

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



“Inducción del fenotipo *Cancer Stem Cell* por el factor de transcripción Zeb1 en la línea celular Du145 de cáncer de próstata humana”

Gisella Marisol Pérez Saavedra

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCION**

Director de Tesis: Prof. Dr. Héctor R Contreras

2019



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

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

GISELLA MARISOL PÉREZ SAAVEDRA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Biología de la Reproducción en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Marzo de 2019

Prof. Dr. Héctor R Contreras

Director(a) de Tesis

Departamento de Oncología Básico Clínica

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Alfonso Paredes

Prof. Dra M. Cecilia Jonhson

Prof. Dr. Cristián Acevedo

**Prof. Dra. Margarita Vega
(Presidenta Comisión)**

“Dedicado a nuestros compañeros de 4 patas, quienes me han enseñado a comprender sin necesidad de hablar”

Agradecimientos

En la búsqueda de un nuevo lugar donde adquirir conocimientos y formarme como profesional, encontré un baúl de tesoros, a quienes dedico estas palabras.

Gracias a mi tutora académica la Dra Margarita Vega, por orientarme en mi plan curricular y guiarme cada vez que me vi en una situación complicada, con una comprensión enorme y un gran carisma.

Gracias a mi tutor de tesis, el Dr Hector Contreras, por su confianza y paciencia, me brindo un lugar donde desarrollar la parte más linda de esta experiencia, nunca faltaron las palabras de aliento los consejos sabios y por sobre todo el buen humor. Agradezco al Dr Enrique Castellón igualmente, director de nuestro laboratorio por confiar en mi trabajo y todos los consejos entregados.

Sin duda alguna, esto no hubiera sido posible, sin la colaboración de Graciela Carocca, siempre atenta a nuestras necesidades de materiales, requerimientos académicos y como si fuera poco a nuestros estados emocionales, entregándonos apoyo, cariño y contención.

Todo el trabajo realizado no es solo mío, tras estos resultados están mis compañeros de laboratorio, los cuales con el avanzar del tiempo, pasaron a ser amigos, cada uno de ellos me brindo parte de sus conocimientos, me entrego su sabiduría y cuando las cosas no resultaban alguna palabra de aliento, muchas gracias: María José, Fernanda, Sebastián, Alex, Catherine, Danae, Lorena, Octavio, Daniela, Jorge. Gracias a cada uno de los compañeros con los que compartí en alguna instancia, para mí siempre enriquecedora.

No puedo dejar de agradecer a Andrea, Carolina y Mariana, quienes me acompañaron desde otra área de la facultad, siempre con una palabra de aliento alguna carcajada un sabio consejo y compañía cuando hizo falta.

Gracias a mi familia, por su constante contención y compañía, por entender mis estados de estrés y mi falta de tiempo.

Gracias a cada uno de mis amig@s, quienes me entregaron un espacio para reír, despejarme y distenderme en momentos de tensión, a quienes se mantuvieron cerca, pese mi falta de tiempo.

Gracias a mis colegas y amigos veterinarios, por entender mis horarios diferentes y momentos de colapso, y aun así mantenerme como parte de su equipo.

INDICE DE CONTENIDOS

Resumen.....	8
Abstract.....	10
1.- Introducción.....	11
1.1.- La Próstata.....	11
1.2.- Cáncer de próstata.....	13
1.3.- Cancer StemCell (CSCs).....	16
1.4.- Transición Epitelio Mesénquima.....	19
1.5.- Transición Epitelio Mesénquima y Fenotipo CSCs.....	22
1.6.- Transición Epitelio Mesénquima y Factor de Transcripción ZEB1.....	24
2.- Hipótesis.....	30
3.- Objetivos Generales.....	30
4.- Objetivos Específicos.....	30
5.- Materiales y Métodos.....	31
5.1.- Cultivo Celular.....	31
5.2.- Evaluación de marcadores CSCs.....	32
5.3.- Capacidad de formar prostatoesferas.....	36
5.4.- Evaluación de Clonogenicidad.....	37
5.5.- Análisis Estadístico.....	38
6.- Resultados.....	39
6.1.- Control de silenciamiento.....	39

6.2.- Evaluación de marcadores de CSCs (KLF4, SOX2, CD44 y CD133) en la línea celular de DU145 de CaP con expresión y silenciamiento de ZEB1, mediante qRT-PCR, <i>western-blot</i> e inmunocitoquímica.....	42
6.3.-Caracterización del fenotipo funcional de CSCs en línea celular DU145 de CaP con expresión y silenciamiento de ZEB1, mediante la formación de prostatoesferas.....	52
6.4.- Caracterización del fenotipo funcional de las CSCs, en línea celular DU145 de CaP con expresión y silenciamiento de ZEB1, mediante la capacidad de generar colonias.....	57
7.- Discusión.....	61
8.- Conclusión.....	69
9.-Bibliografía.....	71

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más frecuentemente diagnosticado a nivel mundial en varones, mostrando resistencia a las terapias convencionales y recurrencia, lo que se ha asociado con altas tasas de metástasis. Se han identificado a las *cancer stem cell* (CSC), dado su capacidad de autorrenovación y diferenciación a otros tipos celulares como las responsables de estos fenómenos, sin embargo, esto aún no han sido del todo caracterizado. Por otro lado, se ha establecido una relación entre algunas características fenotípicas de las CSCs, con uno de los factores de transcripción canónicos de la transición epitelio mesénquima (EMT), ZEB1 en el CaP.

La hipótesis de esta tesis es: el factor de transcripción ZEB1 induce el fenotipo de CSC en la línea celular DU145 de CaP. Para comprobar esta hipótesis se evaluó la expresión de marcadores canónicos del fenotipo CSC (KLF4, SOX2, CD44 y CD133), a través de RT-qPCR, *western-blot* e inmunocitoquímica, en la línea celular DU145 de CaP, con expresión y silenciamiento del factor de transcripción ZEB1. Además, se caracterizó el fenotipo funcional de las CSCs en cuanto a su capacidad de clonogenicidad y formación de prostatoesferas.

Entre los resultados encontrados, se observó en células silenciadas para el gen ZEB1, una disminución de la expresión de marcadores del fenotipo CSCs CD44 y CD133 y también una disminución en la expresión del gen de pluripotencia Sox2, en comparación a células no silenciadas. Por otro lado, en cuanto a la capacidad de autorrenovación, se observó una menor capacidad de formar prostatoesferas y una menor capacidad de generar colonias, en

células silenciadas para ZEB1.

Las características de fenotipo CSCs están asociadas a la expresión del factor transcripcional ZEB1 en la línea celular DU145. ZEB1 podría estar asociado a malignidad y resistencia del CaP, por lo que potencialmente sería un factor clave para erradicar las CSCs y con ello mejorar el pronóstico de esta enfermedad.

ABSTRACT

Prostate Cancer (PCa) is the second most diagnosed cancer in men worldwide. Advanced PCa shows resistance to conventional therapies and high recurrence, which is associated with high rates of metastasis. Cancer stem cells (CSCs) has been suggested as the main responsible for these phenomena, given their capacity for self-renewal and differentiation to other cellular types. Recently, it has been observed a correlation between ZEB1 expression, which is one of the canonical transcription factors of the epithelial-mesenchymal transition, and some phenotypic characteristics of the CSCs. However, this has not been fully characterized.

In our hypothesis, the transcription factor ZEB1 induces the CSCs phenotype in PCa cell line. To test this hypothesis, CSCs canonical markers were evaluated (KLF4, SOX2, CD44 y CD133), through RT-qPCR, western-blot and immunocytochemistry, in a PCa cell line (DU145), with expression and silencing of ZEB1. In addition, the functional phenotype of CSCs was characterized by their capacity for clonogenicity and prostatospheres formation. In this work we found that, in cells silenced for ZEB1, the expression of CSC phenotype markers was decreased. We observed a decrease in the expression of CD44 and CD133, as well as in the pluripotency gene Sox2, in comparison to non-silenced cells. On the other hand, regarding the capacity of self-renewal, in cells silenced for ZEB1, we observed a lower ability to form prostatospheres and a lower capacity to generate colonies.

In conclusion, CSCs phenotype is associated with the expression of the transcription factor ZEB1 in DU145 cell lines. Because ZEB1 is associated with malignancy and therapy resistance, and also with the CSC phenotype in PCa, ZEB1 could be a key factor to eradicate CSCs and therefore improve the prognosis of this disease.

1 INTRODUCCIÓN

1.1- La próstata

La próstata es una glándula exocrina perteneciente al sistema reproductor masculino. Su función principal es producir aproximadamente el 30% del líquido seminal, favoreciendo la motilidad y nutrición de los espermatozoides ¹.

En la próstata anatómicamente se pueden distinguir 4 zonas: periférica o externa, central o transicional, periuretral y anterior.²⁻³. Histológicamente la próstata presenta acinos y ductos de tamaños variables alineados en una doble capa de células epiteliales donde se encuentra la capa luminal, que aporta los nutrientes y la capa de células basales que actúan como reserva para el recambio de las células secretoras. Además, una pequeña proporción de células neuroendocrinas ². Las células lumbinales son las más diferenciadas en el epitelio prostático, expresando altos niveles del receptor de andrógeno (AR) y citoqueratinas de bajo peso molecular como CK8 y CK18 ³, secretan antígeno prostático específico (PSA) y también fosfatasa ácida prostática (PAP) es por lo anterior que las células lumbinales son las células principales de la próstata y dependen de andrógenos a diferencia de las células basales las cuales no expresan AR, siendo independientes a la acción de andrógenos y bastante indiferenciadas ⁴ expresando a su vez citoqueratinas de alto peso molecular como CK5 y CK14³. Las células neuroendocrinas están distribuidas en la glándula prostática en todas las áreas anatómicas y constituyen menos del 1% del epitelio prostático ⁵⁻⁶ (Figura 1). Adicionalmente a ellas hay un pequeño grupo de células intermedias que expresan ambos marcadores tanto de células basales como de células lumbinales, las llamadas “células amplificadoras transitorias”, las que podrían provenir de células basales que se encaminan hacia la diferenciación de células lumbinales. Un pequeño número de células entre la población de células basales, han sido reconocidas como células troncales (*Stem Cell*, SC)

de próstata tanto en ratones como en humanos⁶.

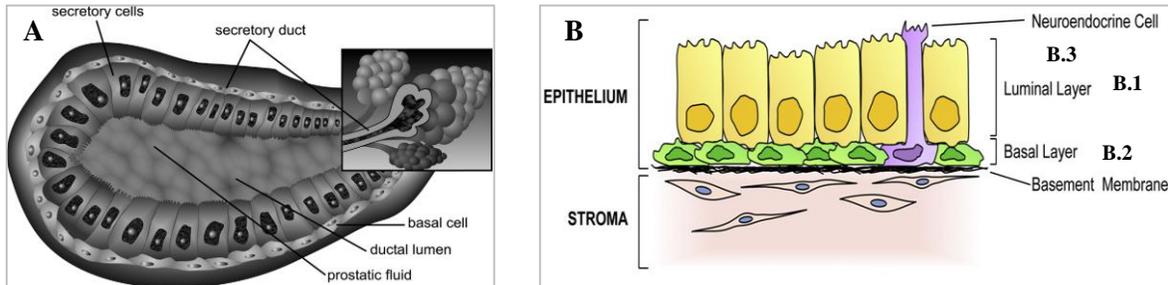


Figura 1: Arquitectura de la próstata humana: A. Organización de la estructura de la glándula prostática. B. Epitelio prostático: **B.1**Células cilíndricas luminales o secretoras, diferenciadas. **B.2** Células cúbicas basales, indiferenciadas. **B.3**Células neuroendocrinas.

A: Modificado de Collins A.T &Mitland M.J. 2006. *European of journal of Cancer*

B: Modificado de: Oldridge E.E; et al. 2012. *Molecular and Cellula Endocrinology*.

Las SC son células inmaduras caracterizadas por una alta capacidad de autorrenovación y potencial para diferenciarse hacia células especializadas según el tejido al que pertenezcan⁷. La división de las SC puede ser asimétrica, en donde se generará una célula hija con idénticas características a la célula madre y otra que será algo más diferenciada; o bien, una división simétrica generando dos células hijas idénticas a la célula madre. De esta manera la población de SC en el órgano se mantiene más o menos constante⁸.

Las principales patologías que pueden afectar a la glándula prostática son, prostatitis (infección a la próstata), hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer prostático (CaP).

1.2- Cáncer de Próstata

El CaP se presenta generalmente en hombres sobre los 50 años, es reconocido actualmente a nivel mundial como un problema de salud pública tanto por su importancia como causa de muerte como también por el aumento en su incidencia ⁴⁴. Este cáncer ha sido descrito en el 70% de las autopsias realizadas en hombres sobre los 80 años apreciándose una incidencia histológica mayor a la incidencia clínica ⁴. El CaP es el segundo tipo de cáncer más diagnosticado en hombres a nivel mundial y el sexto mortalidad por cáncer en varones ⁴⁴. En Chile la mortalidad ha aumentado progresivamente llegando a 23 por 100.000 hombres en 2015 constituyendo la segunda causa de muerte por cáncer en los varones, reportándose 2045 muertes al año ⁹. La mortalidad está asociada principalmente a la edad del diagnóstico, grado de diferenciación del cáncer ⁴, metástasis y resistencia a terapia hormonal, siendo las altas tasas de metástasis y altos índices de recurrencia los mayores desafíos en el CaP ¹⁰, sin embargo en las últimas décadas, se han incrementado los programas de monitoreo lo que ha favorecido el diagnóstico temprano y con ello las terapias con fines curativos, siendo la edad media de detección de cáncer de próstata alrededor de los 70 años ⁹. El 95% de los CaP son adenocarcinomas y los factores de riesgo asociados a éste son la edad, antecedentes familiares, así como también factores ambientales ⁹. Esta patología se desarrolla desde una neoplasia intraepitelial a un carcinoma localmente invasivo, luego cáncer metastizado, para terminar como un cáncer refractario a la terapia hormonal, conocido como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) ⁴⁷. En estados tempranos de la enfermedad, el CaP puede ser tratado exitosamente mediante cirugía y radioterapia, sin embargo pacientes en estados avanzados de la enfermedad en tratamiento hormonal, radioterapia o quimioterapia recidiva en un alto porcentaje,

generando un fenotipo invasivo llegando a metástasis en hueso, generalmente incurable ⁹⁻⁷⁰. De acuerdo a lo anteriormente señalado hay dos tipos de células que podrían originar el CaP, específicamente a partir de células basales o células luminales, lo cual hasta ahora se ha mantenido en constante debate. Las células del CaP usualmente presentan un fenotipo de célula luminal o epitelial pero no terminan en una diferenciación de célula luminal propiamente tal, estas células cancerosas tienen ilimitada capacidad de reproducirse asemejándose más en este punto a las células prostáticas basales ¹¹. Además, son las células con características de troncalidad, las que sobreviven a la deprivación de andrógenos, dado que no presentan expresión de este receptor y poseen potencial de células iniciadoras de tumor, ambas características también presentes en células basales de la glándula ⁴⁵⁻⁷⁰ (Figura 2).

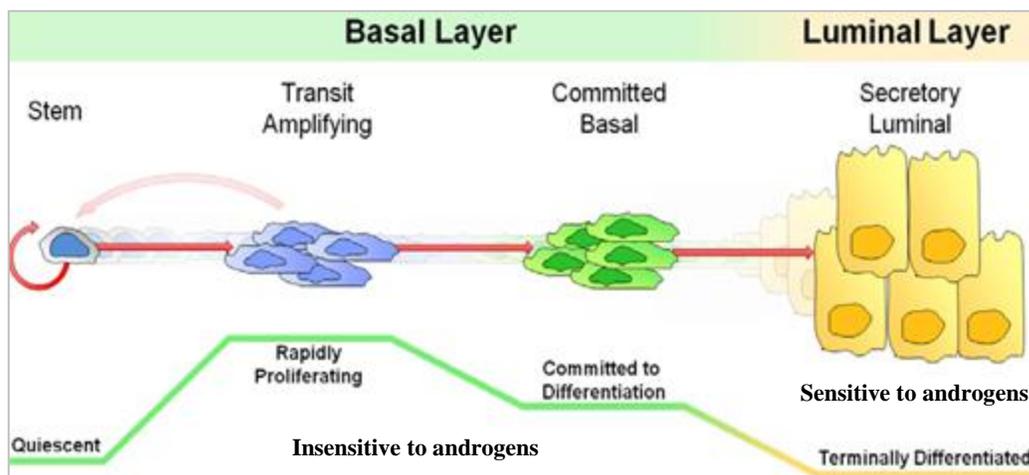


Figura 2: Jerarquía Celular en el epitelio prostático. Células troncales, mayormente quiescentes, las cuales generan células de amplificación transiente, proliferando rápidamente, manteniendo la capacidad multipotente, con compromiso hacia la diferenciación, formando células basales, las que llegan a un estado de diferenciación final, generando células secretoras o luminales.

Modificado de: Oldridge E.E, *et al.* 2012. *Molecular and Cellular Endocrinology*.

En el CaP se han identificado pequeñas sub-poblaciones de células malignas con propiedades de SC. Estas células reciben el nombre de *Cancer Stem Cells*, (CSCs) ¹¹. Se describe que las CSCs en próstata podrían derivar desde células troncales normales con cierto grado de transformación maligna perfectamente desde la porción basal de la glándula ⁷⁰, así como también, por reprogramación genética desde células diferenciadas, que modifican su perfil de expresión de genes adquiriendo un nuevo fenotipo, lo que se conoce como el fenómeno de transición epitelio mesénquima (EMT) ¹⁶⁻¹⁷⁻⁴⁵ (Figura 3).

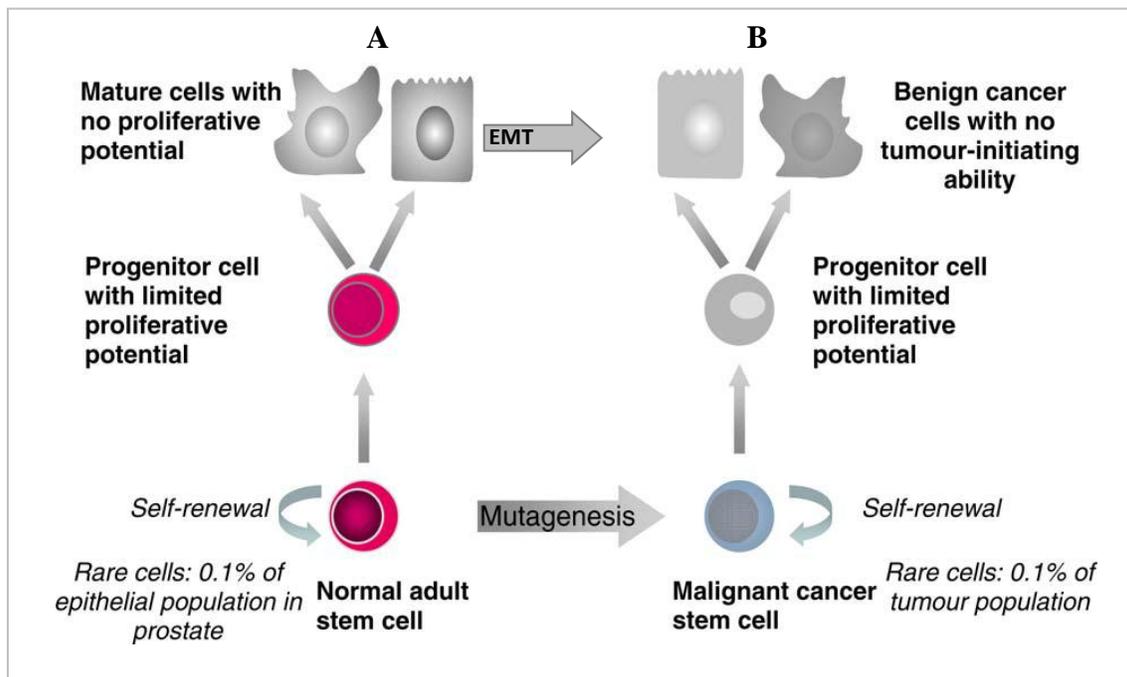


Figura 3: Modelo de renovación celular a partir de SC: A. Origen de células diferenciadas en próstata, a partir SC. B. Origen de células cancerosas en próstata, a partir de SC o de célula diferenciada.

Modificado de Collins A.T & Mitland M.J. 2006. *European of journal of Cancer*.

EMT: Transición epitelio mesénquima.

