

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**EI FACTOR TRANSCRIPCIONAL ZEB1
PROMUEVE EL DESARROLLO TUMORAL Y LA
RESISTENCIA A QUIMIOTERAPEUTICOS EN
CELULAS DE CANCER PROSTATICO**

OCTAVIO ANDRES ORELLANA SERRADELL

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Director de Tesis: Prof. Dr. Héctor Contreras

2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

OCTAVIO ORELLANA SERRADELL

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de Noviembre de 2017.

Prof. Dr. Héctor R. Contreras

Director de Tesis

Dpto. de Oncología Básico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. IVAN GALLEGOS

PROF. DR. ALEJANDRO ARMISEN

PROF. DR. ALEJANDRO GODOY

**PROF. DR. MARIO GALINDO
Presidente Comisión de Examen**

DEDICATORIA

*A mis padres, Viviana y Octavio
sin ellos no sería la persona que soy*

AGRADECIMIENTOS

Ahora que esta larga etapa está acabando, es imposible no pensar en que este no es un logro personal, sino que de muchas personas que me han apoyado y han influido en diferentes formas para poder terminar exitosamente este gran proyecto que ha sido mi tesis de doctorado. Es por esa razón que deseo aprovechar este pequeño espacio para poder agradecer a todas las personas que han contribuido con su granito de arena (y a veces mucho mas) para poder haber hecho de mi tesis y mi paso por el doctorado una experiencia llenadora y sobretodo edificante.

En primer lugar y sobre todo deseo agradecer a mis padres por todo el interés y apoyo que me han brindado durante todos estos años de estudio y trabajo, por levantarme cuando las cosas no salían bien y por alegrarse conmigo cuando tenía éxito, por preguntarme por mis experimentos y por lo que hacía. Les agradezco en especial por sus enseñanzas y sobre todo por darlo todo por mí siempre. También agradezco a mi hermano por su ayuda y por siempre animarme en los momentos difíciles y al resto de mi familia por su gran amor.

En segundo lugar quiero agradecer al Doctor Héctor Contreras por la gran oportunidad que me dio de poder trabajar con él hace ya casi 10 años cuando solo era un joven estudiante de pregrado, le agradezco por confiar en mí siempre y por hacerme parte de sus proyectos, por hacer del laboratorio no solo un lugar de trabajo sino un lugar donde uno pueda sentirse a gusto y feliz. Sobre todas las cosas le agradezco por lo que me ha enseñado sobre ser un buen investigador pero también un buen hombre. Agradezco también a todo el equipo del Laboratorio de Andrología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. A Graciela por estar siempre dispuesta a ayudarnos con lo que necesitáramos y también por hacer lo posible para tener todas las cosas necesarias para solo dedicarnos a nuestros experimentos, pero en especial le agradezco por su constante preocupación por todos los que trabajamos ahí. Agradezco también al Dr. Castellón por sus aportes a mi proyecto y a mi formación como investigador, a Nancy por todas las

cosas que me enseñó al comenzar este camino del Doctorado y a todos los demás chicos que han sido o son parte del laboratorio, por todo lo que me han enseñado, sus comentarios y críticas que han ayudado a mejorar mis experimentos y presentaciones y por hacer del laboratorio algo entretenido y ameno. En especial quiero agradecer a Daniela por su apoyo y compañía en cada paso de mi tesis, por hacer que los fracasos que hubo durante este proceso fueran menos dolorosos, por subirme el ánimo y por siempre creer en mi capacidad. En resumen agradezco a todo nuestro grupo de trabajo por hacer del ambiente en el laboratorio un ambiente familiar siempre lleno de buena onda. Además es imposible no sentirme inmensamente agradecido con Cecilia, la mejor secretaria de doctorado del universo, siempre tan alegre y dispuesta a ayudarnos en cualquier cosa que necesitáramos.

También quiero aprovechar esta oportunidad para agradecer a mis amigos, quienes me han apoyado durante este largo camino, siempre animándome y ayudándome a olvidar el laboratorio cuando el stress era mucho.

Finalmente quiero agradecer a todas las demás personas que estuvieron presentes de una u otra forma conmigo durante todo este proceso que ha significado mi tesis y el Doctorado. No son pocos los que de una u otra manera contribuyeron con sus palabras de apoyo a que pudiera terminar este camino con una sonrisa.

INDICE

INDICE	6
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCION	12
- Aspectos de la Carcinogénesis	12
- Cáncer de Próstata	13
- Transición Epitelio Mesénquima	16
- El Factor Transcripcional ZEB1	19
- ZEB1 en el Proceso Cancerígeno	21
- Quimioresistencia en Cáncer de Próstata	23
- Hipótesis	27
- Objetivos	28
2. MATERIALES Y METODOS	29
- Cultivo Celular	29
- Inmunohistoquímica	29
- Sobreexpresión y Silenciamiento estable de ZEB1	30
- Extracción de RNA	30
- PCR en Tiempo Real	30
- Extracción de Proteínas Totales	31

- Western Blot	31
- Ensayos de Migración e Invasión	32
- Ensayos de Proliferación y Clonogenicidad	33
- Ensayo de Cierre de Herida	33
- Estudios de Sensibilidad a Docetaxel	34
- Estudios de Viabilidad por MTT	34
- Inmunocitoquímica	34
- Bloqueo de ABCC1	35
- Análisis de Proliferación, Citotoxicidad y Apoptosis	35
- Análisis Estadístico	35
3. RESULTADOS	36
3.1 Objetivo Específico 1	36
- Expresión basal de ZEB1 en biopsias de pacientes y líneas celulares comerciales de CaP	36
- Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1 sobre marcadores de TEM	39
- Niveles de mRNA de marcadores de TEM	39
- Niveles proteicos de marcadores de TEM	41
- Ensayos de proliferación y formación de colonias	42
- Ensayo de migración e invasión	44

- Ensayo de cierre de herida	45
3.2 Objetivo Específico 2	46
- Sensibilidad a Docetaxel	46
- Marcadores de quimioresistencia	48
- Ensayo de apoptosis por Anexina V	51
3.3 Objetivo Específico 3	54
- Expresión de ABCC1 en biopsias de CaP y líneas celulares con silenciamiento de ZEB1	53
- Rol de ABCC1 en la quimioresistencia mediada por ZEB1	55
- Rol del proceso de apoptosis en la quimioresistencia mediada por ZEB1	56
4. DISCUSION	59
5. CONCLUSIONES	66
6. BIBLIOGRAFIA	67

RESUMEN

Introducción: El cáncer de próstata (CaP) en Chile representa la tercera patología oncológica más común en hombres y la segunda en causas de muerte por cáncer. Recientemente se ha visto que uno de los mecanismos involucrados en la malignización celular sería la activación anómala del programa de transición epitelio mesénquima (TEM). Este proceso se caracteriza por la represión de la expresión de marcadores epiteliales y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales, motilidad e invasividad celular y está controlado por factores transcripcionales como Snail, Twist y ZEB1. Estos factores transcripcionales ejercen su función generalmente mediante el reclutamiento de corepresores (como CtBP) o coactivadores (como la histona acetil transferasa p300). Se ha reportado que el factor transcripcional ZEB1, a través de la activación del proceso de TEM, no solo controlaría varios de estos cambios fenotípicos sino que además podría promover la resistencia a quimioterapéuticos. Pese a esto, el rol de ZEB1 en el progreso tumoral del CaP aún no está claro. Por lo tanto, el propósito de nuestra investigación es proponer al factor transcripcional ZEB1 como un componente clave en el progreso tumoral hacia etapas avanzadas del CaP y en el desarrollo de un fenotipo quimiorresistente.

Hipótesis y objetivos: “El Factor Transcripcional ZEB1 regula la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima e induce un fenotipo maligno y de resistencia a quimioterapéuticos en células epiteliales de cáncer prostático”. Para responder la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos: 1) Generar y caracterizar líneas celulares de cáncer prostático con sobreexpresión y silenciamiento estable de ZEB1 en cuanto a marcadores de TEM y propiedades relacionadas con la malignidad tumoral. 2) Estudiar la sensibilidad y resistencia de células 22Rv1 con sobreexpresión y DU145 con silenciamiento de ZEB1 en respuesta a Docetaxel y posibles mecanismos de resistencia a dicho fármaco.

3) Evaluar el rol de ABCC1 y el mecanismo de apoptosis en la sensibilidad a Docetaxel de células con sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1.

Materiales y métodos: En este trabajo se utilizaron las líneas celulares de CaP 22Rv1 y DU145 en las que se sobreexpresó y silenció ZEB1 respectivamente, utilizando transducción lentiviral. Se caracterizaron estas líneas celulares en cuanto a marcadores de TEM por medio de qRT-PCR y Western Blot y se estudiaron propiedades asociadas al progreso tumoral como migración, invasión y clonogenicidad. La sensibilidad a Docetaxel se evaluó para ambos tipos celulares por medio del método de conteo por azul de tripán (que se comprobó utilizando el método de MTT). Se estudiaron marcadores de quimioresistencia por qRT-PCR y Western Blot y se analizaron cambios en el proceso de apoptosis como mecanismo de resistencia al tratamiento con Docetaxel por medio de qRT-PCR y Western Blot y se estudió la participación de la proteína de multiresistencia a drogas ABCC1 en la quimioresistencia mediada por ZEB1.

Resultados: Los resultados mostraron que la sobreexpresión de ZEB1 causó un aumento en el marcador mesenquimal Vimentina y una disminución del marcador epitelial E-Cadherina, con un aumento en la motilidad, invasividad y capacidades clonogénicas, mientras que su silenciamiento causó una baja en Vimentina, un aumento en E-Cadherina y una baja en las propiedades malignas. Adicionalmente la expresión de ZEB1 promovió un aumento en la resistencia a Docetaxel, cambio que estaría siendo mediado por una menor activación del programa de apoptosis y un aumento en la expresión de la proteína de multiresistencia a drogas ABCC1.

Proyección: Nuestros resultados sugieren que ZEB1 podría ser un marcador no solo de progreso y agresividad tumoral en CaP sino también de resistencia al tratamiento con Docetaxel y como blanco terapéutico.

ABSTRACT

Introduction: Prostate cancer is a chronic health problem representing one of the most diagnosed cancers in men worldwide. The disease has a good prognosis when it is detected in its early stages but at late stages it becomes resistant to all therapies used to treat it. One of the factors that have lately been signaled as a key promoter of tumoral progress is the abnormal activation of the epithelial-mesenchymal transition program (EMT), which allows tumoral cells to acquire malignant properties and resistance to common treatments such as radio and chemotherapy. The transcription factor ZEB1 is one of its main activators and even though it has been reported that it shows higher expression in prostate cancer samples with high Gleason score, its effect over prostate cancer progression still remains unclear.

Material and Methods: The prostate cancer cell lines 22Rv1 and DU145 cell were selected for this research due to their low and high expression of ZEB1 respectively. ZEB1 overexpression and silencing was achieved using lentiviral vectors. EMT and chemoresistance was evaluated by measuring levels of key markers using qRT-PCR and Western Blot. Malignancy was evaluated using a Boyden chamber assay. Sensitivity to Docetaxel was analyzed using the MTT method. To study apoptosis we used a commercial kit and the Annexin-V assay.

Results: ZEB1 expression caused an upregulation of the mesenchymal marker Vimentin and a downregulation of the epithelial marker E-Cadherin and conferred enhanced motility and invasiveness to 22Rv1 cells while its silencing in DU145 cells showed the opposite switch in markers and decreased motility and invasiveness. Finally, cells overexpressing ZEB1 exhibited lower sensitivity to Docetaxel while silenced cells proved to be more sensitive, change that was mediated by the multi-resistance protein ABCC1 and changes in the apoptosis program.

Discussion: Our data poises ZEB1 as a key driver of tumoral malignancy and resistance to Docetaxel treatment, which could be attributed to changes in ABCC1 expression and the apoptosis program. This suggests ZEB1 as a potential therapeutic target to overcome chemoresistance.

1. INTRODUCCION

Aspectos de la carcinogénesis

El cáncer es un problema crónico de salud a nivel mundial que posee un largo periodo de latencia e inducción (incluso de décadas) haciendo muy difícil la evaluación de posibles factores de riesgo. Las razones para estos largos periodos de desarrollo de la enfermedad están relacionadas con el hecho de que para que una célula normal se convierta en cancerosa, necesita pasar previamente por varios cambios tanto a nivel genético como epigenético (Fig.1) (1). Estos cambios génicos llevan a la desregulación en los niveles de diversas proteínas generando un incremento en la expresión de algunas, una baja (o desaparición) en otras o incluso la expresión de proteínas aberrantes con actividades distintas a las de la proteína normal (2).

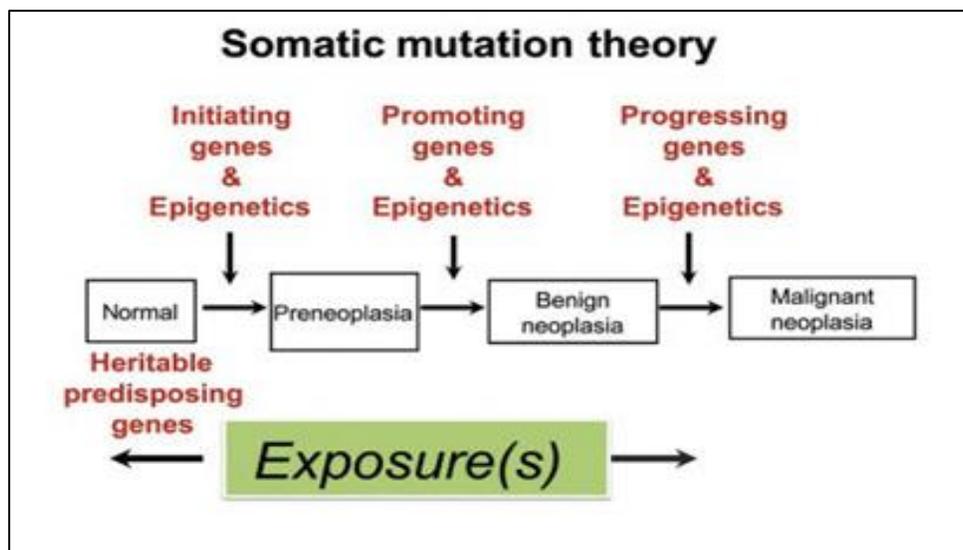


Fig.1. Modelo de progresión de célula normal a célula maligna. En la imagen se muestra la evolución propuesta de una célula normal a célula cancerígena a través de varias mutaciones. Adaptada de *Malarkey et col.* (2013). *Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*; 107–146.

Se han descrito dos tipos de genes relacionados con el proceso de carcinogénesis, los denominados oncogenes son aquellos cuya activación o sobreexpresión promueven el progreso tumoral, un ejemplo de esto son las mutaciones en el gen KRAS, las que llevan a proliferación sostenida y progresión tumoral en cánceres como pulmón o colorectal. También están los llamados genes supresores de tumores, los cuales al inactivarse promoverían el progreso tumoral, ejemplo de esto es el gen TP53 que como un freno para la proliferación celular. La desregulación de estos dos tipos de genes lleva a cambios en distintos procesos normales de la célula como el metabolismo, proliferación, migración y angiogénesis, cambios que contribuirán finalmente a la malignización y desarrollo del tumor (3).

En la actualidad y pese al mayor entendimiento que existe respecto a las causas de la carcinogénesis y a la gran gama de tratamientos disponibles para poder atacar esta enfermedad, el cáncer ha pasado a ser la segunda causa de muertes a nivel mundial (4), por lo que un mayor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que controlan y promueven el progreso y malignización tumoral se hace de vital importancia.

Cáncer de Próstata

El cáncer de próstata (CaP) es un problema de salud importante a nivel mundial, representa el segundo cáncer más diagnosticado en hombres y el quinto en mortalidad asociada a cáncer (5). En estados unidos ya se ha transformado en la enfermedad neoplásica más diagnosticada en hombres llegando a dar cuenta de un 27 % de los canceres diagnosticados cada año y es la segunda en causas de muerte (6). En nuestro país la situación no es muy diferente, el CaP se ha transformado en el tercero más frecuente y el segundo en causa de muerte por cáncer en hombres con un aumento permanente en los últimos años (7) (fig. 2).

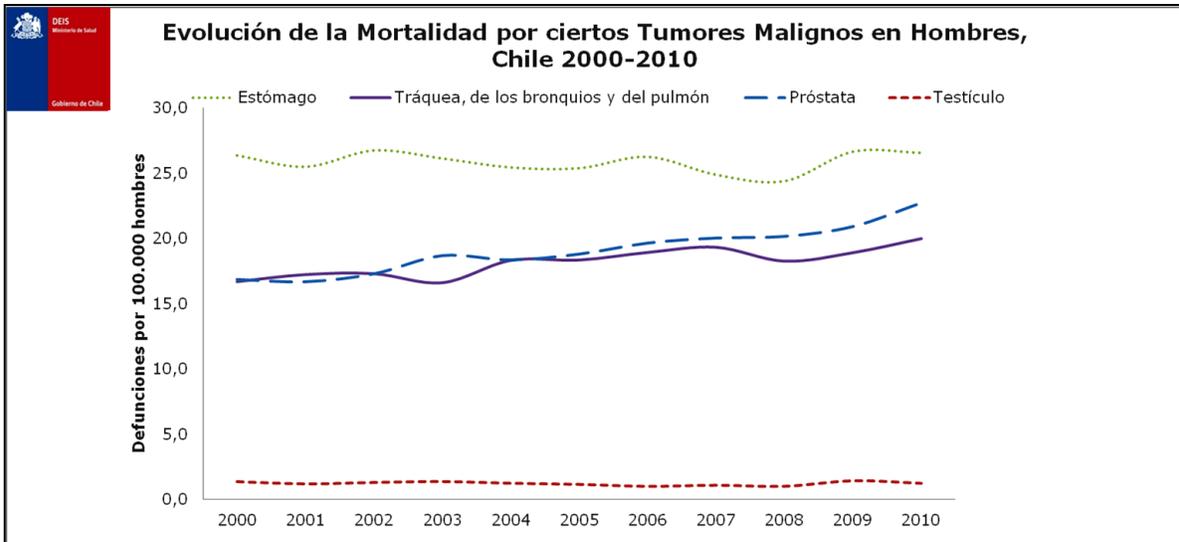


Fig. 2. Evolución de la mortalidad del Cáncer de Próstata en Chile. La imagen muestra los cambios en mortalidad del cáncer de próstata comparado con otras neoplasias comunes en Chile. Adaptada de: Bley E., Silva A. (2011). Diagnóstico precoz del cáncer de próstata. *Rev. Med.Clin.Condes* 22(4), 453-58.

La próstata normal es una glándula con forma de nuez y se encuentra rodeando la uretra en la base de la vejiga y su función es producir importantes componentes del líquido seminal. La próstata posee una arquitectura con zonas bien definidas: una zona central, una periuretral, una de transición, una anterior y una periférica (8).

El CaP es una enfermedad multifocal y heterogénea aunque es en la zona periférica donde se desarrollan la mayoría de los carcinomas en esta glándula. Su origen celular ha sido atribuido a la desdiferenciación de las células luminales, aunque también se ha descrito que en algunos casos podría haber una transformación maligna de las células troncales prostáticas que se encuentran entre las células basales. Para que ocurra esta transformación debe haber cambios a nivel genético en las células. El factor de riesgo mayormente asociado a esta enfermedad es la edad, con un promedio de diagnóstico de 66 años, a esto también se agregan otros factores como la obesidad, la inflamación y la historia familiar (9).

El diagnóstico inicial por medición de los niveles de antígeno prostático específico (PSA en inglés) en sangre junto con un tacto rectal. Para la confirmación del diagnóstico se procede con una biopsia. El análisis de la biopsia la realiza un patólogo quien asignará un score de Gleason, basándose en el grado de organización celular en el tejido (grado 1-5 de mayor a menor diferenciación) y luego, suma los patrones más comunes para obtener el valor definitivo (Índice o score de Gleason 2 a 10) (10). Se ha reportado que ciertas lesiones o enfermedades podrían hacer de precursores al desarrollo del CaP, por ejemplo, la atrofia proliferativa inflamatoria (o PIA) puede producir focos crónicos de inflamación en la zona periférica de la próstata llevando a una transformación maligna de las células en esta zona, o también la neoplasia prostática epitelial (o PIN) cuyas células poseen muchas de las mismas características genéticas, citológicas y de diferenciación que poseen los carcinomas tempranos (11).

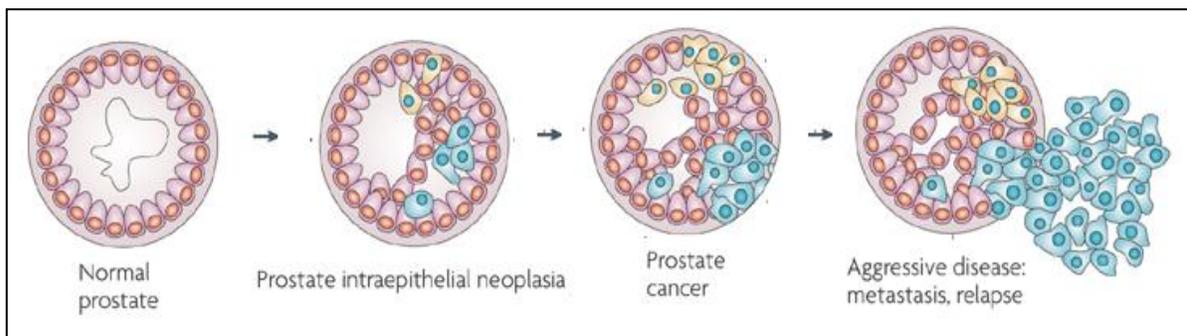


Fig. 3. Etapas de progresión del CaP. En la imagen se observan las etapas propuestas para el progreso del CaP. Figura adaptada de Witte J. (2009). Prostate cancer genomics: towards a new understanding. *Nature Review Genetics* 10, 77-82.

