

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



**SPARC INDUCE TRANSICIÓN EPITELIO – MESÉNQUIMA  
AUMENTANDO LAS PROPIEDADES INVASIVAS Y  
MIGRATORIAS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA A TRAVÉS DE  
INTEGRINA AVB3 Y ZEB1**

**FERNANDA ANDREA LÓPEZ MONCADA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Héctor Ruberly Contreras Muñoz**

**2019**

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

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

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

**FERNANDA ANDREA LÓPEZ MONCADA**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de noviembre de 2019.

**Prof. Dr. Héctor Ruberly Contreras Muñoz**  
**Director de Tesis**  
Departamento de Oncología Básico – Clínico  
Facultad de Medicina - Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DRA. VIVIANA MONTECINOS**

**PROF. DR. DIEGO REYES**

**PROF. DR. LUIS QUIÑONES**

**PROF. DR. JULIO TAPIA**  
**Presidente Comisión de Examen**



# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>Listado de abreviaturas</b> .....                             | 1  |
| <b>Resumen</b> .....   | 3  |
| <b>Summary</b> .....   | 5  |
| <b>Introducción</b> .....  | 7  |
| 1. La próstata.....  | 7  |
| 2. Cáncer de próstata y sistema de Gleason .....                 | 13 |
| 3. Transición epitelio-mesénquima y ZEB1 en cáncer .....         | 19 |
| 4. SPARC y su papel en cáncer .....                              | 25 |
| 5. Integrinas relacionadas a la acción de SPARC .....            | 30 |
| <b>Hipótesis</b> .....   | 33 |
| <b>Objetivo general de la investigación</b> .....                | 33 |
| <b>Objetivos específicos</b> .....                               | 33 |
| <b>Materiales y métodos</b> .....                                | 34 |
| 1. Microarreglos de tejido.....                                  | 34 |
| 2. Inmunohistoquímica .....                                      | 34 |
| 3. Cultivos celulares.....                                       | 35 |
| 4. Transducción lentiviral .....                                 | 35 |
| 5. Western Blot .....  | 36 |
| 6. Extracción de RNA y RT-qPCR.....                              | 38 |
| 7. Inmunofluorescencia indirecta y tinciones fluorescentes ..... | 40 |
| 8. Ensayo de cierre de herida .....                              | 40 |
| 9. Ensayo de trans migración.....                                | 40 |
| 10. Ensayo de invasión <i>in vitro</i> .....                     | 41 |
| 11. Ensayo de viabilidad con MTT.....                            | 41 |
| 12. Prueba de exclusión con azul de tripán.....                  | 41 |
| 13. Ensayo de formación de adhesiones focales.....               | 42 |
| 14. Análisis estadísticos .....                                  | 42 |
| 15. Consideraciones éticas .....                                 | 43 |
| <b>Resultados</b> .....  | 44 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Objetivo 1: Evaluar la expresión de SPARC en muestras de pacientes con CaP de distintos grados de Gleason, en cultivos primarios y en líneas celulares de CaP</b> .....  | 44 |
| 1.1. Expresión de SPARC en muestras de pacientes con CaP de distintos grados de Gleason.....  |    |
| 1.2. Expresión de SPARC en cultivos primarios de CaP .....  | 46 |
| 1.3. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP .....  | 48 |
| <b>Objetivo 2: Evaluar el efecto de SPARC en la inducción de transición epitelio-mesénquima y las capacidades invasivas y migratorias, en líneas celulares de CaP</b> .....   | 50 |
| 2.1. Silenciamiento y sobreexpresión estable de SPARC en líneas celulares de CaP .....  | 50 |
| 2.2. Cambios morfológicos inducidos por SPARC en líneas celulares de CaP.....   | 53 |
| 2.3. Efecto de SPARC en la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en células de CaP.....   | 55 |
| 2.4. Efecto de SPARC en la expresión de factores de transcripción inductores de TEM en líneas celulares de CaP.....   | 57 |
| 2.5. Snail, Slug y ZEB1 aumentan la expresión de SPARC en células de CaP .....  | 61 |
| 2.6. Efecto de SPARC en la proliferación de células de CaP .....  | 65 |
| 2.7. Efecto de SPARC en la motilidad y capacidad invasiva <i>in vitro</i> de células de CaP...  | 69 |
| <b>Objetivo 3: Determinar la participación de los ejes de integrina <math>\alpha_v\beta_3</math> y ZEB1 como mediadores de transición epitelio-mesénquima y aumento de migración, inducido por SPARC en líneas celulares de CaP</b> ..... | 73 |
| 3.1. Efecto de SPARC sobre la expresión de distintas subunidades de integrinas .....  | 73 |
| 3.2. Expresión de las subunidades de integrina $\alpha_v\beta_3$ en líneas celulares de CaP .....   | 75 |
| 3.3. Efecto de SPARC sobre la expresión de efectores <i>río abajo</i> de integrinas y en la activación de FAK .....   | 77 |
| 3.4. Efecto de SPARC en la formación de adhesiones focales en células de CaP.....   | 80 |
| 3.5. Bloqueo de integrina $\alpha_v\beta_3$ en células LNCaP estimuladas con SPARC.....   | 82 |
| 3.6 Integrina $\alpha_v\beta_3$ y ZEB1 son necesarios para la disminución de E-cadherina y el aumento de migración, inducidos por SPARC .....   | 84 |
| <b>Discusión</b> .....  | 93 |
| 1. Expresión de SPARC en tejidos cancerosos .....   | 93 |

|  |     |
|--|-----|
| 2. Regulación de la expresión de SPARC.....                      | 95  |
| 3. SPARC y el programa de TEM.....                               | 97  |
| 4. Efecto de SPARC en la proliferación celular.....              | 99  |
| 5. TEM, estados intermedios y plasticidad .....                  | 101 |
| 6. SPARC y migración: asociación con integrinas .....            | 104 |
| 7. ZEB1: función en TEM y otros procesos en cáncer .....         | 106 |
| 8. Proyecciones e implicancias clínicas de estos hallazgos ..... | 109 |
| 9. Modelo propuesto del efecto de SPARC en células de CaP .....  | 110 |
| <b>Conclusiones</b> .....  | 111 |
| <b>Referencias</b> .....   | 112 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Introducción</b> .....  | 7  |
| Figura 1. Zonas anatómicas de la próstata .....  | 8  |
| Figura 2. Histología de la próstata .....  | 10 |
| Figura 3. Principales tipos celulares presentes en la próstata .....   | 12 |
| Figura 4. Sistema de gradación de Gleason .....  | 15 |
| Figura 5. Cambios celulares y moleculares ocurridos durante la transición epitelio-mesénquima.....   | 22 |
| <b>Resultados</b> .....  | 44 |
| Figura 6. Expresión de SPARC en muestras de pacientes.....   | 45 |
| Figura 7. Expresión de E-Cadherina y SPARC en cultivos primarios de CaP derivados de pacientes.....  | 47 |
| Figura 8. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP.....   | 49 |
| Figura 9. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC .....   | 51 |
| Figura 10. Expresión intracelular de SPARC en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.....  | 52 |
| Figura 11. Morfología de las líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.....   | 54 |
| Figura 12. Expresión de marcadores de TEM en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC .....  | 56 |
| Figura 13. Expresión factores transcripcionales inductores de TEM ZEB1, Snail y Slug, en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC..... | 58 |
| Figura 14. Localización de ZEB1 en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC. ....  | 59 |
| Figura 15. Expresión de E-Cadherina y ZEB1 en células DU145 con silenciamiento de SPARC .....  | 60 |
| Figura 16. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP con sobreexpresión de Slug....  | 62 |
| Figura 17. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP con sobreexpresión de Snail...  | 63 |
| Figura 18. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP con sobreexpresión de ZEB1 .  | 64 |
| Figura 19. Evaluación de Ki-67 nuclear en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC .....   | 66 |
| Figura 20. Ensayo de MTT en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC .....   | 67 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 21. Ensayo de exclusión con Azul de Tripán en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.....                             | 68  |
| Figura 22. Ensayo de cierre de herida en células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC .....   | 70  |
| Figura 23. Ensayo de invasión y transmigración de células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC .....  | 71  |
| Figura 24. Ensayo de invasión y transmigración de células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC .....  | 72  |
| Figura 25. Expresión de subunidades de integrinas en células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC .....                                     | 74  |
| Figura 26. Expresión de subunidades de integrina $\alpha_v\beta_3$ en distintas líneas celulares y en cultivos primarios de CaP .....                      | 76  |
| Figura 27. Expresión de componentes de la vía de integrina en células de CaP con silenciamiento de SPARC .....   | 78  |
| Figura 28. Expresión de componentes de la vía de integrina en células de CaP con silenciamiento de SPARC .....   | 79  |
| Figura 29. Efecto del silenciamiento de SPARC en la formación de adhesiones focales en células de CaP .....  | 81  |
| Figura 30. Efecto del bloqueo de integrina con péptidos RGD en la expresión de E-cadherina y Vimentina en células de CaP con sobreexpresión de SPARC ..... | 83  |
| Figura 31. Efecto de SPARC recombinante en la expresión de E-cadherina y Vimentina en células de CaP .....   | 85  |
| Figura 32. Efecto de SPARC en la expresión de E-cadherina y Vimentina en células de CaP en el tiempo.....  | 86  |
| Figura 33. Silenciamiento de ZEB1 en células LNCaP .....   | 88  |
| Figura 34. Expresión de ZEB1, E-Cadherina y SPARC en células LNCaP con silenciamiento estable de ZEB1 .....  | 89  |
| Figura 35. Efecto del bloqueo de integrina y silenciamiento de ZEB1 en la expresión de E-cadherina en líneas celulares de CaP estimuladas con SPARC .....  | 91  |
| Figura 36. Efecto del bloqueo de integrina y silenciamiento de ZEB1 en líneas celulares de CaP estimuladas con SPARC.....                                  | 92  |
| Figura 37. Efecto de SPARC en células de CaP.....  | 110 |

## LISTADO DE ABREVIATURAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>AF:</b>      | Adhesiones focales   |
| <b>BSA:</b>     | Albúmina de suero bovino   |
| <b>CaP:</b>     | Cáncer de próstata   |
| <b>cDNA:</b>    | Ácido desoxirribonucleico complementario                               |
| <b>CK18:</b>    | Citoqueratina 18   |
| <b>ERK:</b>     | Quinasa regulada por señales extracelulares                            |
| <b>FAK:</b>     | Quinasa de adhesiones focales  |
| <b>FTs-TEM:</b> | Factores de transcripción inductores de transición epitelio-mesénquima |
| <b>HA:</b>      | Antígeno hemaglutinina   |
| <b>HPB:</b>     | Hiperplasia prostática benigna   |
| <b>HRP:</b>     | Peroxidasa de rábano picante   |
| <b>IHQ:</b>     | Inmunohistoquímica   |
| <b>IFI:</b>     | Inmunofluorescencia indirecta  |
| <b>ILK:</b>     | Quinasa ligada a integrinas  |
| <b>MMP:</b>     | Metaloproteasas de la matriz   |
| <b>mRNA:</b>    | Ácido ribonucleico mensajero   |
| <b>MTT:</b>     | bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio            |
| <b>P-FAK:</b>   | Quinasa de adhesiones focales fosforilada                              |
| <b>PBS:</b>     | Tampón fosfato salino  |
| <b>PG:</b>      | Puntaje de Gleason   |
| <b>PSA:</b>     | Antígeno prostático específico   |
| <b>RAC1:</b>    | GTPasa pequeña de la familia Rac 1                                     |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>RGD:</b>     | Péptido de secuencia arginina – glicina – aspartato                        |
| <b>RHOA:</b>    | Miembro A de la familia de genes homólogos de Ras                          |
| <b>RNA:</b>     | Ácido ribonucleico   |
| <b>RT-qPCR:</b> | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa reversa |
| <b>ShRNA:</b>   | Ácido ribonucleico de horquilla corta                                      |
| <b>ShSCR:</b>   | Ácido ribonucleico de horquilla corta de secuencia aleatoria               |
| <b>ShSPARC:</b> | Ácido ribonucleico de horquilla corta de secuencia contra SPARC            |
| <b>ShZEB1:</b>  | Ácido ribonucleico de horquilla corta de secuencia contra ZEB1             |
| <b>SNAI1:</b>   | Proteína de dedos de zinc SNAI1  |
| <b>SLUG:</b>    | Proteína de dedos de zinc SNAI2  |
| <b>SPARC:</b>   | Proteína secretada acídica y rica en cisteínas                             |
| <b>TEM:</b>     | Transición epitelio-mesénquima   |
| <b>TGF-β1:</b>  | Factor de crecimiento tumoral beta 1                                       |
| <b>TGF-βR1:</b> | Receptor de factor de crecimiento tumoral beta 1                           |
| <b>TMA:</b>     | Microarreglo de tejido   |
| <b>TME:</b>     | Transición mesénquima-epitelio   |
| <b>ZEB1:</b>    | Proteína de dedos de zinc homeobox 1 de unión a E-box                      |

## **RESUMEN**

### **Introducción**

La proteína ácida secretada y rica en cisteína (SPARC) es una proteína matricelular altamente expresada en el tejido óseo que actúa como un factor quimioatrayente que promueve la llegada de células de cáncer de próstata (CaP) a la médula ósea, dependiendo para esto de la expresión y actividad de integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Además, SPARC regula numerosos procesos biológicos claves para la progresión tumoral, como la proliferación celular, diferenciación, adhesión celular, migración y angiogénesis. Sin embargo, en diversos modelos tumorales se ha visto que puede promover como también inhibir estos procesos, dependiendo del contexto tumoral. Por lo tanto, la contribución de SPARC durante las primeras etapas de la progresión del CaP aún no está del claro. Recientemente se ha visto que SPARC aumenta la expresión de los factores de transcripción Snail y Slug, que controlan la transición epitelio-mesénquima, junto con ZEB1 y otros factores de transcripción. En base a estos antecedentes, proponemos que SPARC induce transición epitelio-mesénquima (TEM), a través de la vía de integrina  $\alpha_v\beta_3$ , incrementando las capacidades migratorias e invasivas de las células de CaP.

### **Materiales y métodos**

Evaluamos la expresión de SPARC en tumores primarios, cultivos primarios y líneas celulares de CaP. Para evaluar los efectos de SPARC en las células de CaP desarrollamos un modelo *in vitro* de silenciamiento y sobreexpresión de SPARC en líneas PC3 y LNCaP, respectivamente. En estas líneas evaluamos la expresión de marcadores de TEM, factores de transcripción Snail, Slug y ZEB1, diversas subunidades de integrinas y también de proteínas relacionadas con la vía

de señalización de integrinas: RAC1, RHOA, ILK y FAK. Además analizamos las capacidades funcionales de estas células en ensayos de migración, invasión, proliferación y formación de adhesiones focales. Para analizar la contribución de ZEB1 y de integrina  $\alpha_v\beta_3$  como mediadores de los efectos de SPARC, utilizamos células LNCaP con silenciamiento de ZEB1 y péptidos RGD selectivos para integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

## **Resultados**

En nuestro modelo de CaP, SPARC induce TEM, disminuyendo la expresión de E-cadherina y citoqueratina 18 y aumentando la expresión de N-cadherina y vimentina. Además, SPARC induce la expresión de los factores de transcripción reguladores de TEM Snail, Slug y ZEB1. Funcionalmente, el silenciamiento de SPARC en las células PC3 disminuye la migración y la invasión *in vitro*, sin modificar la proliferación celular. Además, el silenciamiento de SPARC disminuye la expresión de la subunidad de integrina  $\beta_3$ , y de alguno de sus efectores como RHOA, RAC1, ILK y P-FAK925, alterando la formación de adhesiones focales. El bloqueo específico de integrina  $\alpha_v\beta_3$  revierte la disminución de E-cadherina y aumento de vimentina, inducidos por SPARC. Por último, mostramos que la disminución de E-cadherina y el aumento de la migración, inducidos por SPARC, requieren de la activación de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y de la expresión de ZEB1.

## **Conclusión**

Nuestros resultados indican que SPARC se expresa en tumores de alto grado histológico SPARC, a través de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1 induce TEM, y mediante este programa, podría facilitar la progresión tumoral.

## **SUMMARY**

### **Introduction**

The secreted and cysteine-rich acidic protein (SPARC) is a matricellular protein highly expressed in bone tissue that acts as a chemoattractant factor that promotes the arrival of prostate cancer cells (PCa) to the bone marrow, depending on the expression and activity of integrin  $\alpha_v\beta_3$ . In addition, SPARC regulates numerous biological processes key for tumor progression, such as cell proliferation, differentiation, cell adhesion, migration and angiogenesis. However, in various tumor models it has been described that SPARC can promote, as well as inhibit, these processes, depending on the tumor context. Therefore, the contribution of SPARC during the early stages of the progression of PCa is not clear yet. Recently, it has been found that SPARC increases the expression of the Snail and Slug transcription factors, which control the epithelial-mesenchymal transition, along with ZEB1 and other transcription factors. Based on this background, we propose that SPARC induces epithelial-mesenchymal transition (EMT), through an integrin  $\alpha_v\beta_3$  pathway, increasing the migratory and invasive capacities of PCa cells.

### **Materials and methods**

We evaluated the expression of SPARC in primary tumors, primary cultures and PCa cell lines. To evaluate the effects of SPARC on PCa, we developed an in vitro model of silencing and overexpression of SPARC on PC3 and LNCaP cell lines, respectively. In this model, we evaluated the expression of EMT markers, Snail, Slug and ZEB1 transcription factors, various subunits of integrins and also of proteins related to the integrin signaling pathway: RAC1, RHOA, ILK and FAK. In addition, we analyzed the functional capacities of these cells in migration,

invasion, proliferation and focal adhesion formation assays. To analyze the contribution of ZEB1 and integrin  $\alpha_v\beta_3$  as mediators of the effects of SPARC, we used ZEB1 knocked down-LNCaP cells and RGD peptides that selectively target integrin  $\alpha_v\beta_3$ .

## **Results**

In our PCa model, SPARC induces EMT, decreasing the expression of E-cadherin and cytokeratin 18 and increasing the expression of N-cadherin and vimentin. In addition, SPARC induces the expression of the EMT regulatory transcription factors Snail, Slug and ZEB1. Functionally, knocking down SPARC in PC3 cells decreases migration and invasion *in vitro*, without modifying cell proliferation. In addition, SPARC silencing decreases the expression of the integrin  $\beta_3$  subunit, and of some of its downstream effectors such as RHOA, RAC1, ILK and P-FAK925, altering the formation of focal adhesions. The specific blockade of integrin  $\alpha_v\beta_3$  reverses the decrease in E-cadherin and increase in vimentin, induced by SPARC. Finally, we show that the decrease in E-cadherin and the increase in migration, induced by SPARC, require the activation of integrin  $\alpha_v\beta_3$  and the expression of ZEB1.

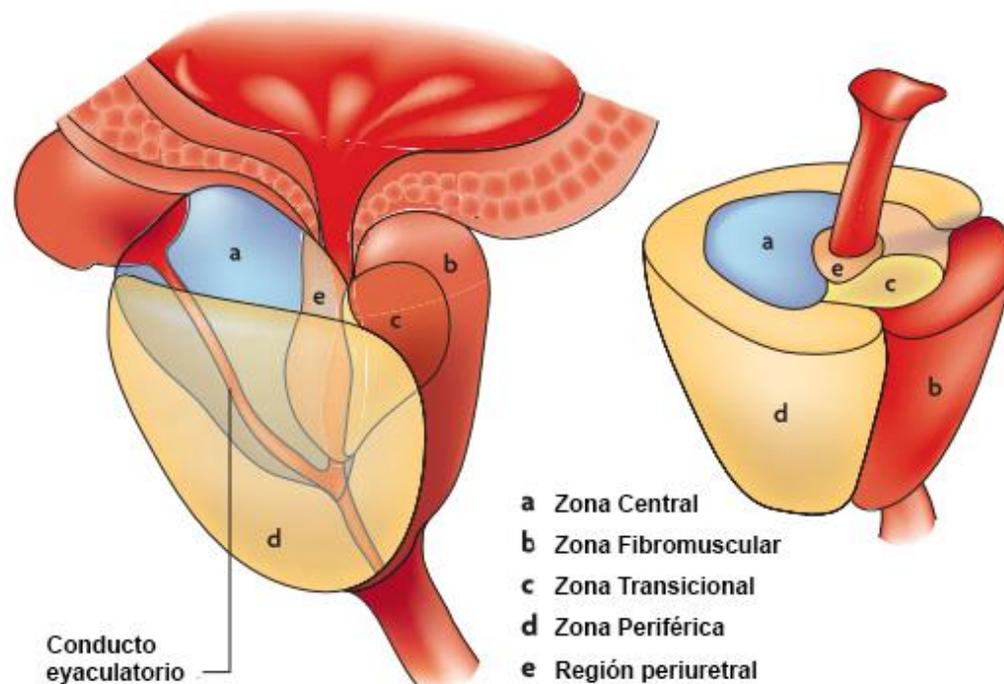
## **Conclusion**

Our results indicate that SPARC is expressed in tumors of high histological grade. SPARC, through integrin  $\alpha_v\beta_3$  and ZEB1, induces EMT and through this program, it could facilitate tumor progression.

# INTRODUCCIÓN

## 1. La próstata

La próstata es una glándula sexual accesoria del aparato reproductor masculino. Anatómicamente, se encuentra localizada anterior al recto e inferior a vejiga, rodeando la uretra prostática. Se encuentra además en estrecha relación con las vesículas seminales. Presenta una forma de pirámide invertida, con el ápice descansando sobre el piso pélvico<sup>1</sup>. Se describen tres zonas anatómicas principales: periférica, de transición y central. Es importante mencionar que mientras las patologías benignas como la hiperplasia prostática benigna y la inflamación ocurren con mayor frecuencia en la zona de transición, más cercana a la uretra, las lesiones pre-malignas y carcinomas se desarrollan preferentemente en la zona periférica, que se encuentra directamente anterior al recto<sup>2</sup> (figura 1).



- a Zona Central
- b Zona Fibromuscular
- c Zona Transicional
- d Zona Periférica
- e Región periuretral

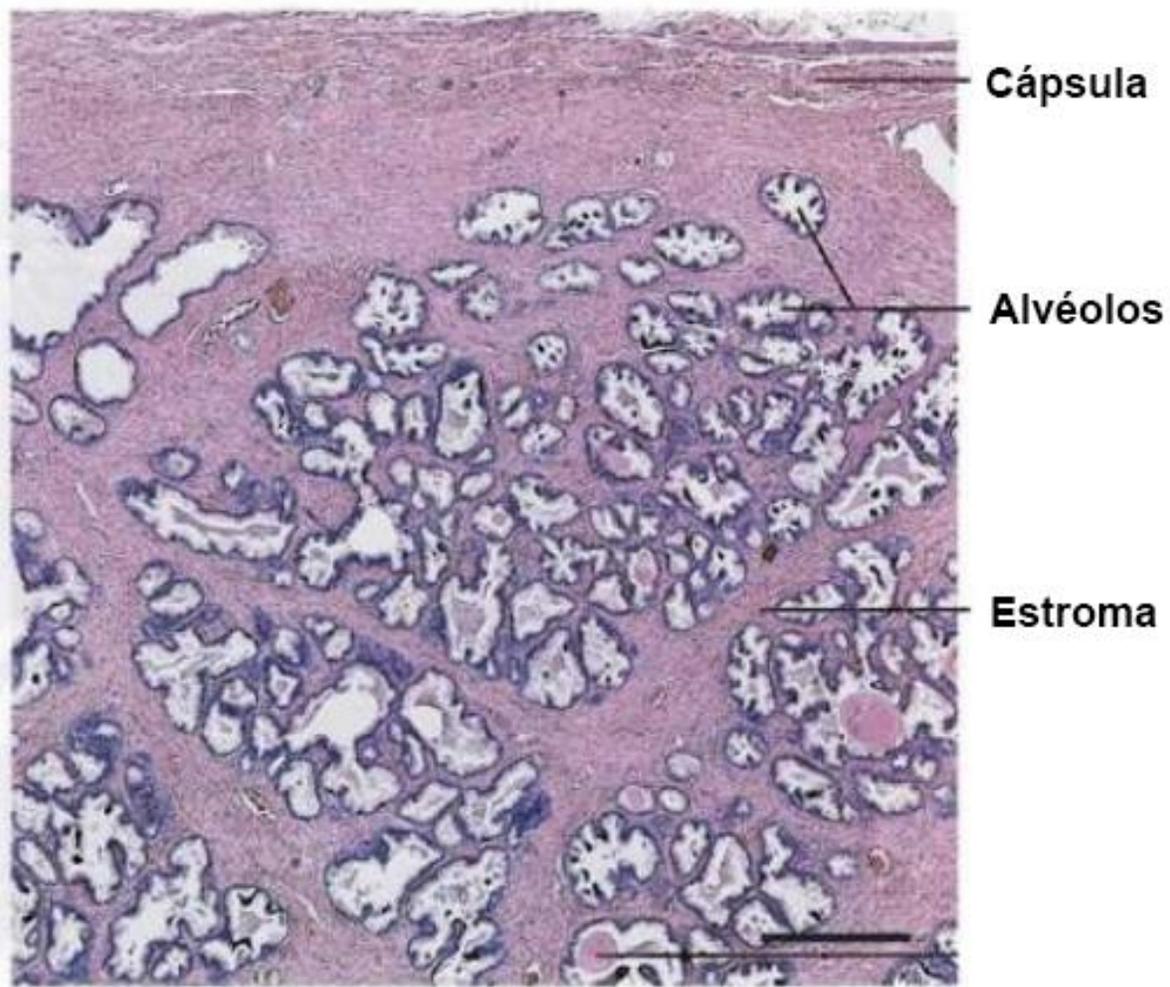
|                                | Zonas de la próstata |            |         |
|--------------------------------|----------------------|------------|---------|
|                                | Periférica           | Transición | Central |
| Atrofia focal                  |                      |            |         |
| Inflamación Aguda              |                      |            |         |
| Inflamación Crónica            |                      |            |         |
| Hiperplasia Prostática Benigna |                      |            |         |
| PIN de Alto Grado              |                      |            |         |
| Carcinoma                      |                      |            |         |

|  |                        |
|--|------------------------|
|  | Prevalencia Alta       |
|  | Prevalencia Media-alta |

|  |                  |
|--|------------------|
|  | Prevalencia Baja |
|  | Ausente          |

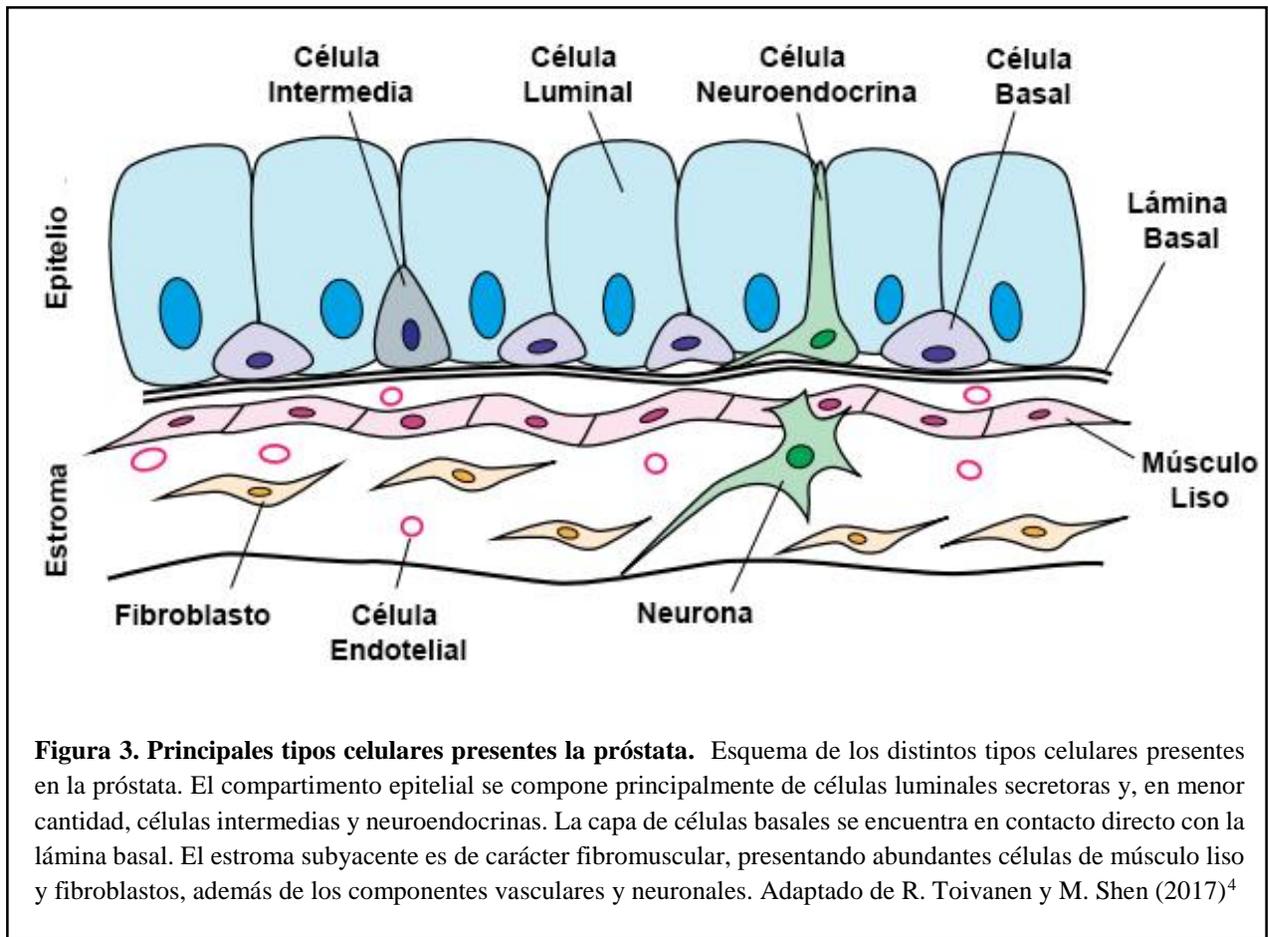
**Figura 1. Zonas anatómicas de la próstata.** Las zonas de la próstata presentan una predisposición diferencial a las distintas patologías prostáticas. La mayoría de las lesiones de hiperplasia prostática benigna se desarrollan en la zona de transición. La mayoría de las lesiones por cáncer o lesiones pre-malignas como la neoplasia prostática intraepitelial (PIN) se producen en la zona periférica de la glándula, con menor frecuencia en la zona de transición y casi ninguna surge en la zona central. Adaptado de A. Marzo et al. (2007)<sup>2</sup>.

Desde un punto de vista histológico, la próstata se compone de glándulas tubuloalveolares, que se vacían en conductos excretores que desembocan en la uretra prostática. Estas glándulas se encuentran rodeadas de un estroma fibromuscular y la próstata en su conjunto está delimitada por una cápsula de tejido conectivo denso<sup>3</sup> (figura 2).



**Figura 2. Histología de la próstata.** Microfotografía de una sección de próstata normal teñida con hematoxilina-eosina. Se observan los alvéolos de tamaño y forma irregular, inmersos en un estroma de tejido conectivo y fibras musculares lisas. La cápsula de tejido conectivo denso rodea completamente la próstata, definiendo su límite anatómico. Barra = 500  $\mu$ m. Aumento 20X. Adaptado de F. Geneser (2015)<sup>3</sup>

El epitelio que compone los alvéolos prostáticos es biestratificado, formado por una capa luminal de células cúbicas a cilíndricas, descansando sobre una capa basal de células aplanadas<sup>3</sup>. Dentro de este epitelio se presentan cuatro tipos celulares que difieren en su morfología y función: células luminales, intermedias, basales y neuroendocrinas<sup>4</sup>. Las células luminales corresponden al componente principal del epitelio prostático: son las encargadas de producir y secretar el fluido prostático, secreción compuesta por zinc, ácido cítrico, fosfatasa alcalina, y antígeno prostático específico (PSA), entre otros<sup>5</sup>. Las células luminales son positivas para receptor de andrógenos, PSA y citoqueratina 18<sup>4</sup>. La gran mayoría de los cánceres de próstata presentan características morfológicas e inmunofenotípicas de este tipo celular, conservando la expresión de estos marcadores en etapas tempranas del cáncer de próstata<sup>6,7</sup>. Las células basales por otro lado corresponden a las células de reserva del tejido, dando origen a las células luminales y a las células intermedias durante su diferenciación. Por último, las células neuroendocrinas se encuentran en el estrato basal en muy baja proporción y secretan neuropéptidos y hormonas<sup>4</sup> (figura 3).



