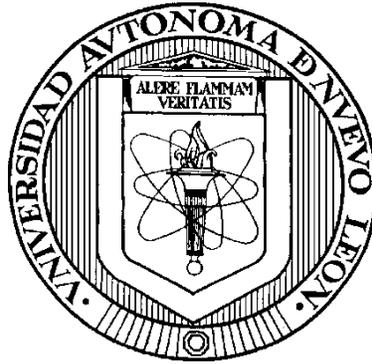


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**DETECCIÓN DEL IncRNA PCA3 EN CÁNCER DE PRÓSTATA POR MEDIO DE
NANOSISTEMAS ACOPLADOS FRET**

Por

Q.C.B KASSANDRA OFELIA RODRÍGUEZ AGUILLÓN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería
Genética**

Octubre 2021

**DETECCIÓN DEL IncRNA PCA3 EN CÁNCER DE PRÓSTATA POR MEDIO DE
NANOSISTEMAS ACOPLADOS FRET**

Aprobación de la Tesis:



DRA. C. CELIA NOHEMÍ SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ
Directora de Tesis



DR. C. HUGO LEONID GALLARDO BLANCO
Co-Director de Tesis



DRA. C. SONIA AMELIA LOZANO SEPÚLVEDA
Miembro de la Comisión



DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A mi papá, Juan Antonio Rodríguez Martínez, por ser el ejemplo más tangible de resiliencia, por siempre tener palabras que sanan, por ser el motor de mi vida y mi modelo a seguir. Gracias por siempre creer que lo puedo todo y por demostrarme que el amor va más allá de la vida. Te amo y te extraño por siempre.

A mi mamá, María Sonia Aguillón Cardona, por ser la persona que me enseña lo fuerte que puedo llegar a ser, por cuidar de mí todos estos años con el amor que lo haces, por motivarme, escucharme, apoyarme y nunca dejarme sola.

A mi hermana, Sonia Itzel Rodríguez Aguillón, por ser la calma en la tormenta, por enseñarme que no hay nada que nos pueda detener, por siempre estar ahí para mí, aún en los peores momentos.

A mis sobrinos: Fernanda, Daniela y Mauricio, gracias por darme el amor más puro que alguien puede experimentar, sus risas le dan paz a mi vida.

A Luis Fernando Armijo Martínez, por demostrarme que el amor lo puede todo, por darle luz y calma a mi vida, por las risas interminables, por la reciprocidad.

A mis amigos, por ser incondicionales, por enseñarme que la amistad es apoyar los sueños del otro aún en la adversidad, mi admiración eterna.

*“Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar,
divirtiéndose y buscando una piedra más lisa o una concha más bonita de
lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con
todo por descubrir”*

-Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez, por la confianza que deposita en mí, por siempre apoyarme en cada paso que doy, por ser parte de mi familia, gracias por enseñarme a crecer como persona y científica.

Al Dr. Hugo Gallardo Blanco, por dejarme ser parte de este proyecto, gracias por darme la oportunidad de aprender de usted, por su paciencia y su tiempo.

A todo el equipo de nanomedicina, por ser una familia, por siempre estar ahí para apoyarnos, trabajar con ustedes ha sido una experiencia única.

A mis compañeros, amigos y colegas de maestría, por hacer este viaje más divertido, por todo lo que me han enseñado cada uno de ustedes, espero que podamos coincidir en un futuro.

A mis profesores, por su tiempo, por sembrar más curiosidad en mí, por pulirme y por enseñarme que hay un mundo por descubrir.

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cáncer de Próstata	1
1.2 Métodos de Diagnóstico Convencionales	2
1.2.1 Algoritmo convencional para el tamizaje y diagnóstico de CaP	2
1.2.2 Utilidad del Antígeno Prostático Específico (PSA) para el tamizaje de CaP 4	
1.2.3 Diagnóstico confirmatorio de CaP	6
.....	8
1.3 Nuevos Métodos de Diagnóstico	8
1.3.1 RNAs largos no codificantes	10
1.3.2 PCA3	13
1.3.2.1 PCA3 en el diagnóstico de CaP	16
1.4 La Nanotecnología aplicada a diagnóstico y tratamiento en medicina .	17
1.4.1 Nanopartículas de oro (AuNP)	18
1.6 Antecedentes del grupo de trabajo	22
1.7 Justificación	24
1.8 Hipótesis	25
1.9 Objetivos	25
1.9.1 Objetivo General	25
1.9.2 Objetivos Específicos	25
CAPITULO II	26
Materiales y Métodos	26
2.1 Materiales	26
2.2 Estrategia General de Trabajo	28
2.2 Estandarización de la hibridación de dos sondas mediante detección de fluorescencia con cDNA de PCA3	28
2.2.1 PCR punto final para gBlock de PCA3	30
2.2.2 PCR unidireccional para cDNA del lncRNA PCA3	33

2.2.3 Tratamiento de oligonucleótidos con DTT en fase líquida	35
2.2.4 Protocolo de hibridación de sondas con cDNA del lncRNA PCA3	36
2.3 Construcción y caracterización de dos nanosistemas AuNPs unidas a sondas específicas para cDNA de PCA3	38
2.3.1 Conjugación de nanopartículas de oro (AuNPs)	38
2.3.2 Caracterización de nanosistemas	41
2.4 Hibridación de nanosistemas AuNPs unidos a sondas específicas para cDNA de PCA3	41
CAPITULO III	44
Resultados	44
3.1 Estandarización de la hibridación de dos sondas mediante detección de fluorescencia con el gBlock de PCA3	44
3.1.2 PCR punto final para gBlock de PCA3	44
3.1.3 PCR unidireccional para cDNA de PCA3	45
3.1.4 Caracterización de sondas tratadas con DTT en fase líquida	47
3.1.5 Hibridación de sondas con cDNA del lncRNA PCA3	48
3.2 Construcción y caracterización de dos nanosistemas AuNPs unidas a sondas específicas para cDNA de PCA3	50
3.2.1 Caracterización de los nanosistemas AuNPs-sondas específicas ..	50
3.3 Hibridación de nanosistemas AuNPs unidos a sondas específicas para cDNA de PCA3	54
CAPITULO IV	56
4.1 Discusión	56
4.2 Conclusión	59
Referencias	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores normales de PSA de acuerdo con diferentes grupos de edad.....	4
Tabla 3. LncRNAs implicados en CaP.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 4. Reactivos para PCR punto final para fragmento de PCA3	32
Tabla 5. Programa para PCR punto final de fragmento de PCA3	33
Tabla 6. Condiciones para PCR unidireccional con <i>primer forward</i>	34
Tabla 7. Condiciones para PCR unidireccional con <i>primer reverse</i>	34
Tabla 8. Condiciones de hibridación de sondas con cDNA del lncRNA PCA3	36
Tabla 9. Conjugación de AuNPs	39
Tabla 10. Técnicas para caracterización de los nanosistemas.....	41
Tabla 11. Condiciones de hibridación de nanosistemas con cDNA del lncRNA PCA3.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número estimado de casos nuevos de cáncer en 2018 en todo el mundo	1
Figura 2. Número estimado de casos nuevos de cáncer en 2018 en hombres mexicanos	2
Figura 3. Algoritmo para el tamizaje de CaP	3
Figura. 4 Biopsia de próstata teñida con H y E.....	7
Figura 5. Diagrama de clasificación de Gleason	8
Figura 6. Localización, estructura y transcritos de PCA3	14
Figura 7. Modulación de genes del AR por PCA3	15
Figura 8. Aplicación de las AuNP en la bionanotecnología	19
Figura 9. Representación esquemática de la oscilación de electrones de conducción	20
Figura 10. Esquema general de trabajo	28
Figura 11. Diseño de sondas.....	29
Figura 12. Estructura química de Cy3	30
Figura 13. Estructura química de TAMRA.....	30
Figura 14. Plásmido pUCITD-AMP.....	31
Figura 15. Sistema de detección compuesto por sondas y sus respectivos fluoróforos	37
Figura 16. Programa utilizado para el protocolo de hibridación de sondas con cDNA de lncRNA PCA3.....	37
Figura 17. Nanosistemas propuestos.....	39
Figura 18. Mecanismo para la adición de un tiol catalizada por tiolato a una maleimida N-sustituida	40

Figura 19. Hbridación de nanosistemas con gBlock PCA3.....	43
Figura 20. Gel de agarosa 2%, TBE 1X	44
Figura 21. Cuantificación de gBlock de PCA3 por medio del equipo NanoDrop ND-1000	45
Figura 22. Cuantificación de gBlock de PCA3 con primer forward por medio del equipo NanoDrop ND-1000.....	46
Figura 23. Cuantificación de gBlock de PCA3 con primer reverse por medio del equipo NanoDrop ND-1000.....	46
Figura 24. Barrido espectral de 230 a 650 nm para sondas.....	47
Figura 25. Ensayo de hibridación de sondas (Cy3 y TAMRA) con amplicón con primer Reverse.....	48
Figura 26. Ensayo de hibridación de sondas (Cy3 y TAMRA) con amplicón con primer Forward.....	49
Figura 27. Espectro UV-Vis para AuNPs conjugadas con sondas Cy3 (izquierda) y TAMRA (derecha).	50
Figura 28. Barrido espectral de 230 a 650 para AuNPs conjugadas con sondas Cy3 (izquierda) y TAMRA (derecha).....	51
Figura 29. DLS de nanosistema conjugado con Cy3.....	52
Figura 30. DLS de nanosistema conjugado con TAMRA	52
Figura 32. Gel de agarosa al 0.5%, TBE 0.5X, visualización con luz visible.	53
Figura 31. Gel de agarosa al 0.5%, TBE 0.5X, visualización con luz UV	53
Figura 33. Ensayo de hibridación de nanosistemas (Cy3 y TAMRA) con amplicón con primer Reverse	54
Figura 34. Ensayo de hibridación de nanosistemas (Cy3 y TAMRA) con amplicón con primer Forward	55

NOMENCLATURA

CaP Cáncer de Próstata

HPB..... Hiperplasia prostática benigna

RNAÁcido ribonucleico

AuNPs Nanopartículas de oro

Nm..... Nanómetros

lncRNA ARN largos no codificantes

PSA Antígeno Prostático Específico

μL microlitros

μM micromolar

mL..... mililitros

ng nanogramos

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

rpm.....Revoluciones por minuto

AR... Receptor de andrógenos

ncRNA RNAs no codificantes

mRNA.....ARN mensajero

RPSResonancia de Plasmón Superficial

DNAÁcido Desoxirribonucleico

cDNA DNA complementario

SERS.....Espectroscopía Raman de superficie mejorada

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Presenta: Kassandra Ofelia Rodríguez Aguillón

Detección del lncRNA PCA3 en cáncer de próstata por medio de nanosistemas acoplados FRET

Introducción: El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más frecuente en hombres, siendo un serio problema de salud pública a nivel mundial. Sin embargo, a pesar de que el CaP es frecuente, debido a las limitaciones en el tamizaje inicial, su detección suele ser tardía, lo que eleva su mortalidad. Para superar estas limitaciones se han propuesto nuevos biomarcadores, el más utilizado hasta la fecha, el antígeno prostático específico (PSA), es utilizado para el tamizaje y monitoreo de pacientes con carcinoma prostático. Sin embargo, niveles elevados de PSA pudieran ser no indicativos de la enfermedad. Por otro lado, el umbral en el que un resultado es indicativo de biopsia (diagnóstico confirmatorio) aún no está del todo claro. El lncRNA PCA3 se ha detectado en muestras de orina, sangre y tejidos en el 95% de pacientes con CaP, por lo que se ha propuesto como un biomarcador no invasivo y como auxiliar en la decisión de repetir biopsia negativa en aquellos casos con sospecha de CaP, reduciendo falsos positivos y falsos negativos. Hasta la fecha, en México existen pocos estudios al respecto. Por otro lado, como alternativa a los métodos tradicionales por PCR en tiempo real con retrotranscripción (qRT-PCR) las AuNPs poseen una versatilidad que las hace útiles en una amplia gama de aplicaciones biomédicas. En este trabajo nos centramos en la utilidad de las AuNPs para el diagnóstico de CaP empleando nanosistemas acoplados para la detección directa del lncRNA PCA3. **Objetivo:** Por lo anterior, proponemos la detección del cDNA de lncRNA PCA3 por medio de nanosistemas acoplados a sondas específicas como una alternativa al tamizaje inicial de CaP. **Métodos:** Se diseñaron dos sondas marcadas con los fluoróforos Cy3™ y TAMRA™ complementarias entre sí y con el cDNA de PCA3, con la finalidad de formar una estructura de doble cadena de 3 elementos (ambas sondas y el cDNA de PCA3). Se utilizó la función *Melting Curve* en el equipo *StepOnePlus Real-Time PCR System* con un rampeo de temperatura de 95° a 25°C, con un minuto a 60°C para la hibridación y de 25°C a 95°C con incrementos de 0.3% para el

registro del cambio de fluorescencia por la transición de DNA de doble cadena a cadena sencilla. Se empleó Evagreen® para el monitoreo de la doble cadena y se registraron las lecturas en 3 canales (EvaGreen®, Cy3™ y TAMRA™), utilizando como control negativo la cadena complementaria al cDNA de PCA3. Posteriormente se realizaron los mismos experimentos empleando los dos nanosistemas de AuNPs conjugadas con las sondas. Los datos crudos se graficaron como las derivadas de los cambios de temperatura contra los cambios de intensidad de fluorescencia para las lecturas de Evagreen®, Cy3™ y TAMRA™, respectivamente. **Resultados:** Se determinó un patrón de picos con máximos a 67.5° y 82.6° C con el cDNA de PCA3. Las AuNPs conjugadas con las sondas incrementan la sensibilidad un 44 % a 82.6°C y un 107.79 % a 67.5°C, comparando con las sondas no conjugadas. El mismo patrón se observó con Evagreen®, confirmando la formación de la doble cadena. **Conclusión:** Se demostró la capacidad de los dos nanosistemas formados por AuNPs conjugadas con sondas para la detección específica de PCA3, un biomarcador propuesto para el diagnóstico de CaP.

Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez
Directora de Tesis

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más frecuente en hombres, siendo un serio problema de salud pública a nivel mundial. Tan solo en el año 2018 se registraron 1,276,106 casos nuevos alrededor del mundo (Figura 1), representando el 13.5% de todos los cánceres en hombres (1). Se estima que para el año 2030 sean diagnosticados anualmente 1.7 millones de casos nuevos y se registren alrededor de 499,000 muertes (2). En México, el panorama no es alentador, en el año 2018 se registraron 25,049 casos nuevos y 6,915 defunciones (Figura 2), cifras que van en aumento (3). Sin embargo, a pesar de que el CaP es frecuente, el curso indolente de una gran cantidad de tumores ha generado controversia respecto a la utilidad del cribado y la detección temprana.

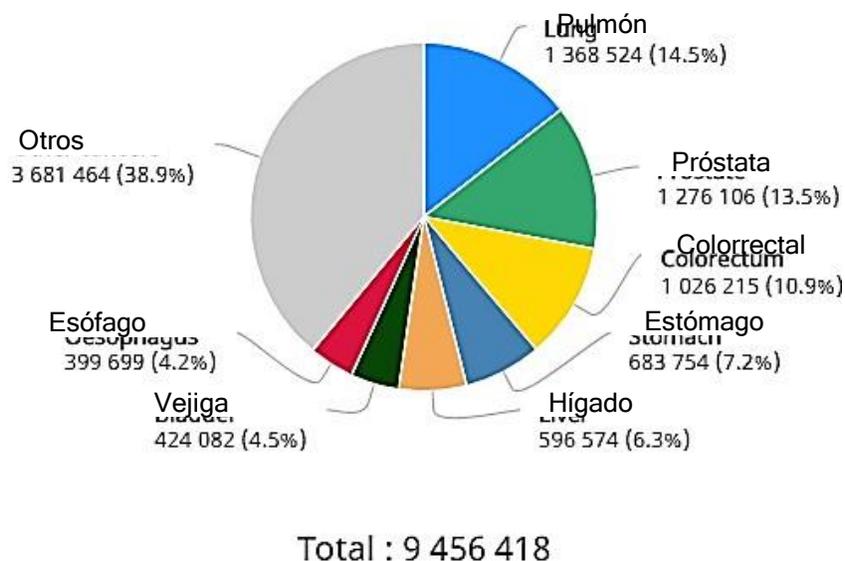


Figura 1. Número estimado de casos nuevos de cáncer en 2018 en todo el mundo en hombres de todas las

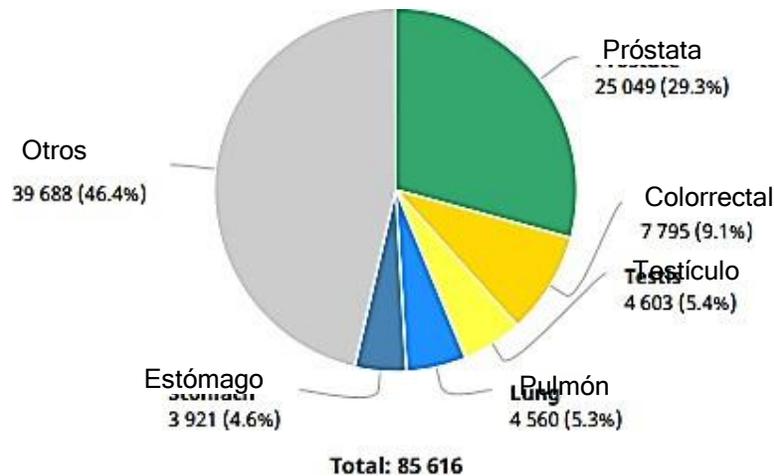


Figura 2. Número estimado de casos nuevos de cáncer en 2018 en hombres mexicanos de todas las edades³.

1.2 Métodos de Diagnóstico Convencionales

1.2.1 Algoritmo convencional para el tamizaje y diagnóstico de CaP

La detección de CaP consiste en la realización de un examen médico y el cuestionario de síntomas prostáticos (CSP), esto a hombres mayores de 45 años sin antecedentes o factores de riesgo o a hombres de 40 años con factores de riesgo, además de exámenes de laboratorio como la medición del Antígeno Prostático Específico (PSA), Examen General de Orina (EGO) y el examen digital rectal (DRE), según las pautas del Diario Oficial de la Federación (4). Una vez se tenga la sospecha de CaP, el paciente es referido al urólogo, para la atención médica oportuna, diagnóstico y tratamiento (figura 3). La concentración de PSA es un parámetro continuo, sin embargo, no hay valor umbral o límite aceptado de forma universal. Si el valor es mayor a 4 ng/mL durante el DRE se detectan induraciones y un volumen prostático mayor a lo habitual se procede a realizar una biopsia transrectal para el diagnóstico confirmatorio. Es importante que sea tomado en cuenta que el PSA es específico de órgano, pero no específico de enfermedad, por lo que valores por encima de 4 ng/mL pueden ser atribuidos a hiperplasia prostática benigna (HPB) o inflamación prostática (5).

