

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**El Factor de Transcripción ZEB1 Disminuye la Síntesis  
de Andrógenos en la Línea Celular DU145 de Cáncer  
Prostático.**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

***Daniela Francisca Herrera Ramírez***

Director de Tesis: Dr. Héctor Contreras

Financiamiento Proyecto FONDECYT N° 1151214

Santiago-Chile

Noviembre 2017

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

## INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**DANIELA FRANCISCA HERRERA RAMÍREZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: bioquímica clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

Director de Tesis:

Dr. Hector Contreras

\_\_\_\_\_

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes.

\_\_\_\_\_

Dra. Carmen Romero.

\_\_\_\_\_

Dr. Julio Tapia.

\_\_\_\_\_

***A mi abuelo Luis Ramírez Miño, mi  
mayor ejemplo de vida.***

## RESUMEN DEL PROYECTO

En Chile el cáncer de próstata (CaP) constituye la segunda causa de muerte por cáncer en el sexo masculino. Dentro de la progresión tumoral para establecer la metástasis se ha destacado al proceso llamado transición epitelio mesénquima (TEM) como parte fundamental del aumento de malignidad. La TEM, induce un cambio en las células tumorales hacia un fenotipo mesenquimal, el cual se caracteriza por una pérdida de las adhesiones celulares y por una modificación en la polaridad ápico basal de las células epiteliales, confiriéndole a las células mayores capacidades migratorias e invasivas. Este proceso es controlado por el factor de transcripción ZEB1, el cual no sólo reprime la expresión de E-cadherina, sino que también ha sido vinculado con la regulación de la expresión del receptor de andrógenos (AR), el cual tiene como ligando a la testosterona y DHT. Estos andrógenos se sintetizan a través de la vía esteroidogénica, la cual se ha encontrado alterada en CaP.

Con los antecedentes mencionados se plantea la siguiente hipótesis: “El factor de transcripción ZEB1 disminuye la síntesis de andrógenos *in vitro*”. Para responder esto se propone como objetivo general: Determinar los cambios inducidos por ZEB1 y las alteraciones asociadas a la síntesis de andrógenos y su receptor *in vitro*, en la línea celular de cáncer prostático DU145. Para evaluar lo anteriormente propuesto se determinará mediante qRT-PCR, western blot o inmunocitoquímica los niveles de mRNA, proteínas y localización celular de marcadores de TEM, AR y de la vía esteroidogénica, en la línea celular de cáncer de próstata DU145 con silenciamiento de ZEB1. Además se detectará la presencia de testosterona y DHT en el medio de cultivo de estas líneas celulares. Se espera que a menor expresión de ZEB1 se induzca un fenotipo más epitelial y que aumenten los niveles de andrógenos y su receptor. Esto permitirá dilucidar si ZEB1 está involucrado en los cambios de la esteroidogénesis intratumoral durante la TEM en CaP.

## **ABSTRACT**

In Chile, prostate cancer is currently the second leading cause of cancer-related deaths in men. Among the factors contributing to tumor progression towards metastasis, epithelial to mesenchymal transition program (EMT) has been highlighted as a key part in the increase in malignancy, by promoting a change in tumor cells towards a mesenchymal phenotype, characterized by a loss in cell-cell adhesions and by a modification in the apicobasal polarity of epithelial cells, making the cells more migratory and invasive. This process is controlled by the e-cadherin repressor ZEB1. ZEB1 has also been involved in the regulation of the expression of the androgen receptor, whose ligands are testosterone and DHT. These androgens are synthesized through the steroidogenic pathway, which has been reported to be altered in prostate cancer.

With all this information the following hypothesis is proposed: “The transcription factor ZEB1 promotes tumoral malignancy by diminishing the androgens synthesis capacity *in vitro*”. To answer this, the general objective will be: Determine changes and alterations induced by ZEB1 in the androgens synthesis and their receptor *in vitro*, in the prostate cancer cell line DU145. To answer what has been proposed, qRT-PCR, Western blot and immunocytochemistry will be used to determine the mRNA, protein levels and cellular localization of EMT markers and enzymes of the steroidogenic pathway in the DU145 cell line with ZEB1 silencing. The concentrations of testosterone and DHT in the culture medium of these cells will also be determined. It is expected that a lower expression of ZEB1 will induce a more epithelial phenotype with higher levels of androgens and their receptor. This will help to understand the role of ZEB1 in the changes in intratumoral steroidogenesis during the epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer.

# Índice de Contenidos

## I. INTRODUCCIÓN

I.1. Cáncer de próstata: Incidencia y Prevalencia .....	8
I.2. Anatomía y fisiología normal de la glándula prostática .....	8
I.3. La transición epitelio mesénquima .....	10
I.4. Marcadores de transición epitelio mesénquima .....	11
I.5. ZEB1: El Regulador Maestro .....	12
I.6. ZEB1 y el Receptor de Andrógenos .....	14
I.7. La Vía Esteroidogénica .....	16
I.8. Andrógenos y cáncer de próstata .....	22
<b>II. HIPÓTESIS .....</b>	<b>24</b>
<b>III. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>24</b>
<b>IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>24</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
V.1. Cultivo celular .....	25
V.2. Transducción con vector de silenciamiento en células DU145 .....	25
V.3. qRT-PCR .....	26
V.4. Western Blot .....	26
V.5. Inmunocitoquímica .....	27
V.6. Medición de testosterona y DHT en el medio de cultivo celular a través de ELISA...	28
V.7. Análisis estadísticos .....	30
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>VIII. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
<b>IX. REFERENCIA .....</b>	<b>67</b>

## ABREVIATURAS

3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ hidroxioesteroide deshidrogenasa/isomerasa
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -hidroxioesteroide deshidrogenasas
ADT	Terapia de privación de andrógenos
AKR1	Aldo-ceto reductasas
AR	Receptor de andrógenos
AREs	Elementos de respuesta a andrógenos
CaP	Cáncer de próstata
CYP11A1	Colesterol side-chain cleavage enzyme
CYP17A1	Citocromo P450 A1
CK	Citoqueratinas
CSC	Cancer Stem Cells
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	5 $\alpha$ -dehidrotestosterona
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HSP	Proteína heat shock
FAD	Flavoproteína
FMN	Flavina mononucleótido
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MET	Transición mesénquima epitelio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
TEM	Transición epitelio mesénquima
HSP	Heat Shock Protein

PAP	Fosfatasa acida prostatica
POR	P450 oxidoreductasa
PSA	Antígeno prostático específico
StAR	Steroid acute regulatory protein
ZEB1	Zinc finger E-box binding 1



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Cáncer de próstata: Incidencia y prevalencia**

En el mundo, el cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer con mayor incidencia en hombres, constituyendo el 15% del total de los cánceres detectados en el sexo masculino, produciéndose para el año 2012 aproximadamente 1,1 millones de nuevos diagnósticos<sup>1</sup>. En Chile las estadísticas muestran que para el año 2012 la incidencia del CaP es de 61,3 por cada cien mil hombres, mientras que la prevalencia entre hombres de 40 y 59 años es de 9,2 cada mil hombres. En cuanto a la mortalidad, esta ha ido aumentando progresivamente en los últimos años hasta llegar a 23 por cada cien mil hombres. Constituyendo así la segunda causa de muerte por cáncer en el sexo masculino con aproximadamente 2045 muertes por año. Sin embargo la mortalidad vinculada a esta enfermedad depende del grado de diferenciación tumoral, el que se asocia con la probabilidad de metástasis y por lo tanto con el momento del diagnóstico<sup>2</sup>. Actualmente se espera que el 99% de los hombres diagnosticado con adenocarcinoma prostático clínicamente localizado sobrevivan al menos cinco años después del diagnóstico, en cambio para los pacientes que presentan metástasis la tasa de supervivencia se reduce a tan solo 28%<sup>3</sup>. Esto se debe principalmente a que en estadíos avanzados el tratamiento no resulta efectivo por lo que el desarrollo de nuevas investigaciones que abarquen esta etapa de la enfermedad son de altísima relevancia.

Entre los factores de riesgo que se asocian al CaP se ha establecido que la edad corresponde al principal factor, debido a que presenta una alta incidencia en hombres mayores de 50 años y a que estudios de autopsia han detectado este tipo de cáncer en más del 70% de los hombres en la octava década de vida<sup>2</sup>. Adicionalmente análisis epidemiológicos han relacionado la raza, la dieta y la historia familiar como factores de riesgo, aunque presentan una menor relevancia<sup>4</sup>.

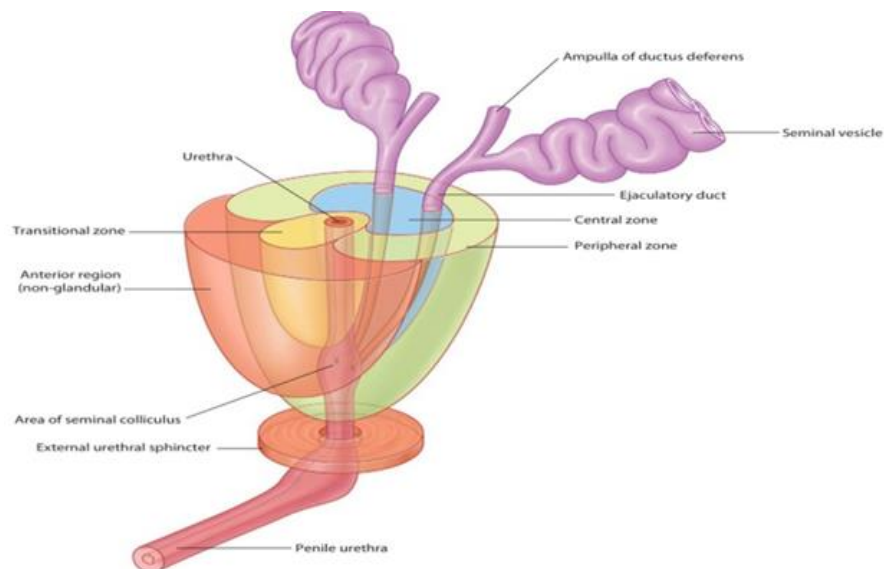
### **I.2. Anatomía y fisiología normal de la glándula prostática**

La próstata es una glándula exocrina que forma parte del sistema reproductor masculino. Esta se ubica en la pelvis; por debajo de la vejiga urinaria, delante del recto y rodeando la primera porción de la uretra. Su función consiste en aportar diferentes compuestos al fluido seminal tales como; fosfatasa acida prostática (PAP) y antígeno prostático específico (PSA) los que tienen la

función de proteger y nutrir a los espermatozoides. Durante la eyaculación, el fluido es expulsado hacia la uretra donde se mezcla con las secreciones provenientes de las vesículas seminales, constituyendo así la secreción por parte de la glándula prostática aproximadamente el 30% del volumen total del semen<sup>5</sup>.

El desarrollo de la próstata comienza durante la embriogénesis tardía bajo la influencia de andrógenos que generan la morfología ductal-acinar característica. El crecimiento continúa después del nacimiento hasta que se alcanza la madurez sexual. En cambio en adultos la glándula se encuentra en un estado de quiescencia, con pocas células mitóticas y apoptóticas<sup>4</sup>.

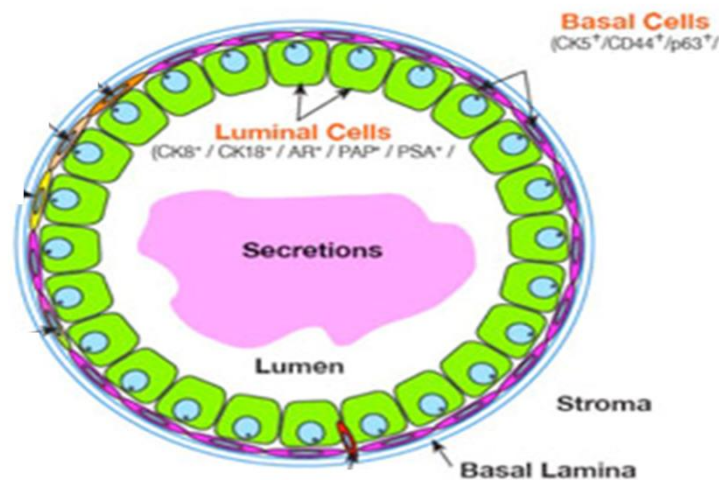
Anatómicamente se distinguen cuatro zonas dentro de la próstata: (1) Una zona periférica, compuesta en un 70% por tejido glandular y donde comúnmente se desarrollan los carcinomas (2), una zona central, que rodea los conductos eyaculadores, (3) una zona de transición (4) y una zona anterior (Figura 1)<sup>6</sup>.



**Figura 1. Zonas anatómicas de la próstata.** En la imagen se observa a la derecha la zona central y periférica mientras que a la izquierda se muestra la zona de transición y anterior<sup>6</sup>.

A nivel histológico, la próstata presenta dos compartimientos: epitelial y estromal, los cuales están separados por una membrana basal que contiene diversas moléculas de matriz extracelular, que son producidas tanto por las células epiteliales como las estromales. A su vez el epitelio se divide en células luminales y basales que forman dos capas separadas. La capa de células

luminales está formada por células epiteliales columnares polarizadas que se encargan de producir las secreciones prostáticas <sup>4</sup>. En cambio la capa de células basales separa las células luminales del estroma y permite la renovación de las células secretoras<sup>7</sup>. Se ha determinado que ambas capas expresan distintos marcadores proteicos y presentan distintos grados de diferenciación. Las células luminales constituyen un tipo de células terminalmente diferenciadas que se caracterizan por presentar altos niveles del receptor de andrógenos (AR), PSA y citoqueratinas (CK) como la CK8 y CK18. Mientras que las células basales son menos diferenciadas y expresan altos niveles de CK5, CK14 y CD44 y bajos niveles de AR, PSA y CK18 <sup>4,7</sup> (Figura 2).



**Figura 2. Esquema que representa a las células del epitelio prostático.** En la imagen se muestran las células basales y epiteliales con sus respectivos marcadores de expresión<sup>7</sup>.

### **I.3. La transición epitelio mesénquima**

Como se describió anteriormente el CaP presenta una alta mortalidad al llegar a estadios avanzados de la enfermedad con la consecuente generación de metástasis<sup>3</sup>. En los últimos años se ha reportado que durante el avance de la enfermedad ocurre una activación anormal del programa de transición epitelio mesénquima (TEM), el cual contribuye durante la progresión tumoral hacia un cambio fenotípico más agresivo. La TEM es un proceso fisiológico reversible que se caracteriza por una pérdida de la adhesión celular y por un cambio en la polaridad ápico-basal de las células epiteliales, convirtiéndolas en células con un fenotipo mesenquimal con propiedades migratorias e invasivas<sup>8</sup> (Figura 3). Este proceso ocurre normalmente durante la embriogénesis temprana y posibilita la migración y redistribución de las células de la blástula en

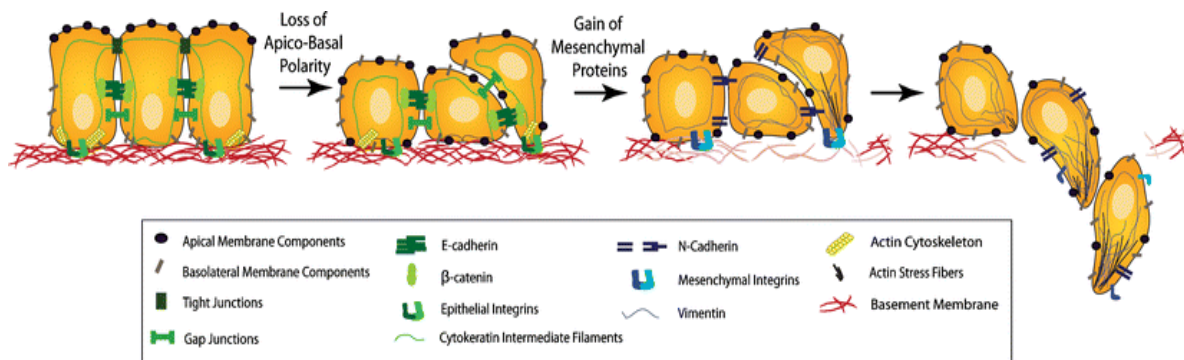
las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo)<sup>9</sup>. Sin embargo en los últimos años también se ha destacado su participación en distintos tipos de cáncer, incluyendo al de próstata, donde una serie de eventos atribuidos a la TEM permitirían que las células neoplásicas escapen desde el tumor primario, invadan el estroma, entren a la circulación sanguínea o linfática y se diseminen hacia otros sitios generando metástasis, la que ocurre preferentemente en huesos, cerebro y nódulos linfáticos. La activación del programa de TEM podría darse a través de factores solubles que son secretados desde el estroma o a la infiltración de células inmunes que invaden las células tumorales y activan vías de señalización como Wnt/ $\beta$ -catenina, FGF y TGF- $\beta$ , los cuales convergen en la activación de factores de transcripción centrales que median la TEM, siendo de especial relevancia los factores ZEB1, SNAIL y TWIST<sup>10</sup>. Es así, que la TEM corresponde a un programa de transdiferenciación que depende de las señales del microambiente y que es controlado por factores de transcripción, los cuales regulan la expresión de proteínas involucradas en la polaridad celular, contactos célula-célula, estructura del citoesqueleto y degradación de la matriz extracelular, confiriendo a las células tumorales la capacidad de poder migrar e invadir tejidos, además de provocar la represión de genes relacionados con la diferenciación y las propiedades epiteliales<sup>11</sup>.

#### **I.4. Marcadores moleculares de transición epitelio mesénquima**

Las células que inician el programa de TEM presentan un cambio morfológico desde célula con fenotipo epitelial a célula con fenotipo mesenquimal, lo cual ha permitido definir en ellas un perfil característico de alteraciones moleculares, tanto a nivel de expresión como de localización celular<sup>12</sup>. Entre los marcadores canónicos de TEM esta vimentina, que es una proteína que compone el citoesqueleto formando parte de los filamentos intermedios encargada de proporcionar resistencia contra estrés mecánico. La expresión de vimentina es muy baja en células epiteliales y aumenta drásticamente cuando se adquiere el fenotipo mesenquimal. Confiriéndole a las células una alteración morfológica y aumento de la motilidad. Adicionalmente vimentina tiene un rol como molécula de señalización, ya que se ha determinado que interacciona con Erk fosforilado protegiéndolo de la inhibición por fosfatasas<sup>13</sup>.

Otra de las moléculas importantes que disminuyen su expresión es E-cadherina y su descenso se considera crucial para el desarrollo de la TEM. En las células epiteliales E-cadherina se ubica en las

uniones adherentes mediante la adhesión intercelular, además de esto posee una región citosólica que posibilita, a través de su unión a  $\beta$ -catenina, el anclaje al citoesqueleto de actina. Estas uniones adherentes son críticas para mantener la polaridad apicobasal característica de las células epiteliales<sup>12</sup>. La represión del gen de E-cadherina es realizada directamente por el factor de transcripción asociado a la TEM ZEB1, lo que tiene implicancias tanto a nivel de la adhesión celular como en la proliferación tumoral, ya que la pérdida de la E-cadherina permite que  $\beta$ -catenina se trasloque al núcleo y se una a los factores de transcripción TCF/LEF que promueven la proliferación y supervivencia celular (vía Wnt/ $\beta$ -catenina)<sup>9</sup>.



**Figura 3. Transición epitelio mesénquima.** La TEM corresponde a un programa reversible de transdiferenciación que convierte células con fenotipo epitelial a células con fenotipo mesenquimal. En la imagen se muestra como las células epiteliales pierden su polaridad apico-basal alterando las uniones celulares lo que le confiere propiedades migratorias e invasivas<sup>14</sup>.

### I.5. ZEB1: El Regulador Maestro

De los factores mencionados anteriormente, ZEB1 (zinc finger E-box binding 1) es el que presenta mayor relevancia para la mantención de este programa en las células tumorales. ZEB1 es codificado por el gen *tcf8* el cual se encuentra altamente conservado y se encarga de regular procesos de desarrollo en el músculo, esqueleto y diferenciación linfocítica<sup>12</sup>. Sin embargo también se ha determinado que la expresión de ZEB1 está elevada en una gran variedad de tipos de cáncer como pulmón, páncreas, mama, colorectal y próstata relacionándose directamente con las variantes más agresivas que tienen un mayor poder metastásico<sup>15</sup>.

Estructuralmente contiene dos dominios dedos de zinc (C2H2), uno en el extremo amino terminal y otro en el extremo carboxilo terminal, un dominio central homeobox, un dominio SID y un dominio CID. Lo cual le permite interactuar con diferentes factores de transcripción, coactivadores y correpresores, específicamente histonas deacetilasas y metiltransferasas y complejos polycomb<sup>16</sup>.