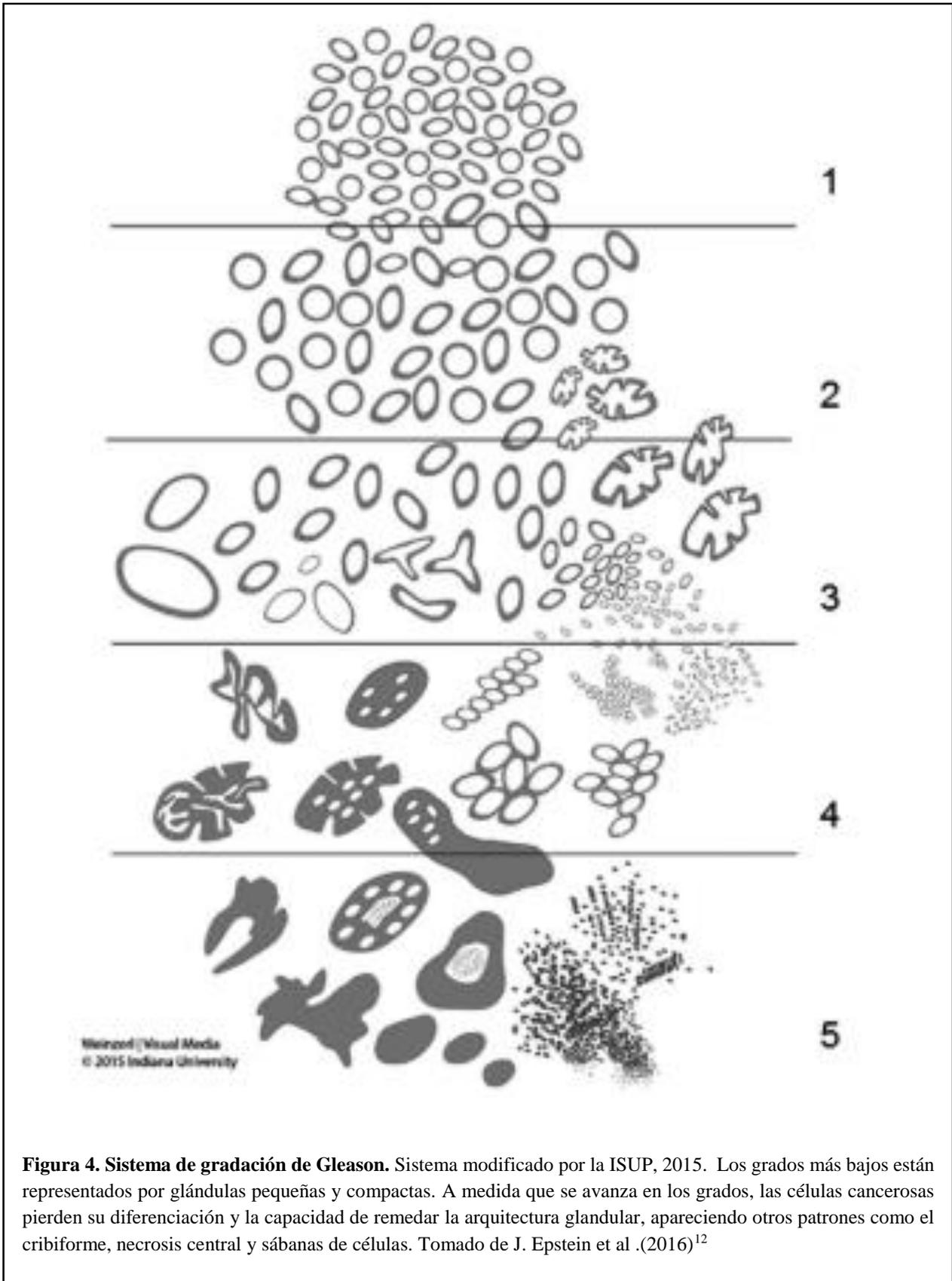
**Figura 3. Principales tipos celulares presentes la próstata.** Esquema de los distintos tipos celulares presentes en la próstata. El compartimento epitelial se compone principalmente de células luminales secretoras y, en menor cantidad, células intermedias y neuroendocrinas. La capa de células basales se encuentra en contacto directo con la lámina basal. El estroma subyacente es de carácter fibromuscular, presentando abundantes células de músculo liso y fibroblastos, además de los componentes vasculares y neuronales. Adaptado de R. Toivanen y M. Shen (2017)<sup>4</sup>

## **2. Cáncer de próstata y sistema de Gleason**

El cáncer de próstata (CaP) es uno de los cánceres con mayor incidencia y mortalidad tanto en Chile como en el mundo.<sup>8</sup> En Chile, el CaP ocupa el primer lugar en incidencia y el segundo lugar en mortalidad por cáncer en hombres, dando cuenta de más de 2000 muertes por año<sup>9</sup> El principal tipo histológico de CaP es el adenocarcinoma, originado en las células luminales de los acinos prostáticos. Sin embargo, también es posible encontrar carcinomas ductales, carcinomas neuroendocrinos y otros tipos histológicos de cáncer, pero en menor proporción<sup>10</sup>. Para efecto de este trabajo, nos limitaremos al tipo adenocarcinoma, refiriéndonos a éste como CaP.

Como se mencionaba anteriormente, el CaP se origina en su gran mayoría en la zona periférica de la próstata, presentándose en esta región entre el 70 al 80% de los casos<sup>10</sup>. El desarrollo de esta neoplasia se asocia a la aparición de lesiones pre-malignas, probablemente precursoras, conocidas como neoplasias intraepiteliales prostáticas. Estas lesiones se caracterizan por presentar glándulas de tamaño intermedio a grande con una arquitectura benigna pero revestidas por células citológicamente atípicas<sup>11</sup>. Cuando estas células degradan la lámina basal (ver más adelante transición epitelio-mesénquima) e invaden el estroma subyacente, estaremos en presencia de un CaP invasor<sup>10</sup>. Las células tumorales del CaP tienen la capacidad de organizarse y formar estructuras que remedan la arquitectura de los acinos prostáticos normales. En atención a esta capacidad, es que los CaP se clasifican según su diferenciación histológica a través del sistema de Gleason, descrito inicialmente por Donald Gleason en 1966 y actualizado recientemente por la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP)<sup>12</sup>.

Brevemente, el sistema consiste en una clasificación morfológica de las estructuras formadas por las células cancerosas, en grados desde el 1 al 5. El grado 1 representa los tumores mejor diferenciados, que forman glándulas bien definidas, mientras que los tumores de grado 5 no muestran diferenciación glandular (figura 4). El CaP se caracteriza por ser heterogéneo y multifocal, presentándose más de un patrón en la mayoría de los tumores. Por esta razón, se asigna un grado primario al patrón dominante y un grado secundario al siguiente patrón más frecuente. La suma de ambos patrones, darán el puntaje de Gleason (GS, por Gleason Score)<sup>12</sup>. Si bien en teoría el GS empezaría desde un GS 1+1=2, debido a la implicancia clínica engañosa de los patrones de Gleason 1 y 2, desde un punto de vista práctico el patrón de Gleason comienza en 3, por lo tanto el GS mínimo asignado a los pacientes en la actualidad es 6<sup>13</sup>.



**Figura 4. Sistema de gradación de Gleason.** Sistema modificado por la ISUP, 2015. Los grados más bajos están representados por glándulas pequeñas y compactas. A medida que se avanza en los grados, las células cancerosas pierden su diferenciación y la capacidad de remodelar la arquitectura glandular, apareciendo otros patrones como el cribriforme, necrosis central y sábanas de células. Tomado de J. Epstein et al .(2016)<sup>12</sup>

Esta gradación permite clasificar a los pacientes en cinco grupos, los cuales permiten determinar, junto con otros parámetros, como el PSA en sangre y clasificación TNM, el riesgo de recurrencia y pronóstico de sobrevida del paciente. Por ejemplo, tomando en cuenta solo el GS, los pacientes de grupo 1 presentan una sobrevida libre de recurrencia de un 96% a los 5 años, mientras que los del grupo 5 presentan sólo un 26% de probabilidad de sobrevida libre de recurrencia a los 5 años.<sup>12</sup> Para efecto de esta tesis, utilizaremos un sistema simplificado, que clasifica tumores primarios en PG bajo, intermedio o alto<sup>11</sup>.

**Tabla 1: Clasificación de CaP según su puntaje de Gleason (PG)**

| <b>Grupo de Grado</b> | <b>PG</b>   | <b>Clasificación simplificada</b> |
|-----------------------|-------------|-----------------------------------|
| <b>1</b>              | $\leq 6$    | PG Bajo                           |
| <b>2</b>              | $3 + 4 = 7$ | PG Intermedio                     |
| <b>3</b>              | $4 + 3 = 7$ |                                   |
| <b>4</b>              | 8           | PG Alto                           |
| <b>5</b>              | 9 o 10      |                                   |

Además, el PG está directamente relacionado con la probabilidad de presentar metástasis óseas. El hueso es el principal sitio de metástasis del CaP, estudios de series de autopsias calculan que entre un 70 a un 90% de los pacientes que mueren por cáncer de próstata presentan metástasis óseas<sup>14,15</sup>. En un estudio de asociación, se encontró que el 19% de pacientes con PG bajo ( $\leq 6$ ) presentaron metástasis óseas, en contraste con el 47% de los pacientes con PG intermedio (7) y el 85% de los pacientes con PG alto (8-10)<sup>16</sup>. Actualmente, la formación de metástasis es la mayor barrera en la sobrevida de los pacientes con CaP. Mientras que los pacientes con enfermedad localizada presentan una sobrevida a 5 años de un 99%, los pacientes con enfermedad metastásica presentan una sobrevida de sólo un 28% a los 5 años<sup>17,18</sup>. La diseminación de las células cancerosas requiere de la activación de procesos fundamentales que aumenten la capacidad invasiva y motil de las células, con el fin de extravasar a la circulación y alcanzar órganos distantes. Esta progresión, en muchos tipos de carcinomas o probablemente en todos ellos, depende de la activación del programa de transición epitelio-mesénquima en las células neoplásicas<sup>19</sup>.

### **3. Transición epitelio-mesénquima y ZEB1 en el cáncer**

La transición epitelio mesénquima (TEM), es un proceso que involucra una serie de cambios moleculares y celulares que llevan a la pérdida de características propias de las células epiteliales y adquisición de marcadores y capacidades funcionales propias de células mesenquimales<sup>20</sup>. Este programa fue descrito por primera vez durante la embriogénesis, siendo de especial relevancia en durante etapas como la gastrulación o en la morfogénesis de los tejidos durante el desarrollo<sup>21</sup>. Sin embargo, en tejidos adultos también se puede activar este programa, participando tanto en procesos fisiológicos y patológicos como la cicatrización de heridas, regeneración de tejidos y progresión tumoral<sup>20</sup>.

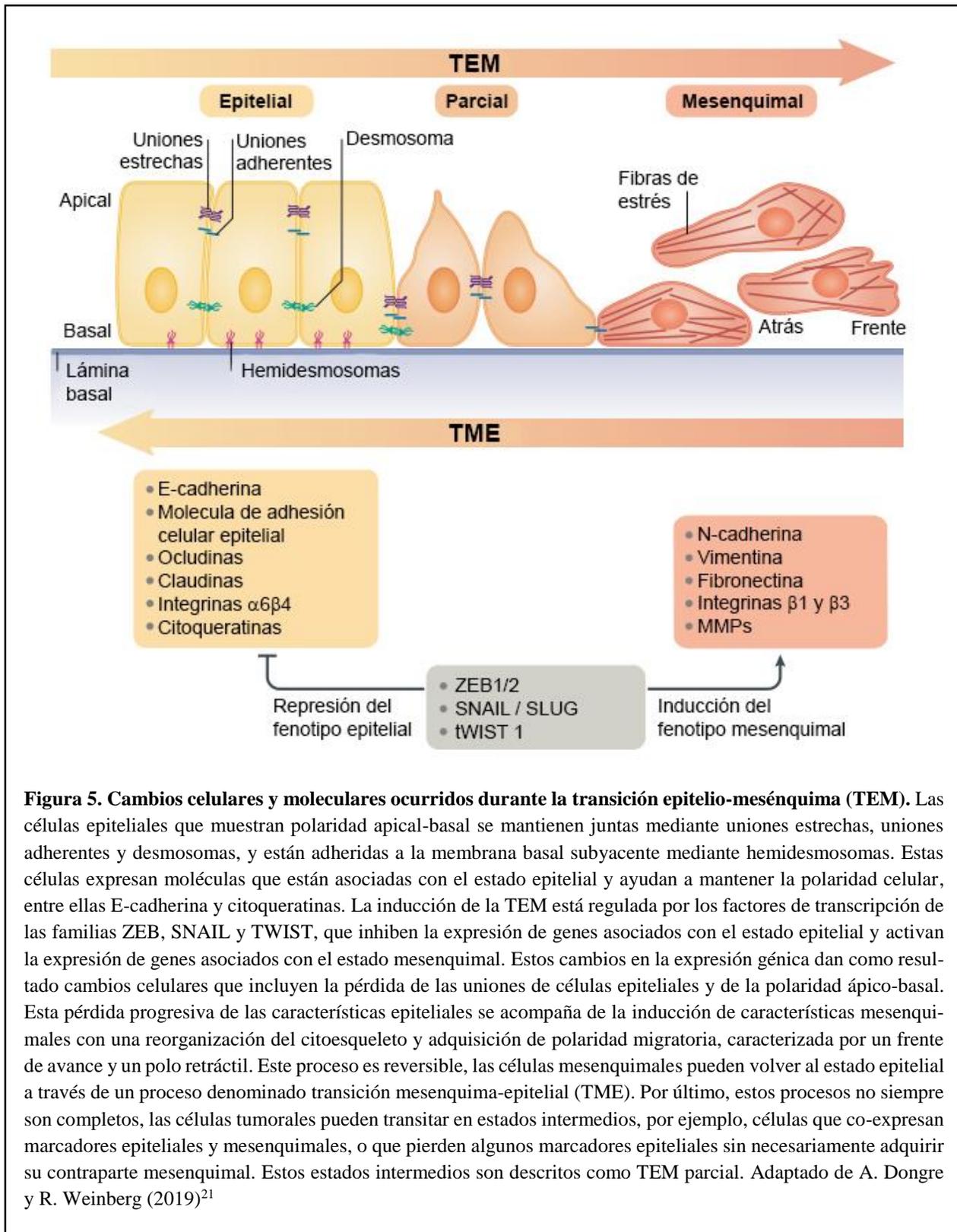
Algunas de las características que diferencian el fenotipo celular epitelial del mesenquimal son la forma, polaridad, motilidad y capacidades invasivas. Por un lado, las células epiteliales se caracterizan por formar monocapas de células poligonales en cultivo. En tejidos, las células epiteliales presentan una polaridad ápico-basal y se unen fuertemente entre ellas a través de uniones adherentes y uniones estrechas, manteniendo la integridad del epitelio. Por otro lado, las células mesenquimales presentan una morfología ahusada, una polaridad migratoria, caracterizada por la presencia de un frente de avance y un polo retráctil, y en cultivo crecen de manera aislada, formando adhesiones focales con la matriz subyacente<sup>22</sup>. La mantención de esta polaridad es clave para la migración celular y se sustenta principalmente en la actividad diferencial de GTPasas de la familia Rho en distintos dominios celulares, por ejemplo mayor actividad de Rac1 y Cdc42 en el frente de avance de la célula, donde promueven la polimerización de actina y formación de protusiones, mientras que RhoA es más activo en las zonas laterales y polo retráctil, donde promueve la contracción actina-miosina y suprime la actividad de Rac1<sup>23</sup>.

Estas características distintivas de las células epiteliales y mesenquimales, se encuentran determinadas por diferencias en sus programas de transcripción, que controlan, entre muchos otros aspectos, la expresión de proteínas estructurales claves para la mantención del citoesqueleto y uniones célula-célula<sup>22</sup>. Uno de los marcadores más clásicos de la transición epitelio mesénquima es el cambio de E-cadherina por N-cadherina, lo que le confiere a las células una menor capacidad de adhesión entre ellas<sup>20</sup>. Además, E-cadherina participa en la organización de las uniones adherentes junto con tres tipos de cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y p120) y la pérdida de E-cadherina permite la liberación de  $\beta$ -catenina desde la membrana celular y su translocación hacia el núcleo donde actúa como factor de transcripción, promoviendo la expresión de genes relacionados con la proliferación celular y la invasión tumoral<sup>24</sup>. Por otro lado, las células epiteliales expresan varios tipos de citoqueratinas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto (en el caso de las células luminales de la próstata, citoqueratina 8 y citoqueratina 18)<sup>4</sup>, mientras que las células mesenquimales forman sus filamentos intermedios a partir de la proteína vimentina.

Además de estas diferencias estructurales, las células mesenquimales presentan un aumento en sus capacidades invasivas. Como se mencionaba previamente, las células mesenquimales presentan un fenotipo altamente migratorio, sin embargo, para invadir en el tejido conectivo requieren además de la expresión de proteínas que degraden componentes de la matriz, principalmente de la familia de las metaloproteasas de la matriz (MMPs). Las MMPs son enzimas proteolíticas dependientes de zinc y calcio. En humanos, se describen más de 25 tipos de MMPs las cuales pueden estar ancladas a la membrana o ser secretadas al extracelular y tienen diferen-

tes blancos, entre ellos proteínas como colágeno, elastina y fibronectina. Dentro de las más relevantes en el CaP se encuentran la MMP-2, que degrada el colágeno tipo IV presente en la lámina basal y elastina, y la MMP-7, que degrada distintos tipos de colágenos, entre ellos el I, III y IV<sup>25</sup>. La expresión de las MMPs y de otras moléculas mencionadas previamente, como E-cadherina y N-cadherina se encuentran bajo el control de los denominados factores de transcripción reguladores de TEM (FTs-TEM)<sup>21</sup>.

Se denominan FTs-TEM a aquellos factores de transcripción que reprimen directamente genes epiteliales involucrados en la adhesión, polaridad celular y organización del citoesqueleto, a la vez que inducen la expresión de genes mesenquimales. Dentro de los más representativos están los factores de transcripción de las familias SNAIL, TWIST y ZEB<sup>26</sup> (Figura 5).



Los FTs-TEM SNAIL, TWIST y ZEB actúan coordinada y jerárquicamente, regulándose entre ellos, potenciando y desencadenando secuencialmente la adquisición de marcadores de TEM. ZEB se expresa más tardíamente que SNAIL y TWIST durante la TEM y constituye un factor importante en el proceso metastásico y también en otros aspectos importantes de la progresión tumoral, como la inducción de fenotipo *cancer stem cell*, y resistencia a terapia<sup>27</sup>. La familia de proteínas ZEB engloba a los factores de transcripción ZEB1 y ZEB2. Estos factores de transcripción se caracterizan por presentar motivos dedos de zinc, a través de los cuales se unen a las secuencias denominadas cajas E-box, presente en los promotores de diversos genes, promoviendo su represión o activación<sup>27</sup>. La sobreexpresión de ZEB1 o ZEB2 en células epiteliales induce TEM, mediante la represión directa de E-cadherina, de componentes de uniones estrechas como ocludinas y claudinas, y de desmosomas, como la desmoplaquina. Además, ZEB1 y ZEB2 activan la expresión de genes mesenquimales como N-cadherina y vimentina, en conjunto con varios tipos de MMPs<sup>24</sup>. Por otro lado, ZEB1 y ZEB2 son reprimidos por microRNAs no codificantes de la familia miR-200, que son importantes para la mantención del fenotipo epitelial. A su vez, los miR-200 son reprimidos transcripcionalmente por ZEB1 y ZEB2, formando así bucles regulatorios que mantienen a las células en estado epitelial o mesenquimatoso<sup>28</sup>. En CaP se ha observado que ZEB1 se expresa mayormente en próstatas de GS alto<sup>29,30</sup>, y en líneas celulares más agresivas, como DU145 y PC3, en comparación con líneas menos agresivas como LNCaP y 22RV1<sup>29,30</sup>. Además, ZEB1 promueve la progresión tumoral induciendo eventos claves como la proliferación celular, migración, invasión y resistencia a quimioterapia<sup>29,31-33</sup>.

Como se mencionaba anteriormente, los FTs-TEM juegan un rol clave en la regulación directa de expresión de proteínas que le otorgan a la célula los fenotipos epitelial y mesenquimal. En

las células tumorales, la actividad de estos factores de transcripción es gatillada por proteínas o miRNAs, secretados por células pertenecientes al microambiente tumoral, o por las mismas células cancerosas. Entre los inductores paracrinos se encuentran los fibroblastos asociados a cáncer (también conocidos como fibroblastos activados), células del sistema inmune y células madre mesenquimales<sup>34</sup>. Estas células del microambiente tumoral secretan inductores de TEM, como por ejemplo factores de crecimiento de la familia de TGF- $\beta$ , citoquinas, MMPs, y proteínas de matriz extracelular<sup>35</sup>. Uno de los inductores de TEM más clásicos es TGF- $\beta$ 1. Este factor de crecimiento es secretado por fibroblastos activados en mayor cantidad en comparación con los fibroblastos normales y se ha demostrado que induce TEM en muchos tipos de carcinomas, entre ellos CaP, mediante la activación de su receptor TGF- $\beta$ R1<sup>36</sup>. La activación de TGF- $\beta$ R1 induce la fosforilación de proteínas de la familia SMAD, quienes actúan como factores transcripcionales promoviendo la expresión de los FTs-TEM, entre ellos ZEB1<sup>37</sup>. En los últimos años se han descrito otras proteínas secretadas que son capaces de inducir TEM mediante la activación de vías de señalización que activan FTs-TEM, entre ellas, la proteína secretada acídica y rica en cisteínas (SPARC).

#### 4. SPARC y su papel en el cáncer

SPARC, también conocida como osteonectina, basement membrane – 40 o BM-40, es una proteína perteneciente a la familia de proteínas matricelulares, que son aquellas proteínas que son secretadas a la matriz extracelular pero que no forman parte estructural de éstas, si no que su función es regular interacciones célula-matriz<sup>38,39</sup>. El gen de SPARC es de copia única y se encuentra altamente conservado entre especies. En humanos, se localiza en el cromosoma 5q31-33 y en su promotor contiene cajas GCA y elementos de respuesta a AMPc, *heat shock* y glucocorticoides<sup>39</sup>. Además, la síntesis de SPARC es inducida por factores de crecimiento como TGF- $\beta$ 1 y PDGF<sup>40</sup>.

La proteína SPARC es de 304 aminoácidos, pesa 40 kDa y presenta tres dominios principales. Hacia el extremo N-terminal está el dominio ácido, el cual presenta secuencias de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  y a hidroxiapatita. El dominio central se denomina “similar a folistatina” por su secuencia homóloga, y contiene péptidos que pueden ser clivados y ejercer distintas funciones, principalmente en células endoteliales, en las cuales estimula la proliferación y angiogénesis. Por último, hacia el C-terminal se encuentra el dominio de unión a  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular. A través de este dominio, SPARC media la deposición de los colágenos I, III, IV y V en la matriz extracelular<sup>39</sup>.

Similar a ZEB1, SPARC se expresa altamente durante las etapas de desarrollo y diferenciación tisular, sin embargo, declina en la mayoría de los tejidos luego de su maduración. En tejidos diferenciados, la expresión de SPARC se limita a aquellos que presentan un alto recambio de matriz extracelular, como el hueso, epitelio intestinal y tejidos en reparación. En el hueso,

SPARC es secretado por osteoblastos hacia la matriz ósea, donde promueve la formación, mantención y reparación del hueso, regulando el procesamiento del procolágeno, el ensamblaje de la matriz y su mineralización<sup>41,42</sup>.

En cáncer, la expresión y función de SPARC es controversial, numerosos reportes muestran que SPARC puede promover como también inhibir la progresión tumoral, incluso dentro de un mismo tipo de tumor. Debido a este comportamiento dual, se sugiere que SPARC podría ejercer distintos efectos, dependiendo del tipo celular que lo exprese y la etapa de progresión en que se encuentre el tumor<sup>40,43</sup>.

SPARC presenta propiedades pro-tumorales en varios tipos de cánceres incluyendo gliomas, astrocitomas, melanomas, adenocarcinoma de mama, páncreas y próstata<sup>40</sup>. Por ejemplo, en glioblastomas y astrocitomas se ha encontrado que la expresión de SPARC es más alta en comparación con su contraparte normal y la expresión de SPARC es un predictor negativo de supervivencia<sup>44,45</sup>. Además, experimentos *in vitro* muestran que la presencia de SPARC, tanto endógeno como exógeno, aumenta la supervivencia, migración e invasión en células de glioblastoma<sup>46</sup>. Sin embargo, también se ha encontrado que el promotor de SPARC se encuentra hipermetilado en muchos tipos de tumor, entre ellos carcinoma colorectal, cáncer de ovario y páncreas<sup>47,48</sup>. En estos casos, la metilación del promotor de SPARC se correlaciona con un peor pronóstico y

menor sobrevida, por lo que, en estos tumores, estaría funcionando como inhibidor tumoral<sup>40,49,50</sup>.

En CaP específicamente, también hay reportes que indican que SPARC podría actuar como un supresor tumoral. En un estudio en líneas celulares de próstata se observó que la expresión de SPARC se encuentra disminuida en las células tumorales, mayormente en células LNCaP y DU145, en comparación con la línea epitelial RWPE-1. Esta disminución de expresión se correlaciona con la hipermetilación del promotor de SPARC y puede ser revertida por agentes demetilantes. Además, se encontró que el 70% los tumores primarios presentan hipermetilación de SPARC, lo cual se correlaciona con un peor pronóstico<sup>47</sup>. De manera similar, Shin et al<sup>51</sup> describieron que SPARC se expresaba en mayor cantidad en el tejido prostático normal adyacente al tejido tumoral, en comparación a éste último, específicamente en el componente estromal. Por otro lado, el co-cultivo de células de CaP junto con células estromales derivadas de próstata normal disminuye la fosforilación de AKT, lo cual es parcialmente revertido cuando se suprime la expresión de SPARC en las células estromales, por lo que SPARC podría estar actuando como un supresor tumoral paracrino. En un estudio *in vivo*, se cruzaron ratones TRAMP (modelo transgénico que generan tumores de CaP espontáneamente) con ratones *knock out* para SPARC. Los ratones TRAMP<sup>+</sup>/SPARC<sup>-/-</sup> mostraron un desarrollo acelerado de CaP en comparación a los TRAMP<sup>+</sup>/SPARC<sup>+/+</sup>. Además, los tumores de ratones TRAMP<sup>+</sup>/SPARC<sup>+/+</sup> presentan menos células en proliferación y menos expresión de ciclinas A y D1, en comparación a aquellos provenientes de ratones con SPARC *knock out*, sugiriendo que la expresión de SPARC en el tejido prostático limitaría la progresión tumoral<sup>52</sup>. En un modelo de metástasis óseas se encontró que aquellas células que mostraban un fenotipo indolente (no formaban tumores al

inyectarse en la tibia) secretaban altas cantidades de SPARC, en comparación con las líneas celulares que crecían rápidamente en el hueso. Al igual que en otros estudios<sup>47,49</sup>, este fenotipo altamente agresivo se correlaciona con la hipermetilación del promotor de SPARC. El tratamiento de estas células con agentes demetilantes aumenta la expresión de SPARC y suprime el crecimiento tumoral *in vivo*, sugiriendo que SPARC podría mantener a las células metastásicas en un estado durmiente<sup>50</sup>. Además, SPARC proveniente del microambiente metastásico podría estar ejerciendo efectos similares. En un estudio *in vitro*, se cultivaron células de CaP sobre matrices minerales sintetizadas por osteoblastos silvestres o por osteoblastos *knock out* para SPARC. En este estudio se encontró que las células sembradas en matrices sintetizadas por osteoblastos silvestres presentaban una menor capacidad proliferativa y menor resistencia a la radiación en comparación a las células sembradas en matrices sin SPARC<sup>53</sup>. Este experimento apoya la idea de que SPARC podría suprimir el crecimiento de metástasis de CaP en el hueso.

Sin embargo, estos estudios contradicen los primeros estudios de SPARC en CaP, que proponen a SPARC como uno de los principales responsables por el establecimiento de las metástasis óseas. Jacobs y colaboradores<sup>54</sup> demostraron que los extractos óseos inducen la migración e invasión de células de CaP entre 2 a 4 veces más que los extractos de otros tejidos como hígado, cerebro o pulmón. Además, demostraron que SPARC, presente en altas cantidades en los extractos óseos, es el componente activo que induce estos efectos. Posteriormente, De. y colaboradores<sup>55</sup> corroboraron estos antecedentes, mostrando que la migración de células de CaP hacia

los extractos óseos es proporcional a la cantidad de extracto presente y depende de la presencia de SPARC en estos extractos.

Recientemente, Mateo y colaboradores<sup>56</sup> demostraron que las células de CaP con alta y baja expresión de SPARC cooperan entre ellas para establecer las metastasis. En este estudio, SPARC, secretada por un clon de células de CaP que no presentan características de *cancer stem cells* (CSC), ejerce efectos paracrinicos sobre una población de células enriquecidas en CSC y que expresan bajas cantidades de SPARC. Esta interacción paracrina resulta en un aumento en las capacidades metastásicas de las células con características de CSC<sup>56</sup>.

En otros modelos tumorales se ha descrito que SPARC induce la expresión de los FTs-TEM Snail y Slug y a través de estos aumenta sus capacidades invasivas<sup>57-60</sup>. En células de melanoma SPARC inhibe la expresión de E-cadherina y aumenta la expresión de Snail, un represor directo de la expresión de E-cadherina<sup>57</sup>. De igual manera, SPARC aumenta la expresión de Slug en células de melanoma con la concomitante pérdida de E-cadherina y adquisición de características mesenquimales<sup>60</sup>. En cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), SPARC induce proliferación, migración y aumento de Snail y marcadores mesenquimales en las líneas celulares CL1-5 y H1299<sup>58</sup>. Estos antecedentes sugieren que SPARC podría estar involucrado en etapas más tempranas del desarrollo tumoral, promoviendo la TEM y con ello, la migración e invasión de las células de CaP en el tumor primario.

## 5. Integrinas relacionadas con la acción de SPARC

En los antecedentes presentados previamente, no se describe un receptor de superficie o intracelular que sea específico para SPARC, sin embargo, en otros modelos celulares se ha visto que SPARC induce distintos efectos a nivel celular mediante la interacción con subunidades de integrinas. Por ejemplo, en células de pulpa dentaria SPARC induce migración a través de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ERK<sup>61</sup>. En células de melanoma, SPARC promueve la invasión, mediada por catepsina B, interactuando con integrina  $\alpha_2\beta_1$  y colágeno I<sup>62</sup>. En CaP, las células tumorales migran hacia SPARC gracias a la activación de las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ <sup>55</sup>.

Además, SPARC no sólo podría estar modificando la actividad de las integrinas sino también su expresión. Por ejemplo, en cáncer de ovario SPARC ejerce un efecto anti-adhesivo, el cual está mediado en parte por una disminución significativa de la expresión de las subunidades  $\alpha_5$ ,  $\beta_1$  y los heterodímeros de  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  en la superficie celular<sup>63</sup>. Por otro lado, algunos efectos antitumorales de SPARC también son mediados por integrinas: en células de CaP en que SPARC inhibe la proliferación y migración, SPARC co-precipita con integrina  $\beta_1$  y la neutralización de integrina  $\beta_1$  con anticuerpos restaura la capacidad proliferativa y migratoria de estas células<sup>51</sup>.