1.3- Cancer Stem Cells

De acuerdo a la Sociedad Americana del Cáncer una CSC es aquella que dentro del tumor posee capacidad de autoperpetuarse a través de la autorrenovación y de generar linajes celulares heterogéneos ¹²⁻¹³, así como también, pueden diferenciarse generando células de distintos tipos de tejido ¹³. En asociación a lo anterior se describe que SC localizadas en el compartimiento basal de la próstata así como CSCs poseen funciones similares, tales como autorrenovación y su capacidad de pluripotencia. La autorrenovación es crucial para la función de una célula troncal, dado que es requerida para mantenerse por largo tiempo en un animal ⁷⁰. Además, ambos tipos celulares expresan moléculas claves que normalmente regulan la supervivencia y la autorrenovación como p63, Bcl-2; aunque las CSCs no necesariamente provienen desde las SC ⁷⁰. Otras características que son compartidas por ambos tipos celulares (SC y CSCs) corresponden a una vida larga, ciclos celulares de corta duración y estados indiferenciados, lo que podría generar una enorme cantidad de células progenitoras indiferenciadas ⁴.

Estas CSCs poseen la capacidad de extender la población de células tumorales en el organismo, y más aún, convertirse en otros tipos de células cancerosas constituyendo parte importante del desarrollo y la expansión del tumor ⁸. La proporción de CSCs en un tumor es variable dependiendo del tipo de tumor. Sin embargo, se ha descrito que la proporción de ellas podrían tener un significado importante al momento de predecir el pronóstico de la enfermedad ¹⁴.

Estudios en cáncer de cabeza y cuello han descrito además a las CSCs como células iniciadoras de tumor ya que tienen la capacidad de generar un tumor nuevo en órganos distantes en un ambiente celular apropiado y también contribuyen con las características de malignidad tumoral como son la radioresistencia, progresión y recurrencia del cáncer luego

de la terapia convencional ¹⁸.

Se describe que las CSCs exhiben una activación preferencial de la maquinaria de reparación del DNA dañado, lo que podría contribuir con el fenómeno de quimioresistencia asociado a estas células ⁷⁰.

Como características propias de las CSCs además de las mencionadas con anterioridad, se puede señalar la elevada expresión de bombas proteicas en su membrana plasmática, que permiten aumentar la movilización de drogas hacia el ambiente extracelular, un perfil de expresión de microRNA distinto al de una célula normal, así como también, la supervivencia de estas células en un ambiente de hipoxia y acidosis ⁷⁰.

Una de las principales propiedades usadas para aislar CSCs es la capacidad que tienen de formar esferas en condiciones de cultivo no adherente ¹⁹, para lo cual, la combinación de múltiples marcadores moleculares celulares ha facilitado además la posibilidad de aislar CSCs prostáticas. Poblaciones celulares CD44⁺, CD133⁺ y $\alpha 2\beta 1$ ⁺, poseen una elevada capacidad de autorrenovación y además podrían regenerar poblaciones celulares fenotípicamente mezcladas, diferenciadas e indiferenciadas ⁷¹.

Varios autores han caracterizado el perfil fenotípico de una CSCs de próstata lo que ha permitido diferenciar las CSCs de próstata de otras células tumorales. Se han evaluado marcadores de superficie celular, los más importantes son **CD24, CD44, CD133, CD166 y $\alpha 2\beta 1$** ²⁰⁻²¹⁻²². La expresión de los marcadores de superficie mencionados con anterioridad, brindan un fenotipo de pluripotencialidad, el cual se caracteriza por la habilidad de formar esferoides, prostatoesferas en el caso del CaP ²³ lo que ha sido asociado directa e indirectamente con la expresión de ciertos factores de transcripción conocidos como genes de pluripotencia, entre ellos podemos mencionar: **OCT-2, NANOG, SOX2, KLF4** ⁴.

SOX2, se expresa durante el desarrollo embrionario del tejido prostático y en menor proporción en células basales de tejido prostático adulto, lo que no ocurre en células lumbinales de la glándula ²⁴. Este es un oncogén y regulador fundamental de la sobrevivencia y pluripotencialidad de células troncales, promoviendo un fenotipo tumoral más agresivo en las CSCs ²⁵⁻²⁶.

KLF4, es un factor de transcripción codificado por el gen Klf4, presenta funciones esenciales en la proliferación, diferenciación y reprogramación de células troncales ²⁷. Este gen puede inducir o reprimir la expresión de ciertos genes según el contexto celular, fisiológicamente se describe que puede actuar como un gen supresor de tumores o como un oncogén ²⁸. Ha sido descrito específicamente en células de hiperplasia prostática benigna, así como también en células de CaP, estableciéndose una correlación entre la expresión de este con malignidad celular ⁷³.

CD44 es una glicoproteína de transmembrana, que funciona como receptor de superficie, en la membrana plasmática, involucrado en la interacción célula-célula, adhesión, migración celular y proliferación, fenómenos elementales involucrados en la metástasis tumoral. Ha sido descrita en diferentes tipos de tumores ¹⁵. Se describe además que células CD44⁺, tienen la capacidad de iniciar la formación de prostatoesferas en series de pasajes, y además pueden ser inyectadas en un animal y dar origen al crecimiento de un tumor, sugiriendo con esto una alta habilidad de autorrenovación ⁷².

CD133 llamada también prominina-1, ha sido descrita en células troncales embrionarias, así como también en células madres hematopoyéticas, su función es a nivel de la membrana plasmática, organizándola y manteniendo una adecuada distribución lipídica, siendo un reconocido marcador de células pluripotentes ¹⁵. Células de próstata CD133⁺, muestran características de células troncales tales como la habilidad de generar esferas en cultivos en

condiciones no adherentes y el desarrollo de tumores en ratones inmunocomprometidos ⁷⁰.

Terapias actuales basadas en quimioterapia o radioterapia fallan al eliminar las CSCs prostáticas, siendo estas células, la mayor complicación para lograr la mejoría de la enfermedad. Es necesario por tanto desarrollar terapias dirigidas contra las CSCs prostáticas y la progenie de estas células que presenten un crecimiento rápido, incrementando así la eficiencia de la terapia y previniendo la recurrencia del tumor ⁷⁰ (Figura 4).

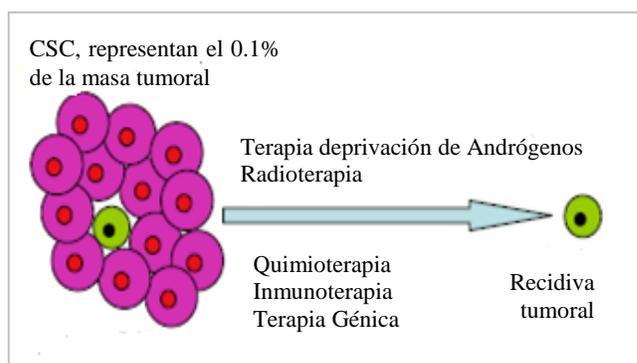


Figura 4: Heterogeneidad celular en un tumor: Mecanismos de erradicación de las células tumorales, si las CSCs no son eliminadas, habrá recidiva del tumor. Modificado de Collins A.T & Mitland M.J. 2006. *European of journal of Cancer*

1.4- Transición epitelio mesénquima (EMT)

El cáncer es descrito como un multiproceso, en donde las células adquieren características de malignidad que aseguran su sobrevivencia, proliferación y por lo tanto crecimiento del tumor ⁴⁷. Células cancerosas en un tumor sólido, pueden despegarse desde la masa principal e invadir el estroma adyacente, entrar a circulación y eventualmente colonizar otros órganos distantes. En la mayoría de los casos, células cancerosas invasivas pierden su polaridad celular y las moléculas de adhesión intercelular adquiriendo un fenotipo móvil, como parte del fenómeno conocido como EMT ⁴⁷.

Los mecanismos moleculares y genéticos asociadas a las altas metástasis en el CaP no

están del todo dilucidadas, pero se describen modificaciones genómicas y fenotípicas en las células malignas como una de las causas importantes ²⁹.

La EMT es un programa que convierte células epiteliales adherentes en células migratorias individuales (Figura 5), generando un fenotipo mesenquimal maligno ³⁰. Un marcador clásico de EMT es la molécula de adhesión E-cadherina, la cual pierde su función durante la EMT ⁴⁷. Controles epigenéticos, transcripcionales y a nivel de la traducción, pueden modular su expresión. Algunos de los factores de transcripción que regulan directamente la expresión de E-cadherina mediante su unión al promotor de esta, son la familia de ZEB, TWIST y SNAIL. Estos factores de transcripción, fueron identificados como reguladores del desarrollo embrionario y la diferenciación celular y han sido reconocidos con un rol en la progresión del cáncer ⁴⁷⁻⁴⁹⁻⁵⁰. Una disminuida expresión de E-cadherina es solo el paso crítico inicial para el fenómeno de EMT, no solo por la disrupción de las uniones adherentes entre células, sino que además, la pérdida de E-cadherina refuerza la inducción de EMT, mediante el estímulo de la expresión de ZEB1 y TWIST, en un sistema de regulación cruzada de genes (*feed-forward loop*), no solo reprimiendo E-cadherina, sino que también, reprimiendo otros genes epiteliales y activando una gran cantidad de genes mesenquimales ⁴⁷.

Entre otros genes epiteliales involucrados en EMT podemos mencionar la disminución de proteínas involucradas en uniones adherentes y uniones comunicantes entre células como desmosomas, citoqueratinas etc. ⁴⁷⁻⁴⁹⁻⁵⁰. En paralelo hay una inducción de la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina, reorganización de proteínas del citoesqueleto, expresando mayormente vimentina y síntesis de componentes de matriz extracelular como metaloproteinasas ⁴⁹⁻⁵⁰. La expresión de estos marcadores de EMT por el tumor primario, se correlaciona con una exacerbada capacidad invasiva y un pronóstico

clínico poco favorable.

Muchas señales que desencadenan EMT durante la embriogénesis, son además activadas en el proceso del cáncer, dentro de estas señales podemos mencionar estímulos endocrinos tales como TGF β -FGF-EGF-IGF-HGF-PDGF-estrógenos, y también paracrinos mediante citoquinas pro-inflamatorias, activación de algunas vías de señalización como la de las proteínas WNT y la proteína SHH e incluso un ambiente de hipoxia, estarían involucradas en la EMT durante la progresión del cáncer ⁵⁰. Estos factores de crecimiento, agentes pro-inflamatorios, en conjunto con un importante número de microRNA, convergen en la inducción de factores de transcripción vinculados con EMT, los cuales mencionamos con anterioridad. Algunas de las señales que gatillan EMT, reprimen o activan la expresión de los microRNA, los cuales también participan en la invasión y metástasis del tumor, por modulación directa de la expresión de estos factores de transcripción y /o por regulación de la expresión de E-cadherina, así como también, regulando la expresión de GTP asas o receptores de matriz extracelular ⁵¹.

Células cancerosas del propio tumor que han enfrentado el fenómeno de EMT, secretan citoquinas y proteasas que promueven la angiogénesis, remodelan la matriz extracelular y activan células no neoplásicas del estroma. De esta manera células del estroma liberan factores que refuerzan la EMT en células cancerosas promueven la supervivencia, crecimiento e invasividad, creando una influencia recíproca entre el tumor y su microambiente ⁵²⁻⁵³ induciendo y manteniendo el estado mesenquimal, para lo cual se requiere cooperación, entre muchas rutas de señalización, siendo esto posible, a través de un *loop* autocrino de regulación ⁵⁴.

1.5- EMT y fenotipo CSCs.

EMT no solo le brinda habilidades migratorias a las células, sino que también participa en la adquisición del fenotipo troncal en estas células cancerosas dado que muchas de las señales que controlan la homeostasis normal de las células troncales, son inductores de EMT y pareciera que además contribuyen a la generación y mantención de las CSCs, regulando la expresión de marcadores celulares asociados con troncalidad y pluripotencia, vinculándose por lo tanto con células iniciadoras de tumor, programas que inhiben la apoptosis y senescencia, favoreciendo la quimioresistencia de estas, así como también promoviendo la angiogénesis del tumor ⁴⁷. En el artículo desarrollado por Brabletz y colaboradores ⁵⁵ se propone un modelo de progresión tumoral, en donde solo las células cancerosas de la interfaz del tumor bajo el proceso de EMT, podrían adquirir características mesenquimales y de troncalidad, presentando capacidad migratoria y de autorrenovación ⁵⁶.

En cáncer de pulmón se ha descrito que la EMT se desarrolla dado un aumento en la expresión de genes de troncalidad presentes también en células embrionarias como OCT4 y NANOG, correlacionándose a su vez con altas tasas de metástasis ¹⁸. Por otra parte, se ha descrito también a la EMT asociada a factores de transcripción de pluripotencialidad en células de cáncer de mama ¹⁸, dentro de ellos se ha mencionado a ZEB1 y SOX2. Como en la embriogénesis, la EMT ocurre durante el cáncer como un proceso reversible.

En los sitios de metástasis, cambios epigenéticos y la ausencia de señales inductoras de EMT en el ambiente, llevan a una disminuida expresión de factores de transcripción de EMT, llevando a las células cancerosas a recuperar las características epiteliales del tumor primario, fenómeno conocido como Transición mesénquima epitelio (MET), sin embargo, estas células mantendrían la capacidad de pluripotencia y autorrenovación, generando un tumor secundario en el nicho colonizado ⁵⁷⁻⁵⁸ (Figura 6) .

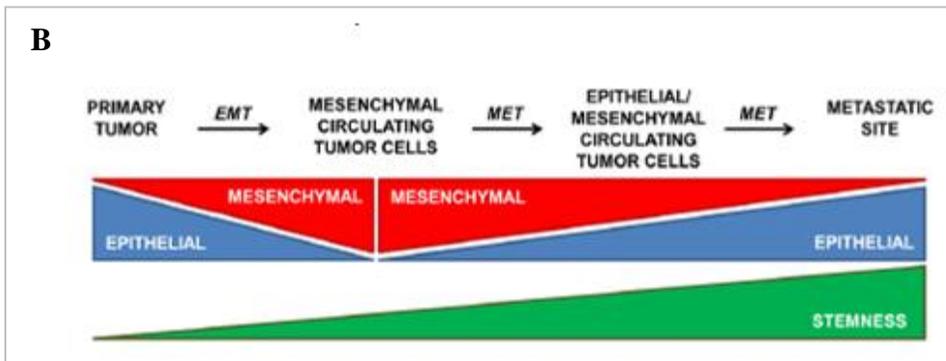
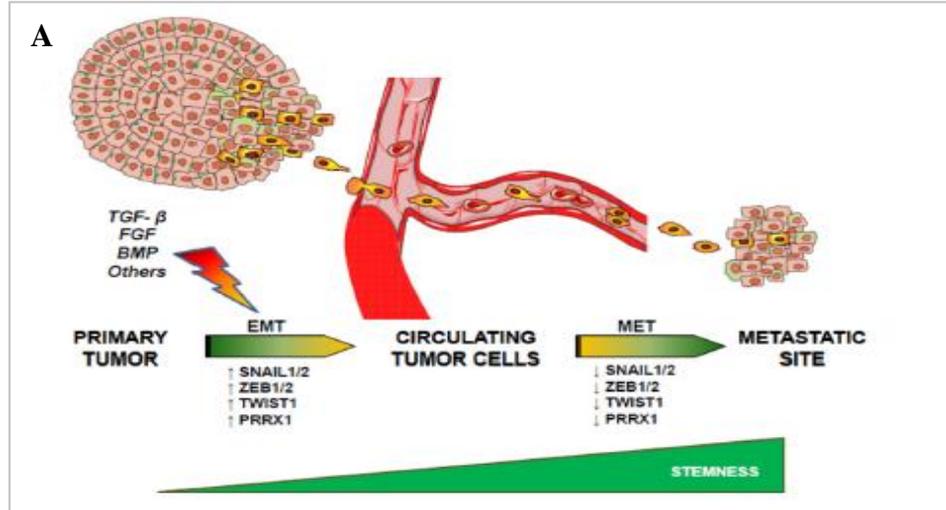


Figura 6: Esquema de transición epitelio mesénquima (EMT) y transición mesénquima epitelio (MET):A. Agentes inductores y Genes involucrados en la reprogramación de las células tumorales, las cuales adquieren capacidad migratoria y lo que les permite colonizar tejidos. **B.** Diagrama del orden secuencial de los fenómenos involucrados para un proceso metastásico eficiente.

Modificado: Fabregat, I, *et al.* 2016. *Journal of Clinical Medicine*

1.6- EMT y Factor de transcripción ZEB1

La familia de los factores de transcripción ZEB está constituida por dos miembros: ZEB1 y ZEB2. Estos son descritos como proteínas en dedos de zinc, los cuales presentan múltiples e independientes dominios que interactúan con otros factores de transcripción, involucrados en la regulación de un gran número de procesos fisiológicos y patológicos, interviniendo en la migración celular durante el desarrollo embrionario. En relación al cáncer, se han visto involucrados en el proceso de desarrollo tumoral, invasividad, metástasis y resistencia a quimioterapia ³¹. La progresión del tumor está relacionada con la capacidad de ZEB1 de reprimir E-cadherina, favoreciendo el fenotipo de SC incrementando la resistencia a la apoptosis. Además, las células con expresión de ZEB1, son dotadas de una mayor movilidad y capacidad de autorrenovación ³². La sobreexpresión de ZEB1 induce la EMT, no solo reprimiendo E-cadherina sino también, P-cadherina y R-cadherina asociados con la polaridad celular, lo mismo ocurre con algunos componentes de uniones ocluyentes, comunicantes y desmosomas. También activaría genes mesenquimales tales como vimentina y N-cadherina.

ZEB1 además se asocia con la modulación de genes en la membrana basal, cuya disrupción es un factor clave en la invasividad de células cancerosas, permitiéndoles penetrar hacia el estroma celular y eventualmente migrar vía torrente sanguíneo ³¹ (Figura 7).

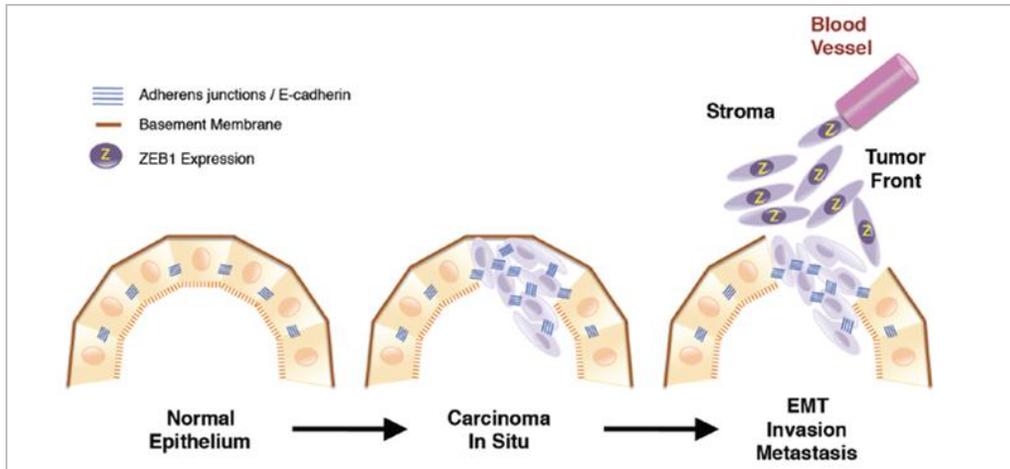


Figura 7: Representación esquemática de la evolución de un carcinoma in situ hacia un carcinoma invasivo. Invasión de células cancerosas hacia el estroma celular. Expresión de ZEB1 por células epiteliales, lo que no es común en estado de normalidad, sin embargo, se expresa durante la EMT en células migratorias y CSCs. ZEB1 además regula la expresión de componentes de la membrana basal, cuya ruptura, es requerida para que las células cancerosas invadan el estroma.

Sánchez-Tillo E, *et al.* 2011. *American Journal of Cancer Research*

En trabajos realizados en nuestro laboratorio por Orellana-Serradel *et al.*, 2018, se determinó los niveles de mRNA de ZEB1 en cuatro líneas celulares distintas de cáncer de próstata (PC3, LNCaP, DU145 y 22Rv1) y una línea epitelial no tumoral de próstata (RWPE-1) que fue utilizada como control, determinándose que la línea celular Du145, es la que presenta los mayores niveles de ZEB1 en relación al control epitelial ⁶⁹, siendo una adecuada línea celular para silenciar el gen (Figura 8).