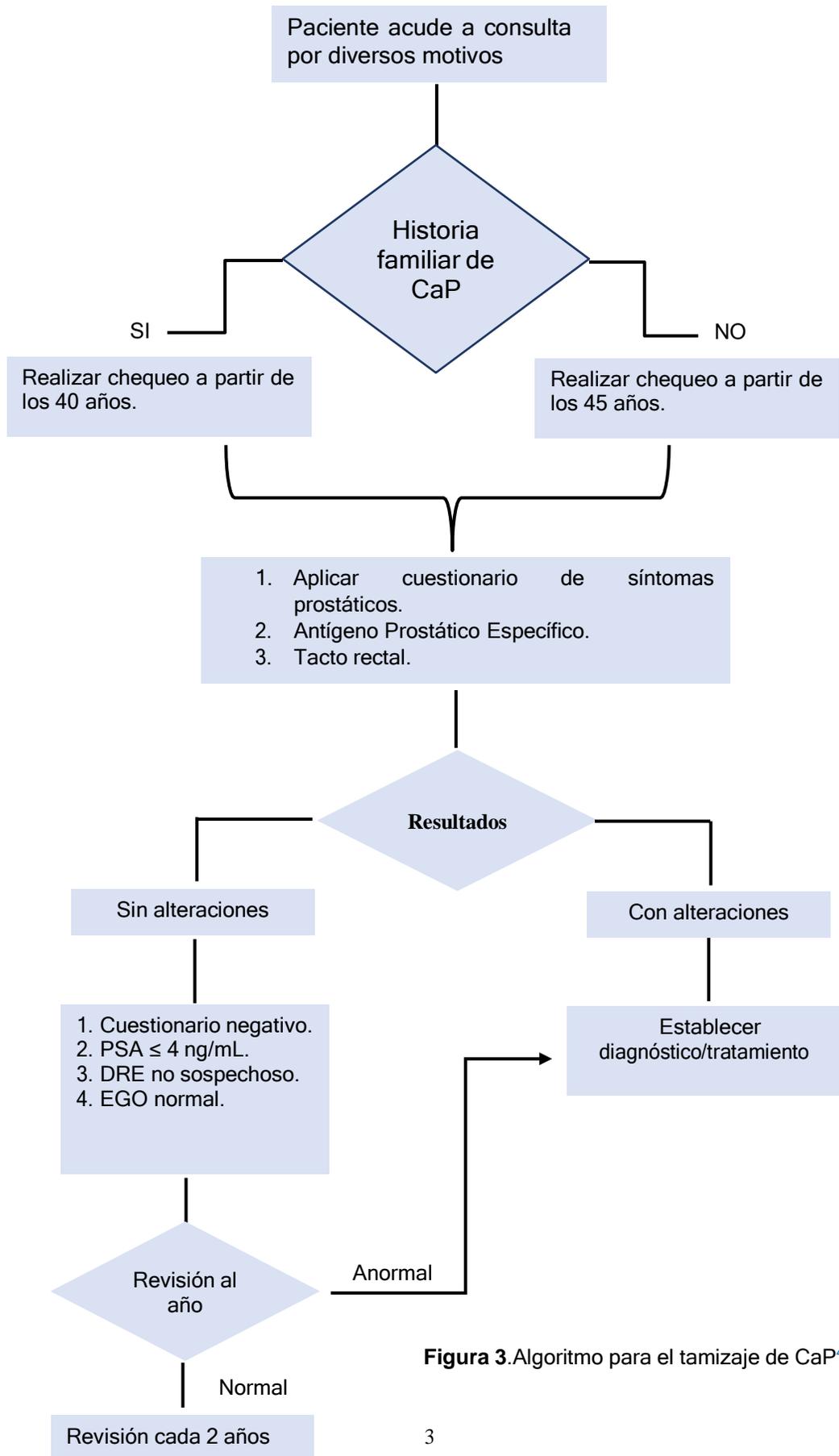


Figura 3. Algoritmo para el tamizaje de CaP⁴.

1.2.2 Utilidad del Antígeno Prostático Específico (PSA) para el tamizaje de CaP

El PSA es una proteasa de serina miembro de la familia de la calicreína 3-peptidasa (KLK3) producida por las células epiteliales prostáticas (6). Su principal función es hidrolizar las proteínas de alto peso molecular producidas por las vesículas seminales, permitiendo así la liberación de espermatozoides del coágulo (7). Su cuantificación es utilizada para el diagnóstico y la detección de pacientes con carcinoma prostático, siendo el primer biomarcador tumoral aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) (8). Los hombres con enfermedades prostáticas, incluido el adenocarcinoma de próstata, pueden tener niveles elevados de PSA en suero debido a una mayor producción de PSA, así como a distorsiones arquitectónicas en la glándula que permiten un mayor acceso de PSA a la circulación (9). Sin embargo, la biopsia de próstata, la prostatectomía transuretral, la retención urinaria aguda y la prostatitis aguda pueden elevar los niveles de PSA, disminuyendo así su especificidad. Por lo que, en este sentido, muchos resultados por encima de los valores normales (Tabla 1) pudiesen ser no indicativos de la enfermedad (falsos positivos).

Tabla 1. Valores normales de PSA de acuerdo con diferentes grupos de edad.²

Grupo de edad (años)	Valores normales PSA (ng/mL)
30-49	0.6-0.78
50-59	0.7-1.23
60-64	1.2
65-69	1.43

Además, se ha debatido si las variaciones entre kits para la detección de PSA son clínicamente significativas.

A pesar de que la biopsia prostática es considerada el estándar de oro para la detección de CaP, ésta se realiza cuando los resultados de PSA (> 4.0 ng/mL) o el examen digital rectal (DRE) suscitan preocupación por parte del clínico, por lo que niveles elevados de PSA (falsos positivos) conducen al sobrediagnóstico y a la realización de biopsias innecesarias.

El umbral en el que un resultado de PSA es indicativo de biopsia aún no está del todo claro (9). En un estudio publicado por Gann y colaboradores se evaluó la relación entre los niveles de PSA en suero y el posterior diagnóstico de CaP. Se encontró que el valor de corte de 4.0 ng/mL de PSA obtuvo un 46% de sensibilidad con respecto a la identificación de casos de CaP que ocurrirían en los próximos 10 años. La especificidad obtenida fue del 91% en esta población (con una media de edad de 63 años), sin embargo, esta varía según la edad de los sujetos en estudio y de la probabilidad subyacente de HPB, obteniéndose valores de especificidad de tan solo el 54% en hombres mayores con HPB (10). Además, los valores de PSA no distinguen entre pacientes con CaP clínicamente significativo con necesidad de tratamiento, de aquellos con necesidad de vigilancia activa (11) y, a pesar de que la determinación de PSA ha disminuido la mortalidad del CaP, ha aumentado el costo por el sobrediagnóstico (12).

En un principio se pensaba que PSA era producida exclusivamente en la próstata. Sin embargo, estudios demuestran que esta proteína se expresa en múltiples tejidos no prostáticos (13). Diversos estudios informan que en mujeres la expresión de esta proteína está altamente relacionada con varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama (14), sin embargo, otros estudios han demostrado niveles de PSA detectables en suero en mujeres sin enfermedad mamaria o con enfermedades mamarias benignas (tumores benignos, mastalgia, entre otras) (15). El papel fisiológico de PSA en los tejidos no prostáticos sigue siendo desconocido, pero se cree que pudiese estar involucrado en la regulación de factores de crecimiento (16).

A pesar de que el cáncer de próstata es una enfermedad grave, la mayoría de los hombres diagnosticados en etapas tempranas sobrevive a la enfermedad. Datos de la *American Cancer Society* sugieren que más de 3.1 millones de hombres estadounidenses diagnosticados con cáncer de próstata en estadio temprano siguen con vida hasta el día de hoy.

1.2.3 Diagnóstico confirmatorio de CaP

La biopsia transrectal es estándar de oro para la confirmación de CaP (17). Esta procede si existen valores de PSA por encima del valor de corte (4 ng/mL) y si en el DRE se palpa rigidez prostática, ya que podría ser indicativo de la presencia de un tumor (18).

El diagnóstico se lleva a cabo mediante el examen de la arquitectura glandular de la muestra. Cuando se manifiesta el cáncer, las células epiteliales se replican de manera incontrolada, lo que interrumpe la disposición regular de las glándulas (Figura 4).

Por otro lado, la agresividad del cáncer se determina a través de una clasificación histológica. Esta es una herramienta valiosa para los médicos debido a que ayuda a identificar la extensión de la enfermedad, se puede correlacionar con la supervivencia del paciente y ayuda a determinar opciones terapéuticas adecuadas (19). El método más común para realizar la clasificación histológica del tejido prostático es el sistema de clasificación de Gleason (20). En este sistema (Figura 5), el tejido se clasifica en cinco grados, numerados del 1 al 5. El grado aumenta conforme aumenta el nivel de malignidad y, por lo tanto, la agresividad del cáncer. El grado Gleason caracteriza la diferenciación tumoral, es decir, el grado de semejanza del tejido tumoral con el tejido sano. Al final, el patólogo otorga una puntuación, la cual representa la suma de los grados más predominantes presentes en la sección del tejido analizado, los cuales van de <6 correspondiente

a cáncer bien diferenciado o de bajo grado a 10, un cáncer poco diferenciado o de alto grado y mal pronóstico.

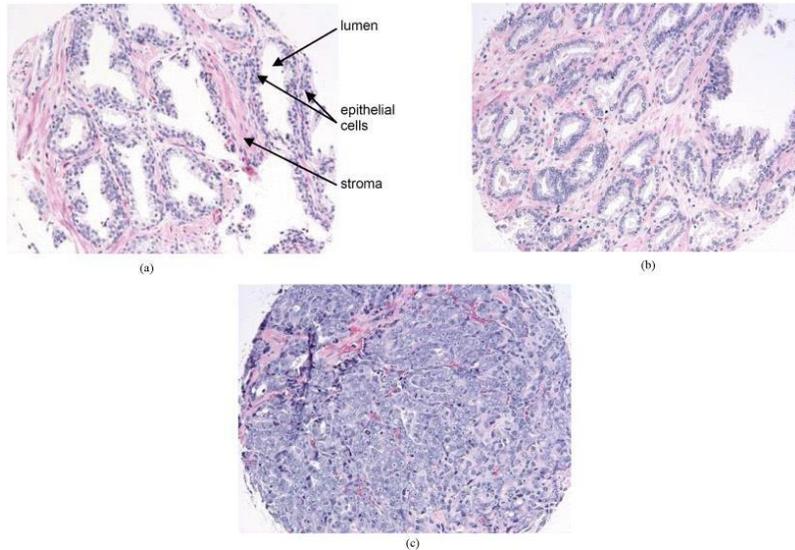


Figura. 4 Biopsia de próstata teñida con H y E, podemos observar los diferentes grados de diferenciación. a) Normal, b) grado 2 (bien diferenciado) y c) cáncer grado 5 (poco diferenciado). Se observa como el estroma prácticamente desaparece. ¹⁷

Las muestras se obtienen perforando toda la superficie de la glándula prostática, intentando obtener muestras de la zona periférica (el 75% de los adenocarcinomas dependen de esta área). Se obtienen de manera convencional un total de 12 fragmentos, seis de cada lóbulo (21). Aunado a lo invasivo que resulta ser el procedimiento antes descrito, se presentan riesgos asociados, los cuales son principalmente: sangrado (sangrado rectal, hematospermia y hematuria) y fiebre (infecciones del tracto urinario, sepsis). Estos síntomas se presentan en aproximadamente 2% al 20% de los procedimientos en todo el mundo(22). Por otro lado, la histología convencional y la clasificación de Gleason en el diagnóstico de cáncer, descrita anteriormente, es propensa a la subjetividad y a una limitada reproducibilidad debido a su gran dependencia a la interpretación

humana, que por supuesto, está propensa a errores, omitiendo del 21% al 28% de los casos de cáncer de próstata (23).

Debido a todos los inconvenientes presentados anteriormente y a que una de las causas de la alta mortalidad del CaP es el diagnóstico en estadio avanzado, grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de biomarcadores con alta sensibilidad y especificidad que permitan el abordaje preciso de la enfermedad.



Figura5. Diagrama de clasificación de Gleason.¹⁷

1.3 Nuevos Métodos de Diagnóstico

Debido a la baja sensibilidad y especificidad de los métodos de diagnóstico convencionales y de los riesgos inherentes de los mismos, existe la necesidad de desarrollar biomarcadores más específicos que permitan el abordaje oportuno de la enfermedad. En la actualidad se han centrado los esfuerzos en la detección, mejoramiento y validación de marcadores moleculares basados en muestras de sangre/orina en lugar de muestras de tejido, las cuales se han denominado

biopsias líquidas. Estas biopsias líquidas abordan dos inconvenientes que se presentan en las biopsias de tejido convencionales: 1) lo invasivo que resulta ser este procedimiento y 2) la heterogeneidad tumoral que dificulta la interpretación de los resultados (24). Pautas de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) de 2018, sugieren el uso de biomarcadores y de la resonancia magnética multiparamétrica antes de realizar una biopsia, disminuyendo de un 20 al 30% las biopsias innecesarias (25). Los biomarcadores de sangre u orina (Tabla 2) propuestos como una alternativa a la biopsia inmediata puede mejorar la especificidad, sin embargo, poco se han estudiado en la población mexicana.

Tabla 2. Biomarcadores propuestos como alternativas a la biopsia inmediata. ²²

Prueba	Muestra	Componentes
PHI	Suero	PSA, fPSA, proPSA.
4Kscore	Suero	PSA, fPSA, PSA intacto, calicreína humana 2.
ExoDx Prostate	Orina	Factor de transcripción ETS, ERG, PCA3.
Michigan Prostate Score	Orina	PCA3, PSA, TMPSS2:ERG.
SelectMDx	Orina	mRNA DLX1, HOXC6.
ConfirmMDx	Tejido	Metilación del DNA, GSTP1, APC, RASSF1.

PSA: Antígeno Prostático Específico., fPSA: PSA libre., TMPSS2:ERG: gen de fusión., DLX1: *Distal-Less Homeobox 1.*, HOXC6: *Homeobox C6.*, GSTP1: glutatión S-transferasa p1., APC: *Adenomatous polyposis coli.*, RASSF1: *Ras Association Domain Family Member 1.*

Se ha demostrado que los fluidos prostáticos son una fuente de sustancias derivadas de células de cáncer de próstata, las cuales se exudan en la orina

después de un DRE, algunas de ellas pueden ser detectadas en orina incluso sin la manipulación de la próstata mediante ensayos altamente sensibles (26).

Biomarcadores candidatos tales como células de cáncer de próstata, proteínas, exosomas, ácidos nucleicos (DNA, RNA) y moléculas pequeñas, pueden ser detectados en orina (22).

1.3.1 RNAs largos no codificantes

Desde que se propuso el dogma central de la biología molecular en 1961, el ARN fue considerado como un intermediario entre el ADN y las proteínas. El dogma central de la biología molecular nos ha proporcionado un marco simplificado de cómo la información genética se traduce en una gran diversidad de procesos biológicos. Posterior a esto, se descubre que los mRNAs son tan solo una pequeña fracción de la población total de ARN, entre los cuales también destacan los ARN no codificantes (ncRNA). Estos, a pesar de no codificar proteínas tienen funciones estructurales, catalíticas y reguladoras (27). Según su expresión y función se puede clasificar en grupos que incluyen ncRNA de mantenimiento (ARN ribosómico, ARN de transferencia, ARN nuclear pequeño y ARN nucleolar pequeño), reguladores y varios tipos de ncRNA no caracterizados adecuadamente. Conforme su tamaño, los ncRNA reguladores pueden clasificarse como pequeños (18-200 pb, por ejemplo, miRNA, siRNA y piRNA) y largos (lncRNA > 200 pb) (28).

De acuerdo con los datos obtenidos de ENCODE (*encyclopedia of DNA elements*), en el 2012 se encontraron alrededor de 9,640 loci de lncRNA en el genoma humano (29), número que continúa al alza. Estudios demuestran que los lncRNA están involucrados en la organización de la cromatina, regulándola de manera tanto transcripcional como postranscripcional (30), esto ha revolucionado nuestra comprensión de la arquitectura, actividad y regulación del genoma eucariota. Diversos estudios han demostrado la importancia de los lncRNA como moduladores de procesos celulares clave no solo en la fisiología normal sino

también en enfermedades como el cáncer, incluido el CaP (Tabla 3) (31). Los lncRNA expresados de manera aberrante pueden ser indicativos de ciertas etapas en la progresión del cáncer (32). Por lo tanto, tienen el potencial de ser aplicables para el diagnóstico de cáncer de próstata, además de ser criterios potenciales en la elección de la terapia y posibles nuevos blancos terapéuticos (31). A pesar de que actualmente hay una gran cantidad de lncRNA implicados en el CaP (Tabla 3), en este trabajo nos enfocaremos en PCA3.

LncRNA	Expresión en CaP	Implicaciones en CaP
PCA3	↑	Biomarcador involucrado en la señalización AR, el crecimiento celular y la viabilidad. Regula la expresión de genes importantes relacionados con el cáncer.
SChLAP1	↑	Su sobreexpresión se asocia con riesgo de recurrencia bioquímica, progresión clínica, metástasis y mortalidad específica por CaP.
SPRY4-IT1	↑	Su <i>knockdown</i> con siRNA inhibe la proliferación e invasión celular y aumenta la apoptosis.
MALAT1	↑	Su sobreexpresión es considerada como un indicador de mal pronóstico. Se une a EZH2 para mejorar la migración y la invasión.
TRPM2-AS	↑	Su sobreexpresión se asocia con un mal pronóstico.
NEAT1	↑	Altera el estado epigenético de genes diana para impulsar el crecimiento oncogénico.
PCGEM1	↑	Relacionado al AR. Promueve la proliferación celular.
PCAT1	↑	Promueve la proliferación celular y reprime a BRCA2.
PCAT6	↑	Predictivo de progresión tumoral por señalización con AR.
PCAT7	↑	Sobreexpresión en CaP primario y metastásico. Su <i>knockdown</i> con siRNA reduce el crecimiento celular.

PCAT18	↑	Predictivo de progresión tumoral por señalización AR.
PRNCR1	↑	Asociado con la susceptibilidad al CaP. Podría estar involucrado en la carcinogénesis de próstata mediante el AR.
CTBP1-AS	↑	Promueve el crecimiento de CRPC mediante la regulación epigenética de genes asociados acáncer.
HOTAIR	↑	Se une al AR para evitar su degradación. Su sobreexpresión aumenta el crecimiento celular y la invasión.
SOCS2-AS1	↑	Promueve la proliferación celular, la migración e inhibe la apoptosis.
POTEF-AS1	↑	Promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis.
GAS5	↓	Supresor de tumor. Reprime la acción del AR y promueve la apoptosis.
H19	↓	Reprime la migración celular
PCAT29	↓	La baja expresión de PCAT29 se correlacionó con malos resultados pronósticos. La sobreexpresión suprime el crecimiento celular y la metástasis

AR: receptor de andrógenos, CRPC: cáncer de próstata resistente a castración.

1.3.2 PCA3

PCA3, conocido originalmente como DD3 (*differentialdisplay clone 3*), fue descrito por primera vez en 1999 por Bussemakers et al. (33) como un gen expresado específicamente en CaP. En ese estudio se analizaron sujetos con próstata normal, HPB y CaP y se comparó su patrón de expresión de ARNm. Se demostró que su expresión era 10-100 veces mayor en más del 95% de los tumores de próstata en comparación a tejidos adyacentes no neoplásicos en 53 de 56 pacientes tratados con prostatectomía radical. De acuerdo con este estudio los tumores indiferenciados expresan más PCA3. El estudio también indicó que la expresión de PCA3 es característica del tejido prostático, ya que no se expresó en los 18 diferentes tejidos estudiados.

El gen de PCA3 se encuentra en el cromosoma 9q21-22, la estructura clásica del gen consta de cuatro exones, sin embargo, se sabe que es más compleja y que incluye exones adicionales (Figura 6) (31).

El transcrito más común contiene los exones 1, 3, 4a y 4b. El ARNm de PCA3 contiene una alta densidad de codones de paro lo que lo lleva a ser un ncRNA, cuya función biológica aún no se conoce por completo. Datos recientes sugieren que PCA3 está involucrado en el control de la supervivencia en células de cáncer de próstata, en parte al modular la actividad transcripcional de los genes diana del receptor de andrógenos (Figura 7) (35). El gen de PCA3 se encuentra entre los exones 7 y 8 del gen PRUNE2 en dirección antisentido (figura 6), y participa a su vez en su regulación (figura 7).