SPARC no sólo se ha relacionado con la actividad y expresión de integrinas, sino también con la activación y expresión de sus principales efectores *río abajo*, la quinasa de adhesiones focales

(FAK) y la quinasa ligada a integrinas (ILK). En la línea celular de mioblastos C2C12, el estímulo de SPARC aumenta la expresión de ILK, mientras que el bloqueo de SPARC con anticuerpos la disminuye<sup>64</sup>. En fibroblastos obtenidos de pulmón, se encontró que SPARC colocaliza con integrina  $\beta_1$  e ILK y es necesario para la activación de ILK inducido por fibronectina y la remodelación de la matriz extracelular<sup>65</sup>. Al parecer, esta interacción de SPARC con integrina  $\beta_1$  aumentaría la activación de ILK, protegiendo a las células de la apoptosis<sup>66</sup>. Por último, el silenciamiento de SPARC en células de glioma disminuye la fosforilación de AKT, FAK e ILK, teniendo como efecto una disminución de la sobrevida e invasión tumoral<sup>44</sup>.

Estos antecedentes sugieren que los efectos de SPARC en las células de CaP podrían estar mediados por proteínas integrinas con las cuales SPARC estaría interactuando directa o indirectamente. Además, estudios demuestran que la señalización de integrina puede activar el programa de TEM, inducida por otros factores secretados, como por ejemplo TGF- $\beta$ . Particularmente, hay amplia evidencia de comunicación cruzada entre las integrinas formadas por la subunidad  $\alpha_v$ , en especial integrina  $\alpha_v\beta_3$ , y TGF- $\beta$ R para inducir y potenciar los efectos inductores de TEM de TGF- $\beta$ <sup>67,68</sup>. Esta inducción de TEM por integrinas compuestas por subunidades  $\alpha_v$  y  $\beta_3$  también ocurre bajo el estímulo de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)<sup>69</sup> y el gen transformante de tumor pituitario (PTTG)<sup>70</sup>, estimulando la invasión y migración tumoral, además de la respuesta desmoplástica<sup>68,70,71</sup>. A nivel intracelular la inducción de TEM estaría mediada por la activación de ILK y FAK<sup>70,71</sup>, que finalmente llevan a un aumento en la expresión y actividad de FTs-TEM Snail y Slug<sup>72-74</sup>. Considerando estos antecedentes es posible que SPARC, a través de integrina  $\alpha_v\beta_3$  active también al factor de transcripción inductor de TEM ZEB1, induciendo TEM en las células de CaP. De este modo, SPARC podría

cambiar el fenotipo celular a uno más migratorio e invasivo que permita a las células del tumor primario diseminarse y crecer en otros órganos distantes.

## **HIPÓTESIS**

SPARC, vía integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1, induce transición epitelio-mesénquima, aumentando las capacidades invasivas y migratorias *in vitro* de células de cáncer de próstata

## **OBJETIVO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN**

Evaluar el efecto de SPARC y la participación de las vías de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1, en la inducción de transición epitelio-mesénquima, invasión, migración y crecimiento en líneas de cáncer de próstata

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la expresión de SPARC en muestras de pacientes con CaP de distintos grados de Gleason, en cultivos primarios y en líneas celulares de CaP.
2. Evaluar el efecto de SPARC, en la inducción de transición epitelio-mesénquima y las capacidades invasivas y migratorias, en líneas celulares de CaP.
3. Determinar la participación de los ejes de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1 como mediadores de transición epitelio-mesénquima y aumento de la migración, inducido por SPARC en líneas celulares de CaP.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Micro arreglos de tejido (TMA)**

Muestras de tejido de cáncer de próstata, fijadas en formalina e incluidas en parafina, fueron obtenidas a partir prostatectomías radicales, realizadas en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. Las muestras fueron evaluadas por un patólogo experto y clasificadas según su puntaje de Gleason (PG): las muestras con una puntuación de 6 se clasificaron como PG bajo, las muestras con una puntuación de 7 se clasificaron como PG intermedio y las muestras con puntuación de 8 a 10 se clasificaron como PG alto. A partir de los bloques de tejido recolectados, construimos dos TMA que contenían sacabocados de 1 mm de diámetro, de zonas representativas de cada muestra. En total, se incluyeron 23 muestras de PG bajo, 59 muestras de PG intermedio y 26 muestras de PG alto, más 12 muestras de hiperplasia prostática benigna (HPB).

### **Inmunohistoquímica (IHQ)**

Las secciones de tejido obtenidas de los TMA fueron procesadas y teñidas en un equipo de IHQ automatizado (Benchmark GX, Ventana, Tucson, AZ, EE.UU.), utilizando protocolos estándar. Brevemente, las muestras fueron desparafinadas, rehidratadas e incubadas durante 30 min a 95° C en solución de recuperación antigénica (tampón citrato, pH 6,0). Después del bloqueo, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo específico contra SPARC (1:100, 335500, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y los núcleos se tiñeron con hematoxilina (Scytek laboratories, Logan, UT, EE.UU.). Las imágenes digitales fueron obtenidas con un microscopio

Leica DM2500 (Leica, Wetzlar, Alemania). La intensidad de la tinción de con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) fue cuantificada con el software ImageJ 1.51w (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.), utilizando el complemento *IHC toolbox*.

### **Cultivos celulares**

Las líneas celulares usadas en este trabajo fueron compradas desde la American Type Culture Colección (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células LNCaP clon FGC (CRL1740) y 22Rv1 (CRL2505) se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (GIBCO, Life Technologies). Las células DU145 (HTB81) y PC3 (CRL1435) se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) F12 (GIBCO). Ambos medios de cultivo fueron suplementados con suero bovino fetal al 10% (SFB; Mediatech, Manassas, VA, EE. UU.), estreptomicina-penicilina y anfotericina B (Corning Inc., Corning, NY, USA). Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 ° C, en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Transducción lentiviral**

Las células con silenciamiento de SPARC se obtuvieron a través de transducción con vectores lentivirales que contienen un RNA de horquilla corta (shRNA) contra SPARC (pLenti-U6-shRNA [h SPARC] -Rsv [GFP-Puro]), o un shRNA scramble como control (pLenti-U6-shRNA [control negativo] -Rsv [GFP-Puro]). Para sobreexpresar SPARC, las células se transdujeron con un lentivirus que contiene la secuencia SPARC acoplada a una etiqueta HA (pLenti-suCMV [h SPARC-HA] - Rsv [GFP-Puro]) o el vector vacío como control (pLenti-suCMV [Control nulo] -Rsv [GFP-Puro]). Todos los lentivirus fueron adquiridos desde Gen Target Inc. (San Diego, CA, EE. UU.) y las células fueron infectado utilizando un protocolo estándar. Brevemente,  $7,5 \times 10^4$  células por pocillo fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Después de 24 h,

las células se incubaron con partículas lentivirales en una multiplicidad de infección de tres, más 5 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en 1 ml de cultivo durante 24 h. Posteriormente, se seleccionaron células que integraron los vectores utilizando 2 µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich) durante 24 h.

### **Western Blot**

La extracción de proteínas de células completas se realizó utilizando buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas (cOmplete mini, EDTA-free, Roche, Indianapolis, IN, EE.UU.). A continuación, se cargaron 50 µg de proteína, se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) y se fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5% en buffer Tris salino (TBS) con Tween al 0,2% por una hora y se incubaron durante toda la noche con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Después del lavado, los anticuerpos primarios unidos a la membrana fueron detectados con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) y revelados con un kit de detección de quimioluminiscencia para HRP (EZ-ECL, Biological Industries, Cromwell, CT, EE. UU.). Los anticuerpos utilizados en este trabajo se encuentran detallados en la tabla 2.

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados para western blot.**

| <b>Anticuerpo</b>                      | <b>Marca</b>                 | <b>N° Catálogo</b> | <b>Dilución</b> |
|--|------------------------------|--------------------|-----------------|
| <b>SPARC</b>                           | Santa Cruz                   | Sc-25574           | 1:500           |
| <b>Hemaglutinina (HA)</b>              | Sigma-Aldrich                | H6908              | 1:1000          |
| <b>ZEB1</b>                            | eBioscience                  | 14974182           | 1:1000          |
| <b>Snail</b>                           | Santa Cruz                   | Sc-393172          | 1:500           |
| <b>Slug</b>                            | Santa Cruz                   | Sc-166479          | 1:500           |
| <b>E-cadherina</b>                     | BD Transduction Laboratories | 610181             | 1:1000          |
| <b>N-cadherina</b>                     | Life Technologies            | 333900             | 1:1000          |
| <b>Vimentina</b>                       | AbCam                        | Ab8978             | 1:2000          |
| <b>Integrina <math>\beta_1</math></b>  | Cell Signaling               | 9669T              | 1:1000          |
| <b>Integrina <math>\beta_3</math></b>  | Cell Signaling               | 13166T             | 1:1000          |
| <b>Integrina <math>\beta_4</math></b>  | Cell Signaling               | 14803T             | 1:1000          |
| <b>Integrina <math>\beta_5</math></b>  | Cell Signaling               | 3629T              | 1:1000          |
| <b>Integrina <math>\alpha_5</math></b> | Cell Signaling               | 4705T              | 1:1000          |
| <b>Integrina <math>\alpha_v</math></b> | Cell Signaling               | 4711T              | 1:1000          |
| <b>FAK</b>                             | Cell Signaling               | 13009T             | 1:1000          |
| <b>P-FAK (Y397)</b>                    | Cell Signaling               | 8556T              | 1:1000          |
| <b>P-FAK (Y576/577)</b>                | Cell Signaling               | 3281T              | 1:1000          |
| <b>P-FAK (Y925)</b>                    | Cell Signaling               | 3284T              | 1:1000          |
| <b>Actina</b>                          | MP Biomedicals               | 691002             | 1:5000          |
| <b>Cabra anti-conejo IgG HRP</b>       | Jackson ImmunoResearch       | 111-035-003        | 1:10000         |
| <b>Cabra anti-ratón IgG HRP</b>        | Jackson ImmunoResearch       | 115-035-003        | 1:10000         |

### **Extracción de RNA y RT-qPCR**

El RNA total fue extraído de las células utilizando TRIzol (Ambion, Life Tecnologías). A partir de éste, se sintetizaron tres mil nanogramos de cDNA utilizando el kit cDNA Affinity Script QPCR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y 100 ng de cDNA se amplificaron mediante qPCR utilizando el kit Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies). El gen housekeeping pumilio fue usado como normalizador y los resultados se analizaron utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$ . Los pares de partidores utilizados para los qPCR se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Partidores utilizados para qPCR**

| <b>Gen</b>                            | <b>Partidor sentido</b>                 | <b>Partidor antisentido</b>              |
|---------------------------------------|---|--|
| <b>SPARC</b>                          | 5'-AAC CGA AGA GGA GGT GGT-3'           | 5'-GCA AAG AAG TGG CAG GAA GA-3'         |
| <b>E-cadherina</b>                    | 5'-GAA CGC ATT GCC ACA TAC AC-3'        | 5'-ATT CGG GCT TGT TGT CAT TC-3'         |
| <b>N-cadherina</b>                    | 5'-GGA CAG TTC CTG AGG GAT CA-3'        | 5'-GGA TTG CCT TCC ATG TCT GT-3'         |
| <b>Vimentina</b>                      | 5'-GCC AAG GCA AGT CGC G-3'             | 5'-GCC AAG GCA AGT CGC G-3'              |
| <b>Citoqueratina 18</b>               | 5'-ACA GAG TGA GGA GCC TGG AGA CCG A-3' | 5'-CAG TAT TTG CGA AGA TCT GAG CCC TC-3' |
| <b>ZEB1</b>                           | 5'-TTC ACA GTG GAG AGA AGC CA-3'        | 5'-GCC TGG TGA TGC TGA AAG AG-3'         |
| <b>Snail</b>                          | 5'-TTC CAG CAG CCC TAC GAC CAG-3'       | 5'-GCC TTT CCC ACT GTC CTC ATC-3'        |
| <b>Slug</b>                           | 5'-CTC CAT TCC ACG CCC AGC TAC-3'       | 5'-AGC CAC TGT GGT CCT TGG AG-3'         |
| <b>MMP2</b>                           | 5'-AGC CAC TGT GGT CCT TGG AG-3'        | 5'-ACT TGG AAG GCA CGA GCA AA-3'         |
| <b>MMP7</b>                           | 5'-TGG GAC ATT CCT CTG ATC CT-3'        | 5'-TGA ATG GAT GTT CTG CCT GA-3'         |
| <b>Integrina <math>\beta</math>3</b>  | 5'- ACC AGT AAC CTG CGG ATT GG-3'       | 5'-CTC ATT GAA GCG GGT CAC CT-3'         |
| <b>Integrina <math>\alpha</math>v</b> | 5'-TCT CTC GGG ACT CCT GCT AC-3'        | 5'-CTG GGT GGT GTT TGC TTT GG-3'         |
| <b>RAC1</b>                           | 5'-TCC GCA AAC AGA TGT GTT CTT A-3'     | 5'-ATG GGA GTG TTG GGA CAG TG-3'         |
| <b>RHOA</b>                           | 5'-GGT GAT GGA GCC TGT GGA AA-3'        | 5'-TGT GTC CCA CAA AGC CAA CT-3'         |
| <b>FAK</b>                            | 5'-CAG GGT CCG ATT GGA AAC CA-3'        | 5'-CTG AAG CTT GAC ACC CTC GT-3'         |
| <b>ILK</b>                            | 5'-CTT CCC TGG ATC ACT CCA CAG-3'       | 5'-GGG AGA AGC CAT GAT CGT CC-3'         |
| <b>Pumilio</b>                        | 5'-TGA ATG GAT GTT CTG CCT GA-3'        | 5'-CGT ACG TGA GGC GTG AGT AA-3'         |

### **Inmunofluorescencia indirecta y tinción fluorescente.**

Las células se sembraron en cubreobjetos de 12 mm a una confluencia del 50%. Después de 24 h, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100 en PBS durante 10 min, se lavaron y se bloquearon con 3% BSA en PBS durante 30 min. Posteriormente, las células se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario: anti-SPARC (1:100, sc-25574, Santa Cruz), anti-Zeb1 (1:50, sc-25388, Santa Cruz) o Ki67 (1:50, sc-15402, Santa Cruz). Luego de lavar, las células se incubaron durante 45 minutos con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (1:500, A21207, Life Technologies). Para la tinción nuclear, se utilizó 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1:10000, sc3598, Santa Cruz) y para la tinción citoplasmática se utilizó faloidina (50 µg/ml, P-1951, Sigma-Aldrich). El área celular y la circularidad se cuantificaron utilizando el software ImageJ 1.51w.

### **Ensayo de cierre de herida**

Las células utilizadas fueron sembradas a confluencia en placas de 24 pocillos. La herida se hizo con una punta de micropipeta y el cierre de herida fue monitoreado cada 12 hrs durante 3 días. El área de la herida fue utilizando el software ImageJ 1.51w.

### **Ensayo de trans migración**

Para el ensayo de trans migración, se sembraron  $5 \times 10^4$  células por pocillo, en la cámara superior de una placa CytoSelect™ (Cell Biolabs, San Diego, CA, EE.UU.) de 96 pocillos, con membranas de poro de 8 µm. Las células sembradas en la cámara superior se mantuvieron con medio de cultivo sin SFB, mientras que, en la cámara inferior, se agregó medio de cultivo con 10% de SFB como quimioatrayente. Después de 24 h, las células que trans migraron se resuspendieron

y se tiñeron con CyQuant® GR Dye (Cell Biolabs). La fluorescencia a 485/528 nm se cuantificó en un lector de placas BioTek Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.).

### **Ensayo de invasión in vitro**

El ensayo de invasión se realizó en una placa CytoSelect™ (Cell Biolabs) de 96 pocillos con membranas de poro de 8 µm, recubiertas con lámina basal, siguiendo el mismo protocolo utilizado para el ensayo de trans migración descrito anteriormente.

### **Ensayo de viabilidad con MTT**

La viabilidad celular se evaluó utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para ello, se sembraron  $1 \times 10^4$  células en una placa de 48 pocillos. Después de 24, 48 y 72 hrs, las células se lavaron en PBS, se añadieron 100 µl de solución de trabajo de MTT (15 µl MTT [5 mg/ml] en 500 µl de solución de Locke) y se incubó durante 3 hrs a 37°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, los cristales de formazán se resuspendieron en 100 µl de dimetilsulfóxido y se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas BioTek Synergy HT (BioTek).

### **Prueba de exclusión azul tripán**

Para esta prueba, se sembraron  $5 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 12 pocillos y el crecimiento celular se controló cada 24 hrs durante 3 días, contando el número total de células viables por pocillo. Para esto, las células se desprendieron con tripsina y se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo. A continuación, se agregaron 10 µl de azul de tripán (0.4%; Sigma-Aldrich) a 10 µl de la suspensión celular y 10 µl de esta mezcla se cargaron en un hemocitómetro (Paul

Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Konigshofen, Alemania). Solo se consideraron las células viables (no teñidas) para el recuento.

### **Ensayo de formación de adhesiones focales**

En este ensayo se sembraron  $5 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pocillos, sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos por fibronectina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Al día siguiente, las células se depletaron de suero por 3 hrs y posteriormente se indujo la migración celular con medio DMEM F12 suplementado con 10% de SFB. Las células fueron fijadas y teñidas con el procedimiento de inmunofluorescencia descrito anteriormente. Los anticuerpos utilizados para este ensayo fueron anticuerpo primario vinculina (1:400, V9131, Sigma-Aldrich), anticuerpo secundario Alexa Fluor 555 (1:500, ab150118, AbCam) y la actina se marcó con faloidina - Alexa Fluor 488 (1:5000, A12379, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.)

### **Análisis estadísticos**

El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Para el análisis de los TMA, la distribución de datos fue evaluada con la prueba de normalidad D'Agostino-Pearson y las diferencias entre grupos se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis. En todos los otros experimentos, los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar, de al menos tres experimentos independientes. Para datos continuos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, prueba t de Student o ANOVA de una o dos vías para analizar las diferencias entre grupos. En todos los casos,  $P \leq 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo. El valor  $P$ , el número de experimentos y la prueba estadística utilizada en cada caso en particular, se detalla al pie de cada figura.

### **Consideraciones éticas**

La utilización de muestras de archivo de tejido de cáncer de próstata fue aprobado por el comité ético del Hospital Clínico de la Universidad de Chile para el proyecto FONDECYT #1151214, cuyo investigador principal es el Dr. Héctor Contreras

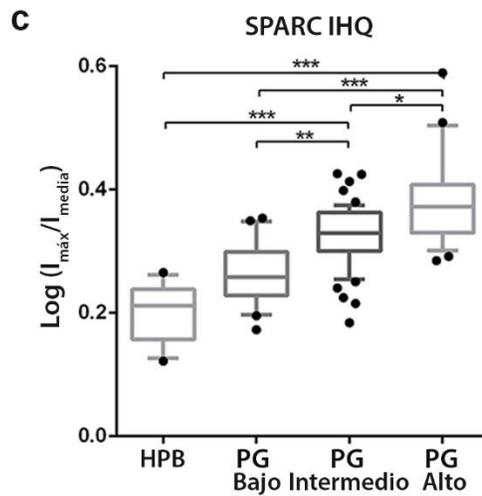
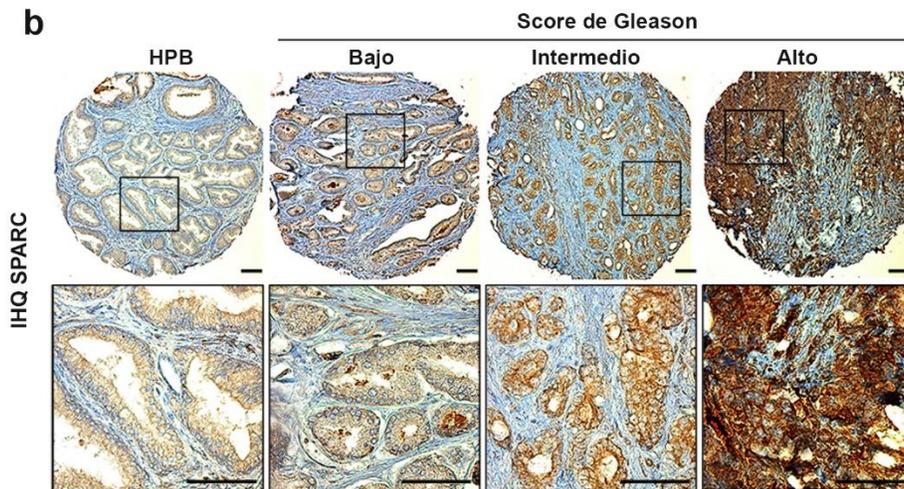
## **RESULTADOS**

**OBJETIVO 1: Evaluar la expresión de SPARC en muestras de pacientes con CaP de distintos grados de Gleason, en cultivos primarios y en líneas celulares de CaP.**

### **1.1 Expresión de SPARC en muestras de pacientes con CaP de distintos grados de Gleason.**

Para evaluar la expresión de SPARC en muestras de pacientes con CaP, se construyeron dos micro arreglos de tejido (TMA) con muestras de tejido de próstata de 120 pacientes, incluyendo muestras de hiperplasia prostática benigna (HPB) y CaP de Score de Gleason bajo, intermedio y alto (figura 6a). En estas muestras se realizó una detección inmunohistoquímica de SPARC. Como se muestra en la figura 6b, las muestras de CaP presentan tinción intracelular positiva para SPARC. Además, la cuantificación de la tinción (figura 6c) muestra que la expresión de SPARC se encuentra aumentada en muestras de grado de Gleason intermedio y alto, en comparación con las muestras de HPB y CaP de Gleason bajo ( $P \leq 0.01$ , Kruskal-Wallis).

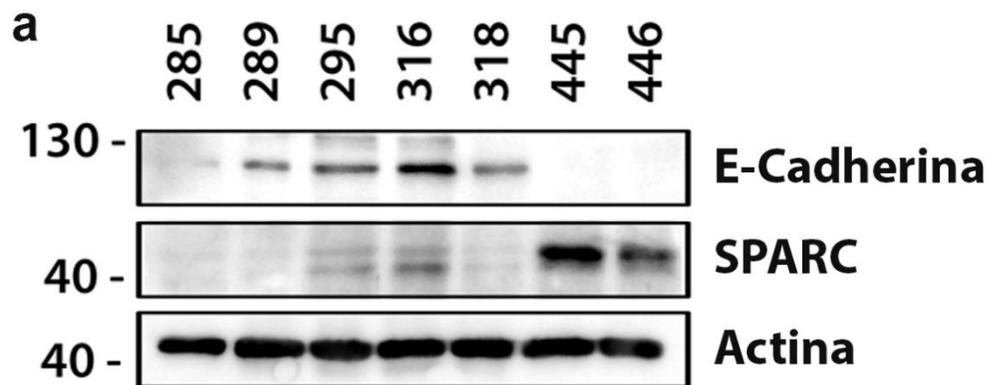
| a | Diagnóstico Histopatológico | Número de Biopsias (n=120) |
|---|-----------------------------|----------------------------|
|   | HPB                         | 12                         |
|   | PG Bajo (<7)                | 23                         |
|   | PG Intermedio (=7)          | 59                         |
|   | PG Alto (>7)                | 26                         |



**Figura 6. Expresión de SPARC en muestras de pacientes. a.** Número de biopsias analizadas por grupo, **incluidas en los dos TMAs de tejido. b.** Imágenes representativas de inmunohistoquímica contra SPARC en TMAs de muestras de pacientes con HPB y CaP de Score de Gleason bajo, intermedio y alto. La fila inferior corresponde a un aumento del inserto superior. Barras = 100  $\mu\text{m}$ . **c.** Cuantificación de la señal IHQ de SPARC. Los gráficos de caja muestran la intensidad de la expresión de SPARC en cada grupo. \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$ , (Kruskal-Wallis test).

## **1. 2 Expresión de SPARC en cultivos primarios de cáncer de próstata.**

Para abordar este objetivo se utilizaron siete cultivos primarios originados desde tumores primarios de CaP. En estas células se evaluó la expresión de SPARC y E-cadherina a través de western blot. En la figura 7, se puede observar que los cultivos primarios que expresan SPARC presentan una baja expresión de E-cadherina.

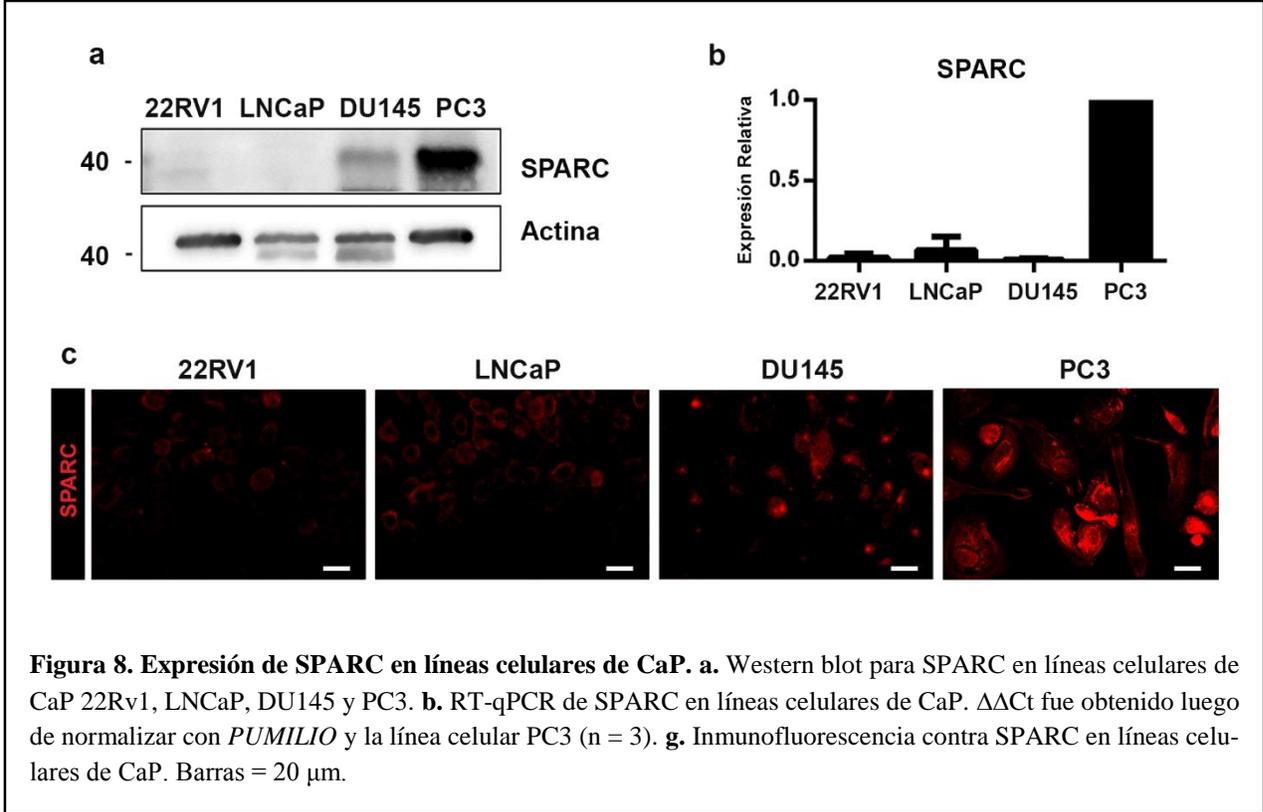


**Figura 7. Expresión de E-Cadherina y SPARC en cultivos primarios de CaP derivados de pacientes. a.** La expresión de E-cadherina y SPARC fue evaluada a través de western blot con anticuerpos específicos para estas proteínas, en siete cultivos primarios derivados de pacientes distintos (285, 289, 295, 316, 318, 445 y 446).

### **1.3 Expresión de SPARC en líneas celulares de cáncer de próstata.**

Se evaluó la expresión de SPARC mediante RT-qPCR, Western Blot e IFI, en cuatro líneas celulares comerciales, que representan distintos estadios de la progresión del CaP: 22Rv1, obtenidas desde un tumor primario; LNCaP, obtenidas desde una metástasis linfonodal; DU145, obtenidas desde una metástasis cerebral; y PC3, obtenidas desde una metástasis ósea.

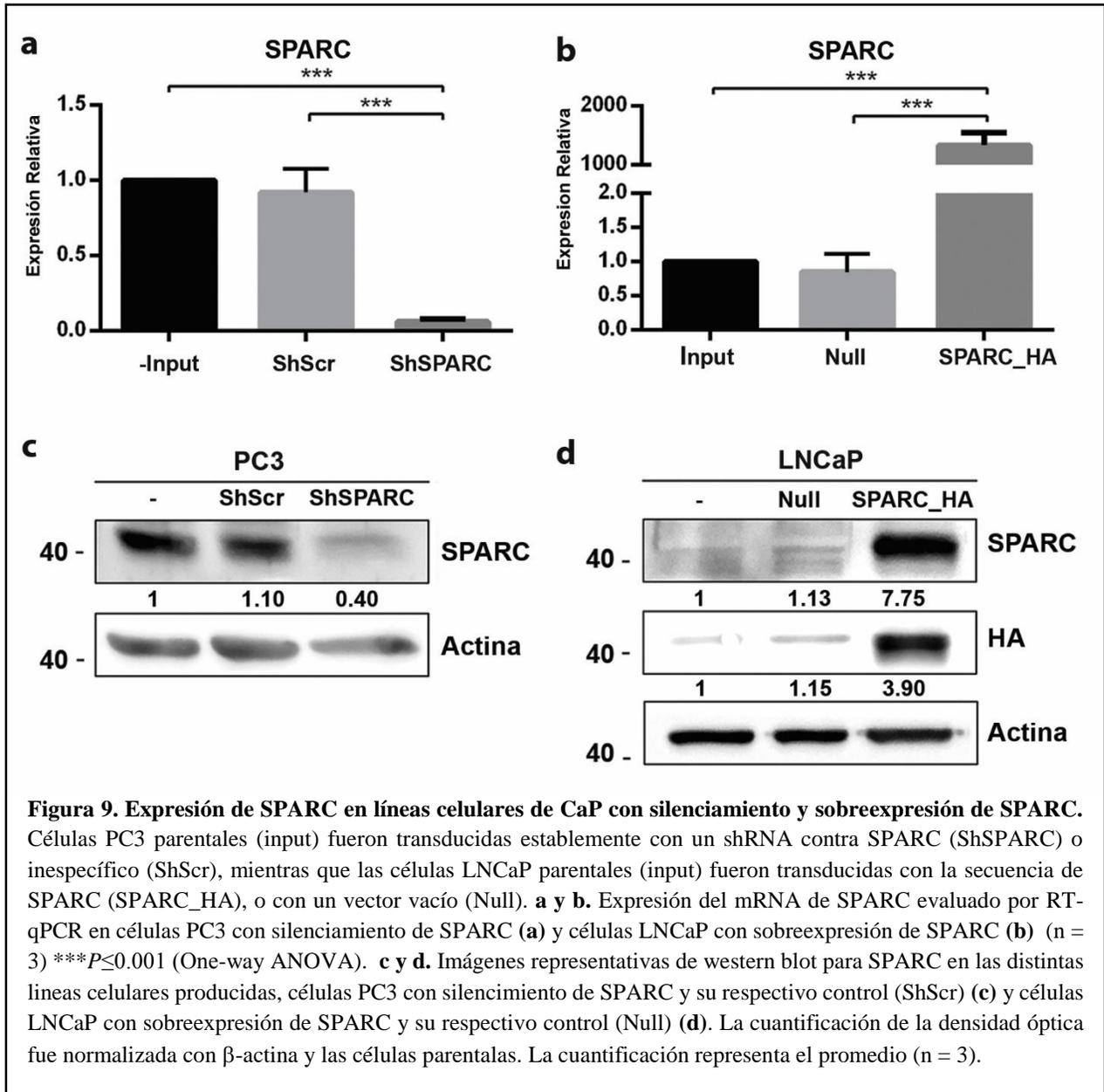
En las líneas celulares estudiadas, la que presentó mayor expresión de SPARC, tanto a nivel de mRNA como de proteína, fueron las células PC3. Comparadas a éstas, las células 22Rv1, LNCaP y DU145 presentan baja expresión de SPARC (figura 8).