A nivel celular se ha planteado que el origen del CaP podría estar dado por un proceso de diferenciación de las células luminales o por la malignización de las células troncales prostáticas (las que se encargan de regenerar las células epiteliales luminales) que se encuentran entre las células basales. Estas células una vez malignizadas pueden dar paso a un carcinoma prostático localizado el que con el tiempo puede invadir tejidos vecinos y finalmente generar metástasis a distancia (9).

El tratamiento de preferencia cuando la enfermedad se encuentra en etapas tempranas es la remoción quirúrgica de la próstata seguida normalmente de radioterapia, tratamiento que puede presentar contratiempos para la calidad de vida del paciente. Si la detección es tardía o el tumor ya ha progresado y ha generado metástasis, entonces la opción terapéutica principal es la deprivación androgénica, la cual es inicialmente efectiva, pero luego lleva a una condición de resistencia a los andrógenos, estado en que el tumor ya no requiere andrógenos para mantenerse y proliferar. En esta etapa de la enfermedad ya no hay tratamientos efectivos, por lo que es necesario un mayor conocimiento de cómo el CaP progresa y se CaP insensible a los andrógenos y a tratamiento en etapas avanzadas (12).

Transición epitelio mesénquima

En los últimos años se ha reportado que durante el progreso tumoral ocurre una activación aberrante de un proceso que es normal durante el desarrollo embrionario, denominado transición epitelio mesénquima (TEM). La TEM es un proceso biológico reversible que le confiere a una célula epitelial, la capacidad de asumir un fenotipo mesenquimal, el cual involucra un aumento en sus capacidades migratorias, invasivas y resistencia a apoptosis. Todos estos cambios llevan a la formación de una célula que tendrá la capacidad de degradar la lámina basal y migrar fuera de la capa epitelial de la que formaba parte (13). Durante el desarrollo embrionario, la TEM está involucrada en diversos procesos como por ejemplo en la gastrulación y formación de las capas embrionarias y en el desarrollo de la cresta neural. En esta última, la TEM ayuda a que las células que forman parte de la cresta neural puedan migrar a distintas partes del embrión en desarrollo y formar lo que será el sistema nervioso periférico (14, 15).

Otro proceso fisiológico donde también está involucrada la TEM es en la cicatrización, donde los queratinocitos que rodean una herida pasan por una TEM para poder migrar al sitio del daño y luego pasan por el proceso inverso o Transición Mesenquimal Epitelial (TME) al cerrarse la herida (16). Finalmente, en el proceso

tumoral se ha visto que la activación anormal del programa de TEM lleva a la adquisición de un fenotipo maligno e invasivo por parte de los tumores epiteliales. En un comienzo estos tumores pasan por una fase de proliferación y angiogénesis local y subsecuentemente evolucionan y adquieren capacidades invasivas (debido a la activación del programa de TEM), las que se manifiestan en una invasión a través de la lámina basal, la que sería el primer paso en la diseminación del tumor y la posterior formación de metástasis a distancia, evento que normalmente lleva a la muerte de los pacientes (17).

El evento principal que define el proceso de TEM es la pérdida de expresión de E-Cadherina, molécula clave en la formación de las uniones adherentes que median las uniones célula-célula en los epitelios. Además, ocurre una disminución en los niveles de otras proteínas relacionadas con las uniones celulares, como alfa y gama cateninas. Simultáneamente se observa un aumento en la expresión de cadherinas no epiteliales como la N-Cadherina y aumento en la expresión del filamento intermedio Vimentina y proteínas de matriz extra celular como Fibronectina. Todos estos cambios proteicos a nivel de moléculas de adhesión celular llevan a un aumento en las capacidades invasivas y migratorias en las células tumorales (18) (Fig. 4).

Además de estos cambios fenotípicos se ha reportado recientemente que la TEM no solo daría paso a células con un fenotipo más mesenquimal sino que también en algunas células a la adquisición de un fenotipo multipotente, transformándose en células denominadas *cancer stem cells* (células troncales tumorales). Este fenotipo favorecería el progreso tumoral y en especial la resistencia del tumor a los tratamientos convencionales (19). Como se observa en la figura 4 y como se ha descrito hasta ahora, el programa de TEM tiene la capacidad de producir variados cambios en las células epiteliales, la mayoría de los cuales le confiere al tumor una mayor malignidad.

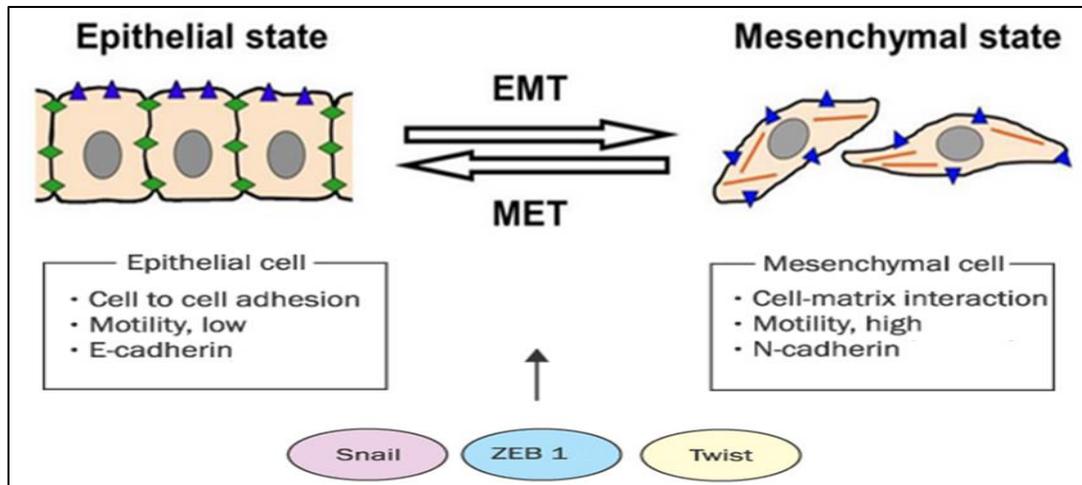


Fig. 4. Características del proceso de TEM. La figura muestra los cambios que se asocian comúnmente al proceso de TEM y el proceso contrario de MET. Adaptada de Maier H et col. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2(4): 2058–83.

Con respecto a la inducción del proceso de TEM se ha reportado que la activación de varias vías de señalización relacionadas con el desarrollo podrían llevar a la activación de este programa, ejemplo de esto son las vías de TGF- β , Wnt, Notch y las de factores de crecimiento como EGF y FGF (20). La activación de estas vías de señalización lleva a cambios en la expresión de factores de transcripción que actuarán como reguladores de la TEM, como lo son los de la familia de Snail (Snail, Slug y Smug), Twist (Twist1/2) y ZEB (ZEB1/2) (21).

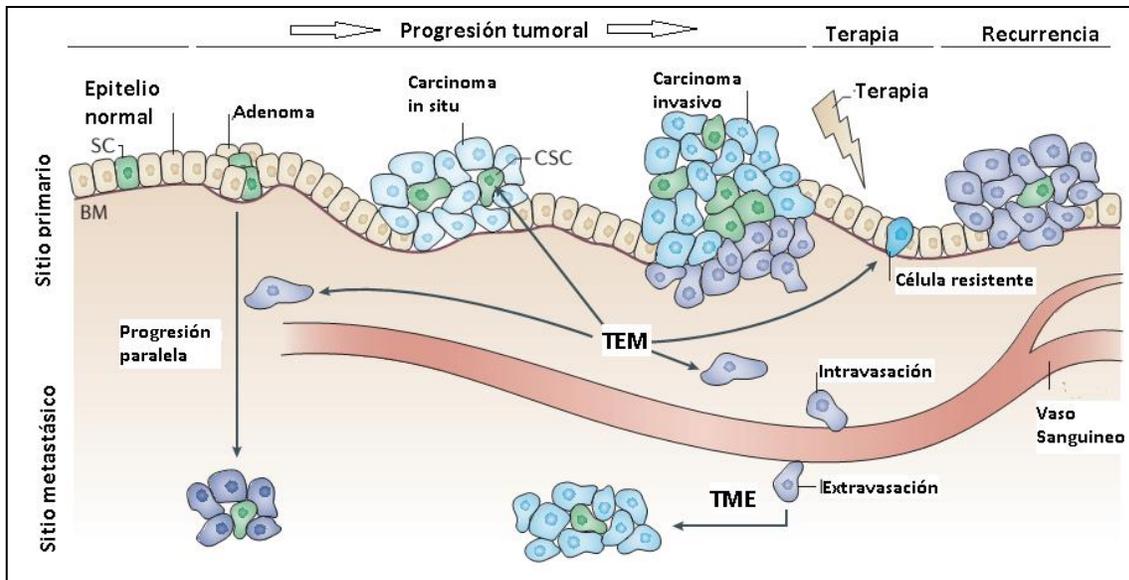


Fig. 5. Diversos roles de la TEM durante el progreso tumoral. A medida que el tumor progresa, el proceso de TEM puede contribuir de diversas formas como en la aparición de CSCs, células resistentes a tratamiento y especialmente en la aparición de células tumorales con un fenotipo mesenquimal, migratorio e invasivo. Adaptado de Craene B., Berx G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cáncer* 13,97-110.

El Factor Transcripcional ZEB1

El factor transcripcional ZEB1 es codificado en humanos por el gen *TCF8*, a nivel estructural ZEB1 es multimodular y contiene varias regiones de unión a DNA, unión a otros factores transcripcionales y a diversos cofactores, los que pueden ser de tipo activador o represor. ZEB1 y todos los miembros de la familia de factores ZEB poseen regiones de “dedos de zinc” que le permiten interactuar y unirse al DNA, estas se encuentran localizadas una en la parte N-terminal, otra en la C-terminal y una más pequeña en la parte central de la proteína (22). Estas regiones de dedos de zinc se unen a secuencias específicas del DNA denominadas E-box-like las que tienen la secuencia 5'-CAGGTG/A-3' (la secuencia E-box corriente es 5'-CANNTG-3') en la región regulatoria de los genes blancos para este factor transcripcional. El hecho de tener más de una región de unión al DNA permite también a estos factores unirse a más de una zona al mismo tiempo (23).

Próximo a la zona N-terminal ZEB1 posee una región de unión a otros factores de transcripción como por ejemplo a miembros de la familia de Smad, asociados a la vía de señalización TGF β /BMP, mientras que el dominio C-terminal de ZEB1 posee regiones de interacción para cofactores CtBP, los que a su vez interactúan con histonas desacetilasas y metiltransferasas (24). Tal complejidad en la variedad de interacciones que puede establecer ZEB1 da cuenta de las múltiples actividades transcripcionales que puede llevar a cabo, las que pueden ser de tipo represor o activador.

La función más común de ZEB1 es la de reprimir la expresión génica, la que puede venir en forma pasiva o activa. En el primer caso, ZEB1 compite con activadores transcripcionales desplazándolos de su sitio de unión al ADN. En el segundo caso (el más común), ZEB1 reprime la expresión de sus genes blancos mediante el reclutamiento de diversos corepresores como CtBP o BRG1 (22). El mejor ejemplo de su actividad como represor es la que ejerce sobre E-Cadherina, donde la unión de ZEB1 al promotor de este gen lleva al reclutamiento de BRG1, el cual es parte del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, lo que promueve la desacetilación de las histonas cercanas, el empaquetamiento de la cromatina y el silenciamiento del gen (25).

La activación transcripcional por ZEB1 también involucra el reclutamiento de cofactores, por ejemplo, su unión a proteínas de la familia de Smad, ZEB1 recluta las histonas acetiltransferasas p300 y p/CAF las que promueven la acetilación de histonas cercanas, lo que lleva a una cromatina menos compacta y una mayor actividad de los genes blanco (26).

Pese a todo el conocimiento que se tiene sobre su estructura aún no se tiene muy clara la forma en que ZEB1 es regulado. Se sugiere que ZEB1 es regulado, a nivel de mRNA por miembros de la familia de los miR200 (que se une a la región 3'UTR del mRNA de ZEB1 promoviendo su degradación), el cual a su vez es reprimido por ZEB1, causándose así un feedback negativo entre ellos (27).

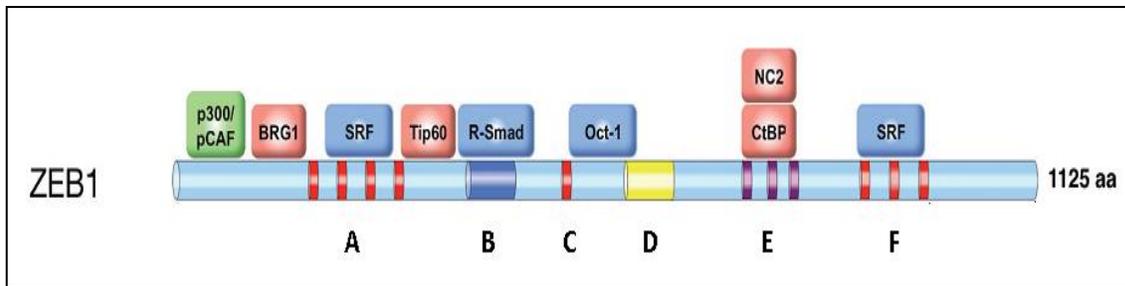


Fig. 6. Esquema de la estructura y dominios del FT ZEB1. A: Región de “dedos de Zinc” N-Terminal. B: Dominio de interacción con proteínas SMAD. C: Región de “dedos de zinc” central. D: Homeodominio. E: Dominio de interacción con proteínas CtBP. Región de “dedos de zinc” C-Terminal. *Postigo A. et al. (2012). Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. Am J Cancer Res 2(1), 897-912.*

Recientemente se ha descrito que la expresión de ZEB1 también podría ser regulada por medio del receptor de andrógenos el que se uniría a zonas ARES dentro del promotor de ZEB1, promoviendo su expresión (28). Además, se ha visto que otros factores transcripcionales podrían activar la expresión de ZEB1, ejemplo de esto es el factor Twist1, el cual también está relacionado con el proceso de TEM y que se une directamente al promotor de ZEB1 (29). Finalmente, se ha reportado recientemente que la ubiquitin ligasa SIAH contribuiría a regular la expresión de ZEB1 a nivel postraduccional promoviendo su degradación por el proteosoma, regulando así su vida media (30).

ZEB1 en el desarrollo del cáncer

Como se mencionó anteriormente, el rol de ZEB1 en el proceso tumoral está dado por su participación en el programa de TEM. Quizás el blanco principal que tiene ZEB1 en regular la TEM es su rol de represor transcripcional de E-Cadherina. Esta proteína se expresa fuertemente en células epiteliales donde forma parte de las uniones adherentes y media la adhesión intercelular mientras que por su lado intracelular interactúa con cateninas y con el citoesqueleto de actina manteniendo la

polaridad celular. Por tanto, la pérdida de E-Cadherina es un paso crítico no solo en el inicio del programa de TEM sino también en el progreso tumoral ya que da paso a la pérdida de las uniones célula-célula, pérdida de polaridad celular y activación de genes mediante la migración de β -catenina al núcleo (31). Este efecto de ZEB1 sobre la represión de E-Cadherina se ha reportado en diversos tipos de cáncer, como por ejemplo, en próstata, donde se ha correlacionado su alta expresión con un alto score de Gleason y como predictivo de metástasis (32), mamario, donde se relaciona su mayor expresión con un estado avanzado de la enfermedad (33) y uterino, donde se expresa casi exclusivamente en cánceres de tipo más agresivo (34).

Por otro lado, se ha reportado que ZEB1 también puede controlar negativamente la expresión de otros genes relacionados a las uniones adherentes como Pals1 y genes relacionados con el control de la polaridad en la célula epitelial tales como Crumbs3 y HUGL2 en un modelo de cáncer mamario, promoviendo de esta manera una “desdiferenciación” celular que es característica de los tumores avanzados (33). Además en un modelo de cáncer de colon, se encontró que un aumento en ZEB1 produce un aumento en la expresión de los genes MT1–MMP and LAMC2, los cuales codifican para una metaloproteínasa de matriz y una isoforma de la laminina respectivamente, promoviendo así la degradación de la matriz extracelular facilitando la invasividad por parte del tumor (35).

Adicionalmente, ZEB1 también promueve el progreso tumoral al inhibir la expresión de los miRNA de la familia de los miR200, los cuales son potentes inductores del fenotipo epitelial al promover la expresión de E-Cadherina y también inhibir la invasión y migración de líneas celulares cancerosas. Al mismo tiempo, la inhibición de los miR200 también lleva a la aparición de un fenotipo de *cancer stem cell* mediante la expresión del factor de troncalidad y oncoproteína BMI1. ZEB1 no solo regula la familia de los miR200 sino que también puede inhibir la expresión de los miR-183 y miR-203 los cuales no solo tienen como objetivo a BMI1 sino además a otros factores asociados con la troncalidad como SOX2 y KLF4 promoviendo así la expresión de estos factores y el fenotipo troncal tumoral (36).

Todos estos efectos hacen de ZEB1 un importante factor transcripcional a estudiar como potencial blanco terapéutico durante el progreso tumoral en CaP (Fig. 7), donde se ha descrito muy poco sobre su rol y acción y donde la enfermedad en etapas avanzadas es resistente a todos los tipos de tratamientos disponibles.

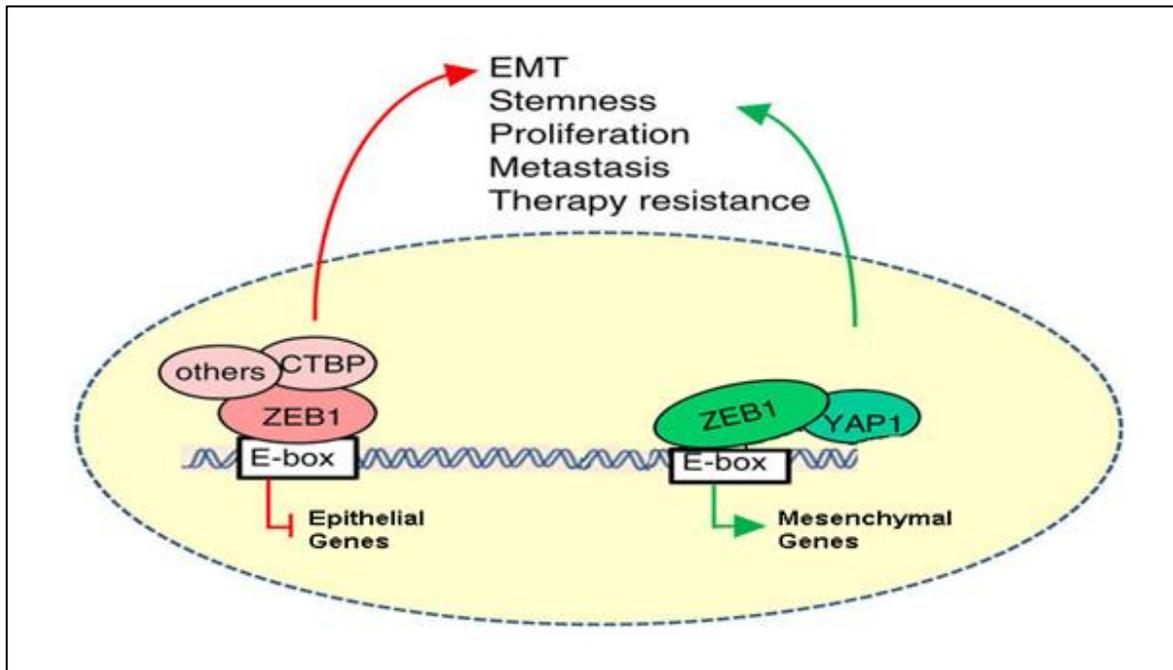


Fig. 7. Características tumorales reguladas por ZEB1. En la imagen se aprecian algunos de las características que regula el factor transcripcional ZEB1 dentro del proceso tumoral. Adaptada de: *Lehmann et al.* (2015). ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nature Comm.* Article number: 10498.

Quimioresistencia en Cáncer de Próstata

En pacientes a los que se les diagnostica CaP avanzado o metastásico, el tratamiento standard prescrito es la terapia de deprivación androgénica, sin embargo, pese a ser efectiva inicialmente, la mayoría de los pacientes presentarán resistencia a esta terapia y un regreso de la enfermedad al cabo de unos años (37).

En esta etapa denominada como CaP resistente a la castración, el tratamiento utilizado para frenar el avance es la quimioterapia y en específico el Docetaxel, el cual actúa interfiriendo con la mitosis al unirse a los microtúbulos y más específicamente a la β -Tubulina. Lamentablemente, una de las características del CaP en estados avanzados es su alta resistencia a los tratamientos disponibles, incluida la quimioterapia. Diversos mecanismos se han descrito para dar cuenta de esta resistencia a la quimioterapia tanto en CaP como en otros tipos de tumores (38). Se ha visto in vitro que mutaciones en esta proteína son capaces de conferir a las células tumorales resistencia al tratamiento con Docetaxel al bajar la afinidad de este por la β -Tubulina. Además, las células cancerosas también podrían expresar diferentes isoformas de la β -Tubulina por las que Docetaxel casi no tiene afinidad (en especial la isoforma III), confiriéndole así otro mecanismo de resistencia al tumor contra el tratamiento con Docetaxel (39).

