herramienta terapéutica en CP asociado a hipercolesterolemia con impacto en procesos como migración e invasión tumoral.

6. Hipótesis y Objetivos

6.1. Hipótesis

La migración e invasión de las células tumorales PC3 inducida por LDLs es inhibida por 8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona, a través de un descenso en la secreción de MMP-2 y MMP-9 y la regulación de proteínas moduladoras del metabolismo de lípidos, tales como LDLR, SREBP-2 y PCSK9.

6.2. Objetivo general

Caracterizar el efecto del 8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona sobre la migración, invasión y homeostasis de lípidos en células tumorales invasivas PC3 tratadas con LDLs.

6.3. Objetivos específicos

1. Determinar la concentración de LDLs que inducen la migración de las células de CP invasivo PC3.
2. Estudiar el papel de 8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona sobre la invasión de las células tumorales PC3.
3. Evaluar el efecto del 8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona sobre la expresión de LDLR, SREBP-2 y PCSK9 en células PC3 tratadas con LDLs.
4. Analizar el impacto de los niveles de expresión de LDLR, PCSK9, SREBP-2 y las isoformas de AKT sobre la supervivencia y supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer prostático utilizando bases de datos como GEPIA.

7. Materiales y Métodos

7.1. Diseño del estudio

Se realizó una investigación aplicada, cuantitativa y experimental en la ciudad de Mexicali, del 1 de agosto del 2021 al 1 de agosto del 2023, en la Facultad de Medicina Mexicali UABC. Los experimentos se llevaron a cabo en cultivos de células tumorales

prostáticas PC3, las cuales son insensibles a andrógenos y presentan un alto potencial metastásico. Las células fueron manejadas en la campana de flujo laminar del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad y se trabajaron en un ambiente estéril. Dichas células fueron estimuladas con el triazaspirano y LDL, estas últimas se obtuvieron a partir del plasma de donadores sanos, habiendo obtenido su consentimiento firmado previo a su extracción. Se realizaron los experimentos con la finalidad de estudiar el efecto del triazaspirano y las LDL sobre los cultivos celulares, valorando su impacto en mecanismos de migración, invasión y en la homeostasis de lípidos.

7.2. Materiales

8-benzil-1,3,8-triazaspiro-[4.5]-decano-2,4-diona donado gentilmente por el Dr. Ignacio A. Rivero, investigador del Instituto Tecnológico de Tijuana. Los anticuerpos anti-AKT, anti-p-AKT^{S473}, anti-LDLR, anti-SREBP-2 y anti-PCSK9 fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc.® y de Cell Signaling Technology®.

7.3. Cultivos celulares

La línea celular tumoral prostática humana PC3 se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) se cultivó en medio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado con antibióticos, 5% de suero fetal bovino (SFB) y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Para propósitos experimentales, los cultivos de células PC3 se sometieron a ayuno durante 18 horas en medio DMEM sin SFB.

7.4. Aislamiento de LDL

Se obtuvo una muestra de plasma humano de un donador sano en la Facultad de Medicina Mexicali, Baja California, México, después de haber obtenido su consentimiento informado (FMM/CEI/0010/2020-2). Se siguió el protocolo acorde a la Declaración de Helsinki. En la primera fase, la densidad del plasma se ajustó a 1.019 g/mL con KBr y se centrifugó a 345,500 *g* por 160 min usando el rotor S140-AT 2555, posteriormente se descartó la capa de VLDL. Subsecuentemente la densidad se ajustó a 1.053 g/mL y se centrifugó a 377,000 *g* por 220 min, posteriormente se recuperó la fracción superior que contendría LDL. La preparación de LDL se recuperó y se sometió a diálisis con PBS 1X,

se depuró con filtros de 0.45 μm y se guardó a 4 °C con nitrógeno atmosférico para reducir el proceso de oxidación en la muestra. Se cuantificó la concentración de LDL mediante el método de ácido bicinconínico (BCA).

7.5. Ensayo de cierre de herida

Se realizaron ensayos de cierre de herida de acuerdo con el protocolo descrito previamente por *Galindo-Hernandez O et al.* (Galindo-Hernandez et al., 2014, 2015). La línea celular PC3 es insensible al tratamiento con andrógenos, con lo que se pretende evaluar si esta condición modula los efectos biológicos mediados por LDLs. Para ello, cultivos confluentes de células tumorales prostáticas PC3 se ayunaron en medio DMEM sin suero durante 18 horas y pre-tratados durante 2 horas con mitomicina C 12 μM para inhibir la proliferación celular durante el experimento.

Posteriormente, a los cultivos se les realizó una rayadura o herida en la monocapa de células con una punta de una pipeta de 200 μL . A continuación, las células fueron estimuladas a concentraciones de 10 y 30 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 horas. Posterior al estímulo con LDLs, las células fueron fijadas con metanol y teñidas con Azul de Coomassie Brillante G-250. La migración resultante dentro de la herida se fotografió utilizando un microscopio invertido VWR VistaVision acoplado a cámara. Un resultado positivo se presenta cuando las células tumorales migran hacia el espacio generado en la rayadura.

7.6. Ensayo en cámara de Boyden

Para confirmar el papel de las LDLs en invasión celular, se exploró la capacidad de esta lipoproteína como inductora de invasión celular mediante ensayos en cámara de Boyden acorde a su descripción en la literatura. Los ensayos de invasión se realizaron en cámaras de Boyden con filtros que presentan un tamaño de poro de 8 μm y las membranas fueron recubiertas con matrigel. Las células de la línea PC3 se sometieron a supresión sin suero durante 18 horas. Se colocaron 100,000 células en la parte superior de la cámara de Boyden, mientras que en la parte inferior de la misma se colocaron 600 μL de medio con la concentración de LDLs de 30 $\mu\text{g/mL}$. Las células se

incubaron durante 24 horas a 37 °C, transcurrido el tiempo de incubación se fijaron en metanol frío y fueron removidas de la parte superior las células que no invadieron. Una vez realizado este procedimiento, las células presentes en la parte inferior fueron fijadas con metanol y teñidas con Azul de Coomassie Brillante G-250, posteriormente lavadas.

Para la evaluación de migración celular en cámaras Boyden se utilizó el mismo procedimiento con la única diferencia de omitir la utilización de matrigel.

7.7. Inmunodetección

Cultivos confluentes de células tumorales prostáticas PC3 fueron tratadas con LDLs a concentraciones de 30 µg/mL durante 12 y 24 horas. Al finalizar el tratamiento, los lisados celulares se obtuvieron con RIPA 1X y se cuantificaron con el método de micro-bradford. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 10% y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche sin grasa al 5% durante 1 hora, para después colocar el anticuerpo correspondiente, dejando en incubación durante toda la noche a 4 °C.

Una vez transcurrido el tiempo las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween al 0.05% y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario especie-específico peroxidado durante 2 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados durante 10 minutos con PBS-Tween al 0.05%. Se revelaron los resultados mediante quimioluminiscencia (ECL) y mediante el sistema ChemiDoc™. Las bandas fueron cuantificadas usando el programa ImageJ 1.44p mediante densitometría.

7.8. Zimografía

Para determinar la secreción de MMP-2 y MMP-9, se realizó el ensayo de zimografía. Cultivos confluentes de las líneas celulares tumorales prostáticas se estimularon con LDLs 30 µg/mL durante 12 y 24 horas, momento en que los medios condicionados se colectaron. A continuación, volúmenes iguales de medio condicionado se cargaron en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina a 1 mg/mL. Posteriormente, los

geles se lavaron e incubaron en el buffer de activación de MMPs. Finalmente, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie Brillante G-250. La actividad proteolítica se detectó como bandas claras sobre fondo teñido de sustrato no degradado, dichas bandas fueron cuantificadas usando el programa ImageJ 1.44p mediante densitometría.

7.9. Análisis de la base de datos GEPIA.

Mediante el uso del servidor GEPA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis), se realizó un análisis de la expresión de ARN de proteínas de interés. GEPIA es una base de datos obtenida mediante el recopilado de información de los proyectos de TCGA (The Cancer Genome Atlas) y GTEx (Genotype-Tissue-Expression) que otorgan datos de 9,736 tumores y 8,587 tejidos sanos (*GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis)*, s. f.). Dicha plataforma se utilizó para estudiar la expresión de las proteínas SREBP2, LDLR, PCSK9 y las isoformas de AKT.

7.10. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio de $\pm$ D.E. Los datos se analizaron estadísticamente mediante la herramienta GraphPad Prism 8 (versión 8.0.2), usando la prueba ANOVA de una vía comparada mediante la prueba múltiple de Dunette. La probabilidad estadística $P < 0.05$ se consideró significativa.

7.11. Análisis bioéticos

El presente estudio utilizó la línea celular tumoral prostática humana PC3 como modelo de estudio, la cual fue estimulada con LDLs obtenidas de un donador sano en la Facultad de Medicina Mexicali, UABC, México. Acorde a la Declaración de Helsinki, se obtuvo el consentimiento informado del donador previo a la obtención de las LDLs.

El presente estudio se desarrolló en apego a la legislación aplicable en materia de protección al ambiente como la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo; así como las disposiciones legales de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, la Norma Oficial Mexicana NOM-

012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. Con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, se obtuvo el consentimiento bajo información por escrito de los participantes. Para tal efecto, el documento mencionado se firmó por los participantes y por alguno de los investigadores asociados.

7.12. Bioseguridad

Se trabajó con base en lo estipulado en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, para la adecuada clasificación y desecho de residuos biológicos con los que se estuvo trabajando durante el estudio, los cuales se dispusieron en bolsas de polietileno color amarillo según lo señalado en la norma previamente mencionada.

8. Resultados

8.1. Estandarización del aislamiento de LDL

Las LDLs son lipoproteínas que se encargan de transportar colesterol en la circulación sanguínea, juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y se han asociado al desarrollo y progresión de algunas neoplasias. En nuestro laboratorio se ha utilizado un protocolo de aislamiento de LDLs a través de centrifugación mediante gradientes de densidad. Este método permite aislar selectivamente la fracción de LDLs en plasma total.