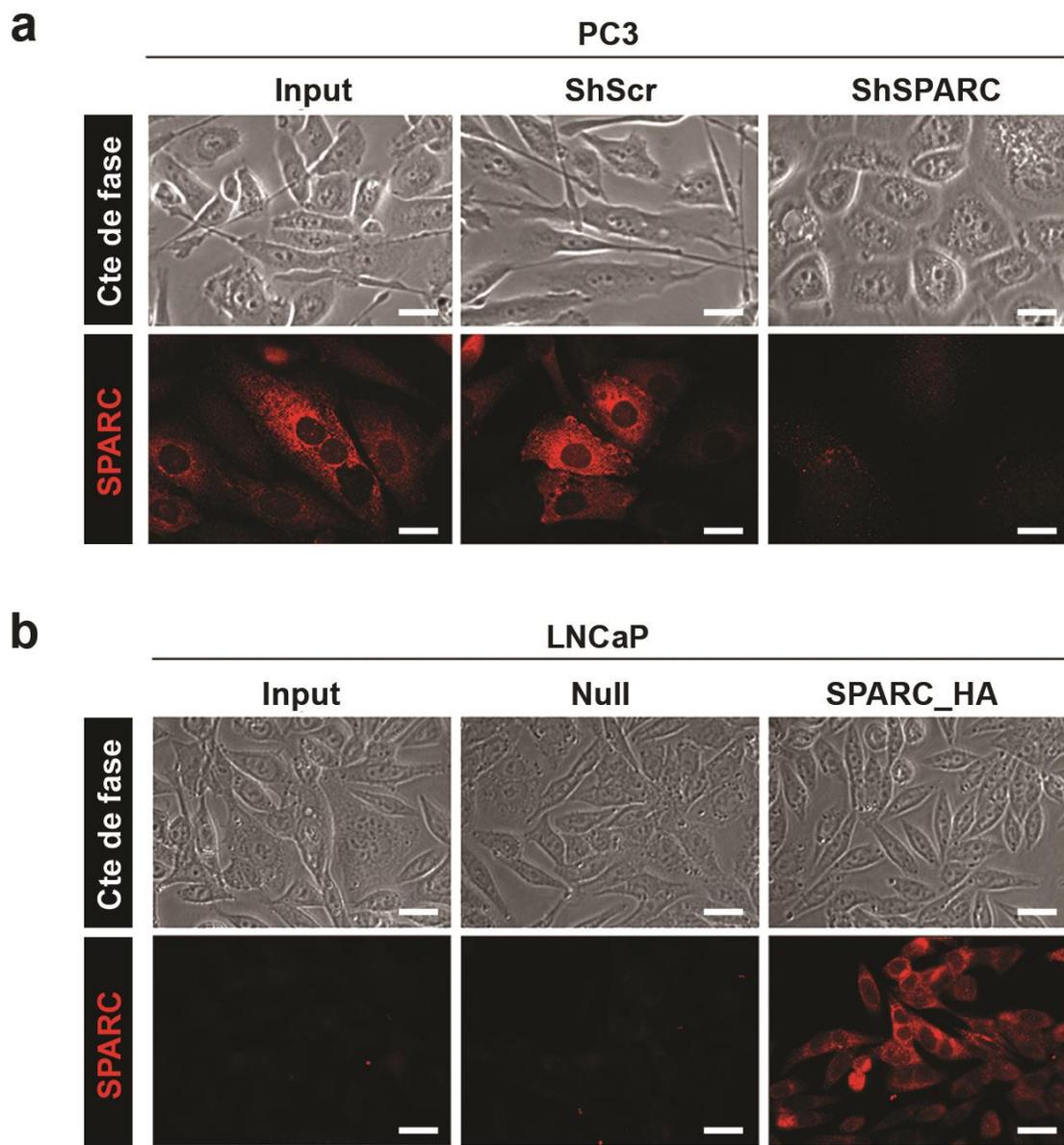


**OBJETIVO 2: Evaluar el efecto de SPARC, en la inducción de transición epitelio-mesénquima y las capacidades invasivas y migratorias, en líneas celulares de CaP.**

**2.1 Silenciamiento y sobreexpresión estable de SPARC en líneas celulares de CaP.**

Dado que las células PC3 expresan altos niveles de SPARC de forma basal, en esta línea se indujo silenciamiento de SPARC por transducción con vectores lentivirales que expresan shRNA contra SPARC (shSPARC), utilizando como control un shRNA de secuencia aleatoria (shScramble). Como se puede observar en la figura 9, el silenciamiento de SPARC se ve reflejado en una disminución de la expresión de SPARC tanto a nivel de mRNA como de proteína ( $P \leq 0.05$ , One-way ANOVA). De manera inversa, se indujo sobreexpresión de SPARC en células LNCaP por transducción con vectores lentivirales que expresan la secuencia de SPARC, acoplada a un epítipo HA. Se observó un aumento de la expresión de SPARC a nivel de mRNA y proteína en las células LNCaP con sobreexpresión de SPARC, en comparación al control ( $P \leq 0.05$ , One-way ANOVA). Además, estos cambios a nivel protéico de SPARC fueron observados intracelularmente (figura 10).

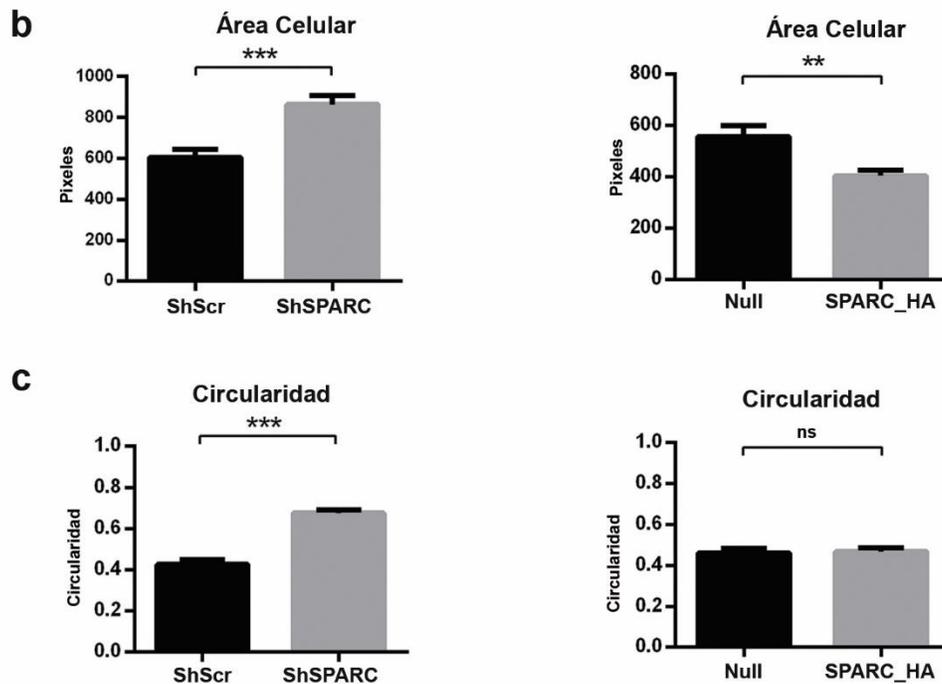
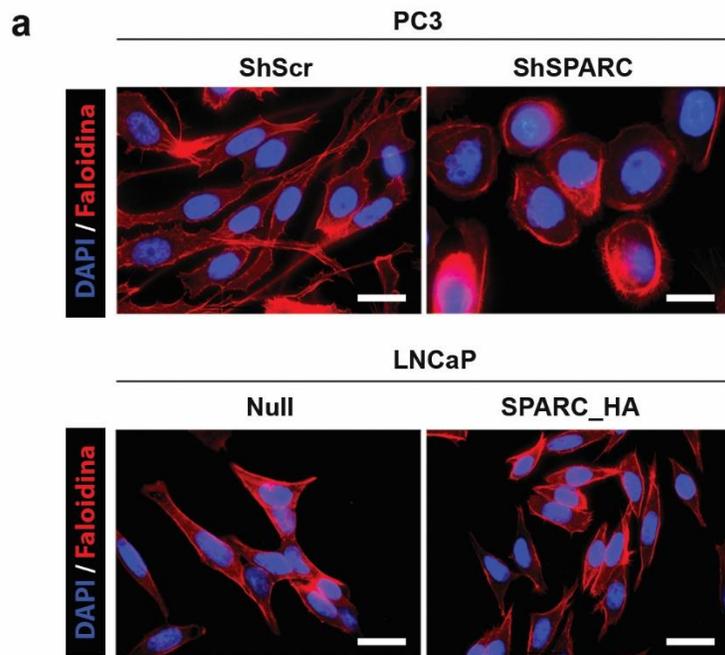




**Figura 10. Expresión intracelular de SPARC en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC. a y b.** Expresión SPARC evaluado por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para SPARC, en células PC3 con silenciamiento de SPARC (**a**) y células LNCaP con sobreexpresión de SPARC (**b**) En las imágenes de contraste de fase se puede apreciar además algunos cambios morfológicos presentes en las células con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC en comparación a sus respectivos controles.

## **2.2 SPARC induce cambios morfológicos en las líneas celulares de CaP.**

Para evaluar si SPARC modifica la morfología celular, las células de CaP PC3 y LNCaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC fueron teñidas con faloidina-RFP y DAPI, y se cuantificó el tamaño celular y la circularidad de estas células. Como se muestra en la figura 11, las células PC3 shScramble son de menor tamaño y fusiformes, lo cual es consistente con una morfología mesenquimal, mientras que las células PC3 shSPARC son más grandes y circulares ( $P \leq 0.05$ , U de Mann-Whitney), lo cual es consistente con una morfología epitelial. Por otro lado, las células LNCaP con sobreexpresión de SPARC son más pequeñas ( $P \leq 0.05$ , U de Mann-Whitney), aunque no se observaron cambios en su circularidad ( $P > 0.05$ , U de Mann-Whitney).

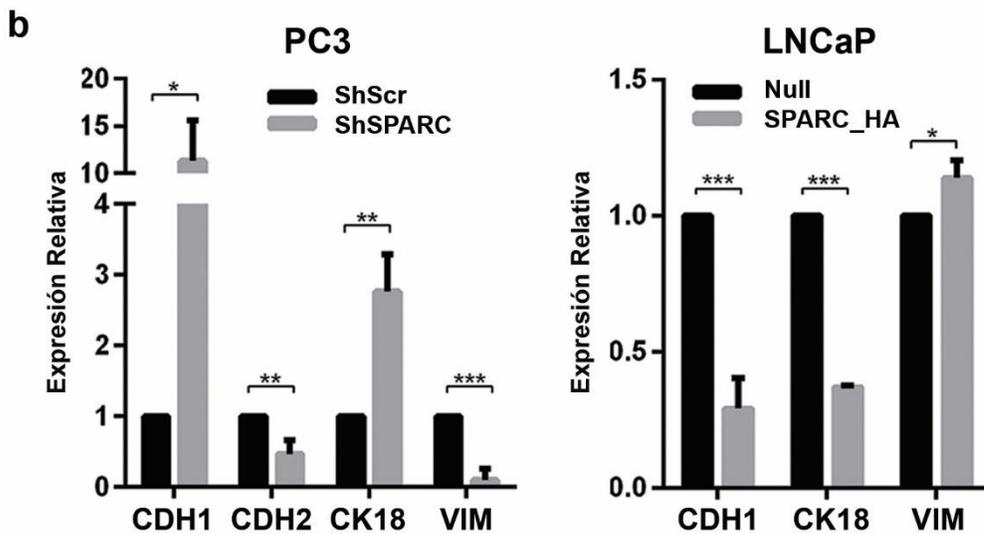
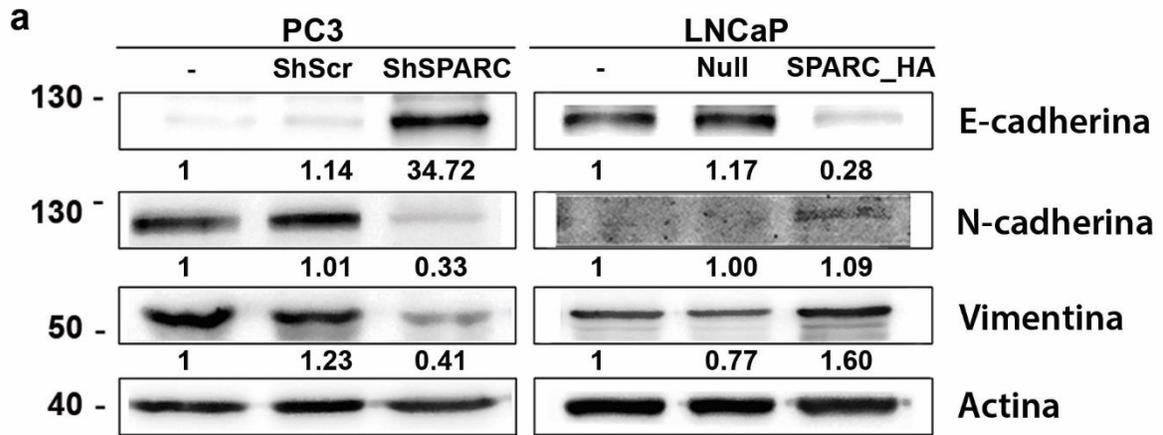


**Figura 11. Morfología de las líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.** a. Imágenes representativas de células PC3 con silenciamiento de SPARC y LNCaP con sobreexpresión de SPARC, teñidas con DAPI y faloidina. Barras = 20  $\mu$ m. b. Cuantificación del área celular en píxeles, de las células PC3 con silenciamiento de SPARC y LNCaP con sobreexpresión de SPARC c. Cuantificación de la circularidad de las células PC3 con silenciamiento de SPARC y LNCaP con sobreexpresión de SPARC. **b y c.** (n = 50) \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , ns =  $P > 0.05$  (Mann-Whitney U test).

### **2.3 SPARC disminuye la expresión de marcadores epiteliales y aumenta la expresión de marcadores mesenquimales en células de CaP.**

Para determinar si la expresión de SPARC por células de CaP puede modificar el fenotipo celular, evaluamos marcadores clásicos de TEM: las moléculas de adhesión célula-célula E-cadherina y N-cadherina, y los filamentos intermedios Vimentina y Citoqueratina 18, en las líneas celulares establecidas: PC3 con silenciamiento de SPARC o control Scramble y LNCaP con sobreexpresión de SPARC o control Null.

En la figura 12 se muestra que el silenciamiento estable de SPARC en células PC3 produce aumento de marcadores epiteliales E-cadherina y citoqueratina 18, acompañado de una disminución de marcadores mesenquimales N-cadherina y vimentina, tanto a nivel de proteínas como de mRNA. Concordantemente, la sobreexpresión de SPARC en células LNCaP induce disminución de e-cadherina y citoqueratina 18, y aumento de vimentina, apoyando la hipótesis de que SPARC induce TEM en células de cáncer de próstata.

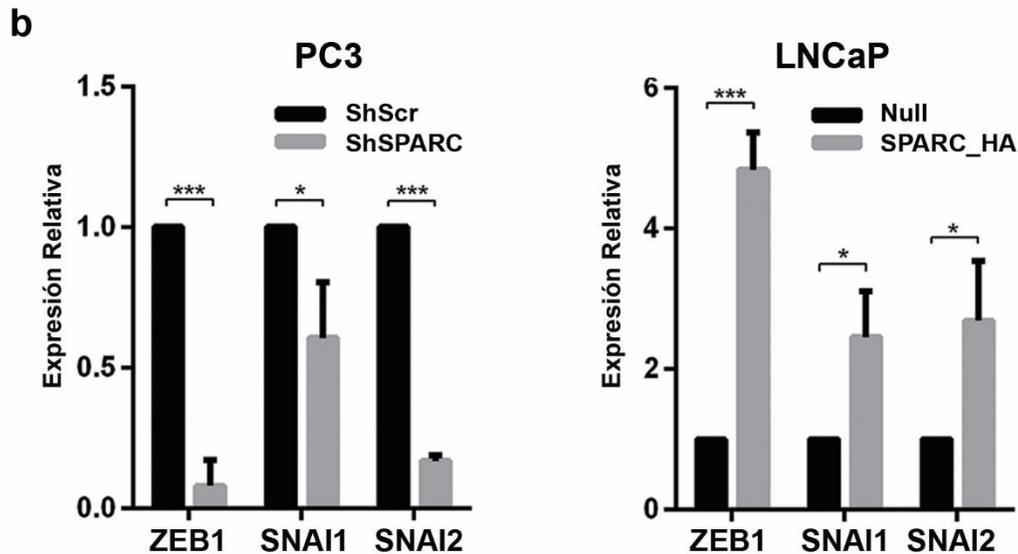
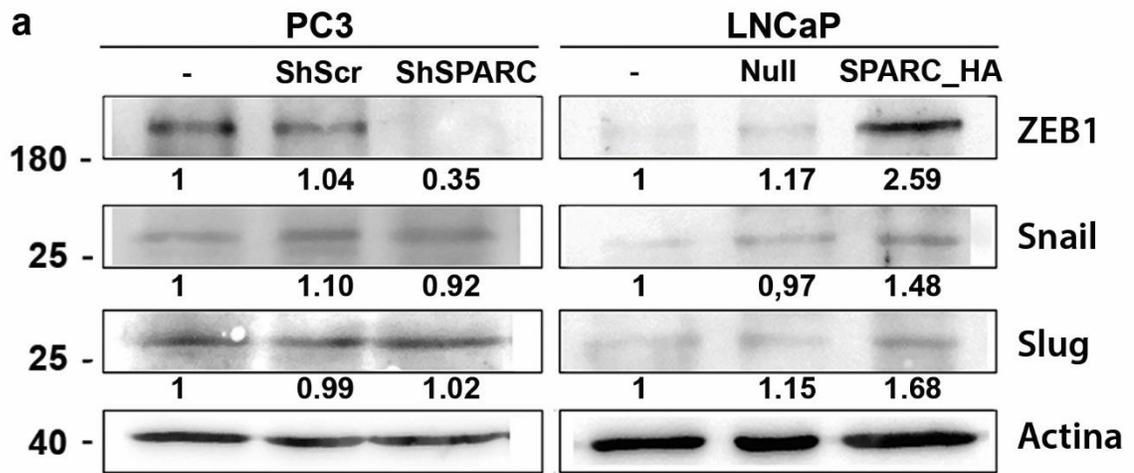


**Figura 12. Expresión de marcadores de TEM en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.** **a.** Evaluación de la expresión proteica de los marcadores de TEM E-cadherina, N-cadherina y Vimentina mediante western blot de las células PC3 transducidas con shRNA contra SPARC, células LNCaP transducidas con la secuencia de SPARC, y sus respectivos controles. La densidad óptica fue normalizada con  $\beta$ -actina y las células parentales (input), la cuantificación representa el promedio ( $n = 3$ ). **b.** Expresión relativa del mRNA de E-cadherina (CDH1), N-cadherina (CDH2), Citoqueratina 18 (CK18) y vimentina (VIM), evaluada por RT-qPCR, en células PC3 con silenciamiento de SPARC y células LNCaP con sobreexpresión de SPARC ( $n = 3$ ), \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$  (Student's test).

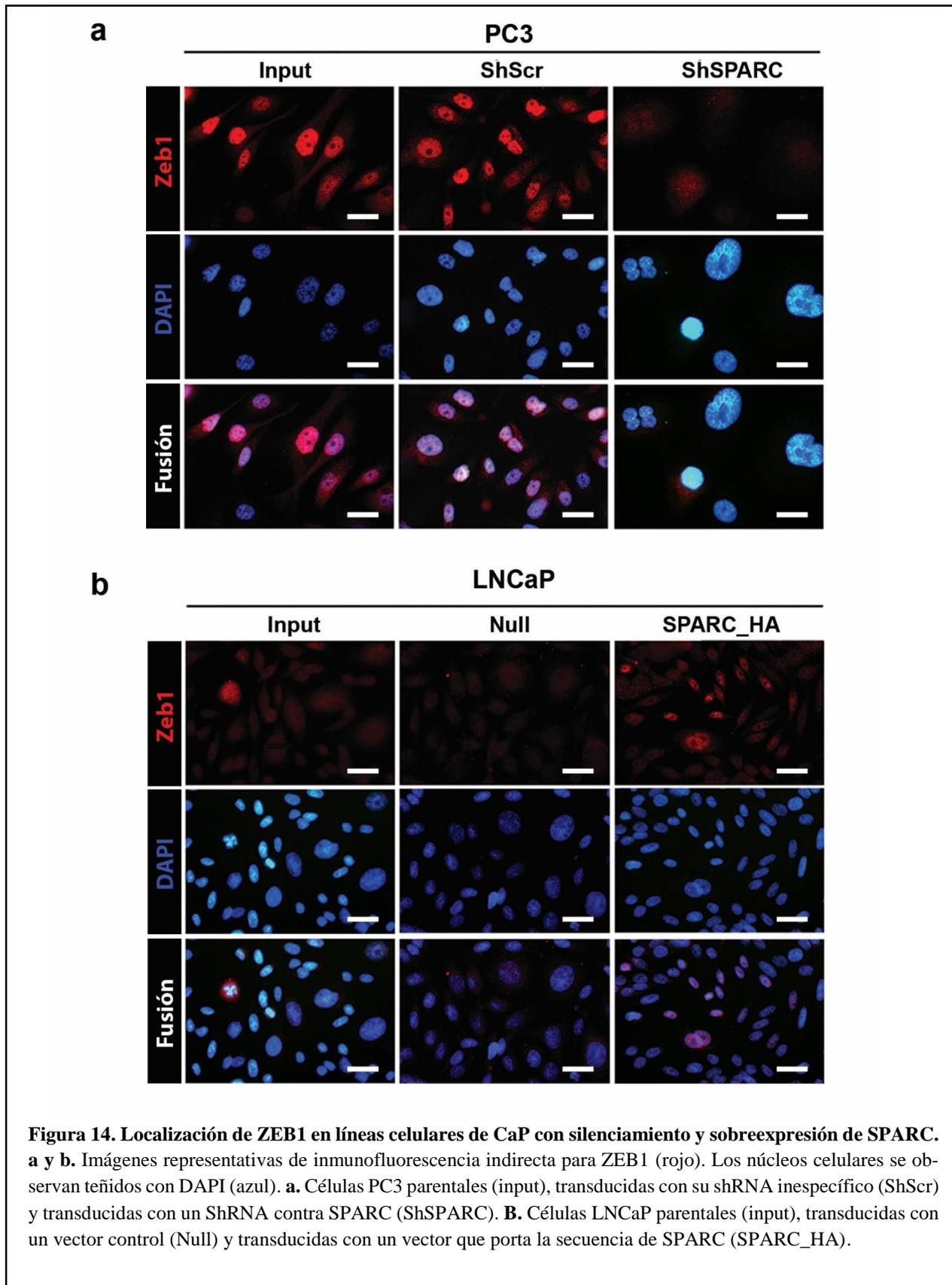
## **2.4 SPARC aumenta la expresión de factores de transcripción inductores de TEM en líneas celulares de CaP.**

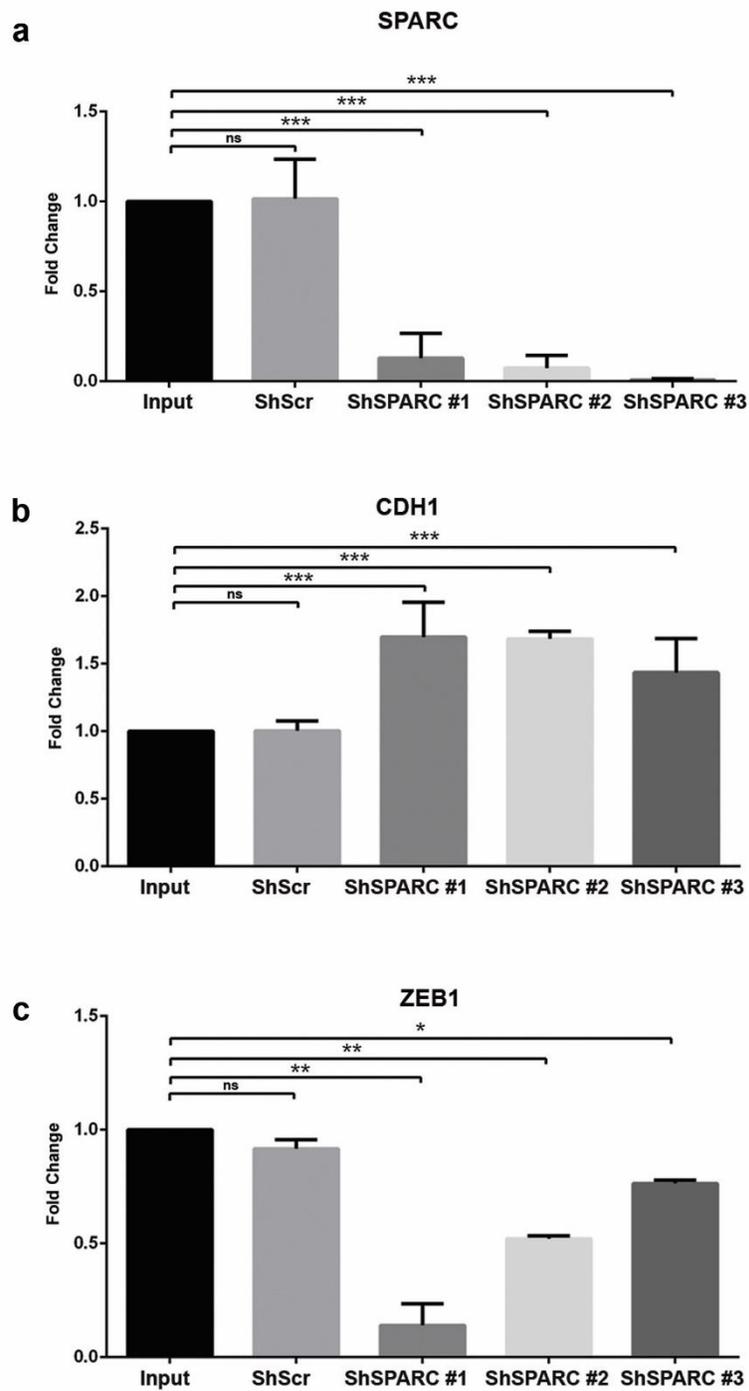
Dado que los cambios en expresión de proteínas que ocurren durante la TEM son gobernados por factores transcripcionales que inhiben la transcripción de genes asociados a fenotipo epitelial e inducen la transcripción de genes mesenquimales, evaluamos si la expresión de SPARC por células de cáncer de próstata puede modificar los niveles de expresión de los factores transcripcionales inductores de TEM como ZEB1, Snail y Slug. El silenciamiento estable de SPARC en células PC3 produjo disminución del mRNA de los factores de transcripción ZEB1, Snail y Slug, sin embargo, por western blot sólo se pudo observar disminución significativa de ZEB1. Por otro lado, la sobreexpresión estable de SPARC en células LNCaP induce un aumento significativo de la expresión de ZEB1, Snail y Slug, tanto a nivel de mRNA como de proteína (figura 13). Además, se verificó que ZEB1 estuviese expresado a nivel nuclear, lo que fue comprobado por IFI (figura 14).

Adicionalmente, para demostrar que estos efectos no son clonales, silenciamos SPARC en otra línea celular de CaP, utilizando distintos shRNA contra SPARC. Podemos observar que, utilizando tres shRNA contra SPARC distintos, el silenciamiento de SPARC indujo un aumento de la expresión de E-cadherina y disminución de la expresión de ZEB1 (figura 15).



**Figura 13. Expresión factores transcripcionales inductores de TEM ZEB1, Snail y Slug, en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.** a. Evaluación de la expresión proteica de los factores transcripcionales inductores de TEM ZEB1, Snail y Slug mediante western blot de las células PC3 transducidas con shRNA contra SPARC, células LNCaP transducidas con la secuencia de SPARC, y sus respectivos controles. La densidad óptica fue normalizada con  $\beta$ -actina y las células parentales (input), la cuantificación representa el promedio ( $n = 3$ ). b. Expresión relativa del mRNA de ZEB1, Snail (SNAI1) y Slug (SNAI2), evaluada por RT-qPCR, en células PC3 con silenciamiento de SPARC y células LNCaP con sobreexpresión de SPARC ( $n = 3$ ), \*\*\* $P \leq 0.001$ , \* $P \leq 0.05$  (Student's test).

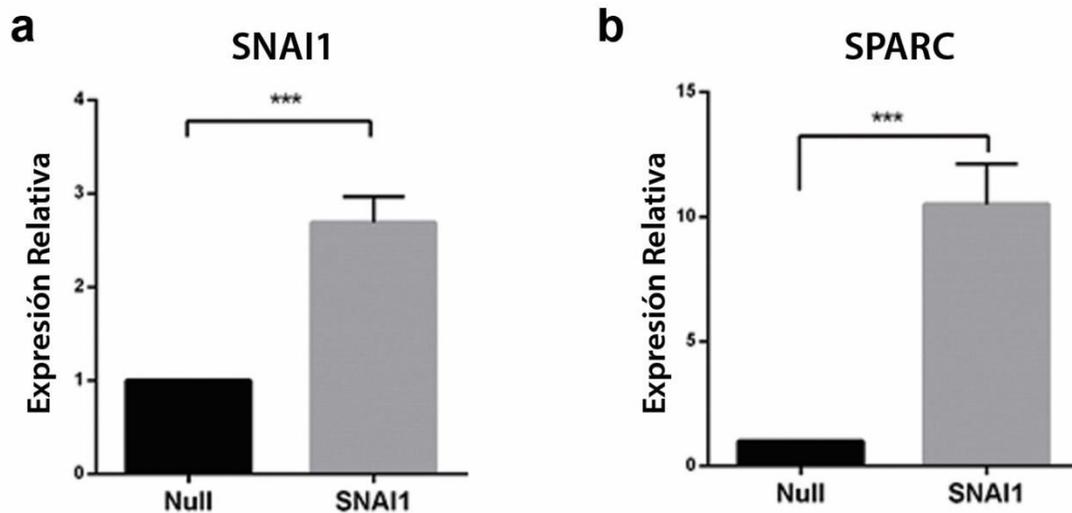




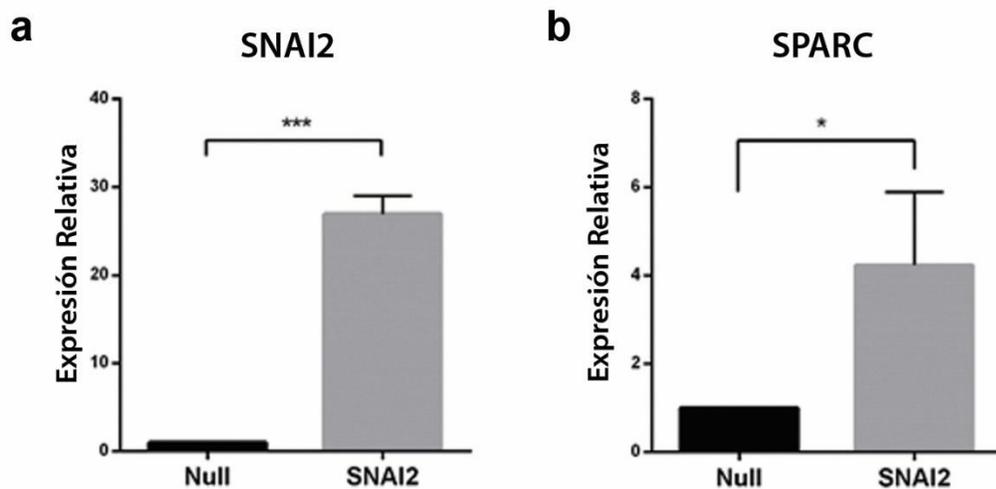
**Figura 15. Expresión de E-Cadherina y ZEB1 en células DU145 con silenciamiento de SPARC.** RT-qPCR para SPARC (a), E-Cadherina (CDH1) (b) y ZEB1 (c) en células DU145 transducidas con tres shRNA contra SPARC distintos (ShSPARC # 1, 2 y 3), o con un shRNA control (ShScr). La expresión de SPARC, E-Cadherina y ZEB1 fue normalizado con *PUMILIO* y las células parentales (input) fueron usadas como control (n = 3), \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$  (One-way ANOVA).