El *knockdown* de PCA3 inhibe la señalización del AR, el crecimiento celular y la viabilidad, lo que sugiere que la sobreexpresión de PCA3 puede modular la señalización del AR en las células tumorales. Así mismo, conduce a la regulación positiva parcial de los marcadores epiteliales como E-cadherina, claudina-3 y citoqueratina-18, y la regulación negativa del marcador mesenquimatoso

vimentina(36). PCA3 también regula la expresión de genes importantes relacionados con el cáncer, los cuales están involucrados en apoptosis, angiogénesis, transducción de señal y adhesión celular (31).

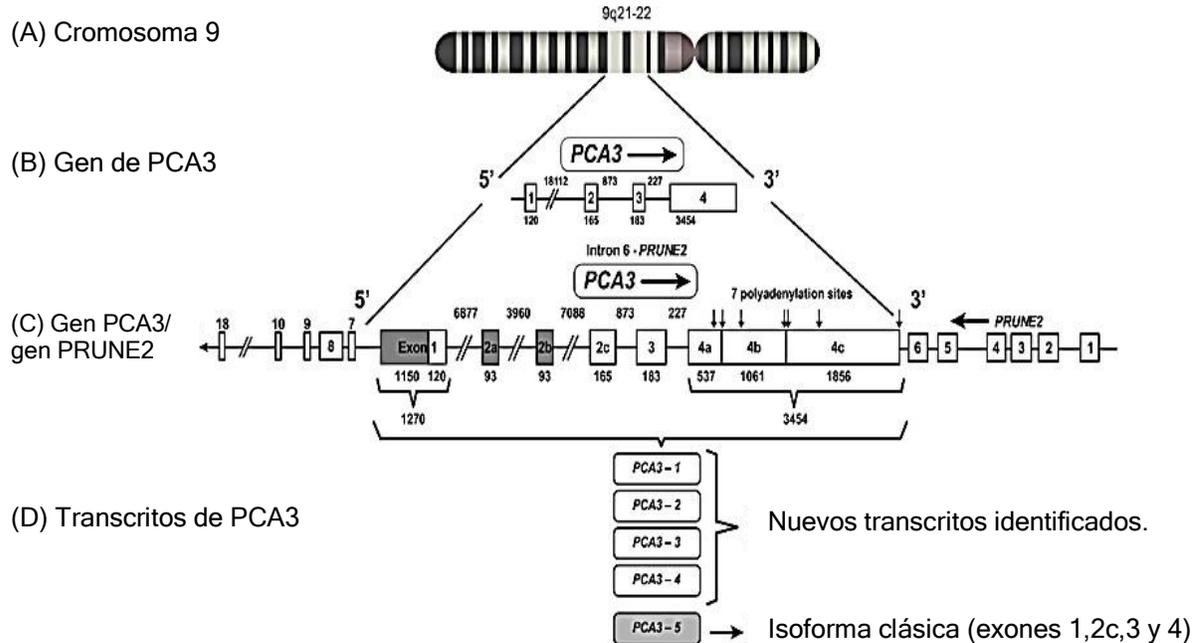


Figura6. Localización, estructura y transcritos de PCA3.(A) El gen PCA3 se localiza en el cromosoma 9q21-22. (B) Estructura clásica de PCA3 que contiene 4 exones. (C) Estructura actualizada de PCA3 que presenta una unidad transcripcional más compleja, que incluye exones adicionales. En esta descripción, se encontró que el exón 1 era 1150 pb más largo, comprendiendo 1270 pb. Se describieron tres exones con empalme alternativo en el exón 2 (2a, 2b y 2c) y se observaron cuatro sitios de poliadenilación adicionales en el exón 4, lo que eleva el número total de sitios de poliadenilación a siete. (D) Transcritos de PCA3.³⁴

La expresión de PCA3 ha mostrado aplicaciones prometedoras para el diagnóstico de CaP en muestras de orina después de un intenso masaje prostático, así como en muestras de sangre y tejidos. La regulación positiva de la expresión de PCA3 en los tejidos de CaP parece ser un evento temprano en el desarrollo del cáncer, ya que su expresión se ha observado en tumores bien diferenciados, moderadamente diferenciados y poco diferenciados (37), por lo que

podría ser utilizado como un biomarcador para la detección temprana y progresión tumoral, por lo que se podría reducir la realización de biopsias innecesarias.

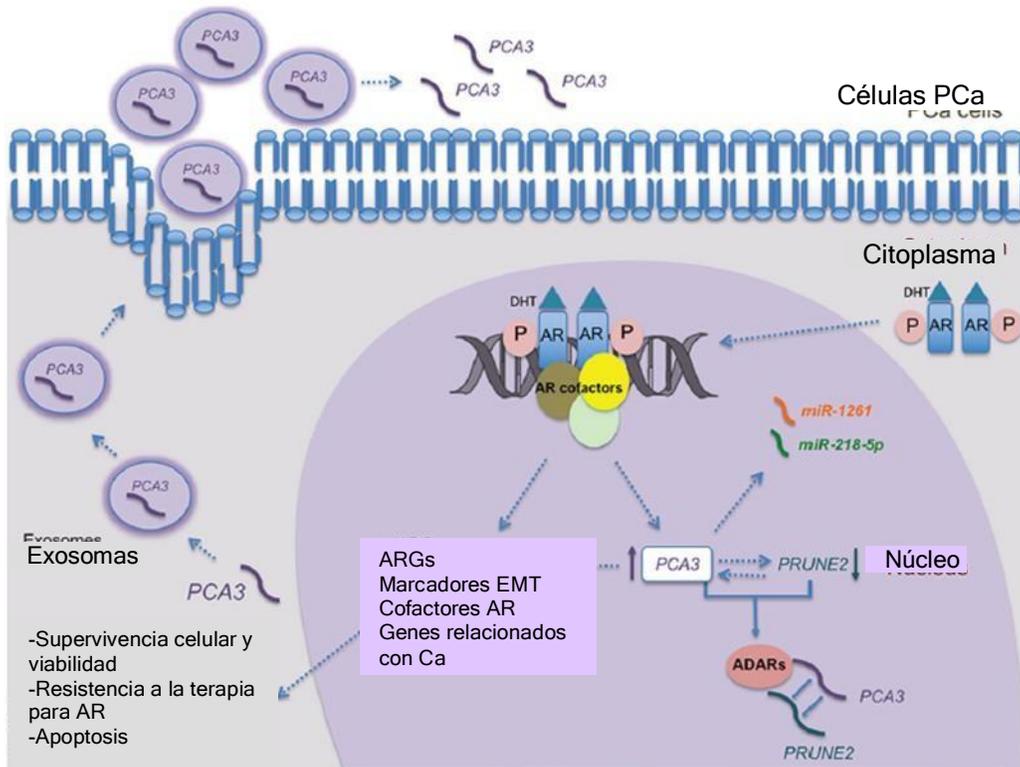


Figura7. Modulación de genes del AR por PCA3. Los transcritos de PCA3 localizados tanto en núcleo como en citoplasma están regulados por la señalización de andrógenos. El andrógeno o la dihidrotestosterona (DHT) se une al AR promoviendo su fosforilación, lo que conduce a su dimerización y translocación al núcleo. El AR fosforilado se une a las regiones promotoras de los genes diana lo que conduce a la activación de su expresión, incluido PCA3 el cual modula la expresión de genes clave relacionados con el cáncer, incluido PRUNE2. La unión de PCA3 al pre-mRNA de PRUNE2 forma un complejo bicatenario el cual se une a las proteínas ADAR, lo que regula los niveles tanto de PCA3 como de PRUNE2. Además, PCA3 modula negativamente a PRUNE2 y viceversa. A su vez, PCA3 puede modular a miRNA, como lo son miRNA-1261 y miR-218-5p mediante complementariedad de bases.³⁴

1.3.2.1 PCA3 en el diagnóstico de CaP

La necesidad de pruebas de diagnóstico en CaP con una mayor especificidad y sensibilidad sigue siendo un reto. Como un ARNm específico de la próstata que se sobreexpresa en las células de CaP, PCA3 es un objetivo ideal y su detección en fluidos biológicos es atractiva debido a su alta especificidad.

Se han desarrollado diversas metodologías para la medición de PCA3 en orina, sangre periférica y tejido prostático obtenido mediante biopsias. Sin embargo, hasta la fecha, la prueba ProgenSA™ para la detección de PCA3 en orina, es la única aprobada por la FDA (2012). Esta prueba tiene la finalidad de mejorar la selección de pacientes con riesgo de una biopsia positiva y, a su vez, brindar datos de pronóstico, diferenciando entre cánceres significativos de aquellos de bajo riesgo, evitando así el sobretratamiento y sobrebiopsiado (38).

El diagnóstico de ProgenSA se basa en la amplificación mediada por transcripción (TMA) para determinar el score de PCA3 mediante la medición de su ARNm en orina después del DRE. Para una medición precisa se hace uso de un factor de normalización y dado que se ha demostrado que la calicreína 3 peptidasa (KLK3), gen que codifica a PSA, tiene una regulación positiva en CaP se selecciona como factor de normalización (38). Por lo tanto, el método mide los ARNm de PCA3 y PSA (copias/mL), este último cuya función es de gen constitutivo, normaliza numéricamente PCA3 para producir una proporción de ambos ARNm, denominado score de PCA3:

$$\text{score de PCA3} = \frac{\text{Número de copias de PCA3}}{\text{Número de copias de PSA}} \times 1000$$

Sin embargo, esta prueba solo se encuentra disponible en la Unión Europea, Canadá y Estados Unidos. El análisis de costo-efectividad en Latinoamérica indicó que su uso no es factible (39), por lo que su utilización en

países en vías de desarrollo resulta controversial. Además, el umbral para el score de PCA3 debe ser debatido para establecer una guía para su aplicación clínica ya que hay discordancia con lo reportado por diversos autores, así como la influencia de la etnia para la toma de decisiones en biopsias repetidas.

En México, el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) desarrolló una prueba para la detección de PCA3 en orina basada qRT-PCR para la obtención de ADNc de PCA3. A pesar de que fue posible detectar a PCA3 en orina, no se obtuvieron rangos esperados de amplificación esperados para la q-PCR (40).

A pesar de que la detección de PCA3 mediante q-PCR es posible y ha demostrado su aplicabilidad, este método presenta varias desventajas: la necesidad de personal altamente capacitado y de equipos especializados, tiempo alto de espera, así como la necesidad de utilizar transcriptasa reversa, que en conjunto hacen que la prueba sea costosa para aplicarse en el tamiz de CaP. Finalmente, se necesitan pruebas para tamizaje inicial más simples, con un enfoque robusto y reproducible que pueda implementarse fácilmente en un laboratorio clínico. Es aquí donde la nanotecnología luce como una herramienta prometedora.

1.4 La Nanotecnología aplicada a diagnóstico y tratamiento en medicina

La detección temprana de biomarcadores circulantes (CB) en fluidos corporales accesibles como la sangre o la orina tiene el potencial de mejorar la supervivencia de pacientes con cáncer. Los cuatro CB más comunes con excelente potencial diagnóstico, pronóstico y terapéutico son las CTCs, ácidos nucleicos específicos de tumor circulante (ctDNA, ctRNA, miRNAs, lncRNA), vesículas extracelulares (exosomas, cuerpos apoptóticos, etc.) y autoanticuerpos (41). Para capturar estos CB en muestras clínicas, los médicos pueden realizar una 'biopsia líquida'. Esta es una herramienta de diagnóstico prometedora no invasiva o mínimamente invasiva para el diagnóstico oportuno de cáncer. Un requisito previo

fundamental en el desarrollo de diagnósticos basados en CB es la capacidad de medirlos en fluidos corporales (suero, plasma, etc.) con la precisión y sensibilidad adecuadas, lo que ha llevado al desarrollo de plataformas simples e innovadoras para su medición.

La nanotecnología tiene una gran variedad de aplicaciones, incluyendo diagnóstico y tratamiento en el campo de la Nanomedicina. Por ejemplo, el diagnóstico molecular mediante el uso de sustancias a nanoescala, (nanopartículas de oro, puntos cuánticos y otros nanomateriales) puede proporcionar pistas claras para el diagnóstico del cáncer. El diagnóstico molecular asistido por nanotecnología ha mejorado la detección de biomarcadores aumentando su sensibilidad realizando el análisis en pocos minutos (42). La detección y cuantificación de ácidos nucleicos específicos de tumor se basa en un evento de reconocimiento molecular, típicamente la hibridación de una cadena (miRNA, lncRNA, etc.) con una sonda de ácido nucleico (o un análogo sintético) a través del emparejamiento de bases Watson-Crick, que se acopla a un mecanismo de transducción que da como resultado una señal medible. La principal diferencia entre los métodos convencionales y basados en nanotecnología radica en el mecanismo de transducción, por lo que las propiedades fisicoquímicas peculiares de los materiales nanoestructurados son esenciales para mejorar la lectura de la señal (43).

1.4.1 Nanopartículas de oro (AuNP)

Las nanopartículas (NPs) tienen excelentes propiedades ópticas que los hacen ideales para el desarrollo de estrategias de detección, un ejemplo de esto son las NPs de oro (AuNP).

Las AuNP han sido ampliamente utilizadas debido a sus propiedades únicas, una de ellas es la facilidad de funcionalizar su superficie. Esta propiedad de las AuNP nos brinda una plataforma versátil para ensamblajes nanobiológicos con oligonucleótidos, anticuerpos, y proteínas (44). Los bioconjugados de AuNP

también se han convertido en candidatos prometedores en el diseño de nuevos biomateriales para la investigación de sistemas biológicos (45).

La versatilidad de las AuNPs las ha hecho útiles en una amplia gama de aplicaciones (Figura 8) tales como:

- 1) Diagnóstico: su unión con los analitos puede alterar algunas de las propiedades fisicoquímicas de AuNP, lo que conduce a señales detectables.
- 2) Plataformas para la liberación controlada de fármacos.
- 3) Imagenología.
- 4) Terapia fototérmica.

Entre otras. En este trabajo nos centraremos en la utilidad de las AuNP en el diagnóstico.

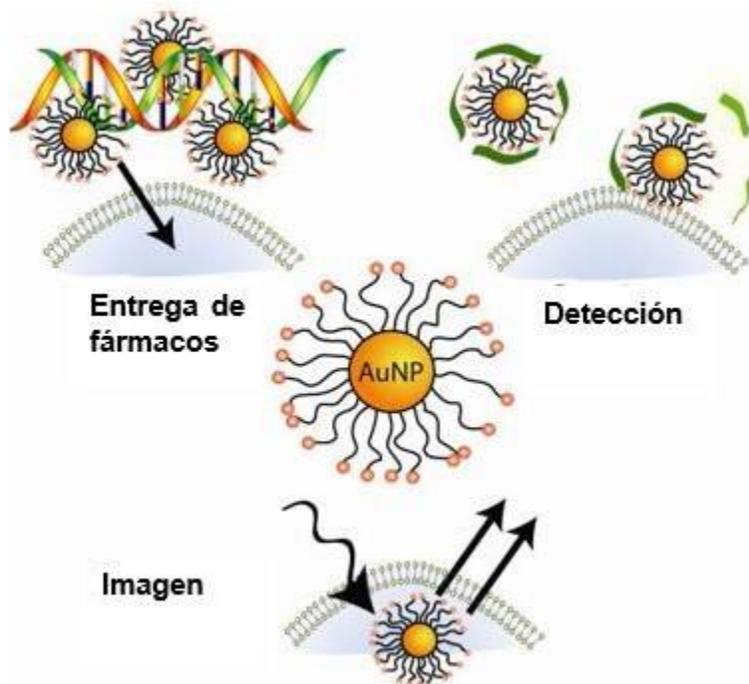


Figura8. Aplicación de las AuNP en la bionanotecnología.⁴⁴

Las AuNP esféricas poseen propiedades optoelectrónicas relacionadas con su tamaño y forma (46), una gran relación superficie-volumen, excelente biocompatibilidad y baja toxicidad. Todas estas propiedades las hacen un candidato importante en la Biomedicina.

19

Las AuNPsexhiben rangos de colores en solución acuosa a medida que el tamaño del núcleo aumenta de 1 a 100 nm (marrón, naranja, rojo y morado), mostrando un pico de absorción entre los 500 y 550 nm (47). Esta banda de absorción surge de la oscilación colectiva de los electrones de conducción debido a la excitación resonante de los fotones incidentes (Figura 9), lo que se denomina “banda de plasmón superficial”(48). Este fenómeno está influenciado por el tamaño, la forma, el solvente, el ligando desuperficie, la carga del núcleo, la temperatura e incluso es sensible a la proximidad de otras NPs (49).

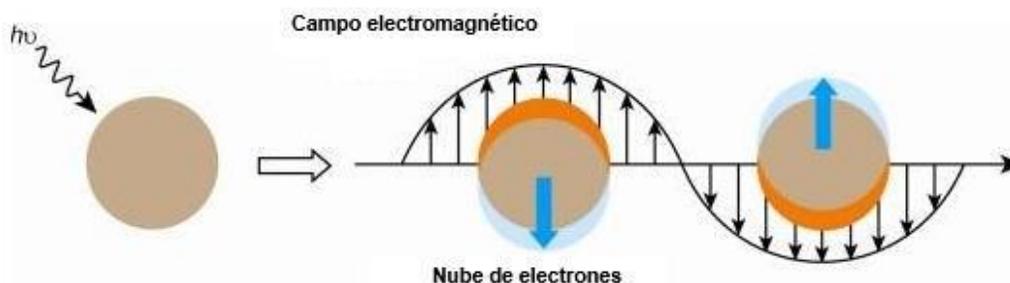


Figura 9. Representación esquemática de la oscilación de electrones de conducción a través de la AuNP en el campo electromagnético de la luz incidente. ⁴⁴

La capacidad de las AuNP de actuar como desactivador de la fluorescencia en los fluoróforos proximales está dada por la vía de desactivación basada en la buena superposición entre el espectro de emisión de fluoróforos excitados y la banda de plasmón superficial de lasAuNP (50).

Sus propiedades físicas más destacables incluyen la resonancia del plasmón de la superficie (RPS), fenómeno único presente en nanopartículas de

metales nobles o plasmónicas, generando fuertes campos electromagnéticos que, en consecuencia, mejora propiedades radiativas como absorción y dispersión; y su capacidad de actuar como desactivador (*quenching*) de la fluorescencia. Entre sus propiedades físicas la RPSy el alto coeficiente de absorción de rayos X, son utilizados ampliamente en el diagnóstico y tratamiento de tumores (51).

La RPS de las AuNPs puede conducir a la espectroscopía de Raman de superficie mejorada (SERS), fluorescencia amplificada por superficie (SEF) y respuestas colorimétricas (52). Estas cualidades han permitido su aplicación para la detección no invasiva *in vivo*, *in situ* *in vitro*.

Cuando la RPS ocurre en escalas nanométricas se produce un plasmón de superficie localizado (LSPR) (53). Con esto, las AuNPs presentan dos efectos importantes: mejoras en el campo electromagnético local y un coeficiente de extinción. Estos campos electromagnéticos pueden amplificarse en varios ordenes de magnitud, esta mejoría ocurre en áreas de curvatura local o *hot spots* (54), lo que permite la mejora de señales espectrales de sustancias cercanas a la superficie, amplificando la señal hasta 1000 veces (55).

Se han utilizado las AuNPs para la detección de mRNA intracelular en células de cáncer(56), así como para el reconocimiento de células cancerosas en cáncer de pulmón (57), leucemia linfocítica (58) y linfoma de Burkitt (59).