Dicho procedimiento se realizó mediante la obtención de sangre total, la cual se centrifugó para obtener plasma sin componente eritrocitario. Se añadió solución de densidad al 1.019 g/mL al plasma obtenido y se centrifugó en la ultracentrífuga a 345,000 g por 160 min a 4 °C. Se descartó fracción de VLDL, se añadió solución de densidad al 1.053 g/mL a la fracción obtenida y se centrifugó a 377,000 g por 220 min a 4°C. Se obtuvo la fracción de LDL, la cual fue dializada toda la noche y filtrada posteriormente. Se realizó cuantificación proteica mediante método de ácido bicinonínico.

8.2. La migración inducida por LDLs en células PC3 es inhibida por el triazaspirano.

Existen diversos mecanismos que permiten a las células de CP progresar a lo largo de su historia natural de la enfermedad, como es la TEM. Es un mecanismo mediante el cual la célula disminuye la expresión de E-cadherina y aumenta la expresión de N-cadherina, adquiriendo de esta manera un fenotipo mesenquimal en vez de epitelial, con ello adquiriendo la capacidad de migración e invasión. La migración es el movimiento de las células de un área a otra, es decir el desplazamiento de las células desde su sitio primario (Dillekås et al., 2019).

Con base a esto, se decidió evaluar si las LDLs promueven la migración de las células PC3, así como evaluar la capacidad del triazaspirano para disminuir dicho proceso.

Cultivos de células PC3 ayunadas 18 h y tratadas con mitomicina C 2 h previo al experimento, se estimularon con LDL 10 µg/mL, LDL 30 µg/mL, LDL 10 µg/mL con triazaspirano 10 µM y LDL 30 µg/mL con triazaspirano 10 µM durante 24 horas. La concentración de colesterol entre 1-50 µg/mL es la que se encuentra en el medio suplementado con SFB al 10%, dicho rango permite el adecuado funcionamiento del receptor de LDL sin que se sature (Murtola et al., 2012).

La proliferación celular se puede obtener a partir de la concentración de LDL de 10 µg/mL por lo que se optó por utilizar dicha concentración como mínima y 30 µg/mL como máxima, puesto que al comparar el efecto del colesterol entre 30 y 40 µg/mL, no hubo diferencia significativa, se decidió utilizar la concentración más baja (54). La migración celular fue determinada mediante ensayo de cierre de herida, en el cual se realiza una rayadura con una punta de plástico para pipeta de 200 µL para generar un área sobre el cual visualizar el movimiento de las células. Como se observa en la fig. 3 los resultados demuestran que las LDLs promueven la migración de las células PC3, con un máximo de migración a 30 µg/mL. Al co-tratar a las células con el triazaspirano, disminuye la migración de las células PC3, efecto más notorio a mayores concentraciones de las lipoproteínas.

De igual forma, se decidió seguir evaluando el efecto de las LDL y el triazaspirano sobre la migración celular utilizando una metodología alternativa, las cámaras Boyden. Cultivos

de células PC3 fueron colocadas en la parte superior de cámaras Boyden, con los estímulos de LDL 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y LDL 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con triazaspirano 10 μM en la cámara inferior durante 24 horas. En la fig. 4 se muestran los resultados donde las LDLs promueven la migración de las células PC3 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LDL. Al añadir el triazaspirano, disminuye la migración de las células PC3.

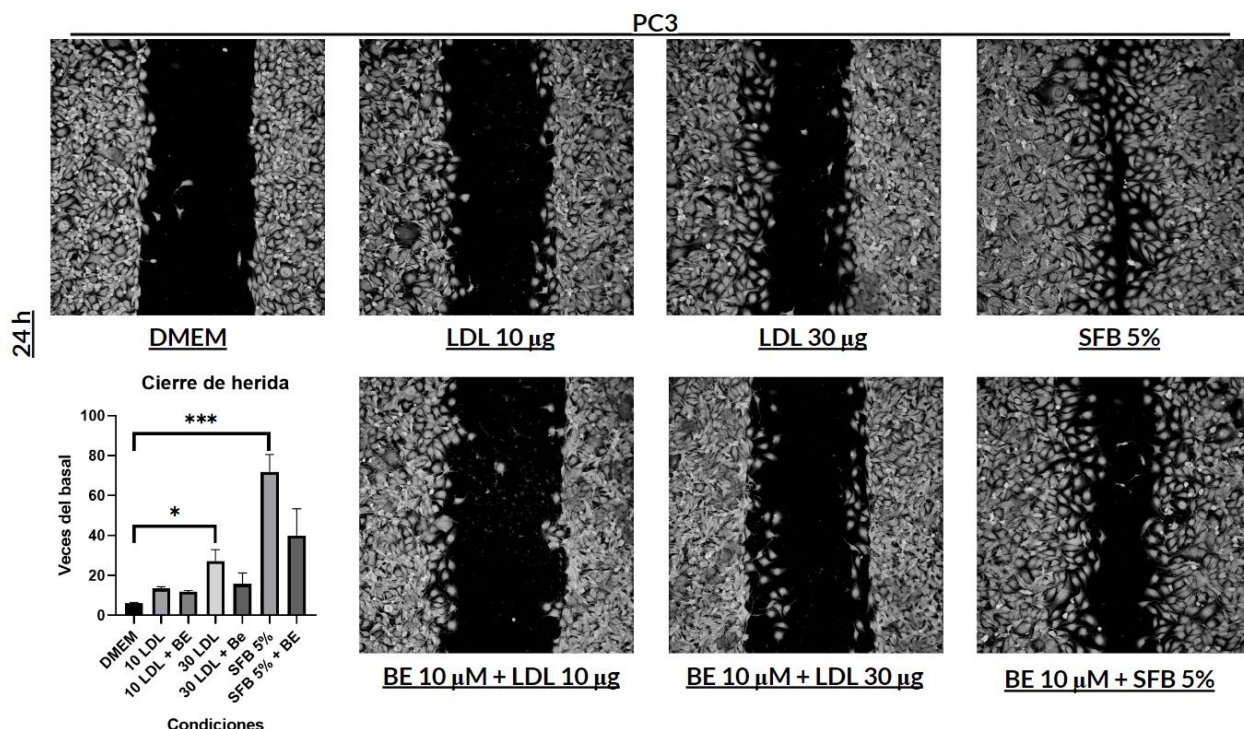


Figura 3. Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la migración de células PC3. Las células PC3 fueron cultivadas en cajas de 35 mm, ayunadas 18 horas, pretratadas con 12 μM de mitomicina C 2 horas. Posteriormente se realizó rayadura con puntas de plástico para pipeta de 200 μl y fueron estimulados durante 24 horas con los tratamientos indicados. Las células fueron fijadas y teñidas, para después obtener las fotografías 24 horas tras el estímulo. La gráfica representa la media $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes y es expresada como las veces de migración respecto al control negativo (células PC3 estimuladas con DMEM). Los asteriscos indican significancia estadística; * $p < 0.05$. BE: triazaspirano; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; LDL: lipoproteína de baja densidad; SFB: Suero Fetal Bovino.

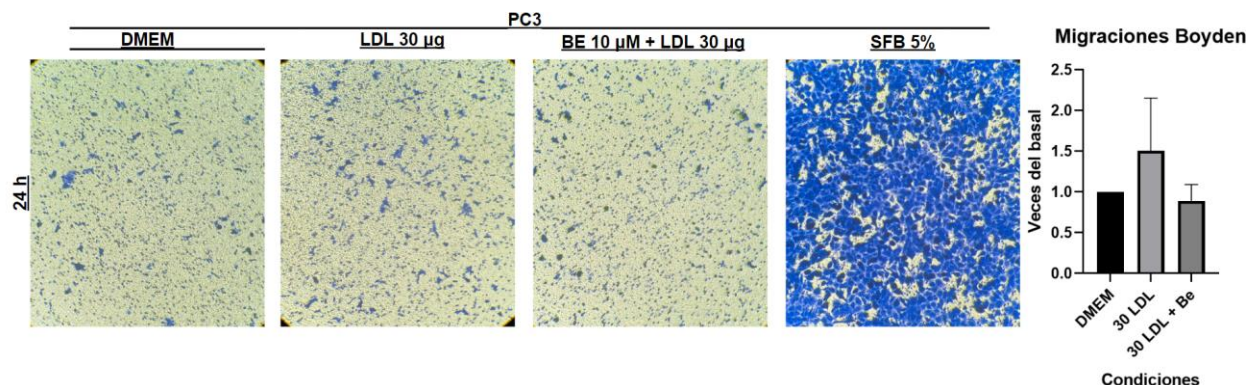


Figura 4. Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la migración de células PC3 en cámaras Boyden. Las células PC3 fueron cultivadas hasta llegar a confluencia, ayunadas 18 horas, pre-tratadas con mitomicina C 2 horas. Células PC3 (1×10^5) fueron colocadas en cámaras Boyden en la parte superior, los estímulos LDL 30 μ g/mL y LDL 30 μ g/mL con triazaspirano 10 μ M se añadieron en la cámara inferior. La migración celular fue evaluada 24 horas tras el estímulo. La gráfica representa la media $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes y es expresada como las veces de migración respecto al control negativo (células PC3 estimuladas con DMEM). BE: triazaspirano; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; LDL: lipoproteína de baja densidad; SFB: Suero Fetal Bovino.

8.3. La invasión inducida por LDLs en células PC3 es inhibida por el triazaspirano.

En el proceso de TEM, las células adquieren la capacidad de invasión, con esto pueden moverse a través de los tejidos y de la membrana basal. Este mecanismo permite que las células neoplásicas puedan invadir hacia vasos sanguíneos y adherirse en sitios distantes para alojarse y formar un foco secundario tumoral. A su vez, la secreción de MMPs, enzimas con la capacidad de degradar matriz extracelular y remodelar tejidos, permite a las células neoplásicas invadir zonas circundantes (Martin et al., 2013).

El ensayo de invasión con cámaras Boyden simula este proceso mediante el uso de matrigel como si fuese la membrana basal, por lo que la degradación y movimiento de

las células a través del matrigel permitirá analizar la capacidad de las células PC3 de invadir al ser estimuladas con condiciones específicas.