## **2.5 Snail, Slug y ZEB1 aumentan la expresión de SPARC en células de CaP.**

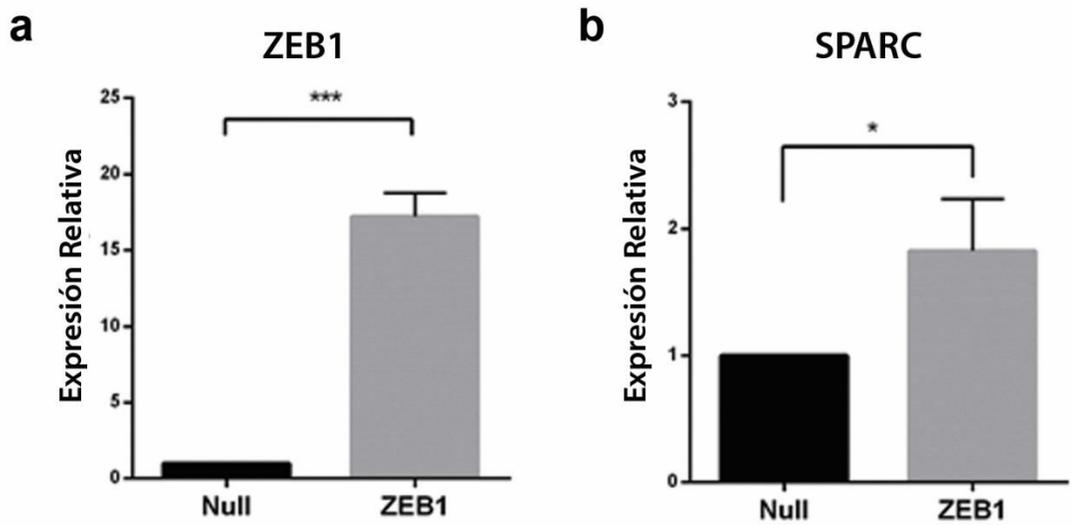
Debido a que observamos que SPARC aumenta la expresión de los factores de transcripción Snail, Slug y ZEB1, nos propusimos evaluar si Snail, Slug y ZEB1 podrían estar regulando la expresión de SPARC de manera recíproca. Para esto, utilizamos células LNCaP con sobreexpresión estable Snail, células LNCaP con sobreexpresión estable de Slug, y células 22Rv1 con sobreexpresión transiente de ZEB1. Interesantemente, observamos que tanto la sobreexpresión de Snail (figura 16), como la sobreexpresión de Slug (figura 17) o de ZEB1 (figura 18), cada uno por sí sólo, aumentan la expresión de SPARC en líneas celulares de CaP.



**Figura 16. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP con sobreexpresión de Snail a.** RT-qPCR para Snail (SNAI1), en células LNCaP con sobreexpresión estable de Snail (SNAI1) células LNCaP control (Null).  $\Delta\Delta C_t$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMILIO* y la línea control (Null) (n = 3). \*\*\* $P < 0.001$  (Student's test). **b.** RT-qPCR para SPARC en células LNCaP con sobreexpresión estable de Snail (SNAI1) y células LNCaP control (Null).  $\Delta\Delta C_t$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMILIO* y la línea control (Null) (n = 3). \*\*\* $P < 0.001$  (Student's test).



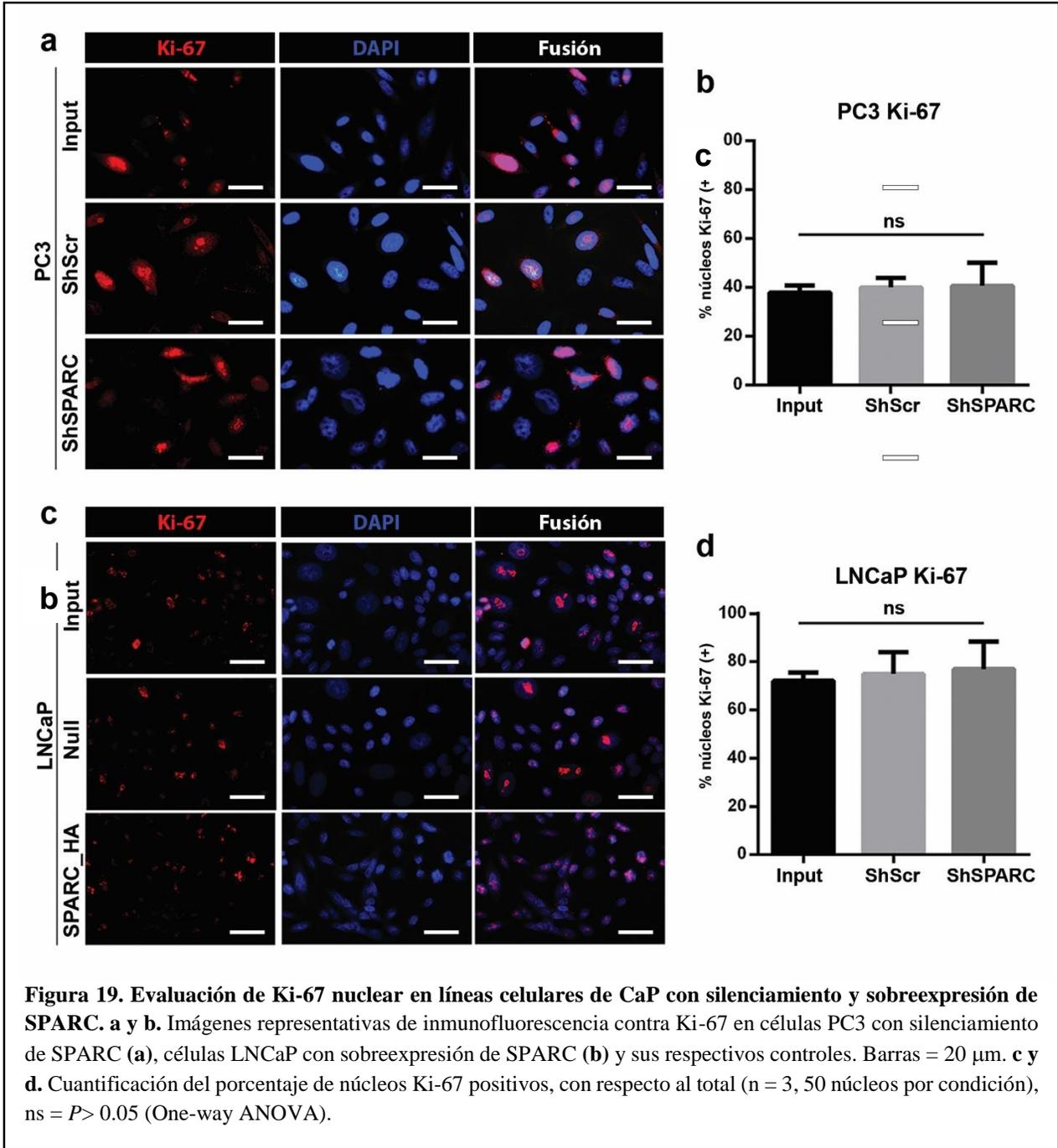
**Figura 17. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP con sobreexpresión de Slug a.** RT-qPCR para Slug (SNAI2), en células LNCaP con sobreexpresión estable de Slug (SNAI2) células LNCaP control (Null).  $\Delta\Delta Ct$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMILIO* y la línea control (Null) (n = 3). \*\*\* $P < 0.001$  (Student's test). **b.** RT-qPCR para SPARC en células LNCaP con sobreexpresión estable de Slug (SNAI2) y células LNCaP control (Null).  $\Delta\Delta Ct$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMILIO* y la línea control (Null) (n = 3). \* $P < 0.05$  (Student's test).

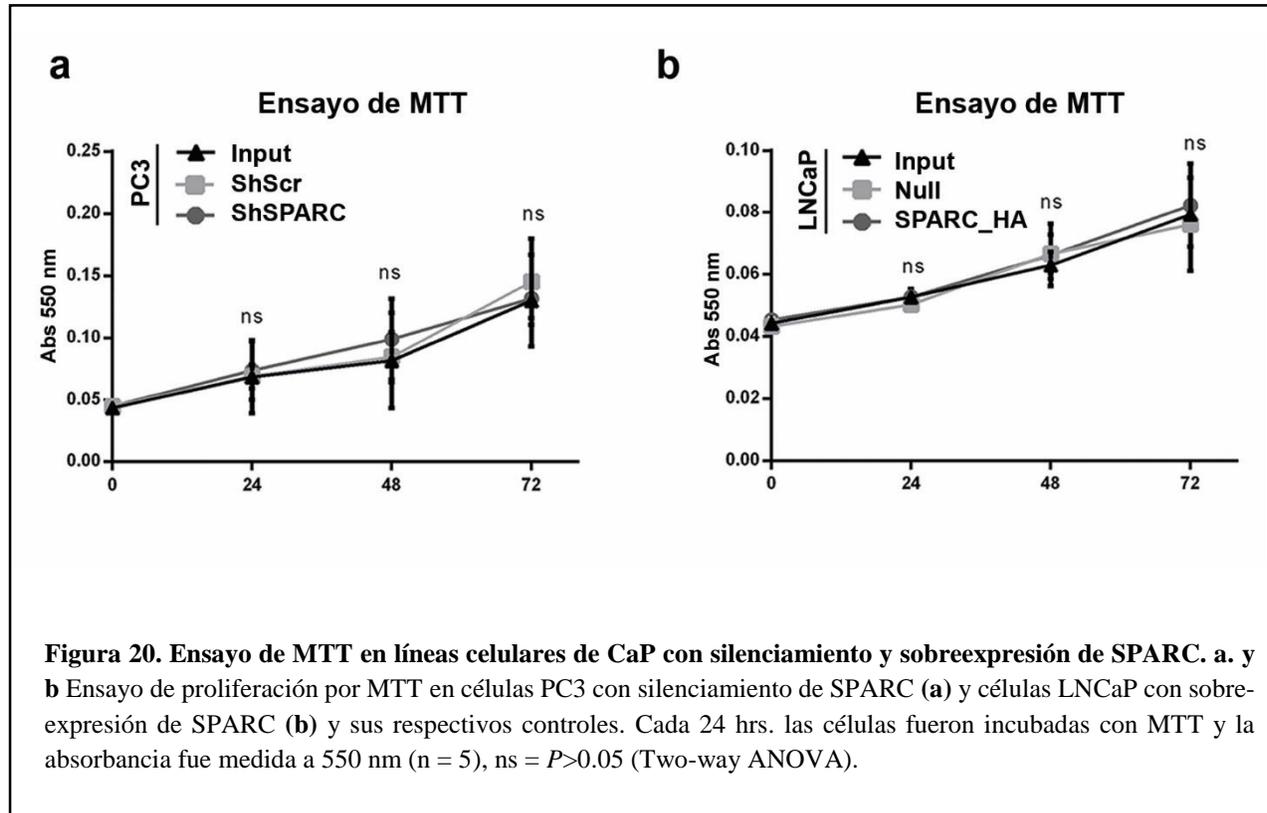


**Figura 18. Expresión de SPARC en líneas celulares de CaP con sobreexpresión de ZEB1** **a.** RT-qPCR para ZEB1, en células LNCaP con sobreexpresión estable de ZEB1 (ZEB1) células LNCaP control (Null).  $\Delta\Delta Ct$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMILIO* y la línea control (Null) (n = 3). \*\*\* $P < 0.001$  (Student's test). **b.** RT-qPCR para SPARC en células LNCaP con sobreexpresión estable de ZEB1 (ZEB1) y células LNCaP control (Null).  $\Delta\Delta Ct$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMILIO* y la línea control (Null) (n = 3). \* $P < 0.05$  (Student's test).

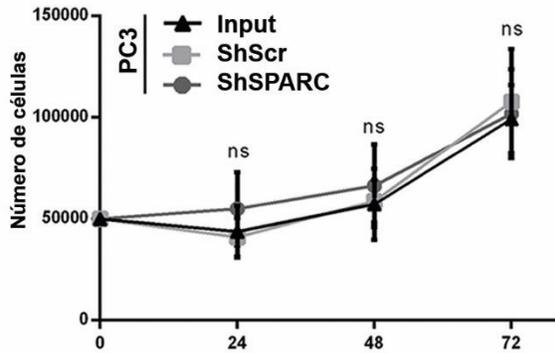
## **2.6. SPARC no modifica la proliferación de células de CaP.**

Dado que SPARC aumenta la expresión de factores inductores de TEM, los cuales pueden inhibir directamente la proliferación, evaluamos si SPARC modifica la proliferación celular en líneas de CaP. Observamos que tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de SPARC en células de CaP no modifican la proliferación in vitro, evaluada por los métodos de inmunofluorescencia contra Ki-67 (figura 19), ensayo de MTT (figura 20) y test de exclusión con Azul de Tripán (figura 21). Estos resultados difieren del efecto de inductores clásicos de TEM, como TGF- $\beta$ 1, el cual sí disminuye la proliferación en células LNCaP (figura 21c).

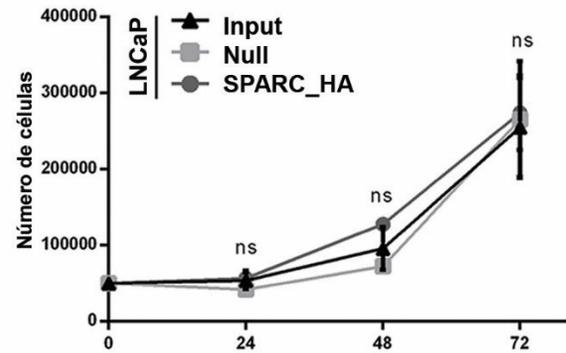




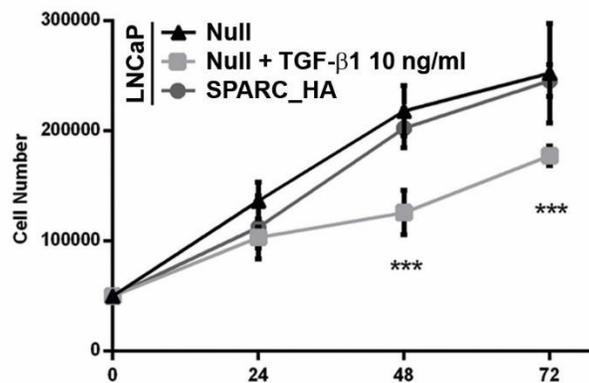
**a** Ensayo de exclusión con Azul de Tripán



**b** Ensayo de exclusión con Azul de Tripán



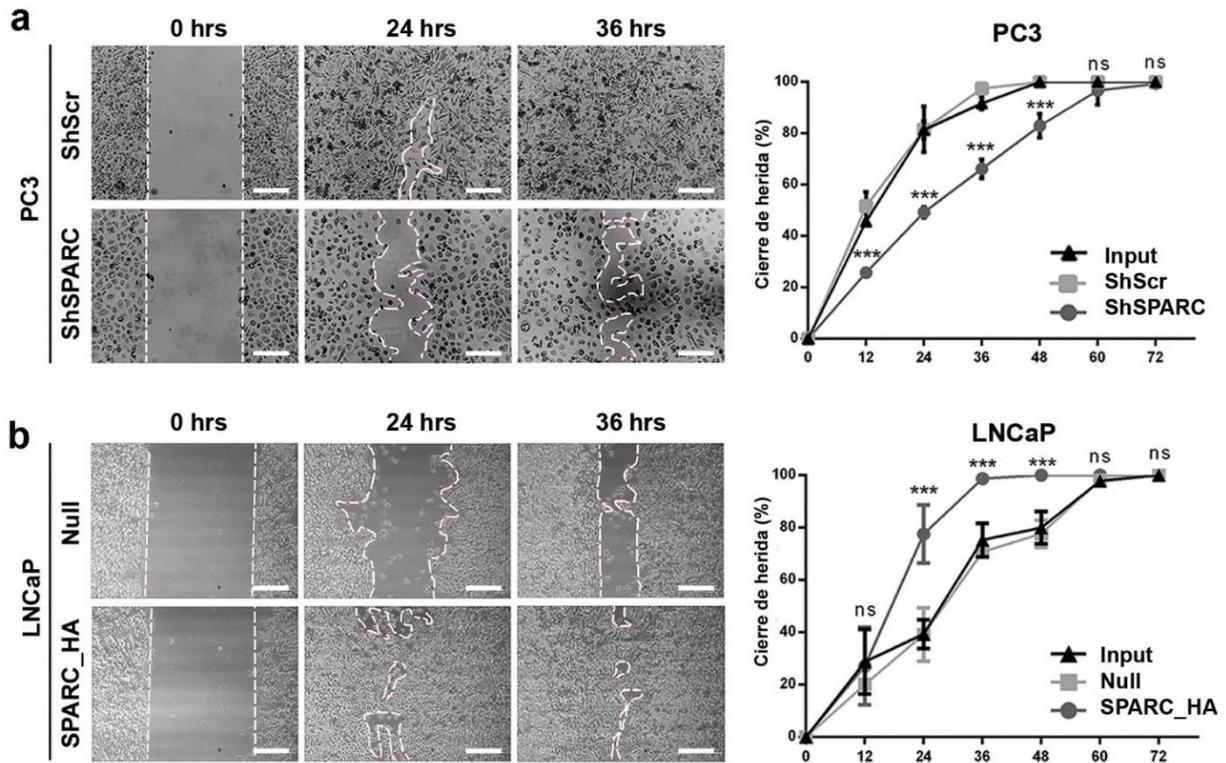
**c** Ensayo de exclusión con Azul de Tripán



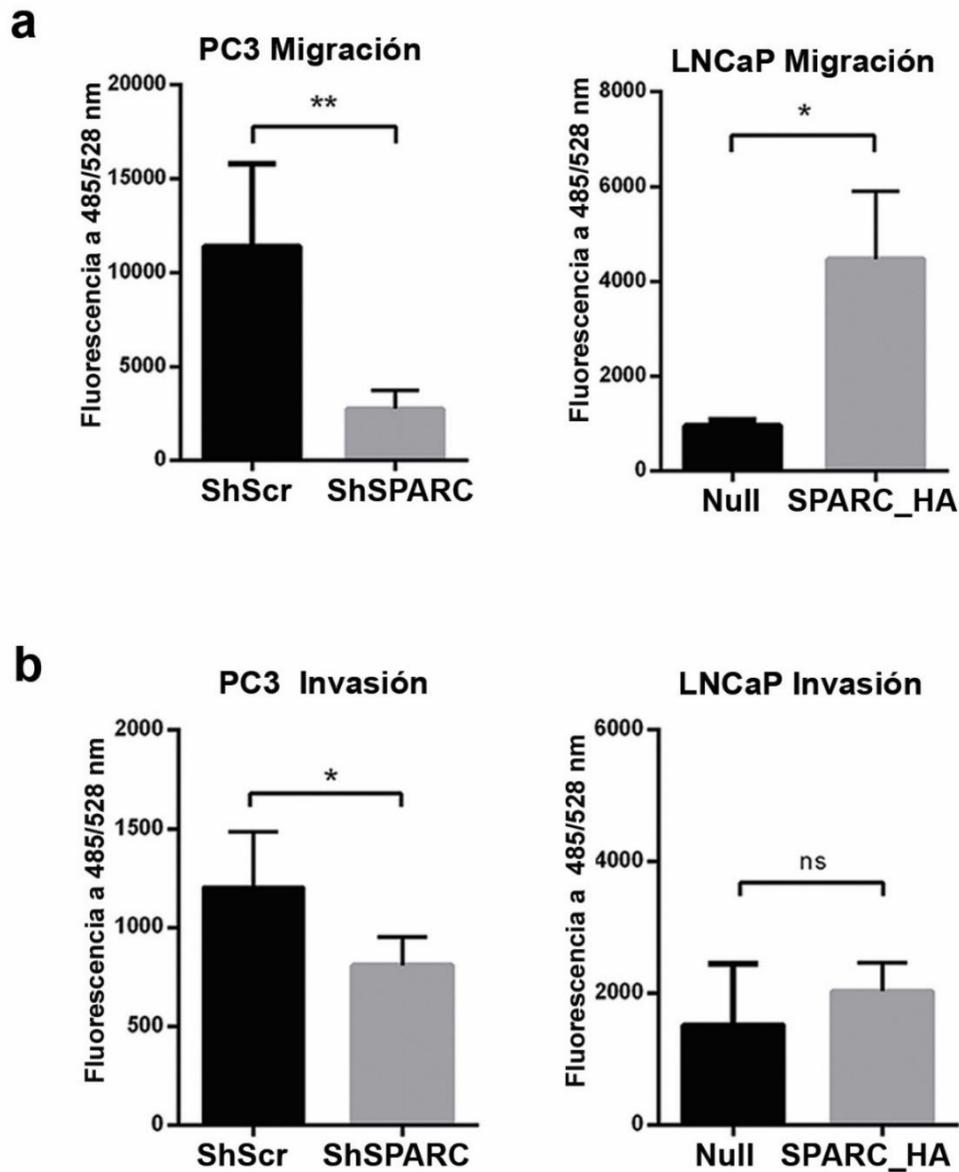
**Figura 21. Ensayo de exclusión con Azul de Tripán en líneas celulares de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC. a y b.** Ensayo de exclusión con azul de tripán. Se sembraron  $5 \times 10^4$  células por pocillo: PC3 con silenciamiento de SPARC, LNCaP con sobreexpresión de SPARC y sus respectivos controles, en placas de 12 pocillos. Cada 24 hrs, las células fueron incubadas con una solución de azul de tripán y las células no teñidas por el colorante fueron contadas en un hemocitómetro. ( $n = 5$ ). **c.** Ensayo de exclusión con azul de tripán se hizo en las mismas condiciones que **(b)**, adicionando a las células LNCaP Null 10 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 cada 24 hrs. **a, b y c.** \*\*\* $P \leq 0.001$ , ns =  $P > 0.05$  (Two-way ANOVA).

## **2.7 SPARC aumenta la motilidad y capacidad invasiva in vitro de células de CaP.**

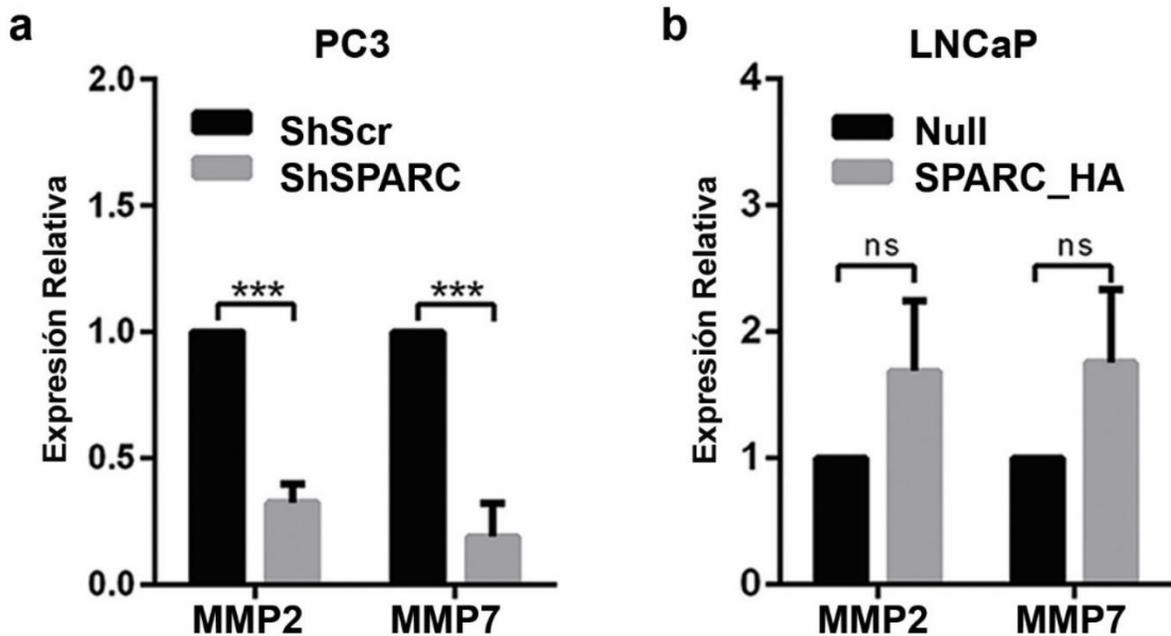
Para evaluar si el cambio a fenotipo mesenquimal inducido por SPARC va acompañado de un aumento en la motilidad celular, se evaluó la capacidad migratoria de células de CaP PC3 y LNCaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC, respectivamente. Mediante el ensayo de cierre de herida pudimos observar que el silenciamiento de SPARC en células PC3 disminuye las capacidades migratorias de estas células, mientras que la sobreexpresión de SPARC en células LNCaP aumenta la migración (figura 22). Estos resultados fueron corroborados con el ensayo de migración en transwell, en el cual se observó resultados similares (figura 23). Para determinar si SPARC aumenta las capacidades invasivas, evaluamos por RT-qPCR la expresión de MMPs esenciales para la disrupción de la matriz extracelular y evaluamos funcionalmente la capacidad de invasión mediante un ensayo in vitro de transwell. Como se observa en la figura 20, el silenciamiento de SPARC disminuye la capacidad de invadir a través del matrigel, lo cual se asocia a una menor expresión de MMP-2 y MMP-7 (figura 24). No se observaron cambios significativos en las capacidades de invasión in vitro de las células LNCaP con sobreexpresión de SPARC (figura 20) ni en la expresión de MMP-2 y MMP-7 (figura 24)



**Figura 22. Ensayo de cierre de herida en células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC. a y b.** Imágenes representativas de los ensayos de cierre de herida. La herida fue realizada con una punta de micro-pipeta sobre monocapas de células en cultivo a confluencia. El cierre de la herida fue monitoreado cada 12 hrs. Se usaron células PC3 con silenciamiento de SPARC y células LNCaP con sobreexpresión de SPARC, junto con sus respectivos controles. Barras = 200  $\mu$ m. A la derecha se muestra la cuantificación del ensayo. El porcentaje de cierre de herida es expresado en comparación al tiempo cero (n = 3), \*\*\* $P \leq 0.001$ , ns =  $P > 0.05$ , (Two-way ANOVA).



**Figura 23. Ensayo de invasión y transmigración de células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.** **a.** Ensayo de transmigración realizado en una cámara de Boyden, usando células PC3 con silenciamiento de SPARC, células LNCaP con sobreexpresión de SPARC y sus respectivos controles. Las células que transmigraron al otro lado de la membrana fueron teñidas con un colorante fluorescente y cuantificadas luego de 24 hrs. **b.** Ensayo de invasión realizado en una cámara de Boyden cubierta con una capa de membrana basal. Las células invasivas fueron teñidas con un colorante fluorescente y cuantificadas luego de 24 hrs. **a y b.** (n = 3). \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$ , ns =  $P > 0.05$ , (Student's test).

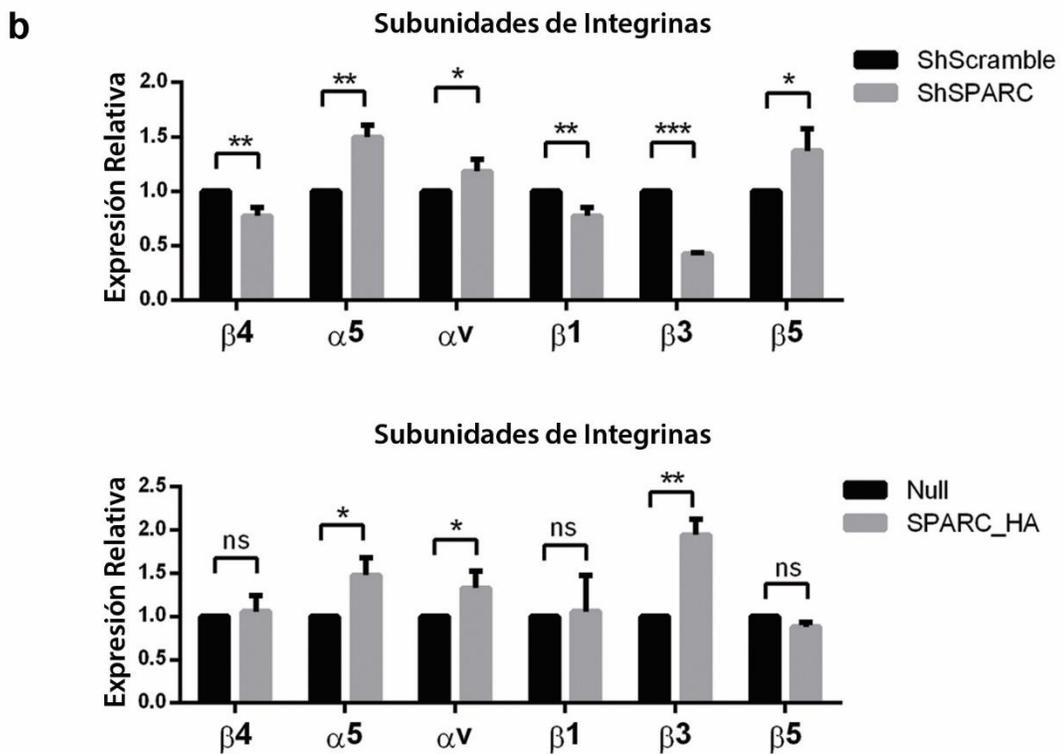
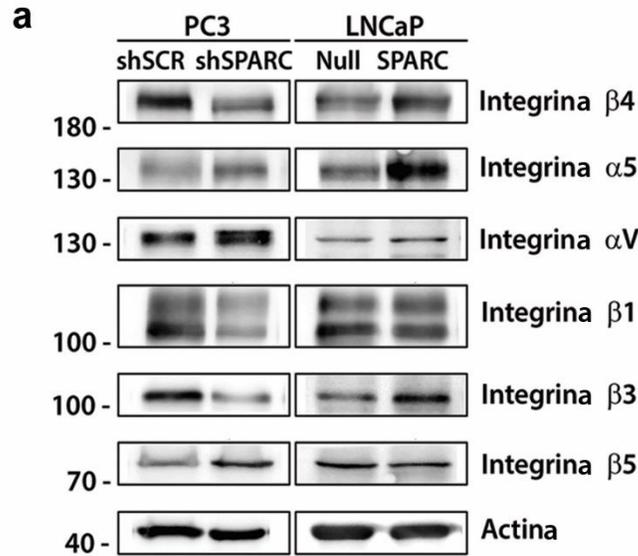


**Figura 24. Ensayo de invasión y trans migración de células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.** **a.** Ensayo de trans migración realizado en una cámara de Boyden, usando células PC3 con silenciamiento de SPARC, células LNCaP con sobreexpresión de SPARC y sus respectivos controles. Las células que transmigraron al otro lado de la membrana fueron teñidas con un colorante fluorescente y cuantificadas luego de 24 hrs. **b.** Ensayo de invasión realizado en una cámara de Boyden cubierta con una capa de membrana basal. Las células invasivas fueron teñidas con un colorante fluorescente y cuantificadas luego de 24 hrs. **c.** Expresión de *MMP2* y *MMP7* evaluado por RT-qPCR. **c, d, e.** n = 3, en todos los ensayos. \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$ , ns =  $P > 0.05$ , (Student's test).