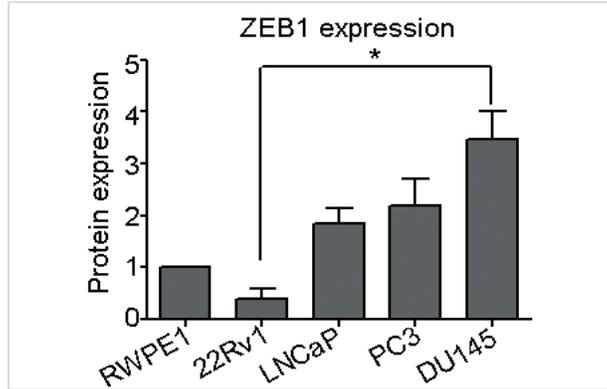


Figura 8: Expresión ZEB1 en líneas celulares de CaP. Análisis cuantitativo de la expresión diferencial de proteína de ZEB1. (Orellana-Serradel, *et al.* 2018. *Asian Journal of Andrology*)

Los represores transcripcionales de la familia SNAIL y SLUG, al igual que otros factores como los de la familia de TWIST ocupan una posición central en el desarrollo de la EMT, inhibiendo la expresión de E-cadherina mediante la inducción de ZEB1, en condiciones fisiológicas y patológicas, además de estar involucrados en la resistencia a la apoptosis y por lo tanto promoviendo la supervivencia de tumores ³³. El trabajo realizado por Sanchez-Tillo *et al*, 2012 ⁶⁶ señala, que la familia de ZEB se encontraría regulada directamente por las moléculas que interactúan con la EMT, SNAIL y TWIST específicamente ⁶⁶ (Figura 9A). SNAIL incrementa ZEB1, a través de mecanismos pre y post transcripcionales. SNAIL1 además aumenta la estabilidad de TWIST, el cual gatilla la activación del promotor de ZEB1 ⁶⁷. Adicionalmente SNAIL reprime a MicroRNA-200, lo que favorece la expresión de ZEB1, estabiliza la proteína de ZEB1 como tal y favorece la activación del promotor de ZEB ⁶⁷ (Figura 9B).

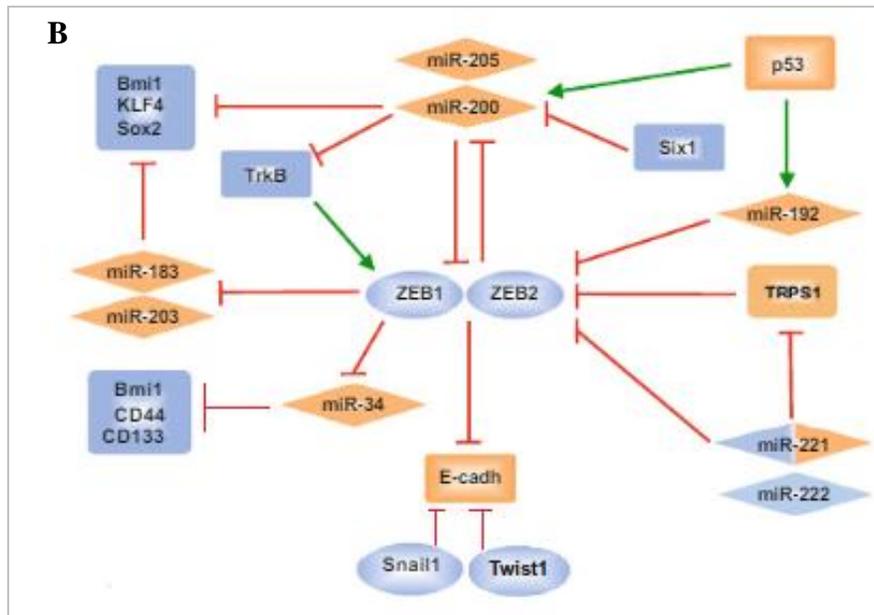
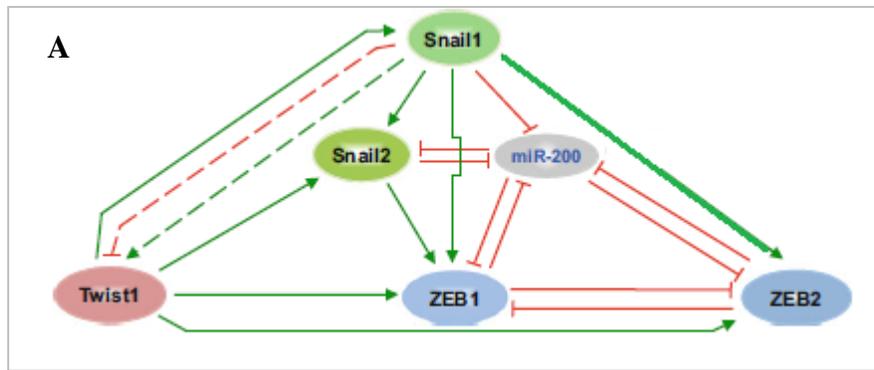


Figura 9: Diagrama de moléculas involucradas en EMT: **A** Regulación cruzada entre factores de transcripción involucrados en EMT, líneas discontinuas, expresan relación distinta según el tipo de tumor. **B** Relación entre microRNA y factores de transcripción involucrados en la regulación de EMT. **EMT:** Transición epitelio mesénquima.

Modificado de: Sanchez-Tillo. E, *et al.* 2012. *Cellular and molecular LifeScience.*

Se describe una relación cruzada entre moléculas de señalización, las cuales resultan en la expresión o silenciamiento de los factores de transcripción mencionados. La expresión y redundancia entre los factores de transcripción asociados a la EMT, sugieren que su especificidad podría ocurrir, tanto en un nivel espacial así como también de acuerdo al momento de la EMT, en donde SNAIL es necesario para iniciar el proceso y subsecuentemente TWIST y ZEB lo consolidarían ⁴⁷.

En la mayoría de los tipos celulares el factor de crecimiento TGF- β induce la expresión de ZEB1 durante el desarrollo, proliferación y diferenciación celular. ZEB1 y ZEB2 son inducidos también por HIF-1 α en condiciones de hipoxia e igualmente a través de citoquinas inflamatorias y activación mediada por ligando como FGF-IGF-1, PDGRF ⁵⁹. A su vez también, ZEB1 puede ser activado frecuentemente mediante moléculas intermediaras en rutas de señalización como por ejemplo: Ras, ERK2, Fra1, NF κ B, Wnt, Notch y JAK/STAT3 entre otras ⁶⁰⁻⁶¹. Sumado a lo anterior, la represión de la expresión de ZEB1 es también controlada a nivel de su mRNA y post-traduccionalmente, mediante distintos tipos de MicroRNAs ³⁴.

Estudios más recientes también han demostrado que ZEB juega un rol importante en la formación de nuevos vasos sanguíneos, la vasculogénesis es un mecanismo que permite suplir la nutrición del tumor. Se describe que las células del tumor que son capaces de inducir vasculogénesis frecuentemente presentan un fenotipo de CSCs, expresando entre otras moléculas CD133 asociado a la expresión de ZEB1 ⁶⁸.

Dado que ZEB1 es un marcador del pronóstico de la enfermedad, sobrevida del paciente y respuesta a la terapia al igual que la presencia de CSCs, en conjunto con la información presentada, el propósito del presente proyecto fue evaluar si el factor de transcripción ZEB1 induce el fenotipo *cancer stem cell* en una línea celular de CaP. Con esta información,

tendremos mejores herramientas para poder diagnosticar y tratar de forma más efectiva el CaP apuntando a erradicar las CSCs y con ello mejorar el pronóstico de esta enfermedad.

2.- HIPÓTESIS

El factor de transcripción ZEB1 induce el fenotipo CSCs en una línea celular de CaP

3.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el silenciamiento de ZEB1, induce una menor expresión de marcadores del fenotipo CSC, en la línea celular DU145 de CaP.

4.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Evaluar los marcadores de CSCs (KLF4, SOX2, CD44 y CD133), en la línea celular DU145 de CaP con expresión y silenciamiento de ZEB1, mediante RT-qPCR, *western-blot* e inmunocitoquímica.

2.- Caracterizar el fenotipo funcional de las CSCs, en la línea celular DU145 de CaP con expresión y silenciamiento de ZEB1, mediante la formación de prostatoesferas y su capacidad clonogénica.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1-Cultivo Celular

Para dar curso a los objetivos descritos, se utilizó la línea celular derivada de metástasis de CaP en cerebro, DU145 (ATCC, Cat: N° HTB-81) con y sin silenciamiento para ZEB1, las cuales fueron cultivadas en condiciones adherentes, en trabajos previos en nuestro laboratorio, con medio DMEM/F-12 (*Gibco, Invitrogen*) suplementado con suero bovino fetal (FBS) (*ScienCell*) al 10%, al que se le adicionó además penicilina-streptomina: (*Corning Inc*), en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C.

- a) *Silenciamiento*: En trabajos previos de nuestro laboratorio se realizó silenciamiento estable de ZEB1 en las células DU145 de la siguiente manera: Fueron sembradas 10x10⁴ células/pocillo, en placas de 6 pocillos, 24 horas antes de la transducción. Posteriormente para la transducción se utilizó el vector (pLenti-U6-shRNA(h ZEB1)-Rsv (RFP-Puro) para el silenciamiento de ZEB1 y se utilizó como control, el mismo vector, pero con un shRNA contra una secuencia al azar, Lenti-U6-shRNA(neg-control)-Rvs(RFP-Puro). Las transducciones se realizaron en presencia de 6 ug/ul de polibreno y los vectores fueron obtenidos de Gen Target Inc. (USA, San Diego, CA). Como resultado se obtuvieron células con ZEB1 silenciado (DU145 SH) y células control (DU145 SCR).

Evaluación del silenciamiento del gen Zeb1: Como parte del desarrollo de esta tesis, se realizó selección celular utilizando 2.0 µg de puomicina (*Sigma Aldrich*) durante 3 días. Para comprobar la eficacia de la transducción en las células silenciadas, se evaluaron niveles de expresión de mRNA de ZEB1 por RT-qPCR (partidores utilizados en Tabla 1) y niveles proteicos de la misma molécula, mediante *western blot*.

5.2- Evaluación de marcadores de CSCs

-RT-qPCR

Se extrajo y purificó RNA total con Trizol (*Invitrogen*) y por medio de espectrofotometría a 260/280 nm fue determinada la concentración y pureza del RNA extraído. Luego a partir del RNA, se obtuvo cDNA, utilizando el kit de síntesis de cDNA Affinity Script QPCR (*Agilent Technologies*). El PCR en tiempo real (qPCR) se realizó con el kit Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (*Agilent Technologies*) y para la obtención de los resultados, se usó un termociclador en tiempo real (modelo Mx3000P, *Stratagene*) aplicando el programa incorporado en el equipo (MxPro v2.0), que además permite el análisis y cuantificación de los datos obtenidos. Se evaluó la expresión de los marcadores de pluripotencia CD133 y CD44, los genes de troncalidad SOX2 y KLF4, usando los primers descritos en la Tabla 1. Para normalizar los valores obtenidos se utilizó el gen de expresión endógena; pumilio.

Tabla 1: Secuencias de partidores para cada marcador

Marcador	Secuencias
ZEB1	L: GCC TGG TGA TGC TGA AAG AG R: TTC ACA GTG GAG AGA AGC CA
CD44	L: GAC AAG TTT TGG TGG CAG GT R: CAC GTG GAA TAC ACC TGC CA
CD133	L: ACT CCC ATA AAG CTG GAC CC R: TCA ATT TTG GAT TCA TAT TT
SOX2	L: AAC CCC AAG ATG CAC AAC TC R: GTC TAG CCT CGT CGA TGA AC
KLF4	L: AGA GTT CCC ATC TCA AGG CA R: CCC CGT GTG TTT ACG GTA GT
PUMILIO	L: CGG TCG TCC TGA GGA TAA AA R: CGT ACG TGA GGC GTA AGT AA

-Western-Blot: Extractos de proteínas celulares (60 µg) fueron sometidas a electroforesis, durante 90 minutos a 120 volts y electrotransferencia, por 90 minutos a 350 amperes, hacia una membrana hidrofóbica Hybond-P (*Amersham, USA*). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con TBS-TWEEN (5%) e incubadas con anticuerpo primario para SOX2 (*Abcam, Cat: ab 92494*) (1:1000), KLF4 (*Abcam, Cat: ab 215036*) (1:1000), CD44 (*Abcam, Cat: ab 51037*) (1:5000), CD133 (*Thermo fisher, Cat: Pas-38014*) (1:500) y ZEB1 (*Thermo fisher, Cat: Pa5-28221*) (1:1000) durante toda la noche a 4°C (Tabla 2). La incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabanito anti-ratón (*Jackson Immunoresearch, Cat: 115-035-003*) (1:10000), se realizó durante 60 minutos, a temperatura ambiente y como control de carga se utilizó actina (*Merck, Cat: MAB 1501*) (1:5000) (Tabla 3). Las membranas fueron lavadas y las diferentes proteínas detectadas mediante quimioluminiscencia, en un revelador automático Fusion FX (*Vilber Lourmat, France*), utilizando un Kit para *western-blot* (*Amersham, USA*). La cuantificación densitométrica de las bandas se realizó utilizando el programa computacional IMAGE-J (*USA*).

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados para western blot. Evaluación de marcadores de troncalidad y genes de pluripotencia

Marcador	Catálogo	Dilución	Especie
ZEB1	Pa5-28221	1:1000	Rabbit
CD133	Pas-38014	1:500	Rabbit
CD44	ab 51037	1:5000	Rabbit
SOX2	ab 92494	1:1000	Rabbit
KLF4	ab 215036	1:1000	Rabbit
Actina	MAB 1501	1:5000	Mouse

Tabla 3: Anticuerpo secundarios utilizados para *western blot*

Anticuerpo	Catálogo	Dilución
Jackson Immunoresearch: anti-mouse	115-035-003	1:10.000
Jackson Immunoresearch: anti-rabbit	115-035-003	1:10.000

-Inmunocitoquímica (inmunofluorescencia): Expresión de marcadores de pluripotencia CD44 y CD133 fueron evaluados mediante inmunocitoquímica en células DU145 control y silenciadas para ZEB1. Las células fueron cultivadas en portaobjetos, alcanzando un 60% de confluencia, posteriormente fijadas mediante Buffer fosfato, sacarosa y paraformaldehído, durante 30 minutos, para luego ser lavadas con PBS-Glicina 0.1% por tres veces. Triton 0,1% fue usado para la permeabilización celular. Luego, las células fueron bloqueadas utilizando PBS-Glicina-BSA, durante 30 min. Los anticuerpos primarios

específicos para cada marcador de pluripotencia mencionados en la sección anterior fueron diluidos en PBS-Glicina-BSA, e incubados durante toda la noche (16 hrs) a 4°C en cámara húmeda, (diluciones mostradas en Tabla 4). Posteriormente, se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos Alexa Fluor 594, durante una hora, a temperatura ambiente (dilución de acuerdo a Tabla 5). Finalizada la incubación, los cubreobjetos fueron lavados con PBS 1X/ glicina 0,15% e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente con DAPI (Cat. 112002, 32 *CellBiolabs*) para contrastar los núcleos celulares. Los cubreobjetos fueron lavados y depositados sobre portaobjetos con medio de montaje (Cat. S3023, *Dako*), previo al análisis en el microscopio de fluorescencia DM-2500-Leika.

Tabla 4: Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia

Marcador	Catálogo	Dilución	Anticuerpo secundario
ZEB1	Pa5-28221	1:100	rabbit
CD133	Pas-38014	1:300	rabbit
CD44	ab 51037	1:300	rabbit
SOX2	ab 92494	1:100	rabbit
KLF4	ab 215036	1:100	rabbit

Tabla 5: Anticuerpo secundario utilizado para inmunofluorescencia

Anticuerpo	Catálogo	Dilución
anti-rabbit	Alexa fluor 594: A21207	1:200

5.3- Capacidad de formar prostatoesferas:

Las células DU145 SH y DU145 SCR (con silenciamiento y expresión para ZEB1) fueron mantenidas en condiciones adherentes hasta lograr confluencia del 80%, en condiciones anteriormente descritas. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, disgregadas con acutasa (*eBioscience*) durante 7 minutos, para detener el efecto de la acutasa se adiciona medio de cultivo suplementado con SFB 10%. Las células recolectadas, fueron centrifugadas a 300 g por 5 minutos. Posteriormente, fueron disgregadas mecánicamente con una micropipeta y recolectadas a través de un *cellstrainer* (BD *Falcon*) de 40µm, para excluir los grupos de células no disgregados en células individuales. Las células obtenidas fueron contadas y sembradas en una proporción de 100.000 células en pocillo de 6 cm, recubiertos por agarosa al 1%, en medio de cultivo adecuado para la inducción del crecimiento celular en estructuras esferoidales en condiciones no adherentes (Medio DMEM/F-12 (*Gibco, Invitrogen*) sin FBS y suplementos correspondientes. Este medio de cultivo, permite la formación de esferoides prostáticos (protastoesferas), enriquecidos con células del fenotipo CSCs, los que se mantuvieron en crecimiento durante 7 días, los cuales fueron fotografiados en un microscopio estereoscópico *Olympus SZ60* conectado a una cámara digital *OlympusDIG CAM ZoomC-4040*. Posteriormente, las prostatoesferas formadas, fueron analizadas según largo, ancho y perímetro (Figura 10) para las distintas condiciones celulares mediante el software computacional *Microscope ZEISS Axio Vision Image System 2012*, de acuerdo a lo descrito por Asikgoz. E; *et al.* 2015 ⁸⁰.

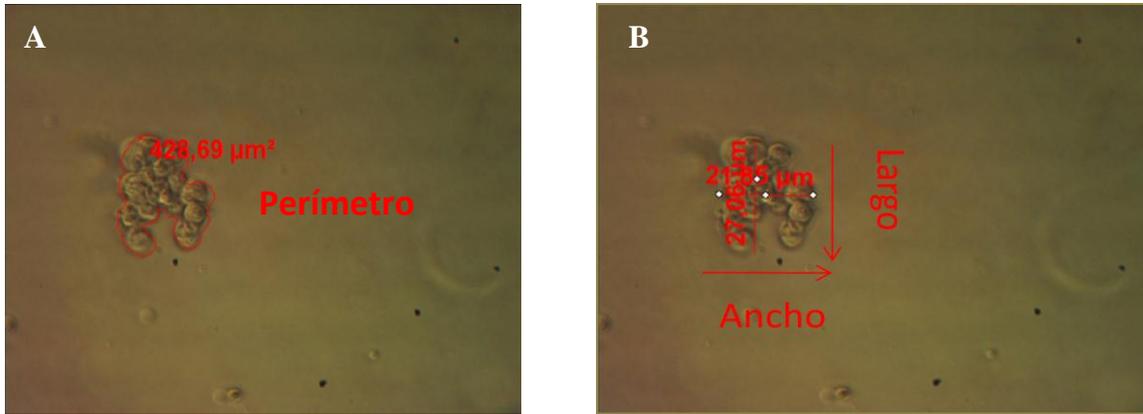


Figura 10: Prostatoesfera día 2 de cultivo. Ejemplificación método de evaluación esferoide: **A** Perímetro. **B:** Largo y Ancho. Unidad de medida μm . Aumento 400X

Asikgoz, E; *et al.* 2015. *Plos One*. Software computacional *Microscope ZEISS Axio Vision Image System 2012*

-Formación de colonias

Para evaluar características asociadas a malignidad celular, se procede con el ensayo de formación de colonias. Células provenientes de cultivo en condiciones adherentes DU145 SH ZEB1 y DU145 SCR ZEB1, fueron disgregadas y sembradas, en concentración de 2000 células por placa, en placas de 6 cm de diámetro. Este cultivo fue mantenido durante 15 días en una atmosfera de CO_2 al 5% a 37°C . Cada experimento fue realizado en triplicado, para cada condición celular. Luego las colonias obtenidas, fueron teñidas y fijadas con glutaraldehído al 6% mezclado con cristal violeta en una proporción 1:1. Posteriormente las placas fueron lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente. Las colonias obtenidas fueron contadas y analizadas mediante el programa computacional IMAGE-J (USA), obteniendo número de colonias por condición. Luego, se procede a caracterizar el tipo de colonia formada según condición celular. Los resultados fueron

expresados como porcentaje de tipo de clon formado, proveniente desde cada tipo de cultivo celular (DU145 SH ZEB1 y DU145 SCR ZEB1), finalmente se procedió a contar el número de células por cada colonia formada, para cada condición celular utilizando el software *IMAGE-J (USA)*.

La clasificación de las colonias obtenidas, de acuerdo a su morfología, fue en holoclones, meroclones y paraclones de acuerdo a lo descrito por Barrandon Y & Green H, 1987 ⁸¹ y Knaack *et al*, 2018 ⁸², un holoclon corresponde a colonias de pequeñas células densamente compacta y de bordes regulares, un paraclon, está constituido de células grandes o alargadas, que crecen de forma dispersa, con bordes irregulares, y un mereclon presenta una morfología intermedia, entre un paraclon y un holoclon. La morfología de las colonias fue evaluada de acuerdo al método descrito por Li H *et al*, 2008 ⁴³, fotografiadas en un microscopio estereoscópico *Olympus SZ60* conectado a una cámara digital *Olympus DIG CAM ZoomC-4040*.