Una forma común en que el CaP y otros tumores resisten el tratamiento con quimioterapéuticos es mediante la expresión de proteínas de multiresistencia a drogas (MDR), las que sacan la droga fuera de la célula limitando así su tiempo de acción y concentración intracelular. En CaP avanzado se ha asociado el aumento en la expresión de varias de estas proteínas de MDR. La Glicoproteína-P es la más estudiada de estas y ha sido asociada con resistencia a quimioterapia en cultivos primarios de CaP (40). Además, la expresión de MRP1 y BCRP, dos proteínas también de la familia de las MDR ha sido correlacionada con un mayor score de Gleason y resistencia a quimioterapéuticos (41).

Uno de los efectos más comunes de la quimioterapia es la generación de daño al DNA, lo que termina matando a la célula. Los tumores responden ante esto aumentando sus mecanismos de reparación del DNA para así poder evitar que el daño permanente lleve a su muerte. También se ha descrito en líneas celulares de CaP una respuesta aumentada frente a daño en su DNA causado por quimioterapéuticos, lo que se correlacionó con un aumento en el marcador de reparación γ H2AX (42). Esto se comprobó en muestras de pacientes con CaP donde

una mayor expresión de las proteínas ligadas a la reparación del DNA, RAD51 y γ H2AX se correlacionó con un estado más agresivo de la enfermedad y con un fenotipo resistente a quimioterapia (43, 44).

Si el daño al DNA ocasionado por la quimioterapia no es reparado, la célula normalmente activa mecanismos de muerte como apoptosis, pero se ha visto que el CaP en estado avanzado es altamente resistente a apoptosis. Casi la totalidad de los casos de CaP que han hecho recidiva y que se han vuelto resistentes a tratamientos presentan una alta expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL, ambos encargados de inhibir la respuesta apoptótica, lo que le confieren a la célula una alta resistencia a la inducción de muerte en respuesta a la quimioterapia (45).

Normalmente la quimioterapia en CaP solo se había utilizado para aliviar los síntomas hasta que en el año 2004 la FDA aprobó el uso del quimioterapéutico Docetaxel para el tratamiento del CaP avanzado luego de demostrarse su efecto en aumentar la sobrevida de los pacientes. Lamentablemente, muchos pacientes no responden a este tratamiento y los demás generan resistencia al cabo de unos meses por lo que se ha hecho de suma importancia el poder entender los mecanismos mediante los cuales las células cancerosas generan resistencia a Docetaxel y encontrar blancos para resensibilizar al tumor a estos tratamientos (46).

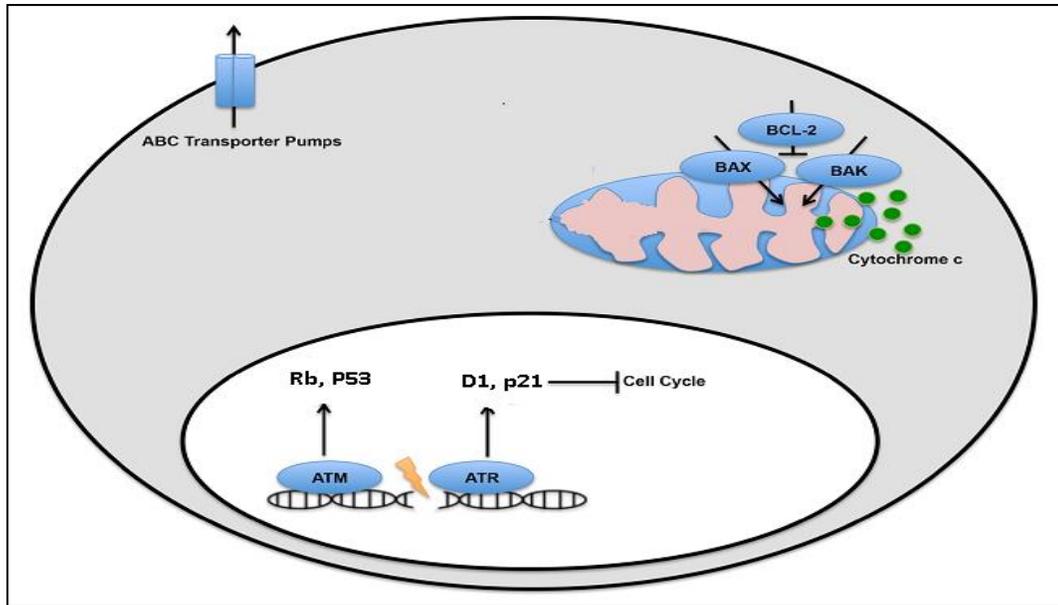


Fig. 8. Ejemplo de mecanismos moleculares de resistencia a quimioterapéuticos en células tumorales. Las células tumorales generalmente utilizan diversos métodos para resistir a los tratamientos con drogas quimioterapéuticas. Adaptado de Abdullah L., Chow E. (2013). Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine* 2(3), 1-9.

Se ha reportado que la inducción del programa de TEM puede otorgar a las células tumorales resistencia a quimioterapia. En trabajos recientes se observó que la inhibición de ZEB1 en líneas celulares de cáncer mamario resistentes a Docetaxel podía resensibilizar a las células al tratamiento con esta droga (47), mientras que otro grupo apuntó también hacia este factor transcripcional como un componente de importancia en la aparición de resistencia a Docetaxel en CaP (48). Hasta ahora, existe escasa información sobre los mecanismos mediante los cuales ZEB1 estaría involucrado en la generación de este fenotipo quimiorresistente, por lo que en este trabajo nos centramos en como ZEB1 promueve el progreso tumoral en un modelo de líneas celulares de CaP, evaluando al mismo tiempo algunos mecanismos de quimiorresistencia para entender cómo este factor transcripcional puede promover el desarrollo de un fenotipo resistente a quimioterapéuticos en CaP.

HIPOTESIS

“El Factor Transcripcional ZEB1 regula la expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima e induce un fenotipo maligno y de resistencia a quimioterapéuticos en células epiteliales de cáncer prostático”

Objetivo General

Determinar el efecto de ZEB1 en el desarrollo de un fenotipo resistente a quimioterapéuticos y en la inducción del programa de transición epitelio-mesénquima en células epiteliales de cáncer prostático.

Objetivos Específicos

1.- Generar y caracterizar una línea celular de cáncer prostático con sobreexpresión estable de ZEB1 en cuanto a marcadores de TEM y propiedades relacionadas con la malignidad tumoral. Estudiar el efecto de un shRNA contra ZEB1 en una línea celular de cáncer prostático con alta expresión de ZEB1 respecto a dichos marcadores y propiedades.

2.- Estudiar la sensibilidad y resistencia de células 22Rv1 con sobreexpresión y DU145 con silenciamiento de ZEB1 en respuesta a Docetaxel y posibles mecanismos de resistencia a dicho fármaco.

3.- Estudiar el rol de ABCC1 y el proceso de apoptosis en la resistencia a Docetaxel mediada por ZEB1

2. MATERIALES Y METODOS

Cultivo celular: Se utilizaron las siguientes líneas celulares de cáncer prostático: PC3 (ATCC, Cat. N° CRL-1435), LNCaP (ATCC, Cat. N° CRL-1740), DU145 (ATCC, Cat. N° HTB-81), 22Rv1 (ATCC, Cat. N° CRL-2505) y la línea celular de origen epitelial prostático RWPE-1 (ATCC, Cat. N° CRL-11609). Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio RPMI (células 22Rv1 y DU145) y DMEM (células LNCaP y PC3) suplementados ambos con 10 % de suero fetal bovino (SFB). Las células RWPE1 se mantuvieron en medio K-SFM suplementado con 0.05 mg/ml de BPE y 5 ng/ml de EGF. Todas las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

Inmunohistoquímica: Muestras de pacientes con cáncer prostático fijadas en formalina y embebidas en parafina se obtuvieron del servicio de anatomía patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, con la correspondiente autorización. Todas las muestras fueron evaluadas por un patólogo experto y clasificadas según su grado de Gleason. Las muestras tumorales se cortaron en secciones de 5 µm, se montaron en portaobjetos silanizados, se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en soluciones de etanol de concentración creciente. Las secciones fueron luego lavadas con PBS e incubadas en una vaporera por 10 minutos a 95-100°C en buffer de recuperación antigénica (buffer citrato 10 mM, pH 6.0). Luego de enfriarlas, las muestras se incubaron con 3% H₂O₂ por 10 minutos para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, se lavaron con PBS y se incubaron con solución de bloqueo (PBS 2% BSA) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se les agregó el anticuerpo primario con el cual se incubaron toda la noche a 4 °C tras lo cual se agregó el anticuerpo secundario por 30 minutos a 37 °C. Las muestras se lavaron con PBS y se marcaron con una solución de streptavidina-biotina y se usó hematoxilina como marcaje de contraste. Finalmente las muestras se sellaron con pegamento neutro y las imágenes se obtuvieron usando el microscopio Leica DM2500.

Sobreexpresión y silenciamiento estable de ZEB1: Se realizó una sobreexpresión y silenciamiento estable de ZEB1 en las células 22Rv1 y DU145 respectivamente. Para esto las células fueron sembradas a 10×10^5 células/pocillo, en placas de 6 pocillos, 24 horas antes de la transducción. Posteriormente para la sobreexpresión las células 22Rv1 fueron transducidas con el vector conteniendo la secuencia de ZEB1 (pLenti-suCMV(ZEB1)- Rsv(GFP-Puro)) y como control el vector vacío, mientras que las células DU145 fueron transducidas usando el vector (pLenti-U6-shRNA(h ZEB1)-Rsv(RFP-Puro) para el silenciamiento de ZEB1 con el vector pLenti-U6-shRNA(neg-control)-Rsv(RFP-Puro) como control. Todas las transducciones se realizaron en presencia de $6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de polibreno y los vectores fueron obtenidos de Gen Target Inc. (USA, San Diego, CA.). La selección fue realizada en presencia de $1,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de puomicina y comprobada en un microscopio de fluorescencia utilizando como parámetro la expresión de GFP o RFP. Finalmente y para comprobar la eficacia de transducción los niveles de expresión a nivel de mRNA serán analizados por PCR en tiempo real, y los niveles proteicos serán determinados mediante western blot.

Extracción de RNA: Placas de 10 mm con células crecidas a confluencia fueron lisadas con trizol (Gibco, Cat. 15596-026) y la extracción de RNA se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La concentración del RNA y su pureza fueron medidas por espectrofotometría a 260 y 280 nm.

PCR en tiempo real: Se utilizaron $2 \mu\text{g}$ de RNA para la obtención del cDNA utilizando el kit AFFINITYSCRIPT QPCR CDNA SYNTHESIS de Agilent Tech. (Cat. 600559), todo siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el cDNA se realizó la reacción de PCR en tiempo real para determinar la expresión de los siguientes genes utilizando los siguientes partidores: ZEB1 sentido (s): 5'-GTA AGA GGC CTC ACG AGT GT- 3', antisentido (a): 5'-GCA GTA GGA GTA GCG GTG AT - 3', E-Cadherina (s): 5'-GAA CGC ATT GCC ACA TAC AC-3', (a): 5'-ATT CGG GCT

TGT TGT CAT TC-3', CK18 (s): 5'-ACA GAG TGA GGA GCC TGG AGA CCG A-3', (a): 5'-CAG TAT TTG CGA AGA TCT GAG CCC TC-3', N-Cadherina (s): 5'-GGA CAG TTC CTG AGG GAT CA-3', (a): 5'-GGA TTG CCT TCC ATG TCT GT-3', Vimentina (s): 5'-GCC AAG GCA AGT CGC G-3', (a): 5'- CA TTT CAC GCA TCT GGC G-3', ABCC1 (s): 5'-GTT TCT CAG ATC GCT CAC CC-3', (a): 5'-TCC ACC AGA AGG TGA TCC TC-3', ABCG2 (s): 5'-CTG AGA TCG TGA GCC TTT GG-3', (a): 5'-TCC ACC AGA AGG TGA TCC TC-3', ABCB1 (s): 5'-TCA GCC TCA CCA CAG ATG AC-3', (a): 5'-TCA CTT CAG GAA GCA ACC AG-3', β III Tubulina (s): 5'-CTC AGG GGC CTT TGG ACA TC-3', (a) 5'-CAG GCA GTC GCA GTT TTC AC-3', como control se ocupará el gen PUM1 (Pumilio) (s): 5'-CGG TCG TCC TGA GGA TAA A-3', (a): 5'-CGT ACG TGA GGC GTG AGT AA-3'). Se utilizó el kit Brilliant II SYBR green QPCR Master Mix de Agilent Tech. (Cat. 600828) y el equipo Aria Mix Real Time PCR de Agilent Tech. (Modelo 68830A) que incluye el programa AriaMX 1.0 para el análisis y cuantificación de los datos obtenidos.

Extracción de proteínas totales: Las células fueron sembradas a confluencia en placas de 10 mm. Para la ruptura celular se utilizó el buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, NP-40 1% v/v, deoxicolato de sodio 1% p/v, Na₃PO₄ 2,5 mM, β -glicerofosfato 1 mM y Na₃VO₄ 1 mM, a pH 7,4) en presencia de inhibidores de proteasas (Roche, Cat. 11-836-170-001) a 4°C. Luego las muestras serán pasadas por una jeringa 10 veces para disgregar las células. Los homogeneizados se centrifugaron a 13500 rpm por 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se recolectaron y cuantificaron por el método de Bradford.

Western blot: Para los análisis se utilizaron 50 μ g de proteínas totales. Las muestras se calentaron a 96°C por 5 minutos, se cargaron en un gel denaturante de SDS-poliacrilamida al 12% y se sometieron a electroforesis a 100 V por 2 horas. Luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (poro 0,45 μ m Bio-Rad) a 300 mA por 1,5 horas la cual posteriormente se bloqueó con leche 5% en TBS-tween 0,1%. La

incubación con el anticuerpo primario se realizó toda la noche con agitación a 4°C, mientras que la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a HRP anti-ratón (Jackson Immunoresearch, Cat. 115-035-003), anti-conejo (Jackson Immunoresearch, Cat. 111-035-003) y anti-cabra (Jackson Immunoresearch, Cat. 305-035-045) fue por 1 hora a temperatura ambiente. Para revelar la actividad de la enzima HRP se agregó el sustrato quimioluminiscente ECL, cuya luminiscencia fue detectada en un revelador automático Fusion FX (Vilber Lourmat, France). Las bandas se cuantificaron utilizando el programa IMAGE-J (USA). Para los ensayos se utilizaron los siguientes anticuerpos: ZEB1 (Millipore, Cat. ABN285), E-Cadherina (BD Transduction Laboratories, Cat. 610181), N-Cadherina (Abcam, Cat. Ab12221), Vimentina (Abcam, Cat. Ab8978), Citoqueratina-18 (Abcam, Cat. Ab7797), ABCC1 (Cell Signaling, Cat. 14685S), ABCG2 (Cell Signaling, Cat. 4477S), Caspasa 3 activa (Cell Signaling, Cat. 9661S), Bcl2 (Thermo, Cat. 13-8800), Bax (Thermo, Cat. MA5-143994) y β -actina como control de carga (Immuno MP Bio, Cat. 69100).

Ensayos de migración e invasión: Para estudiar las capacidades migratorias e invasivas de las células estudiadas se utilizó el kit CytoSelect™ 96-Well Cell Migration and Invasion assay (Cell Biolabs Cat. CBA-106-C) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada pocillo de la placa de migración contiene una membrana de policarbonato de 8 μ m que hace de barrera para discriminar entre las células migratorias y las no migratorias. Los pocillos de la placa de invasión, además de tener la misma membrana de policarbonato, están cubiertos en la parte superior por una capa uniforme de matriz de membrana basal, lo que ayuda a discriminar entre las células invasivas y las no invasivas. Para el ensayo se sembraron 50.000 células en cada pocillo por triplicado las que se incubaron por 24 horas. Al cabo de esto se detectaron las células que invadieron o migraron midiendo la fluorescencia en un lector de placas Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek).

Ensayos de Proliferación y Clonogenicidad: Para los ensayos de proliferación se sembraron 20.000 células de cada tipo estudiado en placas de 6 pocillos por triplicado y se incubaron en una estufa a 37°C por 6 días. Luego de cada día se fue contando el número de células mediante el método de azul de tripán al cabo de lo cual se graficaron los resultados de proliferación luego de cumplidos los 5 días. Para el ensayo de clonogenicidad se sembrarán ambos tipos celulares a una baja confluencia en una placa de 6 pocillos (500 células por pocillo) con el propósito de permitir la formación de colonias únicas y se mantuvieron en condiciones de cultivo normales (37°C y 5% CO₂). Al cabo de 10 días se sacaron las placas, se pusieron en hielo y se lavaron 2 veces con PBS frío. Las células se fijaron luego del lavado por 10 minutos con metanol frío al 100%. Posteriormente las placas se retiraron del hielo y se les agregó solución de cristal violeta (0,5% cristal violeta, 25% metanol) hasta cubrir las células y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se eliminó el cristal violeta y se lavó las células con abundante agua hasta retirar los excesos de la solución. Finalmente la placa se dejó a secar a temperatura ambiente y se analizó el número de colonias positivas fotografió en un microscopio de contraste de fase. Se tomó como colonia positiva todas las formadas por 50 células o más.

Ensayo de cierre de herida: Células DU145 con silenciamiento de ZEB1 y su respectivo control fueron sembradas en placas de 6 pocillos y se crecieron en medio RPMI (suplementado con suero fetal al 10%) hasta obtener confluencia. Luego de esto, usando una punta de pipeta amarilla, se hizo una herida en la placa en forma de herida, creando una línea recta limpia de células. La placa se lavó con PBS para sacar las células que hayan quedado sueltas y se mantuvieron en medio de cultivo a 37°C bajo una cámara CytoSMART™ Lux 10X System (Lonza Group Ltda., Basel, Switzerland) (a un zoom de 10X) enfocada en la herida realizada anteriormente, la cual tomó fotos cada 15 minutos. El experimento se terminará luego de que las células hayan terminado de cerrar la herida y la distancia entre los extremos de la herida a los distintos tiempos fue medida usando el programa Image-J.

Estudios de sensibilidad a Docetaxel: Se sembraron 1.5×10^4 células por pocillo en placas de 48 pocillos para cada tipo estudiado. Las células se mantuvieron a 37°C y $5\%\text{CO}_2$ por 24 horas y posteriormente se les agregó Docetaxel (Tocris Bioscience, Bristol, UK) a distintas concentraciones. Las células se trataron por 48 horas al cabo de lo cual se analizó la sobrevivencia mediante el método de MTT que se complementó con un conteo de células viables utilizando azul de tripán.

Estudio de viabilidad por MTT: Se descartó el medio de los cultivos celulares y a cada pocillo se le agregó $100\ \mu\text{l}$ de una solución stock de MTT ($15\ \mu\text{l}$ de solución stock MTT (5mg/ml) $500\ \mu\text{l}$ de solución Locke. (NaCl $24\ \text{mM}$, NaHCO_3 4mM , KCl 5mM , HEPES $10\ \text{mM}$, Glucosa 5mM , $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ $2,3\ \text{mM}$, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM)). Las células se dejaron incubando en esta solución por 2 horas a $37^\circ\ \text{C}$ en oscuridad. Posteriormente la solución fue descartada y los cristales depositados en el fondo del pocillo fueron resuspendidos en $100\ \mu\text{l}$ de DMSO. Luego, la placa se agitó suavemente durante 10 minutos y la absorbancia fue medida a $550\ \text{nm}$ en un lector de placas Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek).

Inmunocitoquímica: Las células (líneas celulares y cultivos primarios) fueron sembradas sobre cubreobjetos y cultivadas normalmente, posteriormente fueron fijadas durante 30 minutos utilizando una solución de buffer fosfato, sacarosa y paraformaldehído. Luego fueron conservadas en PBS-Azida a 4°C . Al momento de realizar la inmunocitoquímica los cubres fueron lavados con una solución de PBS-Glicina $20\ \text{mM}$ y luego bloqueadas con PBS-glicina ($20\ \text{mM}$) – BSA ($0,1\ \%$). Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios para CB1 (Cayman Chemical CB1 Receptor) a una dilución de $1:100$ y CB2 (Cayman Chemical CB2 Receptor) a una dilución de $1:50$. Luego se utilizó un anticuerpo secundario unido a FITC (Jackson ImmunoResearch Fluorescein-Conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio de Spinning Disc Olympus BX61WI.

Bloqueo de ABCC1: Para analizar el efecto de ABCC1 sobre la sensibilidad a Docetaxel en células con sobreexpresión de ZEB1 se utilizó el bloqueador MK571 (SIGMA-ALDRICH Cat. N° M7571-5MG). Las células se incubaron a 37°C por 1 hora en presencia o ausencia de 100 µm/L del bloqueador MK571. Luego de esto se les incubó con distintas concentraciones de Docetaxel por 48 horas. La viabilidad celular luego de los tratamientos se verificó mediante MTT y fue confirmada por medio del método de azul de tripán.

Análisis de proliferación, citotoxicidad y apoptosis: Para el análisis de estas 3 propiedades al mismo tiempo utilizamos el kit ApoTox-Glo Triplex assay de Promega (Cat. N° G6320) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, se sembraron 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron con Docetaxel a distintas concentraciones por 48 horas, al cabo de lo cual se incubaron por 30 minutos a 37 °C con el reactivo de viabilidad/citotoxicidad y posteriormente se leyó la fluorescencia a 400Ex/505Em (Viabilidad) y 485Ex/520Em (Citotoxicidad). A continuación se agregó el reactivo para detectar apoptosis (Caspase-Glo® 3/7), se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se leyó la luminiscencia.

Análisis Estadístico: Los datos fueron expresados como promedio \pm SD. Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces y la significancia entre los controles y las células transducidas fue calculada usando el método de t-test no pareado para obtener un Valor-P. Se consideró un $P < 0.05$ como una diferencia estadísticamente significativa.