**OBJETIVO 3: Determinar la participación de los ejes de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1 como mediadores de transición epitelio-mesénquima y aumento de migración, inducido por SPARC en líneas celulares de CaP.**

### **3.1. Efecto de SPARC sobre la expresión de distintas subunidades de integrinas.**

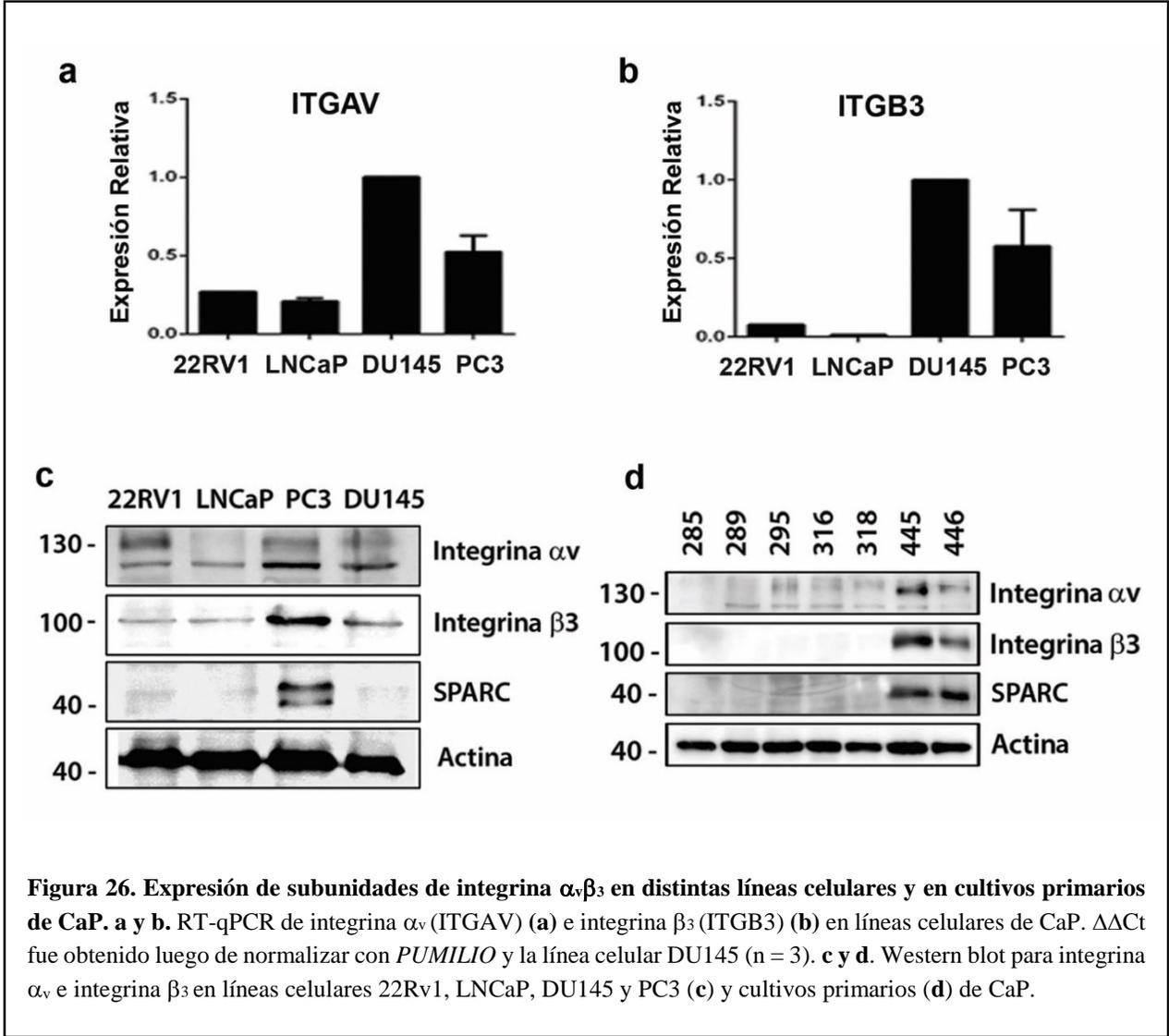
Para evaluar si la expresión de algunas subunidades de integrinas, son modificados por SPARC en células de CaP, evaluamos los niveles de las subunidades de integrina  $\alpha_v$ ,  $\beta_5$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  y  $\beta_5$  a través de western blot en células con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC. Observamos que tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de SPARC, modifican la expresión de varias subunidades de integrina. Sin embargo, la subunidad de integrina  $\beta_3$ , es la única que disminuye su expresión al silenciar SPARC en células PC3 y aumenta su expresión al sobreexpresar SPARC (figura 25).



**Figura 25. Expresión de subunidades de integrinas en células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de SPARC.** **a.** Western blot para distintas subunidades de integrina, en células PC3 transducidas con shRNA contra SPARC, células LNCaP transducidas con la secuencia de SPARC, y sus respectivos controles. **b.** Cuantificación de los western blots. La densidad óptica fue normalizada con  $\beta$ -actina y las células control (n = 3) \*\*\* $P \leq 0.001$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$  (Student's test).

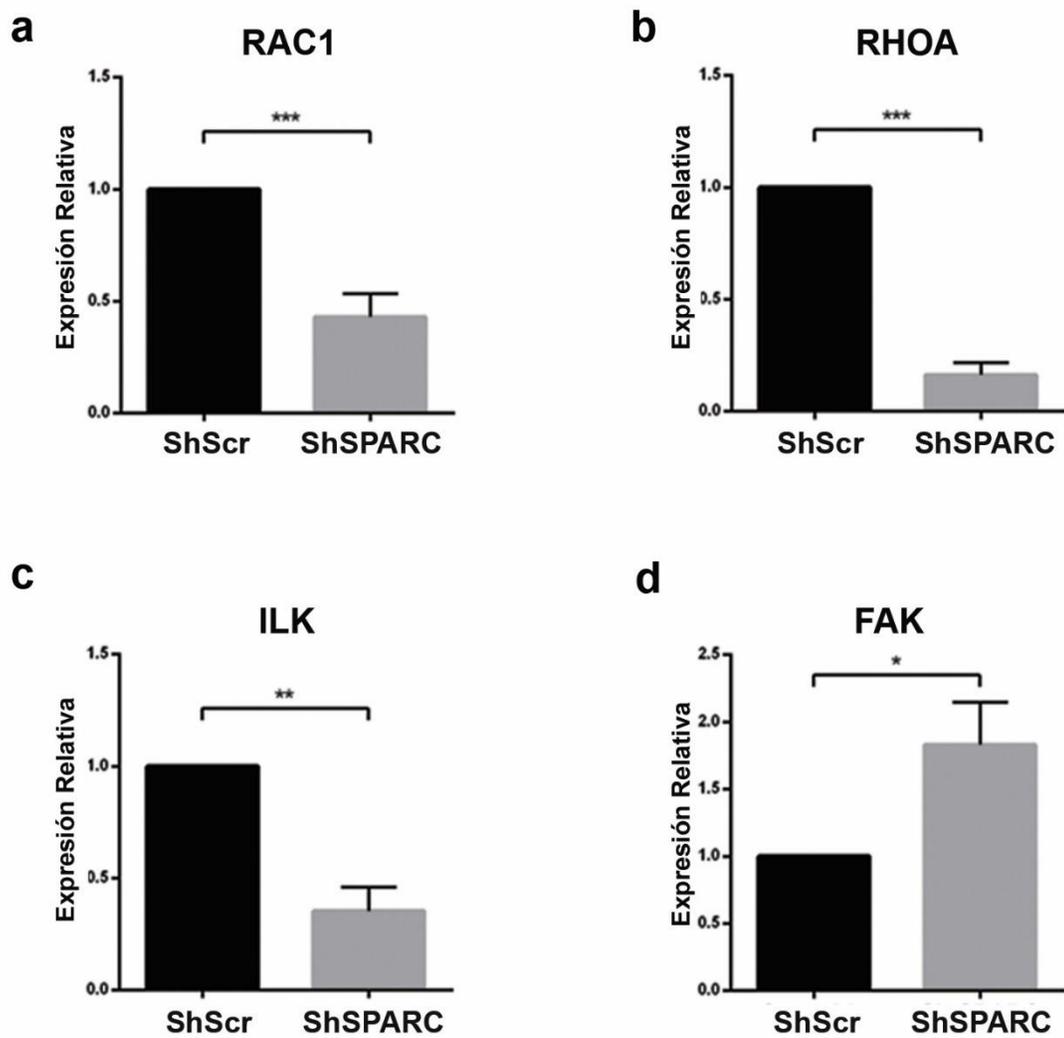
### **3.2. Expresión de las subunidades de integrina $\alpha_v\beta_3$ en líneas celulares de CaP.**

La subunidad  $\beta_3$  de integrina heterodimeriza principalmente con la subunidad de integrina  $\alpha_v$ , por lo que analizamos los niveles basales de expresión de estas dos subunidades en distintas líneas celulares y cultivos primarios de CaP. Evaluamos la expresión de ambas subunidades mediante RT-qPCR y western blot, en las líneas celulares 22Rv1, LNCaP, PC3 y DU145. Similar a lo observado con SPARC, la línea celular PC3 fue la que presentó mayor expresión proteica de ambas subunidades. Comparadas a éstas, las células 22Rv1, LNCaP y DU145 presentan baja expresión de las subunidades de integrina  $\alpha_v\beta_3$  (figura 26). Además, se evaluó la expresión de las subunidades de integrina  $\alpha_v\beta_3$  en cultivos primarios de CaP. Concordante con lo observado en líneas celulares de CaP, ambas subunidades de integrina  $\alpha_v\beta_3$  se expresan en mayor cantidad en aquellas células que presentan mayor expresión de SPARC (figura 26d).

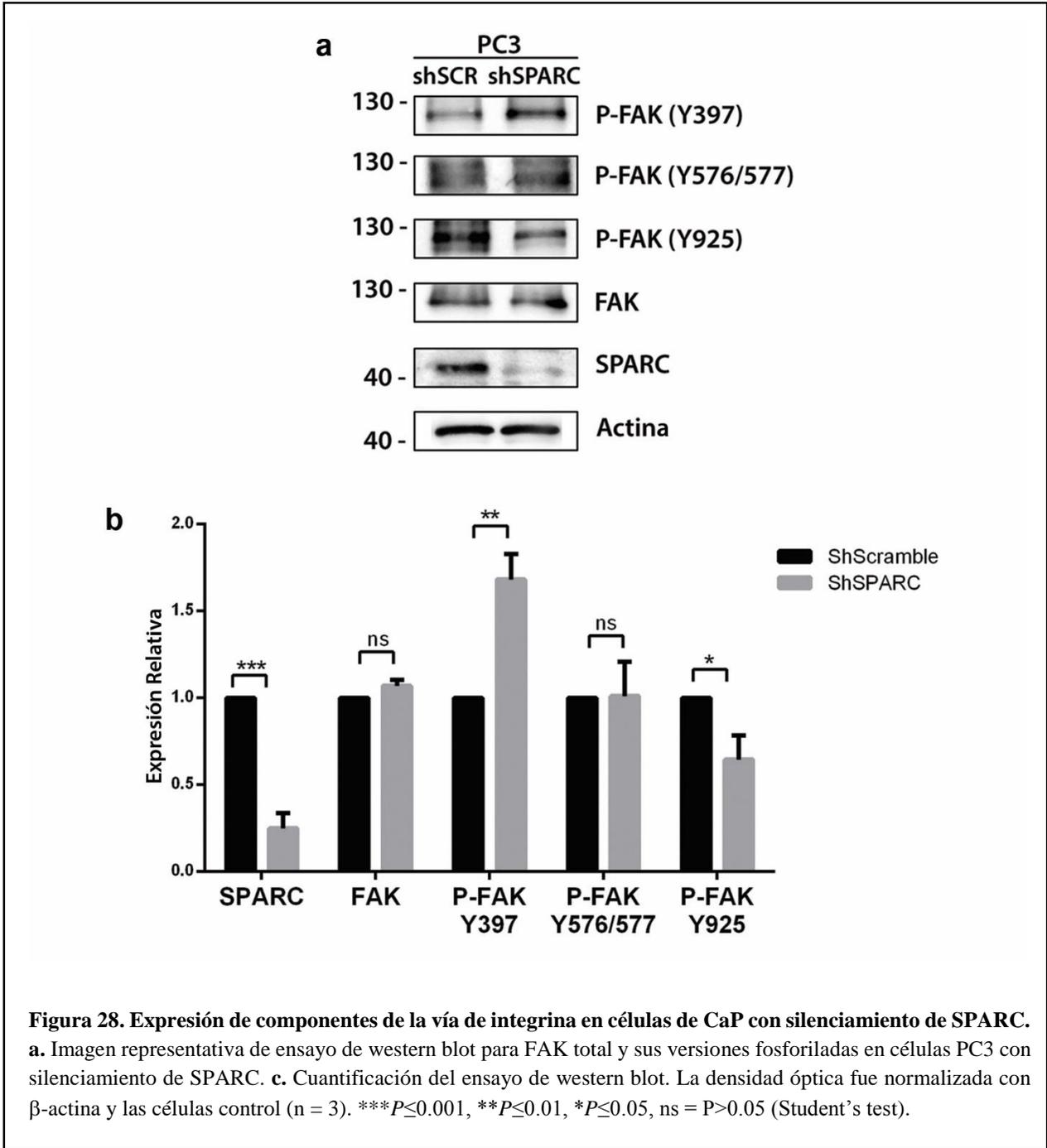


### **3.2. Efecto de SPARC sobre la expresión de efectores *río abajo* de integrinas y en la activación de FAK.**

Para evaluar si SPARC además puede afectar la expresión de efectores *río abajo* de la señalización de integrinas, analizamos mediante RT-qPCR la expresión de RAC1, RHOA, ILK y FAK. En la figura 27 se puede ver que el silenciamiento de SPARC en células PC3 induce una disminución del mRNA de RAC1, RHOA e ILK, y un aumento en la expresión de FAK. Sin embargo, a nivel de proteína, no se observan cambios en la expresión de FAK total al silenciar SPARC, pero sí de sus versiones fosforiladas: Se observó un aumento en la fosforilación en el residuo Y397 y una disminución en la fosforilación del residuo Y925 (figura 28).

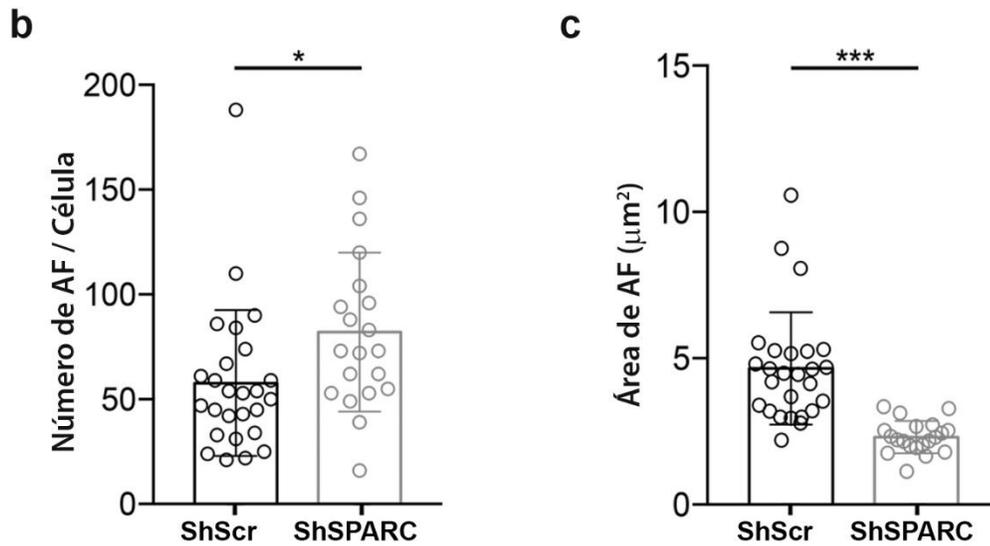
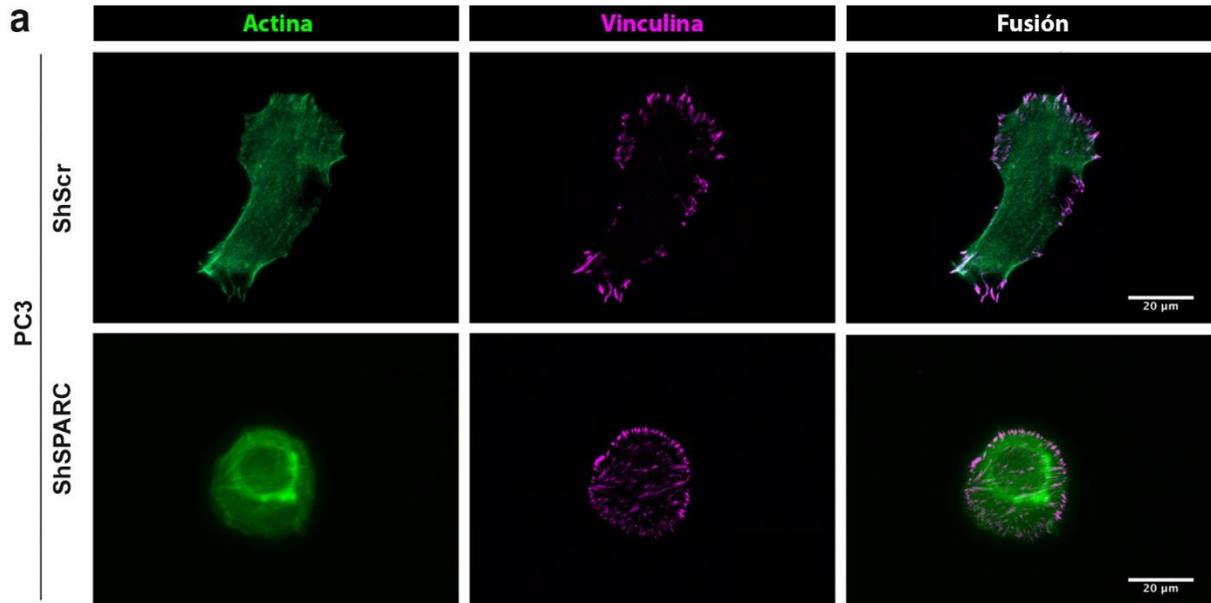


**Figura 27. Expresión de componentes de la vía de integrina en células de CaP con silenciamiento de SPARC.** RT-qPCR de RAC1 (a), RHOA (b), ILK (c) y FAK (d) en células PC3 con silenciamiento de SPARC.  $\Delta\Delta Ct$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMILIO* y la línea control (ShScr) (n = 3). \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  (Student's test).



### **3.3. Efecto del silenciamiento de SPARC en la formación de adhesiones focales en células de CaP.**

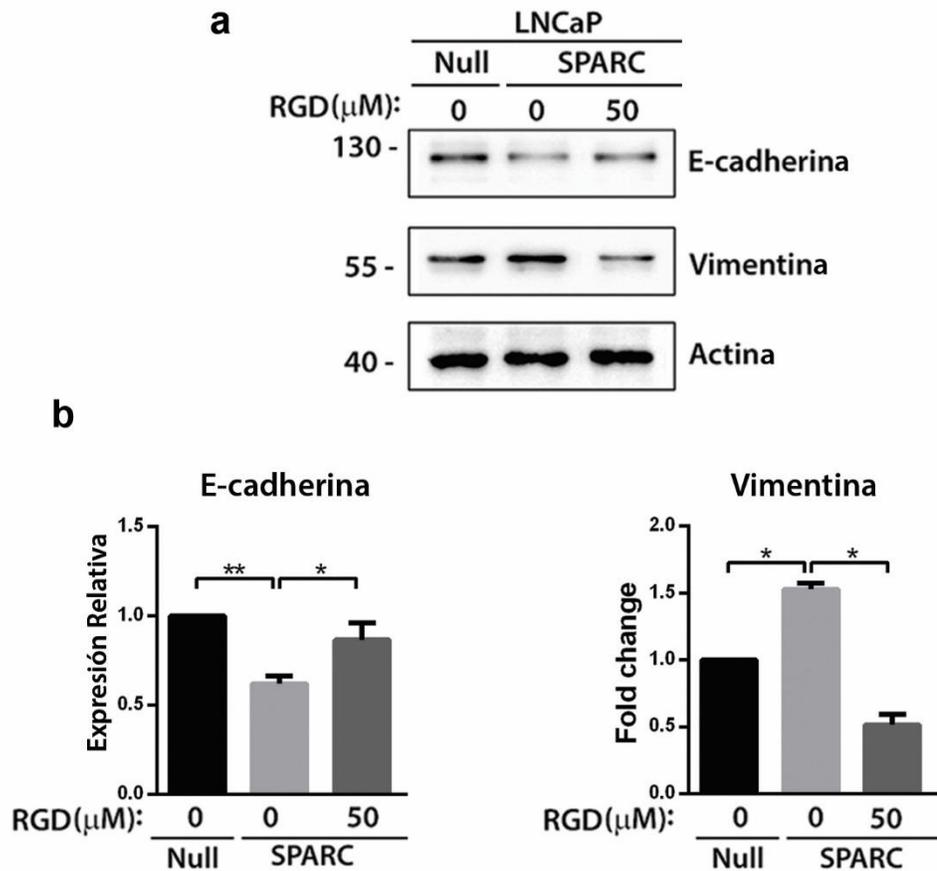
Dado que la fosforilación de FAK en Y925 es clave para el recambio de las adhesiones focales, evaluamos la cantidad y tamaño de las adhesiones focales, mediante IF contra vinculina, en células PC3 ShScramble y PC3 ShSPARC (figura 29a). Observamos que en las células PC3 ShSPARC había un aumento en el número de adhesiones focales por célula en comparación con las células PC3 ShScramble (figura 29b), sin embargo estas adhesiones focales son de menor tamaño en las células con silenciamiento de SPARC, en comparación con las adhesiones focales formadas en células PC3 ShScramble (figura 29c).



**Figura 29. Efecto del silenciamiento de SPARC en la formación de adhesiones focales en células de CaP. a.** Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra vinculina y tinción del citoesqueleto de actina con faloidina en células PC3 transducidas con un ShScramble (ShScr) o ShRNA contra SPARC (ShSPARC) **b.** Cuantificación del número de adhesiones focales por célula en ambas condiciones (n=3), \* $P \leq 0.05$  (Student's test). **c.** Cuantificación del área de las adhesiones focales en ambas condiciones (n=3), \*\*\* $P \leq 0.001$  (Student's test).

### **3.4. Bloqueo de integrina $\alpha_v\beta_3$ en células LNCaP estimuladas con SPARC.**

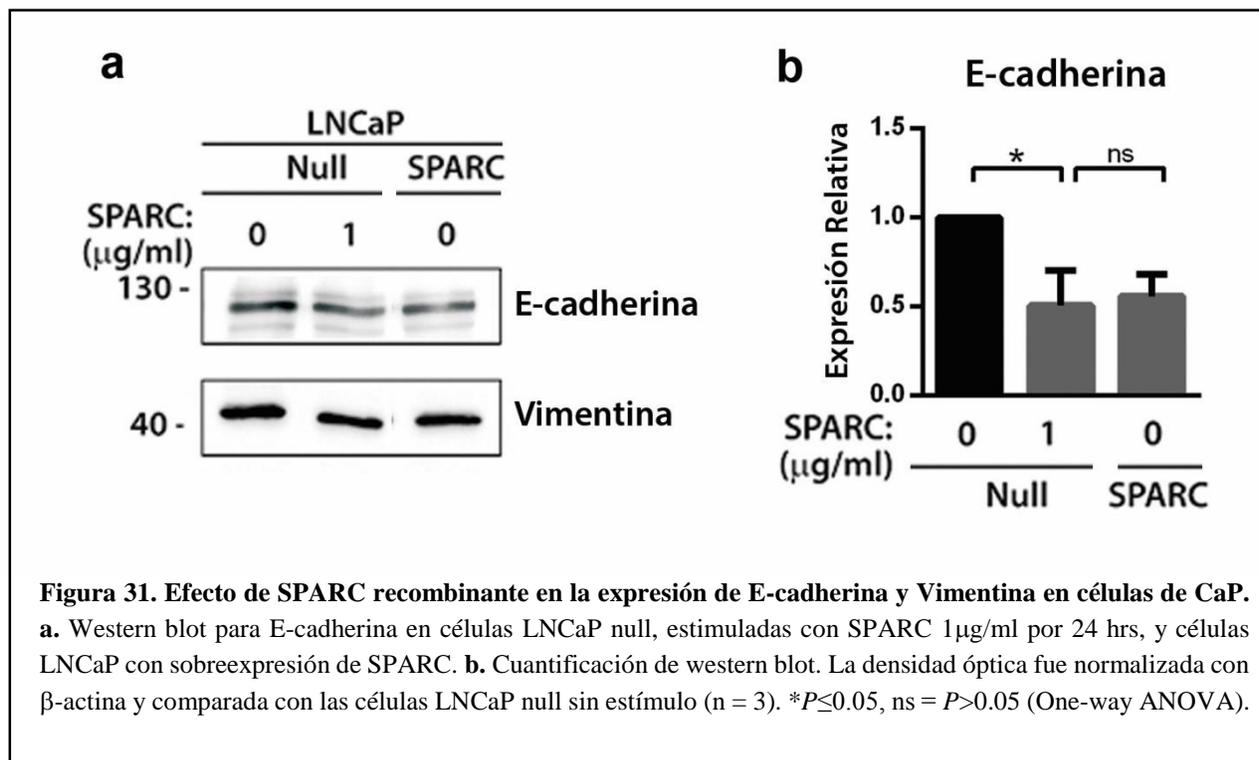
Para evaluar si la activación de integrina  $\alpha_v\beta_3$  es necesaria para que SPARC induzca TEM, utilizamos como bloqueador un péptido de secuencia RGD que se une específicamente a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , impidiendo su activación. En la figura 30 se puede observar que, concordante con lo observado previamente, las células LNCaP con sobreexpresión de SPARC presentan menor expresión de e-cadherina, y mayor expresión de vimentina. Sin embargo, al incubar estas células con el péptido RGD, se produce un aumento de E-cadherina y una disminución de vimentina, revirtiendo los efectos inducidos por la sobreexpresión de SPARC.

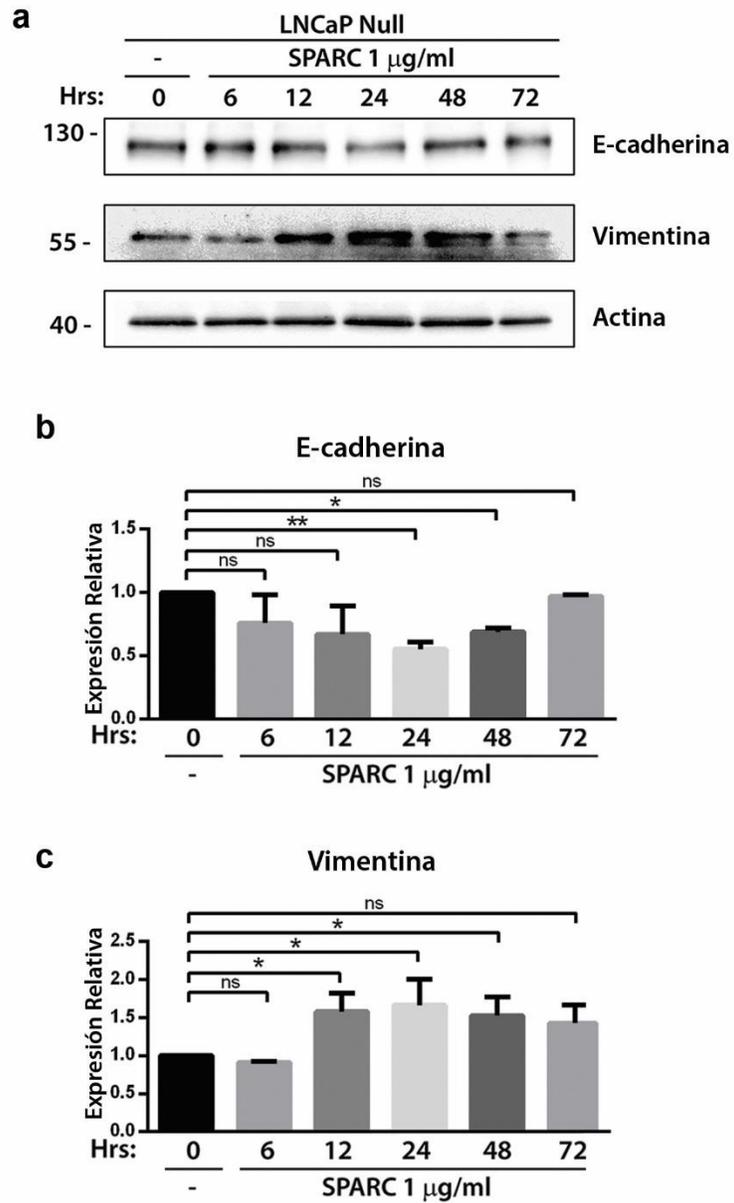


**Figura 30. Efecto del bloqueo de integrina con péptidos RGD en la expresión de E-cadherina y Vimentina en células de CaP con sobreexpresión de SPARC** **a.** Western blot para E-cadherina y Vimentina en células LNCaP null y LNCaP con sobreexpresión de SPARC y con bloqueo de integrina  $\alpha_v\beta_3$  con péptido RGD 50  $\mu$ M por 24 hrs. **b.** Cuantificación de western blot. La densidad óptica fue normalizada con  $\beta$ -actina y las células LNCaP Null (n = 3). \*\* $P \leq 0.01$ , \* $P \leq 0.05$  (One-way ANOVA).

### **3.5 Integrina $\alpha_v\beta_3$ y ZEB1 son necesarios para la disminución de E-cadherina y el aumento de migración, inducidos por SPARC**

Para evaluar si la expresión de ZEB1, en conjunto con la actividad de integrina  $\alpha_v\beta_3$  es necesaria para la disminución de E-cadherina, utilizamos un modelo de células LNCaP con silenciamiento de ZEB1, las cuales fueron estimuladas con SPARC de manera exógena. Para esto, primero se determinó las concentraciones de SPARC en las cuales se induce una respuesta inhibitoria de E-cadherina. Como se observa en la figura 31, concentraciones de 1  $\mu\text{g/mL}$  de SPARC, inducen una disminución de E-cadherina, similar a lo observado cuando se sobreexpresa SPARC establemente en estas células. Para confirmar estos resultados, se incubo con 1  $\mu\text{g/mL}$  durante tiempos entre 0 a 72 hrs. Observamos que a las 24 hrs posteriores al estímulo con SPARC se produce la mayor respuesta de disminución de E-cadherina y aumento de vimentina (figura 32).