5.5- Análisis Estadístico:

Todos los experimentos fueron realizados 3 veces en iguales condiciones, cada uno de ellos en triplicado. La evaluación estadística fue realizada utilizando análisis no paramétrico Test de Mann-Whitney, normalizando respecto a DU145 SCR. $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los resultados se expresaron de acuerdo a la media + la desviación estándar.

6.- RESULTADOS

6.1- Control de Silenciamiento

Luego de la elección de la línea celular disponible (Figura 11), de acuerdo a los trabajos previos de Orellana-Serradel *et al*, 2018 (Figura 8) y para realizar los objetivos planteados, se efectuó en primera instancia, una evaluación del silenciamiento para el gen *Zeb1*, midiendo niveles de expresión de mRNA por RT-qPCR y niveles proteicos determinados por *western-blot* para el gen mencionado, visualizando en ambos casos una disminución de aproximadamente un 50% de molécula en las células silenciadas (Figura 12). Mediante inmunofluorescencia, se evaluó la expresión de ZEB1, el cual presenta distribución preferentemente nuclear, en células control (SCR) (Figura 13A) y células silenciadas para ZEB1 (SH) (Figura 13B), visualizando una tendencia de mayor inmunodetección de ZEB1 en las células SCR en relación a las células SH. Por lo que se decide trabajar con este nivel de silenciamiento.

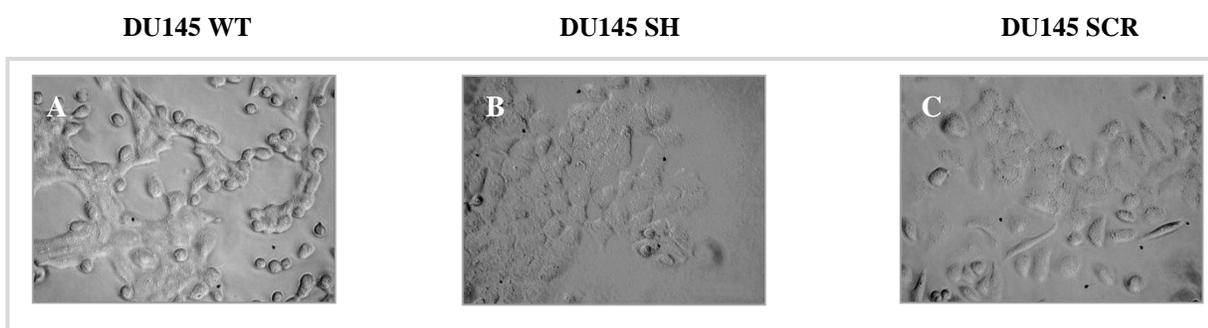


Figura 11: Línea celular DU145 de CaP: A. Fenotipo celular DU145 *willtype*. **B.** Fenotipo celular DU145 SH. **C.** Fenotipo celular DU145 SCR. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

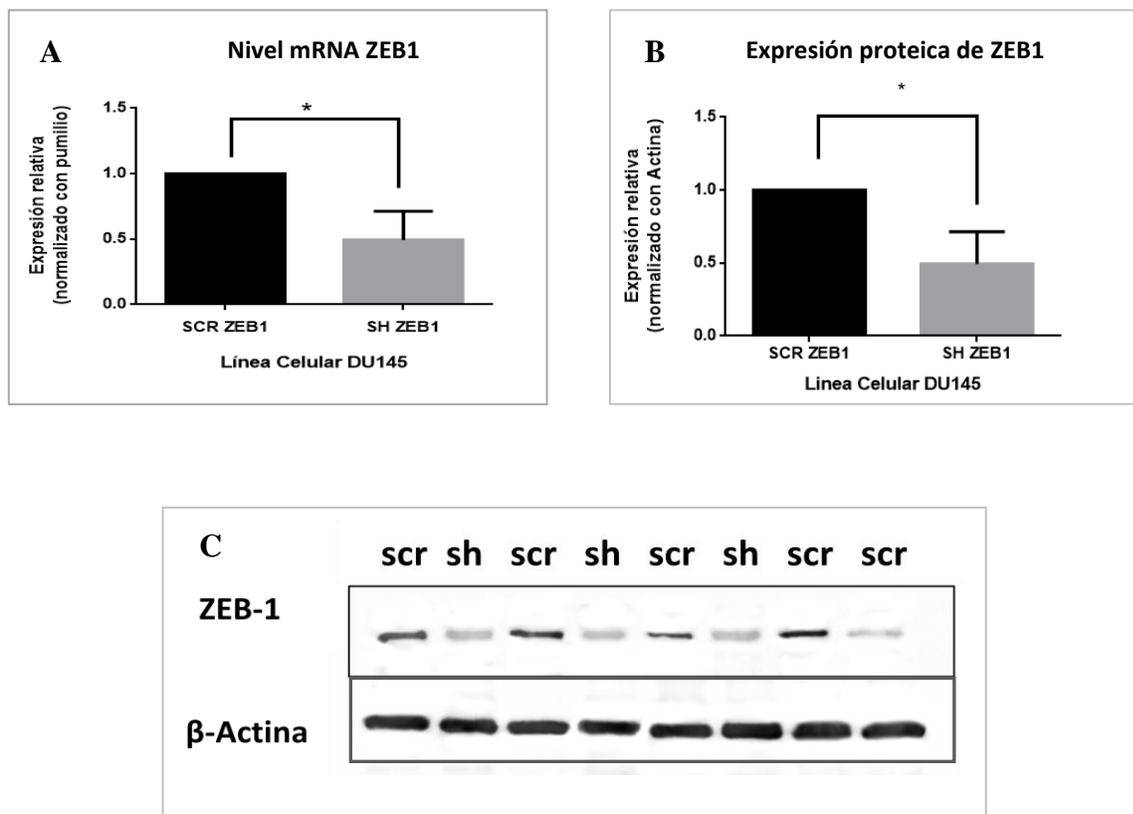


Figura 12: Evaluación del silenciamiento de ZEB1 en línea celular DU145 SCR y DU145 SH.
A. Análisis por RT-qPCR de la expresión de ZEB1. n=4. C_i Prom. DU145 SCR: 25.2; C_i Prom. DU145 SH: 27.3 **B.** Expresión proteica. **C.** análisis cuantitativo de la expresión proteica de ZEB1. n=4 **B** Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test de Mann Whithney, p<0,05. Barra indica desviación estándar. **Prom:** promedio. **SCR:** Expresión ZEB1. **SH** Silenciamiento ZEB1

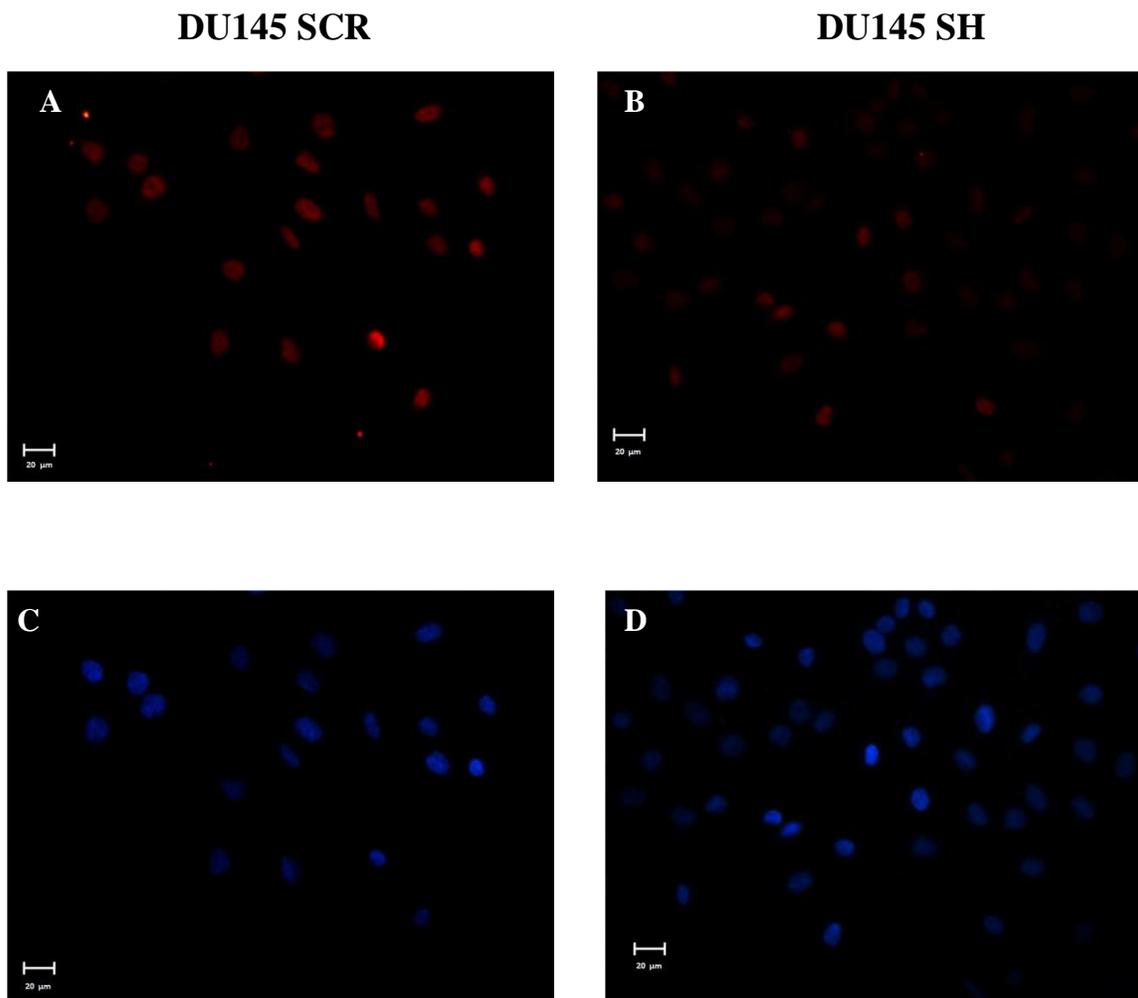


Figura 13: Inmunofluorescencia para ZEB1 en Línea celular DU145 con expresión (SCR) y silenciamiento (SH) para ZEB1. A DU145 SCR (400x). **B** DU145 SH (400x). **C** y **D** Tinción de Contraste nuclear Dapi. Barra 20 µm. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

6.2- Evaluación de marcadores de CSCs (KLF4, SOX2, CD44 y CD133), en la línea celular DU145 de CaP con expresión y silenciamiento de ZEB1, mediante RT-qPCR, *western-blot* e inmunocitoquímica

Se evaluaron los marcadores de superficie celular CD44 y CD133 en la línea celular DU145 con silenciamiento para ZEB1 (SH) y su correspondiente control de silenciamiento (SCR), mediante RT-qPCR , observándose una disminución de aproximadamente un 50% del mRNA tanto para CD133 (Figura 14A) como para CD44 (Figura 16A) en las células silenciadas para el gen. En cuanto a la expresión proteica, medida mediante *western blot*, se observa una disminución de un 30% aproximadamente para CD133 (Figura 14B) y de un 80 % aproximadamente para CD44 (Figura 16B), en células silenciadas en relación a las no silenciadas.

Se realizó además, la evaluación de CD133 y CD44 a través de inmunofluorescencia, determinándose para ambas moléculas un patrón de distribución mayormente periférico en las células, observándose una tendencia a disminuir la inmunodetección en células silenciadas, en relación al control de silenciamiento (Figura 15 y 17). Estos resultados nos permiten describir que el silenciamiento de ZEB1, disminuye la expresión de las proteínas de membrana CD133 y CD44, vinculando la presencia de ZEB1, con la presencia de estos marcadores de superficie celular.

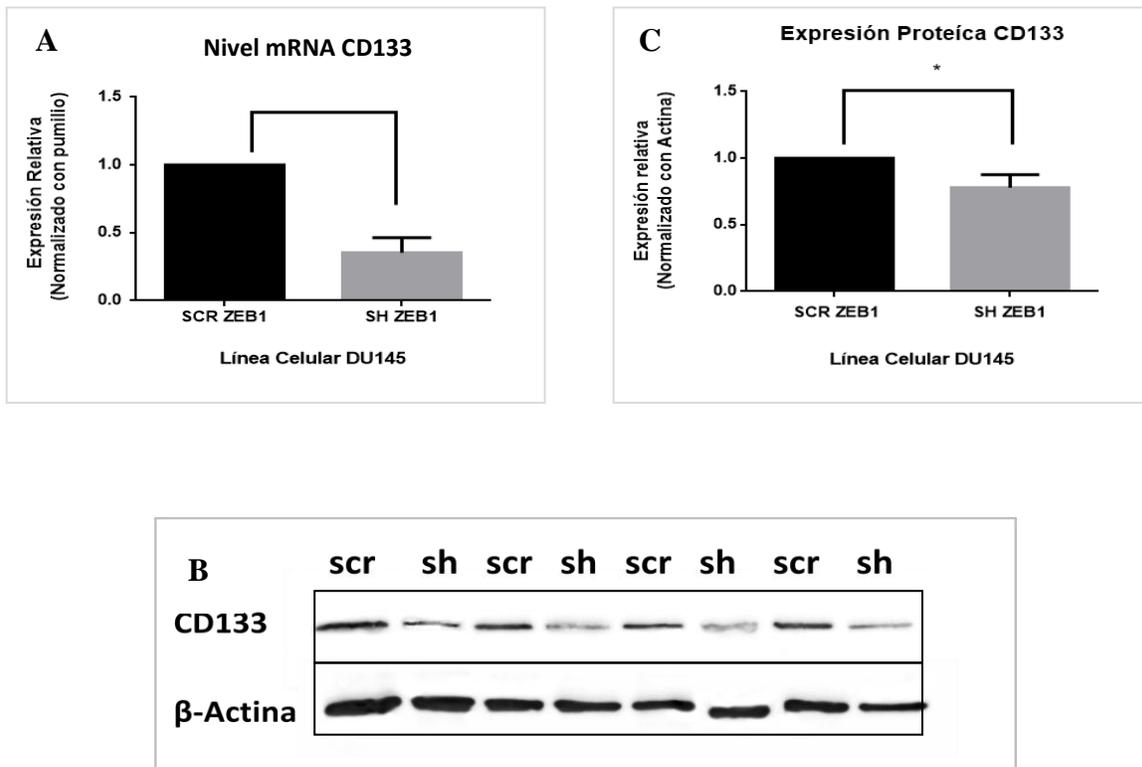
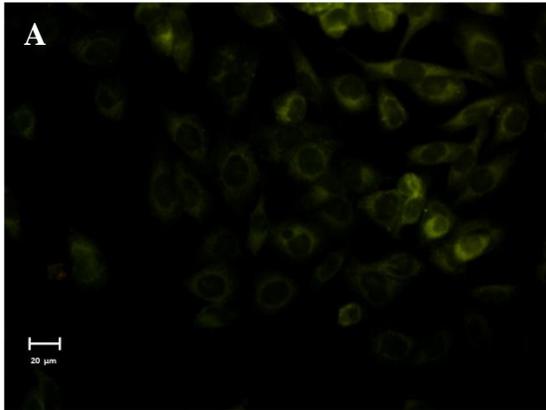


Figura 14: Expresión de CD133 en línea celular DU145 SCR y DU145 SH. **A.** RT-qPCR para CD133 C_t Prom: DU145 SCR: 29.26; C_t Prom: DU145SH: 32.63 (n=4). **B** Expresión proteica de CD133 por *western blot* **C.** Análisis cuantitativo de la expresión de proteína (n=4). Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Barra indica desviación estándar. **Prom:** promedio. **SCR:** Expresión ZEB1. **SH:** Silenciamiento ZEB1

DU145 SCR



DU145 SH

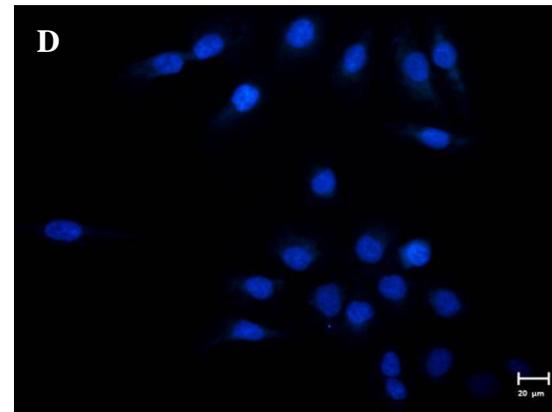
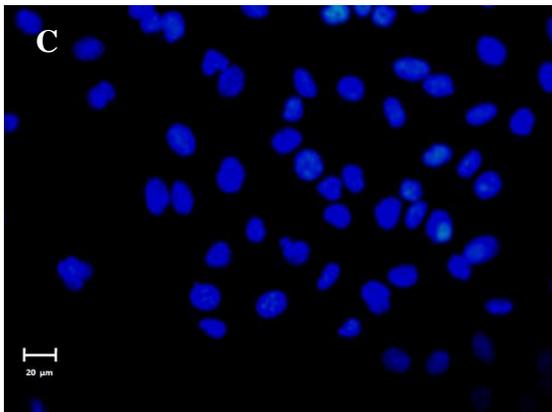
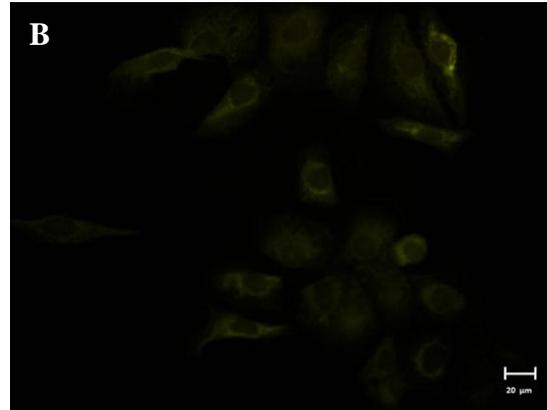


Figura 15: Inmunofluorescencia para CD133 en Línea celular DU145 con expresión (SCR) y silenciamiento (SH) para ZEB1 **A** DU145 SCR (400x). **B** DU145 SH (400x). **C** y **D** Tinción de contraste nuclear (Dapi). Barra 20 μm . Imagen representativa de tres ensayos independientes

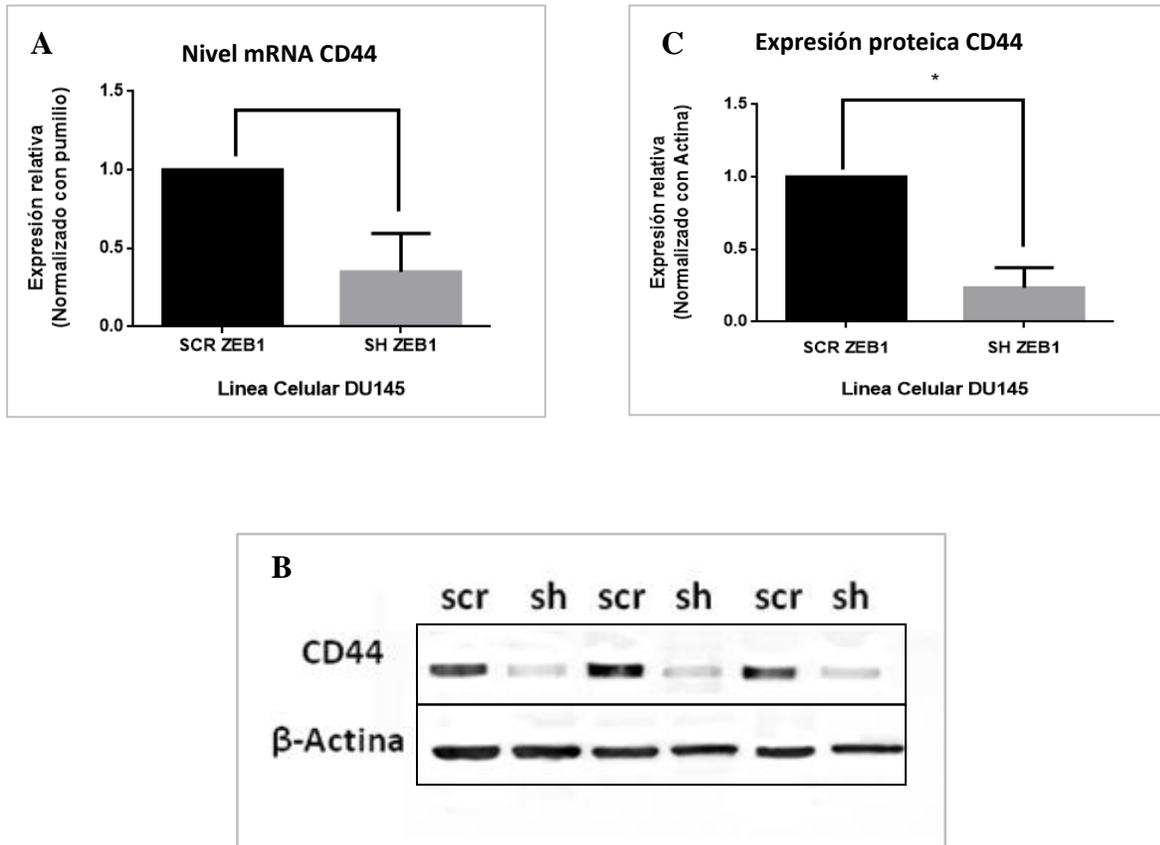


Figura 16: Expresión de CD44 en línea celular DU145 SCR y DU145 SH. A. RT-qPCR para CD44 (n=3). C_t Prom DU145 SCR: 16.5; C_t Prom DU145 SH: 18.2 B Expresión proteica de CD44 por *western blot*. C análisis cuantitativo de la expresión de proteína (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Barra indica desviación estándar. **Prom:** promedio. **SCR:** Expresión ZEB1. **SH** Silenciamiento ZEB1