3. RESULTADOS

3.1 Objetivo específico N°1: Generar y caracterizar una línea celular de cáncer prostático con sobreexpresión estable de ZEB1 en cuanto a marcadores de TEM y propiedades relacionadas con la malignidad tumoral. Estudiar el efecto de un shRNA contra ZEB1 en una línea celular de cáncer prostático con alta expresión de ZEB1 respecto a dichos marcadores y propiedades.

Expresión basal de ZEB1 en biopsias de pacientes y líneas celulares comerciales de CaP

Reportes previos han señalado que la expresión del factor transcripcional ZEB1 estaría aumentado en CaP (32), por lo que se comprobó esto en un contexto nacional en biopsias de pacientes chilenos. La figura 9A muestra imágenes representativas de biopsias de CaP de bajo (≤ 6) y alto (≥ 8) grado de Gleason donde se observa inmunotinción de ZEB1 en células estromales en ambas clases de biopsias, sin embargo, las muestras de mayor Gleason presentan además fuerte marcación para ZEB1 en la zona de tejido tumoral a diferencia de las zonas de bajo Gleason que presentaron baja o nula marca en esta región. Luego, se analizó la expresión de ZEB1 en diferentes líneas celulares comerciales de CaP y se comparó con la expresión en la línea celular de origen epitelial prostático RWPE1. En la figura 9B se observa que la línea celular DU145 mostró la mayor expresión de ZEB1 al compararla con las células RWPE1, mientras que la línea 22Rv1 mostró la menor expresión.

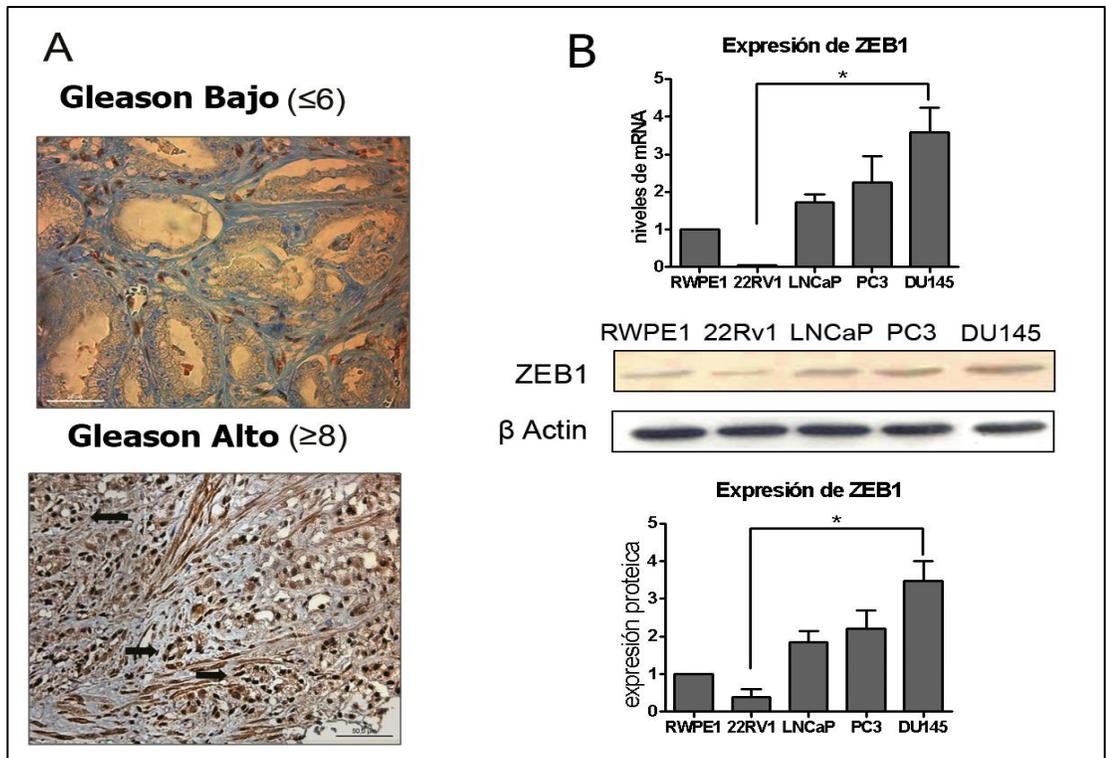


FIGURA 9. Expresión de ZEB1 en muestras y líneas celulares de CaP. A. Inmunohistoquímica para ZEB1 en muestras de pacientes con distinto grado de Gleason. Las flechas negras apuntan a zonas tumorales, Fotografías en Microscopio de contraste de fase (zoom 40x). **B.** Análisis por qRT-PCR de los niveles de mRNA para ZEB1 en la línea celular epitelial prostática RWPE1 y en distintas líneas de CaP. **C.** Expresión proteica de ZEB1 en las líneas estudiadas en B, el gráfico representa los niveles de expresión vistos por WB. * $p < 0.05$, $n = 3$ en cada caso.

Adicionalmente, se analizó la expresión basal de algunos marcadores conocidos dentro del proceso de TEM. La figura 10 muestra la expresión proteica por Western blot para los marcadores epiteliales E-Cadherina y CK18 y para los marcadores mesenquimales Vimentina y N-Cadherina. Se puede observar que la línea DU145 presenta altos niveles de expresión para marcadores mesenquimales y baja expresión de marcadores epiteliales, mientras que la línea 22Rv1 mostro baja expresión de marcadores mesenquimales y alta para marcadores epiteliales. Estos resultados nos llevaron a elegir la línea celular 22Rv1 como modelo para estudiar el efecto de la sobreexpresión de ZEB1 y la línea DU145 para estudiar su silenciamiento.

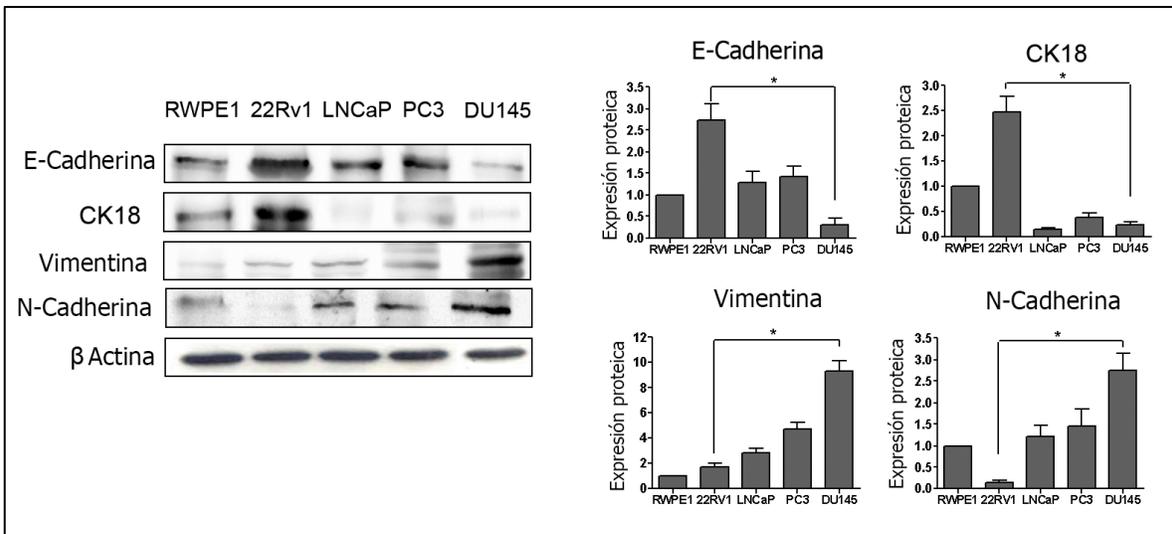


Figura 10. Niveles basales de marcadores de TEM. Estudio de los niveles proteicos por western blot de marcadores de TEM en líneas celulares de CaP comparados con la línea celular epitelial protática RWPE1. Los gráficos representan los niveles proteicos vistos por WB. * $p < 0.05$, $n = 3$ en cada caso.

Efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1 sobre marcadores de TEM

Se llevó a cabo la sobreexpresión estable de ZEB1 en las células 22Rv1 utilizando un vector lentiviral que contiene la secuencia codificante para ZEB1 (obteniendo la línea 22Rv1 ZEB1), mientras que como control se utilizó el mismo vector pero vacío (obteniendo la línea 22Rv1 control). Para el silenciamiento estable de ZEB1 se utilizó un vector lentiviral que contiene un shRNA contra ZEB1 (obteniéndose la línea DU145 shZEB1) y como control se usó el mismo vector pero con un shRNA con una secuencia al azar sin blanco conocido (obteniéndose la línea DU145 shSCR). Se observó que tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína hay un aumento significativo en la expresión de ZEB1 en las células 22Rv1 (Fig. 11A, B y C). De la misma forma se encontró que el silenciamiento de ZEB1 en las células DU145, tanto a nivel de mRNA (Fig. 11A) como a nivel proteico (por Western Blot) fue de aproximadamente un 60-70 % (Fig. 11B y C).

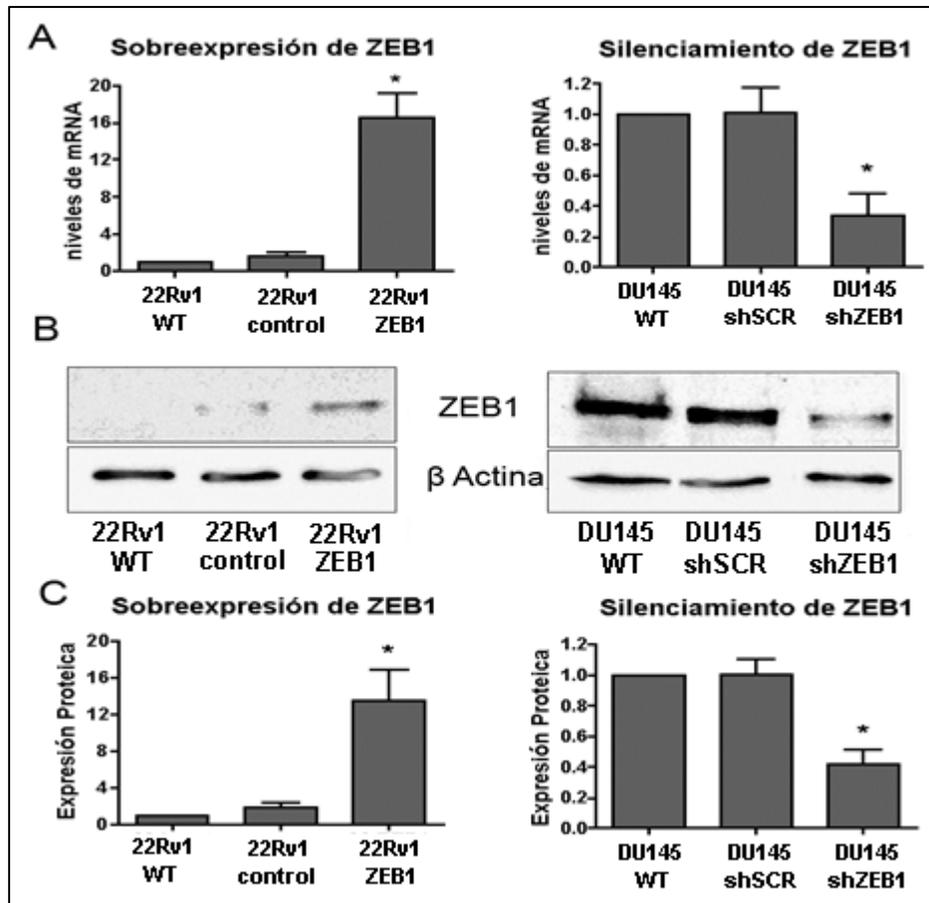


Figura 11. Sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1 en líneas celulares de cáncer prostático. **A.** Evaluación de mRNA para ZEB1 por qRT-PCR en células 22Rv1 y DU145 con sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1 respectivamente, comparadas con sus controles y con la línea wild type (WT). * $p < 0.05$, $n = 3$. **B.** Expresión proteica de ZEB1 por Western Blot de las líneas en A. **C.** Análisis cuantitativo de la expresión proteica de ZEB1 vista en B. * $p < 0.05$, $n = 3$.

Niveles de mRNA de marcadores de TEM

Se midieron los niveles de mRNA para los marcadores clásicos de TEM E-Cadherina, CK18, Vimentina y N-Cadherina utilizando qRT-PCR en las células con sobreexpresión y con silenciamiento de ZEB1. Las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 mostraron un descenso en los niveles del marcador epitelial E-Cadherina y un aumento en los niveles del marcador mesenquimal Vimentina al compararlos con las células transducidas con un vector vacío (células 22Rv1

control), sin embargo no se detectaron cambios significativos en el marcador epitelial CK18 ni en el marcador mesenquimal N-Cadherina (Fig. 12A). Las células DU145 con silenciamiento mostraron un descenso significativo en la expresión de E-Cadherina y un aumento en los niveles de Vimentina al compararlas con las células DU145 shSCR. Al igual que en las células 22Rv1 no se observó un cambio en la expresión de CK18 ni de N-Cadherina en las células DU145 con silenciamiento de ZEB1 (Fig. 12B).

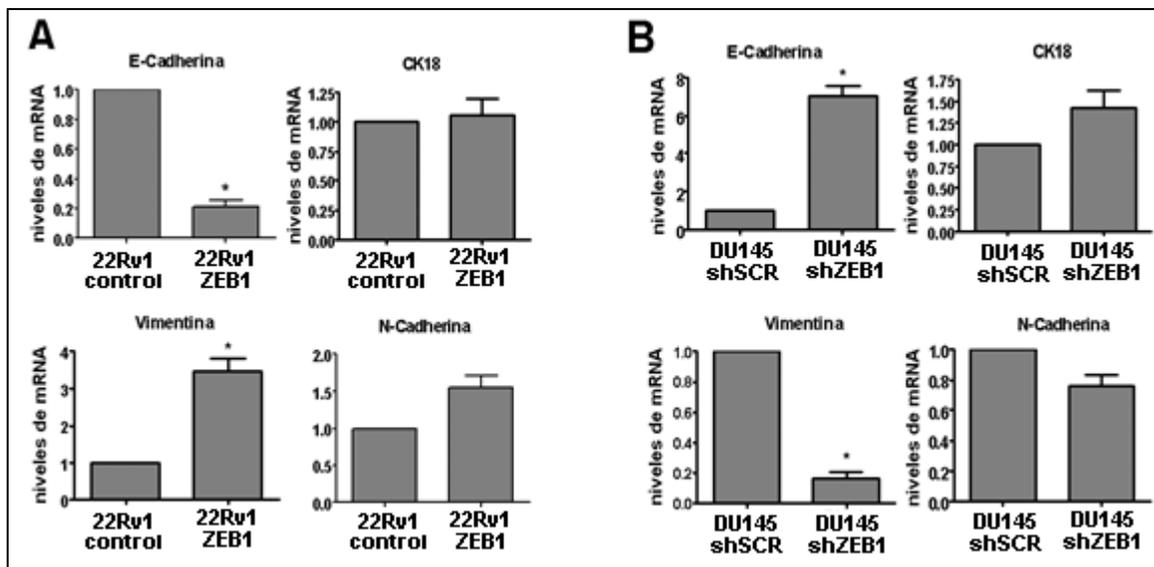


Figura 12. Niveles de mRNA para marcadores de TEM. **A.** Expresión génica de marcadores epiteliales y mesenquimales determinada por qRT-PCR en células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 comparada con células 22Rv1 control. **B.** Expresión génica de marcadores epiteliales y mesenquimales determinada por qRT-PCR en células DU145 con silenciamiento de ZEB1 comparada con células DU145 shSCR. * $P < 0.05$ ($n=3$) las barras representan la media \pm SD.

Niveles proteicos de marcadores de TEM

Para determinar si los niveles proteicos de marcadores de TEM se ven afectados en las células con sobreexpresión y silenciamiento, se utilizó la técnica de Western blot. Al igual que lo visto por qRT-PCR las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 mostraron un descenso en los niveles proteicos de E-Cadherina y un aumento en los de Vimentina al compararse con las células 22Rv1 control, sin encontrarse cambios en CK18 ni en N-Cadherina (Fig. 13A y B). Las células DU145 con silenciamiento de ZEB1, a su vez, mostraron un aumento en los niveles proteicos de E-Cadherina y un descenso en los de Vimentina al compararlos con las células DU145 shSCR sin encontrarse cambios significativos en los niveles de CK18 ni de N-Cadherina (Fig. 13A y B). Estos resultados apuntan hacia una posible inducción del programa de TEM por parte del factor transcripcional ZEB1.

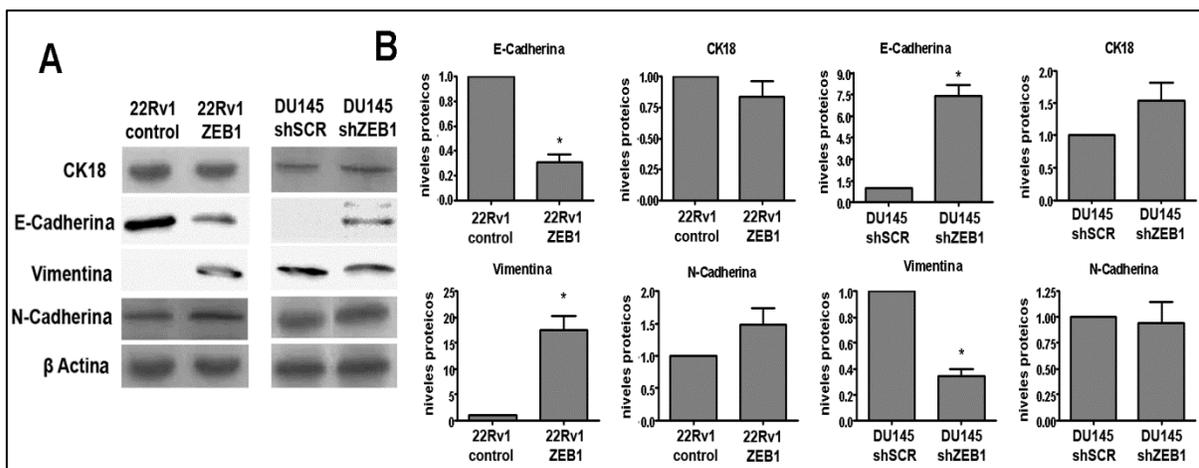


Figura 13. Niveles proteicos para marcadores de TEM. **A.** Expresión proteica de marcadores de TEM por Western Blot en células 22Rv1 con sobreexpresión y DU145 con silenciamiento comparadas con sus controles. **B.** Análisis cuantitativo de los niveles proteicos relativos vistos en A. * $P < 0.05$, (n=3). Las barras representan la media \pm SD.

Ensayos de proliferación y formación de colonias

Para asegurarnos de que todos los resultados obtenidos en adelante son debido al efecto provocado por los cambios de expresión de ZEB1 y no debido solo a diferencias entre el número de células de cada grupo, se realizó un ensayo de proliferación con las células 22Rv1 con sobreexpresión y las DU145 con silenciamiento de ZEB1. El ritmo de crecimiento celular se estudió usando el método de exclusión por azul de tripán y un hemocitometro y se corroboró usando el ensayo de MTT. La figura 14 muestra los resultados del ensayo con azul de tripán, no observándose diferencias significativas en el ritmo de proliferación ni en las células 22Rv1 ZEB1 ni en las DU145 shZEB1 al compararlas con sus respectivos controles durante los días que duró el ensayo.

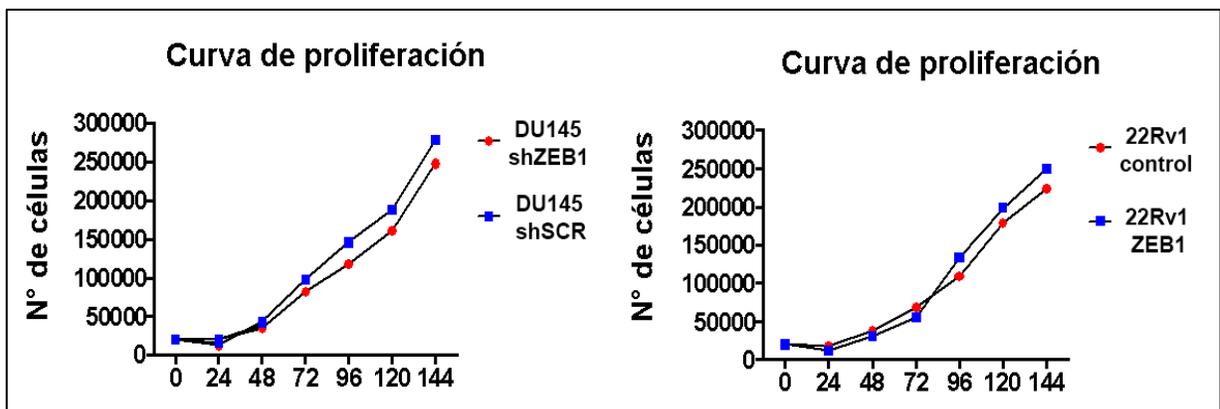


Figura 14. Curva de proliferación para células con sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1. Ensayo de proliferación realizado utilizando el método de azul de tripán en células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 y DU145 con silenciamiento de ZEB1 hecho durante 6 días. n=3.

Adicionalmente evaluamos una de las características asociadas con la malignidad celular, la cual es la capacidad de regenerar tumores desde una célula (49), utilizamos un ensayo de clonogenicidad para ver el efecto de la expresión de ZEB1 sobre esta propiedad. Los resultados muestran que las células con

sobreexpresión de ZEB1 tienen una mayor capacidad de formar colonias en condiciones de baja densidad celular de cultivo que las células transducidas con el vector vacío (Fig. 15A y B). Juntamente con esto las células DU145 con silenciamiento de ZEB1 mostraron una menor capacidad de generar colonias en estas condiciones de baja densidad al compararlas con las células control DU145 shSCR (Fig. 15A y B).