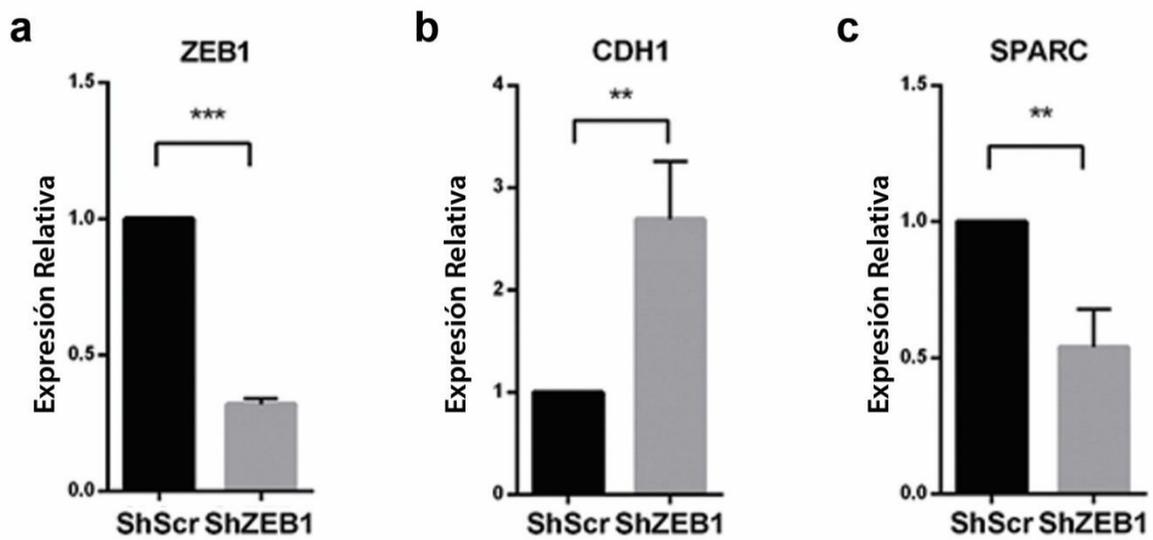




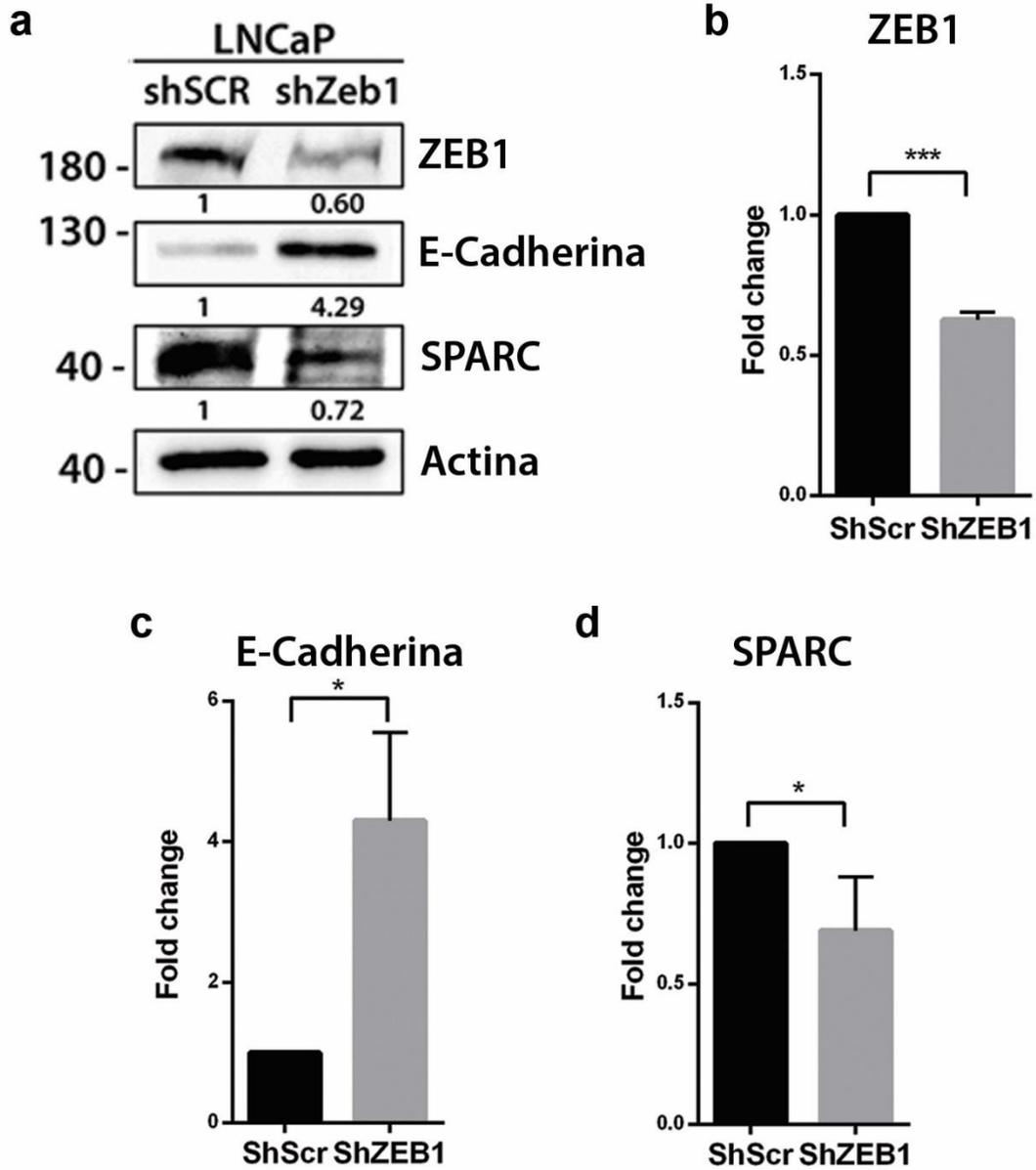
**Figura 32. Efecto de SPARC en la expresión de E-cadherina y Vimentina en células de CaP en el tiempo.**

**a.** Western blot para E-cadherina y Vimentina en células LNCaP null estimuladas con 1  $\mu\text{g/ml}$  SPARC, entre 0 a 72 hrs. **b y c.** Cuantificación de western blot. La densidad óptica fue normalizada con  $\beta$ -actina y comparadas con las células LNCaP null sin estímulo ( $n = 3$ ).  $**P \leq 0.01$ ,  $*P \leq 0.05$ ,  $ns = P > 0.05$  (One-way ANOVA).

Posteriormente, evaluamos la expresión de ZEB1, en las células LNCaP transducidas con el shRNA contra ZEB1 (LNCaP ShZEB1). Como se observa en la figura 33, las células LNCaP ShZEB1, presentan una menor expresión de ZEB1 en comparación a las células LNCaP transducidas con un shRNA inespecífico (LNCaP ShScr). Para evaluar si este silenciamiento es funcional, evaluamos la expresión de E-cadherina, la cual es directamente reprimida por ZEB1. Como se esperaba, el silenciamiento de ZEB1 aumenta la expresión de E-cadherina (figura 33 y 34). Interesantemente, se pudo observar que el silenciamiento de ZEB1 además disminuye la expresión de SPARC, tanto a nivel de proteína como mRNA (figura 33 y 34).

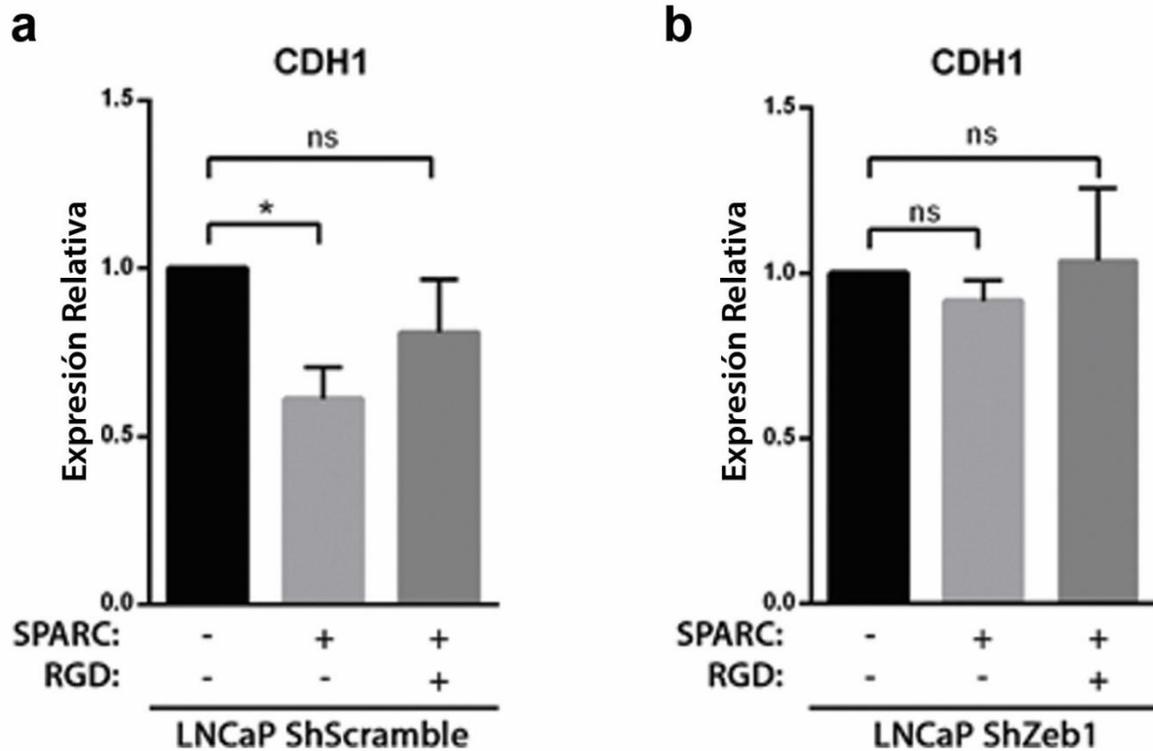


**Figura 33. Silenciamiento de ZEB1 en células LNCaP.** a. La expresión de los mRNA de ZEB1, E-cadherina (CDH1) y SPARC fue evaluado en células LNCaP transducidas con lentivirus que porta un ShRNA dirigido contra ZEB1 (ShZEB1) o un ShRNA de secuencia aleatoria (ShScr).  $\Delta\Delta Ct$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMI-LIO* y la línea control (ShScr) (n = 3). \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  (Student's test).

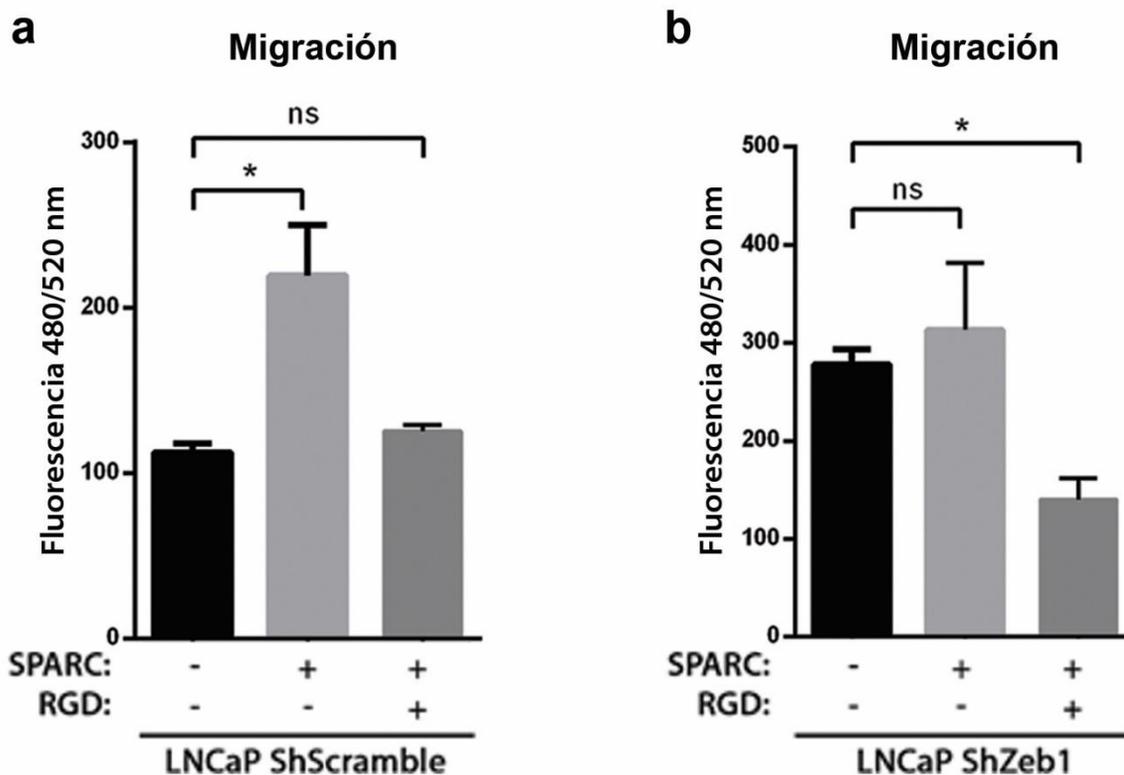


**Figura 34.** Expresión de ZEB1, E-Cadherina y SPARC en células LNCaP con silenciamiento estable de ZEB1. **a.** Western blot para ZEB1, E-cadherina y SPARC en células LNCaP con silenciamiento de ZEB1. **b, c y d.** Cuantificación de western blot. La densidad óptica fue normalizada con  $\beta$ -actina y la condición control (ShScr) (n = 3). \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P \leq 0.05$  (Student's test).

A continuación, las células LNCaP con silenciamiento de ZEB1 y control, fueron estimuladas con SPARC y la actividad de integrina  $\alpha_v\beta_3$  fue inhibida con RGD. En las células LNCaP control, SPARC disminuye la expresión E-cadherina, lo cual es revertido al bloquear integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Sin embargo, en las células LNCaP con silenciamiento de ZEB1, la incubación con SPARC no disminuye la expresión de E-cadherina, lo cual tampoco es modificado al bloquear integrina  $\alpha_v\beta_3$  (figura 35). Por último, para evaluar si integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1 son necesarios para la migración inducida por SPARC, se realizó un ensayo de migración en transwell, utilizando células LNCaP con silenciamiento de ZEB1 y control, estimuladas con SPARC y con bloqueo de integrina  $\alpha_v\beta_3$ . En las células LNCaP control, SPARC aumenta las capacidades de trans migración de las células LNCaP, lo cual es completamente revertido al bloquear integrina  $\alpha_v\beta_3$ . En las células LNCaP con silenciamiento de ZEB1 en cambio, SPARC no modifica las capacidades de trans migración de estas células, aunque el bloqueo de integrina  $\alpha_v\beta_3$ , sí disminuye las capacidades de trans migración de las células LNCaP (figura 36).



**Figura 35. Efecto del bloqueo de integrina y silenciamiento de ZEB1 en la expresión de E-cadherina en líneas celulares de CaP estimuladas con SPARC. a y b.** Expresión de E-cadherina, en células LNCaP ShScramble (a) y LNCaP ShZEB1 (b), estimuladas con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SPARC y con bloqueo de integrina  $\alpha_v\beta_3$  con 50  $\mu\text{M}$  RGD durante 6 hrs.  $\Delta\Delta\text{Ct}$  fue obtenido luego de normalizar con *PUMILIO* y la condición control (sin SPARC y sin RGD) ( $n = 3$ ).  $*P \leq 0.05$ , ns =  $P > 0.05$  (One way ANOVA). e



**Figura 36. Efecto del bloqueo de integrina y silenciamiento de ZEB1 en líneas celulares de CaP estimuladas con SPARC.** **a.** Ensayo de trans migración realizado en una cámara de Boyden con células LNCaP ShScr y Sh ZEB1. Las células fueron incubadas con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SPARC y con 50  $\mu\text{M}$  de péptido RGD, luego de 24 hrs, las células que migraron al otro lado de la membrana fueron teñidas con un colorante fluorescente y cuantificadas ( $n = 3$ )  $*P \leq 0.05$ ,  $ns = P < 0.05$  (Student's test).

## DISCUSIÓN

### 1. Expresión de SPARC en tejidos cancerosos

SPARC es una proteína matricelular altamente expresada en el tejido óseo y descrita como un factor quimioatrayente que podría promover la llegada de células CaP a la médula ósea<sup>42,54,55</sup>. Sin embargo, aún no hay consenso con respecto a su contribución durante las primeras etapas de la progresión tumoral<sup>40</sup>.

En este estudio, encontramos que SPARC se expresa en biopsias de tumores primarios de pacientes con CaP, siendo mayor en aquellos con Gleason intermedio y alto. Nuestros resultados confirman los de Sung et al.<sup>75</sup>, quienes encontraron que el tejido de CaP expresa más SPARC que el tejido de próstata normal, y de DeRosa et al.<sup>76</sup>, que mostraron que SPARC se expresa más en tumores de CaP poco diferenciados en comparación con tumores de CaP bien diferenciados. Sin embargo, Shin et al.<sup>51</sup> describieron que tejido de próstatas normales tienen una mayor intensidad de inmunotinción para SPARC en comparación con el tejido de CaP. Debido a que varios otros estudios han vinculado la expresión de SPARC tanto con tejido normal como con tejido tumoral<sup>40,48</sup>, se sugiere que la expresión de SPARC varía durante la progresión del cáncer y que podría ejercer diferentes efectos en esta enfermedad.

En las líneas celulares de CaP estudiadas en este trabajo, observamos que SPARC es altamente expresado en células PC3 en comparación con las otras tres líneas celulares de CaP. Este resultado es consistente con los hallazgos de Thomas et al.<sup>77</sup>, quienes encontraron que las células de CaP provenientes de metástasis óseas, tales como las células PC3, tienen una mayor expresión

de SPARC en comparación con células obtenidas de tumores primarios o metástasis en otros órganos. Sin embargo, dado que encontramos que los tumores primarios de Gleason intermedio y alto también expresan SPARC, así como los cultivos primarios obtenidos desde tumores localizados, es posible que el aumento de la expresión de SPARC pueda adquirirse durante etapas más tempranas de la progresión del tumor y no solamente cuando colonizan el hueso.

## 2. Regulación de la expresión de SPARC

Dado que observamos que la expresión de SPARC se encuentra aumentada en los cánceres de mayor grado histológico, sería interesante analizar qué mecanismos llevan a la sobreexpresión de esta proteína en el CaP. Los mecanismos de regulación de SPARC pueden estar a varios niveles: regulación génica, epigenética, transcripcional y/o post traduccional.

Se han descrito al menos 471 polimorfismos de nucleótido simple en la secuencia de SPARC, de los cuales 23 se han relacionado con un peor pronóstico en distintos tipos de tumores<sup>78</sup>. Por ejemplo, algunos polimorfismos presentes en la región 3'UTR de SPARC se han relacionado con una mayor expresión de SPARC y peor pronóstico, en pacientes con cáncer de mama<sup>79</sup>, además de ser un predictor negativo de respuesta a terapia en cáncer de páncreas<sup>80</sup>. Es posible que algunos polimorfismos de SPARC tengan efectos similares en el CaP.

Por otro lado, se ha descrito que el promotor de SPARC presenta islas CpG que pueden ser metiladas, inhibiendo su expresión. Se ha propuesto que la hipermetilación del promotor de SPARC podría ser un evento temprano en la tumorigénesis del cáncer de páncreas<sup>81</sup>, mientras que en cáncer de colon, se ha asociado con resistencia a la terapia con 5-fluorouracilo, lo cual puede ser revertido mediante el uso de fármacos desmetilantes<sup>82</sup>. Sin embargo, ya que observamos que en CaP la expresión de SPARC se ve aumentada, es posible que la desmetilación del promotor de SPARC, con el consiguiente aumento de su expresión, favorezca el desarrollo tumoral. En nuestro estudio observamos que la sobreexpresión de ZEB1, Snail y Slug aumenta la expresión de SPARC en células de CaP. Si bien no encontramos antecedentes en la literatura de

regulación directa de SPARC por estos factores de transcripción, en la base de datos *The Eukaryotic Promoter Database*<sup>83</sup> localizamos secuencias presentes en el promotor de SPARC, que pueden servir de unión para ZEB1 y Slug, por lo que es posible que estos factores de transcripción se unan directamente al promotor de SPARC cuando éste se encuentra desmetilado.

Finalmente, SPARC también puede ser regulado a nivel post-traducciona. Esta proteína contiene secuencias que pueden ser clivadas en péptidos bioactivos que ejercen diferentes efectos. Por ejemplo, en el dominio similar a folistatina está la secuencia de los péptidos 2.1 y 2.3. El péptido 2.1 inhibe la proliferación de células endoteliales mientras que el péptido 2.3 inhibe la angiogénesis<sup>84</sup>. Además, el péptido 2.1 inhibe la adhesión celular, disruptiendo las adhesiones focales, al igual que el péptido 4.2, que se encuentra en la región de unión a calcio extracelular<sup>85</sup>. El clivaje de estos péptidos depende de la actividad de metaloproteasas específicas. Por ejemplo, el clivaje de SPARC por MMP-3 produce péptidos que promueven la proliferación endotelial<sup>86</sup>. La generación de estos péptidos con actividad diferencial podría explicar los distintos efectos de SPARC en contextos tumorales distintos, ya que dependería de la presencia de MMPs específicas en el microambiente tumoral. Sería interesante evaluar si en CaP se presenta preferencialmente la versión completa de SPARC o algunos péptidos específicos de esta proteína y si este patrón de expresión varía durante el progreso tumoral.

### 3. SPARC y el programa de TEM

Para investigar los efectos del SPARC tumoral en células CaP, desarrollamos un modelo *in vitro* de silenciamiento y sobreexpresión de SPARC. En nuestro modelo, encontramos que la expresión de SPARC por las células de CaP conduce a cambios morfológicos, moleculares y funcionales asociados con la TEM. Nuestros resultados concuerdan con estudios recientes en cáncer de cabeza y cuello, y cáncer de pulmón de células no pequeñas, en los cuales SPARC induce cambios fenotípicos y moleculares asociados con TEM<sup>58,87</sup>. Sin embargo, el presente trabajo es el primer reporte de inducción de TEM por SPARC en CaP.

En este estudio, observamos que el silenciamiento de SPARC disminuye la expresión de ZEB1, Snail y Slug a nivel de mRNA. Sin embargo, a nivel de proteína, solo ZEB1 se encuentra disminuido. Snail y Slug pueden ser regulados a nivel traduccional<sup>88,89</sup> lo que podría explicar por qué Snail y Slug están disminuidos a nivel de mRNA en células PC3 shSPARC, pero no a nivel de proteína. Por otro lado, la sobreexpresión de SPARC aumenta la expresión de los FTs-TEM canónicos como Snail, Slug y ZEB1, a nivel de mRNA y proteína, lo que sugiere que SPARC podría modular el fenotipo celular a través de estos factores transcripcionales. En otros estudios se ha descrito que las células tumorales con silenciamiento de ZEB1, Snail y Slug cambian a un fenotipo epitelial, con una mayor expresión de E-cadherina<sup>30,90</sup>. Además, Snail es necesario para la disminución de E-cadherina por SPARC en el cáncer de pulmón de células no pequeñas<sup>58</sup>, y Slug para la invasión inducida por SPARC en el melanoma<sup>60</sup>. Dados estos antecedentes, es esperable que estos factores de transcripción sean necesarios para la TEM inducida por SPARC en CaP. Sin embargo, también es posible que SPARC actúe a través de otros mecanismos diferentes a la regulación dada por factores de transcripción. Por ejemplo, debido a que SPARC

activa las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ <sup>55</sup>, SPARC podría promover la internalización de E-cadherina a través de los efectores  *río abajo*  de integrina FAK y v-Src<sup>91</sup>.

Respecto de las características funcionales de nuestras células, observamos que SPARC regula la migración y la invasión  *in vitro*  de células de CaP. Encontramos que el silenciamiento de SPARC disminuye la motilidad y la invasión en células PC3, mientras que la sobreexpresión de SPARC aumenta la motilidad en células LNCaP. Estos resultados indican que SPARC no solo actúa como un quimioatrayente paracrino, como ha sido reportado anteriormente<sup>54,55,92</sup>, sino que también puede estimular directamente la migración e invasión de células de CaP de manera autocrina. Por lo tanto, SPARC podría desempeñar un papel importante en la progresión temprana del tumor, además de contribuir en la llegada de células CaP metastásicas al hueso.

#### 4. Efecto de SPARC en la proliferación celular

En otros estudios en que se ha evaluado el efecto de SPARC en el crecimiento tumoral se ha descrito que SPARC podría estar inhibiendo la proliferación celular. Por ejemplo, Said et al.<sup>52</sup> reportaron que los ratones *knockout* para SPARC muestran un rápido crecimiento tumoral y una mayor proliferación de células tumorales de CaP. Complementariamente, Shin et al.<sup>51</sup> observaron una disminución en la proliferación de células CaP en presencia de SPARC exógeno. Sin embargo, otros estudios han descrito un aumento en las capacidades proliferativas de células tumorales en presencia de SPARC<sup>55</sup>, mientras que otros no observaron cambios en proliferación<sup>50,54,93</sup>. En nuestro modelo no observamos cambios en la proliferación celular al silenciar o sobreexpresar SPARC, al menos durante las primeras 72 hrs. Teniendo en cuenta que SPARC induce TEM, es posible que los efectos de SPARC sobre el crecimiento del tumor dependan de la activación diferencial de los factores transcripcionales que pueden tanto activar como inhibir vías proliferativas. Por ejemplo, en células de CaP se ha visto que el silenciamiento de ZEB1 con RNAs interferentes disminuye la fosforilación de ERK1/2, lo que lleva a un aumento de la apoptosis y menor proliferación<sup>31</sup>. Además, se ha visto que algunos micro RNAs que inhiben la proliferación celular, como miR-126, miR-429 y miR-641, tienen como blanco directo la región 3'UTR de ZEB1<sup>94-96</sup>.

Por otro lado, se ha descrito ampliamente que el proceso de TEM lleva a un estado final de células mesenquimales altamente migratorias e invasivas, con poco potencial proliferativo<sup>97</sup>. Estos efectos se atribuyen principalmente los factores de transcripción Snail y Slug, que detienen el ciclo celular confiriéndole a las células mayor resistencia a la muerte. Se ha descrito que Snail bloquea el ciclo celular<sup>98</sup>, mediante la inhibición de la expresión de Ciclina D1 y D2<sup>99</sup>, al

igual que Slug, que inhibe la expresión de Ciclina D1<sup>100</sup>. La disminución de la proliferación y el aumento de la sobrevivencia le otorga una ventaja a las células malignas para migrar más eficientemente y sobrevivir hasta que alcanzan el nicho metastásico<sup>101,102</sup>. Sin embargo, recientemente se ha descrito que las células en estados de TEM intermedios son altamente plásticas, pudiendo adquirir diversos fenotipos, distintos a los de una célula en un estado mesenquimal final<sup>97,103</sup>.

## 5. TEM, estados intermedios y plasticidad

El programa de TEM durante mucho tiempo se describió como un proceso binario con dos poblaciones celulares opuestas: células epiteliales y células mesenquimales. Éstas últimas son frecuentemente definidas por la pérdida de E-cadherina y la expresión de vimentina. Sin embargo, estudios recientes indican que el proceso de TEM ocurre de manera gradual, caracterizado por varios estados celulares intermedios, con distintos niveles de expresión (y muchas veces co-expresión) de marcadores epiteliales y mesenquimales, presentando características moleculares, morfológicas y funcionales intermedias entre ambos tipos celulares<sup>97,101-103</sup>.

La co-expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales se ha observado en distintos tipos de carcinomas primarios, tales como cáncer de mama, colon, pulmón, páncreas y próstata<sup>97</sup>. En el CaP en particular, se ha observado co-expresión de E-cadherina con vimentina y fibronectina en la misma región tumoral<sup>104</sup>. De manera similar, en un modelo murino de CaP, se describieron células tipo mesenquimal, caracterizadas por ser EpCAM<sup>-</sup>/VIM<sup>+</sup> y células en transición, caracterizadas por EpCAM<sup>+</sup>/VIM<sup>+</sup>, siendo la capacidad proliferativa una de las características distintivas entre ambas poblaciones: mientras que las mesenquimales exhiben características de quiescencia, las células en transición presentan capacidades proliferativas similares a las células progenitoras de tipo epitelial<sup>105</sup>. En nuestro trabajo, las células LNCaP con sobreexpresión de SPARC presentaron características que se podrían atribuir a un proceso de TEM intermedio: en estas células disminuyó la expresión de E-cadherina y aumentó la expresión de CK18 y vimentina, sin embargo, no aumentó la expresión de N-cadherina. En estas células tampoco disminuyó

la proliferación, en comparación a las células LNCaP que fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1, las cuales sí presentaban menor proliferación.

El programa de TEM ha sido asociado con la adquisición de características de células madre del cáncer (CSC) por su mayor potencial de generar tumores cuando son inoculadas en ratones inmunodeficientes. Por ejemplo, la expresión ectópica de FTs-TEM Twist1 o Snail en células epiteliales de mama aumenta su capacidad de formar mamoesferas, una de las características de las CSC de mama<sup>106</sup>. Además, células CD24<sup>-</sup>, que expresan bajos niveles de E-cadherina y altos niveles de vimentina y fibronectina, son capaces de generar tumores mamarios en ratones, a diferencia de células CD24<sup>+</sup>, que además presentan altos niveles de E-cadherina<sup>107</sup>. En otros modelos, como en cáncer de ovario, un fenotipo de TEM intermedio se asocia la adquisición de marcadores y capacidades funcionales propias de CSC, mientras que los fenotipos completamente epiteliales o mesenquimales se asocian a la pérdida de marcadores de CSC y menor capacidad tumorigénica<sup>108</sup>.

Si bien, todas las subpoblaciones presentes durante la TEM (epiteliales, TEM tempranas, TEM intermedias, TEM tardías y completamente mesenquimales) presentan cierto grado de plasticidad, estos y otros antecedentes sugieren que las poblaciones híbridas o de TEM intermedia son las que presentan mayor grado de plasticidad, capacidad clonogénica *in vitro* y en condiciones *in vivo* pueden dar origen a tumores con distintas subpoblaciones<sup>97,103,109</sup>. Sería interesante evaluar a futuro si la inducción de TEM parcial por SPARC podría dar origen a subpoblaciones con fenotipo CSC. Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que las células PC3 con

silenciamiento de SPARC presentan menor capacidad de formar prostatoesferas en condiciones de cultivo no adherente y menor capacidad de formar tumores en ratones inmunodeprimidos.

## 6. SPARC y migración: asociación con integrinas

Distintos autores han analizado las vías involucradas en la migración celular inducida por SPARC, observándose una importante participación de distintas subunidades de integrinas en este proceso. Por ejemplo, De et al.<sup>55</sup>, describieron que la migración hacia SPARC requiere de la activación de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ , mientras que Girotti et al.<sup>62</sup> que la invasión estimulada por SPARC depende de integrina  $\alpha_2\beta_1$ . En nuestro modelo observamos que SPARC regula la expresión de varias subunidades de integrina, siendo integrina  $\beta_3$  la que presenta cambios concordantes con la expresión de SPARC. Esto es interesante ya que previamente se había reportado que la expresión ectópica de integrina  $\beta_3$  induce la expresión de SPARC en células de melanoma<sup>110</sup>, como también la subunidad  $\beta_4$  regula la expresión de SPARC en células de cáncer de mama<sup>111</sup>. Los antecedentes de la literatura en conjunto con nuestras observaciones indican que SPARC y algunos genes de integrina podrían estar regulados recíprocamente de forma positiva, contribuyendo en conjunto a la migración e invasión de células cancerosas. Además, el aumento de integrina  $\alpha_v\beta_3$  por SPARC podría facilitar el proceso metastásico, particularmente de las metástasis óseas<sup>112</sup>, las cuales son el principal nicho metastásico del CaP<sup>15</sup>. De hecho, existen antecedentes que muestran que la sobreexpresión de integrina  $\alpha_v\beta_3$  aumenta el número y tamaño de las metástasis óseas de cáncer de ovario<sup>113</sup>, además de aumentar la migración de células cancerosas hacia la sialoproteína ósea, la cual es altamente expresada en el estroma óseo<sup>114-116</sup>.

Por otro lado, en células PC3 con silenciamiento de SPARC, observamos que la disminución en la expresión de integrina  $\alpha_v\beta_3$ , es acompañada por una disminución de la expresión de genes relacionados con la migración y la actividad de integrinas, específicamente RAC1, RHOA e

ILK. Shi et al.<sup>44</sup>, previamente habían reportado disminución de la actividad de ILK y de la fosforilación de FAK Y397, en células de glioma con silenciamiento de SPARC. En nuestro modelo de CaP en cambio, observamos aumento de P-FAK Y397 y una disminución de P-FAK Y925 al silenciar SPARC. La fosforilación de FAK Y925 es clave para el recambio de las adhesiones focales, ya que impide la unión de paxilina al dominio diana de adhesiones focales (FAT)<sup>117</sup>. Paxilina regula la extensión citoplasmática y la migración celular<sup>118,119</sup>, lo cual podría explicar por qué ambos procesos se encuentran afectados en células PC3 con silenciamiento de SPARC. Además, observamos que el silenciamiento de SPARC altera la formación de las adhesiones focales, observándose un aumento en el número de adhesiones focales, pero de menor tamaño en comparación con las células control, lo cual concuerda con una menor capacidad migratoria<sup>120</sup>.