1.6 Antecedentes del grupo de trabajo

En el 2014 se inició la línea de nanomedicina en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Universidad Autónoma de Nuevo León en conjunto con el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) (60), y posteriormente con la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) (61). A partir de esto se generaron tres tesis que fungen como antecedentes directos del presente trabajo (62,63).

Se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron tres diferentes nanosistemas (M-PEG/Tween 80, M-CS/Tween 80, M-PEI). Se observó que el sistema MNPs-PEI presentaba las características requeridas para considerarse como vehículo para la administración de terapia dirigida contra HER2 y se logró optimizar la funcionalización de las nanopartículas M-PEI con pTracer/sTRAIL, un aptámero contra HER2, como posible terapia inductora de apoptosis contra cáncer de mama HER2+.

Por otro lado, se logró estandarizar una batería de pruebas para evaluar la biocompatibilidad de nanosistemas, con lo que nos aseguramos de que la seguridad al utilizar el nanosistema evaluado.

En otro trabajo, se planteó la construcción de un nanosistema que combine tres elementos: plásmido recombinante inductor de muerte celular (pTracer-TRAIL), AuNP recubiertas de PEI, una capa de un nanocomposito compuesto de PEI modificado con goma de mezquite (64) y aptámeros específicos contra los receptores HER2 con el fin de utilizarlo para generar apoptosis exclusivamente en células cancerosas de mama que sobreexpresen HER2.

Como antecedente directo de trabajo tenemos la tesis de maestría de Aarón Benites en la cual se cuantificó lncRNAPCA3 por medio de qPCR, y se demostró la expresión del lncRNA PCA3 y PSA en muestras de tejidos de cáncer de próstata, mientras que la expresión de ambos no fue detectada en pacientes con

hiperplasia prostática benigna. Por lo que se comprobó que PCA3 es un biomarcador que se expresa en tejidos de cáncer de próstata de pacientes del noreste de México.

Es importante destacar que el grupo de trabajo cuenta con un proyecto CONACYT aprobado; de la Convocatoria-2018-1 (Clave FSSEP02-C-2018-1) del FOSEC SEP-INVESTIGACIÓN BÁSICA. El título del proyecto es “Desarrollo de nanomateriales poliméricos inteligentes y multifuncionales aplicados a la nanomedicina” con la clave A1-S-9859 en la modalidad A1. El proyecto se formalizó en septiembre del 2019 y finalizará en septiembre del 2022. En este proyecto se propuso el diseño, síntesis, caracterización y ensayos in vitro de nanosistemas multifuncionales para teragnosis en cáncer de mama y próstata. El presente trabajo de tesis forma parte del proyecto referido (A1-S-9859).

1.7 Justificación

En hombres mayores de 50 años los niveles de PSA mayores a 4 ng/ml en suero son sugestivos de CaP, y la confirmación se realiza mediante una biopsia transrectal cuando en el tacto digital rectal se presentan signos de sospecha. En muchos de los casos esta biopsia resulta ser negativa o clínicamente no significativa.

Debido a la elevada incidencia de CaP en nuestra población, son necesarias nuevas pruebas que apoyen el tamizaje inicial. Nuestro grupo de trabajo propuso a PCA3 como una alternativa para mejorar la detección de pacientes con CaP, y ha comprobado la sobreexpresión del lncRNA PCA3 en CaP por q-PCR comparado con HPB.

En este trabajo proponemos una alternativa para la detección de cDNA de PCA3 mediante dos nanosistemas compuestos de nanopartículas de oro (AuNPs) acoplados a sondas específicas dirigidas contra PCA3 como una alternativa al tamizaje de CaP.

1.8 Hipótesis

Los nanosistemas de AuNPs acoplados a sondas específicas permiten la detección del cDNA del lncRNA PCA3.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo General

- Detectar el cDNA del lncRNA PCA3 por medio de dos nanosistemas de AuNPs acoplados a sondas específicas.

1.9.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la dinámica de hibridación entre dos sondas y el cDNA de PCA3 mediante una curva de disociación (*melting curve*).
2. Construir y caracterizar dos nanosistemas AuNPs conjugados con las sondas.
3. Realizar y analizar la curva de disociación con los nanosistemas AuNPs conjugados a sondas utilizando cDNA de PCA3 como blanco y comparar la dinámica con las sondas no conjugadas.

CAPITULO II

Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Reactivos:

Agua bidestilada, buffer TE pH 7.4 grado biología molecular, EvaGreen® 20X, gBlock™ de PCA3 (*Integrated DNA Technologies, Inc.*), sonda TMerEx3Cy3 (*Integrated DNA Technologies, Inc.* número de referencia: 288135977), sonda TMer3+4_5TAMN (*Integrated DNA Technologies, Inc.* número de referencia: 288135978), *primer forward*333F (*Integrated DNA Technologies, Inc.* número de referencia: 277493023), *primer reverse*609R (*Integrated DNA Technologies, Inc.* número de referencia: 277493024), Cloruro de magnesio (MgCl₂) 25 mM Promega, buffer 5X Promega, nanopartículas de oro conjugadas con maleimida de 20 nm (*Cyodiagnosics*, lote MKCM1945), agarosa grado biología molecular (Bioline, BIO-41026), GelRed® 10,000X.

Materiales:

MicroAmpOptical96-well ReactionPlate (AppliedBiosystems™, N8010560), puntillas para micropipeta de 10,200 y 1000 µL, microtubos de 0.2, 0.5, 1.5 mL, *100kDa MWC Spin Column*(número de catálogo: 88503).

Equipos:

NanoDrop®*ND-1000*(Número de serie: 7136),StepOnePlus™ Real Time PCR System (Appliedbiosystems),termociclador MJ Mini™ (Bio-Rad), Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK).

2.2 Estrategia General de Trabajo

A continuación, se presenta el esquema general de trabajo (Figura 10), el cual se realizó en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, así como en el departamento de Genética, ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV).



Figura 10. Esquema general de trabajo.

2.2 Estandarización de la hibridación de dos sondas mediante detección de fluorescencia con cDNA de PCA3

Con la asesoría del Dr.C. Hugo Gallardo Blanco, se realizó el diseño de las dos sondas marcadas con fluoróforos distintos (Figura 11) en el extremo 3' de una de las sondas se colocó Cy3, un colorante fluorescente perteneciente al grupo de las cianinas, con una longitud de onda (λ) de excitación de 550 nm y una λ de emisión de 564 nm, caracterizado por bandas nítidas de absorción, elevados coeficientes de extinción y por su resistencia al fotoblanqueo, haciendo a los oligómeros de ADN altamente fluorescente, pudiéndose detectar moléculas individuales (65). Su estructura química está conformada por dos anillos indol

conectados por una cadena de polimetina, Cy3 se caracteriza por una cadena de conexión de tres grupos metino (figura 12). Esta sonda está diseñada para reconocer e hibridar con el exón 3 de PCA3 (TMerEx3Cy3).

Por otro lado, en el extremo 5' de la segunda sonda, se colocó tetrametilrodamina (TAMRA) con una λ de excitación de 559 nm y una λ de emisión de 583 nm. TAMRA es un compuesto químico derivado de la rodamina con una alta estabilidad y fluorescencia (66). Gracias a sus grupos funcionales reactivos (figura 13), es fácilmente incorporado en sistemas biológicos. Los oligonucleótidos marcados con TAMRA han establecido un papel importante en aplicaciones tales como FRET. Esta sonda está diseñada para reconocer e hibridar con el exón 3 y 4 de PCA3 y, a su vez, con la sonda marcada con Cy3 (TMerEx3+4_5TAMN)

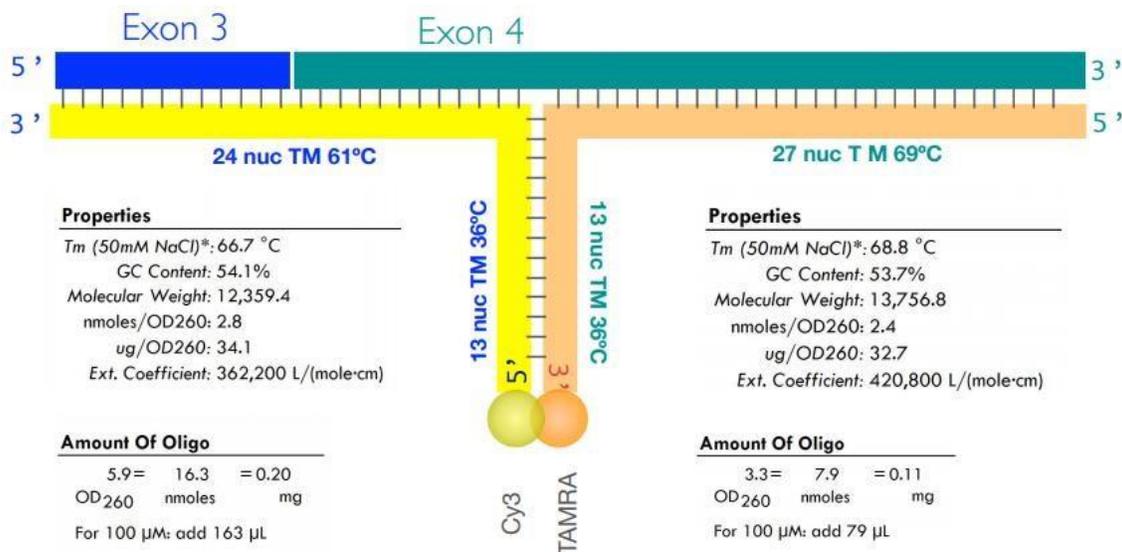


Figura 11. Diseño de sondas. Secuencia de referencia NCBI: NR_1323121

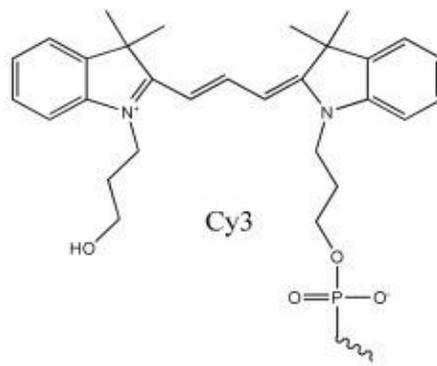


Figura 12. Estructura química de Cy3. Estructura química conformada por dos anillos indol conectados por una cadena de polimetina⁶⁵.

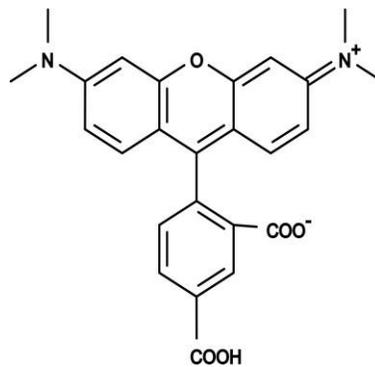


Figura 13. Estructura química de TAMRA⁵⁶

2.2.1 PCR punto final para gBlock de PCA3

Como parte de los ensayos de hibridación, se realizó una PCR punto final para la amplificación de un fragmento de 500 pb de DNA correspondiente al lncRNA de PCA3 utilizando como ADN molde el plásmido pUCITD-AMP (figura 14) con un tamaño total de 3251 pb. El plásmido que contiene el fragmento de PCA3 fue diseñado por el Dr.C. Hugo Gallardo Blanco y la Dra. C. Celia Sánchez y sintetizado por la compañía *Integrated DNA Technologies* (IDT®).

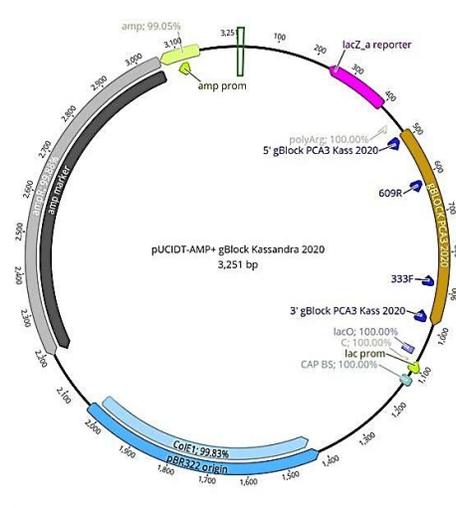


Figura 14. Plásmido pUC19D-AMP

La PCR se llevó a cabo utilizando los siguientes *primers*:

- *Forward* 333F: 5'- TCT CGT TTT TCC TCT CAT TGG TAA-3'.
- *Reverse* 609R: 5'- ATT TCC AGC CCC TTT AAA TAT CCA CAC-3'.

Para amplificar el fragmento de interés, se diseñaron dos *primers* (333F y 609R) para amplificar un fragmento de 277 pb, que contiene la región del exón 3 y exón 4 de PCA3. Para esto se partió de una concentración de 4 μg de plásmido, el cual fue diluido en 123 μL de buffer TE 1X pH 7.8 para obtener una concentración final de 10 pmol/ μL (32.52 ng/ μL de ADN). Se realizaron los cálculos para llevar a cabo una reacción de PCR convencional, se muestran a continuación las condiciones empleadas:

Tabla 4. Reactivos para PCR punto final para fragmento de PCA3

Reactivos	Volumen requerido para una reacción de PCR (μL).	Concentración final	MasterMix para 10 reacciones de PCR (μL).
H ₂ O ultra destilada grado biología molecular	15.5	-	155
Buffer 5X Promega	5.0	1X	50
MgCl ₂ (25mM) Promega	1.5	1.5 mM	15
dNTPs (10mM)	0.5	0.2 mM	5
GoTaq® (5U/ μL) Promega	0.5	2.5 U (0.1U/ μL)	5
Forward primer (100 μM)	0.5	2.5 pmol	5
Reverse primer (100 μM)	0.5	2.5 pmol	5
Plásmido pUCITD-AMP (10 pmol/ μL)	1.0	1.3 ng/ μL (0.4 pmol/ μL)	10
Volumen final	25.0	-	250

El programa del termociclador MJ Mini™ (Bio-Rad) para la PCR se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas a continuación:

Tabla 5. Programa para PCR punto final de fragmento de PCA3

Programa de PCR	Temperatura °C	Tiempo	Rampeo a 1°C/seg
Desnaturalización inicial	96	5 minutos	Paso 1
Desnaturalización	94	30 segundos	Paso 2
Alineamiento	55	45 segundos	Paso 3
Extensión	72	30 segundos	Paso 4
Repetir paso 2 a 4, 30 veces	-	-	Paso 5
Extensión final	72	10 minutos	Paso 12
Infinito	4	Infinito	Fin

El amplicón obtenido se analizó y cuantificó en el NanoDrop® *ND-1000 Spectrophotometer*, posteriormente se diluyó para ajustar a una concentración de 1.53 µM (280 ng/µL) para los ensayos subsecuentes.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% usando como buffer de electroforesis TBE 1X y se corrió de 80V-100V durante 1 hora.

2.2.2 PCR unidireccional para cDNA del lncRNA PCA3

Posteriormente, partiendo del amplicón del gBlock de 277 pb de PCA3, se realizaron dos tipos de PCR unidireccional por separado, una con el *primer 609R* y otra con el *primer 333F*, con las condiciones de reacción con los cálculos mostrados a continuación en las tablas 6 y 7:

Tabla 6. Condiciones para PCR unidireccional con <i>primer forward</i>	
Reactivos	Concentración final
H ₂ O ultra destilada grado biología molecular	-
Buffer 5X Promega	1X
MgCl ₂ (25mM) Promega	1.5 mM
dNTPs (10mM)	0.2 mM
GoTaq® (5U/μL) Promega	2.5 U (0.1U/ μL)
Forward primer (100μM)	2.5 pmol
Plásmido pUCITD-AMP (10 pmol/μL)	1.3 ng/ μL (0.4 pmol/ μL)
Volumen final	25 μL

Tabla 7. Condiciones para PCR unidireccional con <i>primer reverse</i>	
Reactivos	Concentración final
H ₂ O ultra destilada grado biología molecular	-
Buffer 5X Promega	1X
MgCl ₂ (25mM) Promega	1.5 mM
dNTPs (10mM)	0.2 mM
GoTaq® (5U/μL) Promega	2.5 U (0.1U/ μL)
Reverse primer (100μM)	2.5 pmol
Plásmido pUCITD-AMP (10 pmol/μL)	1.3 ng/ μL (0.4 pmol/ μL)
Volumen final	25 μL

Se realizaron las 2 reacciones de PCR, siguiendo las condiciones antes descritas para la PCR punto final del gBlock de PCA3 (tabla 5). Para la primera reacción se utilizó el primer *forward* y para la segunda reacción el primer *reverse*. Se obtuvieron amplicones de cadena sencilla con concentraciones de 1.63 pmol/ μ L para la reacción con primer *Forward* (gBlock F) y 2.17 pmol/ μ L para reacción con primer *Reverse* (gBlock R). Ambos amplicones de cadena sencilla (*singlestrand*, SS) se ajustaron a una concentración de 1.53 μ M para ensayos posteriores.

2.2.3 Tratamiento de oligonucleótidos con DTT en fase líquida

Se realizó el tratamiento de ambas sondas (TMerEx3Cy3, TMer3+4_5TAMN) con Ditiotreitolo (DTT) con la finalidad de reducir el grupo tiol, evitando así la formación de enlaces disulfuro y aumentando la eficiencia del enlace S-Au, esto para la conjugación posterior con las Nanopartículas de oro (AuNPs). A las sondas liofilizadas se les agregó buffer TE pH 7.4 grado biología molecular para obtener una concentración final de 250 μ M para cada una de las sondas.

Se preparó una dilución del stock de DTT (1 M) a 0.5 M con agua bidestilada (ddH₂O). Se agregaron 2.5 μ L de DTT 0.5 M a 50 μ L de cada una de las sondas con una concentración de 250 μ M y una concentración final de DTT de 0.025 M. Las sondas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad para reducir el oligonucleótido. Pasadas las 2 horas de incubación, las sondas se purificaron mediante una columna *illustraMicroSpin G-25* (GE Healthcare). Para la preparación de la columna se siguieron los pasos descritos a continuación, siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se suspendió la resina en la columna agitando con vórtex.
2. Se aflojó la tapa un cuarto de vuelta y girar el cierre inferior.

3. Se colocó la columna en tubo de recogida, el cual se suministró como soporte.
4. Se centrifugó durante 1 minuto a 3000 rpm en microcentrífuga *Eppendorf Centrifuge 5415C*.

Posterior al proceso de preparación de la muestra, se procedió a colocar la columna en tubo de microcentrífuga de 1.5 mL libre de DNasa. Se aplicaron lentamente a cada una de las columnas los 50 μ L de las sondas previamente reducidas. Finalmente, la elución se realizó mediante una centrifugación de 2 minutos a 3000 rpm. Las sondas purificadas se almacenaron a -20°C .

2.2.4 Protocolo de hibridación de sondas con cDNA del lncRNA PCA3

Se realizó una *Melting Curve* en el equipo *StepOnePlus Real-Time PCR System* en estas condiciones de reacción:

Tabla 8. Condiciones de hibridación de sondas con cDNA del lncRNA PCA3

	<i>S1+S2+SYBR+gBlock R</i>	<i>S1+S2+SYBR+gBlock F</i>
Reactivos	Concentración Final	Concentración Final
H2O dd	-	-
Buffer 5X Promega	1 X	1 X
MgCl ₂ (25mM) Promega	1.5 mM	1.5 mM
Oligo E 3 (2.5 μ M)	0.1 μ M	0.1 μ M
Oligo E 3+4 (2.5 μ M)	0.1 μ M	0.1 μ M
DNA amplicon 1.53 μ M (280 ng/ μ L)	0.06 μ M	0.06 μ M
<i>EvaGreen</i> ®20Xenagua	1X	1X

S1: sonda TMerEx3Cy3; S2: TMerEx3+4_5TAMN; gBlock R: amplicón con primer *Reverse* (control positivo); gBlock F: amplicón con primer *Forward* (control negativo).