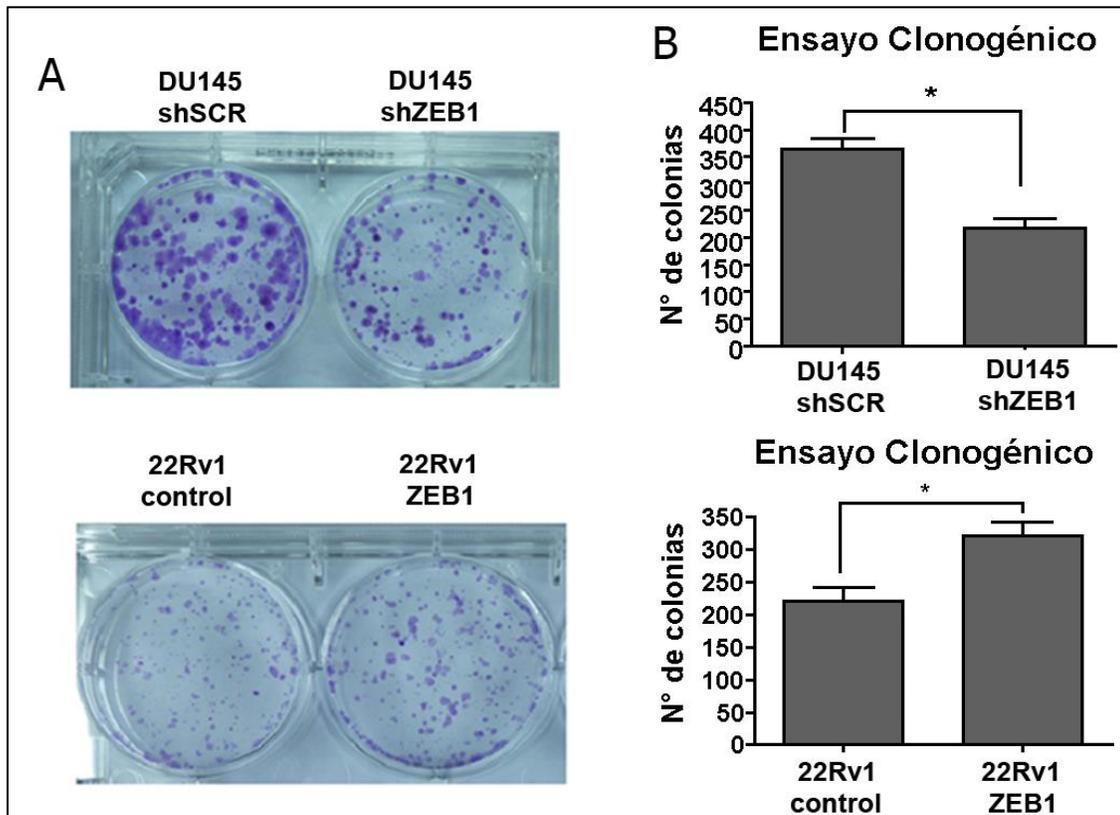


Figura 15. Capacidad clonogénica de células con sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1. **A.** Ensayo de clonogenicidad en células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 y células DU145 con silenciamiento de ZEB1 comparada con sus respectivos controles. **B.** Análisis cuantitativo de lo visto en A. * $P < 0.05$, $n = 3$.

Ensayo de migración e invasión

Para determinar las capacidades migratorias e invasivas de las células con sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1 se realizaron ensayos utilizando un kit basado en el ensayo de cámara de Boyden. Para el ensayo de migración se sembraron 30000 células por pocillo con la base de la cámara cubierta por una membrana de policarbonato. Para el ensayo de invasión se usaron 60000 células por pocillo con una base recubierta de matriz extracelular. La figura 16 muestra que las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 presentaron una mayor capacidad tanto migratoria como invasiva al compararlas con su respectivo control, mientras que las células DU145 con silenciamiento mostraron un descenso en sus capacidades migratorias e invasivas al compararlas con su control (Fig. 16).

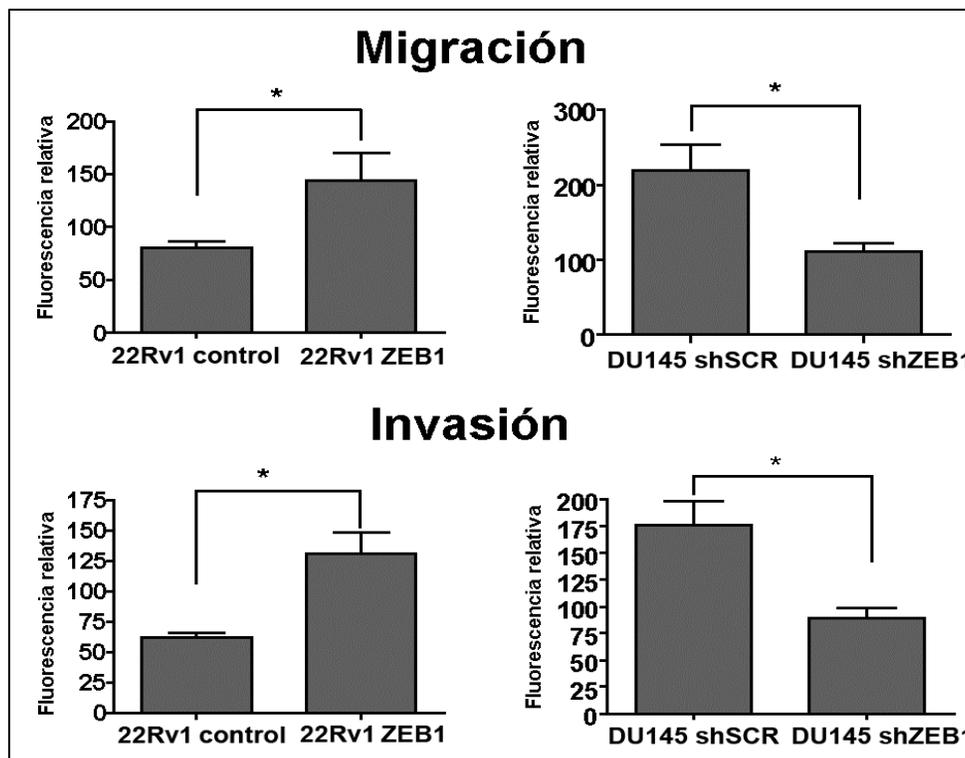


Figura 16. Ensayos de migración e invasión en cámara modificada de Boyden. Células 22Rv1 con sobreexpresión y DU145 con silenciamiento de ZEB1, junto con sus controles, se sembraron en la parte superior de una cámara de boyden y se les dejó migrar hacia medio con suero al 10% por 24 horas. Las células que migraron a través de la cámara fueron teñidas e identificadas usando CyQuant® GR Dye como lo describe el kit. *P<0.05 n=4.

Ensayo de cierre de herida

Para corroborar lo visto mediante los ensayos de cámara de Boyden utilizamos la técnica del cierre de herida. Las células DU145 se cultivaron hasta alcanzar un 80% de confluencia, momento en que se realizó la herida. Al analizar la capacidad migratoria de las células con ZEB1 silenciado comparadas con las células control DU145 shSCR, migración evidenciada por la recuperación de la herida (cicatrización o cierre de herida), se observa que luego de 7 horas las células con silenciamiento de ZEB1 muestran una menor recuperación de la herida al compararlas con las células DU145 shSCR, diferencia que es aún más significativa al final del ensayo (14 horas) (Fig. 17). Estos resultados confirman que el silenciamiento de ZEB1 provoca una pérdida de la capacidad migratoria en las células DU145.

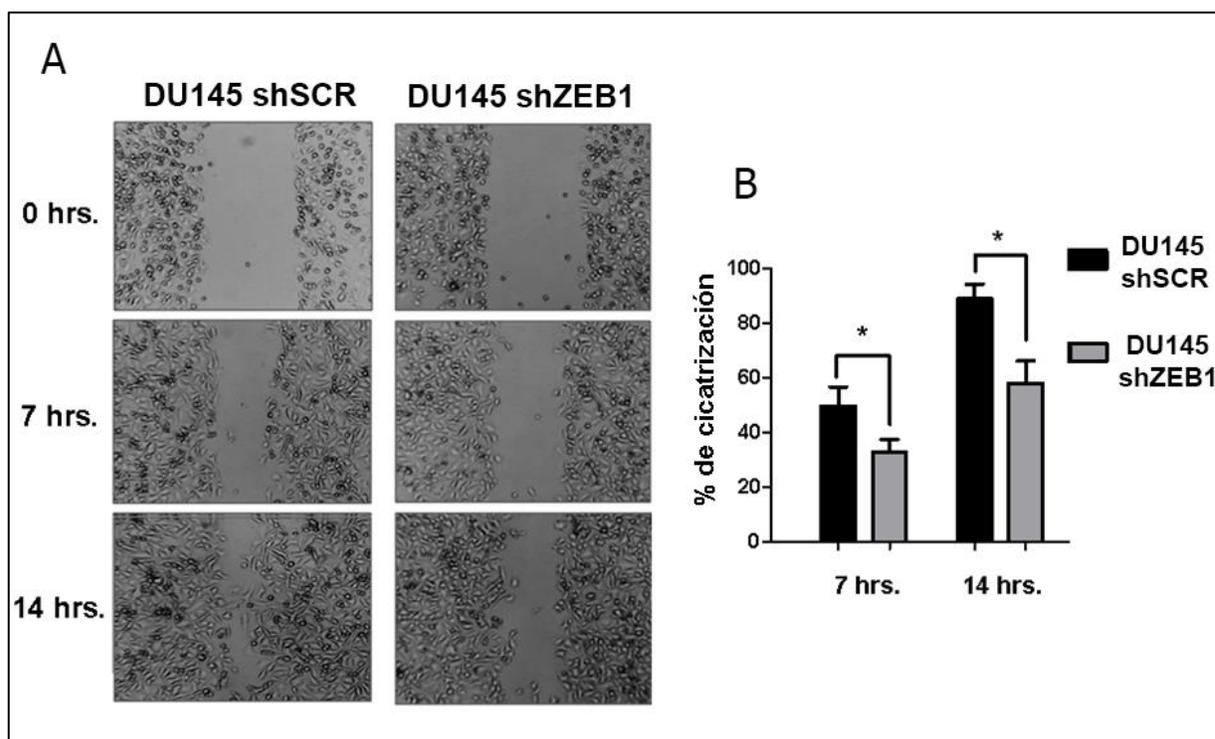


Figura 17. Ensayo de cierre de herida. A. El cierre de la herida se documentó durante 24 horas en células DU145 con silenciamiento de ZEB1 y células DU145 shSCR. B. Análisis cuantitativo del porcentaje de cierre de herida visto en A. * $P < 0.05$ $n = 3$, Las barras representan la media \pm SD.

3.2 Objetivo específico N°2: Estudiar la sensibilidad y resistencia de células 22Rv1 con sobreexpresión y DU145 con silenciamiento de ZEB1 en respuesta a Docetaxel y posibles mecanismos de resistencia a dicho fármaco.

Sensibilidad a Docetaxel

Para analizar el efecto que ZEB1 podría tener en la resistencia a quimioterapéuticos se trataron las células 22Rv1 con sobreexpresión y las DU145 con silenciamiento de ZEB1 con distintas concentraciones de Docetaxel por 48 horas y luego, mediante la técnica de conteo con azul de tripán (y adicionalmente por MTT) se determinó el porcentaje de supervivencia celular de cada cultivo al cabo del tiempo de tratamiento. Los resultados muestran una respuesta dependiente de la concentración de Docetaxel para todos los cultivos estudiados.

En el caso de las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1, estas presentaron una mayor resistencia al fármaco al compararlas con las células control y wild type (Fig. 18A). Las células DU145 con silenciamiento mostraron mayor sensibilidad al tratamiento con Docetaxel al compararlas con las células DU145 shSCR y las wild type (Fig. 18A). Además de esto, se utilizó una regresión lineal para obtener la IC50 de cada cultivo, la que para las células 22Rv1 ZEB1 aumentó a aproximadamente al doble, mientras que las DU145 con silenciamiento de ZEB1 vieron reducida su IC50 a casi la mitad, por otro lado las células DU145 mostraron ser más resistentes al tratamiento con Docetaxel que las células 22Rv1 (Fig. 18B).

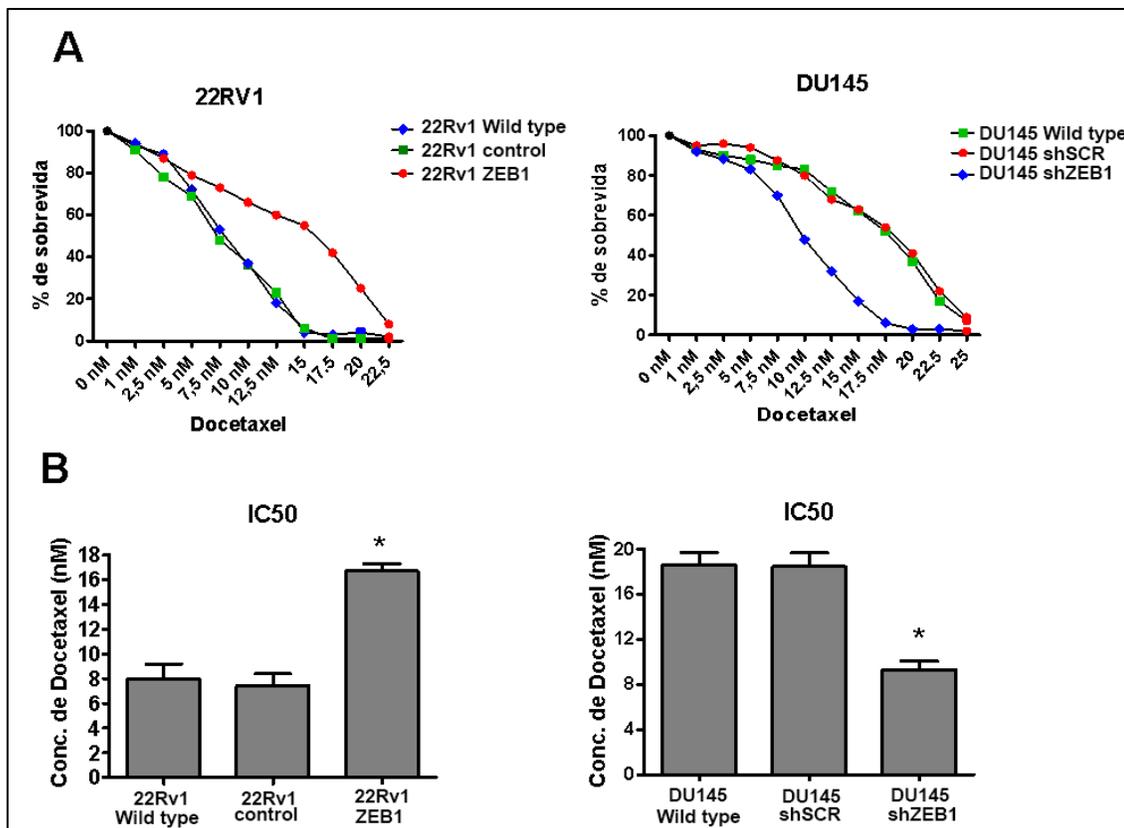


Figura 18. Sensibilidad a Docetaxel de células con sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1. **A.** Las figuras muestran los valores de sobrevida de las células 22Rv1 con sobreexpresión y DU145 con silenciamiento de ZEB1 comparadas con sus respectivos controles al ser tratadas con distintas concentraciones de Docetaxel por 48 horas. **B.** Análisis de la IC50 para cada cultivo estudiado en A. * $P < 0.05$, $n = 5$, las barras representan la media \pm SD.

Los ensayos de proliferación realizados previamente permiten descartar que las diferencias encontradas en la sobrevida luego del tratamiento con Docetaxel se deban a diferencias en la proliferación celular inducidas por la sobreexpresión o el silenciamiento de ZEB1. Los resultados muestran que la expresión de ZEB1 otorga a las líneas celulares de CaP una mayor resistencia al quimioterapéutico Docetaxel.

Para entender si el efecto sobre la sensibilidad a Docetaxel que se observó es provocado específicamente por ZEB1 o si es un efecto relacionado intrínsecamente con el proceso de TEM, se utilizaron líneas celulares LNCaP y PC3 con sobreexpresión estable de ZEB1, de Snail y de Slug, las que se expusieron a

concentraciones crecientes de Docetaxel. La figura 19 muestra la sensibilidad frente a Docetaxel de las distintas líneas evaluada por el método de MTT. Los resultados indican que la sobreexpresión de ZEB1 en las células PC3 y LNCaP produjo un aumento en la resistencia al efecto citotóxico del Docetaxel, efecto similar al que se encontró anteriormente con las células 22Rv1, sin embargo, ni la sobreexpresión de Snail ni la de Slug causó cambios significativos en la sensibilidad al tratamiento con Docetaxel.

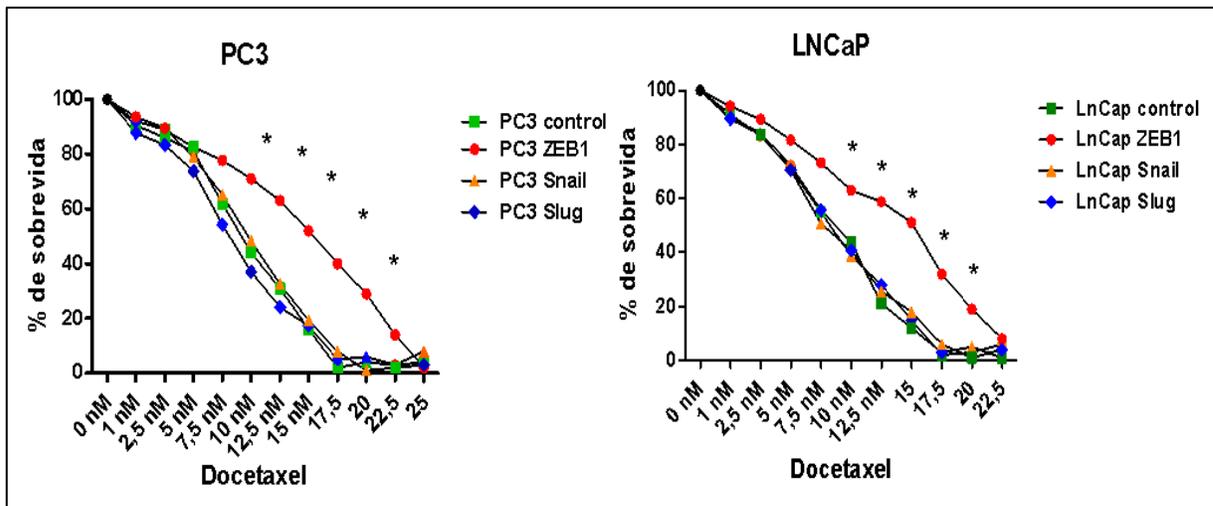


Figura 19. Sensibilidad a Docetaxel de Células PC3 y LNCaP con sobreexpresión de inductores de TEM. Se analizó la sensibilidad a Docetaxel de células PC3 y LNCaP con sobreexpresión de diferentes factores de transcripción inductores de TEM (Snail, Slug, ZEB1). La figura muestra los valores de sobrevivencia de los distintos tipos celulares estudiados al ser tratados con distintas concentraciones de Docetaxel por 48 horas. * $p < 0.05$, $n = 5$.

Marcadores de quimioresistencia

Para entender como ZEB1 estaría ejerciendo su efecto quimio protector en las células tumorales estudiadas, se evaluó la expresión de algunos marcadores comunes de resistencia a Docetaxel tales como: ABCB1, ABCG2, ABCC1 y Tubulina β III. Las células fueron expuestas a Docetaxel (7,5 nM para las 22Rv1 y 12,5 nM para DU145) por 48 horas luego de lo cual se extrajo RNA y proteínas de cada muestra para realizar un análisis de expresión génica por qRT-PCR y proteica por Western Blot. Al medir la expresión génica de los marcadores estudiados por qRT-

PCR se encontró que las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 presentaron una mayor expresión de ABCC1, al compararlas con las células control, mientras que no hubo cambios significativos en la expresión de ABCG2 (Fig. 20). Por otro lado, las células DU145 con silenciamiento de ZEB1 mostraron una expresión significativamente menor del marcador ABCC1 frente al tratamiento con Docetaxel al compararlas con su control, mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de ABCG2.