Dentro de los procesos asociados a la TEM regulados por ZEB1 se ha descrito la represión de la expresión de E-cadherina, que se realiza mediante la interacción directa con la secuencia CANNTG (E-box) en la región promotora y por el reclutamiento de la histona deacetilasa SIRT1, lo que resulta en la condensación de la cromatina y el silenciamiento del gen<sup>14,15</sup>. Sin embargo E-cadherina no es la única molécula de adhesión que reprime ya que también se ha determinado que regula la expresión de otros componentes involucrados en la mantención de la polaridad celular epitelial reprimiendo directa o indirectamente genes como placofilina, ocludina, periplaquina, conexina 26 y epCAM. Cabe destacar que ZEB1 no solo se encarga de la represión de genes ya que también aumenta la expresión de vimentina. En consecuencia, ZEB1 es un factor crítico en el cambio de la polaridad epitelial hacia el fenotipo mesenquimal visto durante la TEM<sup>17</sup>.

Adicionalmente, en la cascada metastásica es de gran importancia la extravasación que permite a las células tumorales salir de circulación migrando a través de la monocapa de células endoteliales y así llegar a un órgano secundario. Henry et al., demostraron que este proceso está contralado en células de CaP por ZEB1 el cual aumenta la migración transendotelial dentro del contexto de la TEM<sup>17</sup>. Así, basta con solo la inducción de ZEB1 para adquirir las características de célula mesenquimal que produce un aumento de la migración, invasión y motilidad que se asocian a la progresión metastásica<sup>16</sup>.

ZEB1 también ha sido vinculado con otros aspectos importantes dentro de la progresión tumoral como lo es la proliferación y senescencia. Se ha sugerido que IGF-1 activa a ZEB1 a través de la cascada de señalización MAPK induciendo la proliferación en líneas de cáncer de próstata<sup>14</sup>.

Por otra parte ZEB1 también ha sido relacionado con la resistencia a la quimioterapia en CaP. Recientemente, Orellana-Serradell et al., han determinado que ZEB1 induce un aumento de la expresión del transportador de eflujo ABCC1 que se encarga de expulsar docetaxel, el cual es el

fármaco quimioterapéutico utilizado como primera línea en el tratamiento del cáncer prostático avanzado<sup>18</sup>.

Finalmente, es necesario mencionar que ZEB1 ha sido vinculado con la aparición de las denominadas Cancer Stem Cells (CSC) mediante la activación del programa de TEM. Las CSC son células no diferenciadas que se definen de acuerdo a la American Association for Cancer Research como células dentro de un tumor que poseen la capacidad de autorenovarse y generar linajes heterogéneos de células cancerosas que conforman el tumor<sup>7</sup>. Inicialmente estas células fueron descritas en cáncer de mama donde se observó que solo cien de estas células bastaban para, en el 89% de los casos, regenerar el tumor al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes<sup>8</sup>. Esto llevo a caracterizarlas como potentes iniciadores de tumores. Es así que las CSC se distinguen del resto de la población tumoral por su capacidad de autorenovación y su potencial para diferenciarse en células especializadas, siendo de altísima relevancia en el desarrollo de metástasis<sup>7</sup>.

Los antecedentes antes mencionados, permiten sugerir que ZEB1 contribuiría a aumentar tanto el poder metastásico, la resistencia a la quimioterapia<sup>18</sup> y la recidiva de la enfermedad.

#### **I.6. ZEB1 y el Receptor de Andrógenos**

Otro punto importante a destacar, es que en la línea celular PC3 se ha determinado que ZEB1 y el AR establecen un loop negativo de regulación, es decir, que cuando aumentan los niveles de ZEB1 la expresión de AR disminuye y viceversa<sup>19</sup>. Recientemente Sanders *et al.*, determinaron que el AR es un regulador directo del gen de ZEB1 ya que este se une a dos elementos de respuesta a andrógenos ubicados 1000pb próximos al sitio de inicio de la transcripción<sup>20</sup>.

El AR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que tiene como ligando a los andrógenos testosterona y 5 $\alpha$ -dehidrotestosterona (DHT). El receptor está constituido por un dominio N-terminal, un dominio de unión a ligando, un dominio de unión a DNA y una región bisagra que son determinantes para su función. Este receptor reside en el citoplasma de la célula donde permanece estabilizado por proteínas heat shock (HSP), tales como HSP90 y HSP70, con las que forma un complejo. La unión del ligando al AR provoca un cambio conformacional que genera la disociación de las HSP lo que permite su dimerización y posterior translocación al núcleo. En el

núcleo el AR se une a los elementos de respuesta a andrógenos (AREs)<sup>21</sup> que están ubicados en las regiones promotoras o enhancers, regulando así la expresión de una gran variedad de genes, entre ellos los de PSA, PAP y genes involucrados en el desarrollo del ciclo celular y apoptosis<sup>22</sup>.

Dentro de la próstata la activación del AR controla la organogénesis, morfología y el desarrollo normal de la glándula. Es así que en estadios tempranos del desarrollo embrionario los andrógenos actúan como los principales factores de crecimiento regulando la proliferación y diferenciación, en cambio en estadios tardíos aseguran la mantención y función prostática<sup>23</sup>.

Extensas investigaciones han sugerido que el AR está involucrado en la progresión del CaP, ya que podría estimular o suprimir la proliferación celular por distintos mecanismos que varían según la población celular. En las células lumbales del epitelio de próstata el AR promueve la tumorogénesis ya que genera una estimulación de la proliferación, mientras que en las células basales el AR actúa como supresor de la proliferación celular. Adicionalmente, la activación AR ha sido involucrada con el incremento del tipo de muerte celular llamado anoikis que se produce por desanclaje de la matriz celular, lo que está relacionado con la producción de metástasis<sup>24</sup>.

Otro punto importante que se debe considerar es la relación que existe entre el AR y la generación de CSC, ya que se ha determinado que el AR reprime la expresión de Sox2, el cual es un factor de transcripción que se encarga de mantener en las CSC la supervivencia, autorenovación y pluripotencia, lo que tendría implicancias en la desdiferenciación<sup>7,25</sup>.

Es así que la activación del AR debe integrar un balance entre las señales de proliferación y diferenciación para funcionar correctamente. En las células tumorales se produce una pérdida de este balance por una alteración de la activación del AR<sup>26</sup>. Se ha descrito que una de las formas de regular esta activación es a través de la síntesis de los ligandos testosterona y DHT, los cuales se producen a través de la vía esteroidogénica (Figura 4)<sup>21</sup>.



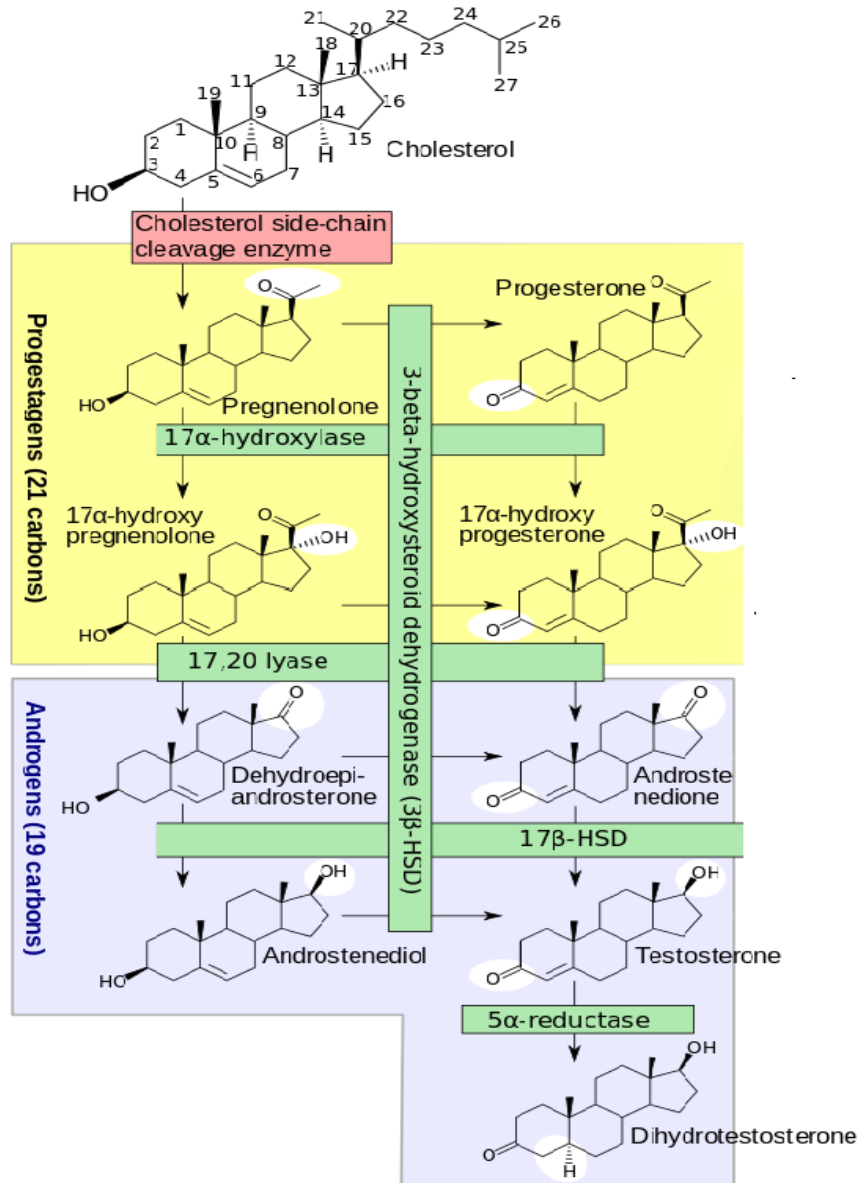
## I.7. La Vía Esteroidogénica

Los andrógenos son producidos principalmente por las células de Leydig en los testículos, bajo la regulación del eje hipotálamo - hipófisis que produce GnRH y LH, respectivamente. Sin embargo, dentro de los últimos años se ha descrito que la próstata también tiene potencial esteroidogénico, pudiendo sintetizar de igual forma tanto testosterona como DHT<sup>21</sup>.

La síntesis de todas las hormonas esteroidales utiliza como precursor a la molécula de colesterol, el cual se modifica a través de una serie de reacciones enzimáticas sucesivas para producir andrógenos<sup>27</sup>. En los tejidos esteroidogénicos el colesterol puede provenir de múltiples fuentes, que incluyen: (1) LDL (lipoproteína de baja densidad) (2) HDL (lipoproteína de alta densidad) (3) Colesterol libre, (4) Síntesis *de novo* de colesterol, siendo en todos los casos depositado en la membrana mitocondrial externa<sup>28</sup>.

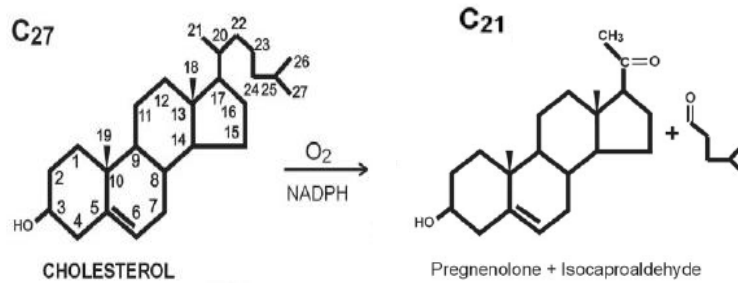
La vía esteroidogénica comienza con la translocación del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna. Este proceso es realizado por una proteína llamada StAR (steroid acute regulatory protein), que facilita el rápido flujo de colesterol hacia el interior de la mitocondria<sup>29</sup>. StAR es sintetizada como una proteína de 37kDa que es importada hacia la mitocondria, lugar donde es escindida generando la forma intramitocondrial de 30kDa. Estudios recientes señalan que StAR actúa exclusivamente en la membrana mitocondrial externa, sin embargo, el mecanismo de acción de esta proteína aún no ha sido determinado. No obstante, se ha sugerido que StAR formaría puntos de contacto entre la membrana mitocondrial externa e interna permitiendo así el flujo de colesterol a favor del gradiente de concentración<sup>30</sup>.

El proceso de translocación del colesterol anteriormente descrito es necesario debido a que solo en la membrana mitocondrial interna se encuentra la enzima CYP11A1 (colesterol side-chain cleavage enzyme). Esta enzima cataliza la conversión del colesterol en pregnenolona, lo que constituye el paso limitante de toda la vía esteroidogénica<sup>28,29</sup>.



**Figura 4. Vía esteroidogénica.** La ruta de síntesis comienza con el precursor colesterol el cual a través de una serie de reacciones enzimáticas sucesivas será convertido en los andrógenos testosterona y DHT<sup>28</sup>.

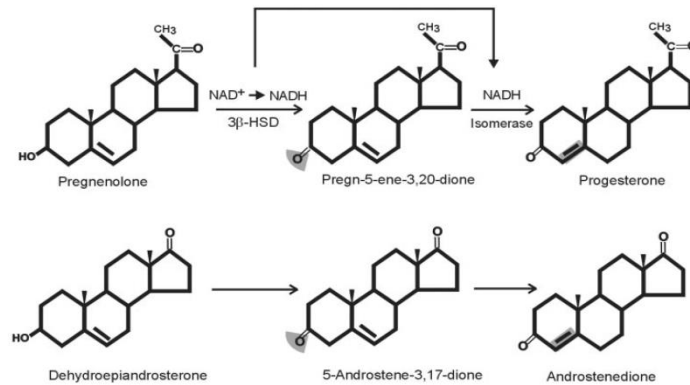
CYP11A1 es una enzima de la familia Citocromo P450 que tienen como característica poseer un grupo hemo en su estructura. Esta enzima cataliza tres reacciones de oxidación secuenciales en la molécula de colesterol, cuyo mecanismo consiste básicamente en dos hidroxilaciones en posición C20 y C22 seguida de una escisión entre ambos carbonos hidroxilados, lo que genera como producto al esteroide de 21 carbonos pregnenolona (primer intermediario de la ruta) e isocaproaldehído<sup>31</sup> (Figura 5)



**Figura 5. Reacción catalizada por CYP11A1.** Esta enzima cataliza el paso limitante de la ruta de síntesis de esteroides, transformando el colesterol (27C) en Pregnenolona (21C) e isocaproaldehído<sup>30</sup>.

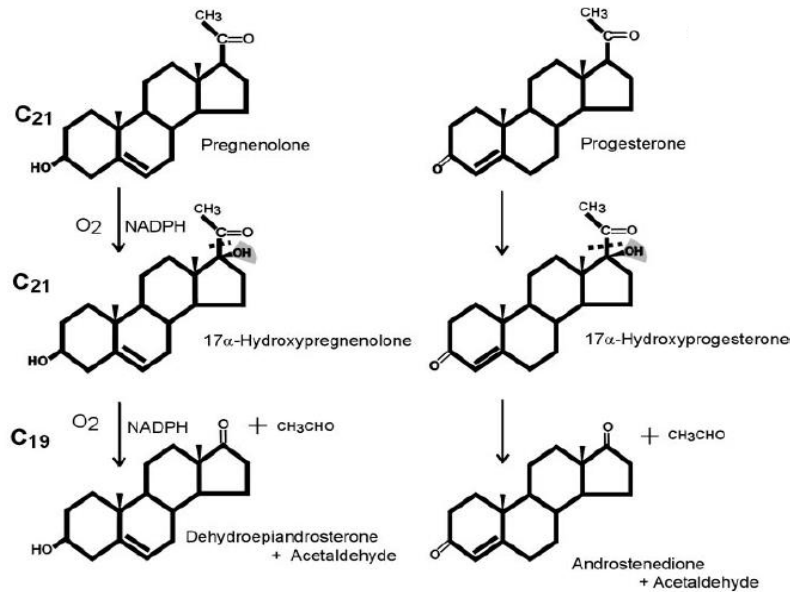
Para que CYP11A1 realice la catálisis requiere en total de tres moléculas de O<sub>2</sub> y de tres moléculas de NADPH<sup>30</sup>. Este último actúa como donador de electrones, utilizando para la transferencia la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La reacción consiste en que inicialmente NADPH transfiere sus electrones a la enzima ferredoxina reductasa que contiene un motivo FAD (flavoproteína). Posteriormente esta enzima dona los electrones a la proteína ferredoxina con la que interactúa electroestáticamente. Finalmente la ferredoxina se disocia de la ferredoxina reductasa y entrega los electrones al grupo hemo de la enzima CYP11A1<sup>26,32</sup>.

La Pregnenolona generada en la reacción enzimática anterior difunde desde la mitocondria hacia el retículo endoplasmático donde puede ser convertida a progesterona por acción de la enzima 3βHSD (3β hidroxisteroide deshidrogenasa/isomerasa)<sup>30</sup>. Esta enzima posee dos isoformas codificada por genes distintos. La isoforma 3βHSD I se expresa en algunos tejidos periféricos como la próstata, y la isoforma 3βHSD II se expresa en las gónadas y las glándulas adrenales<sup>33</sup>. Ambas enzimas catalizan la misma reacción, que consiste en la conversión de los hidroxisteroides; Pregnenolona, 17-OH-Pregnenolona, Dehidroepiandrosterona (DHEA) y Androstenediol a la forma cetoesteroide respectiva; Progesterona, 17-OH-Progesterona, Androstenediona y testosterona (Figura 4 y 6). El mecanismo de acción consta de dos reacciones secuenciales. La primera reacción enzimática es una deshidrogenación que requiere la coenzima NAD<sup>+</sup> generando un cetointermediario no estable y NADH. Luego, este NADH generado induce la actividad isomerasa de la enzima formándose así el producto final<sup>30</sup>



**Figura 6. Reacción enzimática catalizada por la enzima 3βHSD I y II sobre Pregnenolona y DHEA.** La enzima cataliza una deshidrogenación del grupo hidroxilo generando NADH que activa la isomerización para formar cetosteroides estables<sup>30</sup>.

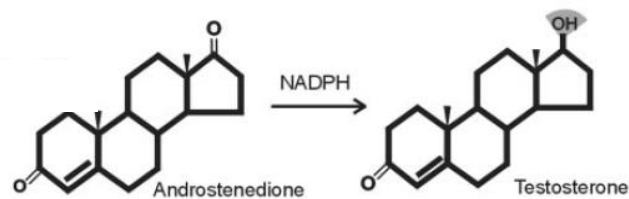
Posteriormente, tanto la pregnenolona como la progesterona pueden ser sustrato de la enzima CYP17A1 (Citocromo P450 A1) generando como producto DHEA y androstenediona, respectivamente (Figura 4 y 7). Esta enzima pertenece a la familia de Citocromo P450 y se localiza en el retículo endoplasmático, donde cataliza dos reacciones de oxidación consecutivas utilizando el sistema microsomal de transferencia de electrones. La reacción catalizada consiste básicamente en la 17α hidroxilación de los esteroides de 21 carbonos pregnenolona y progesterona, para producir los intermediarios estables 17-OH-pregnenolona y 17-OH-progesterona. Posteriormente la enzima cataliza la escisión de los carbonos 17-20 (actividad liasa) para producir los esteroides de 19 carbonos DHEA y androstenediona<sup>30</sup>. Exclusivamente esta segunda actividad de la enzima necesita de citocromo b<sub>5</sub>, el cual actúa como modificador alosterico incrementando aproximadamente 10 veces la actividad liasa de la enzima<sup>34</sup>. No obstante cada reacción requiere de una molécula de O<sub>2</sub> y de NADPH, el cual actúa como donador de electrones utilizando para ello a la citocromo P450 oxidoreductasa (POR). POR se encarga de aceptar los electrones desde el NADPH en el motivo FAD y los transfiere al motivo FMN (flavina mononucleotido) que esta contenido dentro de la misma proteína, para así donar los electrones directamente a la CYP17A1 y permitir su acción (sistema microsomal de transporte de electrones)<sup>31</sup>.



**Figura 7. Reacción enzimática catalizada por CYP17A1.** La enzima cataliza la 17 $\alpha$ -hidroxilación y posterior escisión entre los carbonos C17 y C20. Cada reacción requiere una molécula de O<sub>2</sub> y NADPH y usa el sistema microsomal de transporte de electrones<sup>30</sup>.

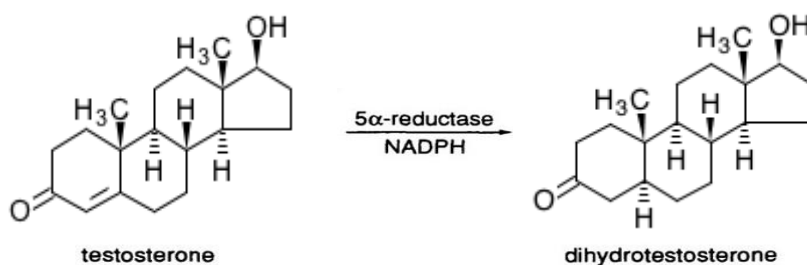
Seguidamente, la androstenediona y DHEA producida en el paso anterior son sustratos de la enzima 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas) que cataliza la conversión hacia androstenediol y testosterona, respectivamente. Finalmente, el androstenediol producido puede ser convertido a testosterona por acción de la enzima 3 $\beta$ -HSD, convergiendo así las dos vías paralelas de síntesis en la formación de uno de los andrógenos más importantes, la testosterona<sup>30</sup>.