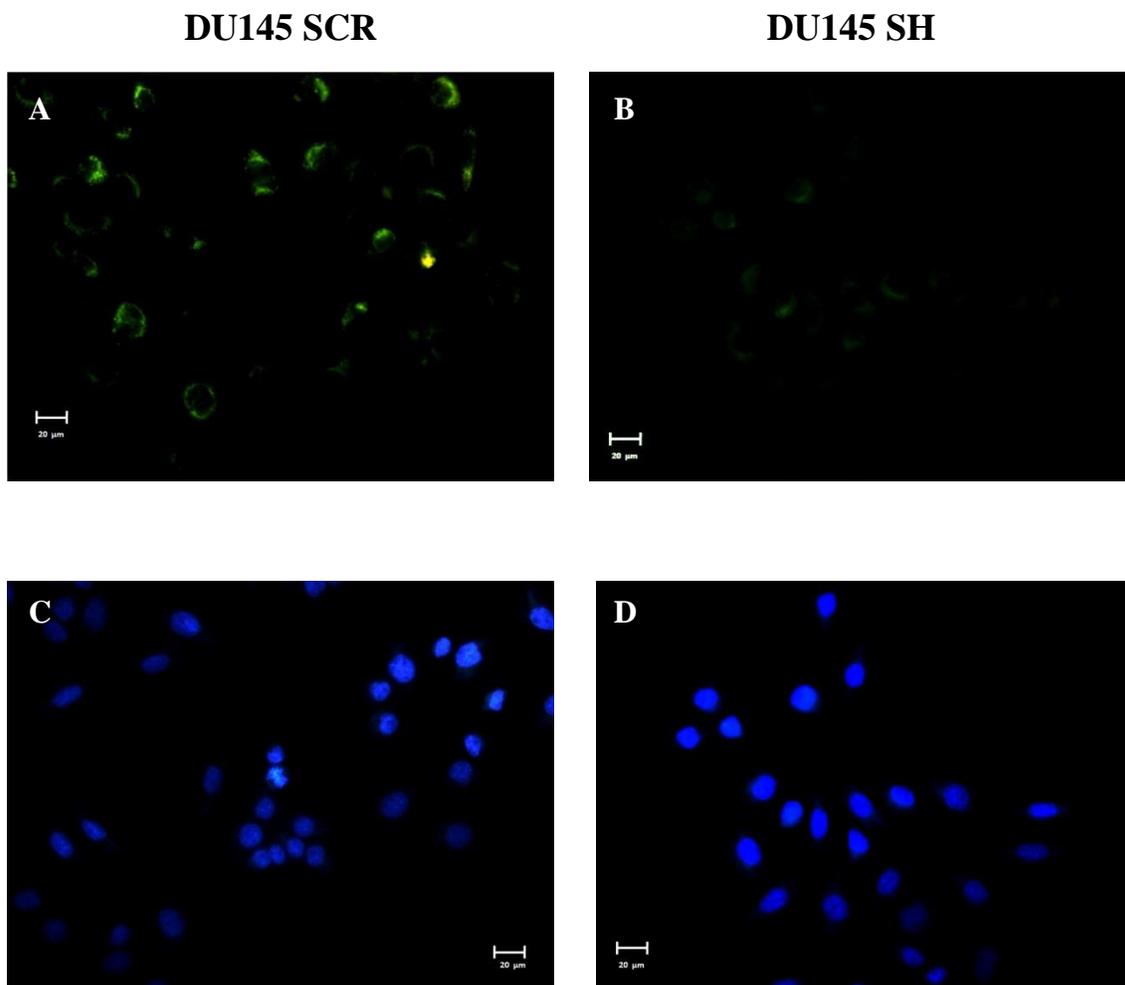


Figura 17: Inmunofluorescencia para CD44 en Línea celular DU145 con expresión (SCR) y silenciamiento (SH) para ZEB1 A DU145 SCR (400x). B DU145 SH (400x). C y D Tinción de contraste nuclear (Dapi). n=3. Barra 20 µm. Imagen representativa de tres ensayos independientes

En cuanto a la evaluación de genes de pluripotencia en SOX2 se observa una disminución de un 50% aproximadamente en la expresión de su mRNA (Figura 18A) en células SH en relación a su control SCR. En cuanto a la evaluación proteica, analizada mediante *western blot*, refleja una disminución de un 30% aproximadamente, en las células silenciadas en relación al control de silenciamiento (Figura 18B). Mediante inmunofluorescencia se observa, una disposición preferentemente nuclear de la molécula, manifestándose de igual manera en el citoplasma de la célula, confirmándose la misma tendencia de expresión descrita anteriormente, tanto en células SH y SCR (Figura 19A y 19B). A partir de estos resultados podemos decir, que el silenciamiento de ZEB1, induce una disminución de la expresión de SOX2, tanto de su mRNA como de la expresión de la proteína.

El factor KLF4, presenta un patrón de expresión distinto a los marcadores anteriormente mencionados, dado que la expresión de su mRNA, analizado mediante RT-qPCR, manifiesta una tendencia a elevar su valores entre las células silenciadas en relación al control de silenciamiento (Figura 20A), sin ser esta una diferencia estadísticamente significativa. Mediante la técnica de *western blot*, se visualiza la misma disposición (Figura 20B). Se realiza también inmunofluorescencia para KLF4, detectándose tanto a nivel nuclear, como citoplasmático en las células, con una distribución homogénea tanto en células SH como SCR (Figura 21A y 21B), por lo que el silenciamiento de ZEB1, no regula la expresión de KLF4, o bien podría regularlo de forma indirecta, contribuyendo a disminuir su expresión.

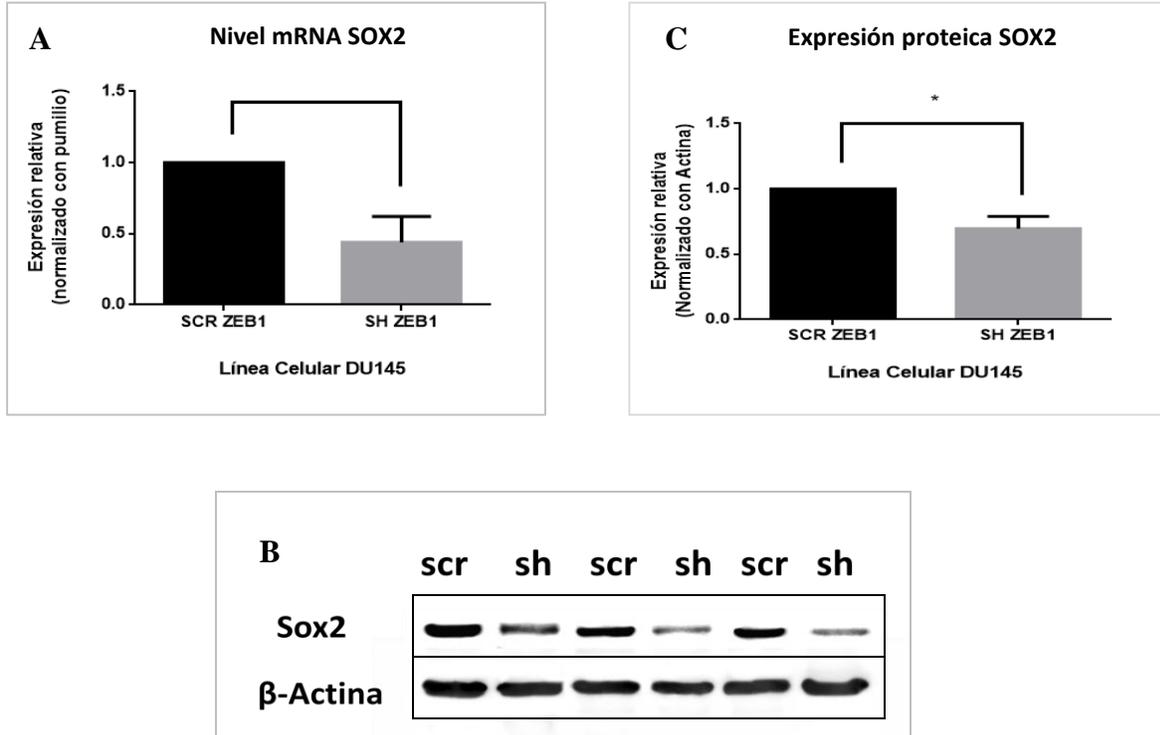
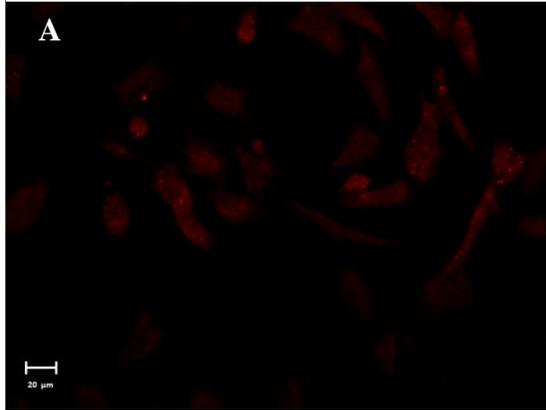


Figura 18: Expresión de SOX2 en línea celular DU145 SCR y DU145 SH. **A.** RT-qPCR para SOX2 C_t Prom DU145 SCR: 21.6; C_t Prom DU145 SH: 23.4 (n=3). **B** Expresión proteica de SOX2 por *western blot*. **C** análisis cuantitativo de la expresión de proteína (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test de Mann Whithney, $p < 0,05$. Barra representa desviación estándar. **Prom:** promedio. **SCR:** Expresión ZEB1. **SH** Silenciamiento ZEB1

DU145 SCR



DU145 SH

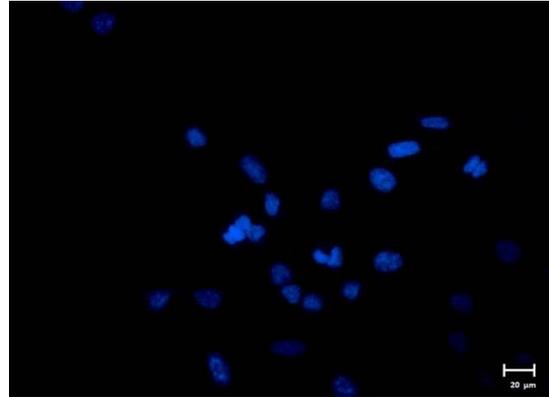
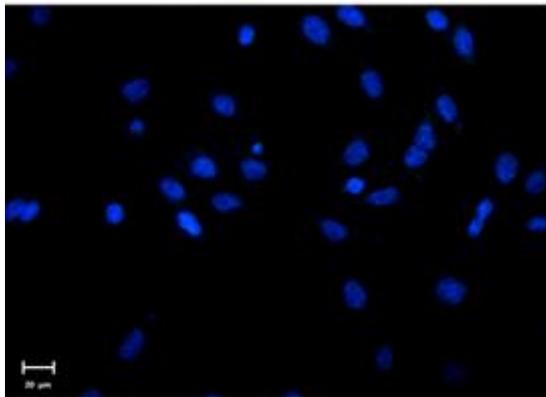
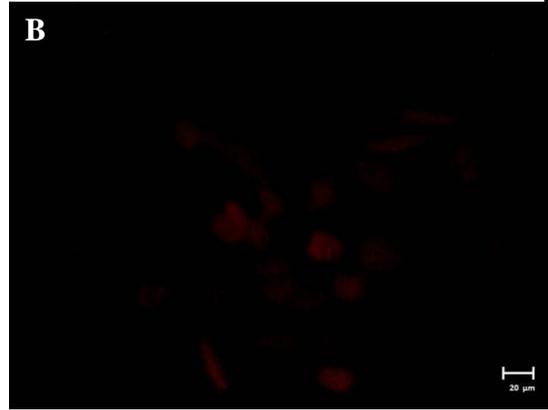


Figura 19: Inmunofluorescencia para SOX2 en Línea celular DU145 con expresión (SCR) y silenciamiento (SH) para ZEB1A DU145 SCR (400x). B DU145 SH (400x). C y D Tinción de contraste nuclear (Dapi). n=3. Barra 20 μm. Imagen representativa de tres ensayos independientes

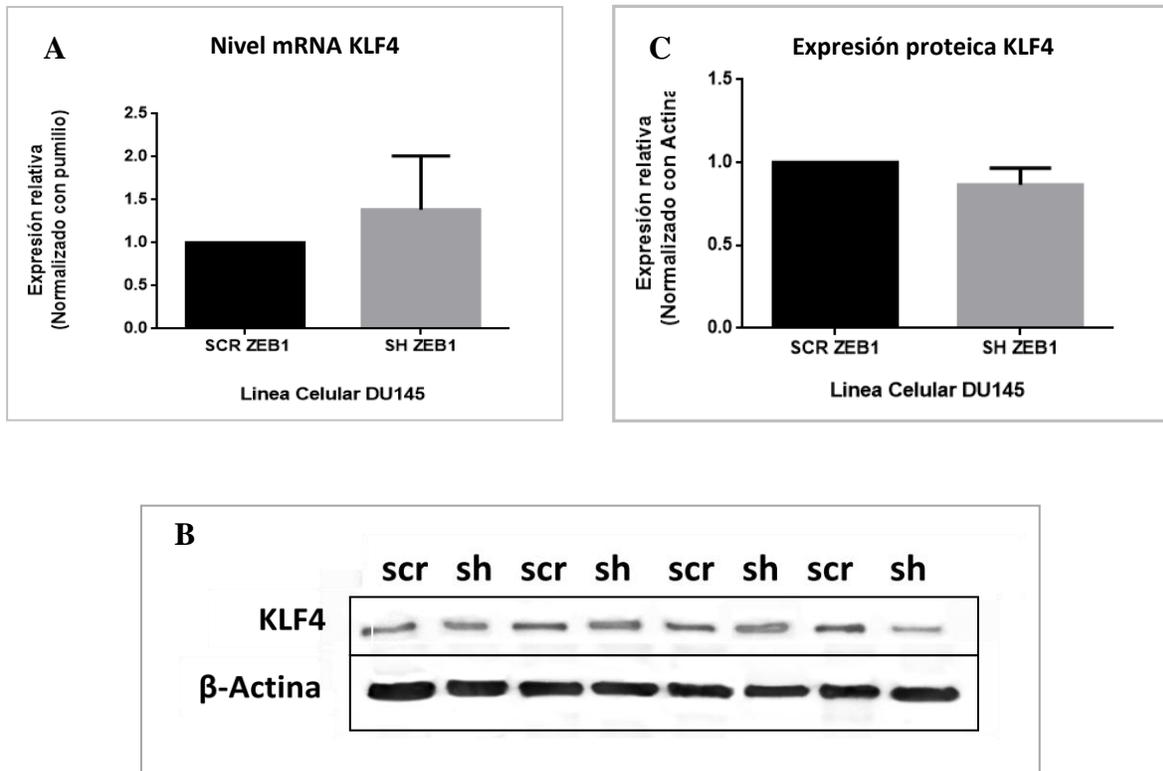


Figura 20: Expresión de KLF4 en línea celular DU145 SCR y DU145 SH. **A.** RT-qPCR para KLF4 (n=3). C_t Prom DU145 SCR: 20.8; C_t Prom DU145 SH: 21.1 **B** Expresión proteica de KLF4 por *western blot*. **C** Análisis cuantitativo de la expresión de proteína (n=4). No se evidencian diferencias estadísticamente significativas utilizando el test de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Barra representa desviación estándar. **Prom:** promedio. **SCR:** Expresión ZEB1. **SH:** Silenciamiento ZEB1

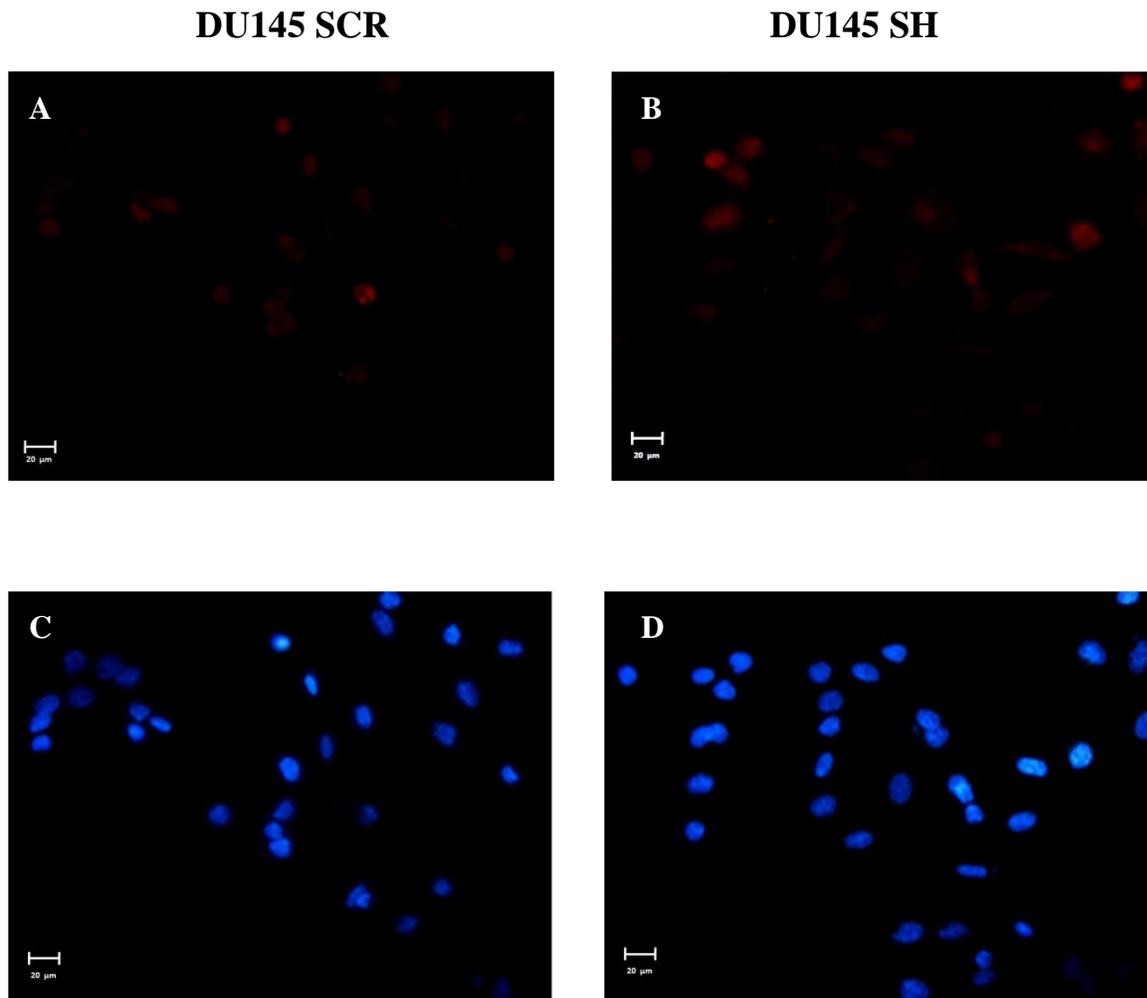


Figura 21: Inmunofluorescencia para KLF4 en Línea celular DU145 con expresión (SCR) y silenciamiento (SH) para ZEB1. A DU145 SCR (400x). B DU145 SH (400x). C y D Tinción de contraste nuclear (Dapi). n=3. Barra 20 µm. Imagen representativa de tres ensayos independientes.