Con base a esto, se determinó si las LDLs promueven la invasión de las células PC3, así como si el triazaspirano disminuye dicho proceso. Cultivos de células PC3 se estimularon con LDL 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y LDL 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con triazaspirano 10 μM durante 24 horas. En la fig. 5 se muestran los resultados demuestran que las LDLs promueven la invasión de las células PC3 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al añadir el triazaspirano, disminuye la invasión de las células PC3.

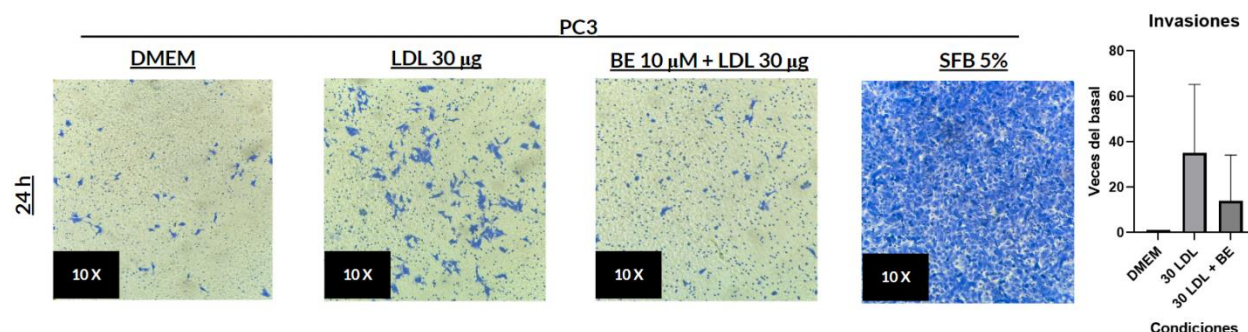


Figura 5. Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la invasión de células PC3.

Células PC3 fueron cultivadas hasta llegar a confluencia, ayunadas 18 horas y pre-tratadas con mitomicina C 2 horas. Las células (1×10^5) fueron colocadas en cámaras Boyden recubiertas de matrigel gelificado en la parte superior, los estímulos LDL 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y LDL 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con triazaspirano 10 μM se añadieron en la cámara inferior. La invasión celular fue evaluada 24 horas tras el estímulo. La gráfica representa la media $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes y es expresada como las veces de migración respecto al control negativo (células PC3 estimuladas con DMEM). BE: triazaspirano; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; LDL: lipoproteína de baja densidad; SFB: Suero Fetal Bovino.

8.4. La secreción de MMPs inducida por LDLs en células PC3 es inhibida por el triazaspirano.

Dentro del microambiente tumoral, las MMPs juegan un rol importante al contribuir tanto al crecimiento del tumor, como al proceso de metástasis. Está descrito que estas

enzimas favorecen el crecimiento tumoral al degradar la matriz circundante y ampliar el espacio que puede ser usado potencialmente para que el tumor crezca. A su vez, participan en el proceso de metástasis al remodelar la membrana basal y matriz extracelular que funciona como una barrera física que impide que las células puedan moverse; las MMPs al realizar esto, favorecen que las células tumorales migren e invadan tejidos circundantes y lejanos (Itoh & Nagase, 2002; Reunanen & Kähäri, 2013).

El zimograma es un estudio que permite evaluar la secreción de MMPs, mediante electroforesis. El ensayo zimograma permite evaluar la actividad proteolítica, efecto que puede ser correlacionado con los ensayos de invasión con cámaras Boyden, con ello se evalúa la capacidad de las células PC3 de degradar e invadir el matrigel. En el ensayo realizado en el presente trabajo, se evaluó la secreción de las MMPs 2 y 9 según los diversos estímulos evaluados

Con base a esto, decidimos evaluar si las LDLs promueven la secreción de MMPs por parte de las células PC3, así como si el triazaspirano disminuye dicho proceso. Cultivos de células PC3 se estimularon con LDL 30 µg/mL y LDL 30 µg/mL con triazaspirano 10 µM durante 12 y 24 horas, se recolectó el medio tras dicho tiempo y se realizó el zimograma con el medio recolectado. En la fig. 6 los resultados demuestran que las LDLs promueven la secreción de MMP-9 por parte de las células PC3 a 30 µg/mL, efecto que al añadir el triazaspirano no fluctúa. Dichos efectos son apreciados en mayor medida a las 24 horas. En cuanto a la MMP-2, no se mostró efecto modulador por parte de las LDL o el triazaspirano.

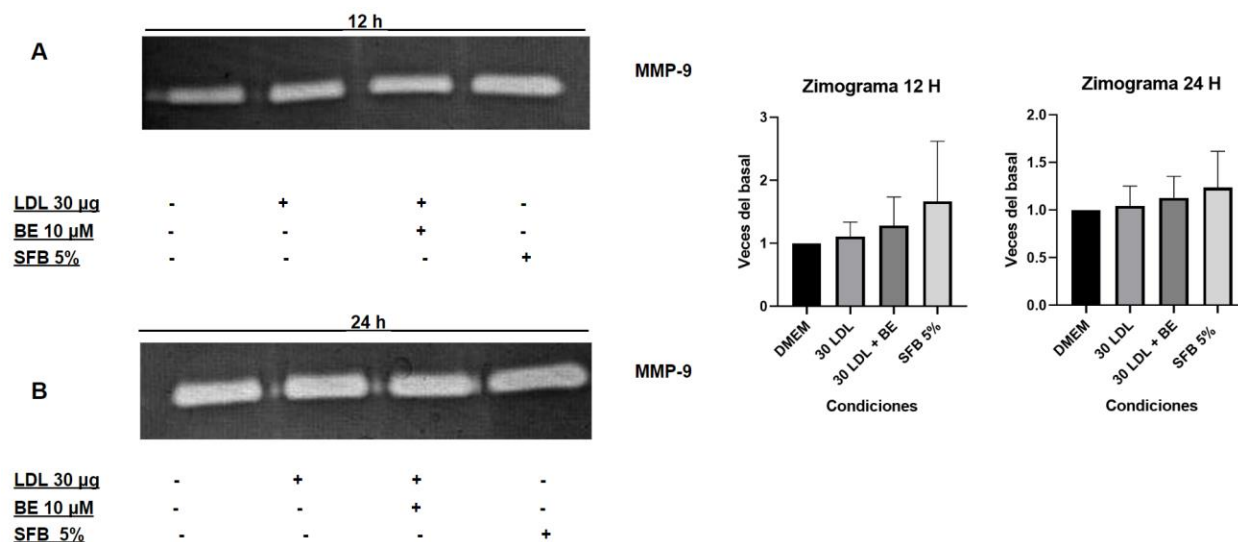


Figura 6. Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la secreción de MMPs en células PC3. Zimograma de medio recolectado de células PC3 estimuladas durante 12 (A) y 24 (B) horas con LDL 30 μ g/mL y LDL 30 μ g/mL con triazaspirano 10 μ M. El gel obtenido mediante electroforesis fue teñido y posteriormente fotografiado. La gráfica representa la media $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes y es expresada como las veces de migración respecto al control negativo (células PC3 estimuladas con DMEM). BE: triazaspirano; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; LDL: lipoproteína de baja densidad; MMP: metaloproteinasa de matriz; SFB: Suero Fetal Bovino.

8.5. La expresión proteica de LDLR, PCSK9 y SREBP2 es inducida por LDLs en células PC3 e inhibida por el triazaspirano.

Diversos estudios han esclarecido que el metabolismo de lípidos en células de cáncer se encuentra alterado. Particularmente en cáncer de próstata se ha establecido que a lo largo de la progresión y desarrollo de la enfermedad ocurre una desregulación en las vías metabólicas involucradas en el metabolismo de lípidos, lo cual se asocia a un fenotipo maligno y agresivo por parte de dichas células. Para el estudio de las modificaciones en dichas vías, se utiliza la técnica de western blot que permite el análisis de la expresión de proteínas involucradas en vías de interés (Siltari et al., 2022).

Es por ello que se decidió evaluar la modulación de la expresión proteica del LDLR, PCSK9 y SREBP2 por parte de las LDLs y el triazaspirano. Cultivos de células PC3 se

estimularon con LDL 30 $\mu\text{g/mL}$ y LDL 30 $\mu\text{g/mL}$ más triazaspirano 10 μM durante 12 y 24 horas, se obtuvieron lisados celulares, se realizó su cuantificación proteica y fueron procesados mediante inmunodetección. En la fig. 7 los resultados demuestran que las LDLs a 30 $\mu\text{g/mL}$ disminuyen la expresión de LDLR y PCSK9 en las células PC3, efecto que es potenciado cuando se añade el triazaspirano y es más evidente a las 24 h. En cuanto a nSREBP2, tanto el estímulo con LDL y triazaspirano aumentan la expresión de SREBP2 escindido a las 12 h, sin embargo, a las 24 h se ve un descenso de su expresión, el cual es más evidente con el triazaspirano.