Se espera que la hibridación de ambas sondas con el amplicón *Reverse* (*gBlock R*) o control positivo, reconozca a su blanco de detección, el cDNA de PCA3, hibride por complementariedad, formando una estructura de doble cadena entre las sondas y el amplicón (figura 15) y que el amplicón *Forward* (*gBlock F*) no hibride con las sondas.

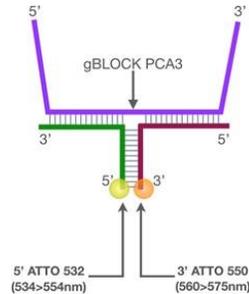


Figura 15. Sistema de detección compuesto por sondas y sus respectivos fluoróforos (Cy3, TAMRA) hibridado con cDNA de PCA3

Se utilizó el programa que se muestra a continuación:

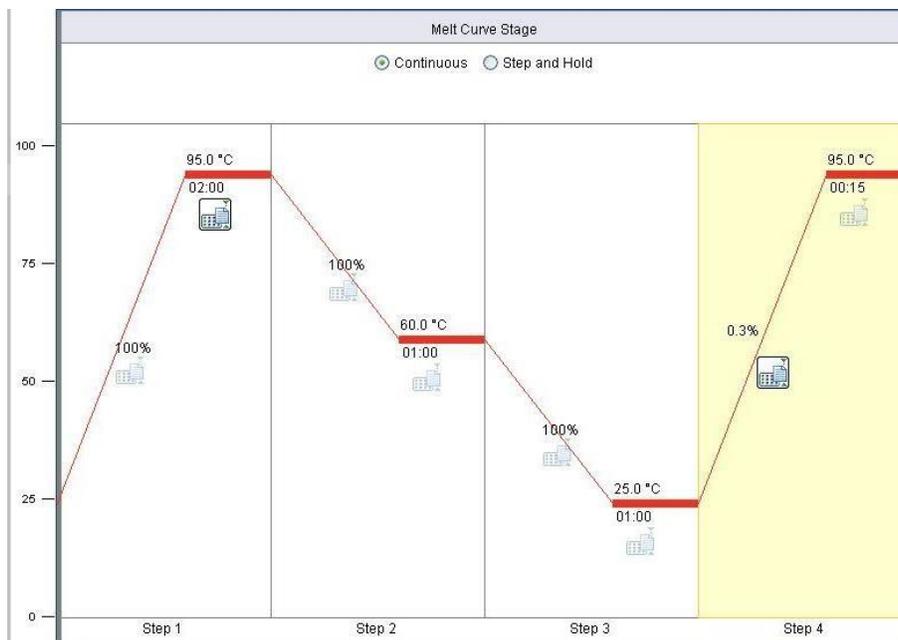


Figura16. Programa utilizado para el protocolo de hibridación de sondas

CoI con cDNA de lncRNA PCA3.

pOnePlus

Real-Time PCR System, el equipo registró lecturas de fluorescencia por pozo de

reacción cada 0.3% (aproximadamente cada 0.3°C) para los tres canales de detección usados, canal 1 para EvaGreen, canal 2 para Cy3 y canal 3 para TAMRA. Para el análisis de datos se representó el cambio de fluorescencia entre el cambio de temperatura ($-\Delta F/\Delta T$) contra la temperatura para obtener una visión clara de la dinámica de fusión. Para la obtención de los gráficos se graficaron los resultados de la *MeltRegion Derivative Data* en líneas 2D.

2.3 Construcción y caracterización de dos nanosistemas AuNPs unidas a sondas específicas para cDNA de PCA3.

2.3.1 Conjugación de nanopartículas de oro (AuNPs)

Se utilizó el estuche *Maleimide-Activated Gold Nanoparticle Conjugation Kit* (Cytodiagnosics, Burlington, Canadá) para la conjugación de las AuNPs PEG funcionalizadas con maleimida (20 nm) con las sondas (TMerEx3Cy3 y TMerEx3+4_5TAMN) previamente reducidas con DTT para obtener un grupo tiol libre. El kit nos permite una conjugación en un solo paso de alta eficiencia de oligonucleótidos tiolados, resultando en una unión covalente y estable; y reduciendo uniones inespecíficas con proteínas.

La funcionalización de las AuNP con las sondas diseñadas (Figura 17) se realizó con la reacción "*click*" *chemistry* (67). Dada su fiabilidad, eficiencia y selectividad, estas reacciones han sido un medio principal de bioconjugación. El mecanismo de las reacciones tiol-maleimida se escribe con mayor frecuencia como una adición típica de tipo Michael (58). La entrada al ciclo catalítico requiere la formación inicial de cierta cantidad de anión nucleófilo tiolato. El anión tiolato resultante, un nucleófilo fuerte, ataca el enlace π de la maleimida, dando como resultado un intermedio de enolato fuertemente básico. Este intermedio desprotona un equivalente adicional de tiol, dando el producto de adición deseado,

así como otro equivalente de tiolato que puede perpetuar el ciclo catalítico (Figura 18).

Para realizar la conjugación se siguieron los pasos del instructivo proporcionado por la compañía; se combinaron en un tubo de microcentrífuga los siguientes reactivos:

Tabla 9. Conjugación de AuNPs		Cantidad en μL
Buffer de reacción		60
Sondas reducidas con DTT		48
Volumen total		108

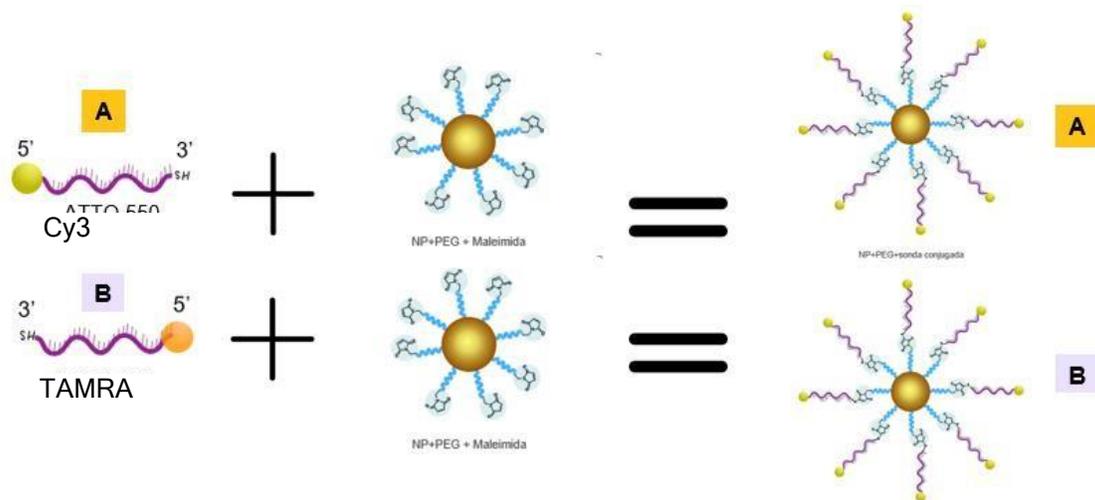


Figura 17. Nanosistemas propuestos.a) Conjugado con Cy3: sonda con fluoróforo en extremo 5' y grupo tiol en extremo 3'. b) Conjugado con TAMRA: sonda con fluoróforo en extremo 5' y grupo tiol en el extremo 3'. Las AuNP funcionalizadas con PEG son conjugada con maleimida.

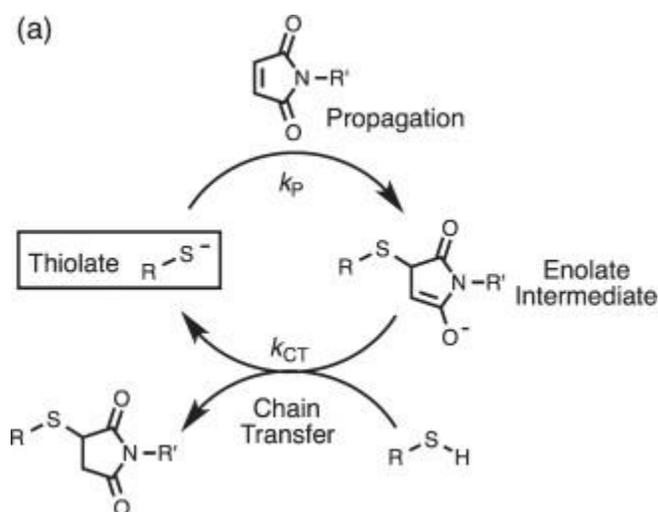


Figura 18. Mecanismo para la adición de un tiol catalizada por tiolato a una maleimida N-sustituida.⁶⁸

Se transfirieron 90 μL del volumen total de 108 μL (buffer de reacción, sondas marcadas con Cy3 y TAMRA) de cada uno de los oligonucleótidos reducidos a viales de AuNPsmaleimida liofilizadas (2) para posteriormente incubar durante una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se añadieron 10 μL de solución de extinción proporcionada por el fabricante y se incubó durante 15 minutos, esto con la finalidad de detener la reacción. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar en *100kDa MWC Spin Column* 15,000 g durante 15 minutos para desechar el sobrenadante que contiene ligando no unido y los reactivos subproducto de la reacción de extinción. El precipitado se resuspendió en 100 μL de TE pH 7.4. Finalmente se registraron los espectros UV-Vis con un barrido espectral de 230 a 650 nm utilizando el equipo NanoDrop®*ND-1000*. Las AuNPs conjugadas se almacenaron en buffer TE pH 7.4 a 4°C hasta su uso.

2.3.2 Caracterización de nanosistemas

Se realizó la caracterización de las AuNPs antes y después de la conjugación para asegurarnos de que cumplen con las características del fabricante y de su correcta funcionalización. Esta se realizó mediante las técnicas descritas a continuación:

Tabla 10. Técnicas para caracterización de los nanosistemas

Técnica	Resultados a obtener
Dispersión dinámica de luz (DLS)	Tamaño.
Espectroscopia Uv-Vis λ : 230-650 nm	Tamaño, morfología, aglomeración y funcionalización.
Electroforesis	Conjugación con sondas

La técnica DLS se realizó en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Por otro lado, la caracterización de los nanosistemas mediante espectroscopia Uv-Vis se realizó en el equipo NanoDrop® *ND-1000* con un barrido espectral de 230 a 650 nm. Para la electroforesis, se realizó un gel de agarosa al 0.5% con buffer TBE al 0.5% durante una hora.

2.4 Hibridación de nanosistemas AuNPs unidos a sondas específicas para cDNA de PCA3.

Se procedió a realizar el protocolo de hibridación de los nanosistemas, se realizaron 2 juegos de experimentos bajo las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 11. Condiciones de hibridación de nanosistemas con cDNA del IncRNA PCA3

	<i>NS1+NS2+SYBR+gBlock R</i>	<i>NS1+NS2+SYBR+gBlock F</i>
Reactivos	Concentración Final	Concentración Final
H2O dd	-	-
Buffer 5X Promega	1 X	1 X
MgCl ₂ (25mM) Promega	1.5 mM	1.5 mM
AuNPs Cy3 (2.5 μM)	0.1 μM	0.1 μM
AuNPs TAMRA (2.5 μM)	0.1 μM	0.1 μM
DNA amplicon 1.53 μM (280 ng/μL)	0.06 μM	0.06 μM
EvaGreen® Dye, 20X in Water	1X	1X

NS1: AuNPs+sonda TMerEx3Cy3; NS2: AuNPs+TMerEx3+4_5TAMN; gBlock R: amplicón con primer *Reverse* (control positivo); gBlock F: amplicón con primer *Forward* (control negativo).

El primer experimento consistió en la hibridación de ambos nanosistemas con el amplicón *Reverse* o control positivo, recordando que ambos nanosistemas al reconocer a su blanco de detección hibridarán por complementariedad, formando una estructura “Y” de doble cadena entre los nanosistemas y el amplicón (*gBlock R*) (figura 19).

Por otro lado, en el segundo experimento se realizó el protocolo de hibridación para ambos nanosistemas con el amplicón *Forward* (*gBlock F*) que

actúa como nuestro control negativo, por lo que no existirá la formación de una estructura de doble cadena al no haber complementariedad de bases.

Todo esto se realizó a las mismas condiciones de hibridación que el protocolo de hibridación de las sondas (figura 16) con una *Melting Curve* de 95° a 25°C en el equipo *StepOnePlus Real-Time PCR System*.

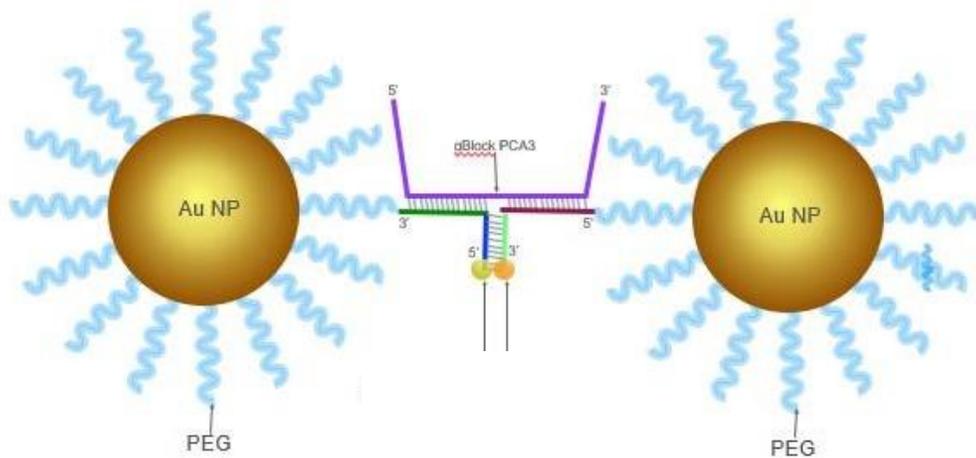


Figura 19. Hibridación de nanosistemas con gBlock PCA3. Los nanosistemas hibridan con el gBlock de PCA3 que actúa como nuestra molécula blanco formándose una estructura de doble cadena y detectándose la fluorescencia de CY3 y TAMRA.

CAPITULO III

Resultados

3.1 Estandarización de la hibridación de dos sondas mediante detección de fluorescencia con el gBlock de PCA3

3.1.2 PCR punto final para gBlock de PCA3

Se esperaba obtener un fragmento de 277 nucleótidos correspondientes al amplicón del gBlock de PCA3, por lo que se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (figura 20).

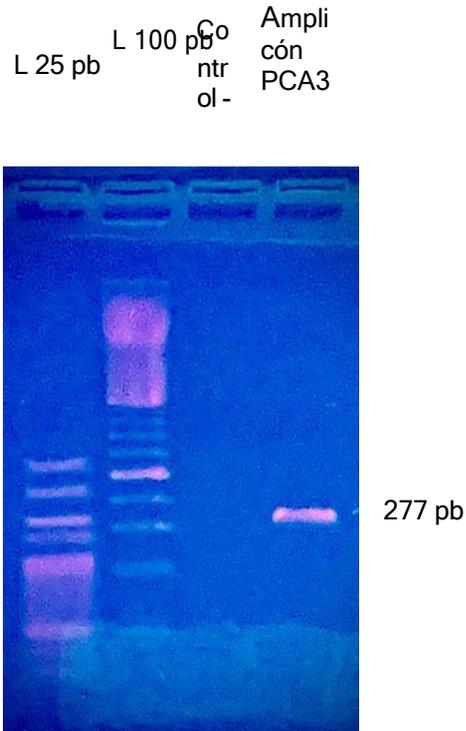


Figura20. Gel de agarosa 2%, TBE 1X.

Podemos observar la banda correspondiente a los 277 pb, lo que nos indica la amplificación exitosa del gBlock de PCA3, a su vez, podemos observar que no hay presencia de productos inespecíficos en la reacción.

Posteriormente, se realizó la cuantificación del amplicón de PCA3 en el equipo NanoDrop® ND-1000, obteniéndose 1.44 pmol/μL (figura 21).

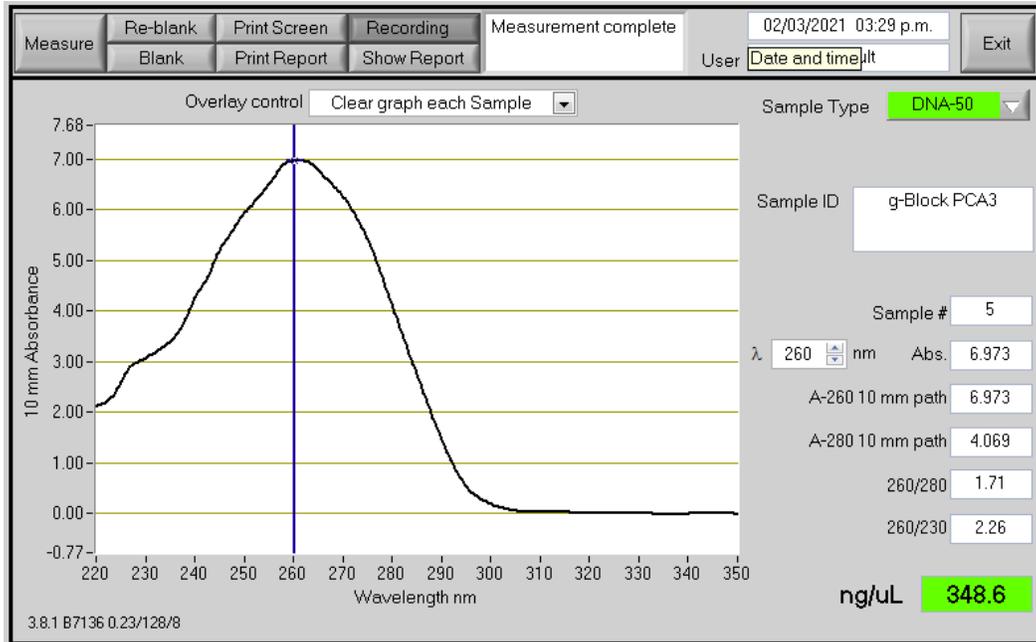


Figura 21. Cuantificación de gBlock de PCA3 por medio del equipo NanoDrop ND-1000a 260 nm.

3.1.3 PCR unidireccional para cDNA de PCA3

A partir del amplicón de PCA3 obtenido mediante PCR punto final, se procedió a realizar una PCR unidireccional con 2 reacciones, una utilizando el primer *Forward* (control negativo) y utilizando el primer *Reverse* (control positivo).

Por otro lado, se realizó la cuantificación de ambos amplicones de PCA3 en el equipo NanoDrop® ND-1000, obteniéndose 1.63 pmol/μL para el amplicón con *primerForward* (control negativo) (figura 22) y 2.17 pmol/μL para el amplicón con el *primer Reverse*(control positivo) (figura 23).