6.3- Caracterización del fenotipo funcional de las CSCs, en línea celular DU145 de CaP, con expresión y silenciamiento de ZEB1, mediante la formación de prostatoesferas.

Para poder analizar y medir la habilidad de autorrenovación, característica fundamental de una CSC, se realizaron cultivos en condiciones no adherentes. Como resultado se evalúa la capacidad de formar prostatoesferas, en células DU145 SCR y silenciadas para el gen ZEB1, DU145 SH, observándose una mayor proporción de esferoides prostáticos a las 24 horas de cultivo en las células DU145 SCR en comparación con las células silenciadas, DU145 SH (Figura 22), siendo estas estructuras, más pequeñas y de menor densidad celular que las formadas a partir de células sin silenciamiento para el gen , lo mismo podemos observar a los tres días posterior al cultivo (Figura 22).

Además se realiza una caracterización de las esferas constituidas, según lo descrito por Asikgoz. E; *et al.* 2015, evaluando el perímetro de las esferas formadas y también largo y ancho de estas ⁸⁰. Se evidencia un mayor perímetro en las células con presencia del factor de transcripción ZEB1, en relación a las células silenciadas, desde el primer día de evaluación hasta los siete días post-cultivo, (Figura 25A). Se observa el mismo patrón de comportamiento al evaluar el ancho de las esferas formadas, para ambos tipos de condición celular (Figura 25C). No se observaron diferencias estadísticamente significativas, al evaluar el largo de cada prostatoesfera, tanto a los dos así como también a los cinco días. A los siete días post-siembra, se evidencia un largo menor en las esferas provenientes de células silenciadas para ZEB1 en comparación con su control de silenciamiento (Figura 25B). El silenciamiento de ZEB1, afecta la capacidad de generar prostatoesferas en cultivos celulares, modulando también, el tamaño y la cantidad de células que forman estas estructuras

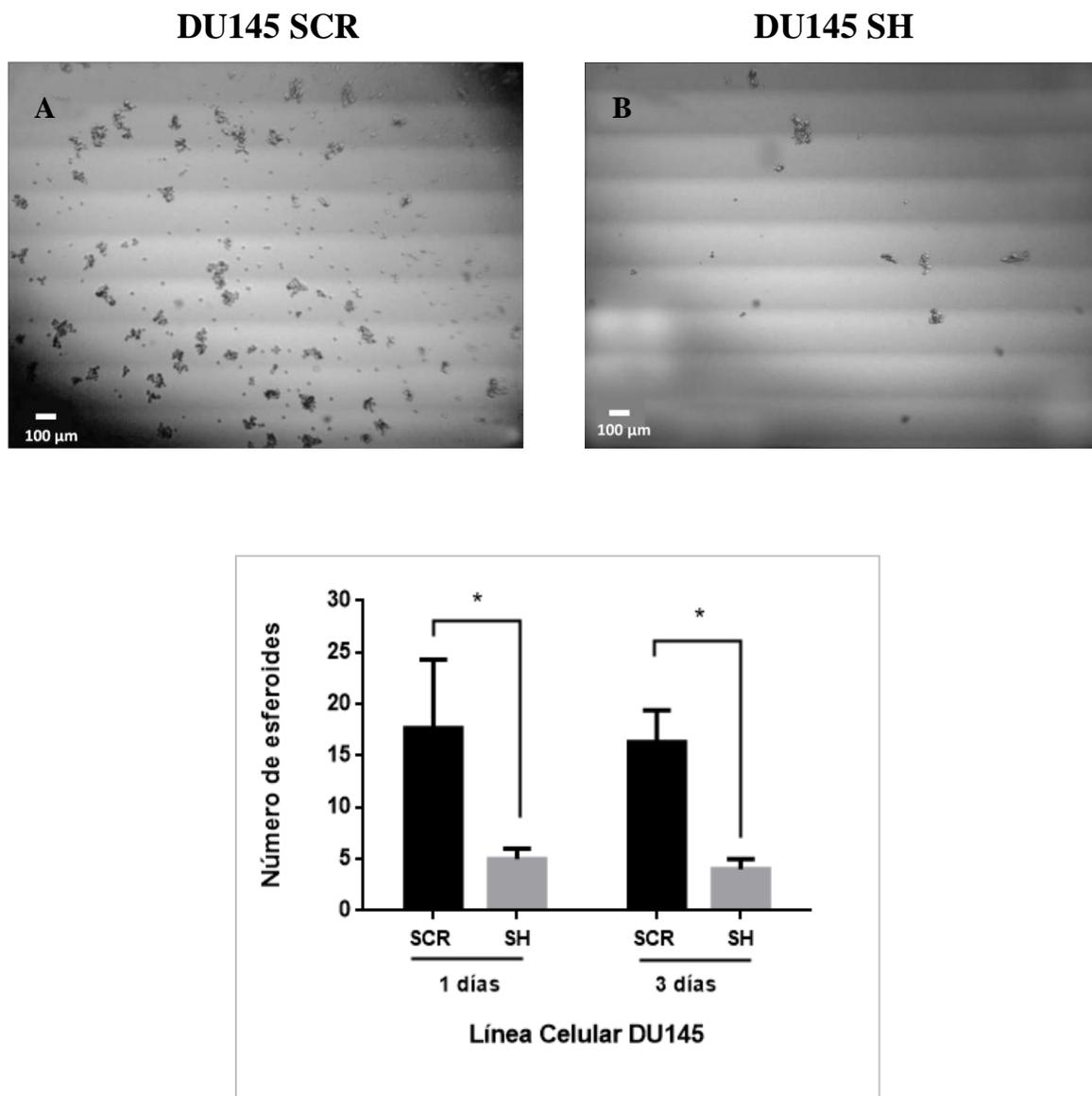


Figura 22: Cultivos en condiciones no adherentes en línea celular DU145 con silenciamiento para ZEB1 (SH) y su control de silenciamiento (SCR). **A** Esferoides prostáticos, 3 días post-cultivo DU145 SCR (5x). n=3. **B.** Esferoides prostáticos, 3 días post-cultivo DU145 SH (5x) n=3. Barra 100 µm. Imagen representativa de tres ensayos independientes. **C.** Cuantificación de los esferoides prostáticos, 1 y 3 días post cultivo, en células DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Barra representa desviación estándar **SCR:** Expresión ZEB1. **SH:** Silenciamiento ZEB1

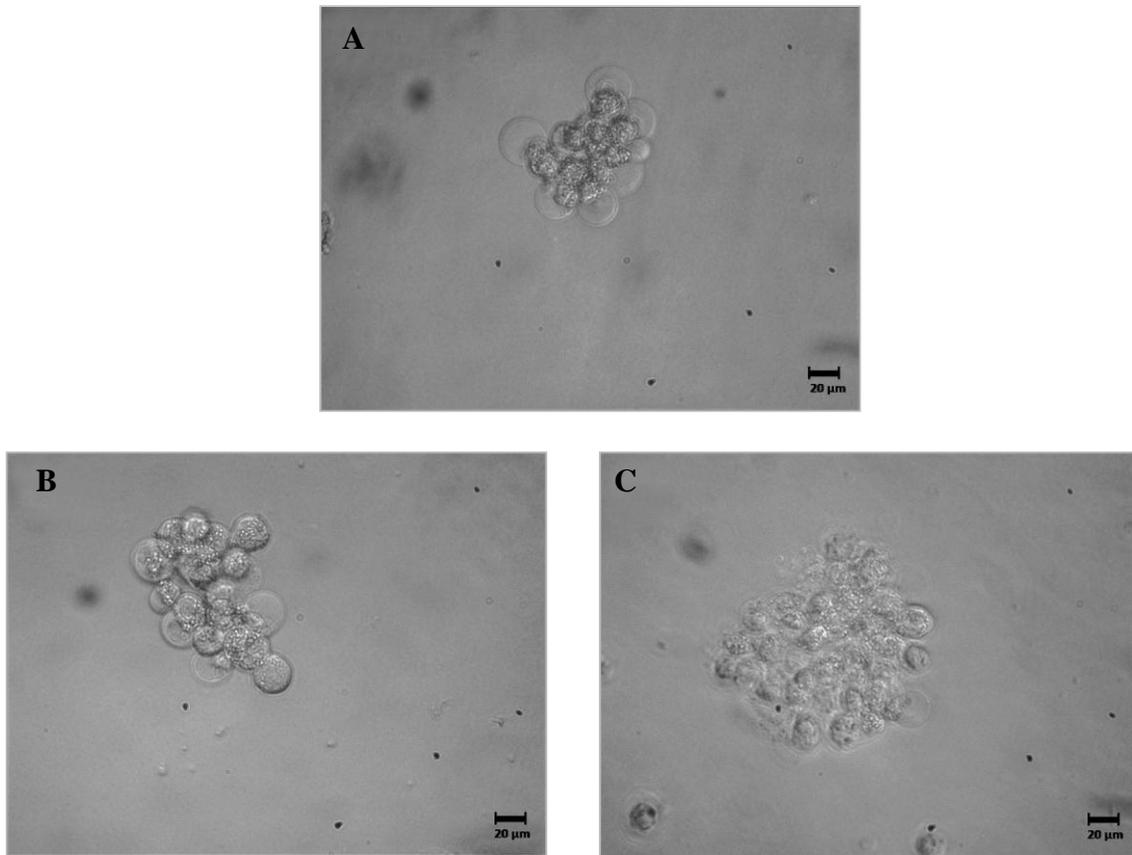


Figura 23: Cultivos celulares en condiciones no adherentes, en células sin silenciamiento para ZEB1: DU145 SCR. **A.** Prostatesferas 2 días de cultivo. (400x) **B.** Prostatesferas 5 días de cultivo. (400x) **C.** Prostatesferas 7 días de cultivo. (400x). Barra 20 µm. Imágenes representativas de tres ensayos independientes.

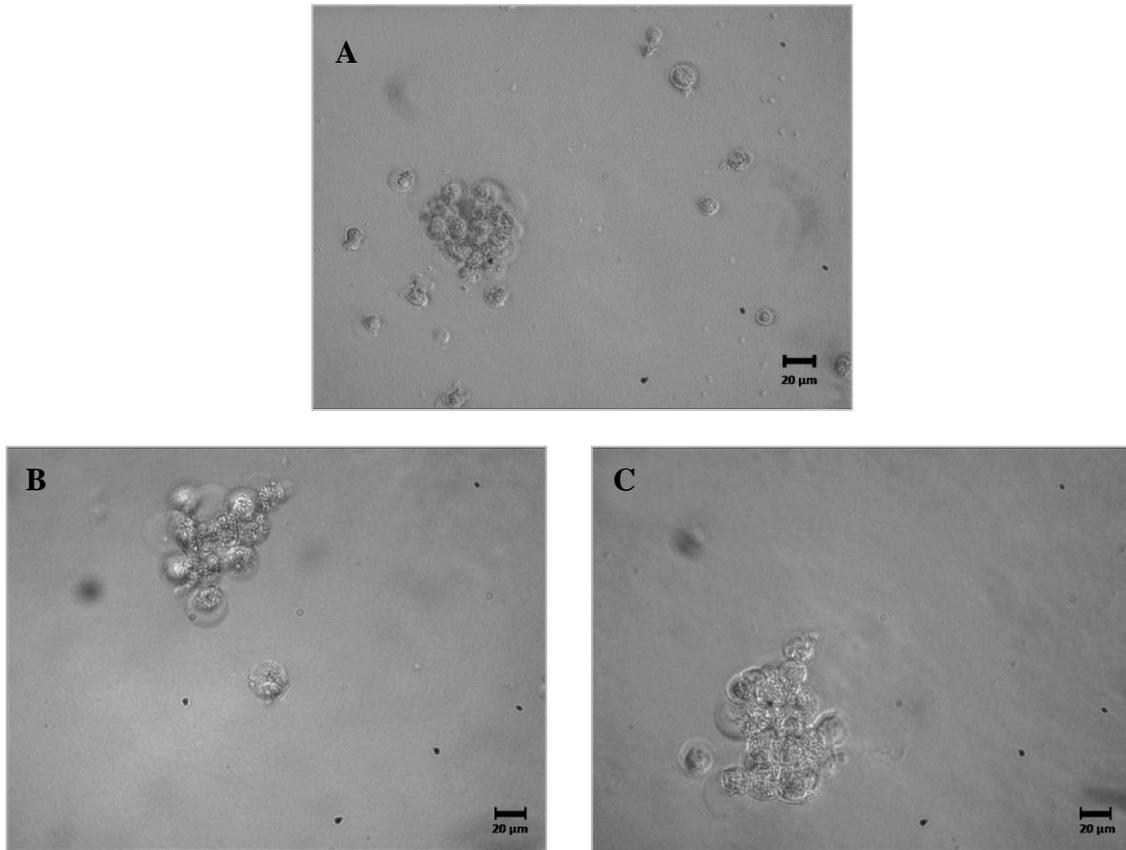


Figura 24: Cultivos Celulares en condiciones no adherentes, en células con silenciamiento para ZEB1 DU145 SH.A. **A.** Prostatosferas 2 días de cultivo. (400x) **B.** Prostatosferas 5 días de cultivo. (400x) **C.** Prostatosferas 7 días de cultivo (400x). Barra 20 µm. Imágenes representativas de tres ensayos independientes.

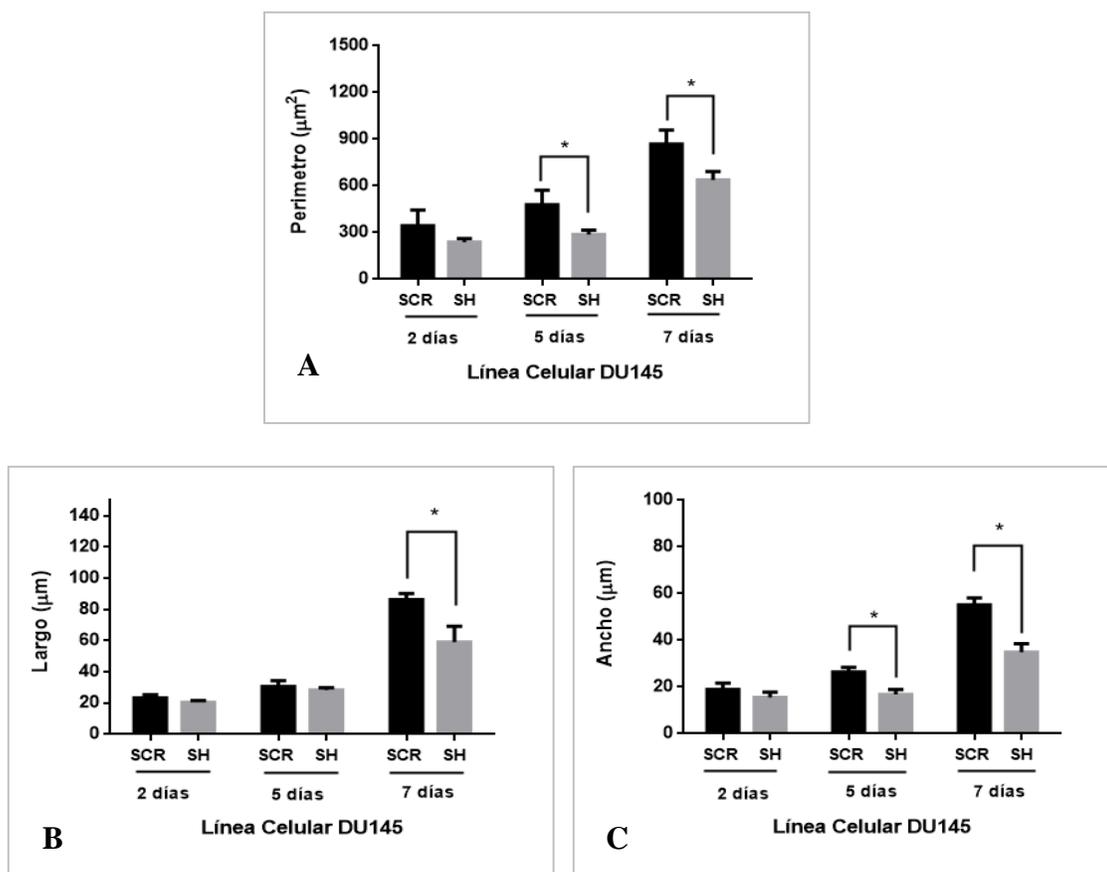


Figura 25: Caracterización de Prostatoesferas en Línea Celular DU145 con expresión (SCR) y silenciamiento (SH) de ZEB1. A. Perímetro de prostatoesferas a los 2, 5 y 7 días post-cultivo. n=3 **B.** Largo de prostatoesferas a los 2, 5 y 7 días post-cultivo. n=3. **C.** Ancho de prostatoesferas a los 2, 5 y 7 días post-cultivo. n=3.

Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test de Mann Whithney, $p < 0,05$. Barra representa desviación estándar.

6.4- Caracterización del fenotipo funcional de las CSCs en línea celular DU145 de CaP, con expresión y silenciamiento de ZEB1, mediante la capacidad de generar colonias.

Como parte de este objetivo, se cultivaron células silenciadas para ZEB1 y su control respectivo SCR, en condiciones adherentes y de baja densidad celular (2000 células/placas de 6 pocillos), durante 15 días observándose una menor cantidad de colonias formadas en células con silenciamiento de ZEB1 (SH) (Figura 26), en comparación a células control de silenciamiento, (SCR) (Figura 26). A su vez, el número de células por colonias fue mayor en células sin silenciamiento para ZEB1, en comparación con células silenciadas (Figura 28A)

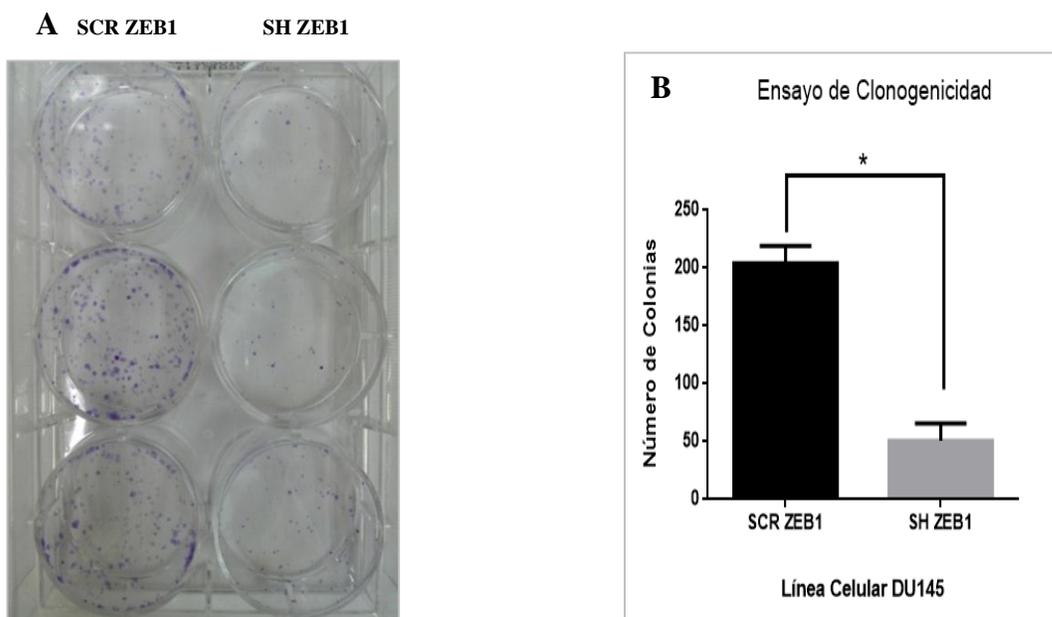


Figura 26: Capacidad Clonogénica: **A** Ensayo de clonogenicidad en células DU145 SCR y DU145 SH. **B** Análisis cuantitativo de la capacidad clonogénica de células DU145 SCR y DU145 SH. n=3 Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test de Mann-Whithney, $p < 0,05$. Barra representa desviación estándar. **SCR:** Expresión ZEB1. **SH** Silenciamiento ZEB1

Como parte de este objetivo, además se procedió con la evaluación de la morfología de los clones formados clasificados en holoclones, meroclones y paraclones de acuerdo a lo descrito por Barrandon Y & Green H, 1987 ⁸¹ y Knaack *et al*, 2018 ⁸² un holoclon corresponde a colonias de pequeñas células densamente compacta y de bordes regulares, un paraclon, está constituido de células grandes o alargadas que crecen de forma dispersa, con bordes irregulares, y un mereclon presenta una morfología intermedia, entre un paraclon y un holoclon, según la condición celular. Tanto para las células DU145 SCR y DU145 SH, se observa la formación de los tres tipos de clones (Figura 27), sin embargo, en las células silenciadas para ZEB1, se aprecia un mayor porcentaje de paraclones, en comparación con las células control de silenciamiento (Figura 28B). A su vez, estas células, DU145 SCR, presentan un mayor porcentaje de holoclones formados, que las células silenciadas para ZEB1 (Figura 28B). En cuanto a la formación de meroclones, estos fueron observados en ambos tipos de condición con y sin silenciamiento de ZEB1, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas (Figura 28B).