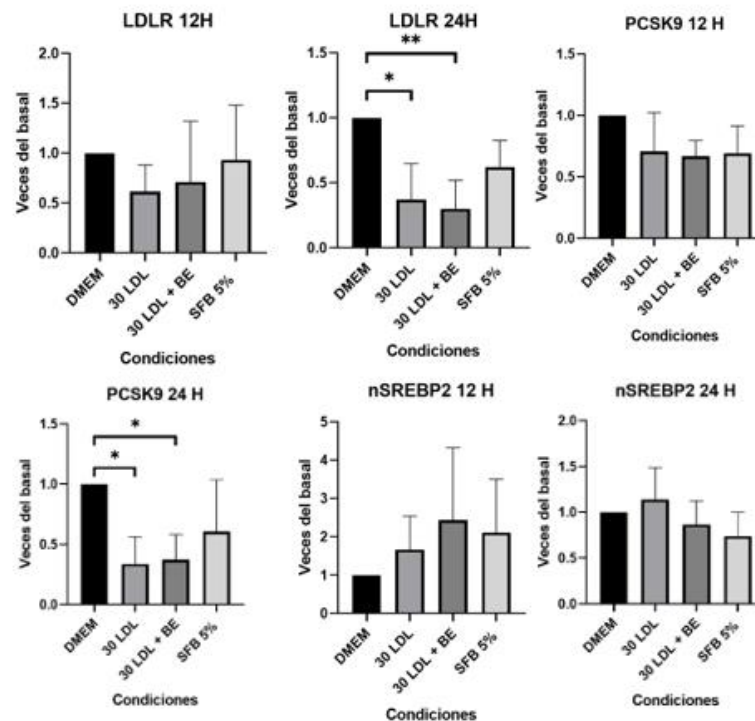
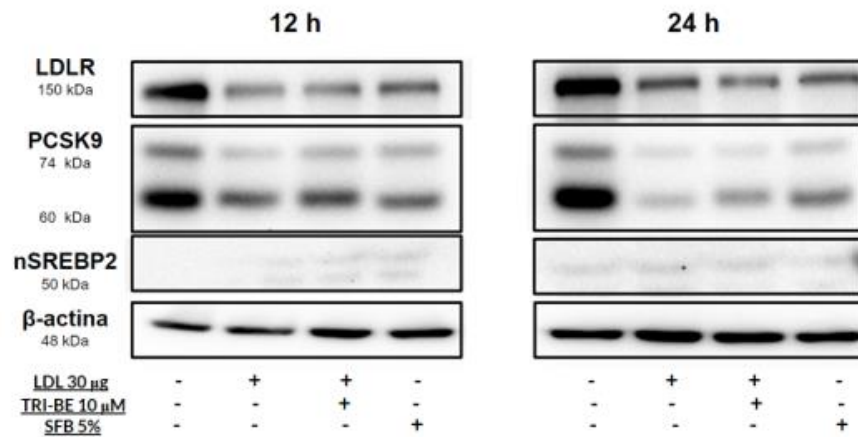


Figura 7. Efecto de las LDLs y triazaspirano sobre la expresión proteica de LDLR, PCSK9 y nSREBP2 en células PC3. Inmunodetección de lisados de células PC3 estimuladas durante 12 y 24 horas con LDL 30 µg/mL y LDL 30 µg/mL con triazaspirano 10 µM. El gel obtenido fue transferido a una membrana, incubado con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios, y revelado mediante un fotodocumentador. La gráfica representa la media $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes y es expresada como las veces de migración respecto al control negativo (células PC3 estimuladas con DMEM). Los asteriscos indican significancia estadística; * $p < 0.05$. BE: triazaspirano; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; LDL: lipoproteína de baja densidad; SFB: Suero Fetal Bovino.

8.6. Análisis de la base de datos GEPIA.

Ante los datos obtenidos de los experimentos previos, se optó por investigar la expresión reportada de las proteínas de interés en el modelo de cáncer de próstata mediante GEPIA, servidor que ayuda a investigar la expresión de ARN de proteínas implicadas en el proyecto de investigación (*GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis)*, s. f.).

Con base a esto, se obtuvo la expresión génica de las proteínas de interés, LDLR, PCSK9 y SREBP2 las cuales se muestran en la fig. 8, y la expresión génica de AKT en la fig. 9. SREBP2 y AKT1 presentan una mayor expresión en tejido de cáncer de próstata en comparación a tejido sin malignidad. En cuando a la supervivencia global, el tener una mayor expresión de LDLR y PCSK9 se asocia a una menor sobrevida.

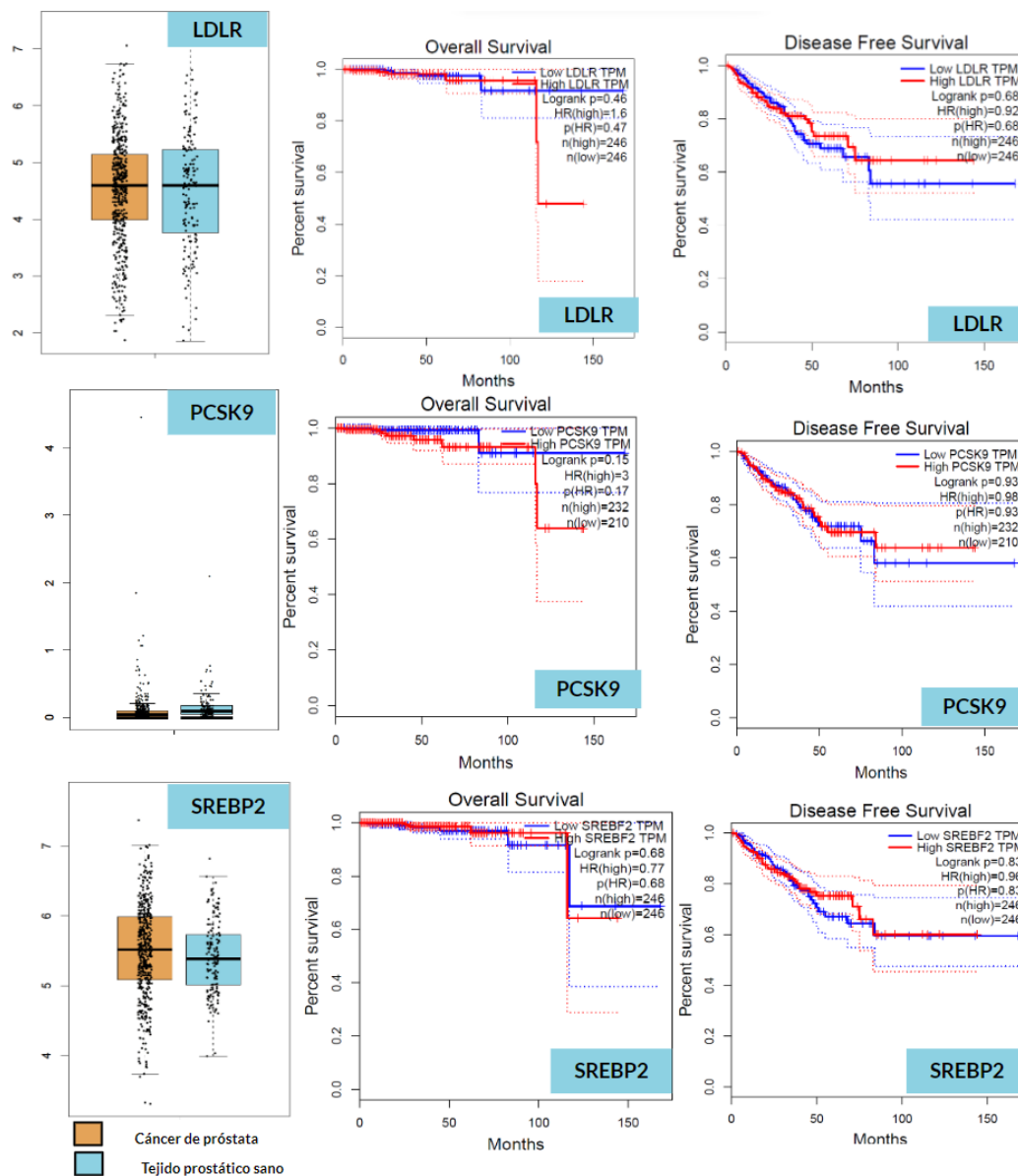


Figura 8. Información de expresión de ARN de los subtipos de LDLR, PCSK9 y SREBP2 en cáncer de próstata y tejido prostático sano obtenida de GEPIA. Se obtuvo de la base de datos la expresión de ARN de LDLR, PCSK9 y SREBP2 de tejido de cáncer de próstata y tejido prostático sano, además de la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad con base en la expresión alta o baja del ARN de LDLR, PCSK9 y SREBP2.

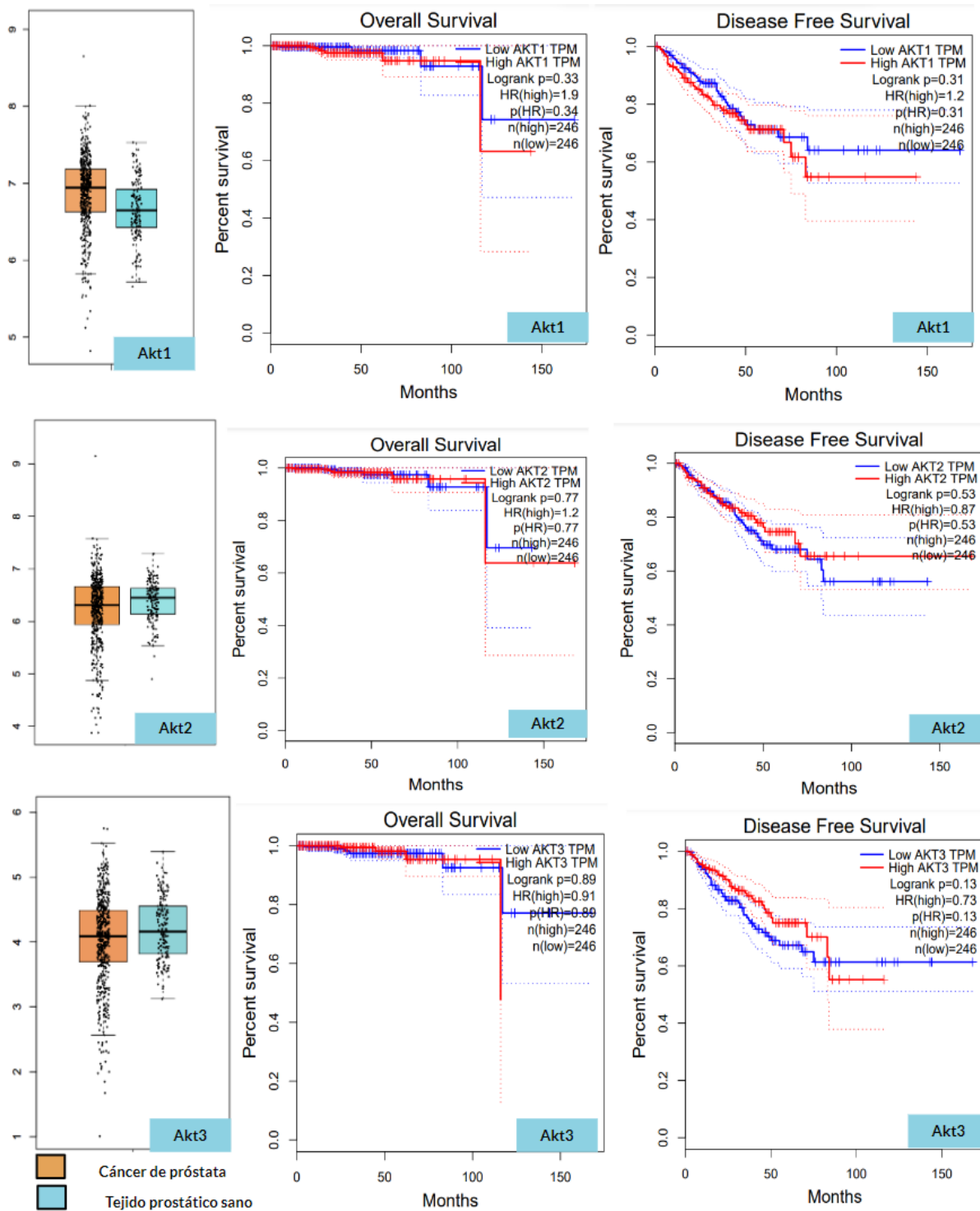


Figura 9. Información de expresión de ARN de los subtipos de AKT en cáncer de próstata y tejido prostático sano obtenida de GEPIA. Se obtuvo de la base de datos la expresión de ARN de AKT de tejido de cáncer de próstata y tejido prostático sano,

además de la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad con base en la expresión alta o baja del ARN de AKT.