Actualmente se han identificado 11 isoformas de la enzima 17 $\beta$ -HSD, siendo relevante para la androgénesis la isoforma microsomal 17 $\beta$ -HSD3 y 17 $\beta$ -HSD5, que se encuentra en la próstata. Esta enzima presenta un mecanismo que consiste en la conversión de los sustratos 17 $\beta$ -ceto hacia la forma activa 17 $\beta$ -hidroxi utilizando NADPH como cofactor (Figura 8)<sup>30</sup>.



**Figura 8. Reacción catalizada por 17 $\beta$ -HSD3.** Esta enzima cataliza la conversión de androstenediona hacia testosterona utilizando como cofactor a NADPH<sup>30</sup>.

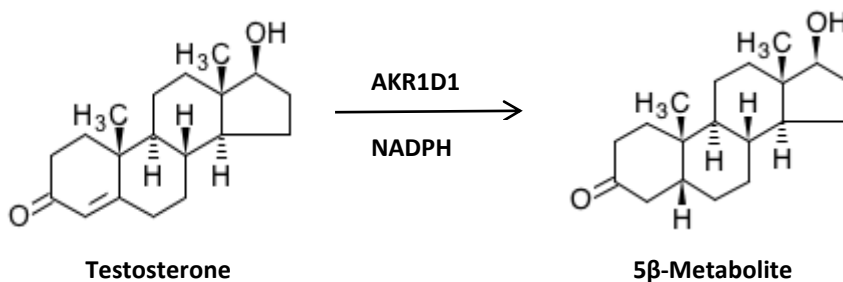
Finalmente, la testosterona producida puede ser convertida irreversiblemente a DHT, que es el andrógeno más potente que existe debido a que en comparación con la testosterona tiene dos veces más afinidad, una tasa de disociación del AR cinco veces menor y presenta una mayor resistencia a la degradación. Esta conversión la realiza la enzima microsomal  $5\alpha$ -Reductasa. Se han descrito tres isoformas de la enzima, siendo relevantes para la esteroidogénesis; la isoforma  $5\alpha$ -Reductasa 1 y  $5\alpha$ -Reductasa 2<sup>35</sup>. Estas enzimas catalizan la reducción del doble enlace en posición 4C-5C utilizando como cofactor NADPH (Figura 9). Sin embargo estas enzimas presentan distinta afinidad por la testosterona, encontrándose que  $5\alpha$ -Reductasa 2 tiene entre 10 a 15 veces más afinidad que la isoforma 1<sup>36</sup>.



**Figura 9. Reacción catalizada por las enzimas  $5\alpha$ -Reductasa 1 y  $5\alpha$ -Reductasa 2.** Estas enzimas catalizan la conversión de testosterona a DHT utilizando NADPH como cofactor<sup>35</sup>.

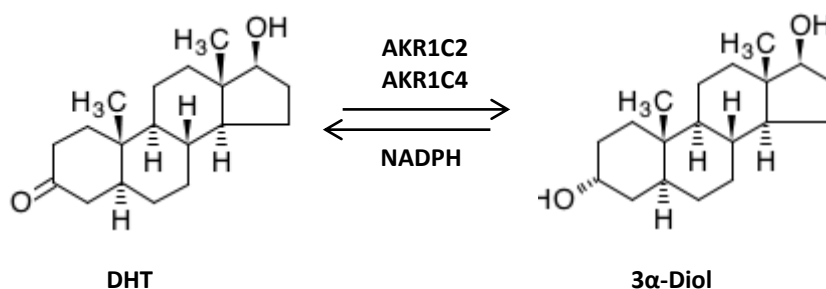
Por otra parte, la degradación de los intermediarios de la vía de síntesis está controlada por un grupo pequeño de enzimas miembros de la familia aldo-ceto reductasas (AKR1), están son: AKR1D1 y AKR1C (1-4). Estas enzimas regulan la concentración de los distintos productos de la vía utilizando NADPH como cofactor<sup>37</sup>.

La enzima AKR1D1 tiene un amplio espectro de sustratos y cataliza la inactivación irreversible de; progesterona, 17-OH-Progesterona, androstenediona y testosterona al convertirlos en  $5\beta$ -metabolitos<sup>37</sup> (Figura 10).



**Figura 10. Reacción catalizada por AKR1D1.** La enzima cataliza la reducción del carbono 5 en cis, produciendo la inactivación de testosterona<sup>37</sup>.

Las enzimas AKR1C (1-4) catalizan la inactivación reversible de DHT formando 3 $\alpha$ -dioles. Se destacan dentro del grupo las isoformas AKR1C2 y AKR1C4 por su preferencia hacia la reacción de formación de 3 $\alpha$ -dioles (inactivación) (Figura 11)<sup>38</sup>.



**Figura 11. Reacción catalizada por las enzimas AKR1C2 y AKR1C4.** Las enzimas catalizan la reducción del carbono 3 produciendo la inactivación de DHT<sup>36</sup>.

Finalmente, los productos de las reacciones de inactivación, 3 $\alpha$ -diol y 5 $\beta$ -metabolitos, son conjugados con ácido glucorónico para su posterior excreción por la orina<sup>37</sup>.

### I.8. Andrógenos y cáncer de próstata

A pesar de ya haberse dilucidado los mecanismos enzimáticos que rigen la esteroidogénesis, la regulación de estas enzimas dentro de la vía es un área de estudio muy poco clarificada especialmente en próstata y más aún en cáncer, siendo de altísima relevancia debido a la acción que tienen los andrógenos como activador del AR, el cual es considerado el principal regulador de la proliferación en CaP.<sup>39</sup>

Es así que se han encontrado distintos patrones de expresión tanto de las enzimas que participan en la esteroidogénesis como de las concentraciones de andrógenos en CaP<sup>40</sup>, no pudiéndose establecer un consenso que asocie los andrógenos al grado de malignidad tumoral<sup>41</sup>. Sin embargo, debido al rol del AR como factor inductor de la proliferación celular es que este ha sido utilizado como el principal blanco terapéutico para el tratamiento de este tipo de cáncer, específicamente se induce la supresión de la señalización del AR a través del bloqueo androgénico, lo que se conoce como terapia de deprivación de andrógenos (ADT). Esta terapia utiliza distintos blancos moleculares para lograr la ablación de los niveles de andrógenos circulantes. Actualmente se utilizan agonistas y antagonistas de la hormona GnRH, inhibidores de enzimas de la vía esteroidogénica como CYP17A1 o bloqueadores del AR. No obstante, este tratamiento es satisfactorio solo inicialmente produciendo la recurrencia del tumor y el desarrollo de metástasis aproximadamente a los 2-3 años y con características más agresivas<sup>24</sup>.

Cabe destacar el hecho de que se ha determinado que la ADT causa TEM, es decir que es la misma terapia la que provoca un aumento de la malignidad tumoral al inducir la activación de este programa de transdiferenciación en las células tumorales<sup>19</sup>. Esto evidencia aún más la importancia de ZEB1 en este contexto ya que no solo es un factor clave para el desarrollo de la TEM sino que también es un regulador del AR<sup>20</sup>. Sin embargo, aún no se ha establecido las alteraciones que se producen en la síntesis de andrógenos en relación a ZEB1. Basándose en todos los antecedentes explicados anteriormente es que se propone que ZEB1 altera la capacidad de síntesis de andrógenos en cáncer de próstata.



## **II. HIPÓTESIS**

“El factor de transcripción ZEB1 disminuye la síntesis de andrógenos *in vitro*”.

## **III. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los cambios inducidos por ZEB1 y las alteraciones asociadas a la síntesis de andrógenos y su receptor *in vitro*, en la línea celular de cáncer prostático DU145.

## **IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1-Evaluar los niveles de mRNA, proteínas y localización celular de las enzimas de la esteroidogénesis; StAR, CYP11A1, CYP17A1, 5 $\alpha$ -Reductasa 1, 5 $\alpha$ -Reductasa 2, AKR1C2, AKR1C4 y AKR1D1 en la línea celular DU145 de cáncer de próstata con silenciamiento de ZEB1.

2-Determinar la concentración de testosterona y DHT en el medio de cultivo de la línea celular DU145 de cáncer de próstata con silenciamiento de ZEB1.

3-Evaluar los niveles de mRNA, proteínas y localización celular del receptor de andrógenos en la línea celular DU145 de cáncer de próstata con silenciamiento de ZEB1.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1. Cultivo celular:

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: **PC3** (ATCC CRL-1435) es una línea celular de cáncer de próstata derivada de metástasis ósea de un varón caucásico de 62 años de edad. **LNCaP** (ATCC CRL-1740). Son células de adenocarcinoma de próstata humano derivado de la metástasis ganglionar supraclavicular izquierda de un varón caucásico de 50 años de edad. **RWPE1** (ATCC CRL-11609) es una línea celular de tejido epitelial de próstata derivada desde un hombre normal caucásico de 54 años de edad. **DU145** (ATCC HTB-81) es una línea celular de adenocarcinoma de próstata derivada de metástasis cerebral de un varón caucásico de 69 años de edad. **22RV1** (ATCC CRL-2505) es una línea celular de adenocarcinoma de próstata derivado de un xenoinjerto que se propagó en serie en ratones después de la regresión y recaída parental.

Las diferentes líneas celulares fueron sembradas usando distintos medios de cultivo, para el caso de DU145, LNCaP y PC3 se utilizó el medio Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal, mientras que las línea celular 22RV1 fue sembrada en RPMI (Roswell park memorial institute medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal y la línea celular RWPE1 en KSFM (Keratinocyte serum free medium) suplementado con 5 ng/ml EGF y 0,05 mg/ml BPE (extracto de pituitaria de bovino).

### V.2. Transducción con vector de silenciamiento en células DU145:

Se comenzó sembrando 100 mil células de DU145 en placas de 6 pocillos. Luego de transcurridas 24 horas las células fueron transducidas con 1µg de un vector (Gen Target Inc) que contiene un shRNA contra ZEB1 (pLenti-U6-shRNA(h ZEB1)-Rsv(RFP-Puro)). Se utilizó como control el mismo vector, pero con un shRNA contra una secuencia al azar. Además se añadió 6 µg/µl de polibreno para aumentar la eficiencia de la infección. Luego de transcurridas 24 horas desde la transducción se añadió 1,5 µg/ml de puomicina para seleccionar las células. Finalmente se comprobó por medio de microscopia de fluorescencia y qRT-PCR que el silenciamiento fuese efectivo. Como resultado se obtuvieron células con ZEB1 silenciado (**DU145 SH**) y células control (**DU145 SCR**). Estas líneas celulares generadas fueron amplificadas usando el medio de cultivo RPMI-Red free suplementado con 10% de suero bovino fetal e incubándose a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### V.3. qRT-PCR

Inicialmente se procedió a extraer el RNA utilizando trizol (invitrogen) en las distintas líneas celulares generadas y por medio de espectrofotometría a 260/280nm fue determinada tanto la pureza como la concentración del RNA extraído. Del producto obtenido, 100ng de RNA total de cada línea fue retrotranscrito para sintetizar cDNA utilizando un kit (applied biosystem) para finalmente realizar qPCR utilizando partidores específicos (Tabla 1) y SYBR Green (invitrogen) como forma de detección. La cuantificación de la expresión génica se realizó en triplicado con el método  $\Delta\Delta Ct$  y se normalizó con respecto a los niveles de pumilio (gen de expresión endógena).

**Tabla 1. Primers utilizados**

Marcador	Secuencias	
ZEB1	F: 5'-GTAAGAGGCTCACGAGTGT-3'	R: 5'-GCAGTAGGAGTAGCGGTGAT-3'
E-Cadherina	F: 5'-GAACGCATTGCCACATACAC-3'	R: 5'-ATTCGGGCTTGTTCATTC-3'
Vimentina	F: 5'-GCCAAGGCAAGTCGCG-3'	R: 5'-CATTTCACGCATCTGGCG-3'
StAR	F: 5'-TCCTTAGCAACCAAGAGGGC-3'	R: 5'-TGACATTGGGGTCCACTCC-3'
CYP11A1	F: 5'-CTGCATCTTCAGTCGTCTGTCC-3'	R: 5'-GGTGACCACTGAGAACCATTCC-3'
CYP17A1	F: 5'-GCCCATCTATTTCGGTTCGT-3'	R: 5'-CAGAGTCAGCGAAGGCGATA-3'
5 $\alpha$ - Reductasa 1	F: 5'-CATGTTCTCTCGTCCACTACGG-3'	R: 5'-CCAACAGTGGCATAGGCTTTC-3'
5 $\alpha$ - Reductasa 2	F: 5'-TTCCTTCGCGGTGCC-3'	R: 5'-CCATTTCAGTGCAGAAGGC-3'
AKR1D1	F: 5'-TGGTCACTTCATGCCTGTCC-3'	R: 5'-CAATATGGCGGAAGCCAGC-3'
AKR1C2	F: 5'-ACCATTGGAATGACATACTGCATC-3'	R: 5'-TGTGAGAGGAGGGACAGAGG-3'
AKR1C4	F: 5'-AGTGAAAGAAGTGGCAAGCAAT-3'	R: 5'-GTGCCAAATCCCAATACGGG-3'
AR	F: 5'-TTGTGTCAAAAAGCGAAATGG-3'	R: 5'-AGTCAATGGGCAAAACATGG-3'
PUMILIO	F: 5'-CGGTCGTCCTGAGGATAAAA-3'	R: 5'-CGTACGTGAGGCGTGAGTAA-3'

### V.4. Western Blot:

Inicialmente se realizó una extracción de proteínas, para ello se utilizó buffer de lisis RIPA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1% v/v, deoxicolato de sodio 1% p/v, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM,  $\beta$ -glicerofosfato 1 mM y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, a pH 7,4) mezclado con inhibidor de proteasas (Roche). El homogenizado obtenido fue centrifugado a 13500rpm por 15 minutos a 4°C. Finalmente se tomó el sobrenadante y se cuantificó por el método de Bradford.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de acrilamida en condiciones reductoras. En el gel se procedió a cargar 50 $\mu$ g de proteínas, además de 5 $\mu$ g del estándar de peso molecular (Thermo Fisher Scientific) y se inició la corrida electroforética a 100V. Luego se realizó la electrotransferencia a 50mA y 4°C por toda la noche utilizando para ello membranas de

nitrocelulosa (biorad), además se evaluó la eficiencia del proceso tiñendo la membrana con rojo ponceau. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% por dos horas, lavadas e incubadas toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla 2), para luego lavar e incubar con el respectivo anticuerpo secundario (Tabla 3) acoplado a la enzima HRP por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia con un equipo automático (Vilber Lourmat). La cuantificación de la cantidad de proteínas se realizó con el programa ImageJ usando como control de carga a la proteína  $\beta$ -actina.

**Tabla 2. Anticuerpos Primarios Western Blot**

Marcador	Catálogo	Anticuerpo secundario	Dilución
ZEB1	SC25388	Rabbit	1/200
E-Cadherina	BD610181	Mouse	1/500
Vimentina	M702001-2	Mouse	1/500
StAR	PA5-21687	Rabbit	1/20
CYP17A1	abc392	Rabbit	1/200
5 $\alpha$ - Reductasa 1	ab110123	Goat	1/500
5 $\alpha$ - Reductasa 2	ab27469	Goat	1/500
AKR1D1	PA5-28963	Rabbit	1/1000
AKR1C2	PA5-36572	Rabbit	1/500
AR	ab7494(44)	Mouse	1/200

**Tabla 3. Anticuerpos Secundarios Western Blot**

Anticuerpo	Catálogo	Dilución
Anti-Mouse	Jackson Immunoresearch 115-035-003	1/10000
Anti-Rabbit	Jackson Immunoresearch 111-035-003	1/10000
Anti-Goat	Jackson Immunoresearch 305-035-045	1/10000

### V.5. Inmunocitoquímica

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos y fijadas con buffer fosfato (PBS), paraformaldehído 3% y sacarosa 2% por 30 min. Luego se procedió a lavar con PBS y PBS-Glicina por 15 minutos cada uno para luego permeabilizar las células con 0,1% de tritón X-100 y lavar con PBS-Glicina. Las células se bloquearon en cámara húmeda con buffer PBS-Glicina más 1% de BSA por 10 min. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo primario necesario diluido

en solución de bloqueo (Tabla 4), dejando cubreobjetos sin incubar para ser utilizados como control. Después se procedió a lavar y hacer una segunda incubación en oscuridad con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488 (Tabla 5), ambos por 1 hora a 37°C. Además se incubó en oscuridad con DAPI (SC3598) para la detección nuclear. Finalmente se lavaron los cubreobjetos y se montaron con Mowiol Mounting Médium (Dako) para la observación posterior de las células con un microscopio Spinning Disk (Olympus IX 81) a 40x.

**Tabla 4. Anticuerpos Primarios Inmunocitoquímica**

Marcador	Código	Anticuerpo secundario	Dilución
ZEB1	SC25388	Rabbit	1/300
StAR	PA5-21687	Rabbit	1/100
CYP17A1	abc392	Rabbit	1/100
5 $\alpha$ - Reductasa 1	ab110123	Goat	1/200
5 $\alpha$ - Reductasa 2	ab27469	Goat	1/200
AKR1D1	PA5-28963	Rabbit	1/200
AKR1C2	PA5-36572	Rabbit	1/200
AR	ab7494(44)	Mouse	1/100

**Tabla 5. Anticuerpos Secundarios Inmunocitoquímica**

Anticuerpo	Catálogo	Dilución
Anti-Mouse	Thermo Fisher Scientific A11001	1/200
Anti-Rabbit	Thermo Fisher Scientific A11008	1/200
Anti-Goat	Abcam150141	1/200

#### **V.6. Medición de testosterona y DHT en el medio de cultivo celular a través de ELISA:**

Inicialmente se sembraron 400 mil células de DU145 SH y DU145 SCR en botellas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> y se les añadió 12 ml de medio RPMI-Red Free. Las células fueron mantenidas con el mismo medio de cultivo celular hasta el tercer día, en que este fue retirado y guardado a -80°C para el posterior análisis. Seguidamente las células fueron contabilizadas utilizando una cámara de Neubauer. Sin embargo para realizar la determinación de la concentración de andrógenos fue necesario realizar una extracción previa de esteroides desde el medio de cultivo celular y posteriormente realizar el ensayo de ELISA.

### **1-Extracción de esteroides desde el medio de cultivo celular:**

Se tomaron 300  $\mu$ L desde el medio de cultivo celular de DU145 SH y DU145 SCR, y se les añadió dietileter en una proporción 5:1 (solvente/muestra), luego las muestras fueron vortexeadas por 2 min. y se permitió la separación de las fases por 5 min a 4°C. Posteriormente la fase orgánica fue retirada y puesta en otro tubo eppendorf. Luego a las muestras se les evaporó el solvente utilizando el equipo Speedvac (Savant SC110). Finalmente las distintas muestras fueron reconstituidas en 500 $\mu$ L de etanol al 10% para la cuantificación de testosterona, y en 500 $\mu$ L de metanol al 10% para la cuantificación DHT.

### **2-ELISA para testosterona y DHT.**

Inicialmente se construyó una curva de calibración. Para ello se pesaron cantidades de testosterona (Sigma T-1500) y DHT (Sigma D-073) sintética necesarias para obtener las concentraciones indicadas en las Tabla 6 y 10, posteriormente se tomaron las distintas cantidades de testosterona y DHT obtenidas y se diluyeron en etanol al 10% y metanol al 10%, respectivamente, para preparar 50ml de disolución utilizando matraces de aforo. Se obtuvieron así dos curvas de calibración de seis puntos cada una. De forma similar se preparó una muestra control de concentración 0,725ng/mL para testosterona y 375pg/mL para DHT.

Para la determinación de testosterona se utilizó el kit de ELISA de 96 pocillos Alpco (11-TESHU-E01) y para DHT se utilizó el kit Elisa Alpco (11-DHTHU-E01). Ambos ensayos se basan en el principio de competencia y tienen un método colorimétrico de detección. Inicialmente se añadió a la placa 50 $\mu$ L de cada calibrador, control y muestras en distintos pocillos por duplicado. Seguidamente a estos pocillos se les añadió 100 $\mu$ L de una solución que contiene el analito marcado con HRP, y se incubó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. Luego los pocillos fueron lavados tres veces con el buffer de lavado correspondiente, para posteriormente adicionar 150  $\mu$ L de TMB a cada pocillo e incubar por 15 min. a temperatura ambiente. Después de transcurridos 20min se detuvo la reacción añadiendo la solución de Stop. Finalmente se leyó la placa a 450nm.

### **V.7. Análisis estadísticos:**

Para los análisis estadísticos las muestras fueron procesadas como mínimo tres veces y los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  SEM. Para la elección de la línea celular a transducir se utilizó el test ANOVA de una vía y se compararon los valores respecto de la línea celular epitelial RWPE-1. En cambio para todo el resto de los análisis de western blot y qRT-PCR se usó el test mann whitney normalizando respecto a DU145 SCR. Además, como diferencia estadísticamente significativa se usó el valor de  $p < 0,05$ .