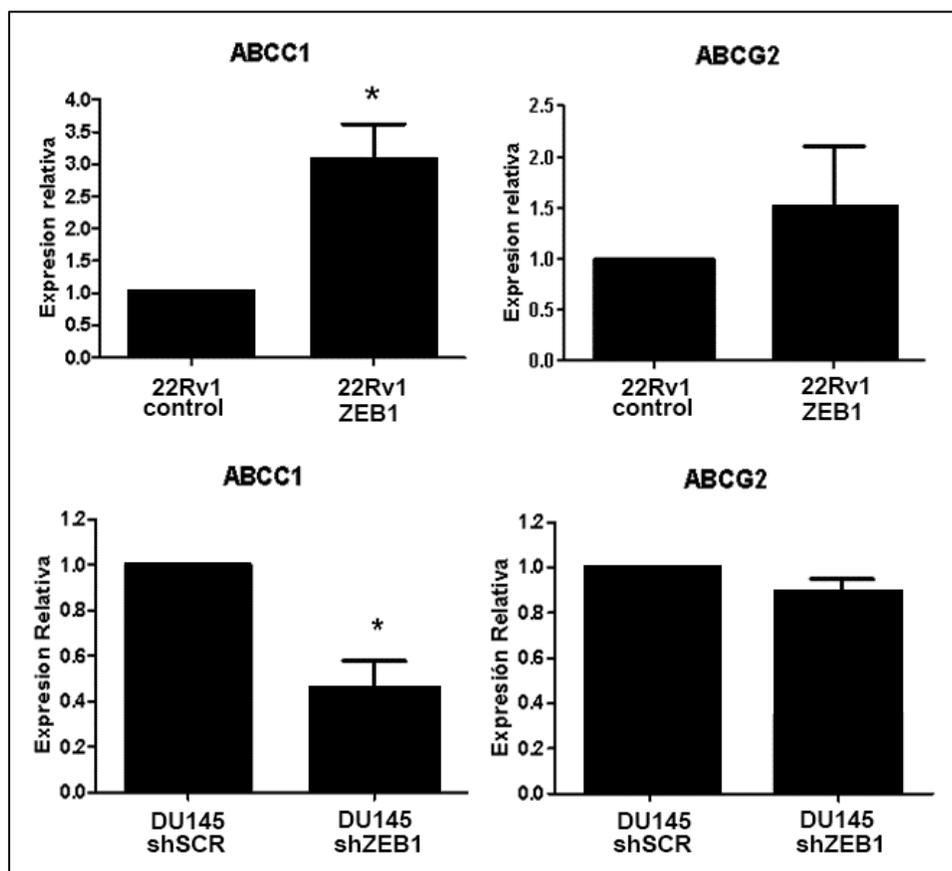


Figura 20. Expresión génica de marcadores de Quimioresistencia. Análisis de la expresión génica de los marcadores de quimioresistencia ABCC1 y ABCG2 en células con sobreexpresión (22Rv1) y silenciamiento (DU145) de ZEB1 por medio de qRT-PCR. * $p < 0.05$, $n = 3$.

Los experimentos de expresión proteica de ABCC1 y ABCG2 por Western Blot en ambos tipos celulares estudiados mostraron resultados semejantes a los encontrados por qRT-PCR. Las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 mostraron un aumento en la expresión de ABCC1, mientras que en las células DU145 con silenciamiento de ZEB1 se observó un descenso en la expresión de dicho marcador al compararlas con su control (Fig. 21), por otro lado, no se vieron cambios significativos en la expresión de ABCG2 en ninguno de los tipos celulares estudiados. Adicionalmente se estudiaron los marcadores ABCB1 y Tubulina β III, los cuales no presentaron expresión en ambos tipos celulares estudiados ya sea por qRT-PCR ni por western blot (datos no presentados).

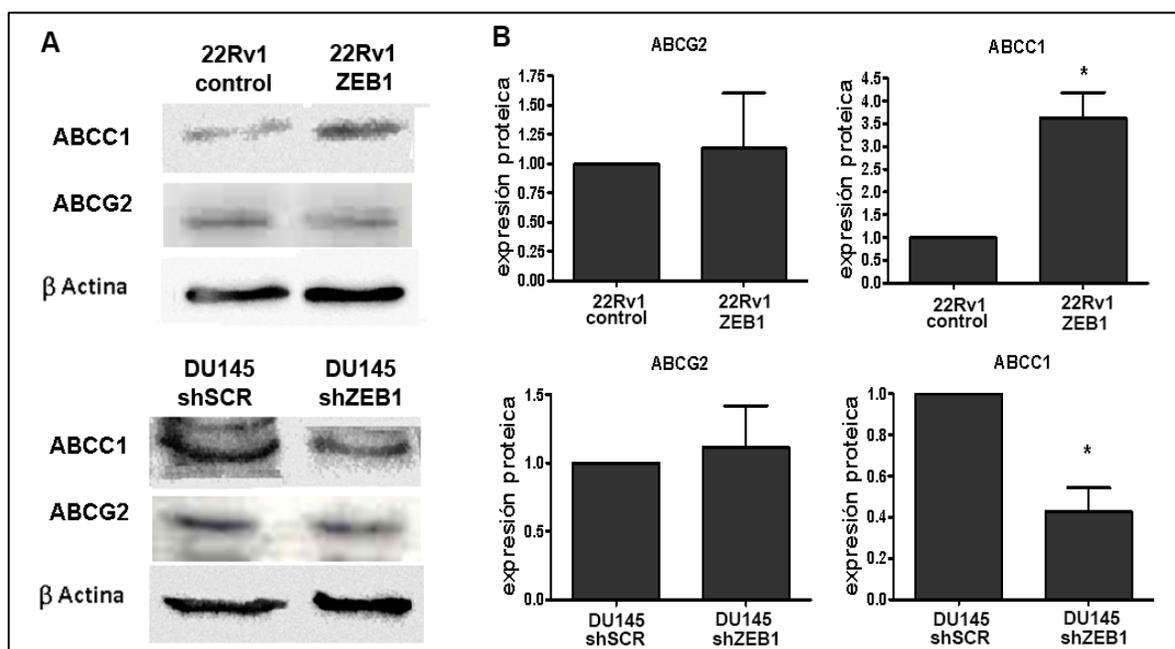


Figura 21. Expresión proteica de marcadores de quimioresistencia. A. Evaluación proteica de ABCC1 y ABCG2 en células con sobreexpresión y silenciamiento de ZEB1 por medio de western blot. **B.** Cuantificación gráfica de los resultados encontrados en B. * $p < 0.05$, $n = 3$. Las barras representan la media \pm SD.

Ensayo de apoptosis por Anexina V

Para analizar si el efecto de ZEB1 sobre la sensibilidad de las líneas celulares estudiadas al tratamiento con Docetaxel podría involucrar el programa de apoptosis, se trataron las células DU145 shSCR y las DU145 shZEB1 con Docetaxel por 12 y 24 horas. Luego del tiempo de los distintos tiempos de tratamiento se sometieron a un ensayo de Anexina V por citometría de flujo para detectar células en apoptosis temprana. Al analizar los resultados se encontró que después de 12 horas de tratamiento las células con silenciamiento de ZEB1 presentaron un significativamente mayor porcentaje de células apoptóticas (medido como el número de células positivas para Anexina V-FITC) al compararlas con las células control (Fig. 22). Los resultados luego de 24 horas de tratamiento fueron semejantes a los vistos a las 12 horas, salvo que la diferencia entre las células DU145 shSCR y DU145 shZEB1 positivas para Anexina V fue mayor.

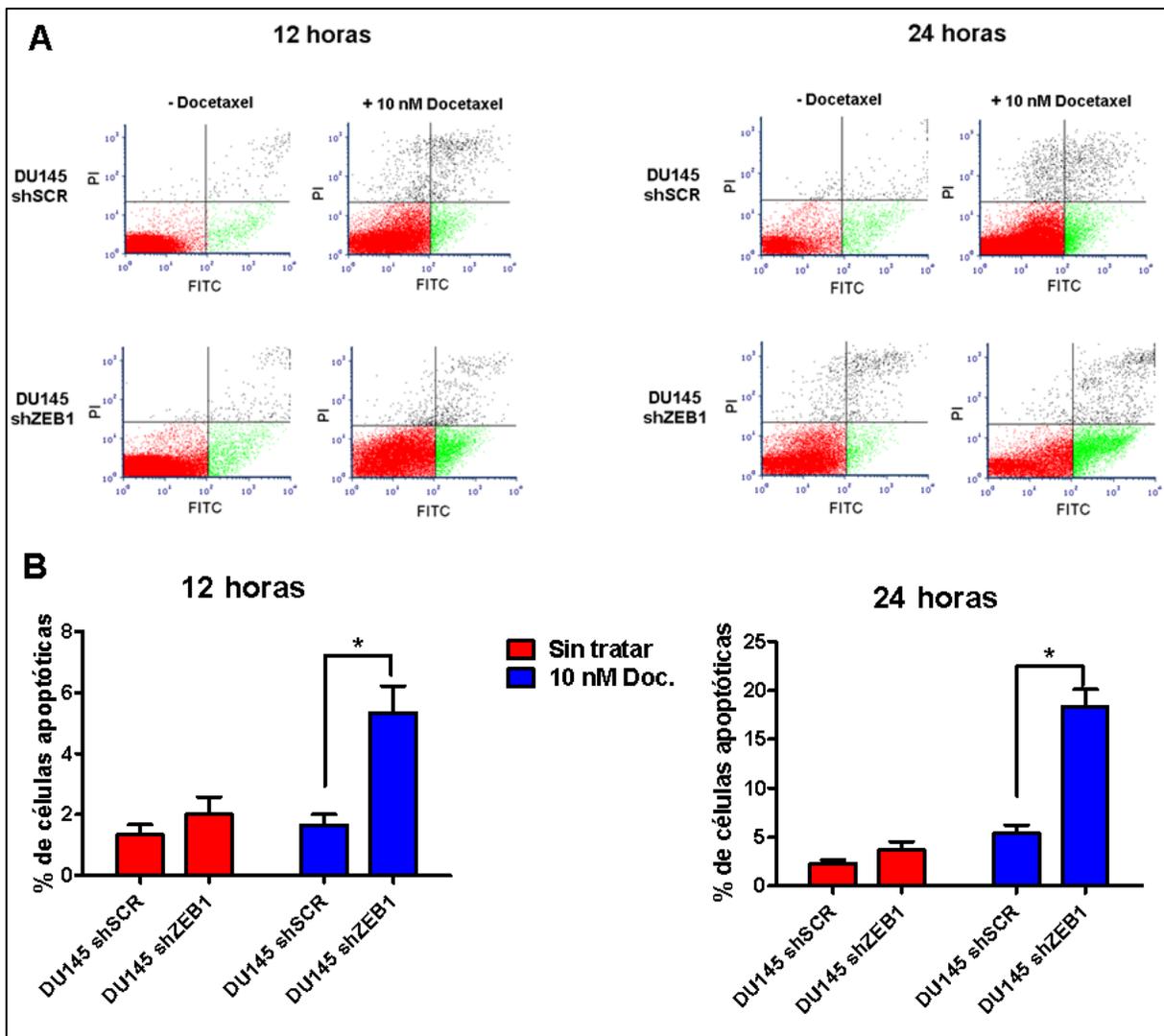


Figura 22. Inducción de apoptosis por Docetaxel en células con silenciamiento de ZEB1. **A.** La tasa de células DU145 con silenciamiento de ZEB1 y su control en apoptosis temprana luego de 12 y 24 horas de tratamiento con Docetaxel fue evaluada utilizando Anexina V por citometría de flujo. En rojo aparecen las células viables mientras que en verde las células en apoptosis temprana (Anexina V positivo). **B.** Análisis cuantitativo de lo observado en A. * $p < 0.05$. $n = 3$. Las barras representan la media \pm SD.

3.3 Objetivo específico N°3: Estudiar el rol de ABCC1 y el proceso de apoptosis en la resistencia a Docetaxel mediada por ZEB1

Expresión de ABCC1 en muestras de CaP y líneas celulares con silenciamiento de ZEB1

En experimentos anteriores se encontró que los cambios en la expresión de ZEB1 llevaba asociado un cambio en la expresión de la proteína de multiresistencia a drogas ABCC1, lo cual podría ser una de las causas del efecto protector que ZEB1 ejercería en nuestro modelo. Para reforzar estos resultados se analizó la expresión de ABCC1 en las células DU145 con silenciamiento de ZEB1 por medio de Inmunocitoquímica.

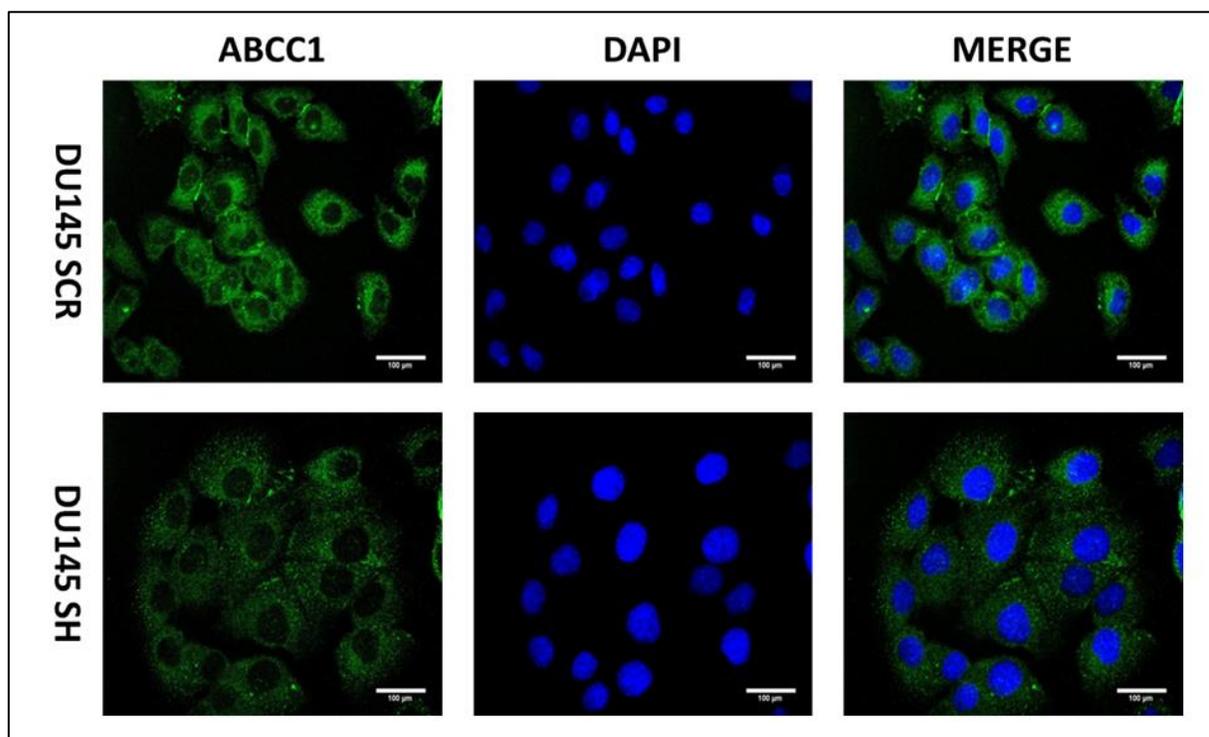


Figura 23. Inmunocitoquímica para ABCC1 en células DU145 con silenciamiento de ZEB1. La figura muestra la expresión de la proteína de multiresistencia a drogas ABCC1 en células DU145 con silenciamiento de ZEB1 (DU shZEB1) comparadas con su respectivo control (DU145 shSCR). Las imágenes son representativas de 3 ensayos con cultivos de distinto pasaje hechos independientemente (n=3) y con un aumento de 40X.

Como se observa en la figura 23, las células con silenciamiento presentan menor expresión de ABCC1 que las células control, tal como se observó previamente por Western blot. Finalmente, y para confirmar si lo encontrado en las líneas celulares también se ve en los pacientes, se estudió la expresión de ABCC1 en muestras de CaP de distinto grado de Gleason y se clasificaron de acuerdo a la intensidad de tinción para ABCC1 (0= sin marca, 1= marca leve, 2= marca intermedia, 3= marca intensa). Como se observa en la figura 24, ABCC1 se expresa en solo algunas de las muestras de bajo grado de Gleason y solo en forma leve, por otro lado, en las muestras de alto grado se observa tinción en casi la totalidad de las muestras, la cual tiende a ser de media intensidad, lo que podría relacionar con el aumento también visto en ZEB1 al progresar la enfermedad a etapas más avanzadas.

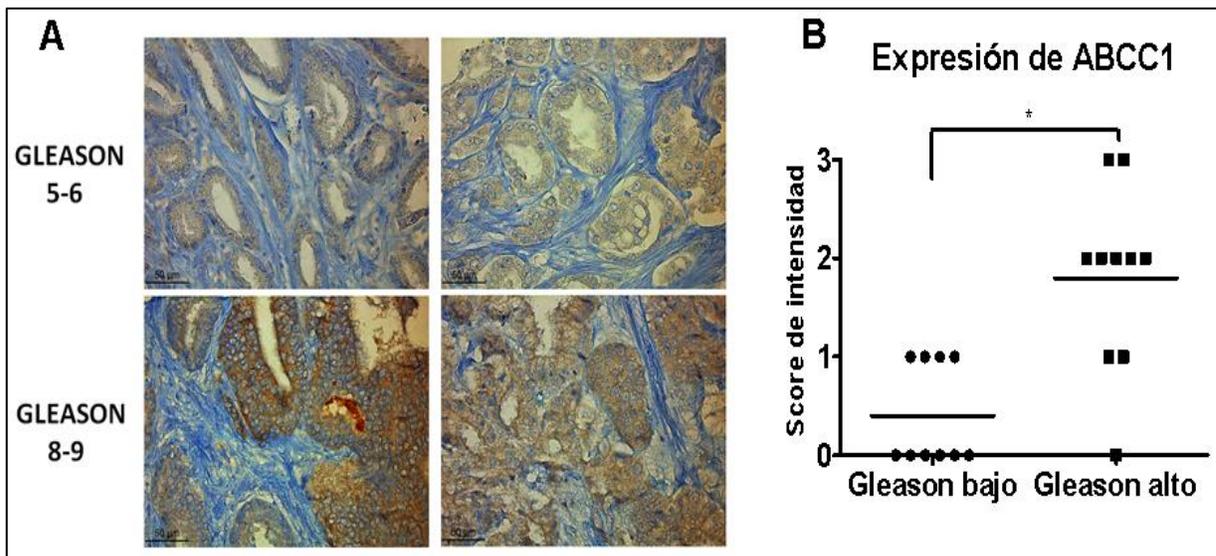


Figura 24. Inmunohistoquímica de ABCC1 en muestras de CaP de distinto Gleason. A. Se analizó la expresión de la proteína de multiresistencia a drogas ABCC1 en biopsias de distinto grado de Gleason. Las imágenes década Gleason son representativas de 5 muestras derivadas de pacientes y de 3 diferentes ensayos hechos independientemente (zoom 40X). **B.** Representación gráfica de los resultados de A. *p<0.05. n=10.

Rol de ABCC1 en la quimioresistencia mediada por ZEB1

Para comprobar que el cambio en la expresión de ABCC1 sería una posible causa del cambio en la sensibilidad a Docetaxel en nuestro modelo, se utilizó un bloqueador para ABCC1 (MK571). Las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 fueron incubadas con MK571 100 μ M por 1 hora antes de ser incubadas con Docetaxel a distintas concentraciones por 48 horas. La figura 25 muestra los resultados de viabilidad celular post tratamiento. Como se observa en el gráfico, el bloqueo de ABCC1 causó una resensibilización de las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 mostrando una IC₅₀ incluso menor que la mostrada por las células 22Rv1 control.

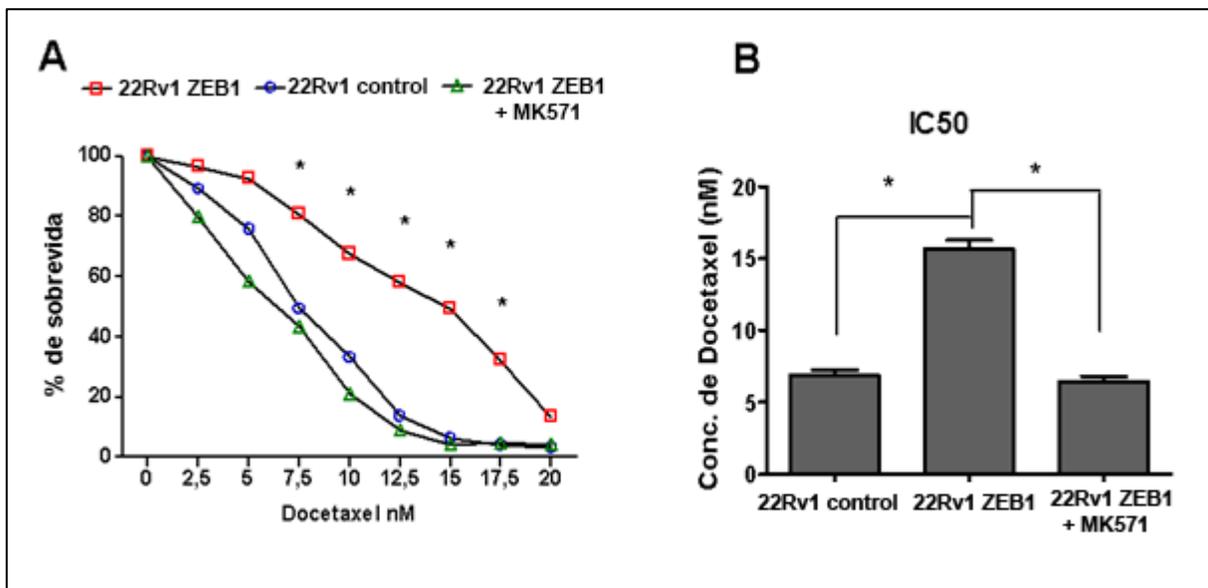


Figura 25. Estudio del rol de ABCC1 en la sensibilidad a Docetaxel de células con sobreexpresión de ZEB1. **A.** Células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 fueron incubadas con 100 μ M de MK571 (bloqueador de ABCC1) previo al tratamiento con Docetaxel. La imagen muestra la supervivencia de los distintos cultivos a distintas concentraciones de Docetaxel por 48 horas. **B.** Representación gráfica de la IC₅₀ de cada cultivo en A al tratamiento con Docetaxel. * $p < 0.05$. $n = 3$. Las barras representan la media \pm SD.