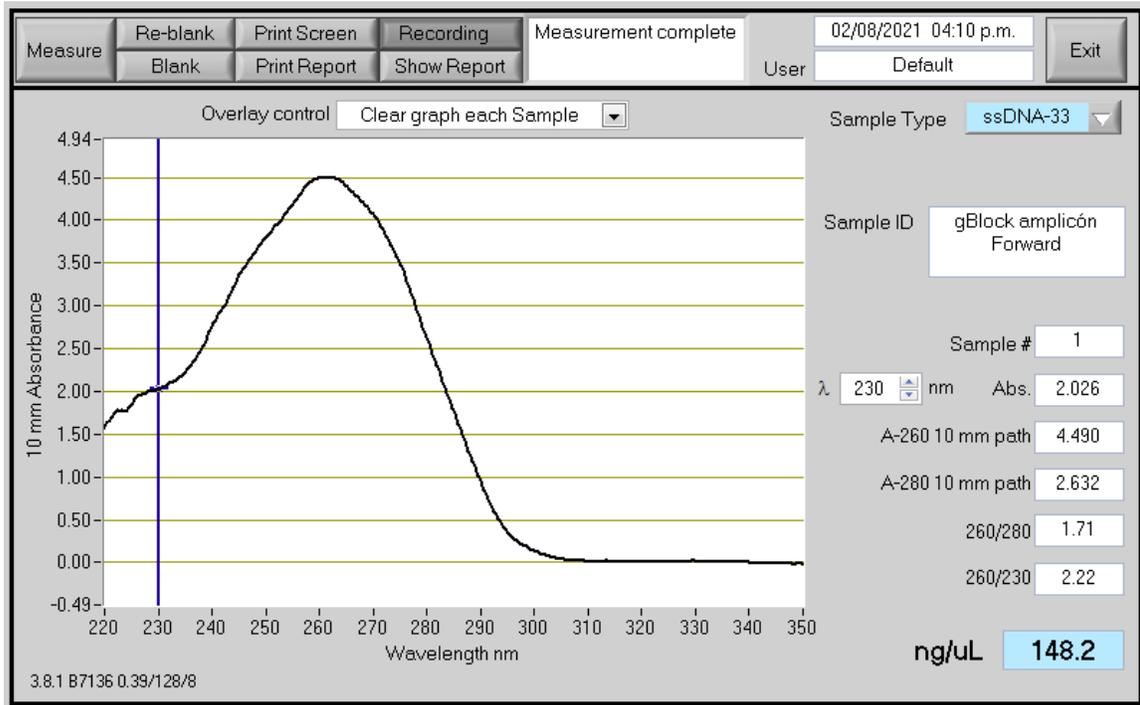


Figura 22. Cuantificación de gBlock de PCA3 con primer forward por medio del equipo NanoDrop ND-1000a 260 nm.

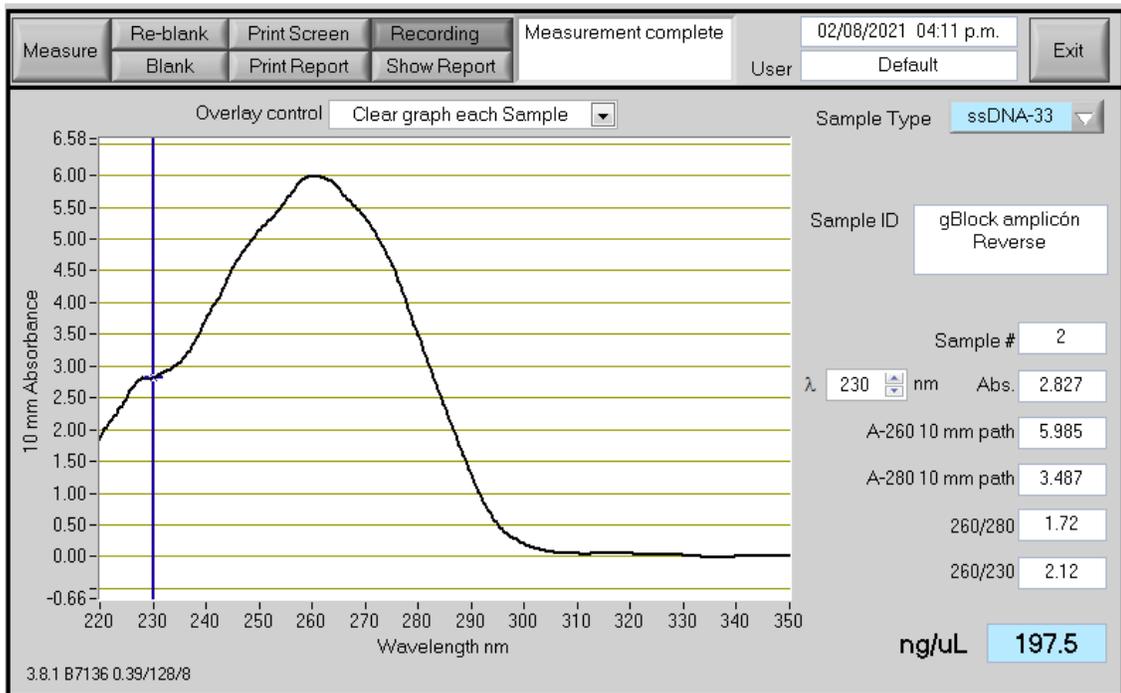


Figura23. Cuantificación de gBlock de PCA3 con primer reverse por medio del equipo NanoDrop ND-1000a 260 nm.

3.1.4 Caracterización de sondas tratadas con DTT en fase líquida

Para realizar la caracterización de las sondas, se realizó un barrido espectral de 230 a 650 nm utilizando el equipo NanoDrop^{ND-1000}. Esto con la finalidad de detectar las longitudes de onda de absorción máximas esperadas tanto para el ADN de las sondas como para los fluoróforos (figura 24). En ambas gráficas a 260 nm podemos observar los picos de absorción del ADN. En la gráfica de lado izquierdo podemos observar, además, un pico máximo de absorción a 554 nm correspondiente a Cy3, mientras que en la gráfica de lado derecho podemos observar un pico máximo de absorción a 557 nm, correspondiente a TAMRA. Ambos picos coinciden con lo reportado en la literatura.

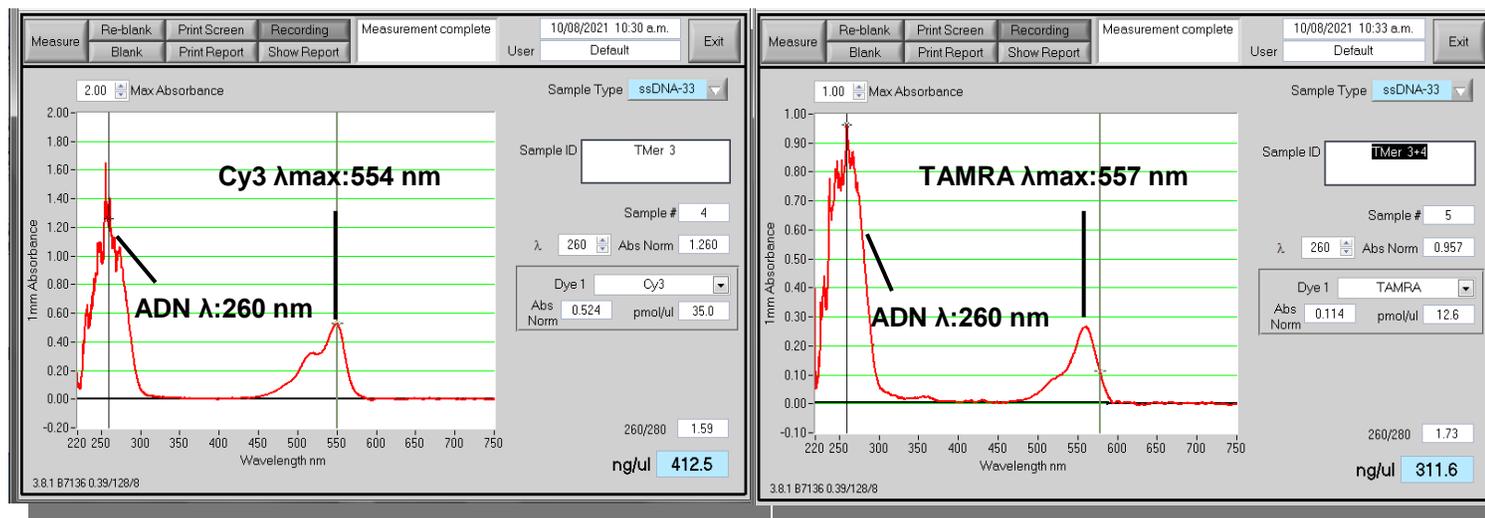


Figura 24. Barrido espectral de 230 a 650 nm para sondas.

3.1.5 Hibridación de sondas con cDNA del IncRNA PCA3

Para la hibridación de las sondas con el blanco de detección o nuestro control positivo (amplicón con *primer Reverse*) obtuvimos la gráfica que se muestra a continuación:

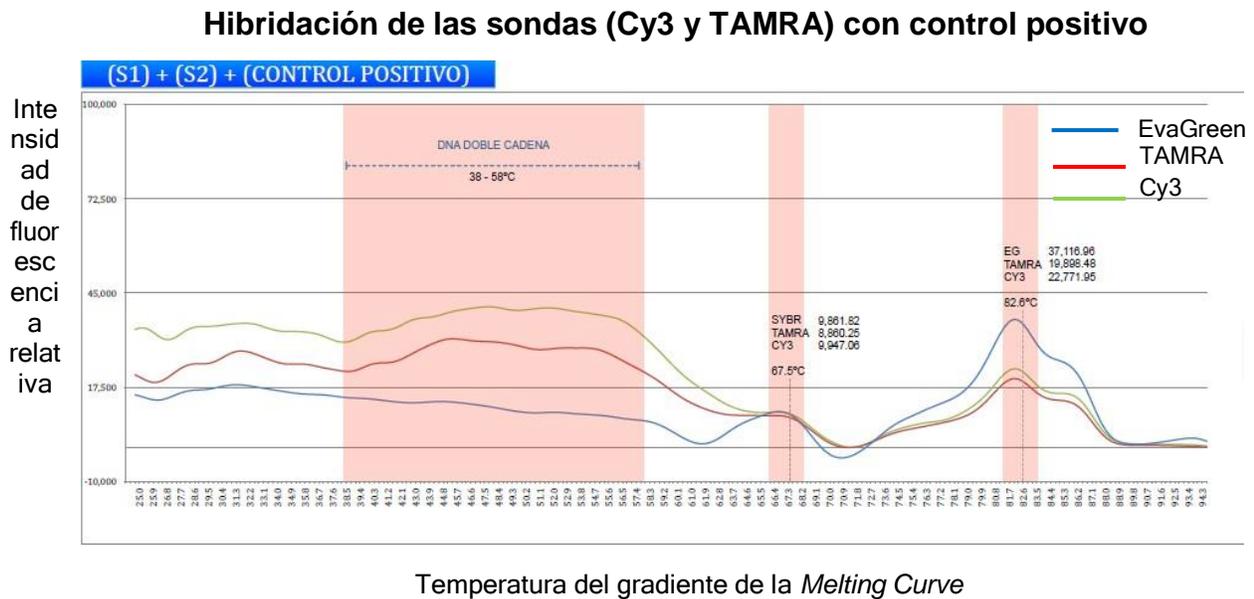


Figura 25. Ensayo de hibridación de sondas (Cy3 y TAMRA) con amplicón con primer Reverseo control positivo.

La gráfica representa el gradiente de temperaturas de 25° a 95°C, contra la intensidad de fluorescencia. La curva deEvaGreen (línea azul) representa la formación de doble cadena, formada por la hibridación entre las sondas y el cDNA de PCA3, que se manifiesta como un incremento de fluorescencia de EvaGreen.

En la dinámica de hibridación podemos observar un pico a 67.5°C, el cual corresponde a la hibridación del cDNA de PCA3 con cada una de las sondas de forma individual. De igual forma, a la misma temperatura podemos observar un aumento en la fluorescencia de TAMRA representada con la línea en color rojo y de Cy3 representada con la línea en color verde.

Se observa un pico más evidente de EvaGreen a 82.7°C, lo que representa una estructura de “Y” de doble cadena formada por la unión de ambas sondas de forma simultánea al cDNA de PCA3. De igual forma, se observa un aumento en la fluorescencia tanto en TAMRA como en Cy3. Ambas señales confirman la detección del cDNA de PCA3.

El experimento de hibridación de ambas sondas (Cy3 y TAMRA) con el amplicón obtenido con el primer *Forward* (*gBlock F*) que actúa como nuestro control negativo, se muestra a continuación:

Hibridación de las sondas (Cy3 y TAMRA) con control negativo

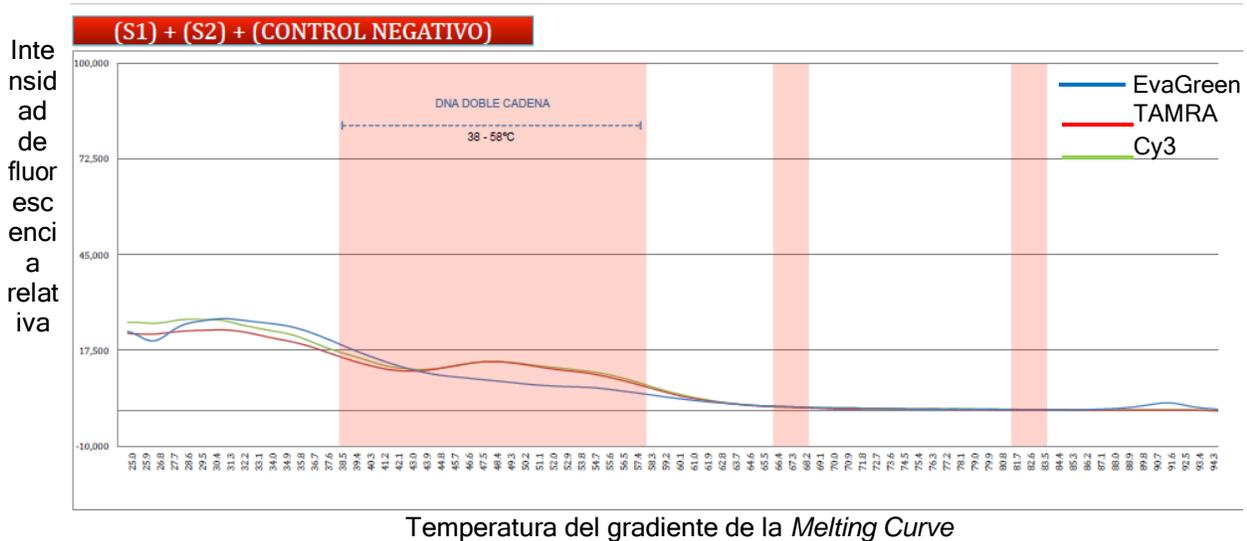


Figura 26. Ensayo de hibridación de sondas (Cy3 y TAMRA) con amplicón con primer Forward o control negativo.

No se observan las señales características de la hibridación de la molécula blanco con las sondas a 67.5 ni a 82.7°C. No hay un aumento en la fluorescencia de EvaGreen lo que nos indica que no hay una formación de doble cadena. Esto corrobora la especificidad de las sondas que hibridan solo con el *gBlock R*, el cual es equivalente a los exones 3 y 4 del cDNA de PCA3.

Es posible observar una señal débil entre los 40 a 60°C, lo que nos indica la interacción de las sondas consigo mismas por cambios conformacionales, esta interacción fue ideada para que fuera un factor condicionante de hibridación con la región de los exones 3 y 4 del cDNA de PCA3. Esta hibridación es favorecida en presencia del cDNA de PCA3.

3.2 Construcción y caracterización de dos nanosistemas AuNPs unidas a sondas específicas para cDNA de PCA3

3.2.1 Caracterización de los nanosistemas AuNPs-sondas específicas

Se realizó la caracterización de los nanosistemas, para esto se realizaron los espectros de absorción de las AuNPs conjugadas con Cy3 y TAMRA, utilizando el equipo NanoDropND-1000, los cuales se muestran a continuación:

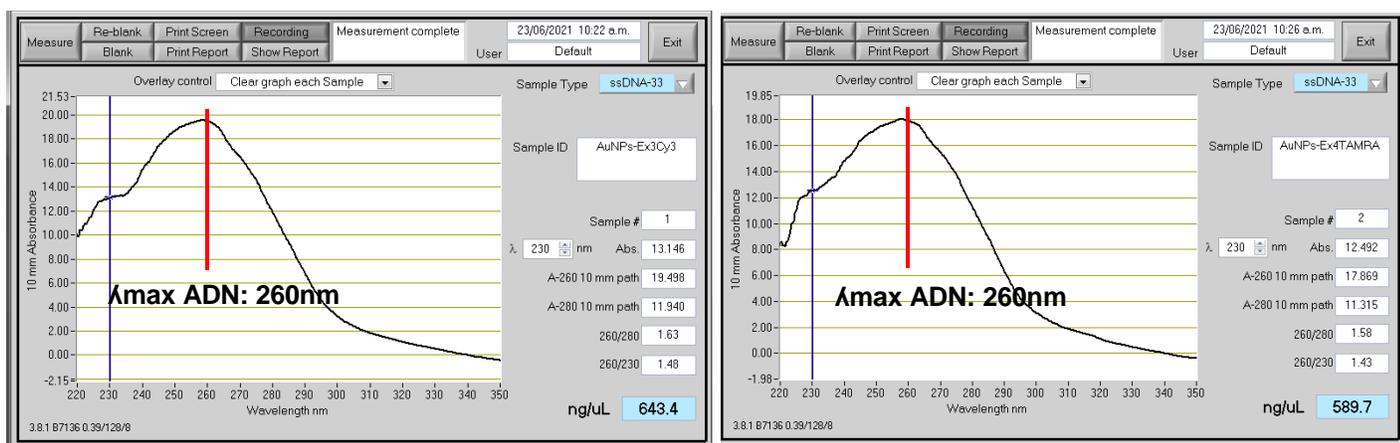


Figura 27. Espectro UV-Vis para AuNPs conjugadas con sondas Cy3 (izquierda) y TAMRA (derecha).

A 260 nm podemos observar en ambas gráficas los picos de absorción del ADN en ambos nanosistemas, tanto con conjugado con la sonda Cy3 (izquierda) como el conjugado con TAMRA (derecha).

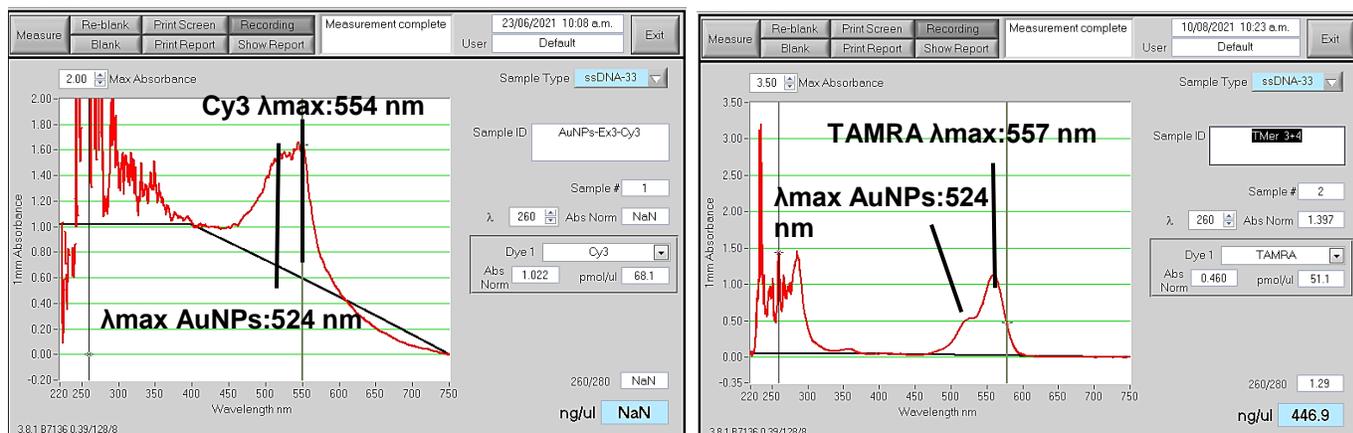


Figura 28. Barrido espectral de 230 a 650 para AuNPs conjugadas con sondas Cy3 (izquierda) y TAMRA (derecha).