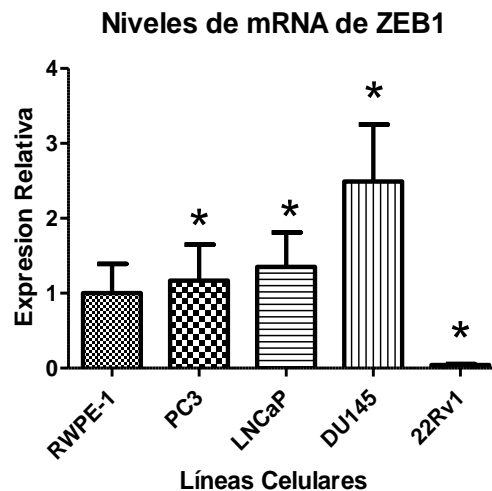
A la curva de calibración utilizada para determinar concentración de testosterona y DHT se le aplicó una regresión exponencial de decaimiento de dos fases y los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  SD. Además, como diferencia estadísticamente significativa también se usó el valor de  $p < 0,05$ .

## VI. RESULTADOS

### Establecimiento del modelo

#### I. Elección de la línea celular

Se determinaron los niveles de mRNA de ZEB1 en cuatro líneas celulares distintas de cáncer de próstata (PC3, LNCaP, DU145 y 22Rv1) y una línea epitelial de próstata (RWPE-1) que se utilizó como control. Los resultados se muestran a en la Figura 12.



**Figura 12. Niveles de mRNA de ZEB1 obtenidos a través de qRT-PCR en líneas celulares de cáncer de próstata.** Las cinco líneas celulares (PC3, LNCaP, DU145 y 22Rv1, además de la línea celular de epitelio de próstata RWPE-1) fueron normalizadas según los niveles de expresión de RWPE-1. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test ANOVA de 1 vía.  $n=4$ ,  $p<0,05$ .

A partir de los resultados obtenidos se observa que la línea celular DU145 tiene una expresión 2,5 veces mayor que la del control RWPE-1, y corresponde a la línea celular que presenta los mayores niveles de expresión de ZEB1 en comparación con el resto de las líneas analizadas. Es por ello que se seleccionó a las células DU145 para realizar un silenciamiento estable de ZEB1.

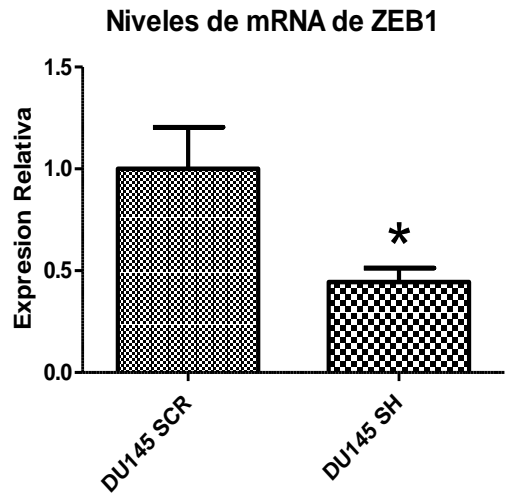
#### II. Transducción con vector de silenciamiento de ZEB1 en células DU145

Se realizó una transducción con vector lentiviral para lograr un silenciamiento estable de ZEB1 en células DU145. Como resultado se obtiene una línea celular control que fue transducida con un shRNA contra una secuencia aleatoria (DU145 SCR) y una línea celular que fue efectivamente

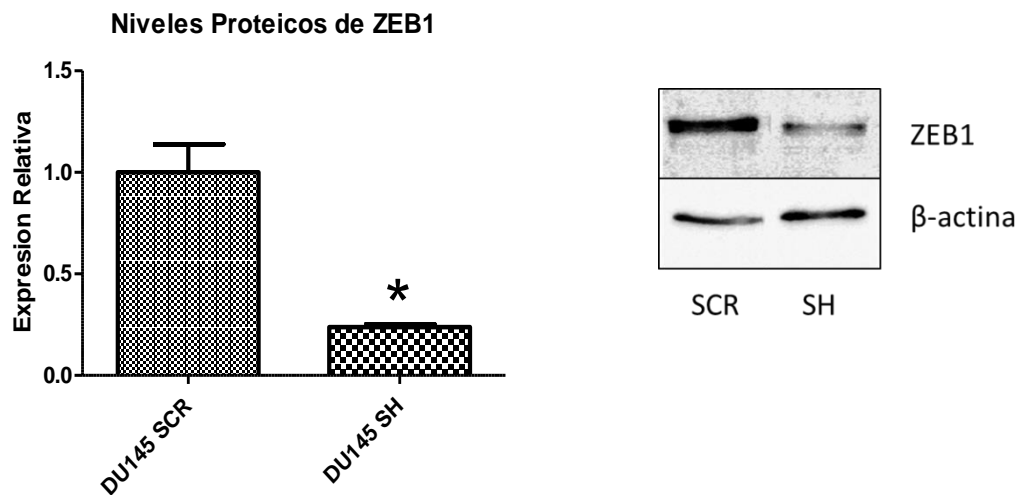


silenciada con un shRNA contra ZEB1 (DU145 SH). Se determinó la eficacia del procedimiento midiendo los niveles de ZEB1 en ambas líneas celulares a través de qRT-PCR y western blot. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13:

**A**



**B**



**Figura 13. Expresión de ZEB1 en células DU145 transducidas. A** Resultados obtenidos a través de qRT-PCR para ZEB1 en células con silenciamiento de ZEB1 (DU145 SH) y células control (DU145 SCR). **B** Western Blot para ZEB1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney.  $n=3$ ,  $p<0,05$ .

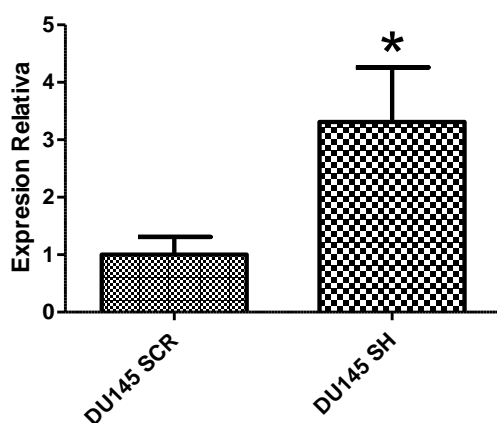
Se evidencia que el silenciamiento produjo una disminución de la expresión del mRNA de ZEB1 en un 60% aproximadamente, y una reducción de un 75% aproximadamente en los niveles de proteicos.

### III. Determinar los niveles de mRNA y proteínas de los marcadores de TEM E-cadherina y Vimentina, en líneas celulares de cáncer de próstata con silenciamiento de ZEB1.

Para determinar si el silenciamiento de ZEB1 produce un cambio en las células DU145 hacia un fenotipo más epitelial, se midieron los niveles de dos marcadores canónicos de TEM; E-cadherina y Vimentina, los cuales durante el proceso de TEM se encuentran bajos y altos, respectivamente. A continuación se muestran los resultados obtenidos a través de qRT-PCR y western blot para el análisis de E-cadherina (Figura 14) y vimentina (Figura 15).

A

#### Niveles de mRNA de E-Cadherina



B

#### Niveles Proteicos de E-Cadherina

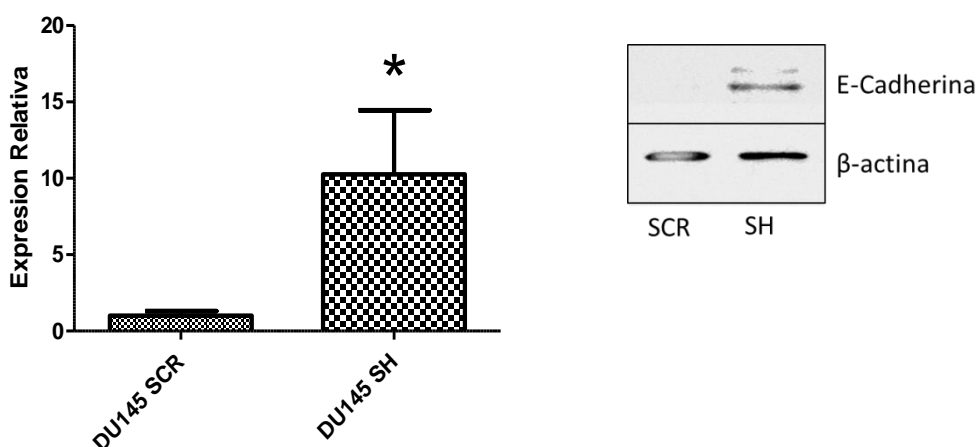
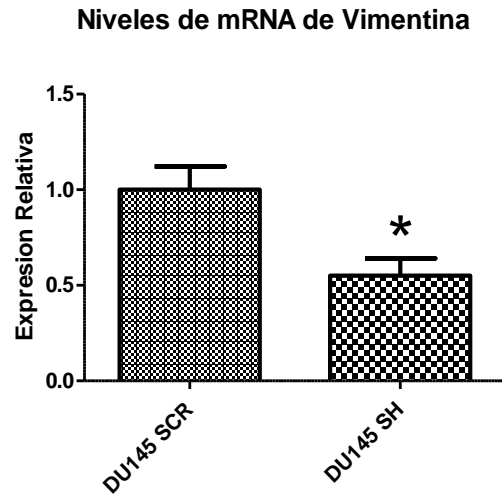
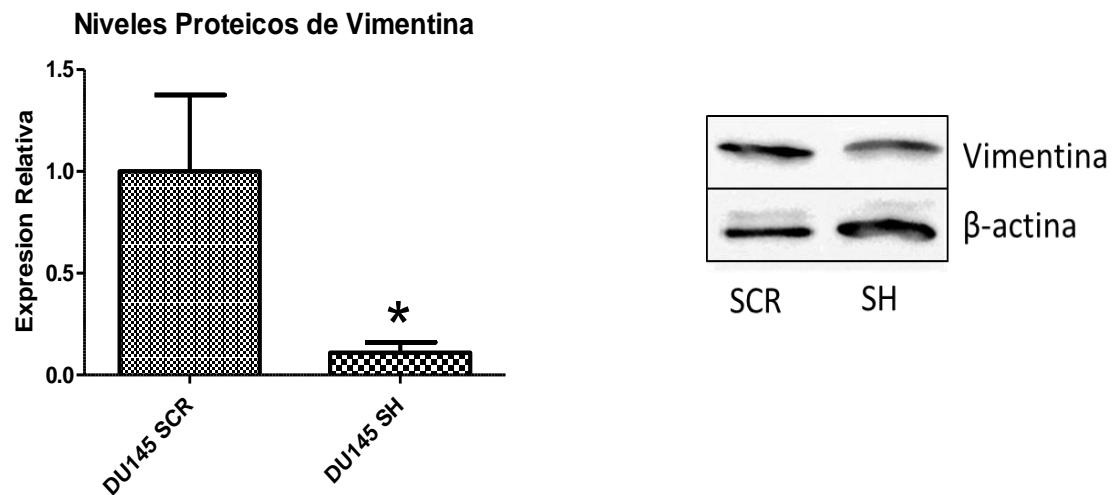


Figura 14. Expresión de E-Cadherina en DU145 SH y DU145 SCR. A qRT-PCR y B western blot para E-Cadherina en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05

A



B



**Figura 15. Expresión de vimentina en DU145 SH y DU145 SCR. A** qRT-PCR y **B** western blot para vimentina en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

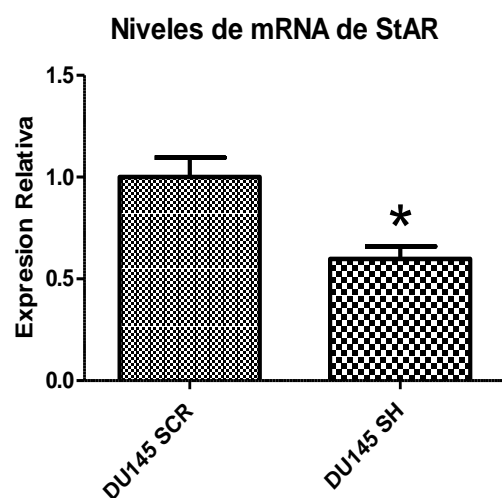
Los resultados obtenidos demuestran que el silenciamiento de ZEB1 genera una inversión de la expresión de los marcadores de TEM E-cadherina y vimentina, lo que indica una inducción de características más epiteliales en células DU145 SH.

Adicionalmente el incremento de E-Cadherina se utilizó como control de función de ZEB1 e indica que el silenciamiento fue efectivo en cambiar la expresión de ZEB1, ya que E-Cadherina es reprimida directamente por este factor de transcripción<sup>12</sup>.

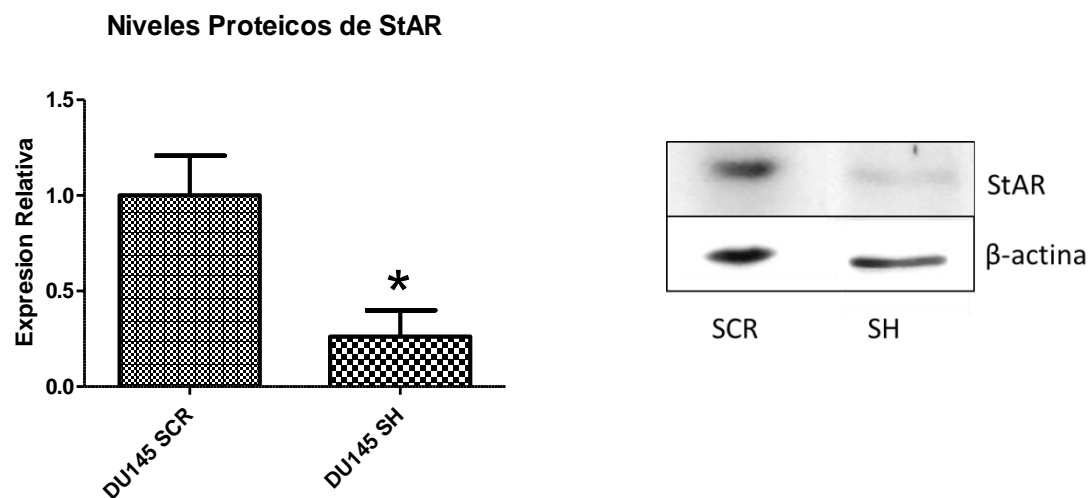
**Objetivo 1: Evaluar los niveles de mRNA, proteínas y localización celular de las enzimas de la esteroidogénesis; StAR, CYP11A1, CYP17A1, 5 $\alpha$ -Reductasa1, 5 $\alpha$ -Reductasa2, AKR1C2, AKR1C4 y AKR1D1 en líneas celulares de cáncer de próstata con silenciamiento de ZEB1.**

Para determinar los cambios que induce ZEB1 sobre la vía esteroidogénica se comenzó evaluando por qRT-PCR, Western blot e inmunocitoquímica la expresión del transportador StAR que participa en la primera etapa de la vía<sup>30</sup>. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

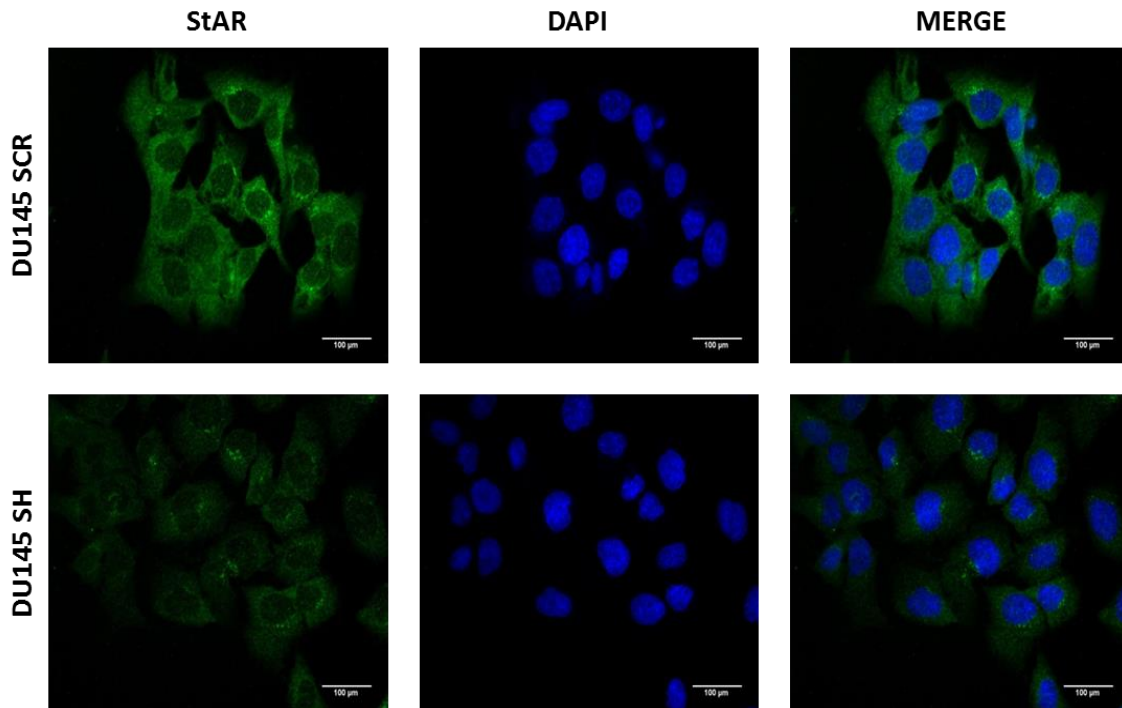
**A**



**B**



**Figura 16. Expresión de StAR en DU145 SH y DU145 SCR. A qRT-PCR y B Western blot para StAR en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.**



**Figura 17. Inmunocitoquímica para StAR en la línea celular DU145 con silenciamiento de ZEB1 (DU145 SH) y su correspondiente control de transducción (DU145 SCR).** A la izquierda se muestra en verde (Alexa 488) el marcador StAR, al centro se muestra en azul (DAPI) los núcleos celulares y a la derecha se muestra la superposición (Merge) de ambas imágenes. Fotografías obtenidas a través de un microscopio Spinning Disk a 40X.

A partir de los resultados obtenidos se determinó que los niveles de expresión del mRNA de StAR en la línea celular DU145 SH disminuyeron en un 40% en comparación con la línea control DU145 SCR. Sin embargo esto fue suficiente para producir una reducción del 75% de los niveles proteicos de StAR en DU145 SH (Figura 16). En cuanto a la localización subcelular de StAR, se observa que esta proteína presenta una localización preferentemente citoplasmática (Figura 17).

Posteriormente se analizó por qRT-PCR la enzima CYP11A1 que participa en el segundo paso de la vía, en el cual se convierte colesterol a pregnenolona<sup>31</sup>. Del análisis de los resultados se determinó que no hay una variación estadísticamente significativa, por lo tanto el silenciamiento de ZEB1 no ejercería un cambio en la expresión del mRNA de CYP11A1 (Figura 18).

### Niveles de mRNA de CYP11A1

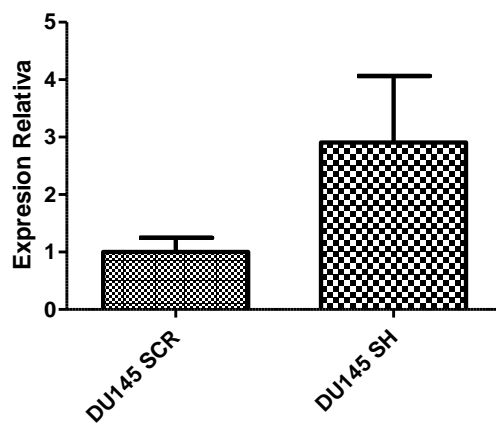


Figura 18. qRT-PCR para CYP11A1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=5, p<0,05.

Seguidamente, se analizó por qRT-PCR, western blot e inmunocitoquímica la enzima CYP17A1, que participa en el tercer y cuarto paso de la vía. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

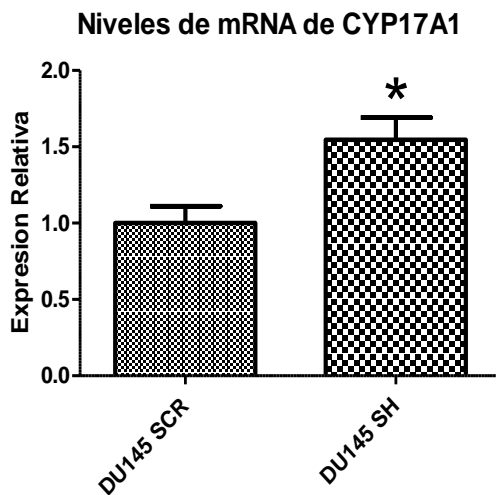


Figura 19. qRT-PCR para CYP17A1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

### Niveles Proteicos de CYP17A1

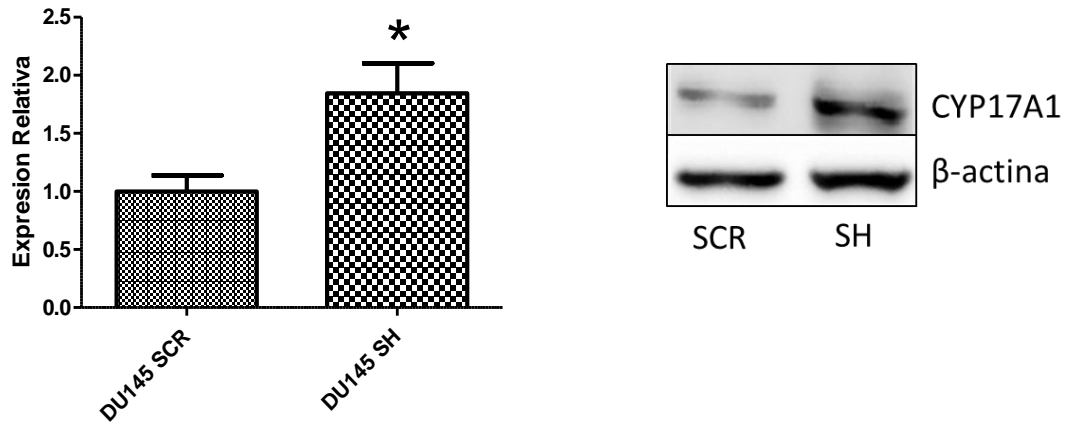


Figura 20. Western blot para CYP17A1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=2, p<0,05.