Ya que integrina  $\alpha_v\beta_3$  media la inducción de TEM por diversos factores<sup>67,69,70,74</sup>, nosotros hipotetizamos que integrina  $\alpha_v\beta_3$  también podría estar mediando la inducción de TEM por SPARC. Efectivamente en nuestro modelo observamos que integrina  $\alpha_v\beta_3$  media la disminución de E-cadherina y aumento de vimentina, inducidos por SPARC, además del aumento de la migración. Considerando que integrina  $\alpha_v\beta_3$  induce la expresión de Snail y Slug en otros modelos<sup>68,70</sup> y que observamos una evidente modificación de ZEB1 al silenciar y sobreexpresar SPARC, evaluamos si en CaP ZEB1 es necesario para la disminución de E-cadherina inducida por SPARC. Nuestros resultados muestran que SPARC requiere de la expresión de ZEB1 y de la actividad de integrina  $\alpha_v\beta_3$  para disminuir E-cadherina. De manera similar, la migración inducida por SPARC depende de que se exprese ZEB1 en estas células. A nuestro saber, este es el primer estudio que vincula la actividad de SPARC con ZEB1.

## 7. ZEB1: función en TEM y otros procesos en cáncer

El aumento de ZEB1 por SPARC y su implicancia como mediador de la inhibición de E-cadherina abre muchas interrogantes respecto a otros procesos celulares que SPARC podría estar regulando a través de ZEB1.

El programa de TEM involucra la acción conjunta y coordinada de distintos factores de transcripción, entre los que destacan los de la familia Snail (SNAI1 y SNAI2), los de la familia Twist (TWIST1 y TWIST2) y de la familia ZEB (ZEB1 y ZEB2)<sup>101-103,121,122</sup>. ZEB1 y ZEB2 presentan varios dominios de unión a proteínas, entre ellos dominios de interacción con Smad, CtBP, p300 y P/CAF que determinan su función como controlador de la activación transcripcional. Como consecuencia, ZEB no sólo actúan como represores transcripcionales por interacción con corepresores como CtBP, sino que también actúan como activadores transcripcionales mediante la interacción con coactivadores como p300 y P/CAF<sup>27,123-125</sup>. Esta actividad dual es de gran relevancia en el control del proceso de TEM, ya que a diferencia de otros factores como SNAI1, ZEB reprime la expresión de proteínas epiteliales a la vez que regula positivamente proteínas mesenquimales como vimentina y N-cadherina<sup>27,123</sup>. Cabe destacar que, si bien ZEB1 y ZEB2 presentan gran homología estructural, sus actividades son distintas y a veces opuestas. Por ejemplo, en la señalización inducida por BMP (proteína morfogenética del hueso, de la familia TGF- $\beta$ ), ZEB1 sinergiza la activación transcripcional medida por SMAD, mientras que ZEB2 actúa como represor, reclutando a CtBP<sup>126</sup>.

Además, ZEB1 pareciera ser clave en algunos procesos celulares que se ven favorecidos por la TEM. Por ejemplo, en un modelo murino de cáncer de páncreas se observó que la presencia de ZEB1 es necesaria para la invasión local y la generación de metástasis, mientras que la depleción de Snail y Twist1 en el mismo modelo no afecta estos procesos<sup>127</sup>. Este papel central de ZEB1 en la TEM y sus procesos asociados, podría explicar que en nuestro modelo observáramos que SPARC no disminuye E-cadherina ni afecta la migración en líneas celulares con silenciamiento de ZEB1, lo que sí ocurre en células LNCaP, las cuales no expresan altas cantidades de ZEB1 de manera basal, pero sí frente a estímulos inductores de TEM.

Por otro lado, hay creciente evidencia de que ZEB1 no sólo juega un papel importante en el proceso de TEM, sino que, además, puede controlar funciones celulares críticas incluyendo diferenciación, proliferación, respuesta al daño y supervivencia celular, contribuyendo en otros procesos importantes para el desarrollo tumoral, desde la tumorigénesis hasta la progresión tumoral<sup>128</sup>. Por ejemplo, se ha visto que ZEB1 podría ser clave en la tumorigénesis temprana del cáncer de páncreas<sup>127,129</sup>, como también en tumores no epiteliales como melanoma<sup>130</sup>. Si bien no hay suficiente evidencia para ligar a SPARC con la transformación tumoral<sup>131</sup>, sí podría estar implicado, junto con ZEB1, en etapas posteriores.

La observación de que las CSC pueden generarse de *novο* a partir de su contraparte no-CSC, mediante el proceso de TEM, ha llevado también a investigar si es que ZEB1 podría estar participando en esta conversión dinámica entre no-CSC y CSC. Efectivamente, en algunos modelos se ha descrito que ZEB1 está involucrado en la aparición del fenotipo CSC<sup>132-134</sup>, mediante la regulación de miRNAs que controlan la expresión de factores transcripcionales como SOX2 y KLF4<sup>134</sup>. En nuestro laboratorio, resultados no publicados muestran que el silenciamiento de

ZEB1 en células de CaP lleva a la reversión del fenotipo CSC, disminuyendo la expresión de marcadores como CD44 y CD133 y de el factor transcripcional SOX2, lo que funcionalmente se refleja en una menor capacidad clonogénica y de formación de prostatoesferas.

Por último, ZEB1 además se ha relacionado con mayor resistencia a la terapia en diversos modelos. En CaP, se ha visto que ZEB1 está involucrado en la resistencia a docetaxel<sup>32,33</sup>, mientras que en cáncer de mama se ha relacionado con mayor resistencia a la radioterapia<sup>135</sup>. Considerando éstos y otros estudios han demostrado que ZEB1 contribuye a la agresividad a través de mecanismos dependientes e independientes de TEM<sup>30,32,33,124,135,136</sup>, sería interesante determinar si SPARC, a través de la señalización de ZEB1 regula otros aspectos importantes para la progresión tumoral, como por ejemplo la generación de poblaciones con fenotipo CSC o la resistencia a terapia.

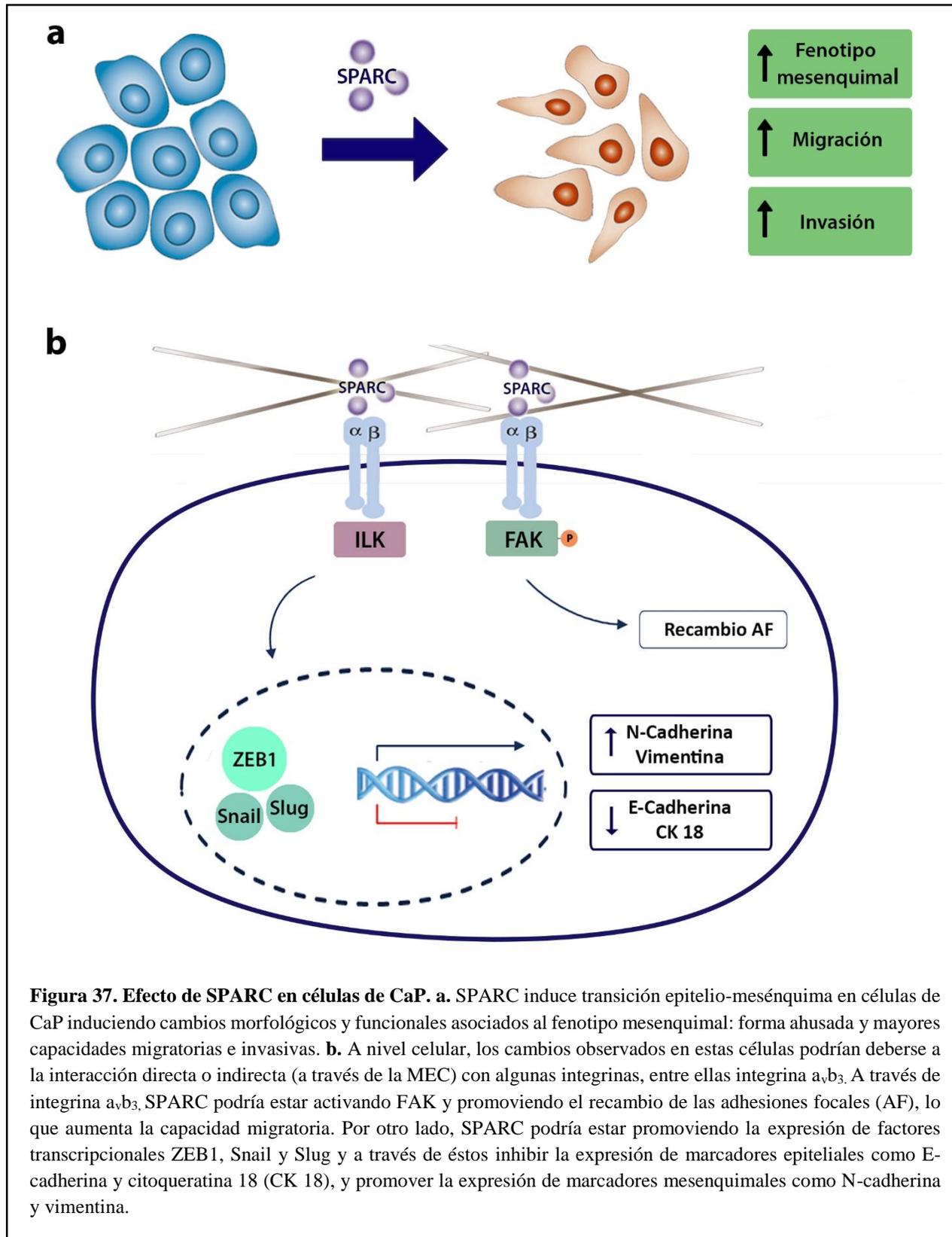
## 8. Proyecciones e implicancias clínicas de estos hallazgos

Nuestros datos muestran que SPARC es altamente expresado en muestras de CaP de Gleason intermedio y alto e induce TEM en células CaP. Uno de los aspectos que se podrían estudiar a futuro es cómo la expresión de SPARC en el tumor primario se correlaciona con otros parámetros clínicos relevantes, como el PSA en plasma, clasificación TNM de los pacientes o tiempo de recidiva posterior a tratamientos.

Además, observamos que SPARC induce la migración e invasión de células CaP *in vitro*, por este motivo es esperable que los pacientes que presenten mayor expresión de esta proteína en el tumor primario presenten un mayor riesgo de desarrollar metástasis a corto plazo. Si estos datos pudiesen ser validados con cohortes de mayor tamaño, la detección inmunohistoquímica de SPARC en muestras de biopsias transrectales podría contribuir, en conjunto con otros parámetros clínicos, a tomar decisiones terapéuticas en aquellos pacientes con pronósticos menos certeros.

Nuestro estudio indica que SPARC regula positivamente a integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1 y que requiere de la expresión y actividad de ambas proteínas para inducir TEM y aumentar la migración de células de CaP. Estos resultados sugieren que SPARC, a través de integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1 regula eventos claves durante la progresión del tumor, como es la invasión local y el escape de células cancerosas a la circulación. Además, dado los diversos mecanismos por los cuales ZEB1 contribuya a la agresividad tumoral, es necesario seguir investigando la implicancia de la expresión anómala de SPARC durante las distintas etapas de la progresión del CaP.

## 9. Modelo propuesto del efecto de SPARC en células de CaP



## CONCLUSIONES

- SPARC se expresa en células tumorales de CaP primario, mayormente en tumores de Gleason intermedio y alto.
- SPARC induce TEM en células de CaP, aumentando sus capacidades migratorias e invasivas
- SPARC regula positivamente a integrina  $\alpha_v\beta_3$  y ZEB1 y requiere de la expresión y actividad de ambas proteínas para inducir TEM y aumentar la migración de células de CaP.

## REFERENCIAS

1. Drake, R., Vogl, W. & Mitchell, A. *Gray's Anatomy for Students*. (Churchill Livingstone, 2009).
2. Marzo, A. M. De *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 256–269 (2007).
3. Geneser, F. *Histología*. (Editorial Panamericana, 2015).
4. Toivanen, R. & Shen, M. M. Prostate organogenesis : tissue induction , hormonal regulation and cell type specification. *Development* **144**, 1382–1398 (2017).
5. Costello, L. C. & Franklin, R. B. Prostatic fluid electrolyte composition for the screening of prostate cancer : a potential solution to a major problem. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **12**, 17–24 (2009).
6. Humphrey, P. A. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology* **60**, 59–74 (2012).
7. Jia, L., Jiang, Y. & Michael, C. W. Performance of different prostate specific antibodies in the cytological diagnosis of metastatic prostate adenocarcinoma. *Diagn. Cytopathol.* **45**, 998–1004 (2017).
8. Bray, F., Ferlay, J. & Soerjomataram, I. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
9. Serie defunciones y mortalidad por tumores malignos según sexo. Chile 1997 - 2013. *Departamento de estadísticas e información en salud* (2013). Available at: <http://www.deis.cl/>. (Accessed: 7th August 2019)
10. Kumar, V., Abbas, A. & Aster, J. *Robbins Basic Pathology*. (Elsevier Saunders, 2013).
11. Zynger, D. & Parwani, A. *Prostate Pathology*. (Demos Medical, 2015).
12. Epstein, J. I. *et al.* The 2014 International Society of Urological Pathology ( ISUP ) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 244–252 (2016).
13. Shah, R. B. & Zhou, M. Recent advances in prostate cancer pathology: Gleason grading and beyond. *Pathol. Int.* **66**, 260–272 (2016).
14. Coleman, R. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity.

- Cancer Res* **12**, 6243s–9s. (2006).
15. Bubendorf, L. *et al.* Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* **31**, 578–83 (2000).
  16. Chen, Y., Lin, Y. & Lin, H. Associations of Prostate-Specific Antigen , Prostate Carcinoma Tissue Gleason Score , and Androgen Receptor Expression with Bone Metastasis in Patients with Prostate Carcinoma. *Med. Sci. Monit.* **23**, 1768–1774 (2017).
  17. American Society of Clinical Oncology. Prostate cancer statistics. (2016). Available at: <http://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/statistics>. (Accessed: 17th October 2018)
  18. Sartor, O. & de Bono, J. S. Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 645–657 (2018).
  19. Heerboth, S. *et al.* EMT and tumor metastasis. *Clin. Transl. Med.* **4**, 1–13 (2015).
  20. Kalluri, R., Weinberg, R. A., Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
  21. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 69–84 (2019).
  22. Ye, X. & Weinberg, R. A. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* **25**, 675–686 (2015).
  23. Raftopoulou, M. & Hall, A. Cell migration : Rho GTPases lead the way. **265**, 23–32 (2004).
  24. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
  25. Hadler-Olsen, E., Winberg, J. O. & Uhlén-Hansen, L. Matrix metalloproteinases in cancer: Their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumor Biol.* **34**, 2041–2051 (2013).
  26. Craene, B. De & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 97–110 (2013).
  27. Sánchez-Tilló, E. *et al.* Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am. J. Cancer Res.* **1**, 897–912 (2011).

28. Korpál, M., Lee, E. S., Hu, G. & Kang, Y. The miR-200 Family Inhibits Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-cadherin Transcriptional Repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem.* **283**, 14910–14914 (2008).
29. Orellana-Serradell, O., Herrera, D., Castellón, E. A. & Contreras, H. R. The transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. *Asian J. Androl.* **20**, 294–299 (2018).
30. Farfán, N. *et al.* The transcriptional factor ZEB1 represses Syndecan 1 expression in prostate cancer. *Sci. Rep.* **8**, 11467 (2018).
31. Song, X., Chang, H., Liang, Q., Guo, Z. & Wu, J. ZEB1 promotes prostate cancer proliferation and invasion through ERK1/2 signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 4032–4038 (2017).
32. Hanrahan, K. *et al.* The role of epithelial-mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer. *Mol. Oncol.* **11**, 251–265 (2017).
33. Orellana-serradell, O., Herrera, D., Castellón, E. A. & Contreras, H. R. The transcription factor ZEB1 promotes chemoresistance in prostate cancer cell lines. *Asian J. Androl.* **21**, 1–8 (2019).
34. Dalla Pozza, E., Forciniti, S., Palmieri, M. & Dando, I. Secreted molecules inducing epithelial-to-mesenchymal transition in cancer development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **78**, 62–72 (2018).
35. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nature* **6**, 392–401 (2006).
36. Fuxe, J. & Karlsson, M. C. I. TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition: A link between cancer and inflammation. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 455–461 (2012).
37. Joseph, J. V *et al.* TGF- $\beta$  is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis.* **5**, e1443-14 (2014).
38. Chong, H. C., Tan, C. K., Huang, R. L. & Tan, N. S. Matricellular proteins: A sticky affair with cancers. *J. Oncol.* **2012**, (2012).
39. Brekken, R. & Sage, E. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol.* **19**, 816–827 (2000).
40. Arnold, S. & Brekken, R. SPARC: A matricellular regulator of tumorigenesis. *J. Cell*

- Commun. Signal.* **3**, 255–273 (2009).
41. Rosset, E. & Bradshaw, A. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix Biol.* **52–54**, 78–87 (2015).
  42. Ribeiro, N., Sousa, S., Brekken, R. & Monteiro, F. Role of sparc in bone remodeling and cancer-related bone metastasis. *J. Cell. Biochem.* **115**, 17–26 (2014).
  43. Nagaraju, G. P., Dontula, R., El-rayes, B. F. & Lakka, S. S. Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis* **35**, 967–973 (2014).
  44. Shi, Q. *et al.* Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene* **26**, 4084–94 (2007).
  45. Thomas, S. L. *et al.* PTEN augments SPARC suppression of proliferation and inhibits SPARC-induced migration by suppressing SHC-RAF-ERK and AKT signaling. *Neuro. Oncol.* **12**, 941–955 (2010).
  46. Kunigal, S. *et al.* SPARC-induced migration of glioblastoma cell lines via uPA-uPAR signaling and activation of small GTPase RhoA. 1349–1357 (2006).
  47. Liu, T. *et al.* Hypermethylation of the SPARC promoter and its prognostic value for prostate cancer. *Oncol. Rep.* **39**, 659–666 (2018).
  48. Tai, I. T. & Tang, M. J. SPARC in cancer biology : Its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist. Updat.* **11**, 231–246 (2008).
  49. Nagaraju, G. P. & Ei-rayes, B. F. SPARC and DNA methylation : Possible diagnostic and therapeutic implications in gastrointestinal cancers. *Cancer Lett.* **328**, 10–17 (2013).
  50. Sharma, S. *et al.* Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Mediates Metastatic Dormancy of Prostate Cancer in the Bone. *J. Biol. Chem.* **291**, 19351–19363 (2016).
  51. Shin, M. *et al.* Exogenous SPARC suppresses proliferation and migration of prostate cancer by interacting with integrin  $\beta$ 1. *Prostate* **73**, 1159–70 (2013).
  52. Said, N. *et al.* The role of SPARC in the TRAMP model of prostate carcinogenesis and progression. *Oncogene* **28**, 3487–98 (2009).
  53. Kapinas, K. *et al.* Bone matrix osteonectin limits prostate cancer cell growth and

- survival. *Matrix Biol.* **31**, 299–307 (2012).
54. Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D. & Kleinman, H. Osteonectin Promotes Prostate Cancer Cell Migration and Invasion : A Possible Mechanism for Metastasis to Bone 1. **56**, 4453–4457 (1999).
  55. De, S. *et al.* Molecular pathway for cancer metastasis to bone. *J. Biol. Chem.* **278**, 39044–50 (2003).
  56. Mateo, F. *et al.* SPARC mediates metastatic cooperation between CSC and non-CSC prostate cancer cell subpopulations. *Mol. Cancer* **13**, 1–17 (2014).
  57. Robert, G. *et al.* SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res.* **66**, 7516–23 (2006).
  58. Hung, J., Yen, M., Jian, S., Wu, C. & Chang, W. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) induces cell migration and epithelial mesenchymal transition through WNK1 / snail in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **8**, 63691–63702 (2017).
  59. Grant, J. L. *et al.* A Novel Molecular Pathway for Snail-Dependent, SPARC-Mediated Invasion in Non – Small Cell Lung Cancer Pathogenesis. *Cancer Prev Res* **7**, 150–161 (2014).
  60. Fenouille, N. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* **7**, e40378 (2012).
  61. Pavasant, P. & Yongchaitrakul, T. Secreted protein acidic, rich in cysteine induces pulp cell migration via avb3 integrin and extracellular signal-regulated kinase. *Oral Dis.* **14**, 335–340 (2008).
  62. Girotti, M. R. *et al.* SPARC Promotes Cathepsin B-Mediated Melanoma Invasiveness through a Collagen I /  $\alpha$ 2b1 Integrin Axis. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 2438–2447 (2011).
  63. Said, N., Najwer, I. & Motamed, K. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) inhibits integrin-mediated adhesion and growth factor-dependent survival signaling in ovarian cancer. *Am. J. Pathol.* **170**, 1054–63 (2007).
  64. Melouane, A., Yoshioka, M., Kanzaki, M. & St-Amand, J. Sparc, an EPS-induced gene, modulates the extracellular matrix and mitochondrial function via ILK/AMPK pathways in C2C12 cells. *Life Sci.* **229**, 277–287 (2019).
  65. Barker, T. H. *et al.* SPARC regulates extracellular matrix organization through its

- modulation of integrin-linked kinase activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 36483–36493 (2005).
66. Weaver, M. S., Workman, G. & Sage, E. H. The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin  $\beta 1$  and activation of integrin-linked kinase. *J. Biol. Chem.* **283**, 22826–22837 (2008).
  67. Mamuya, F. A. & Duncan, M. K.  $\alpha V$  integrins and TGF- $\beta$ -induced EMT: A circle of regulation. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 445–455 (2012).
  68. Galliher, A. J. & Schiemann, W. P. Beta3 integrin and Src facilitate transforming growth factor-beta mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res.* **8**, R42 (2006).
  69. Mori, S. *et al.* Enhanced expression of integrin  $\alpha V\beta 3$  induced by TGF- $\beta$  is required for the enhancing effect of fibroblast growth factor 1 (FGF1) in TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in mammary epithelial cells. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
  70. Shah, P. P., Fong, M. Y. & Kakar, S. S. PTTG induces EMT through integrin  $\alpha V\beta 3$ -focal adhesion kinase signaling in lung cancer cells. *Oncogene* **31**, 3124–35 (2012).
  71. Serrano, I., McDonald, P. C., Lock, F. E. & Dedhar, S. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGF $\beta$ -1-induced epithelial–mesenchymal transition (EMT). *Oncogene* **32**, 50–60 (2012).
  72. Abd El-Rehim, D. M., Abd-Elghany, M. I. & Nazmy, M. H. Integrin-Linked Kinase, Snail and Multidrug Resistance Protein 1: Three concordant players in the progression of non-small cell lung cancer. *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* **27**, 129–137 (2015).
  73. Desgrosellier, J. S. *et al.* Integrin  $\alpha V\beta 3$  drives slug activation and stemness in the pregnant and neoplastic mammary gland. *Dev. Cell* **30**, 295–308 (2014).
  74. Knowles, L. M. *et al.* Integrin  $\alpha v\beta 3$  and fibronectin upregulate slug in cancer cells to promote clot invasion and metastasis. *Cancer Res.* **73**, 6175–6184 (2013).
  75. Sung, S.-Y. *et al.* Co-Targeting Prostate Cancer Epithelium and Bone Stroma by Human Osteonectin-Promoter-Mediated Suicide Gene Therapy Effectively Inhibits Androgen-Independent Prostate Cancer Growth. *PLoS One* **11**, e0153350 (2016).
  76. Derosa, C. a *et al.* Elevated osteonectin/SPARC expression in primary prostate cancer predicts metastatic progression. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **15**, 150–6 (2012).
  77. Thomas, R., True, L., Bassuk, J., Lange, P. & Vessella, R. Differential Expression of

- Osteonectin/SPARC during Human Prostate Cancer Progression. *Clin. Cancer Res.* **6**, 1140–1149 (2000).
78. Wang, B. *et al.* Integrative genomic analyses of secreted protein acidic and rich in cysteine and its role in cancer prediction. *Mol. Med. Rep.* **10**, 1461–1468 (2014).
  79. Bawazeer, S. *et al.* Association of SPARC gene polymorphisms rs3210714 and rs7719521 with VEGF expression and utility of Nottingham Prognostic Index scoring in breast cancer in a sample of Egyptian women. *Mol. Biol. Rep.* **45**, 2313–2324 (2018).
  80. Arqueros, C. *et al.* SPARC gene variants predict clinical outcome in locally advanced and metastatic pancreatic cancer patients. *Med. Oncol.* **34**, (2017).
  81. Gao, J. *et al.* Methylation of the SPARC gene promoter and its clinical implication in pancreatic cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 1–9 (2010).
  82. Cheetham, S. *et al.* SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'-deoxycytidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br. J. Cancer* **98**, 1810–1819 (2008).
  83. Dreos, R., Ambrosini, G., Périer, R. C. & Bucher, P. The Eukaryotic Promoter Database: Expansion of EPDNew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **43**, D92–D96 (2015).
  84. Funk, S. E. & Sage, E. H. Differential effects of SPARC and cationic SPARC peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **154**, 53–63 (1993).
  85. Murphy- Ullrich, J. E., Lane, T. F., Pallero, M. A. & Sage, E. H. SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin- like region and the Ca<sup>2+</sup>- binding EF- hand. *J. Cell. Biochem.* **57**, 341–350 (1995).
  86. Sage, E. H. *et al.* Cleavage of the matricellular protein SPARC by matrix metalloproteinase 3 produces polypeptides that influence angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 37849–37857 (2003).
  87. Chang, C., Id, M. Y., Liao, S., Hsu, Y. & Lai, C. Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine ( SPARC ) Enhances Cell Proliferation , Migration , and Epithelial Mesenchymal Transition , and SPARC Expression is Associated with Tumor Grade in Head and Neck Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
  88. Robichaud, N. *et al.* Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via

- translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene* **34**, 2032–2042 (2014).
89. Jiang, H. *et al.* Long non-coding RNA SNHG15 interacts with and stabilizes transcription factor Slug and promotes colon cancer progression. *Cancer Lett.* **425**, 78–87 (2018).
  90. Sánchez-Tilló, E. *et al.* EMT-activating transcription factors in cancer: Beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 3429–3456 (2012).
  91. Guo, W. & Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 816–826 (2004).
  92. Mateo, F. *et al.* SPARC mediates metastatic cooperation between CSC and non-CSC prostate cancer cell subpopulations. **13**, 1–17 (2014).
  93. Chen, N. *et al.* A secreted isoform of ErbB3 promotes osteonectin expression in bone and enhances the invasiveness of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 6544–8 (2007).
  94. Jiang, R., Zhang, C., Liu, G., Gu, R. & Wu, H. MicroRNA-126 Inhibits Proliferation, Migration, Invasion, and EMT in Osteosarcoma by Targeting ZEB1. *J. Cell. Biochem.* **118**, 3765–3774 (2017).
  95. Wu, G. *et al.* miR-429 suppresses cell growth and induces apoptosis of human thyroid cancer cell by targeting ZEB1. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **47**, 548–554 (2019).
  96. Yao, R., Zheng, H., Wu, L. & Cai, P. MiRNA-641 inhibits the proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis of cervical cancer cells by directly targeting ZEB1. *Onco. Targets. Ther.* **11**, 8965–8976 (2018).
  97. Pastushenko, I. & Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* **29**, 212–226 (2019).
  98. Evdokimova, V. *et al.* Translational Activation of Snail1 and Other Developmentally Regulated Transcription Factors by YB-1 Promotes an Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell* **15**, 402–415 (2009).
  99. Vega, S. *et al.* Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* **18**, 1131–1143 (2004).
  100. Liu, J. *et al.* Slug Inhibits Proliferation of Human Prostate Cancer Cells via Downregulation of Cyclin D1 Expression. *Prostate* **70**, 1768–1777 (2010).
  101. Nieto, M. A. & Cano, A. The epithelial-mesenchymal transition under control: Global

- programs to regulate epithelial plasticity. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 361–368 (2012).
102. Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A. & Thiery, J. P. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
  103. Chaffer, C. L., Juan, B. P. S., Lim, E. & Weinberg, R. A. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 645–654 (2016).
  104. Koliijn, K., Verhoef, E. I. & van Leenders, G. J. L. H. Morphological and immunohistochemical identification of epithelial-to-mesenchymal transition in clinical prostate cancer. *Oncotarget* **6**, 24488–24498 (2015).
  105. Ruscetti, M., Quach, B., Dadashian, E. L., Mulholland, D. J. & Wu, H. Tracking and functional characterization of epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal tumor cells during prostate cancer metastasis. *Cancer Res.* **75**, 2749–2759 (2015).
  106. Mani, S. A. *et al.* The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
  107. Morel, A. P. *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**, 1–7 (2008).
  108. Strauss, R. *et al.* Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One* **6**, 1–20 (2011).
  109. Pastushenko, I. *et al.* Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature* **556**, (2018).
  110. Sturm, R. A. *et al.* Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Res* **62**, 226–232 (2002).
  111. Gerson, K. D., Shearstone, J. R., Maddula, V. S. R. K., Seligmann, B. E. & Mercurio, A. M. Integrin b4 regulates SPARC protein to promote invasion. *J. Biol. Chem.* **287**, 9835–9844 (2012).
  112. McCabe, N., De, S., Vasanji, A., Brainard, J. & Byzova, T. Prostate cancer specific integrin  $\alpha\beta3$  modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. *Oncogene* **26**, 6238–6243 (2007).
  113. Pecheur, I. *et al.* Integrin  $\alpha(v)\beta3$  expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB J.* **16**, 1266–1268 (2002).
  114. Byzova, T. V, Kim, W., Midura, R. J. & Plow, E. F. Activation of integrin  $\alpha(V)\beta(3)$  regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein. *Exp Cell*

- Res* **254**, 299–308 (2000).
115. Karadag, A., Ogbureke, K. U. E., Fedarko, N. S. & Fisher, L. W. Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 956–965 (2004).
  116. Cooper, C. R., Chay, C. H. & Pienta, K. J. The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. *Neoplasia* **4**, 191–194 (2002).
  117. Mitra, S. K., Hanson, D. A. & Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Mol. Cell Biol.* **6**, 56–68 (2005).
  118. Dubois, F., Alpha, K. & Turner, C. E. Paxillin regulates cell polarization and anterograde vesicle trafficking during cell migration. *Mol. Biol. Cell* **28**, 3815–3831 (2017).
  119. López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R. & López, E. Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. *J. Hematol. Oncol.* **10**, 1–15 (2017).
  120. Kim, D. H. & Wirtz, D. Focal adhesion size uniquely predicts cell migration. *FASEB J.* **27**, 1351–1361 (2013).
  121. Montanari, M. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. *Oncotarget* **8**, 35376–35389 (2017).
  122. Goossens, S., Vandamme, N., Van Vlierberghe, P. & Berx, G. EMT transcription factors in cancer development re-evaluated: Beyond EMT and MET. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1868**, 584–591 (2017).
  123. Vandewalle, C., Van Roy, F. & Berx, G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 773–787 (2009).
  124. Zhang, P. & Sun, Y. ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* **14**, 481–487 (2015).
  125. Postigo, A. A., Depp, J. L., Taylor, J. J. & Kroll, K. L. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *EMBO J.* **22**, 2453–2462 (2003).
  126. Postigo, A. A. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGF $\beta$ /BMP signaling pathway. *EMBO J.* **22**, 2443–2452 (2003).
  127. Krebs, A. M. *et al.* The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat. Cell Biol.* **19**, 518–529 (2017).

128. Caramel, J., Ligier, M. & Puisieux, A. Pleiotropic roles for ZEB1 in cancer. *Cancer Res.* **78**, 30–35 (2018).
129. Liu, Y. *et al.* Different thresholds of ZEB1 are required for Ras-mediated tumour initiation and metastasis. *Nat. Commun.* **5**, 1–10 (2014).
130. Caramel, J. *et al.* A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* **24**, 466–480 (2013).
131. Podhajcer, O. L. *et al.* The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev.* **27**, 523–37 (2008).
132. Wang, H. *et al.* ZEB1-mediated vasculogenic mimicry formation associates with epithelial–mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes in prostate cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 3768–3781 (2018).
133. Chaffer, C. L. *et al.* Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* **154**, 61 (2013).
134. Wellner, U. *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1487–1495 (2009).
135. Zhang, P. *et al.* ATM-mediated stabilization of ZEB1 promotes DNA damage response and radioresistance through CHK1. *Nat. Cell Biol.* **16**, 864–875 (2014).
136. Zhou, C. *et al.* ZEB1 confers stem cell-like properties in breast cancer by targeting neurogenin-3. *Oncotarget* **8**, 54388–54401 (2017).