9. Discusión

El colesterol es un componente esencial de las membranas plasmáticas de las células, constituye un tercio de los lípidos de la membrana, por lo tanto es un elemento requerido para el crecimiento celular, especialmente en células de cáncer, las cuales se benefician de este lípido al concentrarlo en sitios específicos de la membrana para acrecentar las vías de señalización celular y favorecer procesos como el de migración celular (Riscal et al., 2019).

En células de cáncer de próstata, los mecanismos reguladores de las vías involucradas en el metabolismo de lípidos se encuentran alteradas, lo cual puede explicar la mayor agresividad y peor pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata al presentar hipercolesterolemia asociada. Dicha enfermedad representa una problemática para la población mexicana, tanto por su alta incidencia como su alta mortalidad, al ser la enfermedad neoplásica en primer lugar en ambas categorías para los hombres mexicanos, quienes en caso de tener asociado un factor pronóstico negativo, como es la dislipidemia, la probabilidad de supervivencia disminuye (Shafique et al., 2012). Es en estos pacientes resulta importante otorgar un nuevo abanico de posibilidades para su manejo terapéutico, para conferir un estado libre de enfermedad y mejorar su pronóstico.

En este estudio, se caracterizó el efecto de las LDL y triazaspirano sobre la línea celular tumoral de cáncer de próstata PC3 que proviene de metástasis de un adenocarcinoma prostático. Las LDL promueven procesos de migración e invasión, mientras que el triazaspirano disminuye dichos fenómenos, efecto que parece ser independiente de la secreción de MMPs, cuya secreción fue estimulada por las LDL pero el triazaspirano no tuvo efecto modulador sobre ello.

En cuanto al metabolismo de lípidos, las LDL demostraron reducir la expresión del LDLR y PCSK9, efecto más notorio al añadir el triazaspirano, por lo que posiblemente el

receptor se sature a las concentraciones de LDLs utilizadas, pese a que el LDLR se ha reportado que suele saturarse hasta concentraciones desde 40 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, esta cifra varía según el tipo celular y la densidad de las LDL (Galeano et al., 1998; Stephan & Yurachek, 1993). En cuanto a SREBP2, el estímulo de las LDL favorecía la expresión de dicha proteína, mientras que el azaspirano la redujo a las 24 horas de estímulo.

Alteraciones en los niveles de colesterol sérico modulan el comportamiento fenotípico de algunas neoplasias. La hiperlipidemia a expensas de colesterol se ha asociado a aumentar el riesgo de desarrollar cáncer, así como de tener una enfermedad neoplásica más agresiva. Las LDL cumplen su papel en esto mencionado al estar involucradas en procesos de metástasis (Wan et al., 2015). El colesterol como se ha mencionado, es un componente esencial de la membrana celular, en ella tiene la capacidad de formar balsas lipídicas o microdominios en la membrana, lo cual permite reclutar diversas proteínas y transportadores que potencian la eficacia de las vías de señalización (Vona et al., 2021).

Dentro de las proteínas que pueden ser reclutadas están las integrinas, las cuales se concentran en estos microdominios, generan adhesiones focales, que en conjunto a otras proteínas, forma el llamado frente de migración, lo que permite a la célula llevar a cabo su desplazamiento de un sitio a otro, dichas interacciones son dinámicas y se van modificando conforme la célula migra (Hoque et al., 2015). Esto a su vez es gracias a la desregulación de factores de transcripción como Snail y Twist, encargados de la expresión de proteínas de adhesión, específicamente al estimular con colesterol se ha observado que hay aumento de la N-cadherina, así como de secreción de MMPs que en conjunto a la falta de unión célula-célula, confieren a estas células la capacidad de remodelar su microambiente y desplazarse desde su sitio primario a tejidos u órganos distantes (Jung et al., 2021).

Diversos factores de transcripción involucrados en este proceso de TEM son regulados por las vías de señalización de PI3K/AKT y Erk 1/2, las cuales son conocidas por favorecer la proliferación, migración e invasión de las células tumorales (Deng et al., 2022). La vía de AKT además de modular la TEM, juegan un papel importante en el

metabolismo celular, particularmente en el metabolismo de lípidos al aumentar la expresión de SREBP2, un factor de transcripción esencial en la regulación de los niveles de colesterol, esto mediante la síntesis de LDLR, HMG-CoAR y PCSK9, los cuales en condiciones libres de cáncer, aumenta su expresión cuando disminuye la concentración intracelular de colesterol. Por el contrario, cuando se detectan niveles elevados de colesterol dentro de la célula, disminuye la señalización por parte de SREBP2 y la consecuente disminución de la expresión de las proteínas blanco moduladas por esta. En células neoplásicas dicho mecanismo se encuentra alterado, debido a la desregulación en la expresión de proteínas involucradas (Rodrigues Dos Santos et al., 2014).

Se ha observado que la actividad y función de PCSK9 es regulado por SREBP2. Este último, una vez activo, favorece la actividad de PCSK9, cuyos niveles disminuyen en condiciones de inanición y aumentan con la alimentación. favoreciendo así en condiciones de depleción de colesterol, que LDLR no sea degradado y la célula pueda seguir captando LDL. Por otro lado, existe otro regulador de PCSK9, HNF1- α (Hepatocyte Nuclear Factor-1 α), un factor de transcripción que en conjunto con SREBP2 mantienen los niveles de PCSK9 en la célula. A diferencia de SREBP2, HNF1- α no regula al LDLR, así que ante niveles bajos de HNF1F- α , existe disminución de la expresión de PCSK9 sin afectar los niveles de LDLR (Burke et al., 2017). En los resultados obtenidos en esta investigación, se observó disminución en la expresión proteica tanto de LDLR, como de PCSK9, por lo que se presume que el principal mecanismo de regulación lo genere SREBP2, encargado de modular ambas proteínas, sin embargo, no se descarta que las LDL o el triazaspirano estén actuando sobre HNF1- α .

En diversos estudios se ha reportado que en células de metástasis de cáncer de próstata hay aumento de la expresión de LDLR, SREBP2 y PCSK9 (Poulose et al., 2018; Xia et al., 2021), al corroborar con los datos obtenidos de GEPIA, la única proteína reportada aumentada con base a dicha información es SREBP2, se atribuye esta discrepancia entre los datos, al hecho de que la base de datos GEPIA integra información sobre biopsias obtenidas de cáncer de próstata, pero no permite clasificar esos datos acorde a

los estadios de la enfermedad. Es importante mencionar que sí existe esta herramienta para otros tipos de cáncer pero no se encuentra habilitada para cáncer de próstata, por lo que se desconoce si los datos aportados por GEPIA son en su mayoría en estados clínicos tempranos o tardíos. Esto permite explicar la variabilidad entre la información reportada por otros investigadores y la reportada en dicha base, además de que en ella trabajamos con la expresión génica de ARN, que aunque nos brinde información útil, no podemos determinar si dicha expresión correlacione con la síntesis y activación de la proteína (Chen & Hughes-Fulford, 2001; Murtola et al., 2012).

En el caso de los datos obtenidos en nuestros experimentos las LDL parecen disminuir la expresión de LDLR, pero incrementan la expresión de SREBP2, por lo que se presume que con la extensión del tiempo de estímulo, podríamos visualizar el efecto de SREBP2 sobre la expresión de LDLR y observar efectos similares a los reportados por otros estudios donde los tratamientos con colesterol favorecen la expresión las proteínas. Por otro lado, existe la posibilidad de que el LDLR sea regulado mediante otros mecanismos distintos a la vía de SREBP2, a través de IDOL (Inducible degrader of LDLR) o EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Salerno et al., 2020; Scully et al., 2021). En cuanto a PCSK9, se mostró una disminución en los niveles de expresión proteica al estimularse tanto con LDL como con triazaspirano, siendo que en condiciones basales se ha reportado que en cáncer de próstata hay niveles elevados de dicha proteína en líneas celulares de CP como PC3 y LnCap, lo cual se observó en la condición sin tratamiento (Gan et al., 2017).

Enfocándonos en los efectos por parte del triazaspirano, cabe destacar algunos datos reportados sobre otras moléculas de la familia. Los azaspiranos han demostrado tener capacidad para modular procesos de migración e invasión en células tumorales, esto atribuido a la modulación de vías como la de AKT y Erk 1/2, con la consecuente disminución de moléculas de adhesión de fenotipo mesenquimal como N-cadherina, y aumentar la expresión de E-cadherina y ocludina, que confieren a las células un fenotipo epitelial, favoreciendo que las células permanezcan adheridas y conserven su relación célula-célula (Sulaiman et al., 2016). Además de estas vías, a su vez poseen la

capacidad de regular STAT3, vía igualmente asociada a procesos de migración e invasión, particularmente la secreción de MMPs, por lo que estas moléculas poseen la capacidad de regular estos mecanismos mediante el bloqueo de dichas vías y disminución de la migración e invasión celular (Sulaiman et al., 2016).