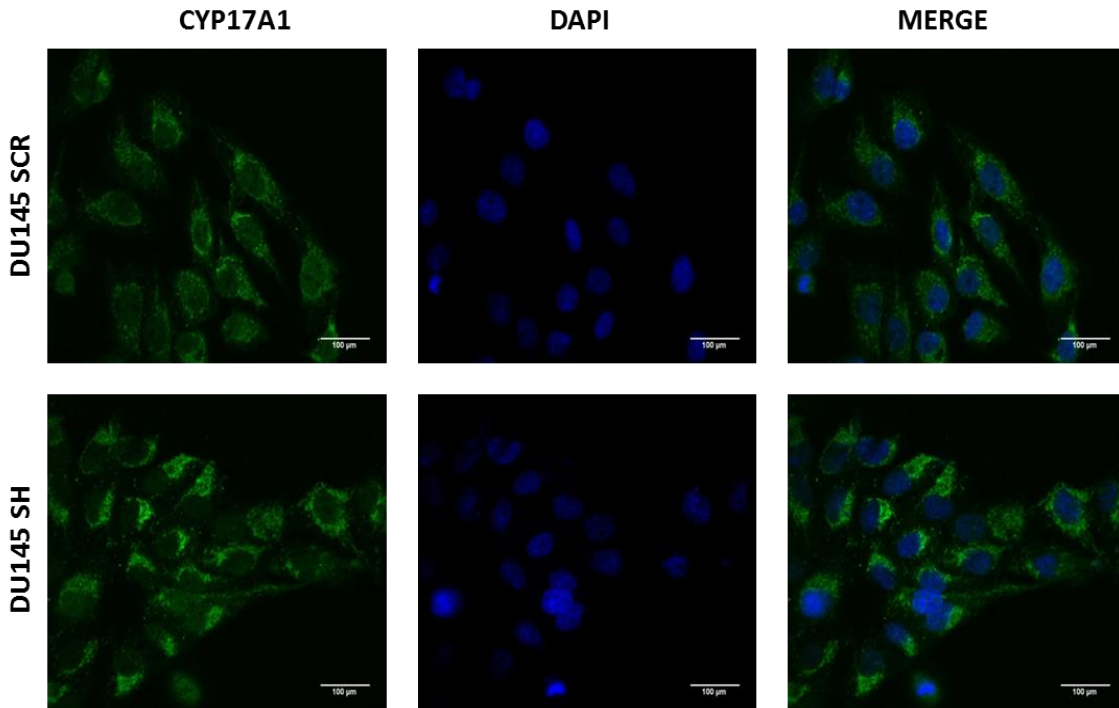
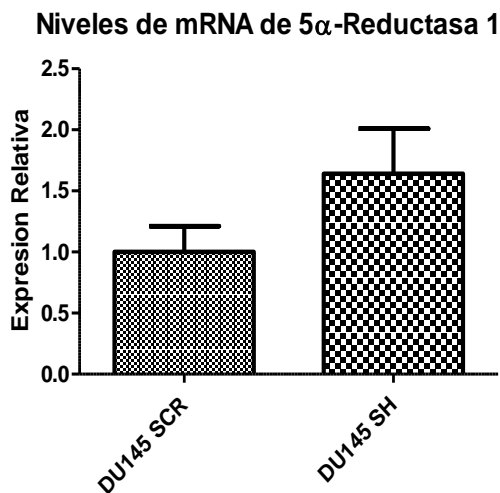


Figura 21. Inmunocitoquímica para CYP17A1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. A la izquierda se muestra en verde (Alexa 488) el marcador CYP17A1, al centro se muestra en azul (DAPI) los núcleos celulares y a la derecha se muestra la superposición (Merge) de ambas imágenes. Fotografías obtenidas a través de un microscopio Spinning Disk a 40X.



De los análisis realizados para CYP17A1 se determinó que el silenciamiento de ZEB1 produce un cambio en la expresión del mRNA de CYP17A1 de 1,5 veces en comparación con el control (Figura 19). Esto se correlaciona con los valores obtenidos para la expresión de proteínas, las cuales aumentaron 1,8 veces en comparación con el control DU145 SCR (Figura 20). En cuanto a la localización subcelular de CYP17A1 se observa que esta enzima se encuentra preferentemente en el citoplasma en las células DU145 SH y DU145 SCR. Además se aprecia una mayor intensidad de la señal de DU145 SH en comparación con DU145 SCR (Figura 21) lo que se correlaciona con los resultados obtenidos de expresión de proteínas para CYP17A1 (Figura 20).

Finalmente, dentro de las enzimas que participan en la síntesis de andrógenos se analizaron dos isoformas; 5 $\alpha$ -Reductasa 1 y 5 $\alpha$ -Reductasa 2, las cuales convierten testosterona a DHT. Los resultados para 5 $\alpha$ -Reductasa 1 se muestran a continuación:



**Figura 22. qRT-PCR para 5 $\alpha$ -Reductasa 1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR.** Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

### Niveles Proteicos de 5 $\alpha$ -Reductasa 1

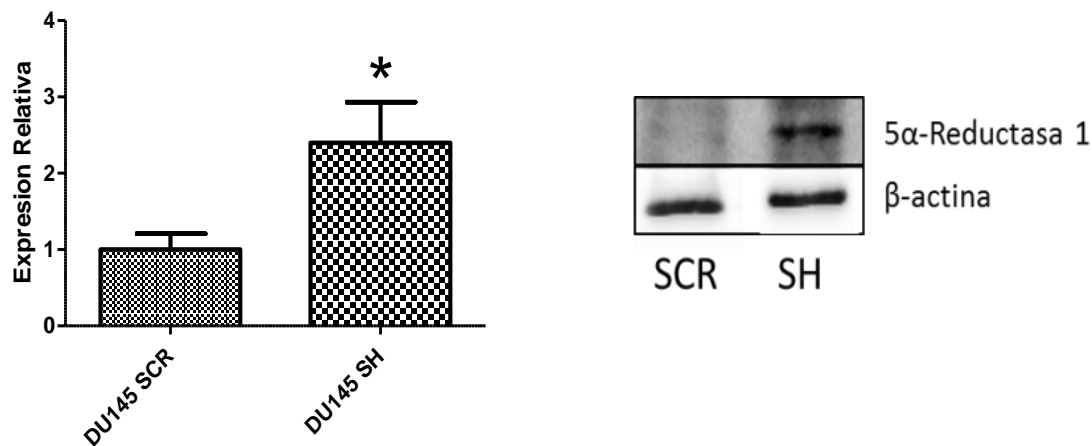


Figura 23. Western blot para 5 $\alpha$ -Reductasa 1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

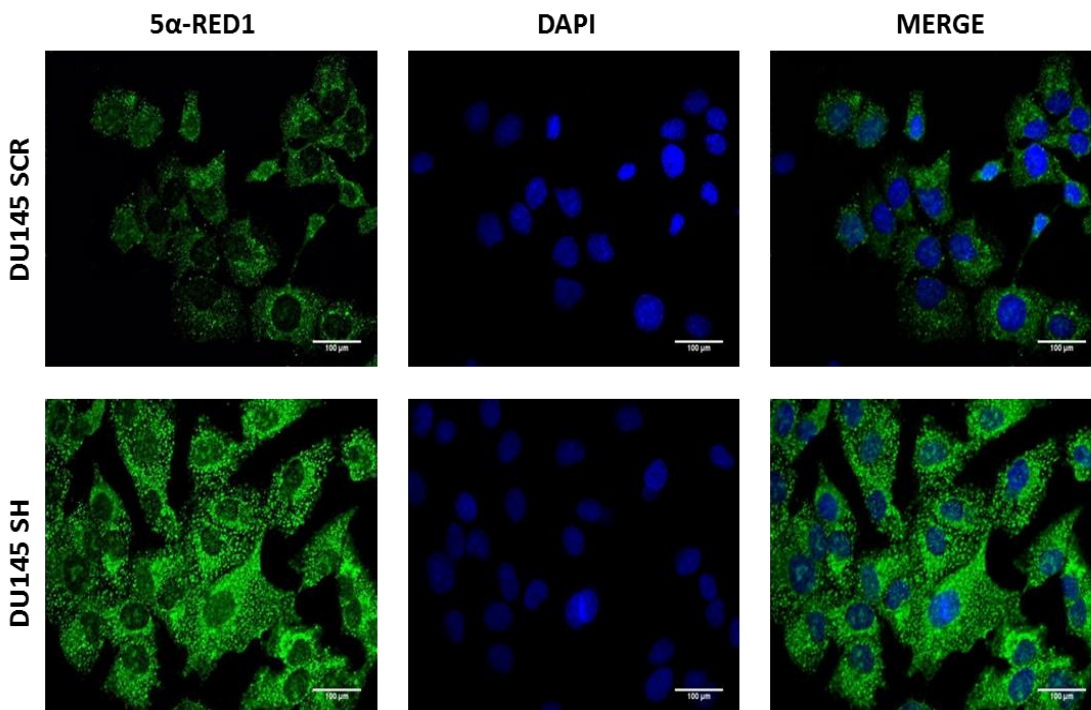
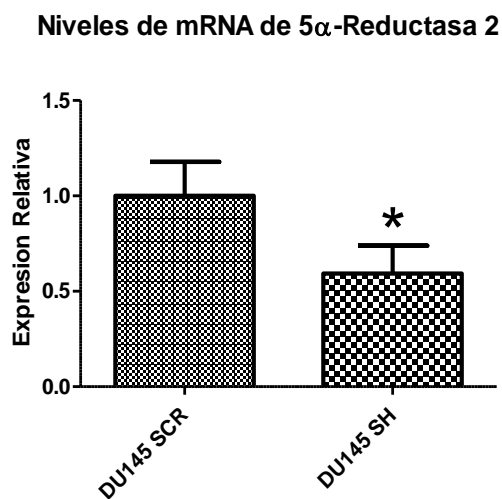


Figura 24. Inmunocitoquímica para 5 $\alpha$ -Reductasa 1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. A la izquierda se muestra en verde (Alexa 488) el marcador 5 $\alpha$ -Reductasa 1, al centro se muestra en azul (DAPI) los núcleos celulares y a la derecha se muestra la superposición (Merge) de ambas imágenes. Fotografías obtenidas a través de un microscopio Spinning Disk a 40X.

A partir de los experimentos realizados, se observa que si bien hay un aumento de 1,64 veces en el mRNA 5 $\alpha$ -Reductasa 1 en las células silenciadas, esta variación no resulta ser estadísticamente significativa, sin embargo se observa una clara tendencia al incremento (Figura 22). Por otra parte, la variación de los niveles proteicos de la enzima son estadísticamente significativos, y tienen un valor 2,4 veces mayor que el control (Figura 23). En cuanto a la localización subcelular de 5 $\alpha$ -Reductasa 1 se observa que esta enzima se encuentra localizada preferentemente en el citoplasma en las células DU145 SH y DU145 SCR. Además se aprecia una mayor intensidad de la señal de DU145 SH en comparación con DU45 SCR (Figura 24) lo que se correlaciona con los resultados obtenidos de expresión de proteínas para 5 $\alpha$ -Reductasa 1 (Figura 23).

De la misma forma, se determinaron los niveles de mRNA, proteínas y localización subcelular de la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa 2. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 25, 26 y 27.



**Figura 25. qRT-PCR para 5 $\alpha$ -Reductasa 2 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR.** Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

### Niveles Proteicos de 5 $\alpha$ -Reductasa 2

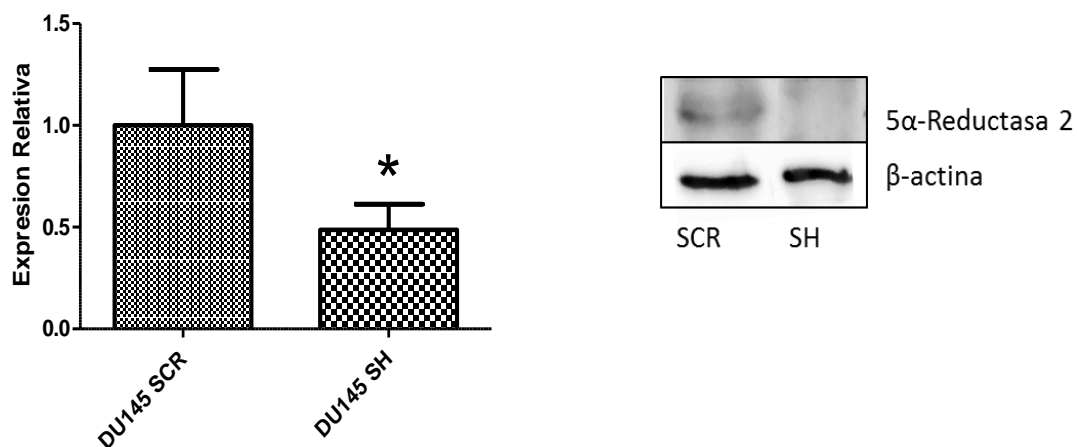


Figura 26. Western blot para 5 $\alpha$ -Reductasa 2 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

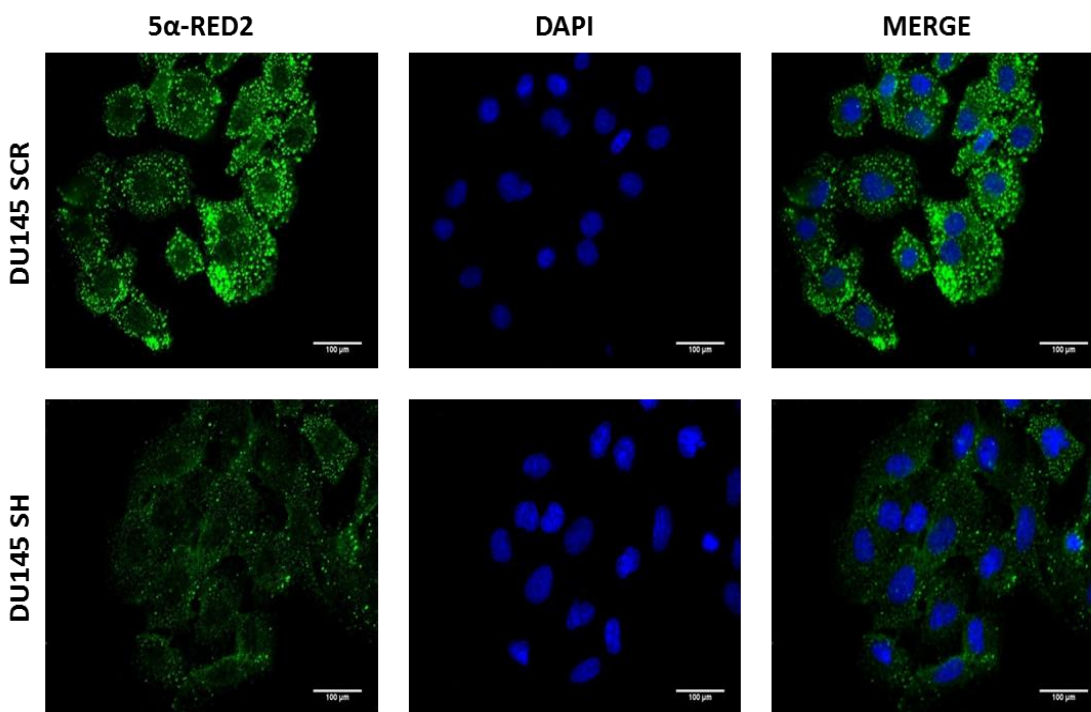
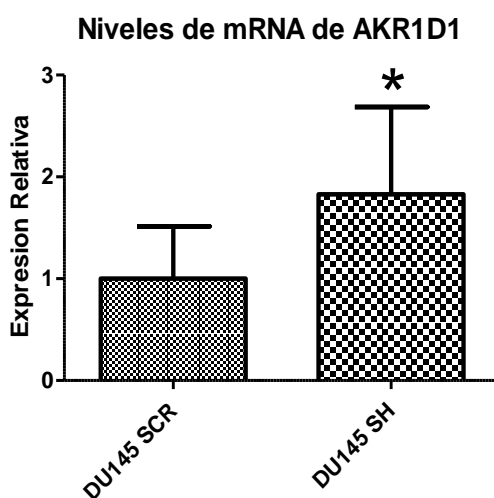


Figura 27. Inmunocitoquímica para 5 $\alpha$ -Reductasa 2 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. A la izquierda se muestra en verde (Alexa 488) el marcador 5 $\alpha$ -Reductasa 2, al centro se muestra en azul (DAPI) los núcleos celulares y a la derecha se muestra la superposición (Merge) de ambas imágenes. Fotografías obtenidas a través de un microscopio Spinning Disk a 40X.

Del análisis de los resultados obtenidos se determinó que el silenciamiento de ZEB1 produce una disminución de los niveles de mRNA de 5 $\alpha$ -Reductasa 2 en un 40% con respecto al correspondiente control (Figura 25). De forma similar, los niveles de proteínas disminuyeron en un 50% con el silenciamiento de ZEB1 (Figura 26). En cuanto a la localización subcelular de 5 $\alpha$ -Reductasa 2 se observa que esta enzima se encuentra preferentemente en el citoplasma en las células DU145 SH y DU145 SCR. Además se aprecia una menor intensidad de la señal de DU145 SH en comparación con DU45 SCR (Figura 27) lo que se correlaciona con los resultados obtenidos de expresión de proteínas para 5 $\alpha$ -Reductasa 2 (Figura 26).