De igual forma se identificaron picos de absorción a 524 nm correspondientes a las AuNPs de 20 nm. En la gráfica de lado izquierdo podemos observar un pico de absorción a 554 nm, el cual corresponde a Cy3. Por otro lado, en la gráfica de lado derecho podemos observar un pico de absorción a 557 nm, lo que corresponde con TAMRA.

Continuando con la caracterización de los nanosistemas, se realizó DLS con el equipo ZetasizerNanp ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) para medir el tamaño promedio de los 2 nanosistemas AuNPs conjugados con las sondas Cy3 y TAMRA respectivamente.

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 239,2	Peak 1: 323,3	100,0	125,1
Pdl: 0,223	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,966	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**

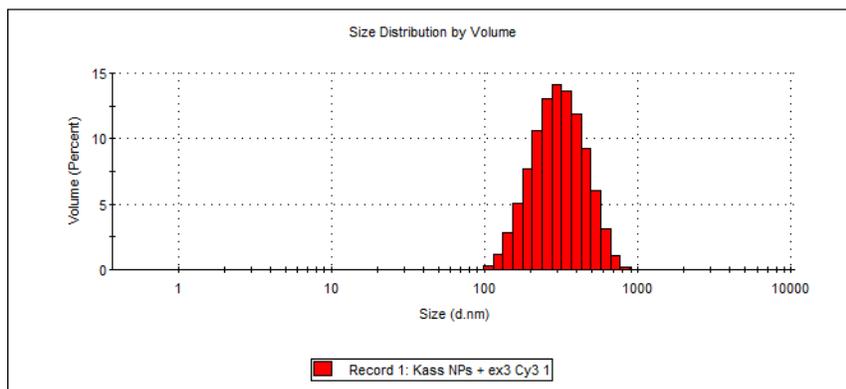


Figura 29. DLS de nanosistema conjugado con Cy3, tamaño promedio de 323.3 nm.

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 238,3	Peak 1: 310,7	79,0	141,2
Pdl: 0,262	Peak 2: 5162	21,0	764,2
Intercept: 0,960	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**

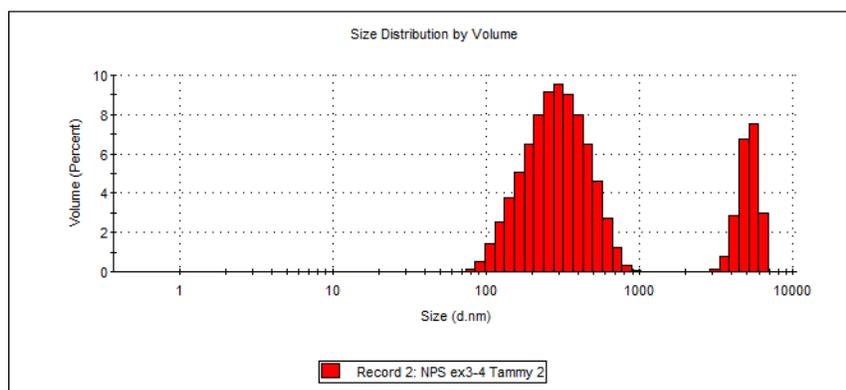


Figura30. DLS de nanosistema conjugado con TAMRA, tamaño promedio de 310.7 nm.

Se obtuvieron tamaños promedios para los nanosistemas conjugados con Cy3 de 323.3 nm y para TAMRA de 310.7 nm respectivamente. La diferencia de tamaño entre ambos nanosistemas puede deberse a la diferencia de longitud de las sondas, 41 pb para Cy3, y 37 pb para TAMRA. El diámetro estimado por DLS

es relativo a la dispersión de la luz, por la hidratación de las moléculas, y por la fluorescencia emitida por los fluoróforos, pues el equipo detecta en luz visible y los fluoróforos (Cy3 y TAMRA) emiten fluorescencia en el espectro de luz visible. Esto también es debido a la corona de polietilenglicol(PEG) y DNA que recubre las NPs. El incremento de tamaño nos confirma la conjugación de los nanosistemas y la saturación con las sondas específicas para la detección del cDNA de PCA3.

Se realizó un gel de agarosa al 0.5% para las AuNPs sin conjugar como para aquellas conjugadas con las sondas Cy3 y TAMRA.

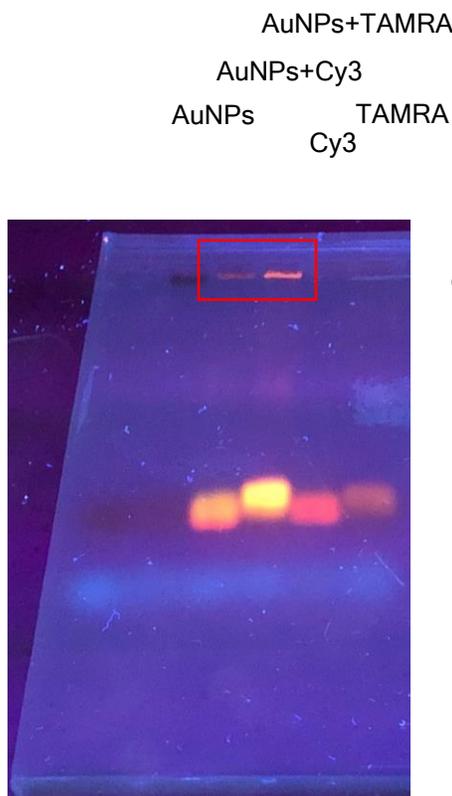


Figura 31. Gel de agarosa al 0.5%, TBE 0.5X, visualización con luz UV.

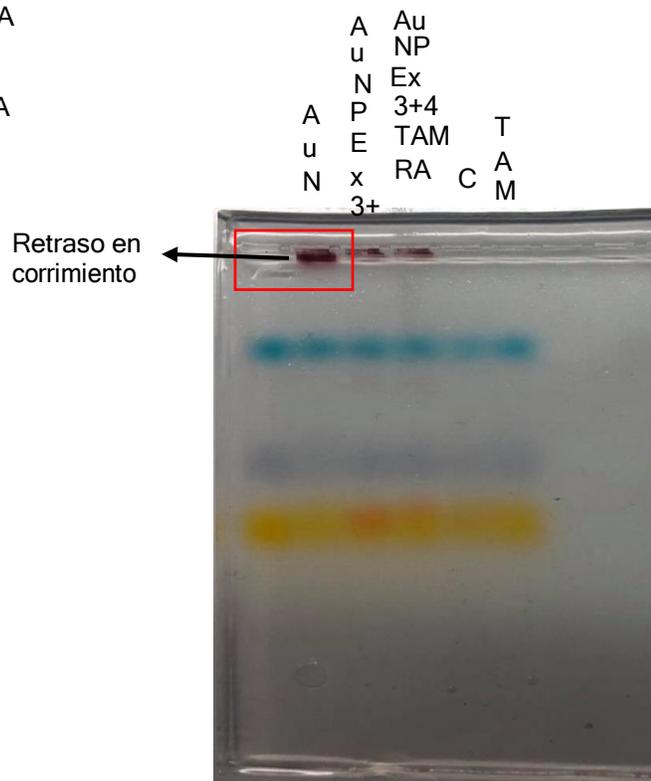


Figura 32. Gel de agarosa al 0.5%, TBE 0.5X, visualización con luz visible.

De lado izquierdo podemos visualizar el gel a través de luz UV, debido a que nos interesaba observar el ADN de las sondas. Se observa fluorescencia de las sondas a nivel de pozo debido a la unión de cada sonda con las AuNPs.

Se observa señal de las sondas que se desprendieron de las NPs en el corrimiento electroforético, esto debido a la saturación de los nanosistemas. De igual manera se observan las señales de las sondas sin conjugar.

Por otro lado, podemos ver el gel mediante luz visible donde las AuNPse observan en color rojo; es evidente el retraso en el corrimiento electroforético en las AuNPs sin conjugar, unacaracterística de nanopartículas sin carga superficial.

3.3 Hibridación de nanosistemas AuNPs unidos a sondas específicas para cDNA de PCA3.

Para la hibridación de las sondas con el blanco de detección o nuestro control positivo obtuvimos la gráfica que se muestra a continuación:

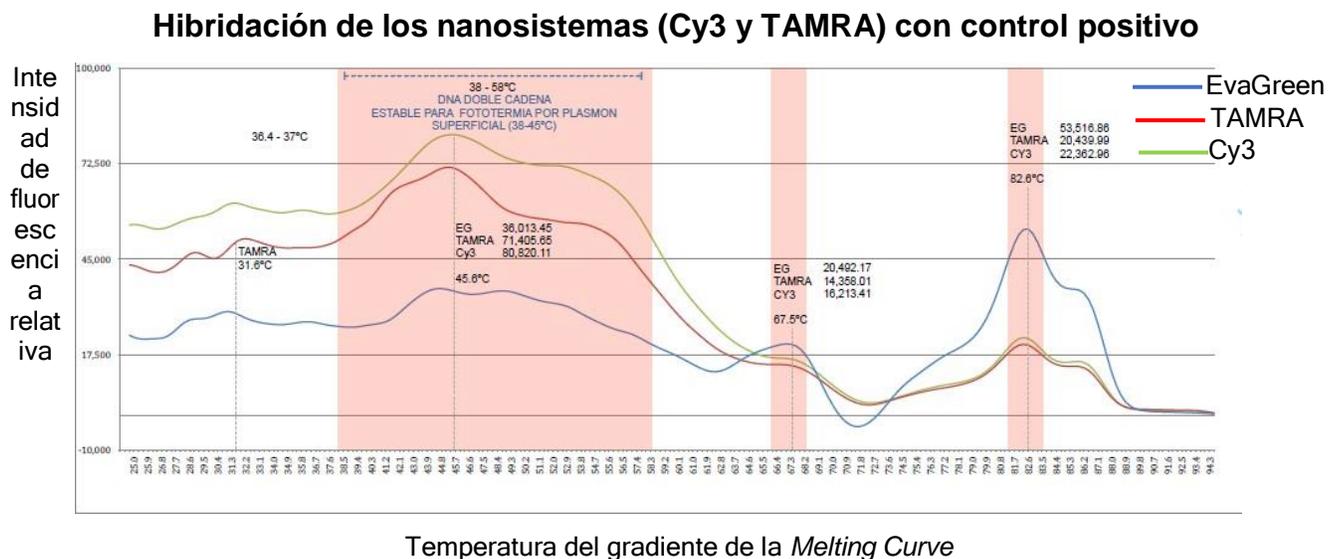


Figura 33. Ensayo de hibridación de nanosistemas (Cy3 y TAMRA) con amplicón con primer Reverse o control positivo.

Al igual que con las sondas sin conjugar, podemos observar un pico a 67.5°C, el cual corresponde a la hibridación delcDNA de PCA3 con cada uno de los nanosistemas de forma individual (cambios conformacionales). De igual forma, podemos observar un aumento en la fluorescencia de TAMRA representada con la línea de color rojo y de Cy3 representada con la línea de color verde.

Por otro lado, se observa un pico más evidente de EvaGreen a 82.6°C, lo que nos indica la unión de ambos nanosistemas de forma simultánea al cDNA de PCA3 y un aumento en la fluorescencia tanto en TAMRA como en Cy3.

Las AuNPsconjugadas con las sondas incrementan la sensibilidad un 44 % a 67.5°C y un 107.79 % a 82.6°C, comparando con las sondas no conjugadas, debido al efecto de plasmón superficial característico de AuNPs o plasmónicas, lo que nos ayudará en un futuro a mejorar la sensibilidad de detección.

Los anterior puede ser confirmado a través del experimento de hibridación de ambos nanosistemas (Cy3 y TAMRA) con el amplicón con primer Forward que actúa como nuestro control negativo, la gráfica correspondiente se muestra a continuación:

Hibridación de los nanosistemas (Cy3 y TAMRA) con control negativo

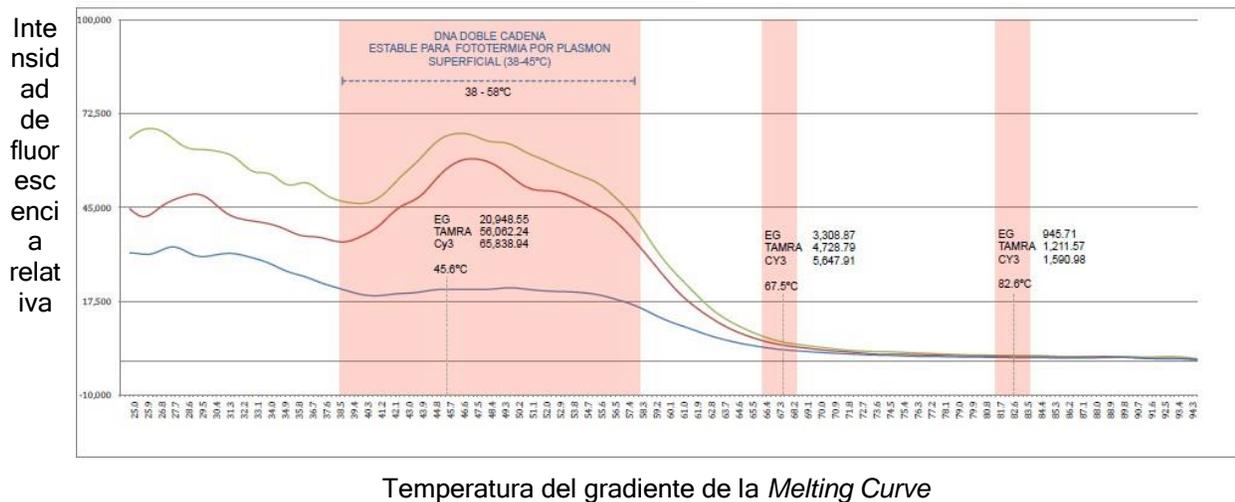


Figura 34. Ensayo de hibridación de nanosistemas (Cy3 y TAMRA) con amplicón con primer Forward o control negativo.

No se observan las señales características de la hibridación de la molécula blanco con las sondas a 67.5 y 82.7°C. No hay un aumento en la fluorescencia de EvaGreen lo que nos indica que no hay una formación de doble cadena.

CAPITULO IV

4.1 Discusión

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial. En México, el CaP ocupa el primer lugar en incidencia de acuerdo con estadísticas del *Global Cancer Observatory*. Hasta la fecha, los métodos para realizar el cribado y monitoreo son la medición del PSA y DRE como lo marcan las pautas de la *American Cancer Society*(69). Sin embargo, estas metodologías presentan ciertos inconvenientes debido a su baja sensibilidad, especificidad y precisión diagnóstica (70). Si existe la sospecha de un DRE anormal y un PSA elevado se procede a realizar la biopsia prostática, la cual es el estándar de oro en el diagnóstico, sin embargo, el uso de PSA y DRE como cribado conducen a aproximadamente dos tercios de biopsias innecesarias (71). Estudios revelan que aproximadamente el 15% de pacientes con CaP presentan un nivel de PSA por debajo del valor de corte 4 ng/mL), lo que conduce a resultados falsos negativos (72). De acuerdo con las nuevas guías de la *U.S. Preventive Services Task Force* (USPSTF) el uso rutinario de PSA como cribado debería ser suspendido al proporcionar pocos beneficios en la detección de CaP, su uso debería ser ofrecido a pacientes en función de circunstancias individuales.

Por todo lo anterior es necesario el desarrollo de metodologías para la detección de nuevos biomarcadores específicos para CaP con la finalidad de reducir el sobrediagnóstico y mejorar la detección temprana de tumores clínicamente significativos. Son necesarias herramientas diagnosticas que permitan diferenciar entre aquellos pacientes con necesidad de tratamiento y aquellos que se beneficiarán de vigilancia activa (73).

PCA3 es un lncRNA expresado específicamente en CaP (74). Se ha demostrado su sobreexpresión en tejido de CaP de 10 a 100 veces en

comparación con el tejido sano adyacente (75). Además, PCA3 ha sido detectado en orina después de un DRE (76), así como en muestras de sangre (77), por lo que es considerado un biomarcador no invasivo prometedor. Estudios demuestran que PCA3 mejora el rendimiento diagnóstico disminuyendo biopsias innecesarias al permitir una mejor selección en pacientes de alto riesgo (78). Además, se ha encontrado una asociación significativa entre los valores de PCA3 y la puntuación Gleason (Gleason ≤ 6 vs Gleason ≥ 7) (79).

La prueba de Progensa para la detección de PCA3 en orina es la única aprobada por la *US Food and Drug Administration* (FDA), esta es recomendada para hombres con niveles elevados persistentes de PSA sérico y una biopsia negativa previa. Sin embargo, es costosa, requiere equipo especializado, personal altamente capacitado y no se encuentra disponible en América Latina. Para superar estas limitaciones son necesarias nuevas metodologías para la detección de PCA3 con alta sensibilidad, simples y asequibles para la población.

Hasta la fecha se han desarrollado nuevas metodologías para la detección de PCA3 por biosensores basados en impedancia (71), ensayos colorimétricos con nanopartículas magnéticas (80), qRT-PCR en muestras de sangre (81), entre otros. Sin embargo, estas metodologías presentan ciertas limitaciones tales como: la necesidad de equipo especializado para el sistema de detección, inespecificidades y traslape de señales que dificultan la interpretación.

En los últimos años se ha empleado a la nanotecnología en el diagnóstico molecular, biomedicina, bioseparación y entrega de fármacos (82). En este trabajo utilizamos nanopartículas de oro (AuNPs) acopladas a sondas específicas para la hibridación entre el exón 3 y 4 del cDNA de PCA3. Las nanopartículas (NP) se han utilizado como una herramienta para amplificar la señal de detección debido a su tamaño, su relación superficie-volumen y la facilidad para su funcionalización.

Se pudo observar un aumento en las unidades relativas de fluorescencia (RFU) al hibridar ambos nanosistemas con la molécula blanco o control positivo, la agregación de las AuNPs da como resultado una amplificación en la señal debido a la Resonancia de Plasmón Superficial (83), por lo que se esperaba un aumento evidente en las RFU. Las AuNPs se funcionalizan habitualmente con secuencias de ADN monocatenario, lo que les permite hibridar con una secuencia diana complementaria (84), lo que nos puede permitir una detección directa del lncRNA PCA3.

4.2 Conclusión

Se logró detectar el cDNA de PCA3 con los nanosistemas acoplados, confirmando la hipótesis propuesta en este trabajo. Logramos verificar que el diseño de nanosistemas propuesto permite detectar el cDNA de PCA3, sin embargo, aún falta realizar más ensayos para verificar y optimizar la sensibilidad y límites de detección, además de realizar ensayos con el lncRNA de PCA3 en lugar del cDNA de PCA3.

Sintetizamos y caracterizamos dos nanosistemas de AuNPs acoplados mediante un enlace PEG-maleimida a sondas de diseño marcadas con los fluoróforos Cy3 y TAMRA, para la detección de una región comprendida entre los exones 3 y 4 del cDNA del lncRNA PCA3.

Mediante el ensayo la curva de disociación (*Melting curve*) se determinaron los patrones de fusión de las sondas sin acoplar, así como de los nanosistemas de AuNPs acoplados a las sondas para detectar la formación de una doble cadena compuesta de 3 segmentos (DNAc de PCA3 y las dos sondas) mediante la fluorescencia de Evagreen, utilizando como control negativo la secuencia complementaria de PCA3.

Se determinó un patrón de picos con máximos a 67.5 y 82.6 C, que no estuvo presente en el control negativo, demostrando la formación de la doble cadena con los nanosistemas y el cDNA de PCA3.