En cuanto al número de células por colonia formada, se observa un mayor recuento celular en cada una de los tipos de clones formados (holoclones, paraclones, meroclones) (Figura 28A) en las colonias provenientes de células sin silenciamiento para ZEB1, DU145 SCR en comparación con las DU145 SH. El silenciamiento de ZEB1, inhibe la capacidad de generar colonias en cultivos celulares DU145, modula la capacidad de autorrenovación de las células, favoreciendo la presencia de células más diferenciadas, agrupadas en paraclones, en comparación a su control de silenciamiento SCR, donde se aprecia una mayor proporción de células indiferenciadas agrupadas en holoclones, siendo además estas colonias más numerosas.

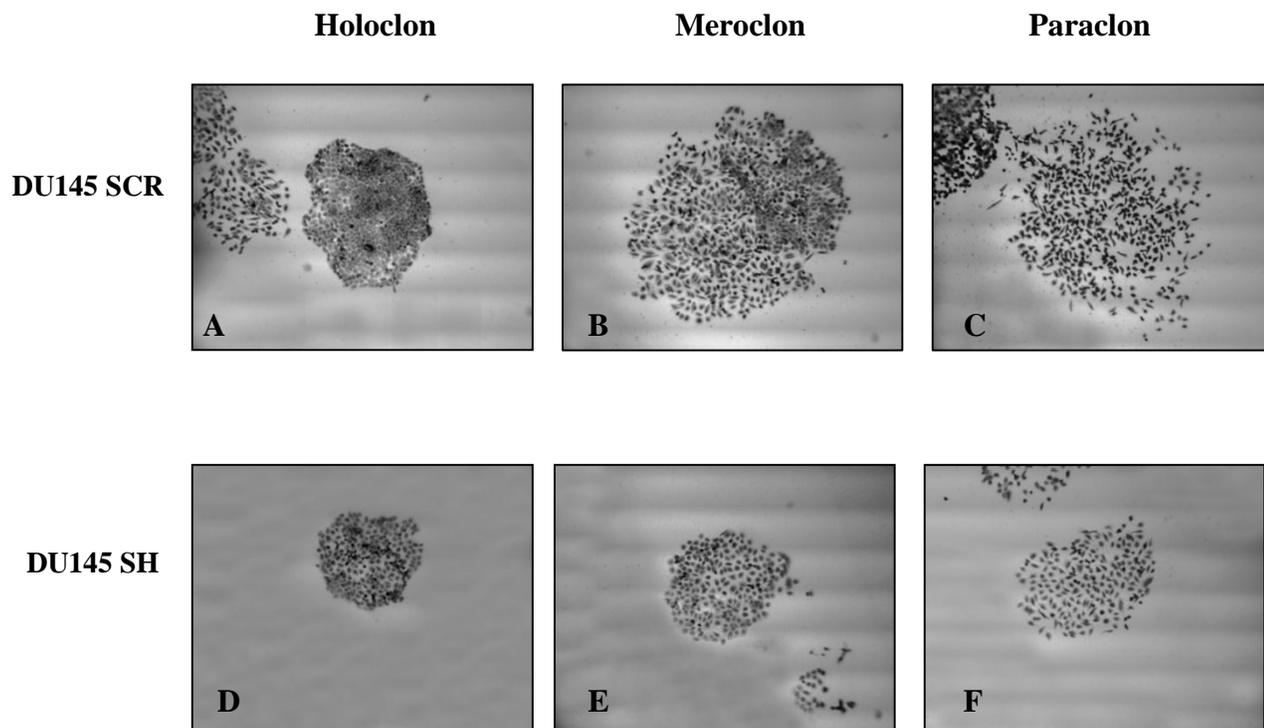


Figura 27: Colonias formadas a partir de células DU145 silenciadas para ZEB1 (SH) y su control de silenciamiento (SCR).A-C Subtipos de colonias provenientes de DU145 SCR. **D-E** Subtipos de colonias provenientes de DU145 SH. **A y D:** Holoclon (5x). **B y E:** Meroclon (5x). **C y F:** Paraclon.(5x) . Imágenes representativas de tres ensayos realizados de forma independiente

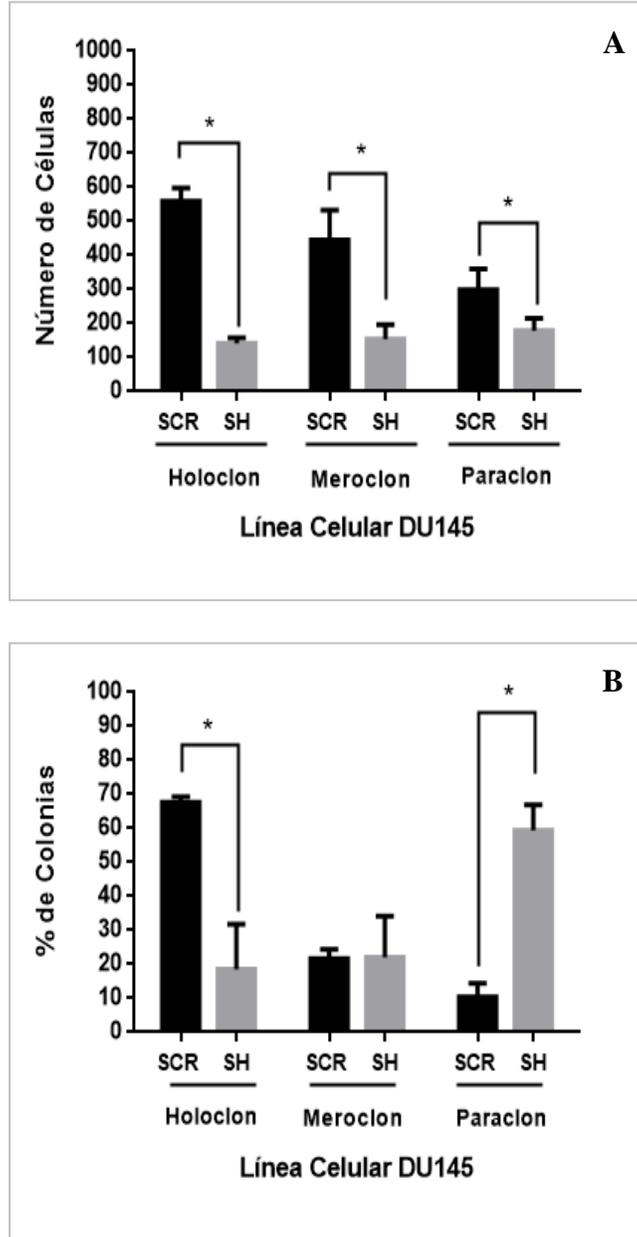


Figura 28: Comparación de clones formados por células DU145 con silenciamiento para ZEB1 (SH) en relación a su control de silenciamiento (SCR). **A.** Cuantificación del número células, por condición celular (SCR) y (SH), para cada tipo de clon formado. n=3 **B.** Porcentaje de colonias formadas, para cada tipo de clon formado, según condición celular (SCR) y (SH). n=3 Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test de Mann Whithney, $p < 0,05$. Las barras representan la desviación estándar.

7.- DISCUSIÓN

Basado en las características de las CSCs mencionadas anteriormente se han desarrollado múltiples estrategias para aislar a las CSCs, usando como blanco marcadores de superficie celular, manipulando rutas de señalización las cuales podrían llevar a apoptosis, diferenciación, modular los niveles de algunos microRNA o inhibir el eflujo de drogas quimioterapéuticas ⁷⁰. Terapias actuales contra el cáncer utilizan nanoformulaciones de pequeñas moléculas, que podrían proveer una ventaja al seleccionar blancos para alterar las rutas de autorrenovación como son: las rutas de señalización de Wnt y Notch⁷⁶, estas rutas a su vez, pueden interactuar con otras rutas de señalización como PI3K, MAPK y NF-Kb, todas ellas involucradas tanto en la proliferación como la autorrenovación celular ⁷⁶, generando resistencia a drogas y recidiva de la enfermedad.

Ha sido descrito en cáncer de páncreas que la EMT se acompaña de una reactivación de las vías de señalización mencionadas con anterioridad, lo que podría facilitar la modificación del perfil fenotípico de las células, adquiriendo en algunas de ellas un fenotipo más agresivo y/o mesenquimal y por lo tanto generar un fenotipo celular de CSCs, favoreciendo la metástasis y la invasividad hacia los tejidos ⁸⁴.

ZEB1 ha sido descrito como un modulador directo de los marcadores de EMT, E-cadherina y vimentina, favoreciendo la expresión de marcadores mesenquimales pero en desmedro de la expresión de marcadores epiteliales ⁴⁷, en coordinación con los factores de transcripción SNAIL y TWIST ⁹⁴.

Expresión de genes que se manifiestan corrientemente en células embrionarias, tales como sox2 o klf4, los cuales son considerados como representantes de las características de troncalidad, fueron evaluados en este trabajo, demostrándose que el silenciamiento de ZEB1 induce una disminución de la expresión de SOX2, tanto de su mRNA como de la expresión de la proteína, sin embargo el silenciamiento de ZEB1, no regularía la expresión de KLF4, pudiendo incluso no encontrarse vinculados entre sí., o bien lo regularía de forma indirecta. Como parte del fenómeno de la EMT, y apoyado por una de las teorías del origen de las CSCs, que propone que estas células cancerosas provendrían desde células diferenciadas, que enfrentan un fenómeno de reprogramación genética, es que creemos que la inducción de la expresión de ZEB1, podría ir acompañado con la reprogramación de uno de estos genes de pluripotencia, entregando a las CSCs, las características de proliferación y migración. Se ha demostrado que SOX2 incrementa la proliferación y la sobrevivencia celular al inducir la EMT ⁸⁵⁻⁸⁶, promoviendo a su vez, resistencia a la castración ⁸⁷. En nuestro trabajo, en las células silenciadas para ZEB1, se obtiene una menor expresión de SOX2 en relación a las células no silenciadas, observándose una disminución del 50% aproximadamente en la expresión de su mRNA, en comparación a un 30% al evaluar la expresión proteica, lo que se correlaciona con los resultados observados por inmunofluorescencia, esta diferencia podría explicarse, dado que no hay un 100% de silenciamiento en nuestros cultivos celulares, o bien, por una modulación directa sobre la expresión del mRNA de SOX2, necesitando de alguna molécula o ruta de señalización adicional para favorecer la expresión de la proteína. También podría ser explicado, dado una expresión temporal de SOX2 y KLF4, expresándose principalmente estas moléculas, durante la colonización en el nicho metastásico, por parte de las CSCs, manifestándose en

menor proporción durante la EMT propiamente tal. SOX2 fue descrito como uno de los factores de transcripción que es sobreexpresado en células de CaP de mayor agresividad, reconocidas como células troncales iniciadoras de tumor o CSCs ⁸⁸.

SOX2 así como también CD44 han sido correlacionados en los trabajos de Gathack *et al*, 2012 ⁷⁴ y Ni *et al*, 2014 ⁷⁵ con invasividad y metástasis en donde se describe la modulación de la expresión de ambas moléculas a partir de SNAIL2, lo cual podría ocurrir perfectamente como lo demostramos en este proyecto, a través de la regulación de ZEB1. A su vez se describe a SOX2 necesario para la inducción de una reprogramación celular ⁸⁹⁻⁹⁰, ganando interés como regulador clave en la autorrenovación y mantención de las CSCs en una variedad de tumores, incluido CaP ⁹¹. Además ha sido descrito como un biomarcador de metástasis en CaP, permitiendo la evaluación y predicción de invasión pudiendo así valorar la extracción del ganglio centinela ⁹¹. Interesantemente también este gen de pluripotencia ha sido descrito como un factor importante en la quimioresistencia y la evasión a la apoptosis y por lo tanto interviene directamente en la recurrencia del tumor ⁹², todo lo anteriormente señalado se describe como características claves de las CSCs.

Mientras KLF4 ha sido demostrado como un gen supresor de tumor en cáncer de colon y pulmón, se ha descrito como un oncogén en cáncer de mama y piel ⁶². También se ha observado en BPH y CaP en distribución, preferentemente citoplasmática ⁷³. En nuestro trabajo, se aprecia una distribución nuclear y citoplasmática de la proteína evidenciando una tendencia a aumentar su expresión en las células silenciadas para ZEB1, por lo que proponemos que este factor de transcripción podría actuar como gen supresor de tumor en CaP, inhibiendo el crecimiento del tumor y la migración celular, teniéndose que realizar estudios complementarios para corroborarlo. Se describe también que TGF- β mediante la inducción de Snail, altera la expresión de KLF4 disminuyendo su expresión. Proponemos

que algo similar podría ocurrir, mediante la expresión de ZEB1 inducido por TGF- β como fue descrito en la introducción ⁶², sin ser una relación directa.

Se describe que ZEB1 participaría además en la expresión de estos factores de transcripción SOX2 y KLF4 a través del *loop* regulatorio con algunos microRNA, en donde se describe que al disminuir ZEB1 por represión de microRNA, se inhibe la expresión de SOX2 y KLF4 en células de carcinoma mamario ⁶³⁻⁶⁴ reprimiendo de esta manera la EMT y las características de troncalidad en las células.

Se describe que aproximadamente el 1.25% de las células de un cultivo celular en células DU145, están disponibles para formar prostatoesferas, y de ellas el 26% podría generar esferas secundarias, lo que nos refleja el enriquecimiento de CSCs en cultivos en condiciones no adherentes o esferas, demostrando este sistema como una manera eficiente de aislamiento de CSCs ⁹⁵. En este proyecto nuestros resultados arrojan una correlación positiva entre las células que expresan el factor de transcripción ZEB1 y la habilidad de formar prostatoesferas, lo que se condice con la capacidad de autorrenovación por las células DU145 y por tanto corroborando la asociación del fenotipo CSCs con la expresión del factor de transcripción ZEB1. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se aislaron CSCs a partir de prostatoesferas provenientes de cultivos primarios, las cuales a su vez, exhiben expresión de los marcadores de superficie celular CD44 y CD133 ²³. Como describimos en la introducción estos marcadores han sido asociados con la capacidad tanto de autorrenovación como de proliferación y diferenciación celular.

Nuestros resultados arrojan que el silenciamiento de ZEB1 disminuye la expresión de marcadores de superficie CD133 y CD44, con esto a su vez, una disminuida capacidad de generar esferas prostáticas.

La ruta de señalización Wnt se ha correlacionado con una elevada expresión de

marcadores de superficie celular CD44 y CD133, la presencia de estos marcadores han sido definidos como críticos en la formación de esferoides prostáticos lo que las asocia directamente con la habilidad de autorrenovación de células de CaP, y lo que se correlaciona según lo descrito por Bisson & Prowe, 2009 ⁷⁷, con un elevado tamaño en las esferas prostáticas. En nuestro trabajo se evidencia que la presencia del factor de transcripción ZEB favorece tanto el número de esferas generadas, así como también, el largo, ancho y perímetro de estas estructuras.

En el trabajo realizado por Dubrovskaya y colaboradores ⁷⁹, se reporta la relación entre esferas prostáticas provenientes a partir de células DU145, su mantención y la activación de la vía de señalización PI3K-AKT. Otro reporte señala que células DU145 son capaces de formar esferoides en medio de cultivo libre de suero fetal bovino, obteniendo mayor número de esferoides y más grandes al suplementar el medio con EGF, además en otros reportes se ha descrito la relación entre EGF y ZEB1⁶⁰. Esto también se correlaciona con la idea que son las células del estrato basal de la próstata las que expresan receptores para EGF siendo estas menos diferenciadas que las células del estrato luminal ⁷⁸, lo que podría reafirmar el origen de las CSCs en próstata. Este mismo trabajo además demuestra que son las células DU145, en condición de cultivo no adherente, las que generan un incremento en la formación de tumores cuando se inyectan en ratones inmunodeprimidos, en comparación con células que crecen en condición de adherencia, lo que demuestra que son las células en esferas las que tienen una mayor habilidad de iniciar el crecimiento de un tumor y de autorrenovarse ; en nuestro caso son estas esferas las que expresan el factor de transcripción ZEB1, el cual creemos les brinda esta capacidad asociado con la co-expresión de marcadores de superficie CD133 y CD44 sumado a la expresión del gen de pluripotencia Sox2, perpetuando la habilidad de proliferación y autorrenovación.

Es por lo anterior que el presente trabajo sustenta la idea que ZEB1, promueve la formación de prostatoesferas, favoreciendo el fenotipo CSCs.

Para evaluar las características asociadas a malignidad celular lo cual se correlaciona con la capacidad de generar tumores, se realizaron ensayos de formación de colonias demostrándose a partir de nuestros resultados que el silenciamiento de ZEB1, inhibe la capacidad de generar colonias en cultivos celulares DU145, modula la capacidad de autorrenovación de las células favoreciendo además la presencia de células más diferenciadas agrupadas en paraclones, en comparación a su control de silenciamiento SCR, donde se aprecia una mayor proporción de células indiferenciadas agrupadas en holoclones, siendo estas colonias además más numerosas.

De la misma manera, trabajos previos en nuestro laboratorio realizados por Orellana-Serradel, *et al*, 2018 ⁶⁹, demuestran una menor habilidad de generar colonias en líneas celulares de CaP con silenciamiento de ZEB1, en comparación a células control de silenciamiento ⁶⁹. Nuestro trabajo evidencia un resultado similar, mayor número de colonias en células con presencia de ZEB1 pero además, clasificamos los clones obtenidos los cuales nos entregan un patrón de diferenciación celular, obteniendo células más indiferenciadas desde células con presencia del factor de transcripción ZEB1. La morfología de las colonias nos permite caracterizar e identificar células troncales en este caso CSCs ⁸³. Los clones obtenidos los clasificamos en: holoclon, meroclon y paraclon, tanto el holoclon como el meroclon, pueden autorrenovarse, generar cultivos en condiciones no adherentes y altamente tumorigénicos al ser inyectados en un ser vivo, expresando marcadores de CSCs ⁸³⁻⁸⁴. La mayor diferencia entre holoclon y mereclon es la proporción de CSCs presentes en su colonia en donde se describe que es el holoclon el que presentaría una elevada capacidad de autorrenovarse presentándose como SC, en este caso

CSCs, el meroclon, presenta limitada capacidad de proliferar y autorrenovarse, siendo descrito en este caso como células amplificadoras transientes el paraclon por la contraparte, presenta capacidad de proliferar, pero no así, de autorrenovarse ⁸³. Nuestros resultados permiten asociar la elevada expresión de ZEB1 con una mayor proporción de holoclones, siendo estos a su vez, más numerosos que los otros dos tipos de clones celulares, de esta manera y con esta información, confirmamos nuestra hipótesis en donde ZEB1 estaría vinculado con el fenotipo CSCs.

En el trabajo realizado por Castellón *et al*, 2012 ²³, además, se generan clones celulares a partir de tejidos primarios de cáncer de próstata, obteniendo en tejidos con grados intermedios y altos de Gleason, mayor número de holoclones o células indiferenciadas ²³. El reporte realizado por Knaack, H. *et al*, 2018 ⁸² se describe una expresión de ZEB1 significativamente mayor en holoclones comparado con paraclones, lo que se correlaciona también, con un aumento en la expresión de TNF- α y otros agentes pro-inflamatorios, que como ya mencionamos en la introducción actuarían como inductores de EMT ⁸². De esta manera se demuestra una posible asociación entre la presencia del fenotipo troncal o CSCs, el factor de transcripción en estudio de este proyecto ZEB1 y el grado de diferenciación celular.

En el trabajo de Orellana-Serradelet *et al*, 2018 ⁶⁹ además de corroborar la relación de ZEB1 con la expresión de marcadores mesenquimales, se demuestra que ZEB1 promueve migración, invasión, clonogenicidad y resistencia a la apoptosis ⁶⁹, características presentes en el fenotipo CSCs. A su vez se demuestra en este mismo trabajo que un aumento de la expresión de ZEB1 confiere resistencia a docetaxel, droga de elección en el tratamiento de CaP, mediante la promoción de la expresión de bombas proteicas en la membrana plasmática de las células, específicamente proteínas de la familia ABCC1 ⁶⁹, todas estas

características asociadas también a malignidad celular presentes en las CSCs.