Posteriormente, se analizó la enzima AKR1D1 que se encarga de la inactivación de progesterona, 17OH-progesterona, androstenediona y testosterona al convertirlos en 5 $\beta$ -metabolitos<sup>37</sup>. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:



**Figura 28.** qRT-PCR para la enzima AKR1D1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05

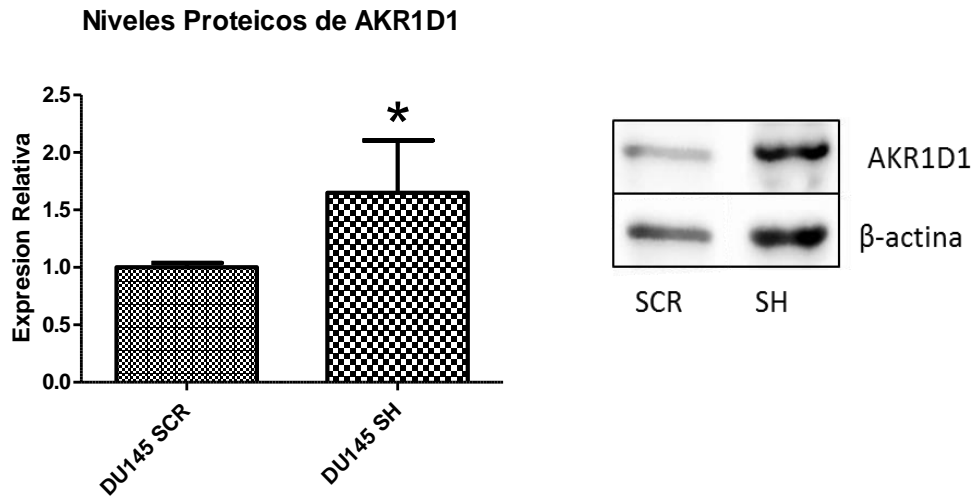


Figura 29. Western blot para la enzima AKR1D1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

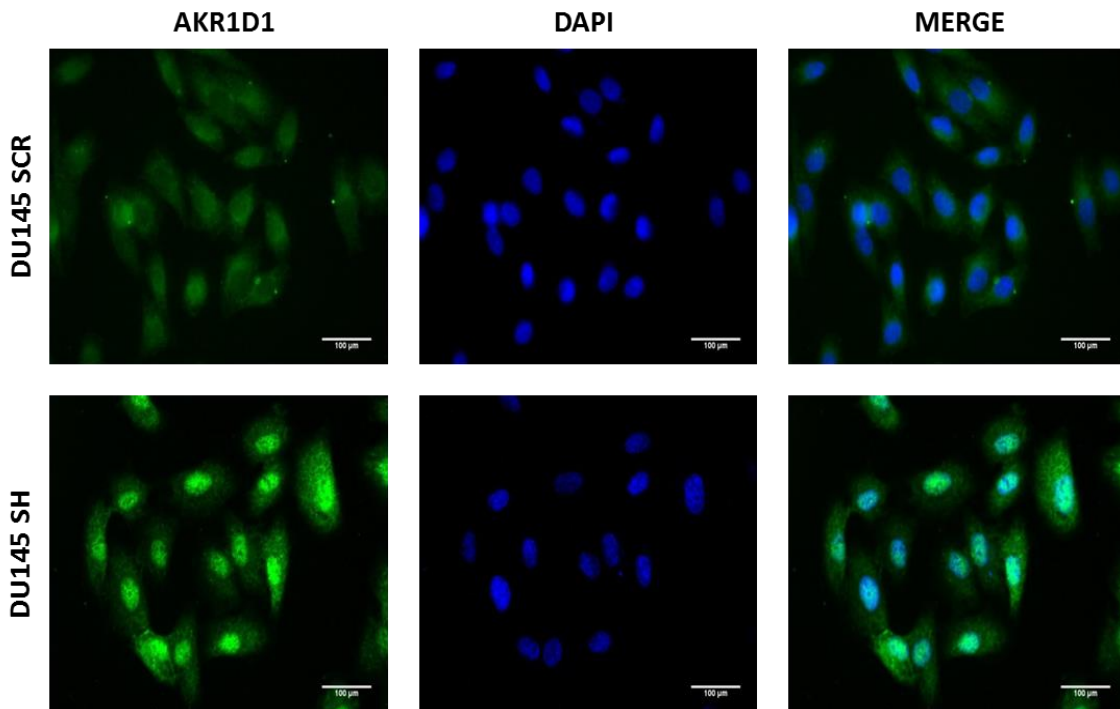


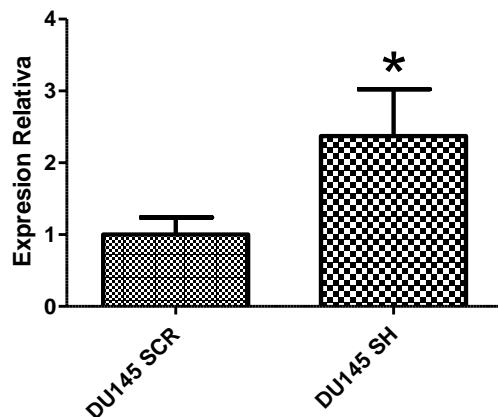
Figura 30. Inmunocitoquímica para AKR1D1 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. A la izquierda se muestra en verde (Alexa 488) el marcador AKR1D1, al centro se muestra en azul (DAPI) los núcleos celulares y a la derecha se muestra la superposición (Merge) de ambas imágenes. Fotografías obtenidas a través de un microscopio Spinning Disk a 40X.

Los resultados obtenidos demuestran que el silenciamiento de ZEB1 produce un aumento de 1,8 veces de los niveles de mRNA de AKR1D1 y un aumento de los niveles proteicos de 1,6 veces en comparación con DU145 SCR (Figuras 28 y 29). Por otra parte, a través del análisis de la inmunocitoquímica se observa que en las células DU145 SH la enzima AKR1D1 presenta una localización preferentemente nuclear. En cambio en DU145 SCR la marca se observa levemente más intensa en el núcleo en comparación con el citoplasma (Figura 30).

Finalmente se analizaron las enzimas AKR1C2 y AKR1C4 que participan en la inactivación de DHT. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

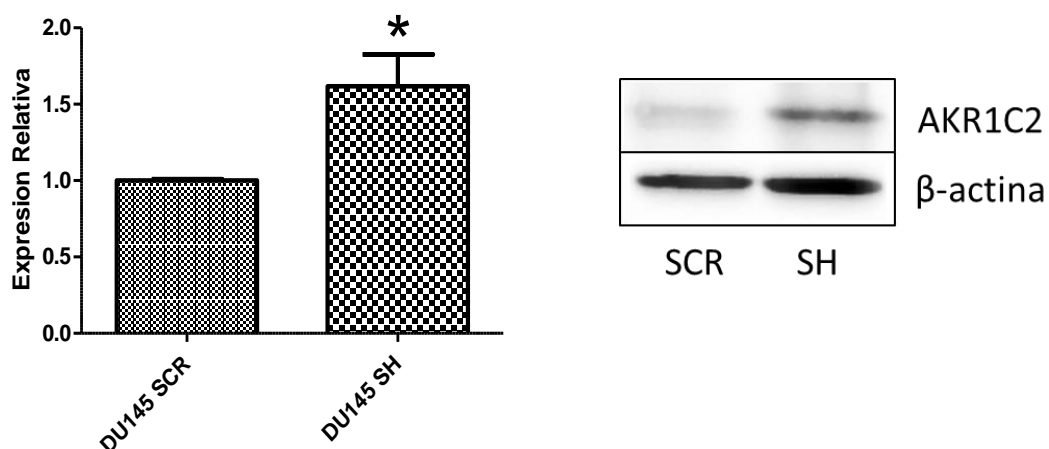
A

**Niveles de mRNA de AKR1C2**



B

**Niveles Proteicos de AKR1C2**



**Figura 31. Expresión de AKR1C2 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. A** qRT-PCR **B** Western blot para la enzima AKR1C2. Se observa que tanto los niveles de mRNA como de proteínas aumentan con el silenciamiento de ZEB1. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05

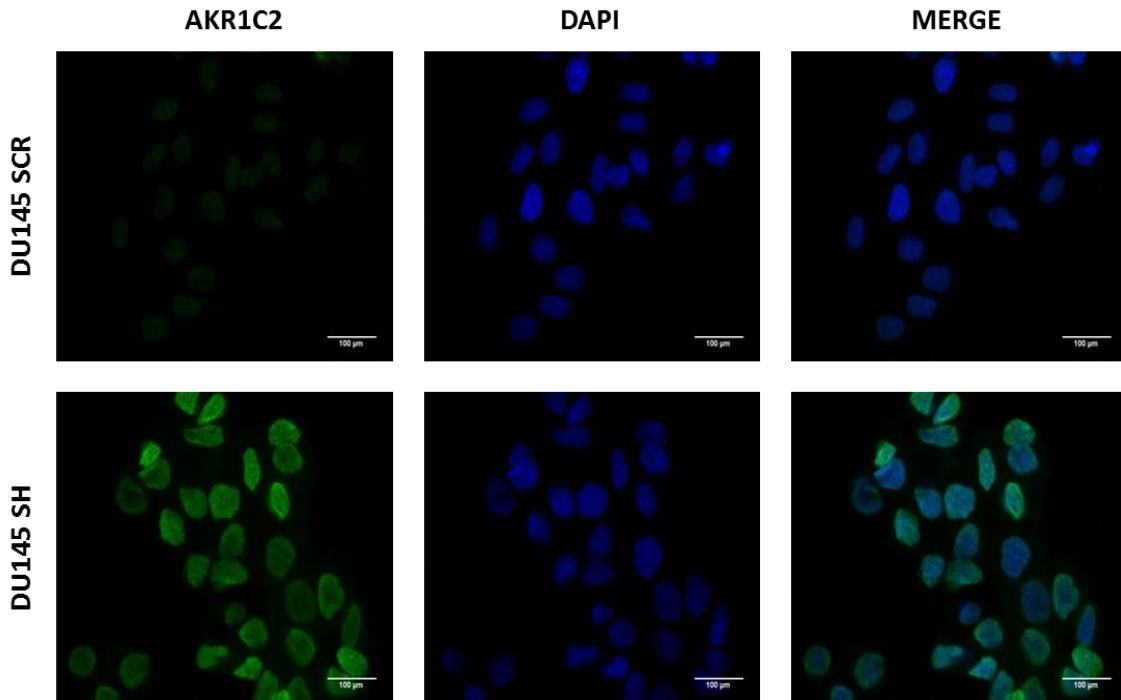


Figura 32. Inmunocitoquímica para AKR1C2 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. A la izquierda se muestra en verde (Alexa 488) el marcador AKR1C2, al centro se muestra en azul (DAPI) los núcleos celulares y a la derecha se muestra la superposición (Merge) de ambas imágenes. Fotografías obtenidas a través de un microscopio Spinning Disk a 40X.

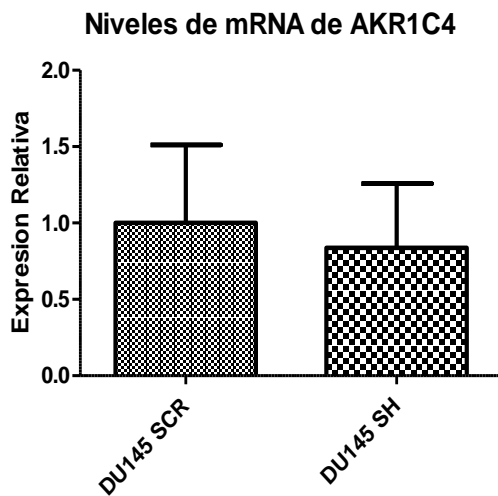


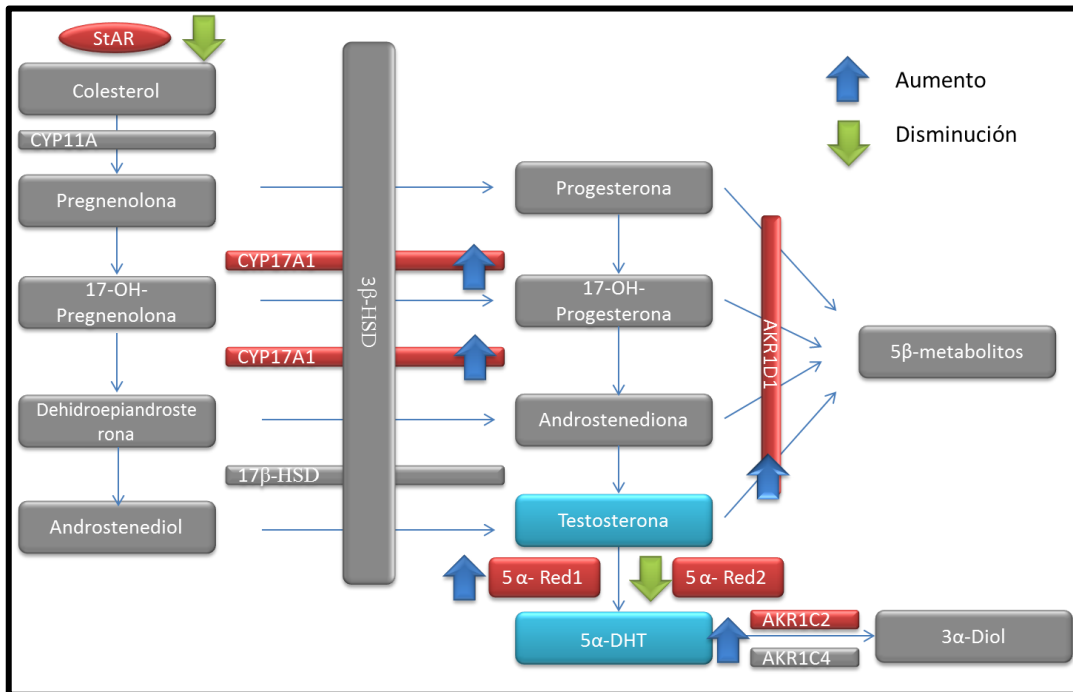
Figura 33. qRT-PCR para la enzima AKR1C4 en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Los resultados obtenidos a través de qRT-PCR muestran que no hay una variación estadísticamente significativa. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.



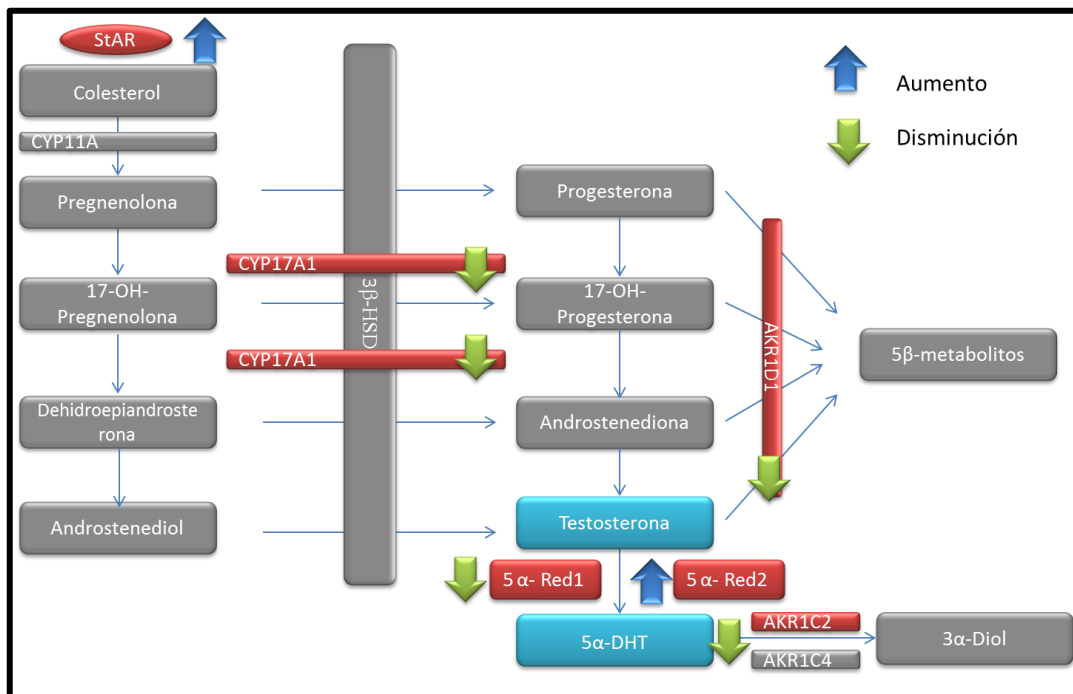
Los análisis realizados demuestran que el silenciamiento de ZEB1 produce un incremento de los niveles de mRNA de AKR1C2 de 2,3 veces y de los niveles proteicos de AKR1C2 de 1,6 veces con respecto al respectivo control (Figura 31). En cuanto a la localización subcelular, se observa que el marcador tiene una ubicación estrictamente nuclear en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Adicionalmente se aprecia una mayor intensidad de la señal de DU145 SH en comparación con DU45 SCR (Figura 32), lo que se correlaciona con los resultados obtenidos de expresión de proteínas para AKR1C2 (Figura 31)

Para el caso de AKR1C4 se observa una pequeña disminución del marcador en la línea celular DU145 SH con respecto al control DU145 SCR, sin embargo esta variación no es estadísticamente significativa, por lo tanto el silenciamiento de ZEB1 no tendría efecto sobre la expresión del mRNA de AKR1C4 (Figura 33).

**A. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE ZEB1 SOBRE LA VÍA ESTEROIDOGÉNICA.**



**B. EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE ZEB1 SOBRE LA VÍA ESTEROIDOGÉNICA.**



**Figura 34. Resumen de resultados obtenidos de la vía esteroidogénica. A.** Se indica en la figura los cambios determinados con el silenciamiento de ZEB1 en la vía esteroidogénica. **B** Efecto de la expresión de ZEB1 en la vía esteroidogénica sugerida a partir de los resultados del silenciamiento de ZEB1.

**Objetivo 2: Determinar la concentración de testosterona y DHT en el medio de cultivo celular de las líneas de cáncer de próstata con silenciamiento de ZEB1.**

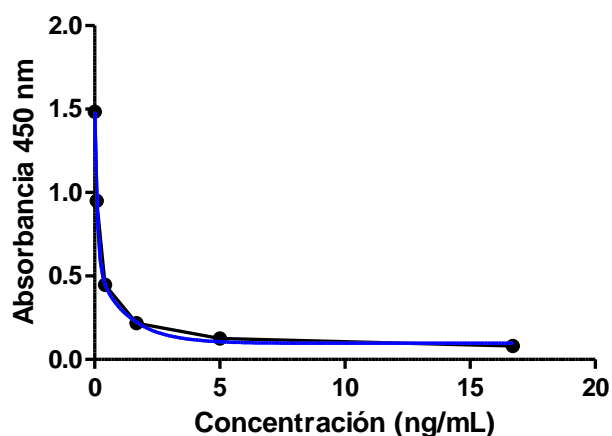
Con el propósito de evaluar el efecto que tienen los cambios en los niveles de expresión de las enzimas que participan en la síntesis y degradación de andrógenos que fueron analizadas en el objetivo anterior, se procedió a determinar la concentración de testosterona y DHT en el medio de cultivo celular a través de ELISA.

Para determinar la concentración de testosterona fue necesario realizar inicialmente una curva de calibración (Tabla 6 y Figura 35).

**Tabla 6. Curva de Calibración de Testosterona**

Calibrador	Concentración (ng/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Promedio Absorbancia	Desviación Estándar
A	0,000	1,509	1,458	1,484	0,036
B	0,080	0,944	0,959	0,952	0,011
C	0,420	0,455	0,440	0,448	0,011
D	1,670	0,216	0,219	0,218	0,002
E	5,000	0,126	0,126	0,126	0,000
F	16,700	0,077	0,085	0,081	0,006

### TESTOSTERONA



**Figura 35. Gráfica de la curva de calibración de testosterona.** En negro se muestran los valores obtenidos de absorbancia a 450nm. En azul se muestra la curva de regresión exponencial de decaimiento de dos fases aplicada. El valor de R obtenido fue de 0,9996.

Para validar la técnica utilizada se calculó la mínima dosis detectable, que corresponde a la concentración más baja del analito que es posible detectar con un 95% de confianza<sup>42</sup>, es decir, la concentración más baja que se puede diferenciar de la respuesta dada por el blanco. La mínima dosis detectable calculada fue de 1,441 (Tabla 7), por lo que al comparar con los resultados obtenidos de absorbancia de testosterona para la curva de calibración y para las muestras de DU145 SH y DU145 SCR (Tabla 7 y Tabla 8), se determinó que los resultados están dentro del rango detectable.

**Tabla 7. Mínima dosis detectable para testosterona**

Calibrador	Concentración (ng/mL)	Promedio Absorbancias	Desviación Estándar * 2	Mínima Dosis Detectable
A	0,000	1,484	0,072	1,411

**Tabla 8. Absorbancias de Testosterona en muestras DU145 SH y DU145 SCR.**

Muestra	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Promedio Absorbancias	Desviación Estándar
DU145 SH 1	0,621	0,623	0,622	0,001
DU145 SCR 1	1,137	1,102	1,120	0,025
DU145 SH 2	1,039	1,048	1,044	0,006
DU145 SCR 2	1,197	1,118	1,158	0,056
DU145 SH 3	0,768	0,753	0,761	0,011
DU145 SCR 3	0,950	0,960	0,955	0,007

Adicionalmente, para validar la técnica se procesó una muestra de testosterona de concentración conocida (0,725 ng/mL). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9. Se observa que el procesamiento de la muestra control dio un valor de concentración dentro del rango estimado como aceptable, por lo que el procedimiento analítico puede ser considerado como válido.

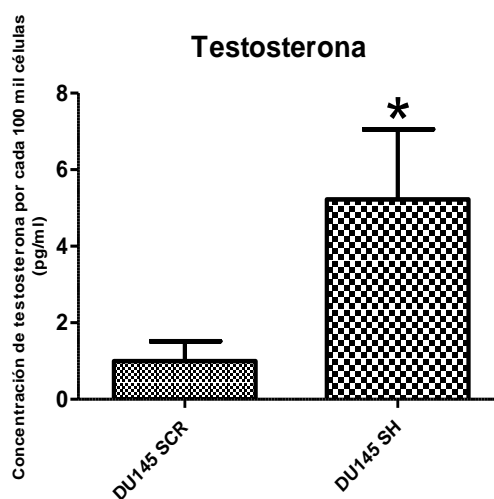
**Tabla 9. Control de Testosterona**

Calibrador	Concentración (ng/mL)	Concentración (ng/mL)	Desviación Estándar	Rango Aceptable (ng/mL)
Control	0,725	0,872	0,004	0,325 -1,025

Finalmente se muestran los valores de concentración de testosterona obtenidos en pg/mL por cada 100 mil células, para cada una de las tres muestras de DU145 SH y DU145 SCR (Tabla 10 y Figura 36).