Rol del proceso de apoptosis en la quimioresistencia mediada por ZEB1

En experimentos anteriores utilizando Anexina V se determinó que las células DU145 con silenciamiento de ZEB1 presentaban un mayor número de células en apoptosis al ser tratadas con Docetaxel que las células control. Para comprobar el rol de la apoptosis en la resistencia mediada por ZEB1 se analizaron marcadores clásicos de apoptosis por medio de Western blot. Células DU145 con silenciamiento de ZEB1 fueron tratadas con o sin Docetaxel por 48 horas, luego de lo cual se analizaron los marcadores Bcl2, Bax y Caspasa 3 activa.

Como se observa en la figura 26A, las células con silenciamiento de ZEB1 que no fueron tratadas con Docetaxel mostraron escasa expresión de marcadores de apoptosis, sin encontrarse diferencia con las células control. En el caso de las células que fueron tratadas con Docetaxel, las células con silenciamiento de ZEB1 mostraron una expresión significativamente mayor de la proteína pro apoptótica Bax y del efector caspasa 3 activa. Al mismo tiempo estas células tienen una menor expresión de la proteína anti apoptótica Bcl2, todo esto al compararlas con las células control (Fig. 26B).

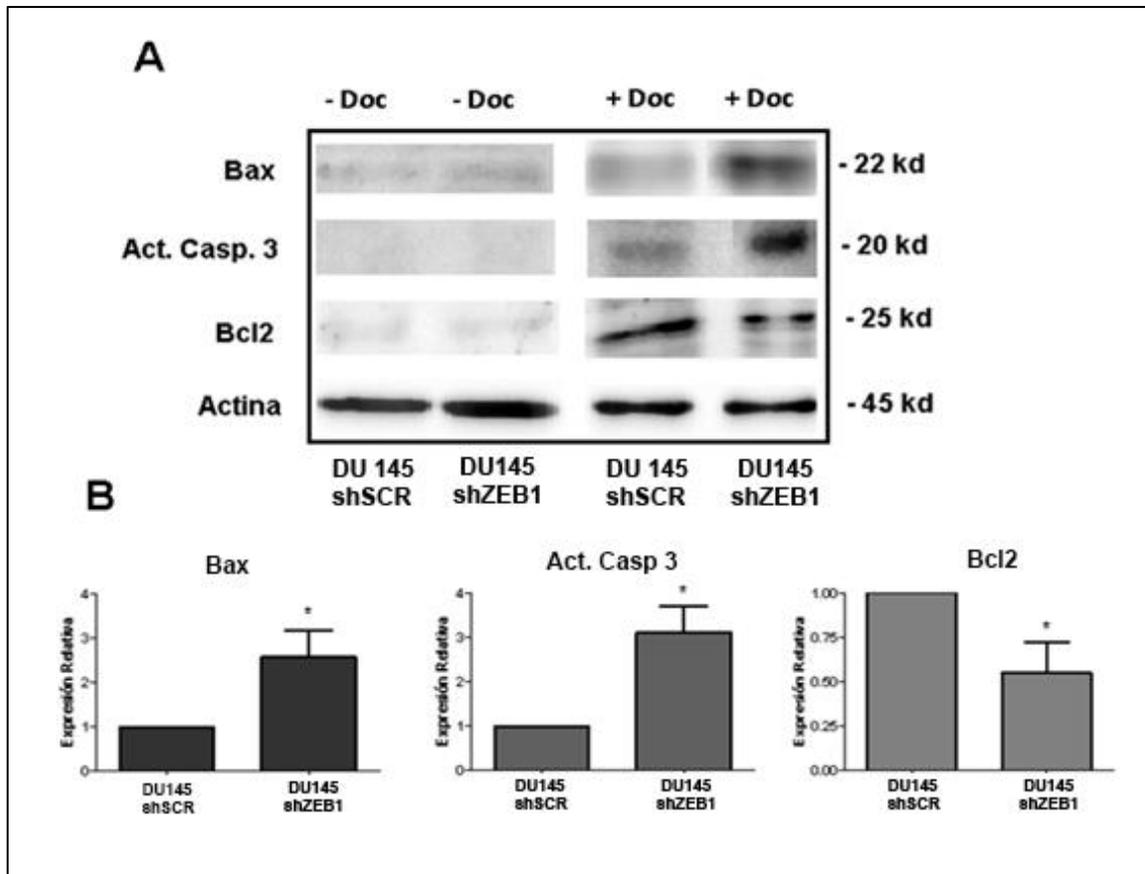


Figura 26. Estudio de marcadores de apoptosis por Western Blot. A. La expresión proteica de marcadores de apoptosis fue estudiada por Western Blot en células DU145 con silenciamiento de ZEB1 con o sin tratamiento con Docetaxel y se comparó con sus controles. **B.** Análisis cuantitativo de los niveles proteicos relativos vistos por western blot en las células tratadas con Docetaxel. * $p < 0.05$, (n=3). Las barras representan la media +/- SD.

A continuación, y para confirmar que el efecto citotóxico del Docetaxel es debido a la activación del proceso de apoptosis y que este proceso se ve modificado al modificar la expresión de ZEB1, se evaluó la viabilidad, citotoxicidad y actividad de caspasas 3/7 en células DU145 con silenciamiento de ZEB1 luego del tratamiento con Docetaxel. En la Figura 27 podemos observar que existe una disminución en la viabilidad de las células DU145 que es dependiente de la concentración de Docetaxel y que al mismo tiempo hay un aumento en la citotoxicidad y la actividad de caspasas 3/7 también en forma dependiente de la concentración, fenómeno que es consistente con el fenómeno de muerte celular por apoptosis. Al analizar las células

con silenciamiento de ZEB1 se aprecia un aumento en la sensibilidad a Docetaxel evidenciada por un descenso más rápido en la viabilidad y un aumento en la citotoxicidad y actividad de caspasas 3/7 lo que demuestra una mayor actividad apoptótica y nos indica nuevamente que el cambio en la sensibilidad a Docetaxel ejercido por ZEB1 estaría relacionado con el mecanismo de apoptosis.

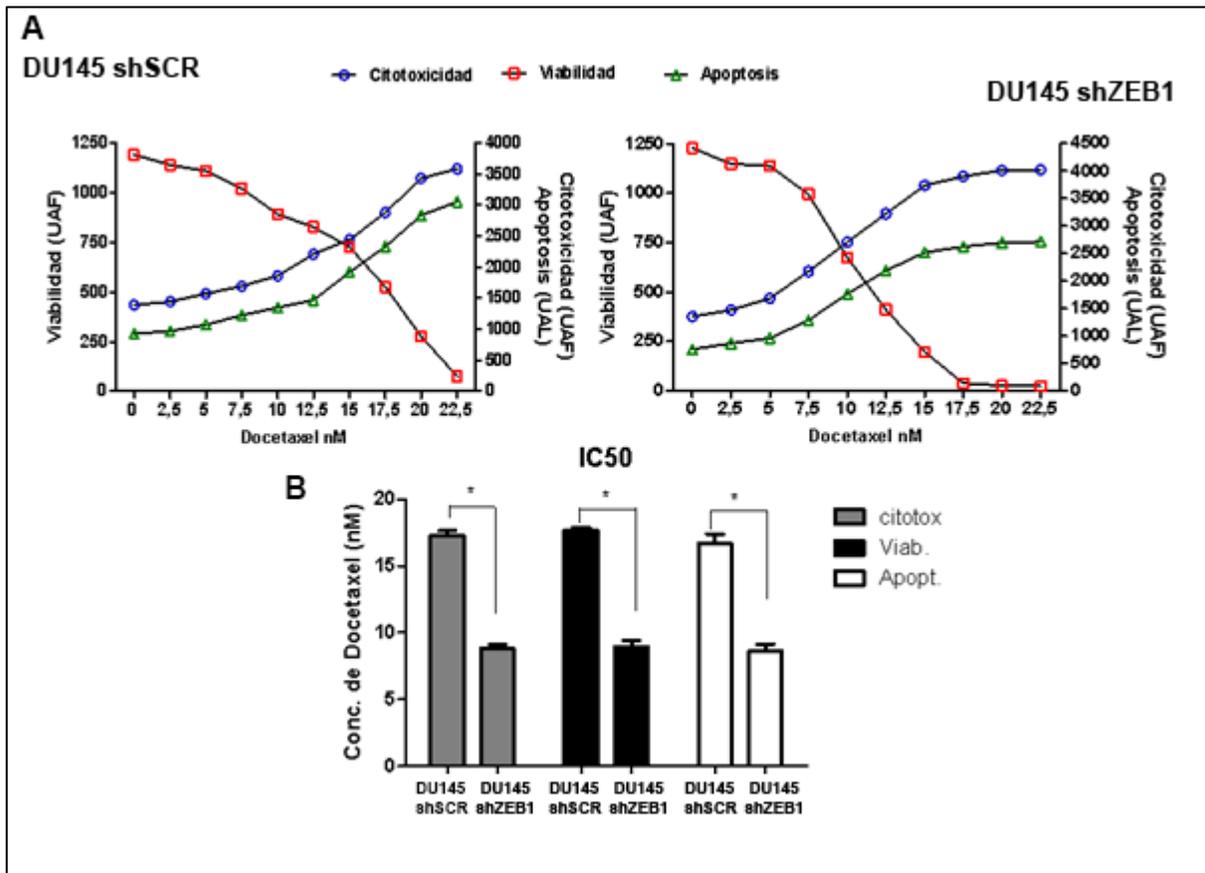


Figura 27. Estudio del rol de la apoptosis en la sensibilidad a Docetaxel. A. Células DU145 con silenciamiento de ZEB1 fueron incubadas con distintas concentraciones de Docetaxel por 48 horas al cabo de las cuales se estudió la viabilidad, citotoxicidad y activación de caspasas 3/7 mediante el kit ApoTox-Glo triplex assay de Promega. **B.** Representación gráfica de la IC50 para los 3 parámetros estudiados en A. * $p < 0.05$, (n=3). Las barras representan la media \pm SD.

4. DISCUSION

En los últimos años y pese a los avances en la medicina, el CaP en Chile ha presentado un alza moderada pero constante en mortalidad. Pese a que en etapas tempranas la enfermedad tiene muy buen pronóstico, cuando esta llega a etapas más avanzadas los tratamientos se van haciendo cada vez menos efectivos. El tratamiento estándar en etapas avanzadas es la quimioterapia, en específico el Docetaxel, pero los estudios han mostrado que solo es capaz de prolongar ligeramente la sobrevida de los pacientes, esto debido a la pronta aparición de mecanismos de resistencia en las células tumorales. Es por estas razones que es de gran importancia el entender no solo los mecanismos mediante los cuales el CaP progresa hacia fenotipos más agresivos, sino también que mecanismos le permiten resistir los tratamientos y que marcadores podrían ayudar a entender mejor el posible comportamiento a futuro de la enfermedad en un determinado paciente.

Hasta ahora para poder clasificar y pronosticar el progreso del CaP se utiliza el Score de Gleason, acompañado de la medición de PSA sanguíneo, pero cada vez es más claro que esto no es suficiente (50,51). *Graham et al.* mostraron recientemente que el factor transcripcional promotor de la TEM ZEB1 estaría aumentado en muestras de CaP de alto score de Gleason al compararlas con tejido sano y muestras de bajo score de Gleason (32). Esto es de gran importancia ya que el proceso de TEM ha sido involucrado con varios aspectos relacionados con el progreso tumoral (52). En el presente trabajo y utilizando muestras de pacientes nacionales encontramos resultados semejantes, donde en todas las muestras analizadas la inmunodetección para ZEB1 se encuentra en el estroma, sin embargo, solo en las de alto score de Gleason se detectó intenso marcaje en la zona tumoral. Variados reportes han señalado que existirían diferencias de expresión génica en el CaP entre distintas etnias y países (53, 54), por lo que la comprobación del aumento de ZEB1 en muestras de alto grado de Gleason nacionales apunta a que esto sería algo generalizado en el CaP.

Durante la búsqueda de factores que contribuyan al avance del CaP, en los últimos años se ha reportado que la activación del programa de TEM sería clave en

distintas etapas del progreso tumoral de esta enfermedad, pese a esto aún no están bien entendidos los mecanismos mediante los cuales este programa podría actuar en el avance del CaP (55). En el presente trabajo encontramos que la sobreexpresión del factor transcripcional ZEB1 en la línea celular 22Rv1 de CaP favorece un estado semejante al de EMT, esto se vio por medio de cambios fenotípicos y también por medio de un *switch* de marcadores epiteliales por mesenquimales. Interesantemente, el cambio no ocurrió en todos los marcadores estudiados, esto podría estar explicado porque normalmente el proceso de TEM está controlado por varios factores y no solo eso, *Dave et al.* (29) reportaron que existiría una cooperación entre los diversos activadores de la TEM por lo que ZEB1 quizás necesite de otros factores para llevar a cabo el *switch* completo de marcadores. Esto se vio reflejado también en las células DU145 donde el silenciamiento de ZEB1 provocó un *switch* de marcadores mesenquimales hacia marcadores epiteliales, aunque también en forma incompleta.

Una de las características más importantes de la TEM es que otorga capacidades migratorias e invasivas a las células tumorales (56). En nuestra investigación el cambio provocado por ZEB1 también se vio a nivel de estas propiedades tumorales como vimos en las células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1, las que presentaron un aumento en la invasión y la migración. Lo contrario se vio al silenciar ZEB1 en las células DU145 que mostraron una baja en sus capacidades migratorias e invasivas. Adicionalmente, encontramos que la expresión de ZEB1 otorgaría a las células mayores capacidades clonogénicas, esto es de gran importancia debido a que esta propiedad se ha relacionado con la aparición de células con fenotipo de *cancer stem cell* (57), células que han sido señaladas como las responsables de regenerar el tumor luego de las terapias debido a su inherente resistencia a los tratamientos convencionales (58). Estos resultados apuntan a ZEB1 como un componente clave en la malignización del CaP y la generación de metástasis promoviendo procesos como la migración, invasión y la capacidad clonogénica.

A diferencia de la mayoría de los tumores sólidos, la quimioterapia no era el tratamiento más común en el CaP, salvo como método para aliviar el dolor asociado a los síntomas, esto debido a la gran resistencia a estos tratamientos que presenta el CaP avanzado. No fue sino hasta la década pasada que un compuesto de la familia de los taxanos, el Docetaxel, mostró un aumento significativo en la sobrevida de los pacientes (59). Lamentablemente el aumento en sobrevida es en promedio de 3-4 meses, debido a que las células tumorales generan rápidamente resistencia a este tratamiento. Como dijimos en un comienzo, en los últimos años se ha relacionado a la activación del programa de TEM como elemento clave en distintas etapas del progreso tumoral (52) incluyendo la aparición de células con el fenotipo de resistencia a quimioterapia (60). Un trabajo reciente hecho en líneas celulares de CaP resistentes a Docetaxel mostró una alta expresión de ZEB1 en dichas líneas al compararlas con las líneas control no resistentes, característica que también se asoció a cambios característicos del proceso de TEM, proponiendo de esta forma que ZEB1 podría, al activar el proceso de TEM, generar células con un fenotipo de resistencia a Docetaxel (61). En el presente trabajo encontramos que la sobreexpresión de ZEB1 juntamente con el cambio en marcadores y propiedades asociadas a la TEM también provocó un aumento en la resistencia al tratamiento con Docetaxel en las células 22Rv1, consistente con esto fue lo visto en las células DU145, donde el silenciamiento de ZEB1 llevo a una mayor sensibilidad al tratamiento con Docetaxel en estas células.

En este contexto, surge la pregunta sobre si este cambio a nivel de quimioresistencia sería consecuencia de los cambios visto a nivel del programa de TEM o si sería un efecto propio de ZEB1. Recientemente, *Wang et al.* (62) publicaron un estudio donde se muestra que ZEB1 y no los demás activadores de la TEM era capaz de aumentar la resistencia a Docetaxel en células de cáncer de pulmón, mientras que *Lim et al.* reportaron que en un modelo epitelial mamario la sobreexpresión de Snail no solo indujo el programa de TEM sino que también llevo a un aumento en la resistencia a Doxorubicina (63). En el presente trabajo se utilizaron líneas celulares de CaP LNCaP y PC3 con sobreexpresión de Snail, Slug y ZEB1. Al analizar la sensibilidad de estas células al tratamiento con Docetaxel encontramos

que tanto las células LNCaP como las PC3 con sobreexpresión de ZEB1 mostraron ser significativamente más sensibles al quimioterapéutico al compararlas con su control. Interesantemente, ninguna de las células con sobreexpresión de Snail ni de Slug mostró diferencias significativas en su sensibilidad a Docetaxel en todos nuestros ensayos, lo que nos lleva a pensar que este fenómeno podría ser propio de ZEB1 y no debido a la activación del programa de TEM. Estos resultados apuntan a que en nuestro modelo habría un desacople entre este proceso y el fenómeno de quimioresistencia. *Aigner et al.* reportaron recientemente que los factores inductores de TEM podrían ejercer diferentes roles uno de otro (33) por lo que no sería extraño pensar que en el cáncer prostático ZEB1 podría ejercer un efecto protector contra el tratamiento con quimioterapia aparte de su efecto sobre la TEM.

En los últimos años se han publicado varios trabajos reportando que ZEB1 jugaría un papel crucial en la regulación de la sensibilidad tumoral a la radioterapia, describiendo además mediante qué mecanismos ejercería esta regulación (64, 65). En el campo de la quimioresistencia y como ya hemos mencionado, en los últimos años ha aparecido evidencia de que ZEB1 estaría implicado en el desarrollo de quimioresistencia en diferentes clases de cáncer, pero pese a esto, aun no se entiende bien mediante qué mecanismos estaría ejerciendo este efecto. En un trabajo reciente *Ma et al.* (66) proponen que ZEB1 no tendría un mecanismo único de acción para mediar la resistencia a quimioterapia y que estos podrían ser variados y depender del tipo de cáncer estudiado.

Se han propuesto diversos mecanismos mediante los cuales las células tumorales se defienden contra el tratamiento con quimioterapia y en específico contra el Docetaxel, entre los que se encuentran los cambios a nivel de microtúbulos, la expresión de proteínas transportadoras de multiresistencia a drogas y cambios en el control de la apoptosis (67). Por lo que para entender como ZEB1 estaría ejerciendo su efecto quimioprotector en nuestro modelo buscamos si algunos de estos mecanismos se verían modificados ya sea con el silenciamiento o sobreexpresión de ZEB1.

En un trabajo del grupo de *Ploussard et al.* mostraron que en muestras de pacientes en etapas avanzadas de CaP había un aumento en la expresión de la isoforma III de la β tubulina, la cual no es sustrato para el Docetaxel (68). Nuestros resultados no mostraron presencia de esta isoforma en ninguna de las células estudiadas frente al tratamiento con Docetaxel, lo que difiere con lo enunciado por Ploussard, pero cabe mencionar que en un estudio del año 2001, la expresión exógena de la isoforma III de la β tubulina en células DU145 no les confirió mayor resistencia al tratamiento con taxanos (39), por lo que el rol de esta proteína en la resistencia a Docetaxel en CaP parece no estar muy claro aún.

Pese a que el Docetaxel es un compuesto hidrofóbico y que puede difundir a través de la membrana plasmática libremente, existe un gran control de la entrada y salida de estos compuestos desde esta región por medio de transportadores de la familia ABC, controlando así las concentraciones y el tiempo de acción dentro de la célula para estos fármacos (46). El más conocido de estos es ABCB1, el cual se ha relacionado fuertemente con la resistencia a Docetaxel en CaP (69), pero otros miembros de esta familia como ABCC1 y ABCG2 también han sido relacionados con el desarrollo de quimioresistencia en CaP (70). En nuestro trabajo no encontramos expresión de ABCB1 ni en las células con sobreexpresión de ZEB1 ni en las con silenciamiento y aunque si encontramos expresión de ABCG2, no se vieron cambios significativos en su expresión ni al sobreexpresar ni al silenciar ZEB1. Sin embargo, en ambos tipos celulares estudiados encontramos cambios en la expresión del transportador ABCC1, el cual aumento al aumentar ZEB1 y disminuyó al silenciarlo. Trabajos por otros grupos han apuntado a esta proteína como un componente importante en la generación del fenotipo quimioresistente en distintos tipos de cáncer (71), mientras que *Liu et al.* reportaron recientemente que ABCC1 podría ser el causante del aumento en la quimioresistencia en cáncer stem cells de próstata (72).

Estos resultados nos llevan a pensar que ZEB1 podría favorecer la resistencia a quimioterapia por métodos alternativos al más estudiado que es el aumento de ABCB1 y que este no sería el único mecanismo de resistencia en etapas avanzadas del CaP. Consistente con esto, en un trabajo de *Hai et al.* se analizaron 95 muestras

de pacientes con CaP de diferente grado de Gleason no se encontró expresión de ABCB1 pero si alta expresión de ABCC1, la cual se hizo aún más alta en muestras de alto grado de Gleason (73). Siguiendo esta línea, *O'Neill et al.* caracterizaron distintas líneas celulares de CaP que fueron hechas resistentes a Docetaxel por exposición a concentraciones crecientes del fármaco. Al analizarse distintos mecanismos de resistencia encontraron que cada línea presentaba mecanismos distintos, entre los que se encontraban el aumento en ABCB1, cambios en el proceso de apoptosis y en la activación de NF- κ B (61), por lo que probablemente el fenómeno de resistencia a Docetaxel es multifactorial y no atribuible a solo un evento.