Los resultados de nuestro trabajo permiten describir el comportamiento de algunos elementos moleculares en el CaP identificando a las CSCs en asociación a ZEB1 y el gen de pluripotencia Sox2, pudiendo utilizarse alguna de estas moléculas como patrón diagnóstico en estadios tempranos de CaP, y eventualmente con una proyección hacia la síntesis de nuevos tratamientos, pudiendo de esta manera, llegar a la remisión completa de la enfermedad.

8.- CONCLUSIÓN

El silenciamiento de ZEB1 en Células DU145 de CaP:

1. Disminuye la expresión de marcadores de superficie celular de CSCs CD133 y CD44, lo que nos permite asociar a ZEB1 con marcadores moleculares característicos de CSCs.
2. Disminuye la capacidad de autorrenovación de estas células, característica clave para el fenotipo CSCs.
3. Reduce la capacidad de generar clones celulares, disminuyendo el número de clones obtenidos, así como también, el porcentaje de células indiferenciadas derivadas desde estos clones, asociando a ZEB1 con el fenotipo CSCs.
4. Disminuye la expresión del gen de pluripotencia SOX2, sin inducir cambios en la expresión de KLF4.

ZEB1 tiene un rol protagónico tanto en EMT como en la activación del fenotipo CSCs, por tanto es una molécula que participaría de forma directa en la evaluación del pronóstico del paciente con CaP. Como hemos descrito con anterioridad, el CaP es una patología la cuál presenta una reaparición tiempo después de su tratamiento, esto ocurre principalmente por la presencia de las CSCs, las cuales permanecen largo tiempo en el organismo (Figura 29). Disponer de factores moleculares diagnósticos y/o pronósticos tempranos para el CaP, o bien blancos moleculares que detengan la progresión de este, o que eliminen de manera temprana la viabilidad de las CSCs, disminuiría la tasa de recurrencia de la patología ⁹³.

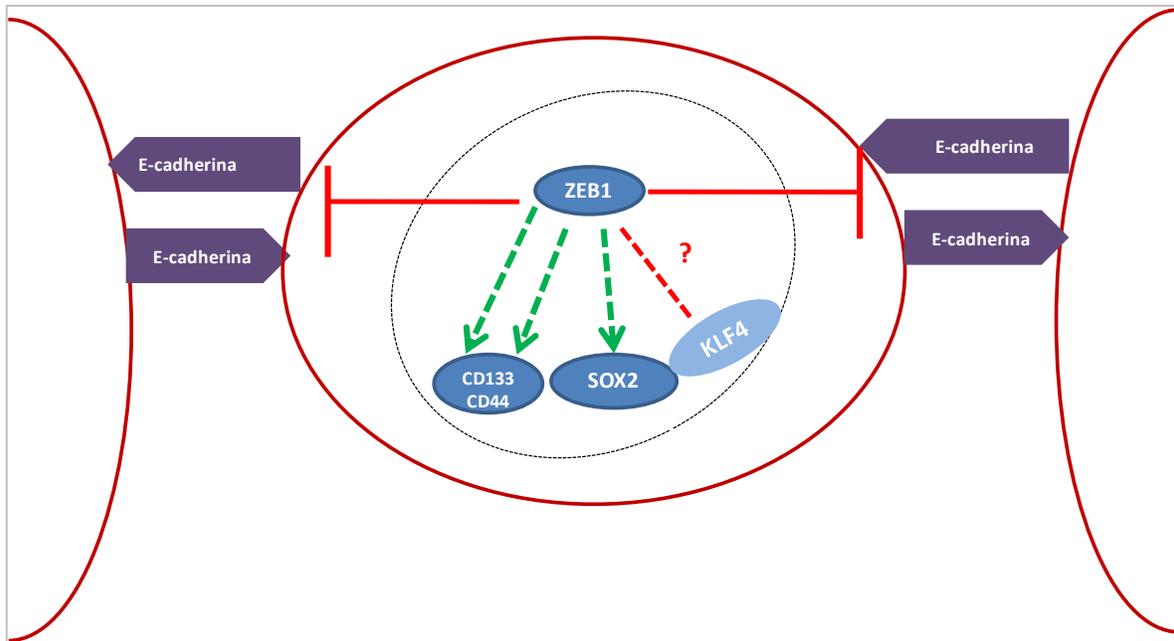


Figura 29: ZEB1 y características CSCs: ZEB1 induce la expresión de marcadores de superficie celular CSCs CD133 y CD44, promueve la expresión del gen de pluripotencia Sox2. No se evidencia relación directa sobre KLF4.

9.-BIBLIOGRAFÍA

1. Ross, M. & Pawlina, W. *Histology a text and atlas*. (2011).
2. Sfanos, K. & De Marzo, A. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*60, 199–215 (2012).
3. Kasper, S. Exploring the origins of the normal prostate and prostate cancer stem cell. *Stem Cell Rev.*4, 193–201 (2008).
4. Jaworska, D., Król, W. & Szliszka, E. Prostate cancer stem cells: Research advances. *Int. J. Mol. Sci.*16, 27433–27449 (2015).
5. Parimi, V., Goyal, R., Poropatich, K. & Yang, X. J. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am. J. Clin. Exp. Urol.*2, 273–85 (2014).
6. De Marzo, A. M., Meeker, A. K., Epstein, J. I. & Coffey, D. S. Prostate Stem Cell Compartments. *Am. J. Pathol.*153, 911–919 (1998).
7. Tuch, B. E. lava. *Aust. Fam. Physician*35, 719–721 (2006).
8. D’Andrea, V., Guarino, S., Di Matteo, F. M., Maugeri Saccà, M. & De Maria, R. Cancer stem cells in surgery. *G. Chir.*35, 257–9 (2014).
9. MinSal. Guía Clínica: Cancer de próstata en personas de 15 años y más. *Guías Clínicas MinSal* 1–44. (2010).
10. Lavallée, L. T. *et al.* The association between tumour density and prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *Can. Urol. Assoc. J.*5, 397–401 (2011).
11. Sottoriva, A. *et al.* Cancer stem cell tumor model reveals invasive morphology and increased phenotypical heterogeneity. *Cancer Res.*70, 46–56 (2010).
12. American Cancer Society, 2016. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer.html>. (Accessed: 20th August 2017)
13. Jiang, W., Peng, J., Zhang, Y., Cho, W. C. S. & Jin, K. The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*13, 16636–16657 (2012).
14. Singh, S. K. *et al.* Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res.* 5821–5828 (2003).
15. Abbaszadegan, M. R. *et al.* Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J. Cell. Physiol.*232, 2008–2018 (2017).
16. Corominas-Faja, B. *et al.* Nuclear reprogramming of luminal-like breast cancer cells generates Sox2-overexpressing cancer stem-like cellular states harboring transcriptional activation of the mTOR pathway. *Cell Cycle*12, 3109–3124 (2013).

17. Craene, B. De & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer*13, 97–110 (2013).
18. Chu, P. Y. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer. *Oral Oncol.*49, 34–41 (2013).
19. Chen, S. F. *et al.* Nonadhesive Culture System as a Model of Rapid Sphere Formation with Cancer Stem Cell Properties. *PLoS One*7, e31864 (2012).
20. Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J. & Maitland, N. J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.*65, 10946–10951 (2005).
21. Richardson, G. D. *et al.* CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J. Cell Sci.*117, 3539–3545 (2004).
22. Hurt, E. M., Kawasaki, B. T., Klarmann, G. J., Thomas, S. B. & Farrar, W. L. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br. J. Cancer*98, 756–65 (2008).
23. Castellón, E. A. *et al.* Molecular signature of cancer stem cells isolated from prostate carcinoma and expression of stem markers in different Gleason grades and metastasis. *Biol. Res.*45, 297–305 (2012).
24. Yu, X. *et al.* Sox2 expression in the developing, adult, as well as diseased prostate. *Prostate Cancer Prostatic Dis*17, 301–309 (2015).
25. Chen, S. *et al.* SOX2 gene regulates the transcriptional network of oncogenes and affects tumorigenesis of human lung cancer cells. *PLoS One*7, 1–12 (2012).
26. Girouard, S. D. *et al.* SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Lab. Investig.*92, 362–370 (2012).
27. Huang, J. *et al.* Kruppel-like factor 4 promotes high-mobility group box 1-induced chemotherapy resistance in osteosarcoma cells. *Cancer Sci.*107, 242–249 (2016).
28. Vangapandu, H. & Ai, W. Kruppel like factor 4 (KLF4): A transcription factor with diverse context-dependent functions. *Gene Ther. Mol. Biol.*13, 194–203 (2009).
29. Borque, Á. *et al.* Genetic predisposition to early recurrence in clinically localized prostate cancer. *BJU Int.*111, 549–558 (2013).
30. Newgreen, D. F. & Thompson, E. W. Progress in epithelial-mesenchymal transition research. *Cells Tissues Organs*197, 421–423 (2013).
31. Sánchez-Tilló, E. *et al.* Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am. J. Cancer Res.*1, 897–912 (2011).
32. Singh, A & Settleman, J. EMT cancer stem cells and drug resistance. *Oncogene*29, 4741–4751 (2011).
33. Yu, Q., Zhang, K., Wang, X., Liu, X. & Zhang, Z. Expression of transcription factors snail , slug

- , and twist in human bladder carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1–9 (2010).
34. Shi, R. *et al.* Effects of miR-200c on the migration and invasion abilities of human prostate cancer Du145 cells and the corresponding mechanism. *Front. Med.* 8, 456–463 (2014).
 35. Williams, L. V., Veliceasa, D., Vinokour, E. & Volpert, O. V. MiR-200b inhibits prostate cancer EMT, growth and metastasis. *PLoS One* 8, 1–10 (2013).
 36. Banyard, J. *et al.* Regulation of epithelial plasticity by miR-424 and miR-200 in a new prostate cancer metastasis model. *Sci. Rep.* 3, (2013).
 37. Shih, S. chun T. C. chun L. T. chieh, Tseng, R. & Hsieh, M. chin Y. Y. jr L. S. yung. The miR-200b – ZEB1 circuit regulates diverse stemness of human hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinog.* 1–13 (2017).
 38. Burk, U. *et al.* A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 9, 582–589 (2008).
 39. Tellez, C. S. *et al.* EMT and Stem Cell – Like Properties Associated with miR-205 and miR-200 Epigenetic Silencing Are Early Manifestations during Carcinogen-Induced Transformation of Human Lung Epithelial Cells. *Cancer Res.* 3087–3098 (2011). doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3035
 40. Chen, D. *et al.* MicroRNA-200c overexpression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *J. Ovarian Res.* 6, 50 (2013).
 41. Nam, E. J. *et al.* MicroRNA profiling of a CD133+spheroid-forming subpopulation of the OVCAR3 human ovarian cancer cell line. *BMC Med. Genomics* 5, 18 (2012).
 42. Mongroo, P. S. & Rustgi, A. K. The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol. Ther.* 10, 219–222 (2010).
 43. Li, H., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Claypool, K. & Tang, D. G. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res.* 68, 1820–1825 (2008).
 44. GLOBOCAN 2012, IARC, WHO.
 45. Collins, A & Maitland Norman. Prostate Cancer Stem Cell. *European Journal of Cancer.* 42: 1213-1218 (2006)
 46. Oldrige, E; Pellacani D; Collins, A; Maitland, N. Prostate cancer stem cell: Are they androgen responsive?. *Molecular and cellular Endocrinology.* 360: 14-24. (2012)
 47. Sanchez-Tillo, E; et al. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 69:3429-3456 (2012)
 48. Oluwasina, S & Kwasi Kumi-Diaka J. Emerging Role of Cancer Stemness in Prostate Cancer Recurrence and Management. *Acta Scientific Cancer Biology* 2.5 (2018)
 49. Kalluri, R. & Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*

119(6):1420–1428. (2009)

50. Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139(5):871–890. (2009)
51. Iorio, M & Croce, C. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 4(3):143–159 (2012)
52. Friedl, P & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147(5):992–1009 (2011)
53. Hanahan, D & Coussens, L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21(3):309–322 (2012)
54. Scheel, C., Eaton, E.N., Li, S.H., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.J., Bell, G., Guo, W, Rubin, J., Richardson, A.L., Weinberg, R. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145(6):926–940 (2011)
55. Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., Kirchner, T. Opinion: migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5(9):744–749. (2005)
56. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ (2012) Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21(3): 283–296
57. Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., Kirchner, T. Variable b-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10356–10361. (2001)
58. Fabregat, I., Maltefotte, A & Soukupova, J. New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *Journal of clinical medicine*. (2016)
59. Sheng, G., Dos Reis, M., Stern, C.D. Churchill, a zinc finger transcriptional activator, regulates the transition between gastrulation and neurulation. *Cell* 115(5):603–613. (2003)
60. Shin, S., Dimitri, C.A., Yoon, S.O., Dowdle, W., Blenis, J. ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Mol Cell* 38(1):114–127. (2010)
61. Xiong, H., Hong, J., Du, W., Lin, Y.W., Ren, L.L., Wang, Y.C., Su, W.Y., Wang, J.L., Cui, Y., Wang, Z.H., Fang, J.Y. Roles of STAT3 and ZEB1 proteins in E-cadherin down-regulation and human colorectal cancer epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 287(8):5819–5832. (2012)
62. Liu, Y.N., Abou-Kheir, W., Yin, J.J., Fang, L., Hynes, P., Casey, O., Hu, D., Wan, Y., Seng, V., Sheppard-Tillman, H., Martin, P., Kelly, K. Critical and reciprocal regulation of KLF4 and SLUG in transforming growth factor b-initiated prostate cancer epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 32(5):941–953. (2012)
63. Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., Zur-Hausen, A., Brunton, V.G., Morton, J., Sansom, O., Schuler, J., Stemmler, M.P., Herzberger, C., Hopt, U., Keck, T., Brabletz, S., Brabletz, T. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*

11(12):1487–1495. (2009)

64. Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R.W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Diehn, M., Liu, H., Panula, S.P., Chiao, E., Dirbas, F.M., Somlo, G., Pera, R.A., Lao, K., Clarke, M.F. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with Normal stem cells. *Cell* 138(3):592–603. (2009)

65. Siemens, H., Jackstadt, R., Hunten, S., Kaller, M., Menssen, A., Götz, U., Hermeking, H. miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle* 10(24):4256–4271. (2011)

66. Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T., Gupta, P.B., Evans, K.W., Hollier, B.G., Ram, P.T., Lander, E.S., Rosen, J.M., Weinberg, R.A., Mani, S.A. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 31(35):15449–15454. (2010)

67. Wels, C., Joshi, S., Koefinger, P., Bergler, H., Schaidler, H. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J Invest Dermatol* 131(9):1877–1885. (2011)

68- Wang, H; *et al.* ZEB1-mediated vasculogenic mimicry formation associates with epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes in prostate cancer. *J Cell Mol Med.* 22:3768-3781. (2018)

69. Orellana-Serradel, O.; Herrera, D.; Castellon, E.; Contreras, H. The transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. *Asian J Androl.* 20; 294-299. (2018)

70. Yun, E.; Lo,U.; Hsieh, J. The evolving landscape of prostate cancer stem cell: Therapeutic implications and future challenges. *Asian J Urology.* 3: 203-210. (2016)

71. Collins, A.; Berry, P.; Hyde, C.; Stower, M.; Maitland, N.; Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 65: 10946-51. (2005)

72- Patrawala, L.; Calhoun, T.; Scheneider-Broussard, R.; Li, H.; Bhatia, B.; Tang, S.; Highly purified CD44⁺ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene.* 25: 1696-708. (2006)

73. Magnen, C. *et al.* Klf4 transcription factor is expressed in the cytoplasm of prostate cancer cell. *Eur. J. Cancer.* 49: 955-963. (2013).

74. Ghatak, S.; Hascall, V.; Markwald, R.; Misra, S. Stromal hyaluronan interaction with epithelial CD44 variants promotes prostate cancer invasiveness by augmenting expression and function of hepatocyte growth factor and androgen receptor. *Biol. Chem.* 285; 19821-19832. (2012)

75. Ni, J.; Cozzi, P.; Hao, J.; Beretov, J.; Chang, L.; Duan, W.; Shigdar, S.; Delprado, W.; Graham, P.; Bucci, J.; Kearsly, J.; Li, Y. CD44 variants 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance. *Prostate.* 74: 602-617.(2014)

76. Takebe, N.; Miele, L.; Harris, P.; Jeong, W.; Bando, H.; Kahn, M.; *et al.* Targeting Notch, Hedgehog and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update, *Nature Rev Clin Oncol.* 12: 445-64. (2015)

77. Bisson, I & Prowse, D. WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. *Cell res.* 19: 683-697. (2009)
78. Rybak, A.; He, L.; Kapoor, A.; Cutz, J.; Tang, D. Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1813: 683-694. (2011)
79. Dubroska, A.; Kim, S.; Salamone, J.; Walker, S.; Maira, C.; Garcia-Echeverría, C.; Schultz, P.; Reddy, V. The role of PTEN/akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad. Sci. USA.* 106: 268-273. (2009)
80. Acikgoz, E.; Guven, U.; Duzagac, F.; Uslu, R.; Kara, M.; Soner, B.; Oktem, G.; Enhanced G2/M Arrest, Caspase Related Apoptosis and Reduced E-Cadherin Dependent Intercellular Adhesion by Trabectedin in Prostate Cancer Stem Cells. *Plos One.* 10:10 (2015)
81. Barrandon, Y & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 84: 2302-2306. (1987)
82. Knaack, H.; Lenk, L.; Philipp, L.M.; Miarka, L.; Rahn, S.; Viole, F.; Hauser, C.; Egberts, J.H.; Liver metastasis of pancreatic cancer: the hepatic microenvironment impacts differentiation and self-renewal capacity of pancreatic ductal epithelial cells. *Oncotarget.* 9(60): 31771-31786. (2018)
83. Tan, L.; Sui, X.; Deng, H.; Ding, M. Holoclone Forming Cells from Pancreatic Cancer Cells Enrich Tumor Initiating Cells and Represent a Novel Model for Study of Cancer Stem Cells. *Plos One.* 6(8): e23383.(2011)
84. Zhang, L.; Jiao, M.; Li, L.; Wu, D.; Wu, K.; Li, X.; Zhu, G.; Dang, Q.; Wang, X.; Hsieh, J.T.; He, D. Tumorspheres derived from prostate cancer cells possess chemoresistant and cancer stem cell properties. *J Cancer Res Clin Oncol.* 138:675-686. (2012)
85. Shi, X.; Gipp, J & Bushman, W. Anchorage-independent culture maintains prostate stem cells. *Dev. Biol.* 312: 396. (2007)
86. Li, H.; Chen, X.; Calhoun, D. *et al.* PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *J Cancer Res.* 68: 120. (2008)
87. Locke, M.; Heywood, M.; Fawell, S.; *et al.* Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *J Cancer Res.* 65:8944. (2005)
88. Nelson, W.G.; De Marzo, A.M & Isaacs, W.B. Prostate Cancer. *N Engl. J Med.* 349:366. (2003)
89. Lawson D.A.; Xin, L.; Lukacs, R. *et al.* Prostate stem cell and prostate cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 70:187. (2005)
90. Jordan, C.T.; Guzman, M & Noble, M. Cancer Stem Cells. *N Engl J Med.* 355: 1253. (2006)
91. Russo, M.V.; Esposito, S.; Tupone, M.G.; Manzoli, L.; Airolidi, I.; Pompa, P.; Cindolo, L.; Schips, L.; Sorrentino, C.; Di Carlo, E. SOX2 boots major tumor progression genes in prostate cancer and is a functional biomarker of lymph node metastasis. *Oncotarget.* 7 (11). 2015.
92. Jia, X.; Li, X.; Xu, Y.; Zhang, S.; Mou, W.; Liu, Y.; Lv, D.; Liu, C.; Tan, X.; Xiang, R.; Li, N. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *J. Mol. Biol.* 3: 230-238. (2011)

93. Oluwasina, S & Kumi-Diaka, J.K. "Emerging Role of Cancer Stemness in Prostate Cancer Recurrence and Management". *Acta Scientific Cancer Biology* 2.5 (2018)
94. Farfán, N.; Ocarez, N.; Castellón. E.; Mejía. N.; García. A.; Contreras. H. The transcriptional factor ZEB1 represses Syndecan 1 expression in prostate cancer. *Scientific Reports*. 8:11467. (2018)
95. Yan. J & Tang. D. Prostate cancer stem-like cells proliferate and resist etoposide-induced cytotoxicity via enhancing DNA damage response. *Exp. Cell Res.* 8. (2018)