Las AuNPs conjugadas con las sondas (Cy3 y TAMRA) incrementan la sensibilidad un 44 % a 67.5 °C y un 107.79 % a 82.6°C, comparando con las sondas no conjugadas a AuNPs. Todos estos ensayos fueron realizados a las mismas condiciones de reacción y concentraciones, por lo que este aumento en la sensibilidad de detección es atribuido a la resonancia de plasmón de superficie

localizado de las AuNPs, el cual tiene como efecto el aumento en la fluorescencia dependiendo de la distancia de las moléculas y las AuNPs.

Referencias

1. WorldHealthOrganization. (2018). CancerToday. In *International Agency forresearch*. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group
2. Delgado-balderas, J. R., Sánchez-domínguez, C. N., León, J. F. Y., Garza-guajardo, R., Hernández-barajas, D., Abarca-blanco, A., Garza-rodríguez, M. L., Robles-torres, J. I., & Gómez-guerra, L. S. (2018). Perspectiva integral del cáncer de próstata: aspectos moleculares al servicio de la clínica Integral perspectiveofprostatecancer: molecular aspects at theserviceoftheclinic. *Boletín Del Colegio Mexicano de Urología*, 33(April), 16-24.
3. InternationalAgency forResearchonCancer. (2019). MexicoSource: Globocan 2018. In *The Global CancerObservatory* (Vol. 283). <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>.
4. Congreso, E. L., Estados, G. D. E. L. O. S., Mexicanos, U., & Reforman. (2007). *DOF - Diario Oficial de la Federación* (Vol. 5002338, pp. 1-14). http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5446705&fecha=03/08/2016
5. Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effectofinflammation and benignprostatichyperplasiaonelevatedserumprostatespecificantigenlevels. *J Urol*1995;154:407-13.
6. G.M. Yousef, E.P. Diamandis, The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease, *Endocr. Rev.* 22 (2) (2001) 184-204.

7. Pérez-Ibave, D. C., Burciaga-Flores, C. H., & Elizondo-Riojas, M. Á. (2018). Prostate-specific antigen (PSA) as a possible biomarker in non-prostatic cancer: A review. In *Cancer Epidemiology* (Vol. 54, pp. 48-55). Elsevier Ltd.
8. E.P. Diamandis, Prostate-specific antigen: a cancer fighter and a valuable messenger? *Clin. Chem.* 46 (7) (2000) 896-900.
9. Barry, M. J. (2001). Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 344(18), 1373-1377.
10. Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA* 1995;273:289-94.
11. Fujita, K., & Nonomura, N. (2018). Urinary biomarkers of prostate cancer. In *International Journal of Urology* (Vol. 25, Issue 9, pp. 770-779). Blackwell Publishing.
12. Howrey, B. T., Kuo, Y. F., Lin, Y. L., & Goodwin, J. S. (2013). The impact of PSA screening on prostate cancer mortality and overdiagnosis of prostate cancer in the United States. *Journal of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 68(1), 56-61.
13. E.P. Diamandis, H. Yu., Nonprostatic sources of prostate-specific antigen, *Urol. Clin. North Am.* 24 (2) (1997) 275-282.
14. F.C. Mashkour, J.N. Al-Asadi, L.M. Al-Naama, Serum level of prostate-specific antigen (PSA) in women with breast cancer, *Cancer Epidemiol.* 37 (5) (2013) 613-618.
15. D.N. Melegos, E.P. Diamandis, Is prostate-specific antigen present in female serum? *Clin. Chem.* 44 (3) (1998) 691-692.
16. E.R. Sauter, et al., Prostate-specific antigen and insulin-like growth factor binding protein-3 in nipple aspirate fluid are associated with breast cancer, *Cancer Detect. Prev.* 26 (2) (2002) 149-157.
17. Litwin, M. S., & Tan, H. J. (2017). The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. In *JAMA - Journal of the American*

- Medical Association* (Vol. 317, Issue 24, pp. 2532-2542). American Medical Association.
18. Hamilton, W., Sharp, D. J., Peters, T. J., & Round, A. P. (2006). Clinical features of prostate cancer before diagnosis: A population-based, case-control study. *British Journal of General Practice*, 56(531), 756-762.
/pmc/articles/PMC1920715/
 19. J. Epstein, *Prostate Biopsy Interpretation*, PA, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995.
 20. Tabesh, A., Teverovskiy, M., Pang, H. Y., Kumar, V. P., Verbel, D., Kotsianti, A., & Saidi, O. (2007). Multifeature prostate cancer diagnosis and Gleason grading of histological images. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 26(10), 1366-1378.
 21. Rodríguez-Covarrubias F, González-Ramírez A, Aguilar-Davidov B, Castillejos-Molina R, Sotomayor M, Feria-Bernal G. Extended sampling at first biopsy improves cancer detection rate: results of prospective, randomized trial comparing 12 versus 18-core prostate biopsy. *J Urol* 2011; 185(6):2132-2136.
 22. Castillejos-Molina, R. A., & Gabilondo-Navarro, F. B. (2016). Prostate cancer. *Salud Pública de México*, 58(2), 279-284.
 23. Bjurlin MA, Carter HB, Schellhammer P, et al. Optimization of initial prostate biopsy in clinical practice: sampling, labeling and specimen processing. *J Urol*. 2013;189(6):2039-2046.
 24. Kretschmer, A., & Tilki, D. (2017). Biomarkers in prostate cancer – Current clinical utility and future perspectives. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 120, pp. 180-193). Elsevier Ireland Ltd.
 25. Carroll, P. H., & Mohler, J. L. (2018). NCCN guidelines updates: Prostate cancer and prostate cancer early detection. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 16(5S), 620-623.
 26. Fujita, K., & Nonomura, N. (2018). Urinary biomarkers of prostate cancer. *International Journal of Urology*, 25(9), 770-779.

27. P. Carninci, Y. Hayashizaki, Noncoding RNA transcription beyond annotated genes, *Curr Opin Genet Dev*, 17 (2007) 139-144.
28. Yang, G., Lu, X., & Yuan, L. (2014). LncRNA: A link between RNA and cancer. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (Vol. 1839, Issue 11, pp. 1097-1109). Elsevier B.V.
29. B.E. Bernstein, E. Birney, I. Dunham, E.D. Green, C. Gunter, M. Snyder, An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, *Nature*, 489 (2012) 57-74.
30. T.R. Mercer, M.E. Dinger, J.S. Mattick, Long non-coding RNAs: insights into functions, *Nat Rev Genet*, 10 (2009) 155-159.
31. Misawa, A., Takayama, K. I., & Inoue, S. (2017). Long non-coding RNAs and prostate cancer. In *Cancer Science* (Vol. 108, Issue 11, pp. 2107-2114). Blackwell Publishing Ltd.
32. Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov* 2011; 1: 391-407.
33. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59:5975-9.
34. Lemos, AE. G., Da Rocha Matos, A., Ferreira, L. B., & Gimba, E. R. P. (2019). The long non-coding RNA PCA3: An update of its functions and clinical applications as a biomarker in prostate cancer. In *Oncotarget* (Vol. 10, Issue 61, pp. 6589-6603). Impact Journals LLC.
35. Filella, X., Foj, L., Milà, M., Augé, J. M., Molina, R., & Jiménez, W. (2013). PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. In *Tumor Biology* (Vol. 34, Issue 3, pp. 1337-1347). Springer.
36. Lemos AE, Ferreira LB, Batoreu NM, de Freitas PP, Bonamino MH, Gimba ER. (2016). PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. *Tumour Biol*; 37: 11339-48.
37. Ferreira, L. B., Palumbo, A., de Mello, K. D., Sternberg, C., Caetano, M. S., de Oliveira, F. L., Neves, A. F., Nasciutti, L. E., Goulart, L. R., & Gimba, E.

- R. P. (2012). PCA3 noncoding RNA is involved in the control of prostate-cancer cell survival and modulates androgen receptor signaling. *BMC Cancer*, 12, 507.
38. Durand, X., Moutereau, S., Xylinas, E., & De La Taille, A. (2011). Progenesa™ PCA3 test for prostate cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 11(2), 137-144.
39. Grández-Urbina, J. A., Pichardo-Rodríguez, R., & Saldaña-Gallo, J. (2018). ¿Es el PCA3 costoefectivo en Latinoamérica y el Caribe? In *Salud Publica de Mexico* (Vol. 60, Issue 1, pp. 104-105). Instituto Nacional de Salud Pública.
40. *Desarrollo de PCA3 en orina una prueba de bajo costo y experiencia inicial para la detección de cáncer de próstata en pacientes mexicanos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González | Revista Mexicana de Urología.* (n.d.). Retrieved November 15, 2020.
41. Soda, N., Rehm, B. H. A., Sonar, P., Nguyen, N. T., & Shiddiky, M. J. A. (2019). Advanced liquid biopsy technologies for circulating biomarker detection. In *Journal of Materials Chemistry B* (Vol. 7, Issue 43, pp. 6670-6704). Royal Society of Chemistry.
42. Chaturvedi, V. K., Singh, A., Singh, V. K., & Singh, M. P. (2018). Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Current Drug Metabolism*, 20(6), 416-429.
43. Fiammengo, R. (2017). Can nanotechnology improve cancer diagnosis through miRNA detection? In *Biomarkers in Medicine* (Vol. 11, Issue 1, pp. 69-86). Future Medicine Ltd.
44. Yeh, Y. C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012). Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. In *Nanoscale* (Vol. 4, Issue 6, pp. 1871-1880). Royal Society of Chemistry.
45. Jamison JA, 1, Bryant EL, Kadali SB, Wong MS, Colvin VL, Matthews KS, Calabretta MK. *J. Nanoparticle Research*. 2011;13:625-636.
46. Sau TK, Rogach AL, Jaeckel F, Klar TA, Feldmann J. *Adv. Mater.* 2011;22:1805-1825.

47. Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, El-Sayed MA. *J. Phys. Chem. B.* 2006; 110:7238-7248.
48. Templeton AC, Pietron JJ, Murray RW, Mulvaney P. *J. Phys. Chem. B.* 2000; 104:564-570.
49. Toderas F, Baia M, Maniu D, Astilean S. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 2008; 10:2282-2284.
50. Pons T, Medintz IL, Sapsford KE, Higashiya S, Grimes AF, English DS, Mattoussi H. *Nano Lett.* 2007;7:3157-3164.
51. Bai, X., Wang, Y., Song, Z., Feng, Y., Chen, Y., Zhang, D., & Feng, L. (2020). The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 7, p. 2480). Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
52. Maier, S. A., & Atwater, H. A. (2005). Plasmonics: Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures. *Journal of Applied Physics*, 98(1), 011101.
53. Schuller, J. A., Barnard, E. S., Cai, W., Jun, Y. C., White, J. S., & Brongersma, M. L. (2010). Plasmonics for extreme light concentration and manipulation. *Nature Materials* 2010 9:3, 9(3), 193-204.
54. Moskovits, M. (1985). Surface-enhanced spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 57(3), 783-826.
55. Puig, H. de, Tam, J. O., Yen, C.-W., Gehrke, L., & Hamad-Schifferli, K. (2015). Extinction Coefficient of Gold Nanostars. *Journal of Physical Chemistry C*, 119(30), 17408-17415.
56. Li, N., Chang, C., Pan, W., & Tang, B. (2012). Inside Back Cover: A Multicolor Nanoprobe for Detection and Imaging of Tumor-Related mRNAs in Living Cells (*Angew. Chem. Int. Ed.* 30/2012). *Angewandte Chemie International Edition*, 51(30), 7601-7601.
57. Shi, H., Ye, X., He, X., Wang, K., Cui, W., He, D., Li, D., & Jia, X. (2014). Au@Ag/Au nanoparticles assembled with activatable aptamer probes as smart

- “nano-doctors” for image-guided cancer thermotherapy. *Nanoscale*, 6(15), 8754-8761.
58. Wang, J., Zhu, G., You, M., Song, E., Shukoor, M. I., Zhang, K., Altman, M. B., Chen, Y., Zhu, Z., Huang, C. Z., & Tan, W. (2012). Assembly of Aptamer Switch Probes and Photosensitizer on Gold Nanorods for Targeted Photothermal and Photodynamic Cancer Therapy. *ACS Nano*, 6(6), 5070-5077.
59. Han, D., Zhu, G., Wu, C., Zhu, Z., Chen, T., Zhang, X., & Tan, W. (2013). Engineering a Cell-Surface Aptamer Circuit for Targeted and Amplified Photodynamic Cancer Therapy. *ACS Nano*, 7(3), 2312-2319.
60. Sanchez-Dominguez, C. N., Gallardo-Blanco, H. L., Rodriguez-Rodriguez, A. A., Vela-Gonzalez, A. V., & Sanchez-Dominguez, M. (2014). Nanoparticles vs cancer: a multifunctional tool. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(5), 664-675.
61. Rocho-Perez, J. A., Gallardo-Blanco, H. L., Sanchez-Dominguez, M., Garcia-Casillas, P., Chapa-Gonzalez, C., & Sanchez-Dominguez, C. N. (2018). Nanoparticles for death-induced gene therapy in cancer (Review). In *Molecular Medicine Reports* (Vol. 17, Issue 1, pp. 1413-1420). Spandidos Publications.
62. Rocho-Pérez, J. A., Ruiz-Hernandez, F. G., Chapa-Gonzalez, C., Martínez-Rodríguez, H. G., Flores-Urquiza, I. A., Pedroza-Montoya, F. E., Garza-Treviño, E. N., Bautista-Villarea, M., García-Casillas, P. E., & Sánchez-Domínguez, C. N. (2020). Magnetite nanoparticles coated with PEG 3350-Tween 80: In vitro characterization using primary cell cultures. *Polymers*, 12(2), 300.
63. Rocho-Pérez, J. A., Rodríguez-Aguillón, K. O., Gallardo-Blanco, H. L., Velasco-Campos, M. R., Sosa-Cruz, K. V., García-Casillas, P. E., Rojas-Patlán, L., Sánchez-Domínguez, M., Rivas-Estilla, A. M., Gómez-Flores, V., Chapa-Gonzalez, C., & Sánchez-Domínguez, C. N. (2021). A Full Set of In Vitro Assays in Chitosan/Tween 80

- Microspheres Loaded with Magnetite Nanoparticles. *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 400, 13(3), 400.
64. Pinilla-Torres, A. M., Carrión-García, P. Y., Sánchez-Domínguez, C. N., Gallardo-Blanco, H., & Sánchez-Domínguez, M. (2021). Modification of Branched Polyethyleneimine Using Mesquite Gum for Its Improved Hemocompatibility. *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 2766, 13(16), 2766.
 65. Moreira, B. G., You, Y., & Owczarzy, R. (2015). Cy3 and Cy5 dyes attached to oligonucleotide terminus stabilize DNA duplexes: Predictive thermodynamic model. *Biophysical Chemistry*, 198, 36-44.
 66. Synak, A., Fudala, R., Gryczynski, I., Kułak, L., Shah, S., Serdiuk, I. E., Grobelna, B., Arłukowicz, P., Kubicki, A., & Bojarski, P. (2018). *Accepted Manuscript AMCA to TAMRA long range resonance energy transfer on a flexible peptide.*
 67. Hoyle, C. E., & Bowman, C. N. (2010). Thiol-ene click chemistry. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 49, Issue 9, pp. 1540-1573). John Wiley & Sons, Ltd.
 68. Northrop, B. H., Frayne, S. H., & Choudhary, U. (2015). Thiol-maleimide "click" chemistry: Evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity. *Polymer Chemistry*, 6(18), 3415-3430.
 69. RA, S., V, C., AC, von E., B, L., C, C., CD, R., S, S., D, S., & HJ, E. (2002). American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 52(1), 8-22.
 70. Roobol, M. J. (2011). Is prostate cancer screening bad or good? Summary of a debate at the innovation in urology meeting, September 17-19, 2010, Milan, Italy. In *European Urology* (Vol. 59, Issue 3, pp. 359-362). EurUrol.
 71. Soares, J. C., Soares, A. C., Rodrigues, V. C., Melendez, M. E., Santos, A. C., Faria, E. F., Reis, R. M., Carvalho, A. L., & Oliveira, O. N. (2019). Detection of the Prostate Cancer Biomarker PCA3 with Electrochemical and

- Impedance-Based Biosensors. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(50), 46645-46650.
72. Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Ford, L. G., Lippman, S. M., Crawford, E. D., Crowley, J. J., & Coltman, C. A. (2004). Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *New England Journal of Medicine*, 350(22), 2239-2246.
73. DC, G., SJ, C., DK, O., K, B.-D., AB, C., KW, D., CA, D., M, E., JW, E., AR, K., AH, K., M, K., CS, L., CM, M., M, S., MA, S., AL, S., & CW, T. (2018). Screening for Prostate Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*, 319(18), 1901-1913.
74. Hessels, D., Klein Gunnewiek, J. M. T., Van Oort, I., Karthaus, H. F. M., Van Leenders, G. J. L., Van Balken, B., Kiemeny, L. A., Witjes, J. A., Schalken, J. A., & Culig, Z. (2003). DD3/PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *European Urology*, 44(1), 8-16.
75. Chunhua, L., Zhao, H., Zhao, H., Lu, Y., Wu, J., Gao, Z., Li, G., Zhang, Y., & Wang, K. (2018). Clinical Significance of Peripheral Blood PCA3 Gene Expression in Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Translational Oncology*, 11(3), 628-632.
76. Htoo, K. P. P., Yamkamon, V., Yainoy, S., Suksrichavalit, T., Viseshsindh, W., & Eiamphungporn, W. (2019). Colorimetric detection of PCA3 in urine for prostate cancer diagnosis using thiol-labeled PCR primer and unmodified gold nanoparticles. *Clinica Chimica Acta*, 488(October 2018), 40-49.
77. Dijkstra, S., Leyten, G. H. J. M., Jannink, S. A., De Jong, H., Mulders, P. F. A., Van Oort, I. M., & Schalken, J. A. (2014). KLK3, PCA3, and TMPRSS2-ERG expression in the peripheral blood mononuclear cell

- fraction from castration-resistant prostate cancer patients and response to docetaxel treatment. *The Prostate*, 74(12), 1222-1230.
78. Merola, R., Tomao, L., Antenucci, A., Sperduti, I., Sentinelli, S., Masi, S., Mandoj, C., Orlandi, G., Papalia, R., Guaglianone, S., Costantini, M., Cusumano, G., Cigliana, G., Ascenzi, P., Gallucci, M., & Conti, L. (2015). PCA3 in prostate cancer and tumor aggressiveness detection on 407 high-risk patients: A National Cancer Institute experience. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1).
79. Chunhua, L., Zhao, H., Zhao, H., Lu, Y., Wu, J., Gao, Z., Li, G., Zhang, Y., & Wang, K. (2018). Clinical significance of peripheral blood PCA3 gene expression in early diagnosis of prostate cancer. *Translational Oncology*, 11(3), 628-632.
80. Shabestari Khiabani S, Farshbaf M, Akbarzadeh A, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;45:6-17.
81. Väänänen, R. M., Rissanen, M., Kauko, O., Junnila, S., Väisänen, V., Nurmi, J., Alanen, K., Nurmi, M., & Pettersson, K. (2008). Quantitative real-time RT-PCR assay for PCA3. *Clinical Biochemistry*, 41(1-2), 103-108.
82. Yang, X., Yang, M., Pang, B., Vara, M., & Xia, Y. (2015). Gold Nanomaterials at Work in Biomedicine. *Chemical Reviews*, 115(19), 10410-10488.
83. Bai, X., Wang, Y., Song, Z., Feng, Y., Chen, Y., Zhang, D., & Feng, L. (2020). The basic properties of gold nanoparticles and their applications in tumor diagnosis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7).
84. De Puig, H., Tam, J. O., Yen, C. W., Gehrke, L., & Hamad-Schifferli, K. (2015). Extinction coefficient of gold nanostars. *Journal of Physical Chemistry C*, 119(30), 17408-17415.