Consistente con la idea de la presencia de múltiples factores responsables de la quimioresistencia en CaP son los resultados que encontramos a nivel de apoptosis mediante ensayos de Anexina V, donde las células con silenciamiento presentaban un mayor número de células en estado de apoptosis luego del tratamiento con Docetaxel. Se ha reportado ampliamente que el Docetaxel ejercería su efecto citotóxico induciendo el proceso de apoptosis (74), lo que se condice con los resultados que obtuvimos cuando evaluamos apoptosis, citotoxicidad y viabilidad, donde el Docetaxel afectó los 3 parámetros en forma similar. Por esta razón es que en muchos casos se ha visto que otro de los mecanismos de resistencia que se activarían en el CaP avanzado estaría relacionado con disminuir o bloquear este programa de muerte celular (61, 70). Por ejemplo, se han asociado cambios en los niveles de expresión de miembros de la familia de Bcl2 con una mayor resistencia a quimioterapia. También se ha visto que un aumento en la expresión de Bcl-xL (proteína antiapoptótica) en líneas celulares de CaP lleva a una mayor resistencia al tratamiento con Docetaxel y otros quimioterapéuticos (75) mientras que *Raffio et al.* reportaron que en muestras de CaP resistente a la castración habría una alta expresión de la proteína anti apoptótica Bcl2 (76).

Nuestros resultados apoyan estos mecanismos ya que encontramos que el silenciamiento de ZEB1 provocó una baja en la expresión de Bcl2 y un aumento en la de Bax (proteína pro apoptótica), con un consecuente aumento en la activación de la

caspasa 3. Estos antecedentes unidos a nuestros resultados señalan a que el desbalance entre proteínas anti y pro apoptóticas podría llevar a la resistencia al tratamiento con Docetaxel y otras drogas con un mecanismo similar en el CaP avanzado.

El análisis global de nuestros datos nos lleva a proponer que ZEB1 sería un regulador clave en la aparición del fenotipo de resistencia a quimioterapia en CaP mediante la regulación de varios mecanismos entre lo que se encontrarían un aumento en la expresión de ABCC1 y una disminución en el proceso de apoptosis.

El CaP representa uno de los cánceres más prevalentes en hombres tanto a nivel nacional como internacional y pese a que el tratamiento local en etapas tempranas es de buen pronóstico, las terapias en etapas avanzadas son poco efectivas a largo plazo, siendo el Docetaxel el único quimioterapéutico actualmente en uso, al que eventualmente todos los pacientes desarrollan resistencia en unos meses. Aunque muchos mecanismos de resistencia se han descrito, pocos han sido estudiados con éxito a nivel clínico y un número aún menor ha mostrado resultados prometedores, una razón para esto podría ser que la mayoría de factores estudiados atacan solo un aspecto del progreso tumoral, descuidando los demás (77). Por estas razones y debido a la heterogeneidad celular que presenta el CaP, inter e intra pacientes, es necesaria la búsqueda de marcadores que den información sobre más de un aspecto del progreso tumoral, lo que ayudaría al médico tratante a no solo diagnosticar la enfermedad sino también poder pronosticar mejor otros aspectos como la rapidez de progreso de la enfermedad o la posible respuesta frente a la terapia (78).

En nuestro trabajo mostramos que el factor transcripcional ZEB1 regula varios factores de la malignización tumoral en el CaP, como la activación del programa de TEM, el que faculta a las células tumorales con mayores características migratorias e invasivas, favoreciendo la invasión de tejidos cercanos y lejanos, además de promover la aparición de mecanismos de resistencia a Docetaxel. Estos resultados harían de ZEB1 un buen marcador pronóstico tanto de progreso tumoral como de respuesta al tratamiento.

5. CONCLUSIONES

1.- El factor transcripcional ZEB1 controla la expresión de los marcadores de TEM, E-Cadherina y Vimentina, en las líneas celulares de CaP DU145 y 22Rv1.

2.- El factor transcripcional ZEB1 promueve características malignas del progreso tumoral tales como la migración, invasión y clonogenicidad.

3.- La sobreexpresión de ZEB1 confiere resistencia al tratamiento con Docetaxel a las células 22Rv1 mientras que su silenciamiento hace más sensibles a las células DU145.

4.- Ni la sobreexpresión de Snail ni de Slug fue capaz de promover resistencia a Docetaxel en las líneas celulares de CaP PC3 y LNCaP.

5.- El factor transcripcional ZEB1 modula la expresión de ABCC1 en las células 22Rv1 y DU145.

6.- El factor transcripcional ZEB1 promueve una mayor resistencia en las líneas celulares DU145 y 22Rv1 a la muerte por apoptosis inducida por Docetaxel.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] D. E. Malarkey, M. Hoenerhoff, and R. R. Maronpot,. *Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations*. 2013.
- [2] J. C. Barrett, "Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment," *Environ. Health Perspect.*, vol. 100, no. 12, pp. 9–20, 1993.
- [3] D. Grandér, "How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?," *Med. Oncol.*, vol. 15, no. 1, pp. 20–6, 1998.
- [4] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-tieulent, and A. Jemal, "Global Cancer Statistics, 2012," *CA a cancer J. Clin.*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, 2015.
- [5] B. W. Stewart and C. P. Wild, "World cancer report 2014," *World Heal. Organ.*, pp. 1–2, 2014.
- [6] R. Siegel, K. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics , 2015 .," *CA Cancer J Clin*, vol. 65, no. 1, p. 29, 2015.
- [7] L. Itriago, N. Silva, and G. Cortés, "Cáncer en Chile y el mundo: una mirada epidemiológica, presente y futuro," *Rev. Médica Clínicas Las Condes*, vol. 24, no. 4, pp. 531–552, 2013.
- [8] M. Shen and C. Abate-Shen, "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges," *Genes Dev.*, no. 212, pp. 1967–2000, 2010.
- [9] J. Felgueiras, J. V. Silva, and M. Fardilha, "Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets.," *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 15, no. 1, pp. 16–42, 2014.
- [10] P. A. Humphrey, "Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate," *Mod. Pathol.*, vol. 17, no. 3, pp. 292–306, 2004.

- [11] S. B. Frank and C. K. Miranti, "Disruption of Prostate Epithelial Differentiation Pathways and Prostate Cancer Development," *Front. Oncol.*, vol. 3, no. October, pp. 1–23, 2013.
- [12] B. J. Feldman and D. Feldman, "The development of androgen-independent prostate cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 1, no. 1, pp. 34–45, 2001.
- [13] R. Kalluri and R. a Weinberg, "Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428, 2009.
- [14] L. Kerosuo and M. Bronner-Fraser, "What is bad in cancer is good in the embryo: Importance of EMT in neural crest development," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 320–332, 2012.
- [15] J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. J. Huang, and M. A. Nieto, "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease," *Cell*, vol. 139, no. 5, pp. 871–890, 2009.
- [16] N. Ahmed, "Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium," *Am. J. Physiol Cell Physiol*, pp. 1532–1542, 2006.
- [17] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, "Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, 2014.
- [18] J. H. Tsai and J. Yang, "Epithelial – mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis," *Genes Dev.*, vol. 27, no. 20, pp. 2192–2206, 2013.
- [19] A. Singh and J. Settleman, "EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer," *Oncogene*, vol. 29, no. 34, pp. 4741–4751, 2010.

- [20] Y. Katsuno, S. Lamouille, and R. Derynck, "TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression," *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 25, no. 1, pp. 76–84, 2013.
- [21] A. Puisieux, T. Brabletz, and J. Caramel, "Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors," *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 488–494, 2014.
- [22] E. Sánchez-Tilló, L. Siles, O. de Barrios, M. Cuatrecasas, E. C. Vaquero, A. Castells, and A. Postigo, "Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression.," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 1, no. 7, pp. 897–912, 2011.
- [23] J. E. Remacle, H. Kraft, W. Lerchner, G. Wuytens, C. Collart, K. Verschueren, J. C. Smith, and D. Huylebroeck, "New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites.," *EMBO J.*, vol. 18, no. 18, pp. 5073–84, 1999.
- [24] Y. Liu, S. El-Naggar, D. S. Darling, Y. Higashi, and D. C. Dean, "Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence," *Development*, vol. 135, no. 3, pp. 579–588, 2008.
- [25] E. Sánchez-Tilló, A. Lázaro, R. Torrent, M. Cuatrecasas, E. C. Vaquero, A. Castells, P. Engel, and A. Postigo, "ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1," *Oncogene*, vol. 29, no. 24, pp. 3490–3500, 2010.
- [26] A. A. Postigo, J. L. Depp, J. J. Taylor, and K. L. Kroll, "Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins," *EMBO J.*, vol. 22, no. 10, pp. 2453–2462, 2003.
- [27] U. Burk, J. Schubert, U. Wellner, O. Schmalhofer, E. Vincan, S. Spaderna, and T. Brabletz, "A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells," *EMBO Rep.*, vol. 9, no. 6, pp. 582–589, 2008.

- [28] R. Graham, R. Yacoub, L. Taliaferro-Smith, A. Asunkoya, V. Odero-Marah, T. Liu, K. Kimbro, D. Sharma, R. O'Regan, "Reciprocal regulation of ZEB1 and AR in triple negative breast cancer cells", *Breast Cancer Res Treat*, vol. 28, no. 5, pp. 1286–1292, 2014.
- [29] N. Dave, S. Guaita-Esteruelas, S. Gutarra, À. Frias, M. Beltran, S. Peiró, and A. García De Herreros, "Functional cooperation between snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 14, pp. 12024–12032, 2011.
- [30] A. Chen, C. S. F. Wong, M. C. P. Liu, C. M. House, J. Sceneay, D. D. Bowtell, E. W. Thompson, and A. Moller, "The ubiquitin ligase Siah is a novel regulator of Zeb1 in breast cancer.," *Oncotarget*, vol. 6, no. 2, pp. 862–873, 2015.
- [31] O. Schmalhofer, S. Brabletz, and T. Brabletz, "E-cadherin, Beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, no. 1–2, pp. 151–166, 2009.
- [32] T. R. Graham, H. E. Zhau, V. A. Odero-Marah, A. O. Osunkoya, K. S. Kimbro, M. Tighiouart, T. Liu, J. W. Simons, and R. M. O'Regan, "Insulin-like growth factor-I - Dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 7, pp. 2479–2488, 2008.
- [33] K. Aigner, B. Dampier, L. Descovich, M. Mikula, A. Sultan, M. Schreiber, W. Mikulits, T. Brabletz, D. Strand, P. Obrist, W. Sommergruber, N. Schweifer, A. Wernitznig, H. Beug, R. Foisner, and A. Eger, "The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity," *Oncogene*, vol. 26, no. 49, pp. 6979–6988, 2007.
- [34] N. S. Spoelstra, N. G. Manning, Y. Higashi, D. Darling, M. Singh, K. R. Shroyer, R. R. Broaddus, K. B. Horwitz, and J. K. Richer, "The transcription factor ZEB1

is aberrantly expressed in aggressive uterine cancers,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 7, pp. 3893–3902, 2006.

- [35] E. Sánchez-tilló, O. De Barrios, L. Siles, M. Cuatrecasas, A. Castells, and A. Postigo, “ β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness,” *PNAS*, vol. 108, no. 48, pp. 19204-209, 2011.
- [36] S. Brabletz and T. Brabletz, “The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer?,” *EMBO Rep.*, vol. 11, no. 9, pp. 670–677, 2010.
- [37] T. Chandrasekar, J. C. Yang, A. C. Gao, and C. P. Evans, “Targeting molecular resistance in castration-resistant prostate cancer,” *BMC Med.*, pp. 1–10, 2015.
- [38] J. Domingo-Domenech, S. J. Vidal, V. Rodriguez-Bravo, M. Castillo-Martin, S. A. Quinn, R. Rodriguez-Barrueco, D. M. Bonal, E. Charytonowicz, N. Gladoun, J. de la Iglesia-Vicente, D. P. Petrylak, M. C. Benson, J. M. Silva, and C. Cordon-Cardo, “Suppression of Acquired Docetaxel Resistance in Prostate Cancer through Depletion of Notch- and Hedgehog-Dependent Tumor-Initiating Cells,” *Cancer Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 373–388, 2012.
- [39] G. Ploussard, S. Terry, P. Maillé, Y. Allory, N. Sirab, L. Kheuang, P. Soyeux, N. Nicolaiew, E. Coppolani, B. Paule, L. Salomon, S. Culine, R. Buttyan, F. Vacherot, and A. De La Taille, “Class III β -tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy,” *Cancer Res.*, vol. 70, no. 22, pp. 9253–9264, 2010.
- [40] C. Sánchez, P. Mendoza, H. R. Contreras, J. Vergara, J. a McCubrey, C. Huidobro, and E. a Castellón, “Expression of multidrug resistance proteins in prostate cancer is related with cell sensitivity to chemotherapeutic drugs.,” *Prostate*, vol. 69, no. 13, pp. 1448–1459, 2009.

- [41] C. Hwang, "Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: a perspective review," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 4, no. 6, pp. 329–340, 2012.
- [42] J. Yan and D. Tang, "Prostate cancer stem-like cells proliferate slowly and resist etoposide-induced cytotoxicity via enhancing DNA damage response," *Exp. Cell Res.*, vol. 328, no. 1, pp. 132–142, 2014.
- [43] A. Mitra, C. Jameson, Y. Barbachano, L. Sanchez, Z. Kote-, S. Peock, N. Sodha, E. Bancroft, and A. Fletcher, "Over-expression of RAD51 occurs in aggressive prostate cancer," *Histopathology*, vol. 55, no. 6, pp. 696–704, 2010.
- [44] M. Amit, E. Anne, B. Raymond, D. Drinkwitz, S. Naran, P. Thompson, P. Steven, P. Stratton. "DNA damage and repair markers (H2AX and RAD51) improve accuracy of prostate cancer diagnosis and improve identification of aggressive disease" *AACR Annual Meeting*, 2014.
- [45] D. Karnak and L. Xu, "Chemosensitization of prostate cancer by modulating Bcl-2 family proteins.," *Curr. Drug Targets*, vol. 11, no. 6, pp. 699–707, 2010.
- [46] L. M. Greenberger and D. Sampath, "Resistance To Taxanes," *Cancer Drug Discov. Dev. Cancer Drug Resist.*, pp. 329–358, 2006.
- [47] H. Wang, T. Vo, A. Hajar, S. Li, X. Chen, A. M. Parissenti, D. N. Brindley, and Z. Wang, "Multiple mechanisms underlying acquired resistance to taxanes in selected docetaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells," *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, p. 37, 2014.
- [48] K. Hanrahan, A. O'Neill, M. Prencipe, J. Bugler, L. Murphy, A. Fabre, M. Pühr, Z. Culig, K. Murphy, and W. R. Watson, "The role of epithelial–mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer," *Mol. Oncol.*, vol. 11, no. 3, pp. 251–265, 2017.
- [49] S. Kasper, "Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell," *Stem Cell Rev.*, vol. 4, no. 3, pp. 193–201, 2008.

- [50] P. Humphrey, "Gleason Grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate", *Modern Pathology*, vol. 17, pp. 292-306.
- [51] A. Buhmeida, S. Pyrhönen, M. Laato, Y. Collan, R., "Prognostic factors in prostate cancer," *Diagn. Pathol.*, vol. 1, no. 1, p. 4, 2006.
- [52] M. I. Khan, A. Hamid, V. M. Adhami, R. K. Lall, and H. Mukhtar, "Role of epithelial mesenchymal transition in prostate tumorigenesis.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 21, no. 10, pp. 1240–8, 2015.
- [53] T. Kimura, "East meets west: Ethnic differences in prostate cancer epidemiology between East Asians and Caucasians," *Chin. J. Cancer*, vol. 31, no. 9, pp. 421–429, 2012.
- [54] P. Kheirandish and F. Chinegwundoh, "Ethnic differences in prostate cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 105, no. 4, pp. 481–485, 2011.
- [55] J. T. Nauseef and M. D. Henry, "Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle?," *Nat. Rev. Urol.*, vol. 8, no. 8, pp. 428–439, 2011.
- [56] C. M. Grant and N. Kyprianou, "Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression," *Transl. Androl. Urol.*, vol. 2, no. 4, pp. 202–211, 2013.
- [57] S. A. Mani, W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R. A. Weinberg, "The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells," *Cell*, vol. 133, no. 4, pp. 704–715, 2008.
- [58] S. Hindriksen and M. F. Bijlsma, "Cancer stem cells, EMT, and developmental pathway activation in pancreatic tumors," *Cancers (Basel)*, vol. 4, no. 4, pp. 989–1035, 2012.

- [59] M. Hurwitz, "Chemotherapy in Prostate Cancer," *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 17, no. 10, p. 44, 2015.
- [60] M. Marin-Aguilera, J. Codony-Servat, O. Reig, J. J. Lozano, P. L. Fernandez, M. V. Pereira, N. Jimenez, M. Donovan, P. Puig, L. Mengual, R. Bermudo, A. Font, E. Gallardo, M. J. Ribal, A. Alcaraz, P. Gascon, and B. Mellado, "Epithelial-to-Mesenchymal Transition Mediates Docetaxel Resistance and High Risk of Relapse in Prostate Cancer," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 13, no. 5, pp. 1270–1284, 2014.
- [61] A. J. O. Neill, M. Prencipe, C. Dowling, Y. Fan, L. Mulrane, W. M. Gallagher, D. O. Connor, R. O. Connor, A. Devery, C. Corcoran, S. Rani, L. O. Driscoll, J. M. Fitzpatrick, and R. W. G. Watson, "Characterisation and manipulation of docetaxel resistant prostate cancer cell lines," pp. 1–13, 2011.
- [62] J. Ren, Y. Chen, H. Song, L. Chen, and R. Wang, "Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line," *J. Cell. Biochem.*, vol. 114, no. 6, pp. 1395–1403, 2013.
- [63] S. Lim, A. Becker, A. Zimmer, J. Lu, R. Buettner, and J. Kirfel, "SNAI1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition Confers Chemoresistance and Cellular Plasticity by Regulating Genes Involved in Cell Death and Stem Cell Maintenance," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, pp. 1–12, 2013.
- [64] M. A. Cortez, D. Valdecanas, X. Zhang, Y. Zhan, V. Bhardwaj, G. A. Calin, R. Komaki, D. K. Giri, C. C. Quini, T. Wolfe, H. J. Peltier, A. G. Bader, J. V. Heymach, R. E. Meyn, and J. W. Welsh, "Therapeutic Delivery of miR-200c Enhances Radiosensitivity in Lung Cancer," *Mol. Ther.*, vol. 22, no. 8, pp. 1494–1503, 2014.

- [65] P. Zhang, Y. Wei, L. Wang, B. G. Debeb, Y. Yuan, J. Zhang, J. Yuan, M. Wang, D. Chen, Y. Sun, W. A. Woodward, Y. Liu, D. C. Dean, H. Liang, Y. Hu, K. K. Ang, M.-C. Hung, J. Chen, and L. Ma, "ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 864–75, 2014.
- [66] P. Zhang, Y. Sun, and L. Ma, "ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance," *Cell Cycle*, vol. 14, no. 4, pp. 481–487, 2015.
- [67] K. L. Mahon, S. M. Henshall, R. L. Sutherland, and L. G. Horvath, "Pathways of chemotherapy resistance in castration-resistant prostate cancer," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 18, no. 4, pp. 103–123, 2011.
- [68] S. Ranganathan, R. a McCauley, D. W. Dexter, and G. R. Hudes, "Modulation of endogenous beta-tubulin isotype expression as a result of human beta(III)cDNA transfection into prostate carcinoma cells.," *Br. J. Cancer*, vol. 85, no. 5, pp. 735–40, 2001.
- [69] Y. Zhu, C. Liu, N. Nadiminty, W. Lou, R. Tummala, C. P. Evans, and A. C. Gao, "Inhibition of ABCB1 expression overcomes acquired docetaxel resistance in prostate cancer.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 12, no. 9, pp. 1829–36, 2013.
- [70] L. Magadoux, N. Isambert, S. Plenchette, J. F. Jeannin, and V. Laurens, "Emerging targets to monitor and overcome docetaxel resistance in castration resistant prostate cancer (review)," *Int. J. Oncol.*, vol. 45, no. 3, pp. 919–928, 2014.
- [71] J. I. Fletcher, M. Haber, M. J. Henderson, and M. D. Norris, "ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 2, pp. 147–156, 2010.

- [72] C. Liu, Z. Li, L. Bi, K. Li, B. Zhou, C. Xu, J. Huang, and K. Xu, "NOTCH1 signaling promotes chemoresistance via regulating ABCC1 expression in prostate cancer stem cells," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 393, no. 1–2, pp. 265–270, 2014.
- [73] F. Sullivan, D. Villanueva, S. Amenta, J. Alvarez, and N. Hait, "Gregory Jocelyn Jin-Ming," *Clin. Cancer Res.*, vol. 4, no. June, pp. 1393–1403, 1998.
- [74] J. Zhu, E. C. Beattie, Y. Yang, H. J. Wang, J. Y. Seo, and L. X. Yang, "Centrosome impairments and consequent cytokinesis defects are possible mechanisms of taxane drugs," *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 3 B, pp. 1919–1925, 2005.
- [75] I. Lebedeva, R. Rando, J. Ojwang, P. Cossum, and C. A. Stein, "Bcl-xL in prostate cancer cells: Effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 21, pp. 6052–6060, 2000.
- [76] A. J. Raffo, H. Perlman, M. Chen, M. L. Day, J. S. Streitman, and R. Buttyan, "Overexpression of bcl-2 Protects Prostate Cancer Cells from Apoptosis in Vitro and Confers Resistance to Androgen Depletion in Vivo Overexpression of bcl-2 Protects Prostate Cancer Cells from Apoptosis in Vitro and Confers Resistance to Androgen Depletion," pp. 4438–4445, 1995.
- [77] E. S. Antonarakis and A. J. Armstrong, "Evolving standards in the treatment of docetaxel-refractory castration-resistant prostate cancer," *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 14, no. 3, pp. 192–205, 2011.
- [78] P. Sharma, K. Zargar-Shoshtari, and J. M. Pow-Sang, "Biomarkers for prostate cancer: present challenges and future opportunities," *Futur. Sci. OA*, vol. 2, no. 1, p. fso.15.72, 2016.