**Tabla 10. Concentración de Testosterona en el medio de cultivo celular**

MUESTRA	Concentración (ng/mL)	Número de células totales	Concentración por 100 mil células (pg/mL)
DU145 SH 1	0,165	2260000	7,310
DU145 SCR 1	0,013	2220000	0,587
DU145 SH 2	0,026	1400000	1,889
DU145 SCR 2	0,007	2700000	0,256
DU145 SH 3	0,099	2355000	4,216
DU145 SCR 3	0,045	2580000	1,725



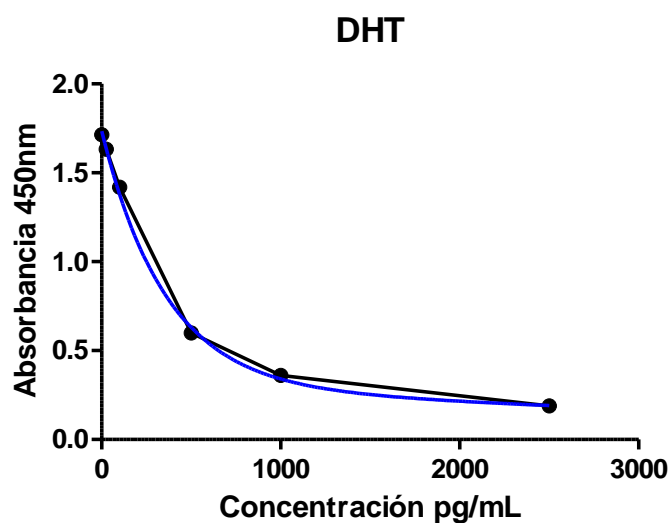
**Figura 36. Concentración de testosterona por cada 100 mil células en el medio de cultivo celular de las líneas DU145 SH y DU145 SCR.** Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

Los resultados obtenidos muestran que el silenciamiento de ZEB1 produce un aumento de testosterona de 5,22 veces en las células DU145 SH en comparación con el respectivo control DU145 SCR.

De la misma forma, se procedió a determinar los valores de concentración para DHT en el medio de cultivo celular de DU145 SH y DU145 SCR. Los resultados obtenidos para la curva de calibración se muestran a continuación (Tabla 11 y Figura 37)

**Tabla 11. Curva de calibración para DHT**

Calibrador	Concentración (pg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Promedio Absorbancia	Desviación Estándar
A	0	1,730	1,699	1,715	0,022
B	25	1,670	1,595	1,633	0,053
C	100	1,417	1,421	1,419	0,003
D	500	0,583	0,614	0,599	0,022
E	1000	0,356	0,364	0,360	0,006
F	2500	0,198	0,179	0,189	0,013



**Figura 37. Gráfica de curva de calibración para DHT.** En negro se muestran los valores obtenidos de absorbancia a 450nm. En azul se muestra la curva de regresión exponencial de decaimiento de dos fases aplicada. El valor de R obtenido fue de 0,9986.

Para validar la técnica utilizada se calcularon los mismos parámetros usados anteriormente; mínima dosis detectable y procesamiento de una muestra control.

**Tabla 12. Calculo de la mínima dosis detectable para DHT**

Calibrador	Concentración (pg/mL)	Promedio Absorbancias	Desviación Estándar * 2	Mínima Dosis Detectable
A	0,000	1,715	0,044	1,671

La mínima dosis detectable para DHT calculada fue de 1,671 (Tabla 12), por lo que al comparar con los resultados obtenidos de absorbancia de DHT para la curva de calibración y para las muestras de DU145 SH y DU145 SCR (Tabla 11 y Tabla 13), se determinó que los resultados están dentro del rango detectable.

**Tabla 13. Absorbancias de DHT en muestras DU145 SH y DU145 SCR**

Muestra	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Promedio Absorbancias	Desviación Estándar
DU145 SH 1	1,538	1,564	1,551	0,018
DU145 SCR 1	1,482	1,608	1,545	0,089
DU145 SH 2	1,486	1,354	1,420	0,093
DU145 SCR 2	1,544	1,457	1,501	0,062
DU145 SH 3	1,436	1,428	1,432	0,006
DU145 SCR 3	1,529	1,513	1,521	0,011

En cuanto al procesamiento de la muestra control para DHT, esta dio un valor de concentración dentro del rango estimado como aceptable, por lo que el procedimiento analítico puede ser considerado como válido (Tabla 14)

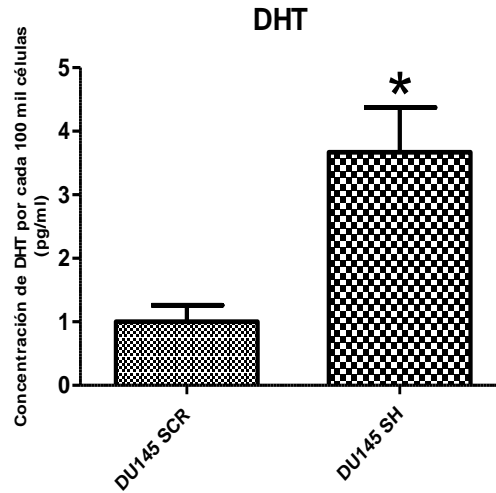
**Tabla 14. Control de DHT**

Calibrador	Concentración (pg/mL)	Concentración (pg/mL)	Desviación Estándar	Rango Aceptable (pg/mL)
Control	375,0	416,301	0,036	272,600 - 454,300

Finalmente se muestran los valores de concentración de DHT obtenidos en pg/mL por cada 100 mil células, para cada una de las tres muestras de DU145 SH y DU145 SCR (Tabla 15 y Figura 38).

**Tabla 15. Concentración de DHT en el medio de cultivo celular**

Muestra	Concentración (pg/ml)	Número de células totales	Concentración por 100 mil células (pg/ml)
SH1	4,206	280151,000	1,501
SCR1	5,902	1640000,000	0,360
SH2	43,164	2355000,000	1,833
SCR2	18,734	2220000,000	0,844
SH3	39,417	1400000,000	2,815
SCR3	12,767	2700000,000	0,473



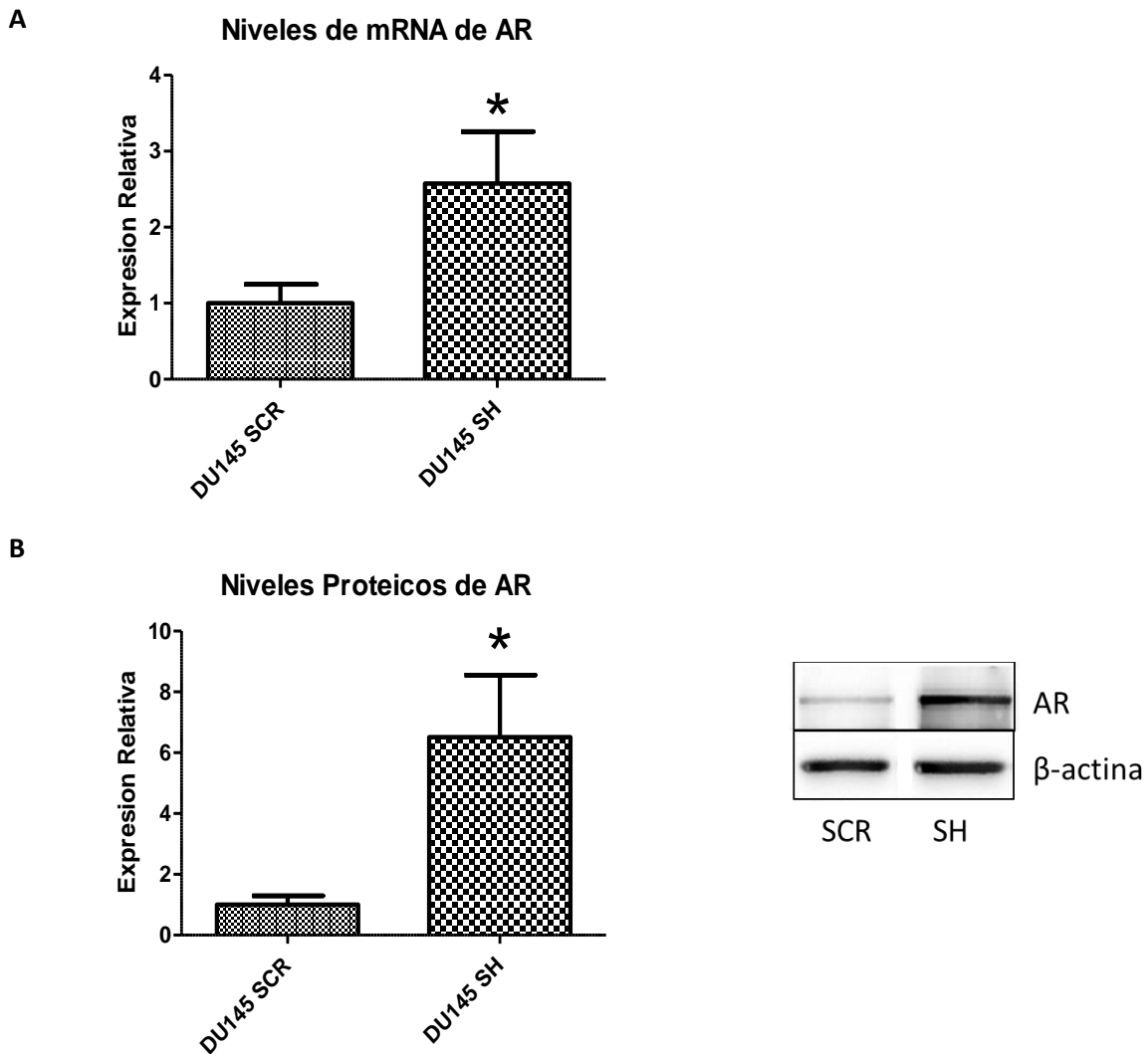
**Figura 38. Concentración de DHT por cada 100 mil células en el medio de cultivo celular de las líneas DU145 SH y DU145 SCR.** Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.

A partir de los análisis realizados se observa que el silenciamiento de ZEB1 produce un aumento de 3,66 veces en la concentración de DHT comparado con el respectivo control. Esto se correlaciona con el incremento de testosterona en las células silenciadas, por lo tanto el silenciamiento de ZEB1 aumenta tanto la concentración de testosterona como de DHT.

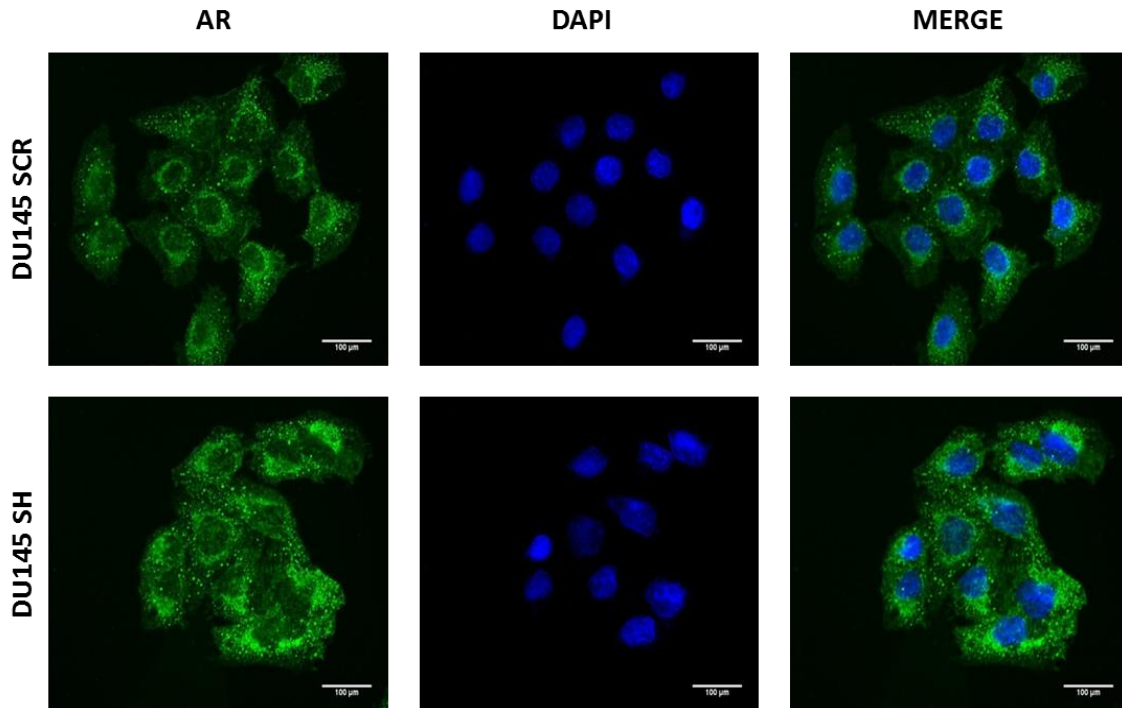


**Objetivo 3: Evaluar los niveles de mRNA, proteínas y localización celular del receptor de andrógenos en líneas celulares de cáncer de próstata con silenciamiento de ZEB1.**

Debido a que el silenciamiento de ZEB1 genera cambios en las enzimas de la síntesis y degradación de andrógenos que culminan con un aumento de la concentración de testosterona y DHT, se procedió a analizar si también produce una alteración en el receptor de andrógenos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:



**Figura 39. Niveles de expresión del AR. A** qRT-PCR **B** Western blot para AR en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas utilizando el test mann whitney. n=3, p<0,05.



**Figura 40. Inmunocitoquímica para AR en la línea celular DU145 SH y DU145 SCR.** A la izquierda se muestra en verde (Alexa 488) el marcador AR, al centro se muestra en azul (DAPI) los nucleos celulares y a la derecha se muestra la superposicion (Merge) de ambas imágenes. Fotografías obtenidas a través de un microscopio Spinning Disk a 40X.

El análisis al AR demuestra que el silenciamiento de ZEB1 genero un aumento de 2,6 veces en los niveles de mRNA del AR y un incremento de 6,5 veces en los niveles proteicos (Figura 39). En cuanto a la localización subcelular se observa que este presenta una ubicación preferentemente perinuclear. Además se aprecia una mayor intensidad de la señal de DU145 SH en comparación con DU45 SCR (Figura 40), lo que se correlaciona con los resultados obtenidos de expresión de proteínas para AR (Figura 39). Por lo tanto el silenciamiento de ZEB1 no solo genera un aumento de la síntesis de andrógenos sino que también un aumento en la expresión del AR.

En resumen esto indica que la expresión de ZEB1 induce una disminución de la síntesis de andrógenos y de su receptor (Tabla 16).

**Tabla 16. Resumen de resultados obtenidos en DU145 SH**

<b>Marcador</b>	<b>Variación de DU145 SH (Respecto a DU145 SCR)</b>
<b>E-Cadherina</b>	Aumenta
<b>Vimentina</b>	Disminuye
<b>StAR</b>	Disminuye
<b>CYP17A1</b>	Aumenta
<b>5<math>\alpha</math>- Reductasa 1</b>	Aumenta
<b>5<math>\alpha</math>- Reductasa 2</b>	Disminuye
<b>AKR1D1</b>	Aumenta
<b>AKR1C2</b>	Aumenta
<b>AR</b>	Aumenta

## VII. DISCUSIÓN

Inicialmente se evaluó E-Cadherina la cual es una molécula epitelial crítica para mantener la integridad tisular, y por lo tanto su reducción se considera un hallmark para determinar TEM debido a que la pérdida de su expresión promueve migración y metástasis en las células tumorales<sup>23</sup>. Drake et al., determinaron en células PC3 que el incremento de la expresión de E-Cadherina indica adquisición de mayores características de célula epitelial<sup>18</sup>, lo cual se corrobora con los resultados obtenidos donde se observa un fuerte incremento en los niveles de expresión de este marcador en las células DU145 SH.

En cambio vimentina es un marcador hallmark de célula mesenquimal y de acuerdo a lo reportado por Mendez et al., la inducción de su expresión por si sola es suficiente para producir una morfología de célula mesenquimal<sup>23</sup>, por lo tanto la disminución encontrada en células con silenciamiento de ZEB1 es indicativa de adquisición de menores características de célula mesenquimal.

En consecuencia la inversión en la expresión de estos marcadores de TEM indican que el silenciamiento de ZEB1 genera que estas células tengan más propiedades de célula epitelial. Esto se ratifica con los resultados obtenidos en ensayos de migración, invasión, proliferación y capacidad clonogénica determinados por Orellana-Serradell et al<sup>18</sup>., Sugiriendo una posible activación de MET (Transición mesénquima epitelio), que es el proceso inverso de TEM. No obstante, esta reversión es solo parcial ya que según lo descrito por Das et al., la reversión completa hacia un fenotipo epitelial no se logra silenciando únicamente a ZEB1<sup>43</sup>. En este punto es necesario destacar que se ha descrito que el proceso de TEM es necesario en estadios tempranos de la metástasis ya que posibilita la migración e invasión, sin embargo en estadios posteriores las células tumorales necesitan de MET para la colonización del nicho metastásico, principalmente debido a que esta rediferenciación facilita el crecimiento tumoral, aumentando la capacidad proliferativa. Es así que la interconversión entre un estado y otro es un proceso altamente dinámico<sup>10,23</sup>.

En la literatura se ha descrito ampliamente que la síntesis de testosterona comienza a través del transporte del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna realizado por StAR, seguido de la modificación por las enzimas CYP11A1, CYP17A1, 17 $\beta$ -HSD y 3 $\beta$ -HSD<sup>31</sup>. En el presente trabajo se analizaron tres de los cinco marcadores mencionados anteriormente, encontrándose que solo CYP17A1 contribuye al incremento de la síntesis de testosterona determinada en las células con silenciamiento de ZEB1, ya que fue la única enzima que presentó un alza en su expresión. Por lo tanto CYP17A1 sería la enzima clave en la producción de testosterona en estas células. Este hallazgo se relaciona con lo obtenido por Montgomery et al., quienes determinaron en muestras de pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración, es decir, en pacientes que no responden al tratamiento, un aumento en la expresión de CYP17A1 y de la concentración de testosterona en comparación con muestras de tumores primarios de próstata, sugiriendo una esteroidogénesis intratumoral en estadios avanzados<sup>44</sup>.

En cambio la producción de DHT está determinada por las enzimas 5 $\alpha$ -Reductasa 1, 5 $\alpha$ -Reductasa 2 y por la concentración de testosterona presente<sup>31</sup>. La inversión en la expresión de las isoformas de 5 $\alpha$ -Reductasa encontrada permite inferir que el principal factor que influye en la producción de DHT es la concentración inicial de testosterona, ya que la inversión en la expresión de las isoformas de 5 $\alpha$ -Reductasa permite que la reducción de una se compense con el aumento de la otra isoforma quedando siempre disponible 5 $\alpha$ -Reductasa para catalizar la conversión de testosterona a DHT.

No obstante, según lo descrito por Rizner et al., tanto la concentración de testosterona como de DHT también están determinadas por su inactivación para posterior degradación<sup>45</sup>. El análisis de la enzima AKR1D1, que se encarga de inactivar progesterona, 17OH-progesterona, androstenediona y testosterona<sup>38</sup>, revela que la expresión de esta enzima se encuentra aumentada por lo que se estaría induciendo una mayor inactivación de estos intermediarios, sin embargo la concentración de testosterona está aumentada en las células silenciadas. Esto sugiere que la inactivación realizada por AKR1D1 no es suficiente para impedir el incremento de testosterona en estas células. De forma similar se analizaron las enzimas AKR1C2 y AKR1C4 que se encargan de la inactivación de DHT, encontrándose que la expresión de AKR1C2 también se encuentra aumentada en células con silenciamiento de ZEB1, pero tampoco posibilita un cambio en los niveles de DHT que permitan su reducción. Por otra parte la localización preferentemente

nuclear encontrada para AKR1D1 y AKR1C2 sugiere que posiblemente estarían catalizando la inactivación de testosterona y DHT luego de la disociación de estos ligandos del AR, ya que según lo descrito por Tindall et al., la unión de testosterona y DHT al AR ocurre en el citoplasma lo que permite la translocación al núcleo<sup>21</sup>.

En el año 2010 Taylor et al., realizaron un perfil genómico en muestras de pacientes con CaP encontrando aumentada la expresión de AKR1C2 en pacientes con CaP avanzado<sup>46</sup>, lo que indica que posiblemente el incremento en la expresión de AKR1C2 determinado en la presente tesis se podría vincular a estadios más avanzados del CaP.

Para el caso de AKR1C4 los resultados no tuvieron una variación estadísticamente significativa, posiblemente debido a que si bien este marcador, según lo descrito por Rizner et al., se ha visto incrementado en muestras de paciente con cáncer prostático<sup>47</sup>, corresponde a una isoforma que se expresa principalmente en el hígado, por lo que no constituye un marcador clave en esta línea celular.

Es importante destacar que según lo analizado por Mitsiades et al., la relevancia que tiene el aumento de la concentración de andrógenos radica en la posibilidad de poder activar el AR<sup>40</sup>. Es así que el incremento de la expresión de enzimas de la esteroidogénesis se ha clasificado como un mecanismo de resistencia al tratamiento<sup>48</sup>. Esto se relaciona con los resultados obtenidos encontrándose una correlación en el incremento de ambos, por consiguiente la elevación de la síntesis de andrógenos posiblemente podría culminar en un aumento de la activación del AR dada su mayor disponibilidad.