Aunque no existe evidencia de la modulación de la vía de lípidos por parte de los azaspiranos, el efecto que estos ejercen sobre Erk 1/2 que sí está dilucidado, nos puede aportar información respecto el mecanismo por el cual el triazaspirano tiene actividad sobre el metabolismo de lípidos (Hamasaki et al., 2005). Erk es una proteína involucrada en la activación de SREBP2, factor de transcripción que confiere a la célula la regulación de otras proteínas con la finalidad de mantener niveles elevados de colesterol en las células neoplásicas (Xue et al., 2020). En nuestros experimentos se determinó que con estímulos de 24 h SREBP2 disminuye con el estímulo del triazaspirano, con lo cual se presume que mantendría a la célula con niveles intracelulares de colesterol bajos, con la consecuente afectación de su capacidad de proliferar, migrar e invadir.

El impacto de la regulación de los niveles de colesterol intracelular en el pronóstico de personas con CP cobra gran interés al representar una variable importante a considerar en el manejo de dichos sujetos, esto debido a que como se ha mencionado, el colesterol tiene un papel importante en las células de CP, al ser precursor de andrógenos y estos mismos al son reguladores de la proliferación de este cáncer (Tousignant et al., 2019).

El aumento en la disponibilidad de colesterol para dichas células se asocia a la progresión de la enfermedad, así como a un comportamiento más agresivo por parte las células, en donde personas que padecen CP e hipercolesterolemia, se ha asociado a una mayor probabilidad de presentar metástasis (Pelton et al., 2012). Se han propuesto diversas medidas para disminuir dicho factor de riesgo modificable, como es implementar dietas estrictas bajas en grasa, medicamentos hipolipemiantes, los cuales siguen en estudio para verificar el impacto en personas con CP, ya sea en prevenir la enfermedad o evitar su progresión. Una medida terapéutica ideal sería aquella que no solo contribuya a regular la vía del metabolismo de lípidos o los niveles de colesterol en las células de

CP, sino que también tenga la capacidad de actuar en otras vías de señalización celular implicadas directamente en la progresión del cáncer (Pelton et al., 2012), potencial que han demostrado los azaspiranos.

El efecto del triazaspirano en cuestión podría ser dependiente de la concentración y el tiempo de estimulación, pudiendo regular diversas vías acorde al aumento o disminución de dichas variables. Los efectos visualizados en los experimentos se atribuyen a la posible modulación de AKT por parte del triazaspirano, esto sustentado en los antecedentes de otros azaspiranos sobre dicha proteína (Hamasaki et al., 2005), con lo cual podríamos explicar la disminución de migración e invasión por parte del triazaspirano, así como la modulación de las proteínas estudiadas.

10. Conclusiones

El triazaspirano a una concentración de 10 μ M demostró un efecto inhibitorio sobre la migración e invasión de células de cáncer de próstata PC3 estimuladas con LDLs, así como disminución de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos tales como LDLR, PCSK9 y SREBP2, por el contrario, no se demostraron cambios significativos en los niveles de MMPs. La regulación del factor de transcripción SREBP2, presumiblemente causaría una disminución en los mecanismos de obtención de colesterol por parte de la célula, generando el descenso en los efectos favorecidos inicialmente por las LDLs.

11. Bibliografía

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Integrins.

Molecular Biology of the Cell. 4th Edition.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26867/>

Berberich, A. J., & Hegele, R. A. (2022). A Modern Approach to Dyslipidemia.

Endocrine Reviews, 43(4), 611-653. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab037>

Burke, A. C., Dron, J. S., Hegele, R. A., & Huff, M. W. (2017). PCSK9: Regulation and Target for Drug Development for Dyslipidemia. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57(1), 223-244. [https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104944)

010716-104944

Butler, L. M., Perone, Y., Dehairs, J., Lupien, L. E., de Laat, V., Talebi, A., Loda, M.,

Kinlaw, W. B., & Swinnen, J. V. (2020). Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 245-293. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.013>

Reviews, 159, 245-293. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.013>

Byar, D. P. (1972). Treatment of prostatic cancer: Studies by the Veterans

Administration cooperative urological research group. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 48(5), 751-766.

Campos-Nonato, I., Galván-Valencia, Ó., Hernández-Barrera, L., Oviedo-Solís, C., &

Barquera, S. (2023). Prevalencia de obesidad y factores de riesgo asociados en adultos mexicanos: Resultados de la Ensanut 2022. *Salud Pública de México*,

65, s238-s247. <https://doi.org/10.21149/14809>

Cancer today. (s. f.). Recuperado 11 de octubre de 2022, de

<http://gco.iarc.fr/today/home>

Chen, Y., & Hughes-Fulford, M. (2001). Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2.

International Journal of Cancer, 91(1), 41-45. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010101\)91:1<41::AID-IJC1009>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010101)91:1<41::AID-IJC1009>3.0.CO;2-2)

Consumidor, P. F. del. (s. f.). *Di no a la obesidad, pero sí al ejercicio*. gob.mx.

Recuperado 14 de noviembre de 2022, de

<http://www.gob.mx/profeco/documentos/di-no-a-la-obesidad-pero-si-al-ejercicio?state=published>

Cornford, P., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., De Santis, M., Gross, T., Henry, A. M., Joniau, S., Lam, T. B., Mason, M. D., van der Poel, H. G., van der Kwast, T. H., Rouvière, O., Wiegel, T., & Mottet, N. (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*, 71(4), 630-642.

<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.002>

Definition of azaspirane—NCI Dictionary of Cancer Terms—National Cancer Institute (nciglobal,ncienterprise). (2011, febrero 2). [nciAppModulePage].

<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/azaspirane>

Deng, C.-F., Zhu, N., Zhao, T.-J., Li, H.-F., Gu, J., Liao, D.-F., & Qin, L. (2022).

Involvement of LDL and ox-LDL in Cancer Development and Its Therapeutical Potential. *Frontiers in Oncology*, 12.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.803473>

- Dillekås, H., Rogers, M. S., & Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, 8(12), 5574-5576.
<https://doi.org/10.1002/cam4.2474>
- Ding, X., Zhang, W., Li, S., & Yang, H. (2019). The role of cholesterol metabolism in cancer. *American Journal of Cancer Research*, 9(2), 219-227.
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(2), 69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Espenshade, P. J., & Hughes, A. L. (2007). Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 41, 401-427.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130315>
- Estado, I. de S. y S. S. de los T. del. (s. f.). *Por cáncer de próstata mueren 7 mil hombres en México; es tiempo de prevención: ISSSTE*. gob.mx. Recuperado 14 de noviembre de 2022, de <http://www.gob.mx/issste/prensa/por-cancer-de-prostata-mueren-7-mil-hombres-en-mexico-es-tiempo-de-prevencion-issste?idiom=es-MX>
- Feingold, K. R. (2000). Obesity and Dyslipidemia. En K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dungan, A. Grossman, J. M. Hershman, J. Hofland, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, J. Purnell, F. Singer, C. A. Stratakis, ... D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDTText.com, Inc.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305895/>

Galeano, N. F., Al-Haideri, M., Keyserman, F., Rumsey, S. C., & Deckelbaum, R. J.

(1998). Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: A potential mechanism for increased atherogenicity¹. *Journal of Lipid Research*, 39(6), 1263-1273.

[https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32551-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32551-7)

Galindo-Hernandez, O., Gonzales-Vazquez, C., Cortes-Reynosa, P., Reyes-Urbe, E.,

Chavez-Ocaña, S., Reyes-Hernandez, O., Sierra-Martinez, M., & Salazar, E. P.

(2015). Extracellular vesicles from women with breast cancer promote an epithelial-mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(12), 9649-9659.

<https://doi.org/10.1007/s13277-015-3711-9>

Galindo-Hernandez, O., Serna-Marquez, N., Castillo-Sanchez, R., & Salazar, E. P.

(2014). Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 91(6), 299-310.

<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.09.002>

Gan, S.-S., Ye, J.-Q., Wang, L., Qu, F.-J., Chu, C.-M., Tian, Y.-J., Yang, W., & Cui, X.-

G. (2017). Inhibition of PCSK9 protects against radiation-induced damage of prostate cancer cells. *OncoTargets and therapy*, 10, 2139-2146.

<https://doi.org/10.2147/OTT.S129413>

GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis). (s. f.). Recuperado 6 de agosto de 2023, de <http://gepia.cancer-pku.cn/>

- Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting: MMPs as potential targets in malignancy. *FEBS Journal*, 278(1), 16-27.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>
- Giunchi, F., Fiorentino, M., & Loda, M. (2019). The Metabolic Landscape of Prostate Cancer. *European Urology Oncology*, 2(1), 28-36.
<https://doi.org/10.1016/j.euo.2018.06.010>
- Global Cancer Observatory. (s. f.). Recuperado 5 de diciembre de 2023, de <https://gco.iarc.fr/>
- Hager, Dr. M., Solomon, K., & Freeman, M. (2006). The Role of Cholesterol in Prostate Cancer. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 9, 379-385.
<https://doi.org/10.1097/01.mco.0000232896.66791.62>
- Hamasaki, M., Hideshima, T., Tassone, P., Neri, P., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Raje, N., Kumar, S., Picker, D. H., Jacob, G. S., Richardson, P. G., Munshi, N. C., & Anderson, K. C. (2005). Azaspirane (N-N-diethyl-8,8-dipropyl-2-azaspiro [4.5] decane-2-propanamine) inhibits human multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu in vitro and in vivo. *Blood*, 105(11), 4470-4476.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3794>
- Hoque, M., Rentero, C., Conway, J. R., Murray, R. Z., Timpson, P., Enrich, C., & Grewal, T. (2015). The cross-talk of LDL-cholesterol with cell motility: Insights from the Niemann Pick Type C1 mutation and altered integrin trafficking. *Cell Adhesion & Migration*, 9(5), 384-391.
<https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1019996>