Se ha detectado que la expresión de ZEB1 incrementa con el estadio tumoral, siendo indetectable en próstatas normales, expresada moderadamente en bajos Gleason y altamente expresada en Gleason elevados, sugiriendo una relación con la agresividad del tumor<sup>12</sup>. Por lo tanto es necesario analizar los resultados desde el punto de vista del incremento de ZEB1 y no de su silenciamiento, es decir que la expresión de ZEB1 induce una disminución del AR, de testosterona y DHT, y del cambio en las enzimas de la esteroidogénesis que se señala en la Figura 34. En consecuencia el hecho que se reduzcan los niveles de andrógenos y su receptor permite relacionar a ZEB1 con las CSC. Existe evidencia que sugiere que una pérdida de la actividad del AR

podría ser un inductor potencial del fenotipo de CSC. En el año 2005 Collins et al., identificaron una población de CSC en muestras de pacientes con CaP las cuales expresaban bajos niveles del AR<sup>49</sup>, seguidamente diversos estudios han demostrado que líneas celulares tratadas con siRNA o con inhibidores del AR tienen un habilidad incrementada para formar prostatoesferas. Adicionalmente en el año 2013 Kregel et al., demostraron que el AR regula directamente los factores de pluripotencia Sox2, NANOG y OCT4 encargados de la supervivencia de las CSC<sup>25</sup>. Por otra parte, la generación de CSC también ha sido relacionada con TEM y específicamente con ZEB1. En el año 2010 Kong et al., describieron que el aumento en los niveles de ZEB1 induce el cambio hacia TEM y le confiere a las células características de CSC al aumentar la expresión de marcadores como Sox2 y Nanog, lo que es consistente con el aumento de la capacidad clonogénica, de autorenovación y tumorigenicidad. Además propusieron que ZEB1 regularía esta inducción a través de la represión de miR-200, el cual a su vez se encarga de reprimir factores de pluripotencia<sup>50</sup>. Tomando en cuenta los antecedentes mencionados anteriormente es que se propone que la reducción de los niveles de andrógenos inducida por ZEB1, determinada en la presente tesis, permitiría la inducción de células con fenotipo de CSC. Esto estaría apoyado por datos de nuestro laboratorio que indican que células DU145 SH tienen una menor expresión del mRNA de Sox2 en comparación con DU145 SCR, así como también el hecho que células 22Rv1 con sobreexpresión de ZEB1 tienen mayores niveles de expresión del mRNA de SOX2 (datos no publicados).

De este modo la reducción en los niveles de andrógenos posibilita una menor activación del AR. Sin embargo en los últimos años se ha reportado que células de CaP son capaces de activar la esteroidogénesis intratumoral a través de dos vías esteroidogénicas alternativas. La primera de ellas es conocida como "*The backdoor pathway*" y consiste en la modificación sucesiva de progesterona por principalmente las enzimas 5 $\alpha$ -Reductasa 1, CYP17A1 y AKR1C2 para producir el intermediario androsterona que puede ser convertido a DHT<sup>51,52</sup>. La segunda vía se conoce como "*5 $\alpha$ -Diona*" y se basa en la transformación de androstenediona por las enzimas 5 $\alpha$ -Reductasa 1 y 17 $\beta$ -HSD3 para formar DHT. En ambos casos se sintetiza DHT sin necesidad de producir previamente testosterona<sup>52</sup>. Del análisis de los resultados de la vía esteroidogénica se desprende que no solo se estaría inhibiendo la vía clásica, sino que también las vías alternativas, ya que las enzimas claves CYP17A1, 5 $\alpha$ -Reductasa 1 y AKR1C2 reducen su expresión con el aumento de ZEB1.

En síntesis la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa 1 resulta esencial para la activación de estas vías alternativas, sin embargo como se observa en los resultados obtenidos la isoforma 5 $\alpha$ -Reductasa 2 aumenta mientras 5 $\alpha$ -Reductasa 1 disminuye, por lo tanto hay un *switch* de expresión entre ellas. Se ha sugerido que esto se produce debido a que ambas enzimas actúan a distinto pH y en el ambiente tumoral la actividad de 5 $\alpha$ -Reductasa 1 se vería favorecida permitiendo incrementar la producción de DHT<sup>33</sup>.

En el presente año Audet-Walsh et al., demostraron que la regulación inversa de estas enzimas es realizada directamente por el AR el cual se une a las secuencias promotoras de los genes para estas enzimas incrementando la expresión de la isoforma 1 y reprimiendo la expresión de la isoforma 2<sup>53</sup>. En este punto es muy importante destacar que en CaP se han encontrado, tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes, una gran diversidad de patrones de expresión de enzimas de la esteroidogénesis definiéndose en la literatura solo una relación consistente en la expresión de las enzimas 5 $\alpha$ -Reductasas<sup>54</sup>.

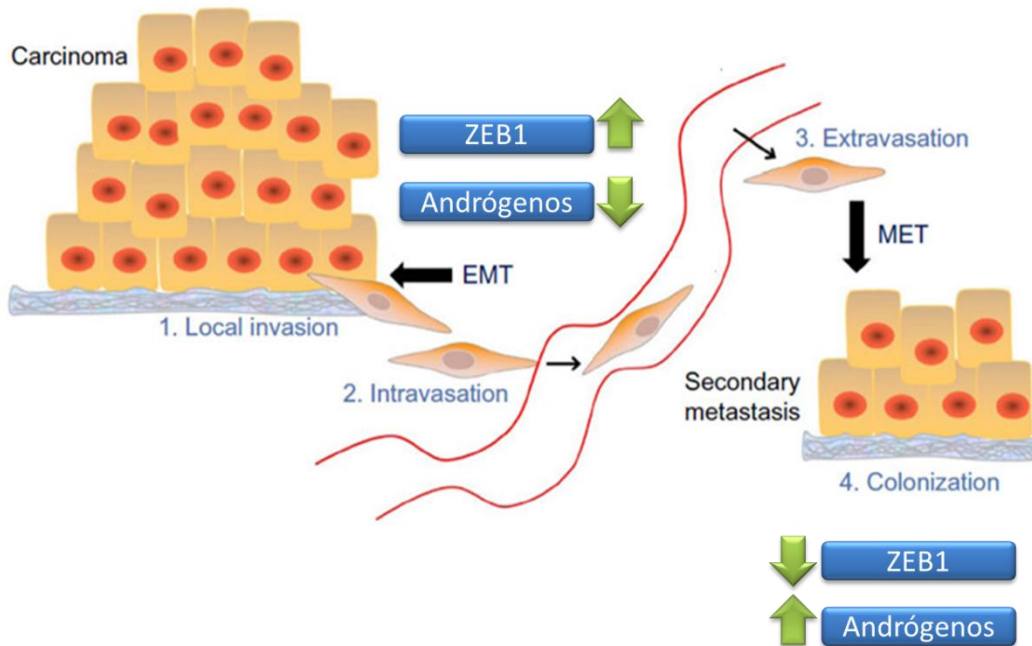
Por otra parte la expresión de la enzima AKR1C2 se ha encontrado correlacionada con la expresión del AR<sup>54</sup>. Huang et al., determinaron que células de cáncer prostático LNCaP, las cuales expresan el AR, tienen una mayor expresión de AKR1C2 en comparación con líneas celulares que no expresan el AR. Además describieron que el silenciamiento del AR en células LNCaP produce una disminución de AKR1C2, desconociéndose aun el mecanismo de regulación<sup>55</sup>. Sin embargo Ji et al., determinaron que el tratamiento con DHT en células LNCaP y DU145 genera una inducción de la expresión de AKR1C2 señalando que esto sucede posiblemente como forma de contrarrestar el alza en la concentración de DHT<sup>56</sup>. Estos antecedentes se corroboran con nuestros resultados, sugiriendo una posible regulación realizada por el AR como mecanismo para controlar la disponibilidad de los andrógenos presentes. Es así que a partir de los resultados obtenidos se propone también que posiblemente sea el AR, con el mismo objetivo anterior, el que controla la expresión de la enzima AKR1D1, requiriéndose análisis experimentales adicionales en este punto.

En el año 2013 Locke et al., determinaron que StAR presenta una expresión aumentada en un modelo de xenotrasplante resistente a la castración, encontrándose además testosterona y DHT incrementados<sup>57</sup>. Esta referencia difiere de lo hallado en la presente tesis indicando que estos cambios se podrían diferenciar en el mecanismo de regulación, ya que nuestros resultados



obtenidos señalan una relación inversa entre la concentración de andrógenos y StAR. Es por ello que proponemos que el incremento de StAR podría actuar como mecanismo compensatorio frente a la reducción de los andrógenos presentes por mecanismos que no involucran a ZEB1, debido al efecto contrario de ambos.

Cabe destacar el hecho de que el CaP está compuesto de distintas células fenotípica y funcionalmente lo que se traduce en una gran heterogeneidad tumoral, la cual es manejada por las CSC las cuales incrementan durante la TEM<sup>58</sup>. En el año 2017 Izumi et al., determinaron que pacientes con bajos niveles de testosterona presentan una mayor expresión de CCL2, la cual es una quimioquina que favorece la EMT<sup>59</sup>. Con los antecedentes mencionados es que se propone que la reducción de los andrógenos por ZEB1 estaría enmarcada en una subpoblación celular dentro de los estadios iniciales de la metástasis (EMT) y que luego de la colonización de un nicho secundario se generaría un incremento en la concentración de andrógenos para aumentar la proliferación celular (MET). Esto resulta ser consistente con los altos niveles de testosterona y DHT encontrados en pacientes con cáncer de próstata avanzado<sup>33</sup>, además de otro antecedente entregado por Izumi et al., que indica que tanto altas como bajas concentraciones séricas de testosterona serian indicativas de un peor pronóstico<sup>59</sup> **(Figura 41)**.



**Figura 41. Progresión tumoral en cáncer de próstata<sup>60</sup>.** Se propone que dentro del tumor una subpoblación de células tumorales tendría una alta expresión de ZEB1 que promovería la reducción de los andrógenos testosterona y DHT durante la TEM. Posteriormente, en el proceso inverso MET se produciría una disminución de la expresión ZEB1 que generaría como consecuencia un aumento de andrógenos, lo que le otorgaría a las células mayores capacidades para establecer un nicho metastásico secundario.

Finalmente los resultados obtenidos permiten relacionar a ZEB1 con la resistencia a la ADT, debido a que se ha determinado que pacientes sometidos a esta expresan altos niveles de ZEB1<sup>25</sup>, lo que en conjunto con nuestros resultados sugiere que la ADT actuaría como presión selectiva, aumentando la supervivencia de una subpoblación de células que no necesitan andrógenos, es más, la misma ADT ayudaría a incrementar la malignidad tumoral al reducir la testosterona y DHT circulantes. En suma esto constituiría un nuevo antecedente que explicaría la gran falla que produce la ADT con el consecuente recurrencia tumoral y la muerte del paciente.

## VIII. CONCLUSIÓN

1. El silenciamiento de ZEB1 induce un aumento de la concentración de testosterona y DHT en el medio de cultivo celular de la línea DU145.
2. El incremento en la producción de testosterona y DHT está asociada con el aumento de la enzima CYP17A1 en la línea celular DU145.
3. El silenciamiento de ZEB1 induce un aumento de la expresión del AR en la línea celular DU145.
4. El incremento de la expresión del AR provocada por el silenciamiento de ZEB1 confirma una asociación con el aumento de la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa 1 y una disminución de la expresión de 5 $\alpha$ -Reductasa 2 en la línea celular DU145.

## IX. REFERENCIAS

1. World Cancer Research Fund International. Cancer: World wide data. [En línea] <<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>> [consulta: 28 de octubre de 2017]
2. Ministerio de salud. Gobierno de Chile. Guía clínica próstata en personas de 15 años y más. Minsal. ISBN 1ª. 2015.
3. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Cáncer de próstata: Estadísticas. [En línea] <<http://www.cancer.net/es/tipos-dec3%A1ncer/c3%A1ncerdepr3%B3stata/estad3%ADsticas>>[consulta: octubre de 2017]
4. Knudsen, B. & Vasioukhin, V.. Mechanisms of prostate cancer initiation and progression. *Adv Cancer Res.* 2010; 109, 1-50.
5. Lilja H. Structure and función of prostatic and seminal vesicle secretec proteins involved in the gelatin and liquefaction of human semem. *Scand J Lab Invest.* 1988;191:13-20.
6. Verma S, Sarkar S, Young J. Evaluation of the impact of computed high b-value diffusion-weighted imaging on prostate cancer detection. *Abdom Radiol.* 2016;41(5):934-945. doi:10.1007/s00261-015-0619-1.
7. Jaworska D, Król W, Szliszka E. Prostate cancer stem cells: Research advances. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):27433-27449. doi:10.3390/ijms161126036.
8. Cabrera MC. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells.* 2015;7(1):27. doi:10.4252/wjsc.v7.i1.27.
9. Broster SA, Kyprianou N. Epithelial-mesenchymal transition in prostatic disease. *Future Oncol.* 2015;11(23):3197-3206. doi:10.2217/fon.15.253.

10. Das R, Gregory PA, Hollier BG, Tilley WD, Selth LA. Epithelial plasticity in prostate cancer: Principles and clinical perspectives. *Trends Mol Med.* 2014;20(11):643-651. doi:10.1016/j.molmed.2014.09.004.
11. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol.* 2014;16: 488–494.
12. Suresh PK, Nathawat L. Role of cadherin switching in EMT and prostate cancer metastasis - A topic revisited. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(3):97-102.
13. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(18):3033-3046. doi:10.1007/s00018-011-0735-1.
14. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15(2):117-134. doi:10.1007/s10911-010-9178-9.
15. Graham TR, Zhou HE, Odero-Marah VA. Insulin-like growth factor-I - Dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(7):2479-2488. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2559.
16. Drake, J. M., Strohschein, G., Bair, T. B., Moreland, J. G., & Henry, M. D. ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(8), 2207-2217.
17. Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, Higashi Y, Dean DC. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence. *Development.* 2008;135(3):579-588. doi:10.1242/dev.007047.
18. Orellana-Serradell O, Herrera D, Castellón E, Contreras HR. The transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. *Asian Journal of andrology.* 2017;19,1-6;doi:10.4103/aja.aja\_61\_17.

19. Sun Y, Wang BE, Leong KG. Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate: Implications for androgen- deprivation therapy. *Cancer Res.* 2012;72(2):527-536. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3004.
20. Anose BM, Sanders MM. Androgen receptor regulates transcription of the ZEB1 transcription factor. *Int J Endocrinol.* 2011;2011:903918. doi:10.1155/2011/903918.
21. Basu S, Tindall DJ. Androgen Action in Prostate Cancer. *Horm Cancer.* 2010;1(5):223-228. doi:10.1007/s12672-010-0044-4.
22. Waltering K. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer. University of Tampere. Finlandia. 2010. pag:10-15
23. Matuszak E a, Kyprianou N. Androgen regulation of epithelial–mesenchymal transition in prostate tumorigenesis. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2011;6(3):469-482. doi:10.1586/eem.11.32.
24. Wen S, Niu Y, Lee SO, Chang C. Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death. *Cancer Treat Rev.* 2014;40(1):31-40. doi:10.1016/j.ctrv.2013.07.008.
25. Bishop JL, Davies A, Ketola K, Zoubeidi A. Regulation of tumor cell plasticity by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(3):R165-R182. doi:10.1530/ERC-15-0137.
26. E. Livermore K, Munkley J, J. Elliott D. Androgen receptor and prostate cancer. *AIMS Mol Sci.* 2016;3(2):280-299. doi:10.3934/molsci.2016.2.280.
27. Chien Y, Rosal K, Chung B chu. Function of CYP11A1 in the mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;441:55-61. doi:10.1016/j.mce.2016.10.030.
28. Stocco DM, Zhao AH, Tu LN, Morohaku K, Selvaraj V. A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;441:7-16. doi:10.1016/j.mce.2016.07.036.

29. Miller WL. Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(11):771-793. doi:10.1016/j.tem.2017.09.002.
30. Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res.* 2011;52(12):2111-2135. doi:10.1194/jlr.R016675.
31. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* 2004;25(6):947-970. doi:10.1210/er.2003-0030.
32. Miller WL. Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology.* 2005;146(6):2544-2550. doi:10.1210/en.2005-0096.
33. Mostaghel EA. Steroid hormone synthetic pathways in prostate cancer. *Transl Androl Urol.* 2013;2(3):212-227. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.16.
34. Sharifi N, Auchus RJ. Steroid biosynthesis and prostate cancer. *Steroids.* 2012;77(7):719-725. doi:10.1016/j.steroids.2012.03.015.
35. Nacusi LP, Tindall DJ. Targeting 5 $\alpha$ -reductase for prostate cancer prevention and treatment. *Nat Rev Urol.* 2011;8(7):378-384. doi:10.1038/nrurol.2011.67.
36. Marchetti PM, Barth JH. Clinical biochemistry of dihydrotestosterone. *Ann Clin Biochem.* 2013;50(Pt 2):95-107. doi:10.1258/acb.2012.012159.
37. Chen M, Penning TM. 5 $\beta$ -Reduced steroids and human 4-3-ketosteroid 5 $\beta$ -reductase (AKR1D1). *Steroids.* 2014;83:17-26. doi:10.1016/j.steroids.2014.01.013.
38. Zeng CM, Chang LL, Ying MD. Aldo-keto reductase AKR1C1-AKR1C4: Functions, regulation, and intervention for anti-cancer therapy. *Front Pharmacol.* 2017;8:1-9. doi:10.3389/fphar.2017.00119.
39. Snaterse G, Visser JA, Arlt W, Hofland J. Circulating steroid hormone variations throughout different stages of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2017:ERC-17-0155. doi:10.1530/ERC-17-0155.

40. Mitsiades N, Sung CC, Schultz N. Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors. *Cancer Res.* 2012;72(23):6142-6152. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1335.
41. Van Der Sluis TM, Meuleman EJH, Van Moorselaar RJA. Intraprostatic testosterone and dihydrotestosterone. Part II: Concentrations after androgen hormonal manipulation in men with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *BJU Int.* 2012;109(2):183-188. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10652.x.
42. RD Systems. ELISA Guide. [En línea] <<https://resources.rndsystems.com/images/site/erg20106836.pdf>> [consulta: 28 de octubre de 2017]
43. Das S, Becker BN, Hoffmann FM, Mertz JE. Complete reversal of epithelial to mesenchymal transition requires inhibition of both ZEB expression and the Rho pathway. *BMC Cell Biol.* 2009;10(1):94. doi:10.1186/1471-2121-10-94.
44. Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: A mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* 2008;68(11):4447-4454. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0249.
45. Rižner TL, Lin HK, Peehl DM, Steckelbroeck S, Bauman DR, Penning TM. Human type 3  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (aldo-keto reductase 1C2) and androgen metabolism in prostate cells. *Endocrinology.* 2003;144(7):2922-2932. doi:10.1210/en.2002-0032.
46. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell.* 2010;18(1):11-22. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.026.
47. Penning TM. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact.* 2015;234:236-246. doi:10.1016/j.cbi.2014.09.024.



48. Kobayashi T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):15615-15635. doi:10.3390/ijms140815615.
49. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):10946-10951. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.
50. Kong D, Banerjee S, Ahmad A. Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One.* 2010;5(8). doi:10.1371/journal.pone.0012445.
51. Auchus RJ. The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(9):432-438. doi:10.1016/j.tem.2004.09.004.
52. Stuchbery R, McCoy PJ, Hovens CM, Corcoran NM. Androgen synthesis in prostate cancer: do all roads lead to Rome? *Nat Rev Urol.* 2016;14(1):49-58. doi:10.1038/nrurol.2016.221.
53. Audet-Walsh É, Yee T, Tam IS, Giguère V. Inverse regulation of DHT synthesis enzymes 5 $\alpha$ -reductase types 1 and 2 by the androgen receptor in prostate cancer. *Endocrinology.* 2017;158(4):1015-1021. doi:10.1210/en.2016-1926.
54. Zhang A, Zhang J, Plymate S, Mostaghel EA. Classical and Non-Classical Roles for Pre-Receptor Control of DHT Metabolism in Prostate Cancer Progression. *Horm Cancer.* 2016;7(2):104-113. doi:10.1007/s12672-016-0250-9.
55. Huang K-H, Chiou S-H, Chow K-C. Overexpression of aldo-keto reductase 1C2 is associated with disease progression in patients with prostatic cancer. *Histopathology.* 2010;57(3):384-394. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03647.x.

56. Ji Q, Chang L, VanDenBerg D, Stanczyk FZ, Stolz A. Selective reduction of AKR1C2 in prostate cancer and its role in DHT metabolism. *Prostate*. 2003;54(4):275-289. doi:10.1002/pros.10192.
57. Locke JA, Guns ES, Lubik AA. Androgen Levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68(15):6407-6415. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5997.
58. Deng Q, Tang DG. Androgen receptor and prostate cancer stem cells: Biological mechanisms and clinical implications. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(6):T209-T220. doi:10.1530/ERC-15-0217.
59. Izumi K, Shigehara K, Nohara T, Narimoto K, Kadono Y, Mizokami A. Both High and Low Serum Total Testosterone Levels Indicate Poor Prognosis in Patients with Prostate Cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(10):5559-5564. doi:10.21873/anticancer.11988.
60. Reed IKG. Mechanism and regulation of epithelial – mesenchymal transition in cancer. *Cell Health and Cytoskeleton*. 2015;155-166.