- Huang, B., Song, B., & Xu, C. (2020). Cholesterol metabolism in cancer: Mechanisms and therapeutic opportunities. *Nature Metabolism*, 2(2), 132-141.
<https://doi.org/10.1038/s42255-020-0174-0>
- Itoh, Y., & Nagase, H. (2002). Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays in Biochemistry*, 38, 21-36. <https://doi.org/10.1042/bse0380021>
- Jamnagerwalla, J., Howard, L. E., Allott, E. H., Vidal, A. C., Moreira, D. M., Castro-Santamaria, R., Andriole, G. L., Freeman, M. R., & Freedland, S. J. (2018). Serum cholesterol and risk of high-grade prostate cancer: Results from the REDUCE study. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 21(2), 252-259.
<https://doi.org/10.1038/s41391-017-0030-9>
- Jiang, S., Wang, X., Song, D., Liu, X., Gu, Y., Xu, Z., Wang, X., Zhang, X., Ye, Q., Tong, Z., Yan, B., Yu, J., Chen, Y., Sun, M., Wang, Y., & Gao, S. (2019). Cholesterol Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Prostate Cancer Cells by Suppressing Degradation of EGFR through APMAP. *Cancer Research*, 79(12), 3063-3075. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3295>
- Jung, Y. Y., Ko, J., Um, J., Chinnathambi, A., Alharbi, S. A., Sethi, G., & Ahn, K. S. (2021). LDL cholesterol promotes the proliferation of prostate and pancreatic cancer cells by activating the STAT3 pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 236(7), 5253-5264. <https://doi.org/10.1002/jcp.30229>
- Kachhawa, P., Kachhawa, K., Agrawal, D., Sinha, V., Sarkar, P. D., & Kumar, S. (2018). A study of prostate cancer and its association with dyslipidemia, elevated insulin levels in blood, and relative insulin resistance prevalent in South East Asia.

- Journal of Integrative Nephrology and Andrology*, 5(1), 24.
https://doi.org/10.4103/jina.jina_30_17
- Kwakwa, K. A., & Sterling, J. A. (2017). Integrin $\alpha\beta3$ Signaling in Tumor-Induced Bone Disease. *Cancers*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cancers9070084>
- Lee, B. H., Taylor, M. G., Robinet, P., Smith, J. D., Schweitzer, J., Sehayek, E., Falzarano, S. M., Magi-Galluzzi, C., Klein, E. A., & Ting, A. H. (2013). Dysregulation of cholesterol homeostasis in human prostate cancer through loss of ABCA1. *Cancer Research*, 73(3), 1211-1218. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3128>
- Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., & Jiang, W. G. (2013). Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. En *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>
- Miao, R., Fang, X., Wei, J., Wu, H., Wang, X., & Tian, J. (2022). Akt: A Potential Drug Target for Metabolic Syndrome. *Frontiers in Physiology*, 13.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.822333>
- Michael Kolodziej, M. D. (2015). *Management of Biochemically Recurrent Prostate Cancer Following Local Therapy*. 20.
https://www.ajmc.com/view/ace021_dec14_prostatece_kolodziej
- Mohan, C. D., Bharathkumar, H., Bulusu, K. C., Pandey, V., Rangappa, S., Fuchs, J. E., Shanmugam, M. K., Dai, X., Li, F., Deivasigamani, A., Hui, K. M., Kumar, A. P., Lobie, P. E., Bender, A., Basappa, Sethi, G., & Rangappa, K. S. (2014). Development of a Novel Azaspirane That Targets the Janus Kinase-Signal

- Transducer and Activator of Transcription (STAT) Pathway in Hepatocellular Carcinoma in Vitro and in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 34296-34307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.601104>
- Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas.* (s. f.-a). Instituto Nacional de Salud Pública. Recuperado 21 de marzo de 2021, de <https://www.insp.mx/avisos/4189-cancer-prostata-mx.html>
- Mortalidad por cáncer de próstata en México a lo largo de tres décadas.* (s. f.-b). Recuperado 30 de octubre de 2022, de <https://www.insp.mx/avisos/4189-cancer-prostata-mx.html>
- Munjal, A., & Leslie, S. W. (2021). Gleason Score. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553178/>
- Murtola, T. J., Kasurinen, T. V. J., Talala, K., Taari, K., Tammela, T. L. J., & Auvinen, A. (2019). Serum cholesterol and prostate cancer risk in the Finnish randomized study of screening for prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 22(1), 66-76. <https://doi.org/10.1038/s41391-018-0087-0>
- Murtola, T. J., Syväälä, H., Pennanen, P., Bläuer, M., Solakivi, T., Ylikomi, T., & Tammela, T. L. J. (2012). The Importance of LDL and Cholesterol Metabolism for Prostate Epithelial Cell Growth. *PLOS ONE*, 7(6), e39445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039445>
- Nelson, W. G., Antonarakis, E. S., Carter, H. B., De Marzo, A. M., & DeWeese, T. L. (2020). 81—Prostate Cancer. En J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, M. B. Kastan, J. H. Doroshow, & J. E. Tepper (Eds.), *Abeloff's Clinical Oncology (Sixth*

Edition) (pp. 1401-1432.e7). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47674-4.00081-5>

Nitulescu, G. M., Van De Venter, M., Nitulescu, G., Ungurianu, A., Juzenas, P., Peng, Q., Olaru, O. T., Grădinaru, D., Tsatsakis, A., Tsoukalas, D., Spandidos, D. A., & Margina, D. (2018). The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *International Journal of Oncology*, 53(6), 2319-2331. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4597>

Parker, C., Castro, E., Fizazi, K., Heidenreich, A., Ost, P., Procopio, G., Tombal, B., & Gillessen, S. (2020). Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*, 31(9), 1119-1134. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.011>

Pelton, K., Freeman, M. R., & Solomon, K. R. (2012). Cholesterol and Prostate Cancer. *Current opinion in pharmacology*, 12(6), 751-759. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.006>

Pirahanchi, Y., Sinawe, H., & Dimri, M. (2021). Biochemistry, LDL Cholesterol. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519561/>

Poulose, N., Amoroso, F., Steele, R. E., Singh, R., Ong, C. W., & Mills, I. G. (2018). Genetics of lipid metabolism in prostate cancer. *Nature Genetics*, 50(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41588-017-0037-0>

Prostate Cancer | Concise Medical Knowledge. (s. f.). Lecturio. Recuperado 20 de mayo de 2021, de <https://www.lecturio.com/concepts/prostate-cancer/>

Prostate Cancer Risk Factors. (s. f.). Recuperado 11 de octubre de 2022, de <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>

Prostate Cancer Signs and Symptoms. (s. f.). Recuperado 8 de noviembre de 2022, de <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-symptoms.html>

Raftopoulos, N. L., Washaya, T. C., Niederprüm, A., Egert, A., Hakeem-Sanni, M. F., Varney, B., Aishah, A., Georgieva, M. L., Olsson, E., dos Santos, D. Z., Nassar, Z. D., Cochran, B. J., Nagarajan, S. R., Kakani, M. S., Hastings, J. F., Croucher, D. R., Rye, K.-A., Butler, L. M., Grewal, T., & Hoy, A. J. (2022). Prostate cancer cell proliferation is influenced by LDL-cholesterol availability and cholesteryl ester turnover. *Cancer & Metabolism*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40170-021-00278-1>

Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10, 63-89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>

Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillessen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>

Reunanen, N., & Kähäri, V. (2013). Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. En *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>

Riscal, R., Skuli, N., & Simon, M. C. (2019). Even cancer cells watch their cholesterol!

Molecular cell, 76(2), 220-231. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.008>

Rivero, I., Reynoso, E., & Ochoa-Terán, A. (2011). Microwave-assisted synthesis of cycloalkanespirohydantoins and piperidinespirohydantoins as precursors of restricted α -amino acids. *Arkivoc*, 2011.

Rodrigues Dos Santos, C., Domingues, G., Matias, I., Matos, J., Fonseca, I., De Almeida, J. M., & Dias, S. (2014). LDL-cholesterol signaling induces breast cancer proliferation and invasion. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-16>

Roles of Lipids in Cancer | IntechOpen. (s. f.). Recuperado 21 de marzo de 2021, de <https://www.intechopen.com/books/advances-in-lipid-metabolism/roles-of-lipids-in-cancer>

Saad, F., & Hotte, S. J. (2010). Guidelines for the management of castrate-resistant prostate cancer. *Canadian Urological Association Journal*, 4(6), 380-384.

Salerno, A. G., van Solingen, C., Scotti, E., Wanschel, A. C. B. A., Afonso, M. S., Oldebeken, S. R., Spiro, W., Tontonoz, P., Rayner, K. J., & Moore, K. J. (2020). LDL Receptor Pathway Regulation by miR-224 and miR-520d. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2020.00081>

Salih, F. A. M., Mustafa, M., EM.Illzam, AM.Sharifa, M.Suleiman, & SS.Hussain. (2016). Prostate cancer: Pathophysiology, diagnosis, and prognosis. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 15(6), Article 6.

Salud, S. de. (s. f.). 073. *Cáncer de próstata primera causa de muerte en hombres de edad avanzada*. gob.mx. Recuperado 21 de marzo de 2021, de <http://www.gob.mx/salud/prensa/073-cancer-de-prostata-primera-causa-de-muerte-en-hombres-de-edad-avanzada?idiom=es>

Santiago-Ruiz, S., Polverini, E., Manjarrez, J., Espinoza, K. A., Reynoso, E., & Rivero, I. A. (2016). *Virtual Screening of Putative Anticonvulsant Hydantoin Derived Drugs and Biological Evaluation*. 7.

Scully, T., Kase, N., Gallagher, E. J., & LeRoith, D. (2021). Regulation of low-density lipoprotein receptor expression in triple negative breast cancer by EGFR-MAPK signaling. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97327-y>

Sekine, Y., Koike, H., Nakano, T., Nakajima, K., Takahashi, S., & Suzuki, K. (2009). Remnant lipoproteins induced proliferation of human prostate cancer cell, PC-3 but not LNCaP, via low density lipoprotein receptor. *Cancer Epidemiology*, 33(1), 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2009.04.004>

Shafique, K., McLoone, P., Qureshi, K., Leung, H., Hart, C., & Morrison, D. S. (2012). Cholesterol and the risk of grade-specific prostate cancer incidence: Evidence from two large prospective cohort studies with up to 37 years' follow up. *BMC Cancer*, 12, 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-25>

Siltari, A., Syväälä, H., Lou, Y.-R., Gao, Y., & Murtola, T. J. (2022). Role of Lipids and Lipid Metabolism in Prostate Cancer Progression and the Tumor's Immune Environment. *Cancers*, 14(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/cancers14174293>

Stephan, Z. F., & Yurachek, E. C. (1993). Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by Dil-labeled LDL. *Journal of Lipid Research*, 34(2), 325-330.

Sulaiman, N. B. S., Mohan, C. D., Basappa, S., Pandey, V., Rangappa, S., Bharathkumar, H., Kumar, A. P., Lobie, P. E., & Rangappa, K. S. (2016). An azaspirane derivative suppresses growth and induces apoptosis of ER-positive and ER-negative breast cancer cells through the modulation of JAK2/STAT3 signaling pathway. *International Journal of Oncology*, 49(3), 1221-1229.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3615>

The role of cholesterol and cholesterol-driven membrane raft domains in prostate cancer—Anita Hryniewicz-Jankowska, Katarzyna Augoff, Aleksander F Sikorski, 2019. (s. f.). Recuperado 30 de septiembre de 2021, de
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1535370219870771?journalCode=ebmb>

Tousignant, K. D., Rockstroh, A., Taherian Fard, A., Lehman, M. L., Wang, C., McPherson, S. J., Philp, L. K., Bartonicek, N., Dinger, M. E., Nelson, C. C., & Sadowski, M. C. (2019). Lipid Uptake Is an Androgen-Enhanced Lipid Supply Pathway Associated with Prostate Cancer Disease Progression and Bone Metastasis. *Molecular Cancer Research: MCR*, 17(5), 1166-1179.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-1147>

Vasconcelos-Ulloa, J. de J., García-González, V., Valdez-Salas, B., Vázquez-Jiménez, J. G., Rivero-Espejel, I., Díaz-Molina, R., & Galindo-Hernández, O. (2023). A Triazaspirane Derivative Inhibits Migration and Invasion in PC3 Prostate Cancer Cells. *Molecules*, 28(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/molecules28114524>

- Vekic, J., Zeljkovic, A., Stefanovic, A., Jelic-Ivanovic, Z., & Spasojevic-Kalimanovska, V. (2019). Obesity and dyslipidemia. *Metabolism*, 92, 71-81.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.005>
- Vona, R., Iessi, E., & Matarrese, P. (2021). Role of Cholesterol and Lipid Rafts in Cancer Signaling: A Promising Therapeutic Opportunity? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.622908>
- Wan, F., Qin, X., Zhang, G., Lu, X., Zhu, Y., Zhang, H., Dai, B., Shi, G., & Ye, D. (2015). Oxidized low-density lipoprotein is associated with advanced-stage prostate cancer. *Tumor Biology*, 36(5), 3573-3582. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2994-6>
- Xia, X., Peng, Z., Gu, H., Wang, M., Wang, G., & Zhang, D. (2021). Regulation of PCSK9 Expression and Function: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.764038>
- Xue, L., Qi, H., Zhang, H., Ding, L., Huang, Q., Zhao, D., Wu, B. J., & Li, X. (2020). Targeting SREBP-2-Regulated Mevalonate Metabolism for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 10.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01510>



Dr. Octavio Galindo Hernández
Director de tesis

Anexos

Anexo A. Acta de aprobación del Comité de Ética en Investigación.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Mexicali, Baja California a 14 de diciembre de 2022

Dr. Octavio Galindo Hernández
Investigador Responsable

Facultad de Medicina Mexicali
Universidad Autónoma de Baja California
Humberto Torres Sanginés s/n, Centro Cívico; C.P. 21000. Mexicali, B.C., México

Título del proyecto: "EFECTO DE 8-RFN7VI-1,3,8-TRIAZASPIRO-[4.5]-DECANO-2,4-DIONA SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE CÉLULAS TUMORALES PROSTÁTICAS PC3 ESTIMULADAS CON LDLs"

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

APROBADO

Número de registro asignado por el Comité: **FMM/CEI-FMM/011/2022-2**

Estimado investigador, en atención a la solicitud presentada para obtener número de registro ante el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina Mexicali (CEI-FMM), en sesión ordinaria, se ha decidido aprobar su solicitud y validar el número de registro otorgado. Le sugerimos mantener comunicación constante con el comité para un adecuado seguimiento.

ATENTAMENTE

Dr. Carlos Olvera Sandoval
Presidente del CEI-FMM



Comité de Ética en Investigación
Facultad de Medicina Mexicali

Anexo B. Formato de la Carta de Consentimiento Informado.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaración de Consentimiento del Paciente para Participar en el Estudio

Título del Estudio: Efecto de 8-Benzyl-1,3,8-Triazaspiro-[4.5]-Decano-2,4-Diona sobre la migración e invasión de células tumorales prostáticas PC3 estimuladas con LDLs..

Patrocinador:	22da Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación
Lugar y fecha:	Mexicali, Baja California, 8 de septiembre de 2022.
Dirección:	Calle Dr. Humberto Torres S/N, Centro Cívico.
Teléfono:	686-557-1622 Ext. 45324
Comité de Ética:	Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina Mexicali.

Lea este documento detenidamente

Lo estamos invitando a participar en un estudio de investigación. Antes de decidir participar, necesita entender por qué se lleva a cabo la investigación y qué implicará. Pregúntenos si hay algún aspecto que no esté claro o si desea tener más información. Estamos a su disposición para responder a cualquier pregunta que tenga ahora o en cualquier momento durante el estudio.

Justificación

Las alteraciones en el metabolismo y en las concentraciones sanguíneas de lípidos (dislipidemias) representan un factor de riesgo importante en el desarrollo de cáncer de mama, correlacionándose fuertemente con una baja supervivencia particularmente en pacientes post-menopáusicas. La obesidad va comúnmente de la mano con la presencia de dislipidemias, aunque también se ven implicadas otras alteraciones metabólicas. Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) podrían desempeñar un papel crítico en varios mecanismos que desencadenan la progresión tumoral.

Por otro lado, el desarrollo de agentes quimioterapéuticos ha reducido significativamente la mortalidad de pacientes con cáncer de mama, sin embargo, la resistencia farmacológica continúa siendo un área de oportunidad. Considerando que diversos estudios sugieren una relación de los niveles altos de LDL con el desarrollo y progresión del cáncer de mama, así como con la resistencia al tratamiento, es importante descubrir la forma en que las LDL participan en la progresión y el desarrollo de resistencia a la terapia del cáncer de mama, lo que permitirá la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos.

Es importante remarcar que para los fines de esta investigación es necesario el uso de plasma fresco para la obtención de lipoproteínas de baja densidad (LDL) con calidad adecuada para los experimentos *in vitro*. Por lo anterior, durante el desarrollo del estudio se invitará a participar a dos sujetos sanos de 20 a 40 años, esto con la finalidad de que puedan ser donantes de muestras de sangre para el aislamiento de LDLs.

Objetivo del estudio

El presente trabajo tiene como objetivo investigar la forma en que las LDL pudieran participar favoreciendo la progresión tumoral y la resistencia al tratamiento farmacológico del cáncer de mama, lo cual permitirá sentar las bases para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad farmacológica contra el cáncer de mama.

Procedimientos

Si usted acepta participar en el estudio, se le colectará una muestra de sangre venosa de aproximadamente 15 mL para la obtención de suero sanguíneo el cual se utilizará para la cuantificación de metabolitos (perfil de química sanguínea de al menos 20 parámetros), así como para el aislamiento de lipoproteínas de baja densidad (LDL); además, se colectarán 3 mL para la obtención de sangre total para la determinación de una biometría hemática. A los participantes se les realizará una historia clínica y un examen físico general.

Posibles riesgos y molestias

Sobre la colección de la muestra sanguínea, hay un riesgo bajo de dolor al puncionar la vena y de sangrado mínimo, el cual va disminuyendo gradualmente al paso de los minutos; puede generarse algún morete en el sitio de la punción, muy raramente infección ya que todo esto se realiza con material estéril y desechable.

Beneficios al término del estudio

Usted puede obtener el beneficio de conocer los resultados del perfil de química sanguínea (al menos 20 parámetros) así como de la biometría hemática. Estos resultados serán valorados por un médico, lo que, en conjunto con un examen físico general y una historia clínica, permitirán conocer su estado general de salud.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento

Usted obtendrá un reporte en formato electrónico de los resultados de las pruebas de laboratorio y de la valoración de su estado físico. Si usted lo desea se les proporcionará orientación para el manejo de los resultados de laboratorio que muestren alteración.

Participación o retiro

Usted dispondrá de todo el tiempo que requiera para leer esta información, pensar en ello, meditarla y decidir al momento de la entrevista o en una próxima consulta, si desea participar en el estudio. Usted está en libertad de hacer todas las preguntas que desee y que se le aclaren todas las dudas que pudiera tener sobre su participación en esta investigación. También tiene derecho a dirigirse a otras personas del equipo de investigadores. En caso de que usted decida participar en el estudio, usted tiene derecho a retirarse del mismo en cualquier momento si así lo desea, lo que podrá hacer sin que esto represente algún tipo de afectación hacia su persona.

Compensación

En el presente estudio su participación es totalmente voluntaria, por lo que no existe una compensación económica o en especie por su colaboración. Por otro lado, su

Privacidad y confidencialidad

Disposición del material biológico colectado

9

□

En caso de dudas o aclaraciones

Bajo las condiciones arriba mencionadas accedo a participar voluntariamente.

Nombre y firma del **Paciente:**

Dirección:

Correo electrónico:

Fecha: _____

Teléfono:

Nombre y firma del **Testigo 1:**

Dirección:

Fecha: _____

Teléfono:

Nombre y firma del **Testigo 2:**

Dirección:

Fecha: _____

Teléfono:

Nombre y firma del **Investigador:**

Fecha:
