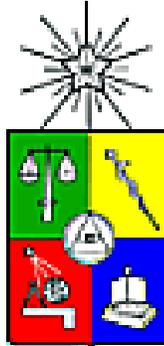


**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**El factor transcripcional REST reprime el proceso de transición epitelio mesén-
quima y el fenotipo maligno en células de cáncer de próstata en condiciones de
independencia androgénica**

SEBASTIÁN RAÚL INDO COFRÉ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Director de Tesis: Prof. Dr. HÉCTOR R. CONTRERAS MUÑOZ

2023

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

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

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

SEBASTIÁN RAÚL INDO COFRÉ

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 junio de 2023.

**Prof. Héctor R. Contreras Muñoz
Director de Tesis
Dpto. Oncología Básico Clínico
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. MARTÍN MOTECINO L.

PROF. DR. DIEGO REYES O.

PROF. DR. ALEJANDRO TAPIA P.

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

Dedicada a mi hermana que, desde su nacimiento, hizo encender una llama en mi corazón, la cual hace que me mueva y respire hasta el día de hoy.

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor Héctor Ruberly Contreras Muñoz le agradezco por su incansable apoyo a todo lo que emprendí en este periodo de tesis. Por ser una fuente inagotable de energía, la cual me motiva a continuar y seguir cumpliendo metas en esta carrera académica. Gracias por todo el cariño, trabajo y considerarme en cada proyecto que se presenta en su camino.

- Al Profesor Enrique Castellón le agradezco por el apoyo constante en el desarrollo de esta tesis, por sus aportes intelectuales y de financiamiento, que sin duda aumentaron el valor científico de este trabajo.

- A los profesores Mario Galindo, Martín Motecino, Diego Reyes y Alejandro Tapia por sus invaluable sugerencias y correcciones realizadas a esta tesis, y a mi formación como doctor en ciencias biomédicas.

- Agradezco a los/las profesores, profesionales y estudiantes de diversos laboratorios de la Facultad de Medicina, Odontología y Química y Farmacia por su ayuda en el momento de necesitar opiniones, sugerencias, equipamiento y/o reactivos para el desarrollo de este trabajo: Katherine Marcelain, Jessica Toro, Mariela Araya y Fernanda Morales, a Montserrat Reyes y Jimena Gatica, a Oscar Cerda, María Paz Saldías y Pablo Cruz, a Mayarling Troncoso, Patricia Carvajal e Isabel Castro. Agradezco especialmente a Octavio Orellana-Serradell por colaborar conmigo para realizar los experimentos de trans migración e invasión y a Bárbara Pesce por su asesoría y realización de los ensayos FACs.

- Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas le agradezco el haberme entregado tantas instancias enriquecedoras desde el punto de vista académico. En permitirme vivir tantas experiencias y por todo el aprendizaje adquirido. Agradezco especialmente a María Cecilia Carter, quien fue una persona fundamental en estos años, preocupándose de mi avance, ayudándome a resolver distintas situaciones administrativas y demostrándome que su labor proviene del gran cariño que siente por los/las estudiantes.

- A mis compañeros/as de laboratorio por su alegría, enseñanzas y ánimo en este largo periodo de tesis. A Fernanda López, Gisela Pérez, Alexander Riquelme, Paula Escalante, Catherine Gatica, Pamela Aravena, Joaquín Reyes, Alam Núñez, Camila Leal, Stephani González y Kevin Brockway. Doy especial agradecimiento a Graciela Caroca, quien gestionó cada uno de los reactivos necesarios para realizar los experimentos de esta tesis, por su amistad, consuelos y por el cariño que me reconfortó durante estos años; y a María José Torres, quien se transformó en una de mis mejores amigas, haciéndome barra, construyendo momentos inolvidables y por tener una fe ciega en mis capacidades, aunque me esté muriendo de nervios.

- A las autoridades del Departamento y Escuela de Tecnología Médica, les agradezco por apoyar mi carrera académica y brindarme los tiempos para poder desarrollar esta

tesis en sintonía con la visión disciplinar de nuestra profesión y la docencia, a la Prof. Inés Pepper y al Prof. Patricio Bustamante; y a la Prof. Denisse Karl y Prof. Fabiola Cerfogli. Hago hincapié en agradecer a toda la comunidad de TM, por su preocupación en mi trabajo y por expresar tan genuinamente su alegría cuando alcanzo una meta. Agradezco especialmente a la Profesora Cecilia Leyton, ex directora de la Escuela, quien fue la gran impulsora de que yo haya podido iniciarme y desarrollarme en la vida académica, por ser uno de los grandes tesoros que la Universidad de Chile me entregó, y una amiga que mantengo hasta el día de hoy, gracias por creer en mí.

- A mis colegas y amigas/os de la mención de Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, a Isabel Castro, Eliana Ayarza, Mayarling Troncoso, Marisel González, Ignacio Maureira, Prof. Esteban Órdenes y Pablo Cruz, por su compañerismo, apoyo incondicional, y por el grato ambiente laboral que tenemos. Les agradezco por su disposición a reemplazar mis labores cuando lo he necesitado y el trabajo riguroso que aplican a la docencia en nuestra área. Doy un especial agradecimiento a Marioly Müller, por su compañía, consejos y abrir mis ojos a más oportunidades que no había visto. Y por demostrarme que puedo, solo debo atreverme.

- A los/las estudiantes de Tecnología Médica, por ser una de mis grandes motivaciones para continuar en este sendero que elegí, y por avivar mi ánimo en días complejos.

- A mis amigas y amigos, Katherine Bravo, Macarena Álvarez, Consuelo Morán, Raúl Indo, Madeleine Bernal, Javiera Yáñez y Paulina Ruiz por regalarme bellas palabras, momentos y alegrías, las cuales se convirtieron en preciados recuerdos. Sin ustedes, estos años hubieran sido más largos aún. Agradezco especialmente a mi pololo Claudio Anabalón, quien es el compañero “que va a todas”, el que me acompañó en momentos hermosos, de triunfos y resultados, y de algunos no tan lindos como de dolores y de pérdida de fe. Le agradezco por todos esos fines de semana de trabajo, de dormir poco, de entender mis momentos de ansiedad y nerviosismo, pero también de risas y abrazos. Fue una pieza fundamental de todo lo que en este trabajo se escribe. Aprovecho en esta instancia de agradecer a las familias Anabalón y Ovalle por acogerme y quererme como uno más.

- Agradezco a mi familia, por jugársela al 100% por la formación de sus hijos. A mi madre Glenda Cofré por sentarse a mi lado a leer sobre medicina y cuidados del paciente cuando era muy pequeño, por su amor incondicional, su cuidado y por su inconmensurable preocupación por cualquier paso en mi vida. A mi padre Fernando Indo, por su trabajo, sus grandes sacrificios y cariño, por concretar las decisiones en mi educación y por decirme “*estudia hijo, tienes que ser más que nosotros*”, algo que improbablemente no podré lograr. A mi hermana Scarlet Indo, por nuestra relación tan cercana, por compartir momentos increíbles de esta vida, y por nuestra admiración recíproca; nunca me faltes.

Este trabajo fue financiado por los proyectos U-Apoya (Enlaces) 22-2019, FONDE-
CYT regular #1201704 y ANID-FONDAP #152220002

Índice

	Página
Lista de abreviaturas	9
Lista de figuras	10
Resumen	12
Summary	14
Introducción	16
1.1. Cáncer de próstata.	16
1.2. Cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) y fenotipo neuroendocrino (NEPC).	17
1.3. Deprivación androgénica y variantes del receptor de andrógenos (AR).	18
1.4. REST y su papel en cáncer.	20
1.5. REST, cáncer de próstata y el proceso de transición epitelio mesénquima.	23
1.6. Tratamientos disponibles para cáncer de próstata.	24
2. Hipótesis	26
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo General	
3.2 Objetivos Específicos	26
4. Materiales y métodos	27
4.1. Microarreglos de tejido (<i>tissue micro array</i> , TMA)	
4.2. Inmunohistoquímica cromogénica (IHQ)	27
4.3. Cultivos celulares 2D	28
4.4. Cultivos celulares 3D	29
4.5. Inmunofluorescencia	30
4.6. Transducción lentiviral	31
4.7. Ensayo de <i>cell sorting</i> activado por fluorescencia (FACs)	32
4.8. Extracción de RNA y RT-qPCR	34
4.9. Extracción de proteínas y <i>western blot</i>	36
4.10. Ensayos de clonogenicidad	38
4.11. Ensayos de transmigración e invasión	39
4.12. Evaluación de la viabilidad a enzalutamida	40
4.13. Consideraciones éticas	41
4.14. Análisis estadísticos	41
5. Resultados	
5.1. Expresión de REST en líneas celulares de CaP.	42
5.2. Evaluación de REST en biopsias de pacientes con CaP.	46
5.3. Silenciamiento de REST en líneas LNCaP.	49
5.4. Evaluación de genes reguladores de la transición epitelio mesénquima en células LNCaP con silenciamiento de REST.	56
5.5. Evaluación de receptor de andrógeno (AR), variante 7 (Arv7) y antígeno prostático específico (PSA) en células LNCaP con silenciamiento de REST.	60
5.6. Sobreexpresión de REST en líneas 22rv1	62
5.7. Evaluación de genes reguladores de la transición epitelio mesénquima en células 22rv1 con sobreexpresión de REST	65
5.8. Evaluación de AR, ARv7 y PSA en células 22rv1 con sobreexpresión de REST.	71

5.9. Evaluación de la proliferación, migración e invasión en células 22rv1 con sobreexpresión de REST	73
5.10. Evaluación de la viabilidad celular de las líneas <i>scramble</i> y silenciadas para REST frente a la incubación de dihidrotestosterona (DHT), enzalutamida (ENZ) y DHT + ENZ.	79
5.11. Evaluación de la viabilidad celular de las líneas <i>null</i> y sobreexpresadas para REST frente a la incubación de dihidrotestosterona (DHT), enzalutamida (ENZ) y DHT + ENZ.	82
6. Discusión	85
6.1. Expresión de REST en líneas celulares y muestras de pacientes con CaP.	
6.2. Evaluación de los genes inductores de la TEM y marcadores de epitelio-mesénquima.	88
6.3. Evaluación de AR, ARv7 y KLK3 en células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de REST, y evaluación de la viabilidad a enzalutamida.	96
6.4. Sobreexpresión de REST disminuye la proliferación, la migración e invasión en células 22rv1	99
7. Proyecciones de nuestro estudio	102
8. Modelo propuesto del efecto de REST en células de CaP sensibles a andrógenos	104
9. Conclusiones	105
10. Anexos	106
10.1. Evaluación de los niveles proteicos con control de carga RNA polimerasa II	
10.2. Evaluación de KLF4 en líneas celulares 22rv1 con sobreexpresión de REST	108
11. Referencias	109

Lista de abreviaturas

AA: acetato de abiraterona
ADT: terapia de privación androgénica
AR: receptor de andrógenos
ARv7: variante 7 del receptor de andrógenos
CaP: cáncer de próstata
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario
CRPC: cáncer de próstata resistente a la castración
CSC: <i>cancer stem cell</i> (células troncales cancerosas)
DEP: condición deprivada de andrógenos
DIC: microscopía de contraste de interferencia diferencial
ENZ: enzalutamida
FT: factor de transcripción
GFP: proteína fluorescente verde
HA: hemaglutinina
MMP: metaloproteinasas de la matriz
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NE: neuroendocrino
NEPC: cáncer de próstata neuroendocrino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PSA: antígeno prostático específico
RFP: proteína fluorescente roja
SYP: sinaptofisina

Lista de figuras

Nombre de figura	Página
Figura 1. Mecanismo de represión de REST en respuesta a la unión a sitios RE-1 en el genoma.	21
Figura 2. Esquema representativo de los lentivirales de silenciamiento y sobreexpresión de REST	32
Figura 3. Expresión de REST en líneas celulares de CaP.	43
Figura 4. Localización de REST en líneas celulares de cáncer de próstata.	44
Figura 5. Identificación de REST en cultivos 3D derivados de cultivos celulares primarios de cáncer de próstata.	45
Figura 6. Identificación de REST en muestras de pacientes con CaP.	47
Figura 7. Patrones de inmunotinción cromogénica de REST en muestras de pacientes con CaP.	48
Figura 8. Expresión de REST en líneas celulares LNCaP con silenciamiento de REST.	50
Figura 9. Resultados de Ensayo FACs de células scramble y con silenciamiento de REST.	52
Figura 10. Microscopía de fluorescencia y DIC de las células scr y shREST seleccionadas mediante FACs.	53
Figura 11. Morfología de las células LNCaP scr y shREST en microscopio de luz invertido.	54
Figura 12. Expresión de sinaptofisina en líneas celulares LNCaP con silenciamiento de REST.	55
Figura 13. Expresión de factores transcripcionales inductores de la TEM en líneas LNCaP con silenciamiento para REST.	56
Figura 14. Expresión de E-cadherina (CDH1) y vimentina (VIM) en líneas con silenciamiento de REST.	59
Figura 15. Expresión del AR, Arv7 y KLK3 en líneas LNCaP con silenciamiento de REST.	61
Figura 16. Organización de células 22rv1 NULL y 22rv1 REST-HA por microscopía de luz.	63
Figura 17. Expresión de REST en líneas celulares 22rv1 con sobreexpresión de REST.	64
Figura 18. Evaluación de los niveles de transcritos de genes reguladores de la TEM en células 22rv1 NULL y 22rv1 con sobreexpresión de REST.	66
Figura 19. Expresiones proteicas de factores de transcripción reguladores de la TEM en células 22rv1 con sobreexpresión de REST.	68
Figura 20. Expresión de E-cadherina (CDH1) y vimentina (VIM) en células 22rv1 con sobreexpresión de REST.	70
Figura 21. Evaluación de la expresión del AR, ARv7 y KLK en células 22rv1 con sobreexpresión de REST	72
Figura 22. Evaluación de la proliferación de células con sobreexpresión de REST a través de ensayos de MTT.	74
Figura 23. Ensayo de formación de colonias de células con sobreexpresión de REST.	75

Figura 24. Resultados de ensayos de migración de células 22rv1 con sobreexpresión de REST	77
Figura 25. Resultados de ensayos de invasión de células 22rv1 con sobreexpresión de REST.	78
Figura 26. Evaluación de la viabilidad de células LNCaP scr y shREST a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos	80
Figura 27. Comparación de la viabilidad de células LNCaP scr y shREST frente a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos.	81
Figura 28. Evaluación de la viabilidad de células 22rv1 NULL y REST-HA a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos.	83
Figura 29. Comparación de la viabilidad de células 22rv1 NULL y REST-HA frente a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos.	83
Figura 30. Comparación de la viabilidad de células 22rv1 NULL DEP y REST-HA DEP frente a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos.	84
Figura 31. Genes reguladores de la TEM contienen elementos de unión a REST, y REST presenta elementos de unión para reguladores de la TEM.	90
Figura 32. Efecto de REST en líneas celulares de CaP.	104
Figura 33. Evaluación de niveles de proteínas de interés en fracciones nucleares de células con silenciamiento y sobreexpresión de REST utilizando RNA polimerasa II como control de carga.	106
Figura 34. Evaluación KLF4 en células 22rv1 con sobreexpresión de REST.	108

Resumen

Introducción

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más frecuente a nivel mundial y representa la quinta causa de muerte por cáncer en hombres. Los pacientes que son diagnosticados con un CaP avanzado son tratados con terapia de deprivación androgénica (ADT), los cuales, luego de 18 a 24 meses, se hacen resistentes al tratamiento, alcanzando un estadio denominado cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). El fenómeno de resistencia puede ser generado por diversos mecanismos, entre los cuales se encuentran los dependientes e independientes del receptor de andrógeno (AR). Entre los independientes, se encuentra el desarrollo del fenotipo neuroendocrino (NEPC), entidad originada posiblemente por un proceso de transdiferenciación que ocurre en las células que componen el CRPC, y que está relacionada con el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM). REST es un factor represor de las características celulares neurales, y se encuentra disminuido en NEPC. Recientemente se ha establecido una correlación negativa de REST con factores de la TEM. En base a los antecedentes descritos, proponemos que REST puede reprimir el proceso de TEM, disminuir el fenotipo maligno de este cáncer y aumentar su sensibilidad a enzalutamida.

Materiales y métodos

Evaluamos la expresión de REST en muestras de tumores y líneas celulares de CaP. Para evaluar los efectos que produce REST en las células de CaP desarrollamos un modelo *in vitro* de silenciamiento y sobreexpresión de REST en líneas LNCaP y 22rv1, respectivamente. En estas líneas determinamos la expresión de los factores de

transcripción de la TEM, como Snail, Slug, Twist y ZEB1, y marcadores de epitelio y mesénquima, como E-cadherina y vimentina, respectivamente. Adicionalmente, determinamos la expresión de AR, ARv7 y KLK3. Para evaluar los efectos de REST en el fenotipo maligno, analizamos las capacidades funcionales de las células con ensayos de migración, invasión y proliferación. La respuesta a tratamiento fue analizada mediante ensayos de viabilidad de células expuestas a enzalutamida.

Resultados

REST mostró una localización preferentemente nuclear, aunque también estuvo presente en el citoplasma de muestras de pacientes y en cultivos primarios 3D. En nuestros modelos celulares con silenciamiento de REST, se observó un aumento de Twist, vimentina y sinaptofisina, y una disminución en AR y KLK3. Por otro lado, la sobreexpresión de REST disminuye Twist, ZEB1 nuclear y vimentina. Funcionalmente, la sobreexpresión de REST en células 22rv1 disminuye la proliferación, migración, invasión y viabilidad a enzalutamida. Sorpresivamente, Snail disminuyó su expresión en líneas con silenciamiento de REST y la aumenta en células con sobreexpresión.

Conclusión

Nuestros resultados indican que REST disminuye características de agresividad tumoral, y esto se relaciona con la disminución parcial de factores de la TEM.

Summary

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer worldwide and represents the fifth leading cause of cancer death in men. Patients who are diagnosed with advanced PCa are treated with androgen deprivation therapy (ADT), which, after 18 to 24 months, become resistant to treatment, reaching a stage called castration-resistant prostate cancer (CRPC). The phenomenon of resistance can be generated by various mechanisms, among which are those dependent and independent of the androgen receptor (AR). Among the independent ones, there is the development of the neuroendocrine phenotype (NEPC), an entity possibly originated by a transdifferentiation process that occurs in the cells of the CRPC, and which is related to the epithelial-mesenchymal transition process (TEM). REST is a repressor factor of neural cell characteristics, and it is decreased in NEPC. A negative correlation of REST with TEM factors has recently been established. Based on the described background, we propose that REST may repress the TEM process, decrease the malignant phenotype of this cancer, and increase its sensitivity to enzalutamide.

Materials and methods

We evaluated REST expression in PCa cell lines and tumor samples. To evaluate the effects that REST produces in CaP cells, we developed an in vitro model of REST silencing and overexpression in LNCaP and 22rv1 lines, respectively. In these lines we determined the expression of TEM transcription factors, such as Snail, Slug, Twist and ZEB1, and epithelial and mesenchymal markers, such as E-cadherin and vimentin. Additionally, we determined the expression of AR, ARv7 and KLK3. To assess the effects

of REST on the malignant phenotype, we analyzed the functional capabilities of the cells with migration, invasion, and proliferation assays. The response to treatment was analyzed by viability assays of cells exposed to enzalutamide.

Results

REST showed a preferentially nuclear localization, although it was also present in the cytoplasm of patient samples and in 3D primary cultures. In our cell models with REST knockdown, we observed an increase in Twist, vimentin, and synaptophysin, and a decrease in AR and KLK3. On the other hand, overexpression decreases Twist, nuclear ZEB1 and vimentin. Functionally, REST overexpression in 22rv1 cells decreases proliferation, migration, invasion, and viability to enzalutamide. Surprisingly, Snail decreased its expression in lines with REST silencing and increased it in cells with overexpression.

Conclusion

Our results indicate that REST decreases characteristics of tumor aggressiveness, and this is related to the partial decrease of TEM factors.

1. Introducción

1.1. Cáncer de próstata.

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más común en el mundo y representa la quinta causa de muerte en hombres. Según datos de GLOBOCAN, 1.4 millones de personas fueron diagnosticados con CaP en el año 2020, y se produjeron 375.000 muertes a causa de él. Se describe que las áreas geográficas más afectadas son países de América Central y del Sur, Europa del Norte y Oeste, Australia/Nueva Zelanda y países de África Subsahariana¹.

La región más afectada de nuestro país en el año 2012 fue Aisén, seguido de Atacama y O'Higgins en el segundo y tercer lugar, respectivamente². Según datos de *Cancer Today* de la *International Agency for Research of Cancer* (IARC), el CaP se llevó el primer lugar en incidencia y mortalidad en hombres en nuestro país en el año 2020³.

Dentro de los principales factores de riesgo asociados a la aparición de la enfermedad se encuentran la edad avanzada, ser individuo de raza negra, historia familiar de esta enfermedad y factores genéticos. Otros aspectos implicados son la dieta, obesidad, inflamación, hiperglicemia, entre otros⁴⁻⁶.

A pesar de las estrategias de *screening* para la detección temprana de este cáncer, como lo es la medición de los niveles de PSA en sangre y el tacto rectal^{6,7}, un 20% de los pacientes se presentan con una enfermedad avanzada o metastásica al momento del diagnóstico, en los cuales el tratamiento de primera línea es la deprivación androgénica (ADT, por sus siglas en inglés). Estos pacientes progresarán a una fase de peor pronóstico, denominado cáncer de próstata resistente a la castración

(CRPC, por sus siglas en inglés)^{7,8} en un periodo que va de 18-24 meses después del inicio del tratamiento con ADT.

1.2. Cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) y fenotipo neuroendocrino (NEPC).

El CRPC se define como la progresión de la enfermedad a pesar de la castración médica o quirúrgica. En estas condiciones, el eje androgénico continúa teniendo una gran importancia en la función y el crecimiento de este cáncer. Para diagnosticar la resistencia a la castración se deben cumplir dos criterios: 1) el nivel de testosterona sérica de un paciente castrado debe ser menor a 1.7 nmoles por litro, y 2) demostrar progresión bioquímica. Este último punto es entendido como el aumento al doble de los niveles de PSA (antígeno prostático específico) en el transcurso de una semana o más de tres mediciones con el valor más bajo con un incremento mayor al 50% y mayor a 2g/l⁹.

El entendimiento del desarrollo de un cáncer sensible a andrógenos a uno resistente a la castración es clave para la generación de terapias para combatir esta enfermedad. Entre los mecanismos descritos que originan el CRPC se destaca la amplificación del receptor de andrógeno (AR), generación de variantes de *splicing*, su promiscuidad a señales no androgénicas, esteroideogénesis alterada, entre otros⁸⁻¹⁰.

Un mecanismo interesante de independencia androgénica es la generación del cáncer de próstata neuroendocrino (NEPC, por sus siglas en inglés), el cual se caracteriza por la presentación de marcadores canónicos, como lo son cromogranina A (CgA) y sinaptofisina (SYP). El NEPC ha sido propuesto como el resultado del proceso

de transdiferenciación que sucede en las células tumorales que conforman el CRPC^{11,12}.

Si bien algunos NEPC se originan desde las células neuroendocrinas que normalmente residen en el epitelio prostático, este acontecimiento es extremadamente raro, a diferencia de lo que se ha observado en CRPC, en donde la presencia del NEPC es altamente prevalente (40-100%)¹³⁻¹⁵. Además, se observa que este fenotipo se hace más recurrente en pacientes tratados con inhibidores de la vía del AR de primera y segunda línea, de modo que cuando los pacientes son tratados con ADT, se aplica una cierta presión negativa para que se perpetúe el cáncer con las células que pueden sobrevivir a esta terapia, las cuales corresponden a células AR negativo y marcadores neuroendocrinos positivos¹⁶⁻¹⁷.

1.3. Deprivación androgénica y variantes del receptor de andrógenos (AR).

El AR es un factor de transcripción dependiente de ligando que controla la expresión de genes específicos. La unión del AR a su ligando (como testosterona y dihidrotestosterona) inicia el desarrollo sexual y diferenciación¹⁸.

El gen AR se localiza en el cromosoma X en el locus Xq11-Xq12 y codifica para una proteína de 110 kDa, compuesta por 919 aminoácidos. La proteína presenta 3 dominios principales: un dominio N terminal (NTD), un dominio de unión al DNA (DBD) y un dominio C terminal de unión a ligando, el cual está conectado a DBD por una región denominada bisagra¹⁸. Para efectos de esta investigación, el AR que presenta todos sus dominios se denominará AR longitud completa (AR-FL, del inglés *full length*).

A diferencia del AR-FL, las variantes de *splicing* del AR carecen del dominio de unión a ligando, por lo que cuando se expresan, funcionan de manera constitutiva¹⁹.

Entre las variantes de *splicing* más frecuentes encontradas en muestras de CRPC son: AR-V7, AR-V567es, AR-V3 y AR-V9¹⁸. En modelos pre clínicos, la expresión de AR-V567es y AR-V7 aumentan después de la castración y confieren resistencia primaria y adquirida a acetato de abiraterona (AA) y enzalutamida (ENZ)²⁰.

Antonarakis y colaboradores, identificaron que pacientes AR-V7 positivos mostraron resistencia a tratamientos con ENZ y AA, pero mantienen una sensibilidad a tratamiento con taxanos (como docetaxel y cabazitaxel), no así los pacientes en donde no se detecta la variante 7²¹. Estos autores incluso proponen a AR-V7 como un biomarcador de tratamiento en pacientes CRPC²².

Por otro lado, en experimentos desarrollados a partir de muestras de CRPC metastásico se observaron altos niveles de AR-V3, AR-V7 y AR-V9 comparado con muestras de pacientes con CaP sin ADT²³. Ninguna de las variantes estudiadas se correlacionó con la expresión de genes regulados por andrógenos ni por AR, como lo es KLK3 (gen que codifica para PSA).

En el año 2018 Park y cols., observaron que la variante AR-V7 fue la más frecuente en cohorte coreana de pacientes con CRPC²⁴; y Hörnberg y cols., también observaron un aumento de AR-V567es y AR-V7 en pacientes con CRPC metastásicos a nivel de mRNA y proteína²⁵.

Los estudios sobre las variantes de *splicing* de AR en CaP solo se ha enmarcado en muestras de pacientes con PCa y CRPC, pero no en NEPC, el cual ha sido caracterizado por ausencia de AR, presencia de marcadores como CgA y SYP, y disminución del factor maestro REST.

1.4. REST y su papel en cáncer.

El factor de transcripción de silenciamiento RE-1 (REST) es un factor que se encuentra en la posición 4q12 del genoma y que tiene como función reprimir el fenotipo neural en tejidos no neurales²⁶. REST es una proteína del tipo *zinc finger* que posee dos dominios represores, uno de 83 aminoácidos cercano al N-terminal y otro de 56 aminoácidos cercano al C-terminal. Uno de sus dominios corresponde al de interacción con DNA que comprende la unión de REST a una secuencia específica de 21 pares de bases denominada RE1. A la fecha se han descrito dos tipos de RE1: la canónica y la no-canónica. La primera se destaca por estar dividida en dos partes, separadas por pocas pares de bases que sirven como espaciadoras, mientras que la segunda se caracteriza por poseer variaciones en la longitud de esta secuencia nucleotídica espaciadora²⁷. Se ha identificado que la función represora de REST es efectiva independientemente si su unión al genoma es lejana al sitio de inicio de la transcripción o se encuentra en una orientación diferente al del promotor del gen a reprimir²⁶.

El mecanismo de silenciamiento génico que utiliza REST consiste en el reclutamiento de histonas desacetilasas, metiltransferasas e demetilasas a sus genes blancos mediante sus dos dominios de represión (Figura 1). La composición de proteínas reclutadas a los sitios de silenciamiento varía según tipo celular y estado de diferenciación^{27,28}.

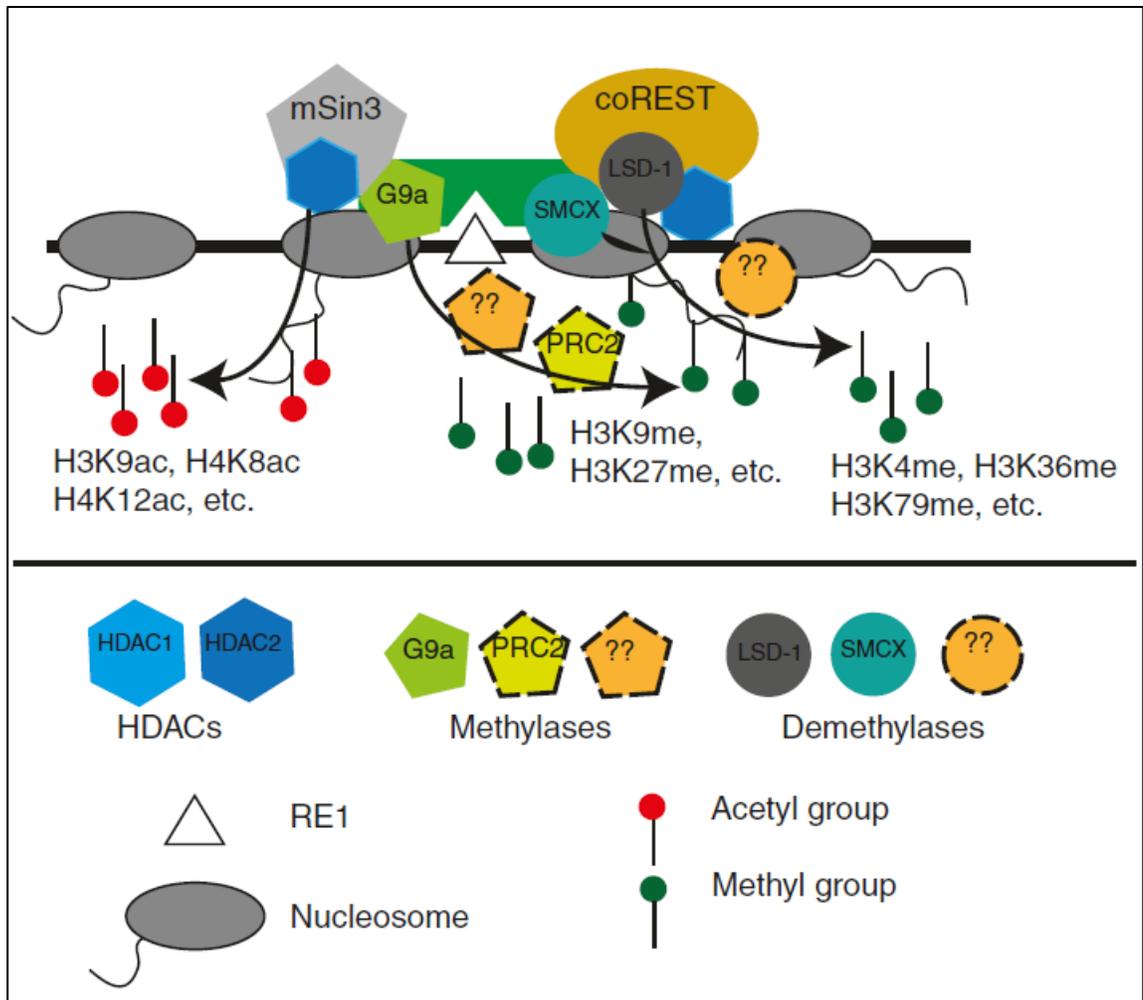


Figura 1. Mecanismo de represión de REST en respuesta a la unión a sitios RE-1 en el genoma. REST posee dos dominios de represión, uno en hacia el N-terminal y otroa hacia el C-terminal. Una vez que REST se une a las secuencias RE-1, al sitio N-terminal se recluta a la proteína mSin3, la que a su vez recluta a las histonas desacetilasas 1 y 2 (HDAC1 y HDAC2). Estas últimas son capaces de eliminar grupos acetilos de las histonas, estimulando la compactación de la cromatina e impidiendo así la unión de otros factores de transcripción (FT). Por otro lado, al dominio C-terminal puede unirse el factor CoREST, el que a su vez recluta histonas desacetilasas, histonas metiltransferasas (G9a, PRC2) e histonas demetilases (LSD1, SMCX), entre otras proteínas. Imagen extraída de Zheng et al., 2009²⁹.

La expresión de este factor represor puede ser regulado a nivel de transcrito y a nivel proteico. A nivel de transcrito puede ser sometido a *splicing* alternativo a través de la acción de SRRM4, que alarga la secuencia en 62 pb de mRNA y codifica para una proteína denominada REST4, inactivo. SRRM4 también puede ser regulado por REST^{30,31}. SRRM4 posee una alta expresión en metástasis de CaP, en conjunto con un aumento de REST4, por lo que se relaciona con el aumento de marcadores neuroendocrino y el desarrollo de este fenotipo³¹⁻³³. A nivel proteico es regulado por ubiquitinización por β -TRCP y desubiquitinación, por HAUSP³⁴⁻³⁵. β -TRCP ejerce su acción de ubiquitinización en señal a una fosforilación previa, aumentando la vida media de la proteína. En contraparte a la acción de β -TRCP, HAUSP disminuye las ubiquitinización de la proteína REST, aumentando su estabilidad³⁵. Adicionalmente, se han descrito algunos inhibidores farmacológicos de REST, entre los cuales se encuentra X5050, el cual provoca una disminución proteica de REST con el consecutivo aumento de marcadores neuroendocrinos³⁶.

REST ha sido implicado en una serie de patologías, como trastornos psiquiátricos, de neurodesarrollo y en cáncer³⁷. En este último contexto, REST tiene un rol de oncogén en tejidos neurales, y uno de supresor de tumores en tejidos no neurales³⁸. En líneas comerciales y muestras humanas de meduloblastoma se ha observado un alto nivel de expresión de REST, disminuyendo incluso la sobrevida total y la sobrevida libre de enfermedad^{39,40}. Un fenómeno similar ocurre en glioblastoma multiforme, encontrándose niveles de expresión elevados de REST en células y muestras humanas⁴¹. Por otro lado, en cánceres de origen epitelial, tales como mama, colon, pulmón

y próstata, se ha evidenciado una disminución de REST, relacionándose con un fenotipo tumoral agresivo, aumento del tamaño tumoral, y metástasis⁴²⁻⁴⁶.

En el caso del CaP, en el año 2012, se identificó a REST dentro de los genes que presentaban una baja expresión en muestras que tenían una morfología neuroendocrina. Estos hallazgos se hicieron a través de la caracterización genómica de un paciente diagnosticado con NEPC y confirmados en células LNCaP, las que fueron transfectadas con un siRNA contra REST, lo que provocó un concomitante aumento de marcadores neuroendocrinos, como SYP⁴⁶.

Tal como se dijo anteriormente, REST ha sido relacionado con diversos procesos celulares implicados en la progresión del cáncer, y en el caso del CaP, se ha asociado directamente con el proceso de transición epitelio mesénquima (TEM) y el fenotipo *cancer stem cell* (CSC, por sus siglas en inglés).

1.5. REST, cáncer de próstata y el proceso de transición epitelio mesénquima.

El proceso de TEM juega un rol fundamental en el desarrollo normal de la glándula prostática en el periodo embrionario y la regeneración tisular durante el cierre de heridas, pero también es relevante en los procesos de progresión tumoral y desarrollo de fenotipos resistentes a terapias^{47,48}. Los factores que orquestan este proceso tienen como función reprimir moléculas participantes en la interacción célula-célula, como E-cadherina, y estimulan la expresión del fenotipo mesenquimal, como lo son vimentina y N-cadherina. Dentro de los factores más relevantes de la TEM, se encuentran ZEB1, factor relacionado a procesos de resistencia a andrógenos y quimioterapéuticos en modelos celulares de CaP; Snail, Slug y Twist, como factores que reprimen la transcripción de E-cadherina causando una elevación de proteínas mesenquimales^{49,50}.

En el año 2016, Paranjape y colaboradores identificaron a FOXC2 como un factor clave en la inducción de fenotipo agresivo en cáncer de mama, por lo que determinaron el efecto de este factor los procesos de TEM y CSC, esta vez, en CaP. El incremento de este factor produjo un aumento en la expresión de genes inductores de la TEM y marcadores mesenquimáticos; y estos cambios estuvieron acompañados con el incremento de marcadores neuroendocrinos como CgA y SYP⁵¹, sin embargo, no hubo evaluaciones de REST y sus factores reguladores en este estudio.

Por otro lado, el aumento de Snail en células LNCaP y el aumento de Slug en células PC3 estimulan la aparición del fenotipo neuroendocrino, comprobado por el aumento de los niveles proteicos de cromogranina A y sinaptofisina^{52,53}. En ambos estudios no hubo una evaluación de REST.

En el año 2017, se propuso a REST como un factor participante en los procesos de TEM y del fenotipo CSC, lo que permitió establecer un primer acercamiento de REST al fenómeno de transdiferenciación neuroendocrina a través de ambos fenómenos⁵⁴.

Hasta el momento ninguna investigación ha evaluado los efectos que tiene el silenciamiento y/o sobreexpresión de REST en el perfil de expresión de los cuatro genes canónicos reguladores de la TEM, ni de marcadores de epitelio y mesénquima.

1.6. Tratamientos disponibles para cáncer de próstata.

El CaP depende del AR para su progresión, por lo que la terapia estándar para esta enfermedad es la ADT, la cual consiste en la castración quirúrgica, administración de agonistas del factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH), con o sin tratamiento anti-androgénico y/o antagonistas de LHRH. El objetivo de esta terapia, por

tanto, es disminuir los niveles de andrógenos sanguíneos. Junto con esta terapia, en las últimas décadas se han aceptado algunas otras, como lo son la quimioterapia, representados por docetaxel y cabazitaxel; tratamientos hormonales, como acetato de abiraterona y enzalutamida; inmunoterapia, como sipuleucel-T; y radioterapia, como radio-223. Se ha descrito que la ADT y tratamientos con enzalutamida favorecen la aparición del fenotipo neuroendocrino, reprimiendo la vía de dependencia androgénica para la progresión del CRPC, por lo tanto, favorece el fenómeno de plasticidad y transdiferenciación de las células neoplásicas⁵⁵⁻⁵⁷.

Bajo los antecedentes previamente expuestos, se propone evaluar el rol de REST en líneas celulares de CaP, de modo de estudiar los efectos que tiene su silenciamiento y sobreexpresión en la activación del proceso de TEM y el fenotipo maligno, a través de la evaluación de la proliferación, migración e invasión.

2. Hipótesis

La expresión de REST reprime el proceso de transición epitelio mesénquima y el fenotipo maligno en células de cáncer de próstata en privación androgénica y tratamiento con enzalutamida.

3. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto represor de REST sobre la transición epitelio mesénquima y el fenotipo maligno en células de cáncer de próstata, y sensibilidad y resistencia a enzalutamida en condiciones de privación androgénica.

Objetivos Específicos

- 1) Evaluar los niveles de expresión y localización subcelular de REST en biopsias de pacientes con CaP y líneas celulares comerciales.
- 2) Evaluar los niveles de expresión y localización de marcadores de TEM y androgénicos en líneas celulares con silenciamiento y sobreexpresión de REST con y sin privación androgénica.
- 3) Evaluar las características migración e invasión de células con silenciamiento y sobreexpresión de REST, tumorigenicidad *in vitro* con ensayos de clonogenicidad.
- 4) Evaluar la sensibilidad y resistencia a la privación androgénica y a la respuesta a tratamiento con enzalutamida en líneas celulares con sobreexpresión y silenciamiento de REST.

4. Materiales y métodos

4.1. Microarreglos de tejido (*Tissue Micro Array*, TMA)

Se obtuvieron muestras de tejido de cáncer de próstata desde el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Estas muestras fueron fijadas en formalina al 10% v/v tamporada e incluidas en parafina, para luego ser evaluadas por un patólogo, quien las clasificó según su grado Gleason. De acuerdo con ello, las muestras que presentaron un puntaje Gleason (PG) de 6 fueron clasificadas como PG bajo, mientras que las que presentaron una puntuación de 7 se clasificaron como PG intermedio, y las con puntuación de 8 a 10 como PG alto. A partir de los bloques de inclusión, y con ayuda de la tinción con hematoxilina y eosina correspondiente, se procedió a extraer un sacabocados de 1 mm de diámetro de cada muestra para construir el TMA. Dicho TMA contuvo 51 muestras de pacientes totales.

4.2. Inmunohistoquímica cromogénica (IHQ)

Los cortes obtenidos desde el TMA fueron adheridos en portaobjetos silanizados y mantenidos a 4° C hasta el momento de realizar la identificación de REST. Las muestras fueron desparafinadas en xileno e hidratadas en etanol en una batería de graduación descendente hasta agua destilada. Se realizó una recuperación antigénica en buffer Tris-EDTA pH 8.0 en vaporera a 92° C por 20 minutos. Luego los cortes fueron lavados brevemente en agua destilada e incubados con solución de bloqueo (BSA) al por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la incubación con anticuerpo anti-REST humano (dilución 1:100), preparado en solución de bloqueo toda la noche a 4° C. Posteriormente se realizaron lavados con PBS 1X y se incubó con anticuerpo secundario universal, seguido por la incubación con el complejo ABC (R.T.U. Vectastain

Universal ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). El revelado de la señal específica fue realizado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB; DAKO North America Inc, Carpinteria, California, USA) y el contraste nuclear fue hecho con hematoxilina de Mayer (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA). En una primera instancia, una vez teñidos los cortes con DAB, las placas fueron deshidratadas con etanol, aclaradas con xileno y montadas con Entellán. Se obtuvieron las imágenes digitales con un microscopio Leica DM2500 (Leica, Wetzlar, Alemania). Luego de capturar las imágenes con DAB, se pusieron las placas en xileno para desmontar el cubreobjeto de la lámina, hidratarlas en una batería descendente de etanoles hasta el agua destilada y posteriormente contrastarlas con hematoxilina de Mayer. Posterior a la tinción, se deshidrataron, aclararon y montaron nuevamente. Se capturaron nuevas imágenes de las mismas regiones obtenidas únicamente con DAB. Las imágenes fueron procesadas con ayuda del software ImageJ 1.51w (NIH, Bethesda, MD, EEUU), utilizando el complemento *IHC toolbox*.

4.3. Cultivos celulares 2D

Las líneas de cáncer de próstata fueron obtenidas desde AddexBio Technologies (San Diego, California, USA). Las células LNCaP clon FGC y 22rv1 se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), más 2.5 gr/L de D-glucosa y 0.11 gr/L de piruvato de sodio, según recomendación del fabricante. Las células DU145 y PC3 se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) F12 (GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, California, USA). Ambos medios fueron suplementados con suero fetal bovino al 10% v/v (SFB; Mediatech, Manassas, VA, USA), y antibióticos estreptomycin-penicilina

(Corning Inc., Corning, NY, USA). Los cultivos fueron mantenidos a 37° C, en un ambiente húmedo con 5% de CO₂.

Para el crecimiento de células en condiciones libres de andrógeno, se realizó una suplementación de medio base RPMI 1640 sin rojo fenol (GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) con 2.5 gr/L de D-glucosa, 0.11 gr/L de piruvato de sodio y 10% v/v de suero fetal bovino tratado con carbón activado.

Una vez que los cultivos alcanzaron un 70% de confluencia con medio RPMI con rojo fenol, se lavaron dos veces con PBS 1X y se agregó el medio RPMI sin rojo fenol con suero deprivado. Se mantienen de esta forma el tiempo necesario para realizar los distintos experimentos comprometidos en esta tesis.

4.4. Cultivos celulares 3D

Debido a que se han mostrado claras ventajas de los cultivos celulares 3D por sobre cultivos en 2D a nivel estructural y funcional⁵⁸ se realizó la identificación de REST en cultivos primarios de CaP crecidos en condiciones apropiadas para generar cultivos 3D. Los cultivos primarios fueron cultivados sobre extractos de lámina basal extraídos desde sarcoma de ratón *Engelbreth-Holm-Swarm*, también conocido como Matrigel, libre de rojo fenol (BD Discovery Labware, Inc, Bedford, Massachusetts, USA). En portaobjetos estériles de 8 pocillos (Lab-Tek) se distribuyeron 7 µL de Matrigel al 10 mg/mL preparado en DMEM-F12 y se dejó gelificar por 45 minutos a 37° C. Luego, a cada pocillo se le agregó medio de cultivo DMEM-F12, estreptomina-penicilina, 10% de SFB, 7000 células y 0.3 mg/mL de Matrigel. Los cultivos fueron dejados en la incubadora por 6 días, hasta que alcanzaran una forma esférica con un espacio central.

4.5. Inmunofluorescencia

- Cultivos 2D

Las células fueron sembradas en cubreobjetos de 12 mm a una confluencia del 50% en placas de 24 pocillos. Después de 72 horas, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% p/v en tampón fosfato de sodio pH 7.1 por 30 minutos. Una vez realizada la fijación, los cubreobjetos fueron lavados con PBS 1X y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% v/v (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) durante 10 minutos. Luego se lavaron y se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con BSA al 3% p/v en PBS-glicina durante 30 minutos. Posteriormente, las células fueron incubadas durante toda la noche a 4° C con anticuerpo anti-REST (Abcam [ab21635], Cambridge, United Kingdom). Luego de lavar con PBS, se realizó la incubación con anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos durante 1 hora a 37° C. La tinción nuclear fue realizada con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; dilución 1:10000, sc 3598, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). Las imágenes digitales fueron obtenidas con un microscopio Leica DM2500 (Leica, Wetzlar, Alemania), y procesadas con el software ImageJ 1.51w (NIH, Bethesda, MD, USA).

- Cultivos 3D

Los cultivos 3D sembrados en portaobjetos estériles fueron fijados con paraformaldehído al 4% p/v por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron y se realizó la permeabilización con Triton X-100 al 1% v/v durante 10 minutos y posteriormente se lavaron con glicina 100 mM. El bloqueo de las interacciones inespecíficas fue hecho con BSA al 30% p/v en PBS-glicina y la incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4° C. Después de lavar con PBS 1X, se hizo la

incubación con anticuerpos secundarios Alexa Fluor 546 (tabla 2), durante 1 hora a temperatura ambiente. La contratinción nuclear se realizó con DAPI. Las preparaciones fueron fotografiadas con un microscopio confocal C2+, Nikon Instruments y las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ 1.51w (NIH, Bethesda, MD, USA).

4.6. Transducción lentiviral

Las células LNCaP fueron utilizadas para generar el silenciamiento de REST. Este procedimiento fue realizado con vectores lentivirales que contienen un RNA de horquilla corta (shRNA) contra REST (pLenti-U6-shRNA[hREST]-Rsv[GFP-Puro]), o un shRNA *scramble* como control (pLenti-U6-shRNA[control negativo]-Rsv[GFP-Puro]). Para la sobreexpresión de REST, las células fueron transducidas con un lentivirus que contuvo una secuencia REST acoplada a una etiqueta de hamaglutinina (HA) en su extremo C-terminal (pLenti-U6-suCMV[hREST-HA]-Rsv[RFP-Puro]) o el vector vacío como control (pLenti-suCMV[control nulo]-Rsv[RFP-Puro]) (Figura 2). Los lentivirales fueron obtenidos desde GenTarget Inc. (San Diego, California, USA), y las células fueron infectadas siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se esperó a que las células alcanzaran un 80% de confluencia y se le agregó 50 μ L de partículas lentivirales del vector de silenciamiento en una placa de 24 pocillos, con 5 μ g/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Después de 72 horas, se les retiró el medio de cultivo con los lentivirales, se lavaron con PBS 1X y fueron incubadas con puromicina (InvivoGen, San Diego, California, USA) en una concentración de 2 μ g/mL en medio de cultivo. La selección con puromicina fue realizada durante 24 horas. En el caso de

la sobreexpresión, se realizó una incubación con los lentivirales con un factor de multiplicidad viral de 3 (moi 3), por 72 horas. Transcurrido el tiempo, se lavó con PBS 1X y las células transfectadas fueron incubadas con puromicina en una concentración de 2.5 µg/mL por 24 horas. Todas las condiciones fueron posteriormente sometidas a una selección por ensayo de *cell sorting* activado por fluorescencia (FACs).

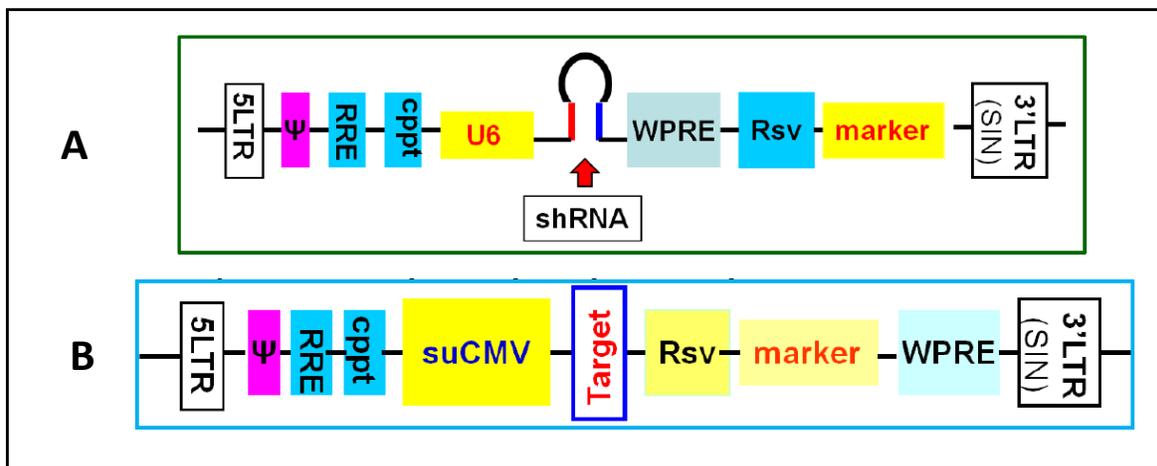


Figura 2. Esquema representativo de los lentivirales de silenciamiento y sobreexpresión de REST. En **A**, se observa el vector de silenciamiento pLenti-U6-shRNA[hREST]-Rsv[GFP-Puro]. **B**, Esquema de vector de sobreexpresión pLenti-suCMV[control nulo]-Rsv[RFP-Puro]. Figura extraída desde cotización N° 1475 realizada por la empresa GeneTarget Inc., San Diego, California, USA. Con fecha 10 de enero de 2022.

4.7. Ensayo de *cell sorting* activado por fluorescencia (FACs)

Con el fin de seleccionar las células que expresaron la proteína fluorescencia verde (GFP, *green fluorescent protein*) o la proteína fluorescente roja (RFP, *red fluorescent protein*), las células LNCaP y 22rv1 transfectadas fueron sometidas a un ensayo FACs.

Para ello, se observaron las células bajo un microscopio de fluorescencia invertido y se obtuvo un porcentaje aproximado de transfección. Las células LNCaP transfectadas tuvieron un aproximado de 80% de transfección para la línea *scramble*, y 30% para la línea shREST, por lo que se ingresaron al citómetro de flujo entre 7-10 millones de células por mL en PBS 1X con suero fetal bovino al 5% v/v y 4 mM de EDTA para evitar la adhesión célula-célula, mientras que las células 22rv1 tenían 40%, por lo que se llevó una concentración de 10 millones de células por mL. El ensayo FACs fue llevado a cabo en las instalaciones de la Facility de REDECA (Red de Equipamiento Avanzado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile) FACs Lab, con un equipo BD FACSARIA III (2350 Qume Dr Bldg 1, San Jose, California, 95131, United States). Para la selección de las células positivas para GFP se utilizó un filtro de FITC, mientras que para las positivas para RFP, un filtro Texas Red. Las células seleccionadas fueron recolectadas en tubos cónicos de 15 mL con suero fetal bovino concentrado. De las LNCaP GFP fueron purificadas entre 800 mil y 900 mil células, mientras que de las 22rv1 se pudieron obtener 5000 mil células. Células sin transfección fueron utilizadas como control negativo de selección, y los gráficos fueron generados mediante el programa FACSDIVA, versión 6.1.3.

4.8. Extracción de RNA y RT-qPCR

El RNA total se obtuvo de los cultivos celulares 2D utilizando TRIzol (Ambion, Life Technologies). El homogenizado de TRIzol fue centrifugado por 15 minutos a 12.500 rpm a 4°C, posteriormente se rescató la fase acuosa y ésta se mezcló con isopropanol concentrado para precipitar el RNA. Posteriormente se realizó una centrifugación a 12.500 rpm por 10 minutos, obteniéndose un *pellet* al fondo del tubo. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se lavó una vez con etanol al 75% preparado con agua DEPC (dietil pirocarbonato). Se centrifugó nuevamente a 9.500 rpm por 5 minutos, se eliminó el nuevo sobrenadante y se dejaron los *pellets* a temperatura ambiente hasta que se secaron. Los *pellets* fueron reconstituidos con agua estéril libre de nucleasas. El RNA fue mantenido a -80° C hasta su utilización.

El RNA fue cuantificado en el equipo Synergy HT (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) a partir de 2 µL de la muestra, por duplicado. La concentración y pureza del RNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm y calculando la razón 260/280. En todos los experimentos se utilizaron muestras que presentaron una razón de 2.0, aproximadamente. A partir del RNA, se sintetizaron 2000 nanogramos (ng) de cDNA utilizando el kit 5X All-In-One RT MasterMix (BC, Vancouver, Canada). 100 ng de cDNA fue amplificado mediante el uso del kit Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Blvd., Santa Clara, California, USA). Para la amplificación se empleó un protocolo (recomendado por el fabricante) con 10 minutos de denaturación inicial a 95° C, y 35 ciclos consecutivos de 15 segundos de denaturación a 95° C, 15 segundos de apareamiento a temperatura óptima de los partidores, 15 segundos a 72° C para la elongación. Para la obtención de la curva de

disociación se realizó un ciclo adicional al final de la reacción de PCR, en donde las muestras se denaturaron durante 10 segundos a 95° C, se hibridaron a 70° C durante 1 segundo y durante 10 minutos se realizó un aumento gradual de la temperatura hasta alcanzar los 95° C.

El gen constitutivo GAPDH fue utilizado como normalizador y los resultados fueron analizados utilizando el método $\Delta\Delta C_t$. Los pares de partidores se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Partidores utilizados para qPCR

<i>Nombre de gen</i>	<i>Partidor sentido</i>	<i>Partidor antisentido</i>
AR	5'-CAGACCCTGAAGAAAGGCTGA-3'	5'-TGGAGGGAGTCAGCAATCAAG-3'
ARv7	5'-GTCCATCTTGTCGTCTTCGGA-3'	5'- GTCAGCCTTTCTTCAGGGTCT-3'
CDH1	5'-GAA CGC ATT GCC ACA TAC AC-3'	5'-ATTCGGGCTTGTTGTCATTC-3'
GAPDH	5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'
KLF4	5'-AGAGTTCCCATCTCAAGGCA-3'	5'-CCCCGTGTGTTTACGGTAGT-3'
KLK3	5'-GTCCTCACAGCTGCCAG-3'	5'-AGCTGTGGCTGCCTGAAAT-3'
REST	5'-TGCCTACTCATTGAGGTGAGA-3'	5'-TCTTGCATGGCGGGTTACTT-3'
SNAI1	5'-TTCCAGCAGCCCTACGACCAG-3'	5'-GCCTTTCCCACTGCCTCATC-3'
SNAI2	5'-CTCCATTCCACGCCAGCTAC-3'	5'-AGCCACTGTGGTCCCTGGAG-3'
SYP	5'-GAAGGTGCTGCAATGGGTCT-3'	5'-GCCTGAAGGGTACTCGAAC-3'
TWIST1	5'-GGAGTCCGCAGTCTTACGAG-3'	5'-TCTGGAGGACCTGGTAGAGG-3'
ZEB1	5'-TTCACAGTGGAGAGAAGCCA-3'	5'-GCCTGGTGATGCTGAAAGAG-3'

4.9. Extracción de proteínas y *western blot*

Para la identificación de las proteínas se realizó un fraccionamiento celular de modo de tener la fracción proteica nuclear y citosólica de forma separada. Para ello, placas de 60 mm con un 80% de confluencia fueron lavadas 2 veces con PBS frío y luego lisadas con el tampón de fraccionamiento citosólico (TFC) (250 mM sucrosa, 20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM de KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT, más inhibidores de proteasa [cOmplete mini, EDTA-free, Roche, Basel, Switzerland]) con ayuda de un raspador de células (*scraper*). Luego de la lisis con el TFC, se traspasó el homogenizado a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se realizó una centrifugación a 700 x g por 5 minutos. El sobrenadante fue recolectado en otro tubo de 1.5 mL y guardado para su posterior procesamiento. El *pellet* resultante fue resuspendido con 400 µL de TFC y centrifugado nuevamente a 700 xg por 10 minutos. El sobrenadante fue desechado y el *pellet* fue resuspendido en el tampón de fraccionamiento nuclear (TFN) (50 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0.5% de deoxicolato de sodio, 0.1% p/v de SDS, más inhibidores de proteasas) obteniéndose así la fracción nuclear. Antes de realizar la cuantificación, la fracción nuclear fue sonicada 2 veces mediante 3 pulsos a una amplitud de 30. El sobrenadante almacenado en pasos anteriores fue centrifugado a 10.000 xg por 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante, el que fue recolectado en un nuevo tubo, obteniéndose de esta manera la fracción citosólica. La cuantificación proteica de ambas fracciones se realizó mediante el método de Bradford (Sigma Aldrich-Merck, Burlington MA, USA). A continuación, se cargaron 10 µg de proteína de cada una de las fracciones, se separaron por electroforesis (SDS-PAGE) a 100 V hasta que el frente alcanzara el borde inferior del gel. La transferencia a membranas de nitrocelulosa se hizo durante 1.5

horas a 400 mA mediante un sistema húmedo y el control de este proceso se realizó con una tinción con Rojo Ponceau (Ponceau S 0.1%, ácido acético glacial 5%). Las membranas se bloquearon con leche libre de grasas al 5% p/v en buffer Tris salino (TBS) con Tween al 0,2% durante 1.5 horas y luego se incubaron durante toda la noche con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Después del lavado, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti-IgG (H+L) de cabra anti ratón o conejo, conjugadas con peroxidasa (HRP) y reveladas con un kit de detección de quimioluminiscencia para HRP (EZ-ECL, Biological Industries, Cromwell, CT, EE. UU.). El revelado y fotografiado de los resultados de la técnica se hizo con un sistema de captura Vilber Lourmat (Fusion FX5-XT 826.WL/Superbright, Vilber). Los anticuerpos que fueron utilizados en este trabajo se encuentran detallados en la Tabla 2, siendo tubulina el control de carga de la fracción citosólica y la histona H3 de la fracción nuclear. Los análisis de semicuantificación de las bandas generadas se realizaron con el programa ImageJ 1.51w (NIH, Bethesda, MD, USA).

Tabla 1: anticuerpos primarios y secundarios utilizados

<i>Anticuerpos Primarios (especie de origen)</i>	<i>Marca</i>	<i>Dilución</i>
AR (conejo)	Abcam (ab9474)	WB: 1/1000
E-cadherina (ratón)	BD Biosciences (610181)	WB: 1/1000
GFP (conejo)	Alicota gentilmente donada por laboratorio del Prof. Dr. Vicente Torres, Facultad de Odontología, Universidad de Chile	
Histona H3 (conejo)	Abcam (ab1791)	WB: 1/10000
KLF4 (conejo)	Abcam (ab215036)	WB: 1/1000
REST (conejo)	Abcam (ab21635)	WB: 1/1000 IF: 1/100
RFP (ratón)	Chromatek (6G6). WB: 1/10000. Alicuota gentilmente donada por Prof. Dr. Oscar Cerda, Facultad de Medicina, Universidad de Chile	
RNA polimerasa II	Santa Cruz Biotechnology (sc-55492)	WB: 1/1000
Sinaptofisina (conejo)	Invitrogen (MA5-14532)	WB: 1/1000
Snail (conejo)	Cell Signaling Tech. (3879)	WB: 1/1000
Tubulina (ratón)	Sigma Aldrich (T0198)	WB: 1/10000
Twist (conejo)	Sigma Aldrich (T6451)	WB: 1/1000
<i>Anticuerpos Secundarios</i>	<i>Marca</i>	<i>Dilución</i>
Alexa Fluor 488 goat anti mouse	Life Technologies (A11001)	IF 2D: 1/200
Alexa Fluor 546 donkey anti rabbit	Life Technologies (A21207)	IF 3D: 1/200
Goat anti mouse HRP	Jackson ImmunoResearch, Inc	WB 1/10000
Goat anti mouse HRP	Jackson ImmunoResearch, Inc	

4.10. Ensayos de clonogenicidad

Para evaluar características asociadas a malignidad celular, se procede con el ensayo de formación de colonias. 2000 células correspondientes a las líneas 22rv1 NULL y 22rv1 REST-HA fueron sembradas en placas de 5 pocillos. Este cultivo fue mantenido durante 15 días, con cambio de medio cada 2. Cada experimento fue realizado por triplicado para cada una de las condiciones celulares evaluadas. Al tener las colonias, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% p/v tamponado a pH 7.1 por 30

minutos a temperatura ambiente. El lavado de la fijación fue realizado con PBS 1X. La tinción de las colonias fue realizada en cristal violeta al 0.2% p/v acuoso por 10 minutos. Una vez teñidas, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente.

4.11. Ensayos de transmigración e invasión

Las células 22rv1 transfectadas con REST-HA fueron sembradas en cámaras Transwell® de 24 pocillos con un tamaño de poro de 8 μm (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA, Cat#CLS3422). Fueron sembradas 5000 células por cada pocillo para el ensayo de transmigración y 7.500 para el de invasión. Para este último ensayo, se adicionó Matrigel (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA, Cat#E1270), el cual se dejó en las placas durante toda la noche a 4° C y posteriormente las placas se dejaron gelificar durante 30 minutos a 37° C antes de la siembra. La invasión de las células en el Matrigel se realizó adicionando 10% de suero fetal bovino en la cámara inferior, que pudo haber estado deprivado o no, dependiendo de la línea celular a evaluar. La migración e invasión se evaluó después de 24 horas en una estufa de cultivo provista de una temperatura de 37° C y con una humedad de 5% de CO₂. Las células que no migraron o invadieron fueron removidas, y las adheridas a la membrana del Transwell® fueron fijadas y coloreadas al mismo tiempo con una solución de cristal violeta al 0.2% p/v, disuelto en metanol al 10% v/v. Las células migratorias e invasoras fueron contadas y expresadas en los gráficos como el promedio del conteo en cada caso. Cada uno de estos experimentos se realizaron en tres oportunidades, de manera independiente.

4.12. Evaluación de la viabilidad a enzalutamida

La viabilidad celular se evaluó utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Para ello, se sincronizaron las células *scramble* y shREST con medio RPMI 1640 sin rojo fenol y sin suero por 24 horas. Posteriormente las células fueron tripsinizadas con tripsina preparada en PBS 1X, y se contaron las células en un contador automático (TC Automated Cell Counter, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, United States). Se sembraron 5000 células en una placa de 96 pocillos para realizar la evaluación de la proliferación y otras placas para evaluar la viabilidad a enzalutamida. Se esperaron 48 horas desde la siembra, y las células fueron incubadas por 30 minutos con enzalutamida (ENZ) en una concentración de 10 mM (grupo ENZ), o con dihidrotestosterona (DHT) al 1nM. Para el grupo de ENZ + DHT, se retiró la enzalutamida luego de 30 minutos, y se agregó DHT 1 nM. Tanto enzalutamida como DHT fueron preparados en dimetilsulfóxido (DMSO). Para el grupo control, se agregó DMSO para una concentración final del 1% v/v. Después de 24, 48 y 72 horas, las células se lavaron con PBS 1X, y se añadió 100 μ L de solución de trabajo de MTT (1 mL MTT [5 mg/mL] en 9 mL de medio RPMI 1640 sin suero) y se incubó durante 3 horas a 37°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, los cristales de formazán se resuspendieron en una solución de DMSO al 20% v/v en isopropanol y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas BioTek Synergy HT (BioTek).

4.13. Consideraciones éticas

La utilización de muestras de archivo de tejido de cáncer de próstata fue aprobada 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. Los cultivos primarios usados en este trabajo fueron generados en el proyecto FONDECYT #1020969 del Dr. Enrique Castellón, el cual cuenta con el consentimiento de los pacientes y la aprobación del comité ético del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

4.14. Análisis estadísticos

El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). En todos los experimentos, los datos fueron representados como la media \pm desviación estándar, de al menos tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para determinar la existencia de diferencias significativas entre las mediciones de grupo control y los grupos experimentales. Para los análisis de MTT se aplicó la prueba de ANOVA de dos vías con una prueba de múltiples comparaciones de Tukey. En todos los casos, $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. El valor de p , el número de experimentos y la prueba estadística utilizada en cada caso en particular de detalla al pie de cada figura.

5. Resultados

OBJETIVO 1:

Evaluar los niveles de expresión y localización subcelular de REST en biopsias de pacientes con CaP, líneas celulares comerciales, y líneas con sobreexpresión y silenciamiento de los genes reguladores de la TEM.

5.1. Expresión de REST en líneas celulares de cáncer de próstata.

Se evaluó la expresión de REST mediante qPCR, de *western blot* e inmunofluorescencia en cuatro líneas celulares de cáncer de próstata comerciales que representan diferentes estadios de la progresión del CaP: 22rv1, células obtenidas desde un tumor primario; LNCaP, obtenidas de una metástasis linfonodal; PC3, obtenidas de metástasis ósea; y DU145, obtenidas de una metástasis cerebral.

En las líneas celulares descritas, las células que presentaron una mayor expresión del transcrito de REST fue DU145, mientras que 22rv1 presentó los menores (**Figura 3A y 3B**).

A nivel proteico, en cambio, las células que presentaron los mayores niveles de REST fue PC3 seguido de LNCaP en las fracciones nucleares, mientras que 22rv1 siguió presentando los menores niveles de este marcador en comparación al resto de las líneas (**Figura 3C y 3D**). En las fracciones citosólicas se observa presencia de REST, pero es muy menor en comparación a la fracción nuclear.

En la inmunofluorescencia se puede observar que REST mayormente presenta un patrón preferentemente nuclear en todas las líneas celulares evaluadas (**Figura 4**). En algunas de ellas también se destaca una ubicación citoplasmática, como en DU145.

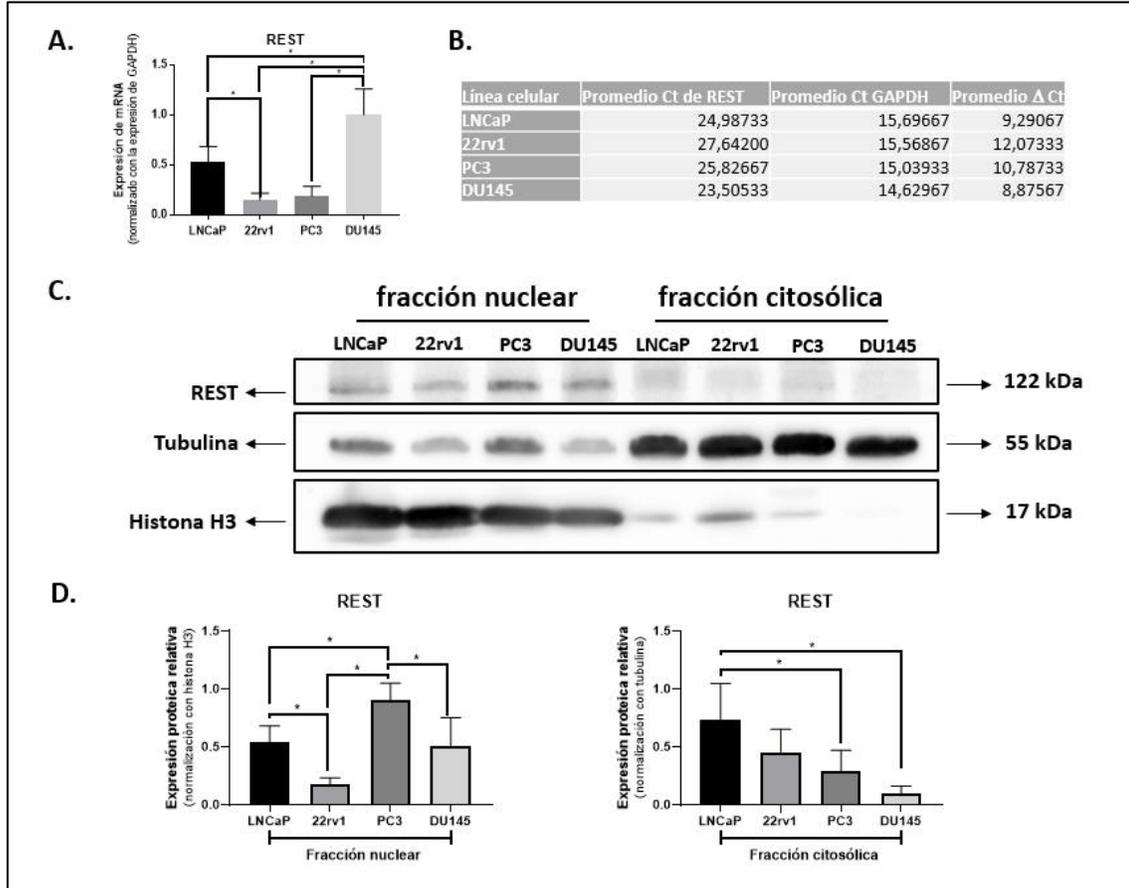


Figura 3. Expresión de REST en líneas celulares de CaP. **A.** RT-qPCR de REST en líneas celulares de CaP. DDCt fue obtenido luego de normalizar con GAPDH y la línea celular DU145. N=4. **B.** Tabla en la que se muestran los valores promedios de Ct de REST y GAPDH en las cuatro líneas celulares. **C.** Imagen representativa de un gel en donde se identificó la proteína REST mediante *western blot* en la fracción nuclear y citosólica. Se utilizó tubulina como control de carga para fracción citosólica e histona H3 para la nuclear. **D.** Cuantificación de resultado de *western blot* de REST de la fracción nuclear (izquierda) y la fracción citosólica (derecha) (N=4). La prueba Kruskal Wallis fue utilizada para comparar el promedio de cada uno de los datos.

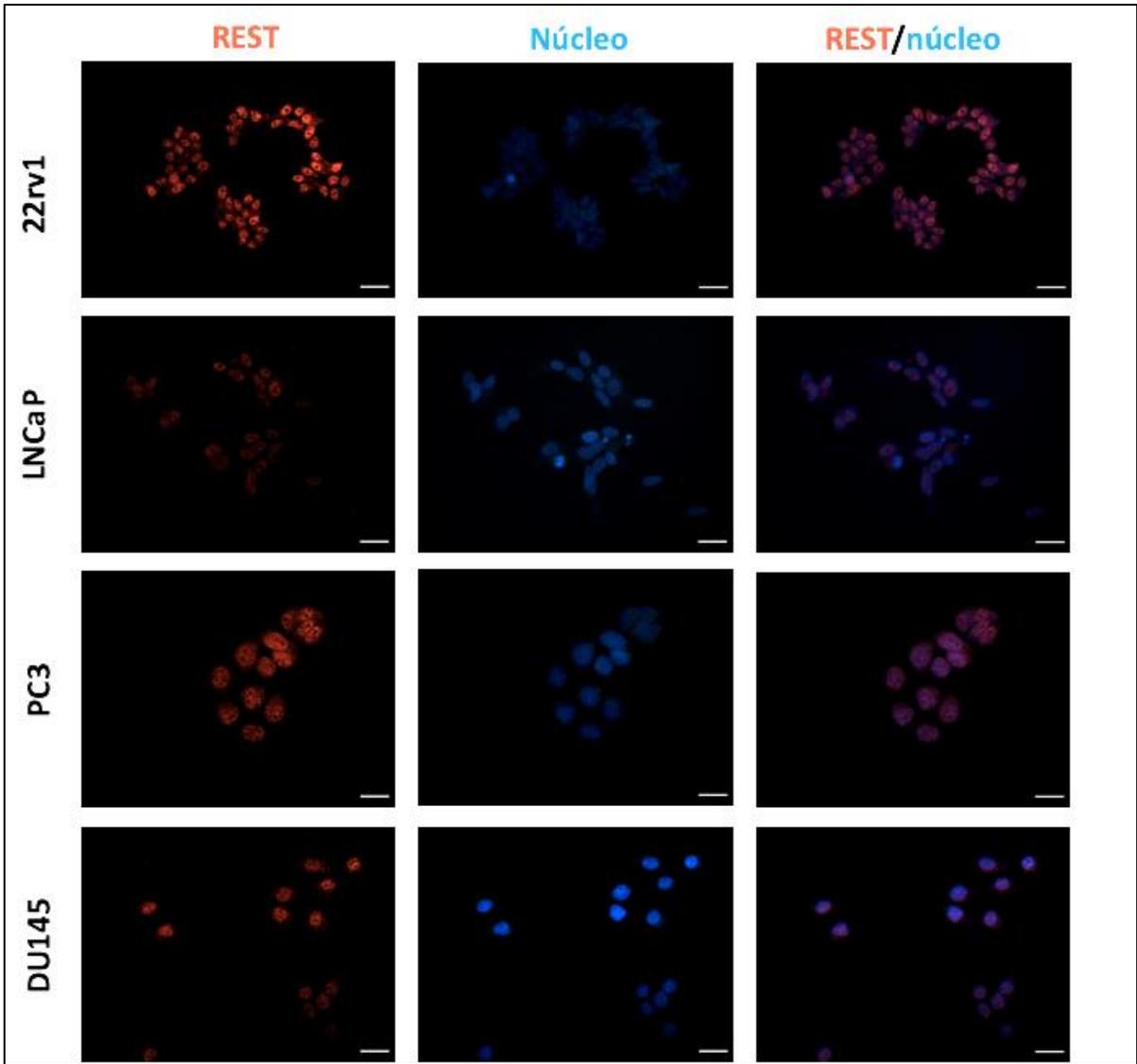


Figura 4. Localización de REST en líneas celulares de cáncer de próstata. Se observa la localización nuclear de REST en todas las líneas celulares mediante inmunofluorescencia. Barra = 30 μ m.

Para respaldar nuestros resultados anteriores, quisimos validar la ubicación subcelular en cultivos 3D generados a partir de cultivos primarios de pacientes con CaP a través de inmunofluorescencia. En la figura 5 se observa que REST sigue teniendo un patrón preferentemente nuclear, con una marca más intensa en las células que se encuentran en la periferia del cultivo 3D, las cuales se encuentran en el plano de corte confocal. Además, es posible identificar REST en citoplasma.

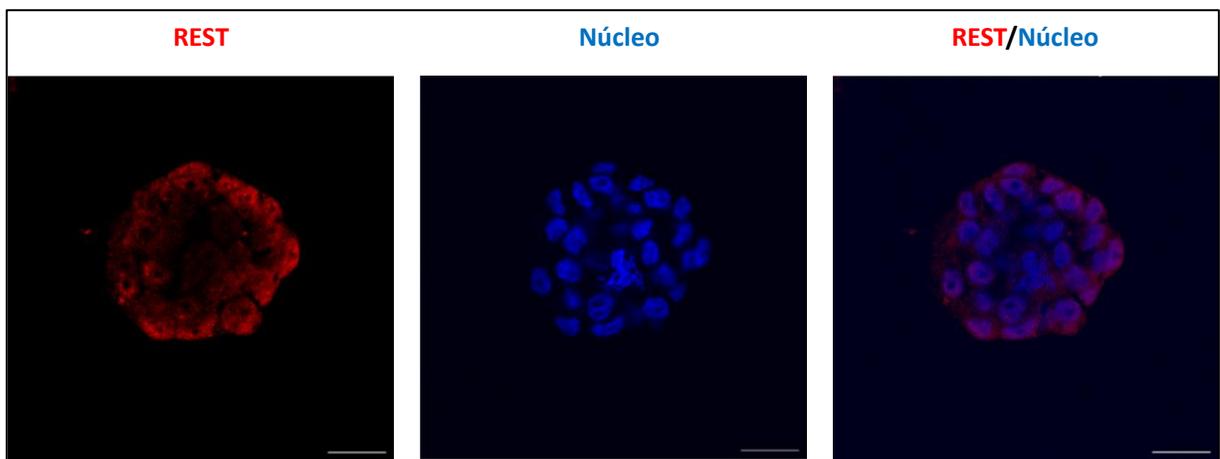


Figura 5. Identificación de REST en cultivos 3D derivados de cultivos celulares primarios de cáncer de próstata. REST es observado con un patrón preferentemente nuclear. También está presente en citoplasma. Barra = 30 μm .

5.2. Evaluación de REST en biopsias de pacientes con cáncer de próstata

Para analizar la expresión de REST en muestras de pacientes con CaP, se evaluó un microarreglo de tejido (TMA) construido desde distintos bloques de inclusión de pacientes con diferentes grados Gleason (total = 51).

En la figura 6, se muestran fotografías representativas de cada uno de los grados Gleason evaluados en conjunto con su cuantificación. No se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos de estudio ($p > 0.05$, prueba de Kruskal Wallis).

En la figura 7, se muestran distintas localizaciones de REST en las biopsias de pacientes incluidas en el TMA. En ellas se observaron distintos patrones de inmunotinción, siendo mayoritariamente nuclear, pero también se observó en algunas su presencia en citoplasma y núcleo, y en otras muestras solo una inmunotinción en citoplasma. No hubo relación entre patrones de tinción con puntaje Gleason.

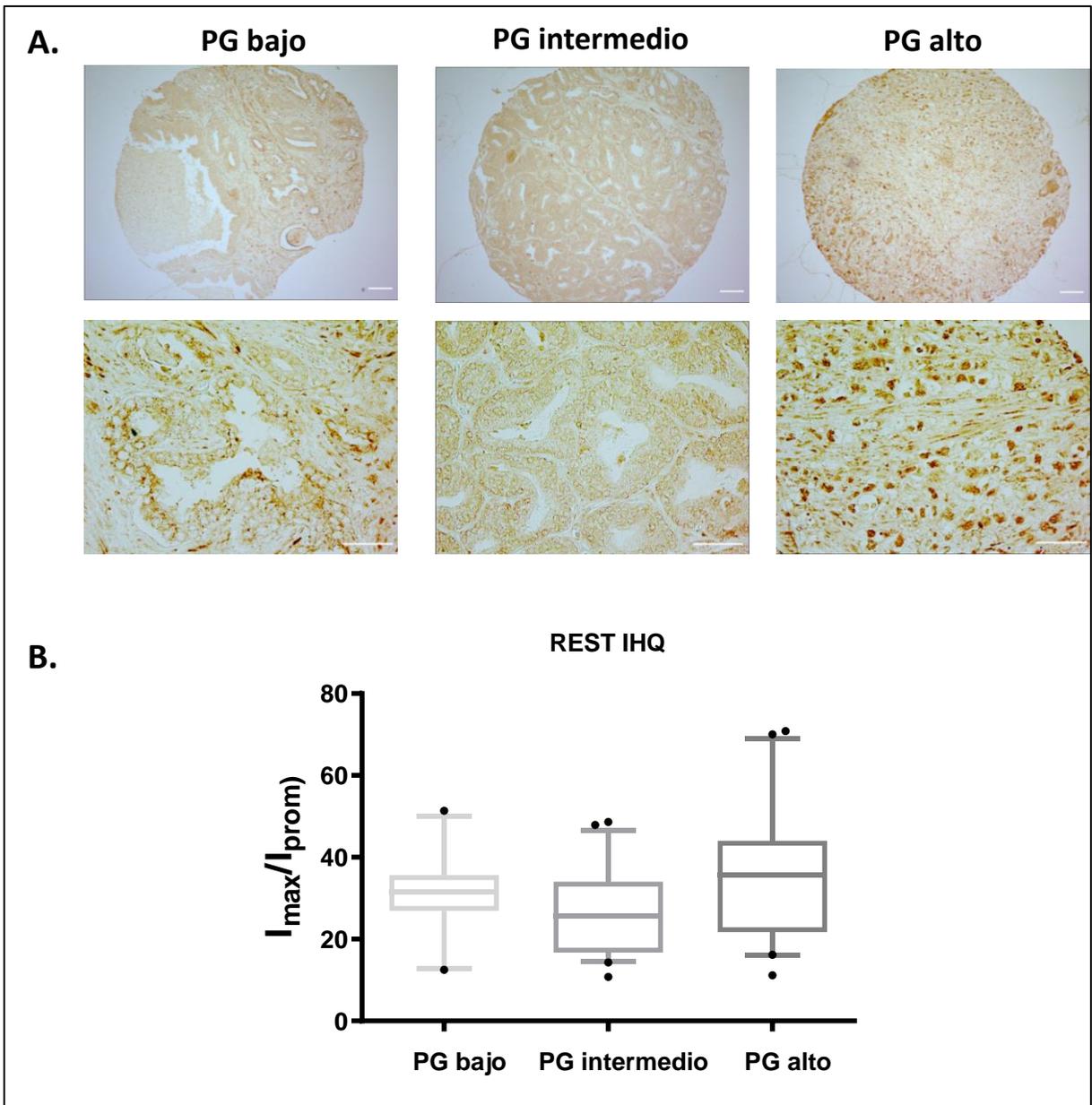


Figura 6. Identificación de REST en muestras de pacientes con CaP. A. Imágenes representativas de inmunohistoquímica cromogénica contra REST en TMA de muestras de pacientes con CaP de distintos grados Gleason (bajo, intermedio y alto). Barras = 100 μ m en panel superior, y 50 μ m en panel inferior. **B.** Cuantificación de la señal IHQ de REST. Los gráficos de caja muestran la intensidad de expresión de REST en cada grupo. $P > 0.5$, prueba de Kruskal Wallis.

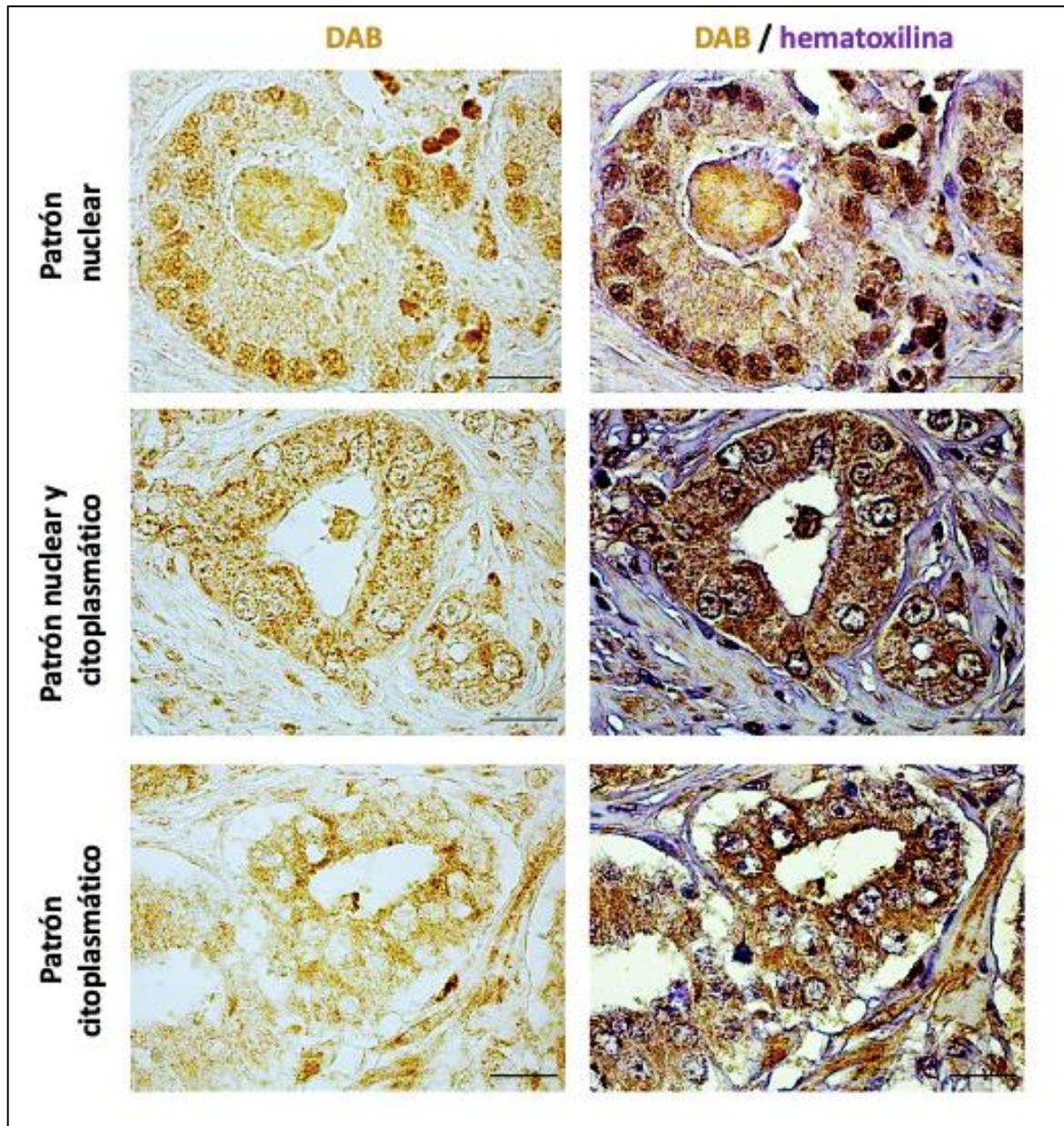


Figura 7. Patrones de inmunotinción cromogénica de REST en muestras de pacientes con CaP. En la primera columna se observa tinción con DAB únicamente, mientras que en la segunda se observa la misma área teñida con DAB y hematoxilina de Mayer de manera simultánea. Barras = 30 μ m.

OBJETIVO 2:

Evaluar los niveles de expresión y localización subcelular de marcadores de TEM y androgénicos en líneas celulares con silenciamiento y sobreexpresión de REST con y sin deprivación androgénica.

5.3. Silenciamiento de REST en líneas LNCaP.

Debido a que LNCaP presentó los mayores niveles de transcritos de REST entre las células dependientes de andrógeno evaluadas y también los mayores niveles de proteína REST nuclear, se hizo el silenciamiento de REST de forma estable por medio de una transducción con vectores lentivirales que expresan shRNA contra REST (shREST), utilizando como control a un shRNA de secuencia aleatoria (*scramble*, *scr*).

Como se observa en la figura 8, el silenciamiento de REST se ve reflejado por una disminución de la expresión de REST tanto a nivel de mRNA (**Figura 8A**), como de proteína. La disminución proteica de REST se observa en la fracción nuclear (**Figura 8B y 8C**). Además, se realizó la detección de GFP en los extractos proteicos, observándose una banda de mayor intensidad en la línea *scramble* en comparación a la línea shREST (**Figura 8D**). Se observa que en la fracción citosólica se encontró la mayor cantidad de GFP.

Los controles de carga utilizados fueron histona H3 para la fracción nuclear y tubulina para la fracción citosólica. Adicionalmente, se realizaron algunas evaluaciones con el control de carga RNA polimerasa II, las cuales están disponibles de la sección de Anexos (**Figura 33**).

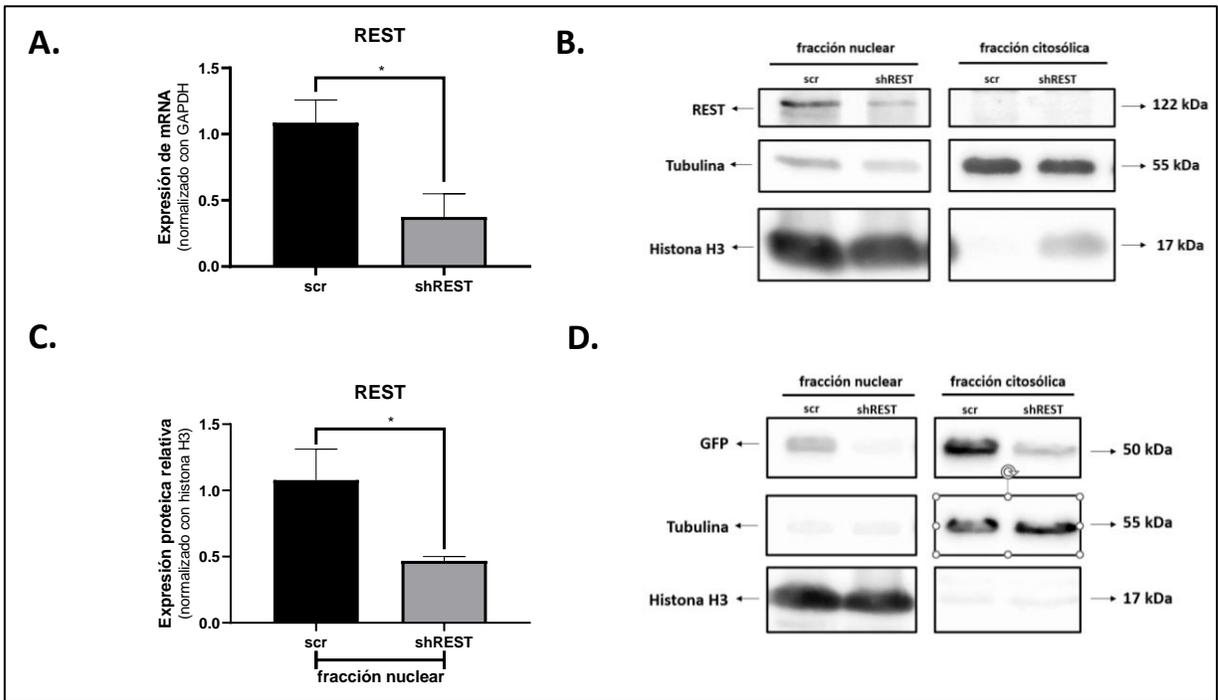


Figura 8. Expresión de REST en líneas celulares LNCaP con silenciamiento de REST. A. Expresión de mRNA de REST evaluado por RT-qPCR en células LNCaP con silenciamiento de REST. **B.** Imagen representativa de *western blot* para REST en células LNCaP con silenciamiento de REST. **C.** Gráfico de cuantificación de la expresión relativa de la fracción nuclear y citosólica. Prueba Mann Whitney U, n=4, p<0.05. **D.** Imagen representativa de *western blot* para GFP en células LNCaP con silenciamiento de REST.

Los resultados anteriores fueron obtenidos posterior a la selección de las líneas por medio de la incubación con puromicina y ensayo FACs. En la figura 9 se observan los resultados provenientes de los reportes del ensayo FACs. En la columna de la izquierda se muestran los resultados de los gráficos de conteo vs fluorescencia y *side scatter-height* (SSC-H) vs fluorescencia antes del *sorting* (*pre-sorting*) de las líneas scr y shREST. Se destaca que en la fase de *pre-sorting* hay un gran enriquecimiento de células negativas para la fluorescencia, representado por el primer *peak* en el histograma de color naranja (gráfico conteo vs fluorescencia). Este *peak* disminuye de manera drástica en el *post-sorting* (columna derecha de la figura), por lo que la muestra seleccionada incluye mayormente células con presencia de GFP (>90%).

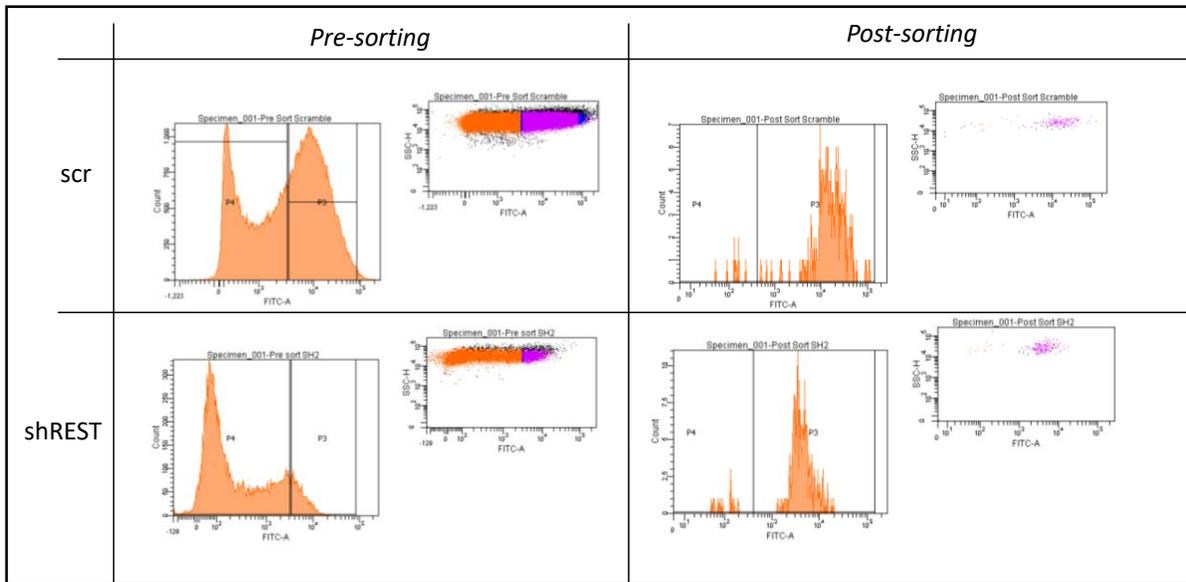


Figura 9. Resultados de Ensayo FACs de células *scramble* y con silenciamiento de REST. En cada cuadrante se observan dos gráficos, el de recuento celular vs fluorescencia (histograma de color naranja) y el de SSC-H vs fluorescencia. En todos los casos se observa un enriquecimiento significativo de células fluorescentes (*post-sorting*), representando más del 90% del total de las células seleccionadas.

Una vez obtenidas las células seleccionadas desde el ensayo de *sorting*, éstas fueron sembradas en placas de 6 pocillos, y fueron observadas en un microscopio invertido con fluorescencia. En la imagen 10, se muestran resultados de las células fluorescentes y microscopía DIC (**D**ifferential **I**nterference **C**ontrast microscopy), en donde se destaca en más de un 90% la presencia de células positivas para GFP.

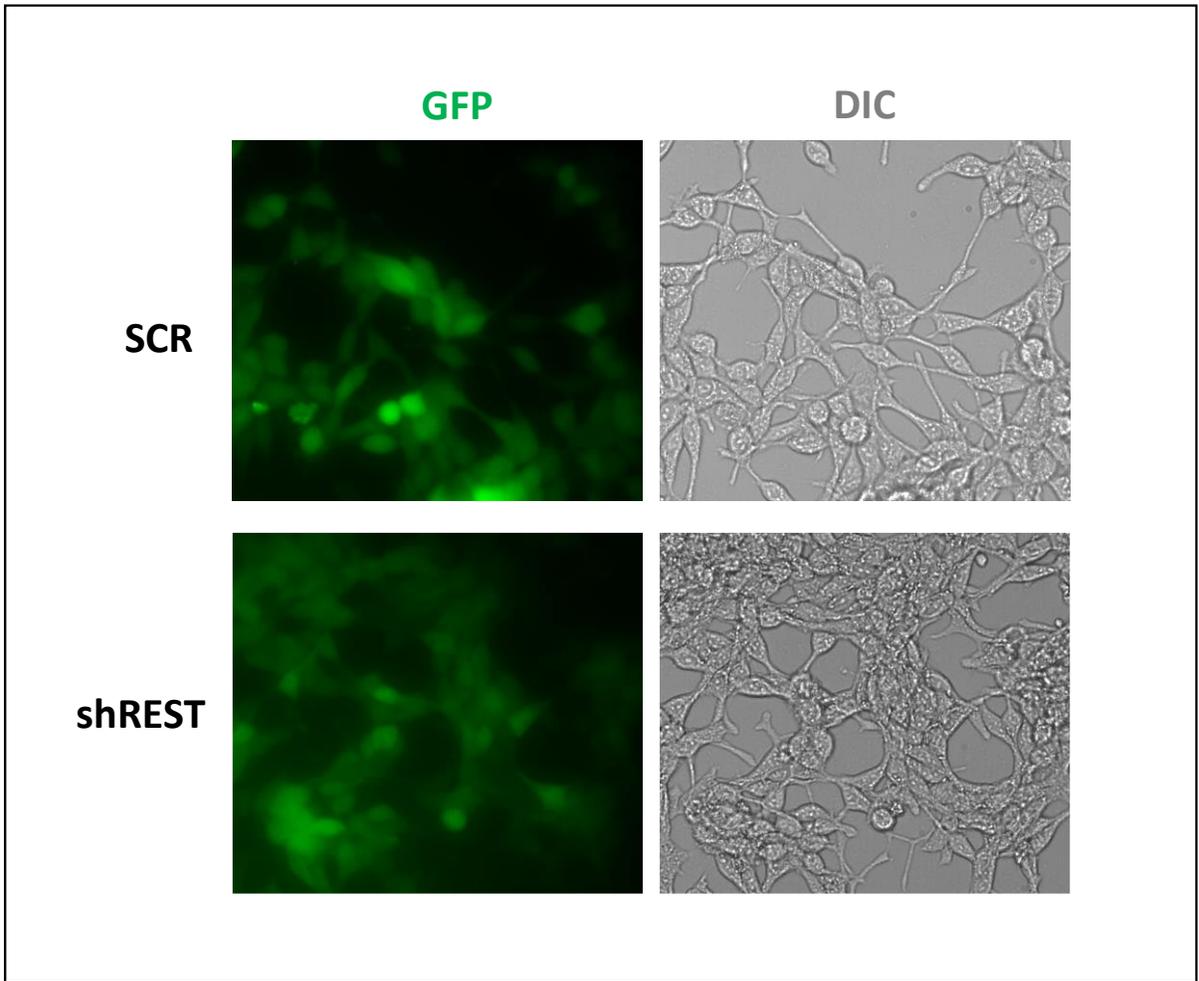


Figura 10. Microscopía de fluorescencia y DIC de las células scr y shREST seleccionadas mediante FACS. En la columna de la izquierda se observa el carril de color verde, en donde se destacan las células positivas para GFP de ambas líneas. En la columna de la derecha se observa la contraparte correspondiente con microscopía DIC.

Además, se obtuvieron imágenes de estas mismas células bajo un microscopio de luz invertido. En la figura 11, se presenta una imagen representativa de ellas. Las células scr muestran una morfología típica del tipo LNCaP, las cuales presentan una estructura más bien estrellada, con varias prolongaciones citoplasmáticas extendiéndose desde el sector celular en donde se encuentra el núcleo. En la imagen de la derecha se observan las células con silenciamiento de REST, las cuales también se caracterizan por poseer prolongaciones citoplasmáticas, pero llaman la atención de estas tienen una mayor extensión (indicada por flechas blancas). Estas características celulares son propias de células LNCaP con aumento de marcadores neuroendocrinos.

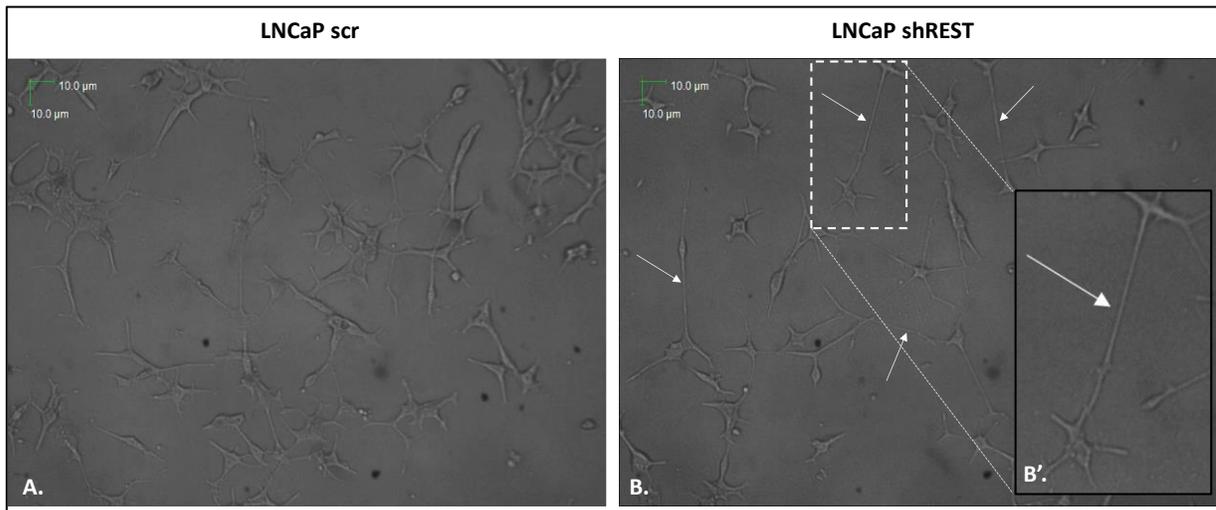


Figura 11. Morfología de las células LNCaP scr y shREST en microscopio de luz invertido. A. Células scr con una morfología epitelial, cuerpo celular alargado y extensión citoplasmáticas de mediano tamaño. **B.** Se observan células shREST con una morfología similar a las células scr, pero se identifican prolongaciones citoplasmáticas más extensas (indicadas con flechas blancas). **B'** Aumento de la zona destacada por un rectángulo de borde punteados, en donde se destaca una prolongación citoplasmática. Barra: 10 μm.

Como control de silenciamiento se realizó la identificación de sinaptofisina, puesto que es un marcador canónico del fenotipo neuroendocrino y regulado por REST. Efectivamente hubo un aumento significativo de la proteína sinaptofisina en los extractos citosólicos de las células con silenciamiento de REST (**Figura 12**). Cabe destacar que no se observó expresión proteica de esta proteína en las fracciones nucleares, algo que concuerda con la localización subcelular descrita en otras publicaciones⁴⁷.

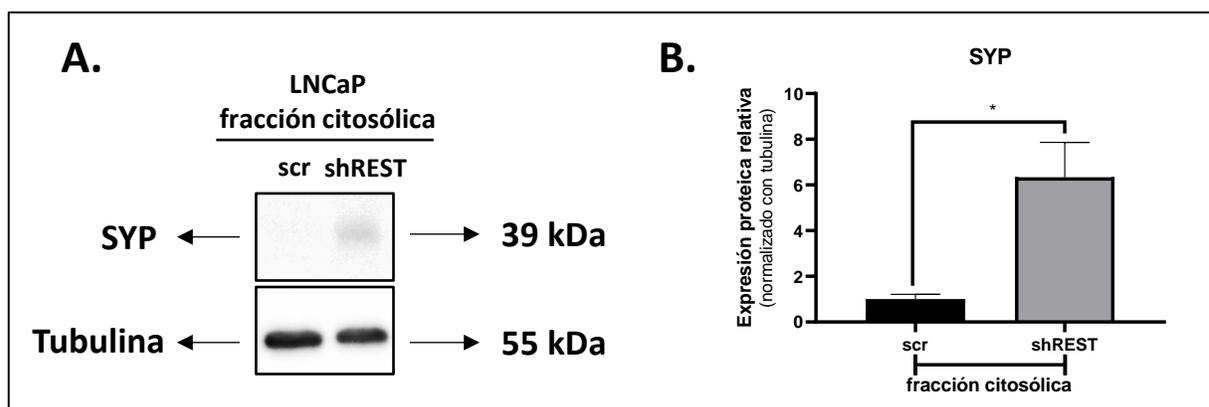


Figura 12. Expresión de sinaptofisina en líneas celulares LNCaP con silenciamiento de REST. **A.** Imagen representativa de *western blot* para sinaptofisina en células LNCaP con silenciamiento de REST. Tubulina fue utilizada como control de carga citosólico. **B.** Gráfico de cuantificación de la expresión relativa. Prueba Mann Whitney U, n=4, p<0.05.

5.4. Evaluación de genes reguladores de la transición epitelio mesénquima en células LNCaP con silenciamiento de REST.

De acuerdo con la hipótesis de esta tesis, en donde se propone que REST reprime el proceso de transición epitelio mesénquima, se evaluó la expresión de los genes inductores de este proceso a través de RT-qPCR. Estos genes corresponden Snail (gen: SNAI1), Slug (gen: SNAI2), Twist (gen: TWIST1) y ZEB1.

El silenciamiento estable de REST en líneas celulares LNCaP no produce ningún cambio significativo en los niveles de transcritos de SNAI1 (**Figura 13A**), pero sí produce un aumento de los niveles de SNAI2 y TWIST1 (**Figura 13B y 13C**, respectivamente). En los niveles proteicos, sorpresivamente se observa una tendencia a la disminución de Snail en las líneas silenciadas (**Figura 13D y 13E**), pero un aumento significativo de la proteína Twist (**Figura 13F y 13G**).

Con respecto a Zeb1, no se encontraron cambios significativos en ninguna de las fracciones subcelulares evaluadas (**Figura 13H y 13I**).

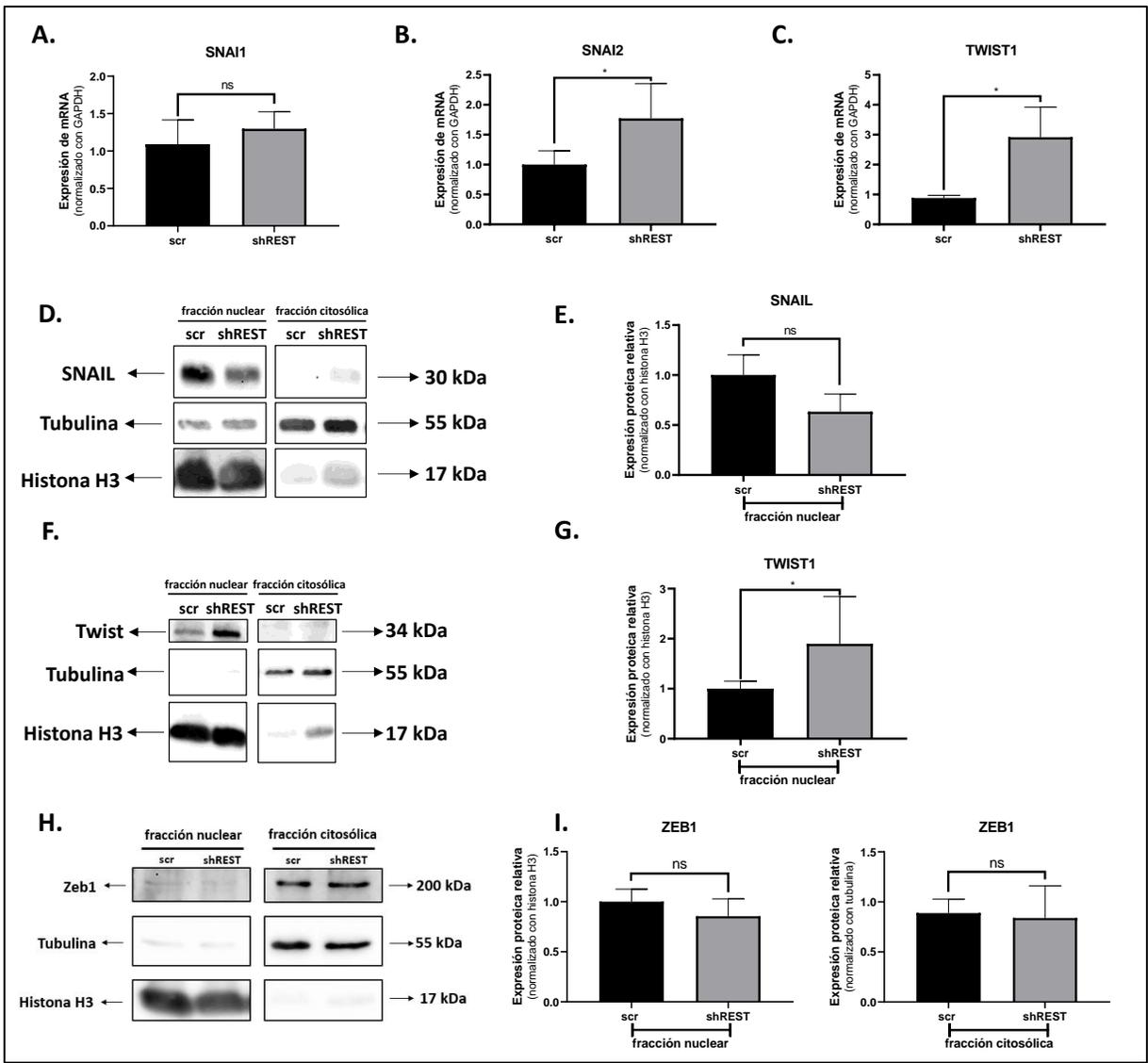


Figura 13. Expresión de factores transcripcionales inductores de la TEM en líneas LNCaP con silenciamiento para REST. A, B y C. Expresión relativa del mRNA de SNAI1, SNAI2 y TWIST1 evaluada por RT-qPCR, respectivamente. **D, F y H.** Imágenes representativas de *western blot* de SNAIL, Twist y ZEB1, respectivamente. **F, G e I.** Gráficos de cuantificación relativa de las proteínas Snail, Twist y ZEB1, respectivamente. Prueba de Mann Whitney U, N=4, $p < 0.05$.

Además de los reguladores maestros de la TEM, se propuso evaluar marcadores de epitelio y mesénquima, tales como E-cadherina y vimentina, respectivamente. En la figura 14, se muestra interesantemente que en esta línea celular E-cadherina y vimentina se encuentran presente mayoritariamente en fracciones nucleares. Para el caso de E-cadherina, no hubo cambios significativos entre las dos condiciones de expresión de REST, mientras que, en el caso de vimentina, hubo un aumento de su expresión proteica en las células shREST en fracciones nucleares.

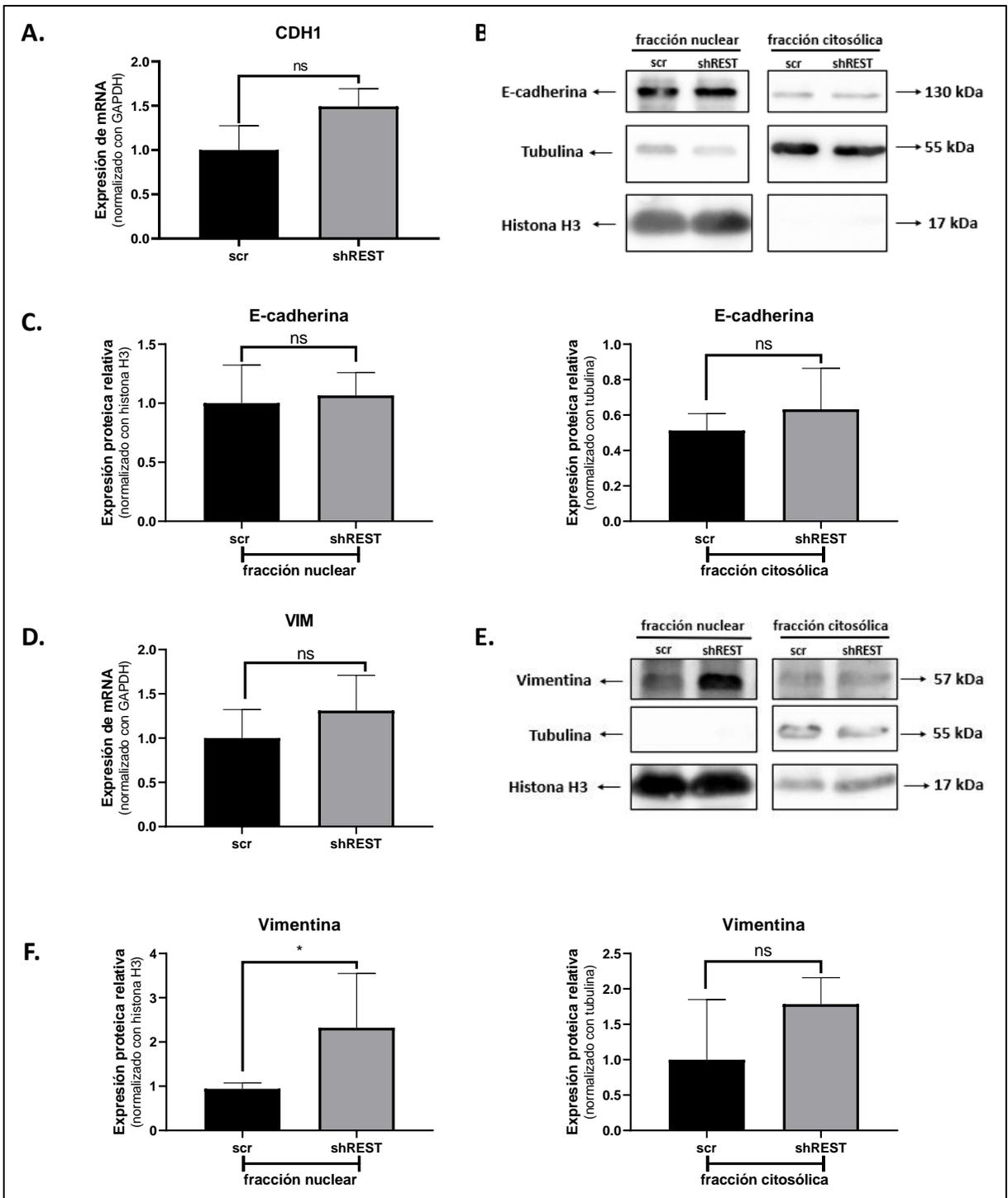


Figura 14. Expresión de E-cadherina (CDH1) y vimentina (VIM) en líneas con silenciamiento de REST. **A.** Expresión relativa del transcrito CDH1 en células scramble y shREST evaluado con RT-qPCR. **B.** Imagen representativa de los resultados de *western blot* de E-cadherina. **C.** Gráfico de expresión relativa de los niveles proteicos de E-cadherina. Mann Whitney U test, N=4, p<0.05.

5.5. Evaluación de receptor de andrógeno (AR), variante 7 (Arv7) y antígeno prostático específico (PSA) en células LNCaP con silenciamiento de REST.

En las células LNCaP con silenciamiento de REST, se evaluó la expresión de AR, la variante 7 del receptor de andrógeno (ARv7) y KLK3, gen que codifica a la proteína PSA. Como se puede observar en la figura 14, el silenciamiento estable de REST produce una disminución significativa de los transcritos de AR en comparación a la línea *scramble* (**Figura 15A**), mientras que se observó una disminución de este receptor tanto en fracciones nucleares como en citosólicas (**Figura 15B y 15C**), siendo esta última diferencia, significativa.

En una situación distinta a AR, en la variante 7 no hubo ningún cambio de expresión a nivel de mRNA respecto del control (**Figura 15D**), mientras que KLK3 disminuye significativamente en la línea shREST (**Figura 15E**).

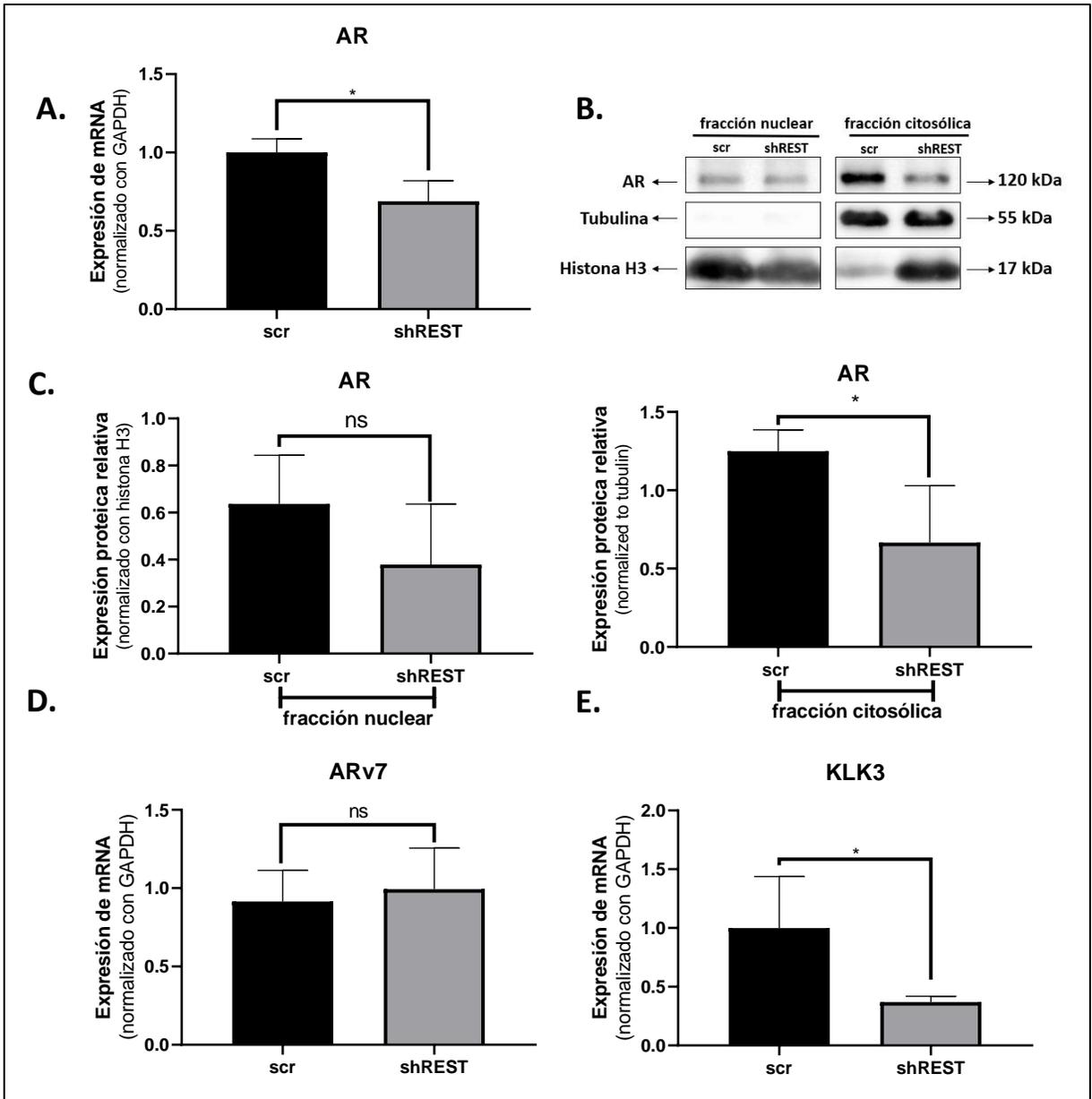


Figura 15. Expresión del AR, Arv7 y KLK3 en líneas LNCaP con silenciamiento de REST. **A.** Expresión relativa del mRNA de AR evaluada por RT-qPCR. **B.** Imagen representativa del *western blot* para AR en células LNCaP scr y con silenciamiento de REST. **C.** Gráficos de cuantificación de la expresión relativa de AR de fracciones nuclear y citosólica. **D.** Expresión relativa del mRNA de ARv7 evaluada por RT-qPCR **E.** Expresión relativa del mRNA de KLK3 evaluada por RT-qPCR. Prueba de Mann Whitney U, n=4, p>0.05.

5.6. Sobreexpresión de REST en líneas 22rv1

Debido a que la línea celular 22rv1 presentó los menores niveles de transcritos de REST entre todas las líneas celulares evaluadas, se realizó la sobreexpresión del factor REST de forma estable por medio de una transducción con vectores lentivirales que expresan REST, utilizando como control de secuencia aleatoria (línea celular NULL).

Después de 72 horas de transfección, las células se seleccionaron con puromicina y fueron observadas bajo microscopía de luz con un microscopio invertido. En la figura 16, se observan las células NULL con una morfología típica de este tipo celular, con una forma de crecimiento en grupo y células con proyecciones citoplasmáticas cortas. A la derecha de la imagen, se puede observar la contraparte células de REST-HA, las cuales crecen en grupo y con una morfología celular a la línea NULL, pero llama la atención que su crecimiento es lento y en grupo pequeños. Algunos grupos celulares fueron delineados en blanco para hacer más fácil la visualización por parte del lector.

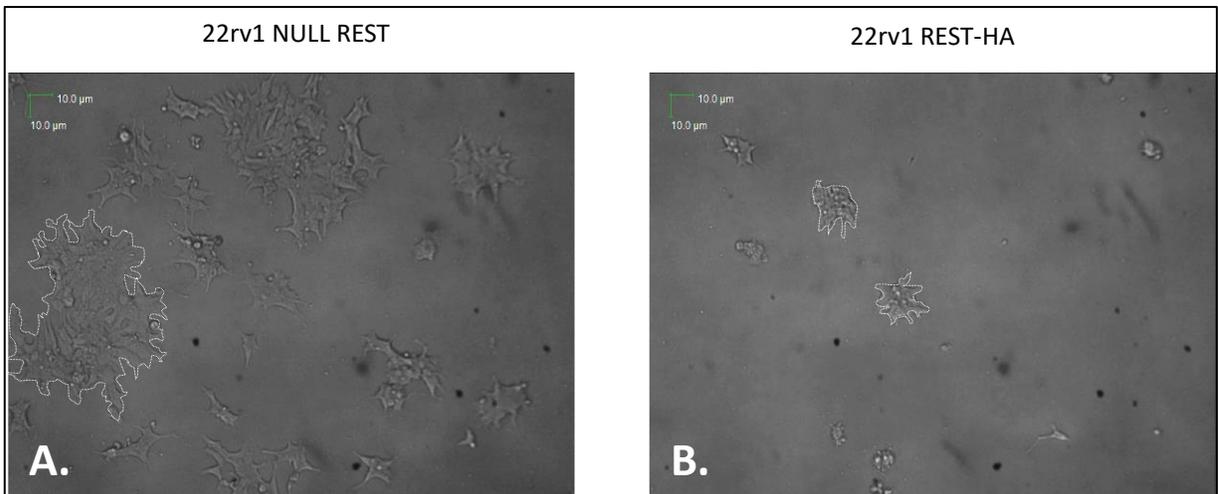


Figura 16. Organización de células 22rv1 NULL y 22rv1 REST-HA por microscopía de luz. En A se muestran las células NULL, con un crecimiento más bien en grupos, que logran alcanzar formaciones con un mayor número de células en los mismos tiempos que REST-HA. En B se observa que las células REST-HA poseen un crecimiento grupal, compuesto de menor número de células en comparación a las NULL. Algunos grupos fueron delineados con blanco para su mejor delimitación. Barra de 10 µm.

Como se observa en la figura 17, la sobreexpresión de REST se evaluó a nivel de RNA mensajero y proteína. En ambas mediciones se observó un aumento significativo de la expresión de REST en la línea con sobreexpresión con respecto al control NULL. Además, se realizó la detección de RFP en los extractos proteicos, observándose una banda de mayor intensidad en la línea NULL en comparación a la línea REST (**Figura 17B**). Se observa que en la fracción nuclear se encontró la mayor cantidad de RFP. Adicionalmente, se identificó la etiqueta HA, demostrándose su presencia solamente en las células con sobreexpresión de REST (**Figura 17D**).

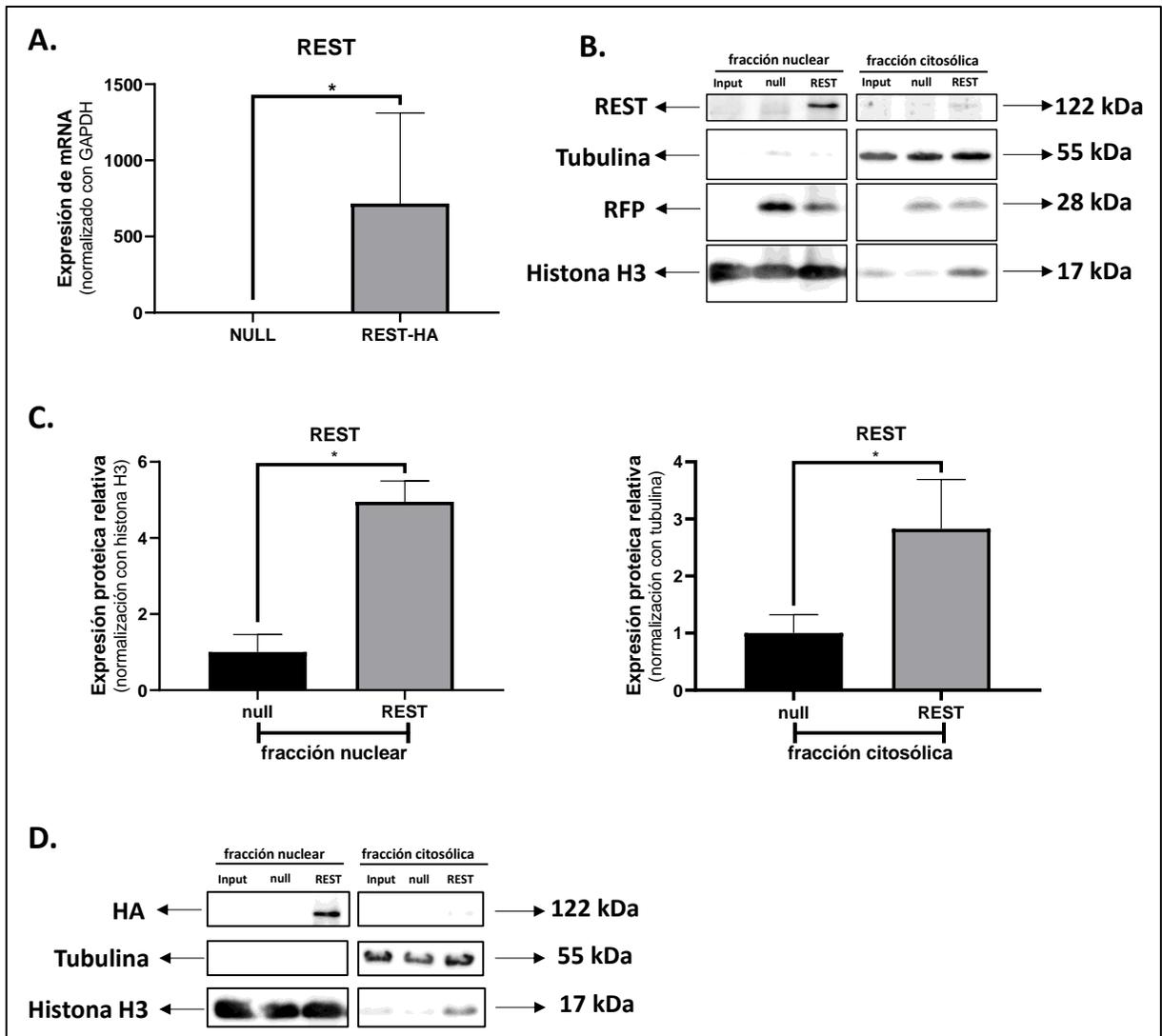


Figura 17. Expresión de REST y RFP en líneas celulares 22rv1 con sobreexpresión de REST. **A.** Expresión del mRNA de REST fue evaluado en células 22rv1 transducidas de manera estable con lentivirales de sobreexpresión. El gen de interés fue evaluado por RT-qPCR. **B.** Imagen representativa del *western blot* de REST de las fracciones nucleares y citosólicas. Adicionalmente se evaluó RFP. **C.** Gráficos que representan la expresión relativa de niveles proteicos de REST en la fracción nuclear y citosólica. Prueba de Mann Whitney U, n=4, p<0.05.

5.7. Evaluación de genes reguladores de la transición epitelio mesénquima en células 22rv1 con sobreexpresión de REST.

Tal como se realizó con las células LNCaP, se realizaron las evaluaciones de qPCR y *western blot* para evaluar los niveles de expresión de Snail (gen: SNAI1), Slug (gen: SNAI2), Twist (gen: TWIST1) y Zeb1.

En la figura 18, se observan los niveles de transcrito para cada uno de los genes reguladores de la TEM. En ella se observa que la sobreexpresión de REST en células 22rv1 provoca un aumento significativo de los transcritos para SNAI1 y SNAI2, mientras que ZEB1 disminuye significativamente. Para el caso de TWIST1, no hubo cambios entre las dos condiciones evaluadas.

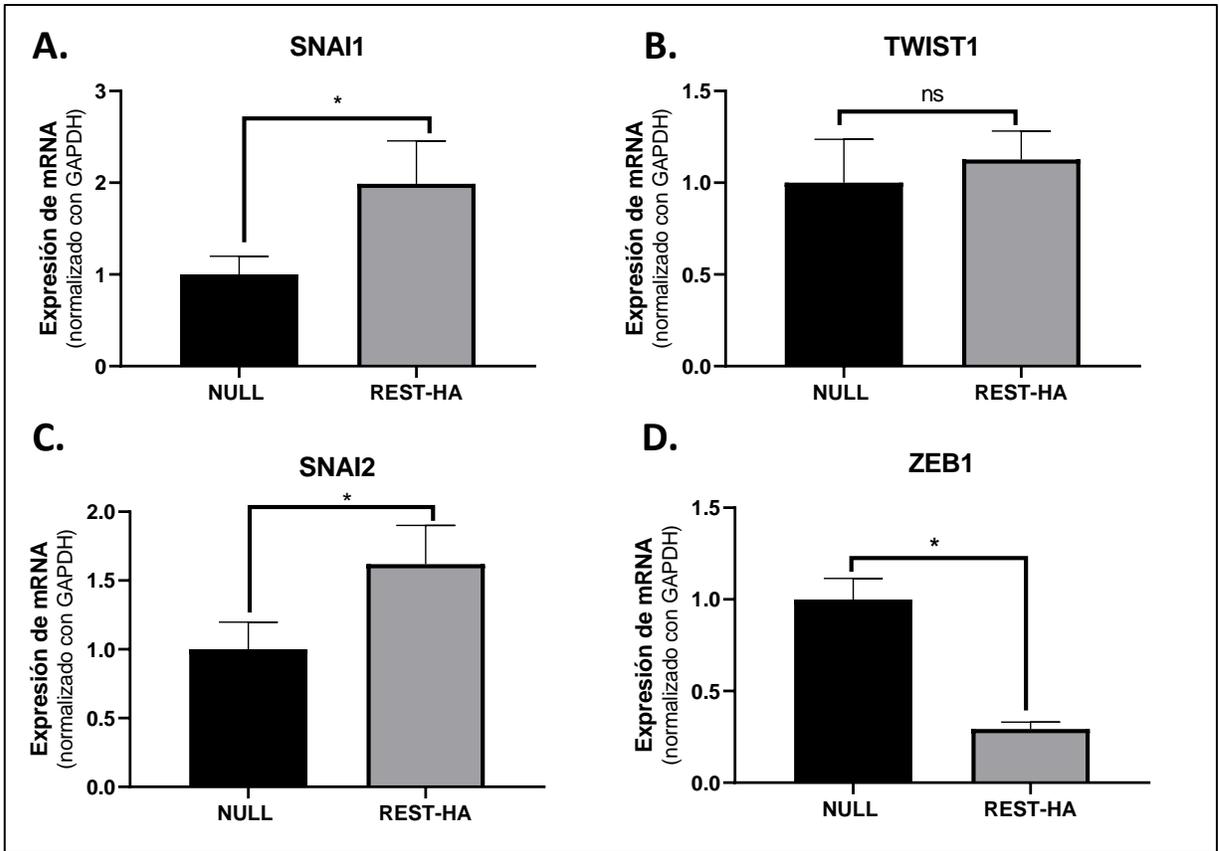


Figura 18. Evaluación de los niveles de transcritos de genes reguladores de la TEM en células 22rv1 NULL y 22rv1 con sobreexpresión de REST. A. Niveles de transcritos de SNAI1, B. Niveles de transcritos de SNAI2, C y D. Niveles de transcritos de TWIST1 y ZEB1, respectivamente. Prueba de Mann Whitney U, n=4, p<0.05.

Sorpresivamente, Snail aumentó su expresión proteica en las células 22rv1 con sobreexpresión de REST, coincidiendo con los hallazgos hechos a través de qPCR **(Figura 19)**. Por otro lado, Twist disminuyó su expresión proteica en fracciones nucleares, mientras que los citosólicos no fueron distintos con respecto al control **(Figura 19B)**.

ZEB1 mostró una tendencia a la disminución a nivel nuclear, mientras que tuvo un comportamiento contrario a nivel citosólico. Este comportamiento de ZEB1 no fue estadísticamente significativo **(Figura 19C)**.

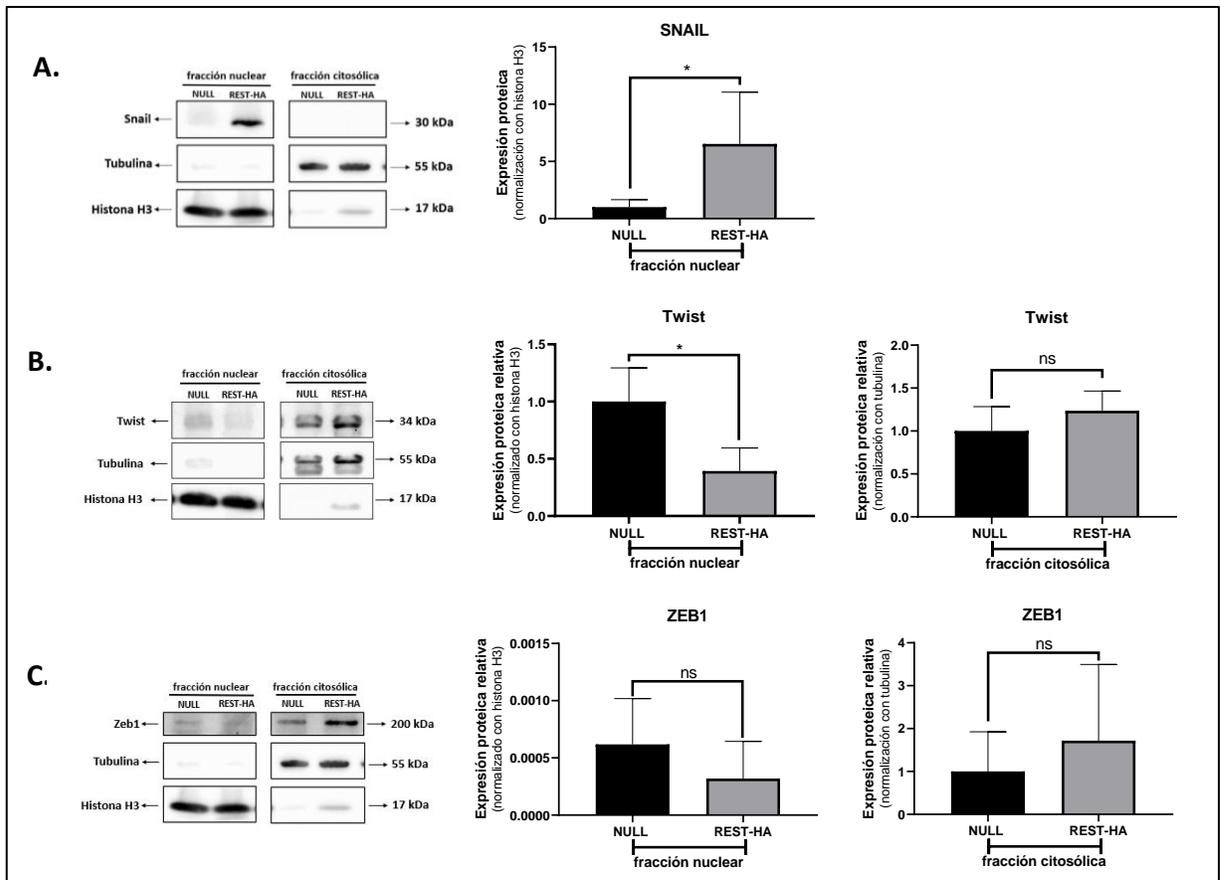


Figura 19. Expresiones proteicas de factores de transcripción (FT) reguladores de la TEM en células 22rv1 con sobreexpresión de REST. **A.** Imagen representativa de Snail a través de *western blot* (izquierda) y su semi cuantificación (derecha). **B.** Imagen representativa de Twist (izquierda) y semi cuantificación de las bandas nucleares y citosólicas por separado (derecha). **C.** Imagen representativa de la evaluación por *western blot* de ZEB1 (izquierda) y sus gráficos de semi cuantificación por separado entre fracción nuclear y citosólica (derecha).

Con respecto a los marcadores de epitelio y mesénquima evaluados, E-cadherina no disminuyó su expresión de mRNA con respecto al control, algo que solo se correlaciona con su disminución a nivel proteico en fracciones citosólicas, sin embargo, a nivel nuclear no hubo diferencias (**Figura 20A-C**).

Por otro lado, vimentina disminuyó significativamente su expresión tanto a nivel de transcritos como proteicos en células con sobreexpresión de REST (**Figura 20D-F**).

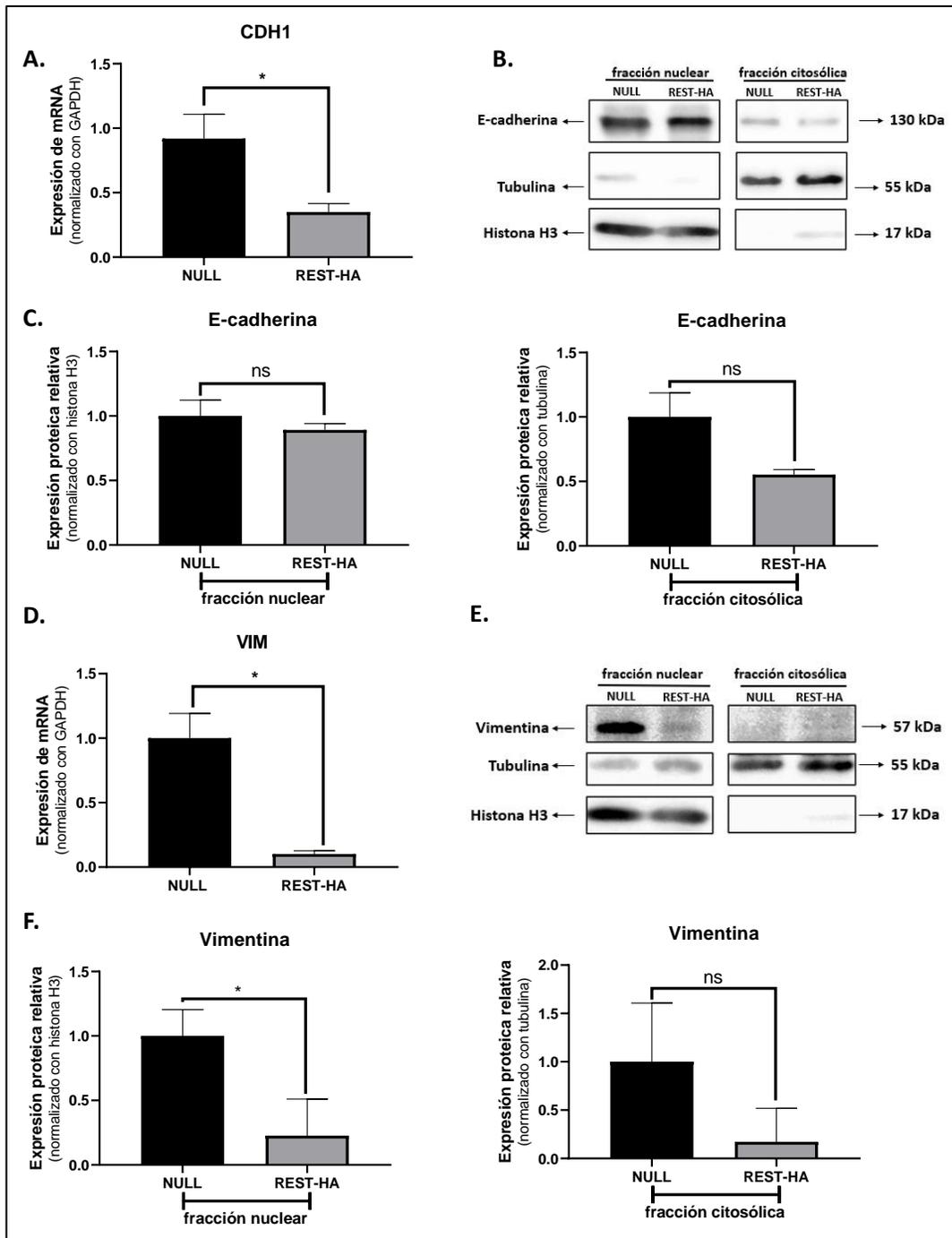


Figura 20. Expresión de E-cadherina (CDH1) y vimentina (VIM) en células 22rv1 con sobreexpresión de REST. **A.** Gráfico que representa los niveles de transcritos de E-cadherina (gen: CDH1). **B.** Imagen representativa de *western blot* para E-cadherina. **C.** Gráficos de semi cuantificación de los niveles proteicos de E-cadherina en fracciones nucleares y citosólicas. **D.** Gráfico que representa los niveles de transcritos de vimentina (gen: VIM). **E.** Imagen representativa de la evaluación de niveles proteicos de vimentina en fracciones nucleares y citosólicas. **F.** Gráficos de semi cuantificación de los niveles de expresión proteicas de vimentina en ambas fracciones.

5.8. Evaluación de AR, ARv7 y PSA en células 22rv1 con sobreexpresión de REST.

A nivel de transcritos, el AR no presentó ningún cambio entre las células NULL y REST-HA, pero si se observó una disminución de su expresión proteica en fracciones nucleares y un aumento en fracción citosólica (**Figura 21A-C**).

Para el caso de la variante 7 del receptor de andrógenos, se observó una disminución a nivel proteico en las fracciones nucleares y citosólicas de las células 22rv1 REST-HA con respecto al control. Esto último no fue acompañado por cambios en los niveles de transcritos (**Figura 21D-F**).

Con el fin de saber si estos cambios tienen implicancias en proteínas reguladas por el RA se estudió la expresión de KLK3. En la figura 21G, se observa que en células con sobreexpresión de REST, KLK3 se encuentra disminuido significativamente.

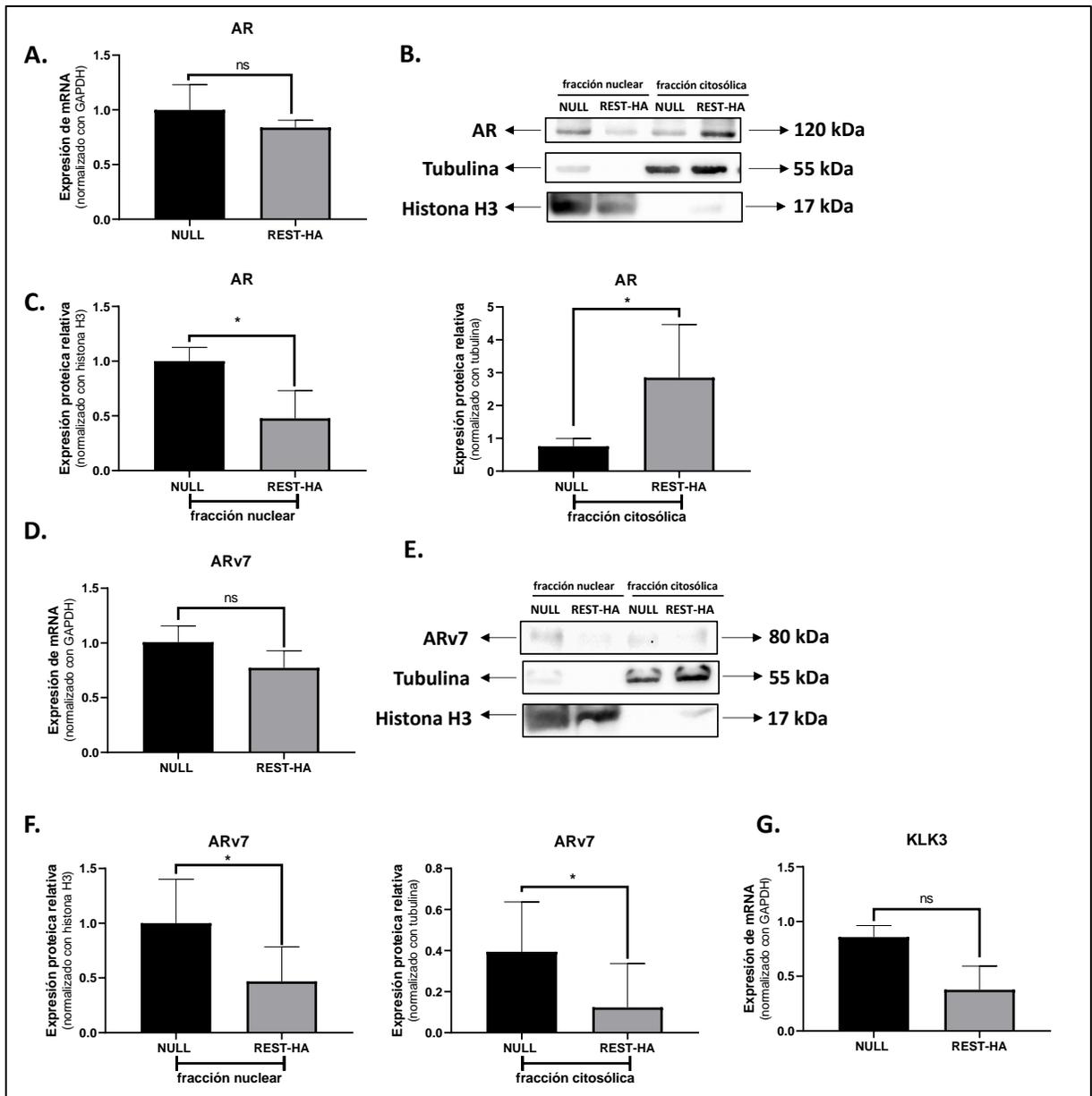


Figura 21. Evaluación de la expresión del AR, ARv7 y KLK en células 22rv1 con sobre-expresión de REST. **A.** Niveles de mensajeros de AR. **B.** Imagen representativa del *western blot* de AR en fracciones nucleares y citosólicas. **C.** Gráficos de semi cuantificación de las bandas obtenidas de AR en las fracciones subcelulares. **D.** Niveles de mensajeros de ARv7. **E.** Imagen representativa del *western blot* de ARv7 en fracciones nucleares y citosólicas. **F.** Gráficos de semi cuantificación de las bandas obtenidas de ARv7 en las fracciones subcelulares. **G.** Niveles de mensajeros de KLK3.

OBJETIVO 3:

Evaluar las características migración e invasión de células con silenciamiento y sobreexpresión de REST, tumorigenicidad *in vitro* con ensayos de clonogenicidad.

5.9. Evaluación de la proliferación, migración e invasión en células 22rv1 con sobreexpresión de REST

Dentro de los factores que caracterizan el comportamiento agresivo en células cancerosas está la proliferación. Para evaluar esta característica funcional y poner a prueba la hipótesis de que la expresión de REST disminuye el comportamiento de agresividad de las células de CaP, hicimos ensayos MTT por hasta 96 horas, de manera de observar una dinámica cada 24 horas. Estos ensayos se realizaron con las células NULL, REST-HA y sus contrapartes deprivadas de andrógenos.

Como se presenta en la figura 22, las células NULL presentan una mayor viabilidad que los otros 3 grupos de células desde las 24 horas en adelante. Las células REST-HA deprivadas tuvieron un lento crecimiento en comparación a las demás. Se destaca la alta diferencia entre las células NULL y 22rv1 REST-HA (24 horas, $p=0.0097$; 28 a 96 horas, $p<0.0001$).

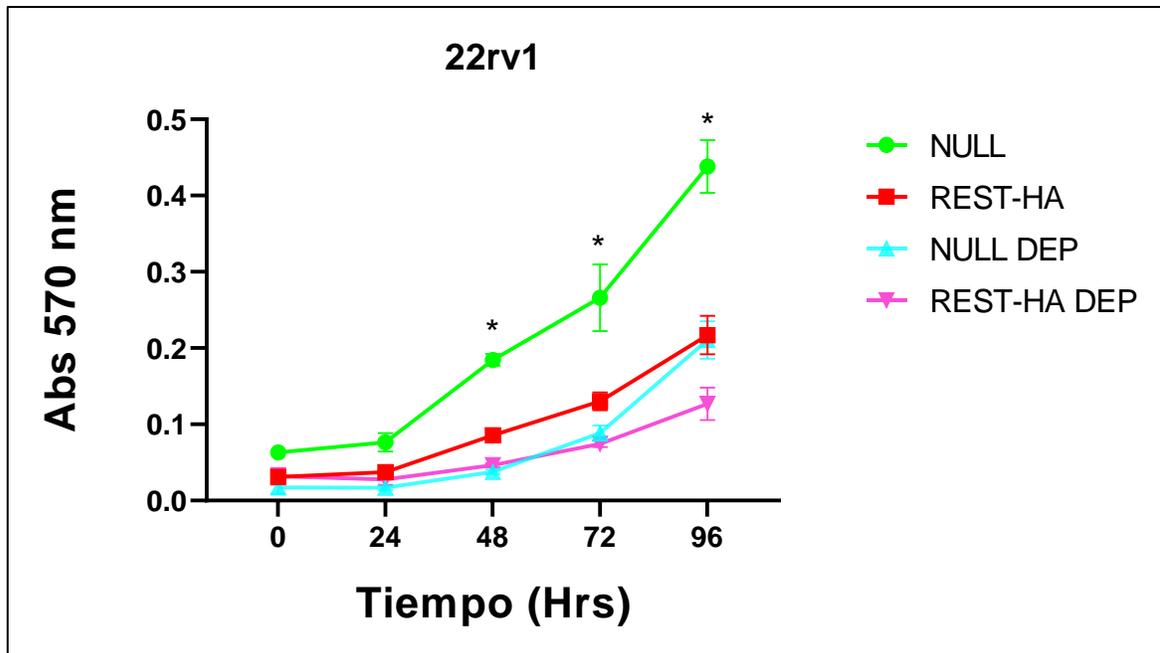


Figura 22. Evaluación de la proliferación de células con sobreexpresión de REST a través de ensayos de MTT. Inicialmente se sembraron 5000 células por pocillos, las cuales fueron incubadas con MTT cada 24 horas. Cada experimento fue realizado en cuadruplicado. La colorimetría de cristales de formazán fue determinada con la absorbancia a 570 nm.

Para evaluar la capacidad de formación de colonias, las líneas celulares NULL, REST-HA y sus contrapartes deprivadas de andrógenos fueron sometidas a un ensayo de clonogenicidad. En la figura 23, se muestra que las células 22rv1 con sobreexpresión de REST presentó el menor número de colonias en comparación con las otras líneas evaluadas, siendo la diferencia con 22rv1 NULL estadísticamente significativa. Se destaca además que las colonias formadas en los pocillos de las contrapartes deprivadas de andrógeno tenían un menor tamaño comparados con las líneas no deprivadas.

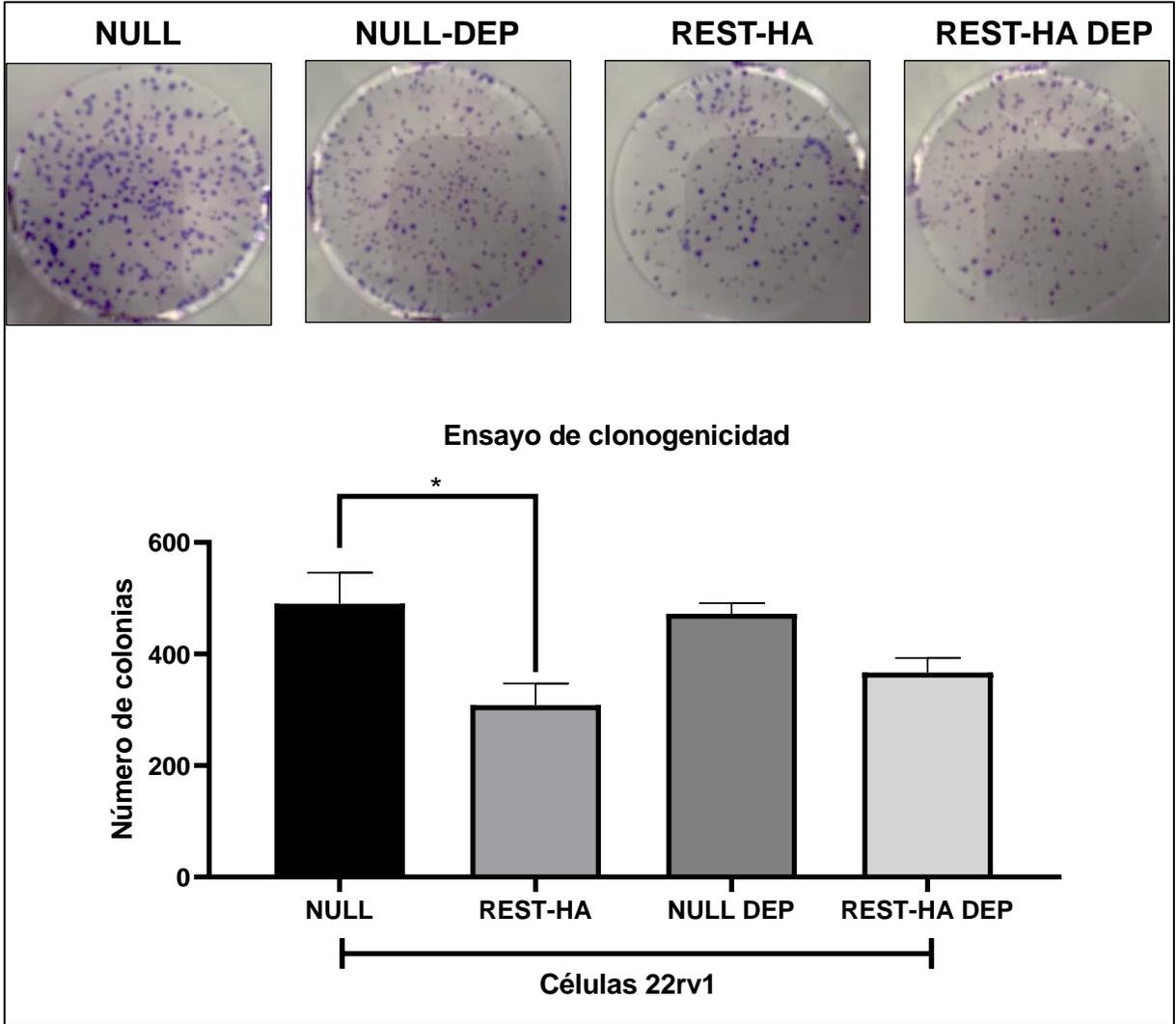


Figura 23. Ensayo de formación de colonias de células con sobreexpresión de REST. En la parte superior de la figura se muestran fotografías representativas de los resultados de las tinciones con cristal violeta de cada una de las distintas líneas celulares evaluadas. En la parte inferior de la figura se observa el gráfico de cuantificación de las células. La única diferencia significativa fue entre las líneas NULL y REST-HA.

Para evaluar si los cambios observados en los FT de la TEM están acompañados por una disminución o aumento en la capacidad migratoria e invasiva de las células 22rv1 con sobreexpresión de REST, se realizaron ensayos con Transwell® con y sin Matrigel, respectivamente.

En la figura 24, se muestran los resultados representativos de la tinción de cristal violeta de las células migratorias en conjunto con el gráfico de conteo de células por campo. De acuerdo con este resultado, las células 22rv1 REST-HA y su contraparte deprivada poseen una menor capacidad migratoria que la condición control. En el caso de la invasión ocurre un fenómeno similar a la migración, las células REST-HA y REST-HA deprivadas presentan una menor capacidad invasiva (**Figura 25**).

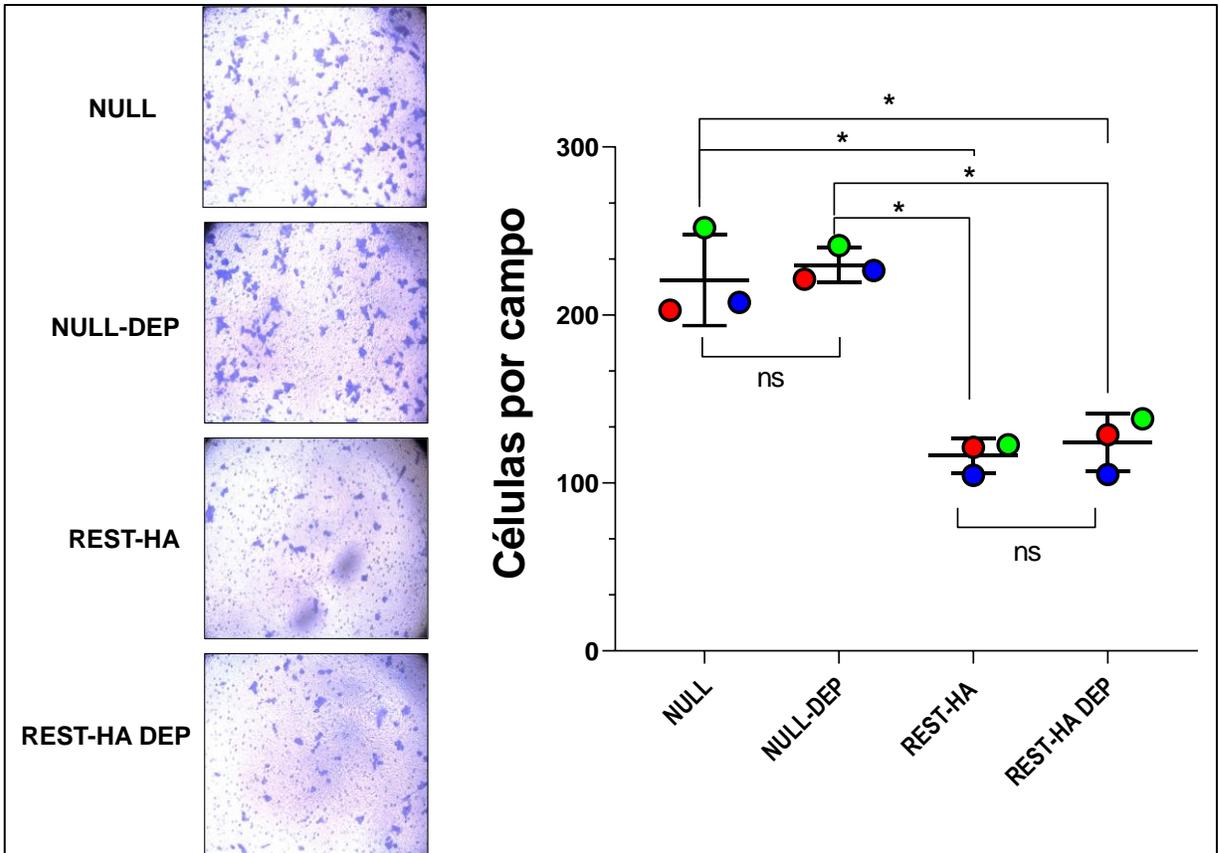


Figura 24. Resultados de ensayos de migración de células 22rv1 con sobreexpresión de REST. A la izquierda de la figura se muestran fotografías representativas de la tinción con cristal violeta de la membrana de trans migración de las cuatro condiciones evaluadas. A la derecha se observa el gráfico de cuantificación del promedio de los conteos de células por campo. N=3, ANOVA de dos vías.

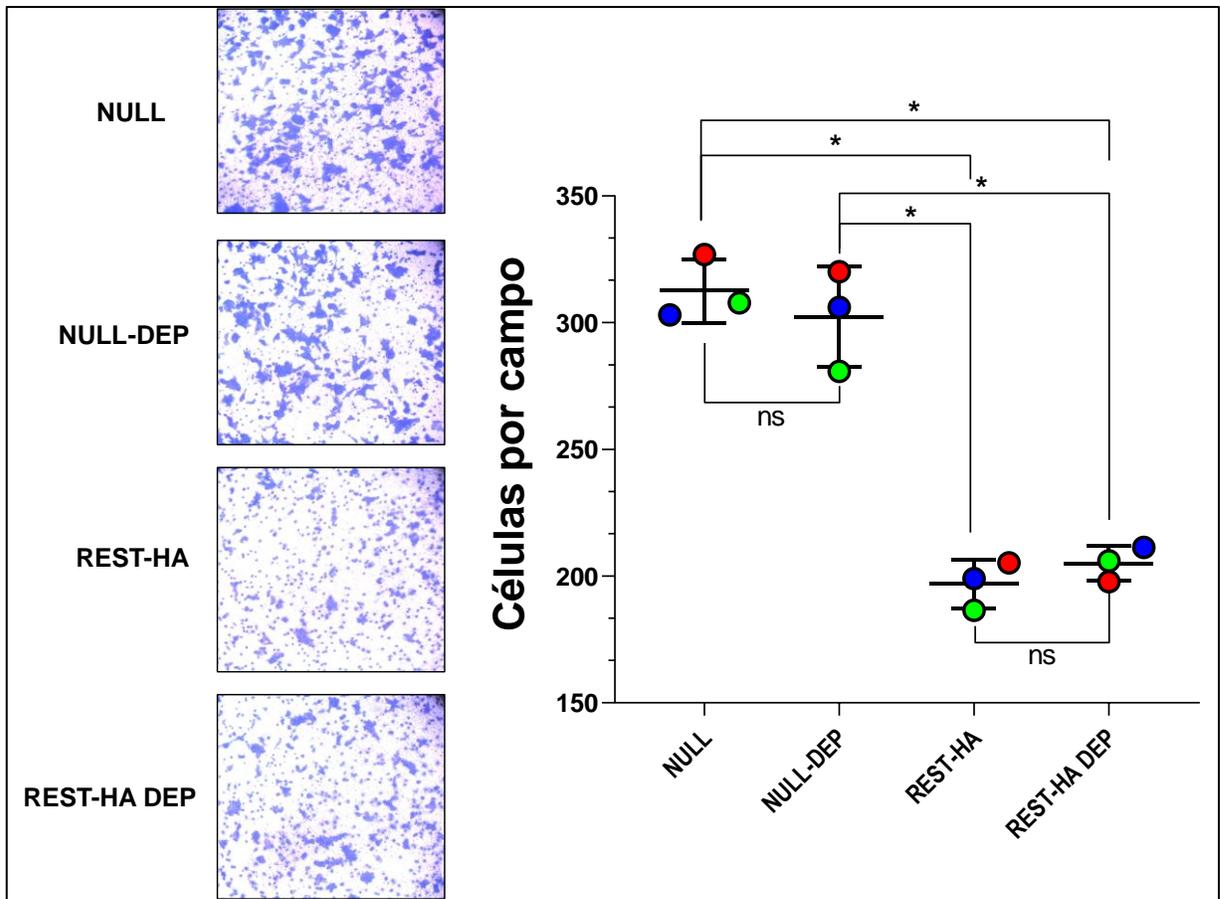


Figura 25. Resultados de ensayos de invasión de células 22rv1 con sobreexpresión de REST. A la izquierda de la figura se muestran fotografías representativas de la tinción con cristal violeta de la membrana de invasión de las cuatro condiciones evaluadas. A la derecha se observa el gráfico de cuantificación del promedio de los conteos de células por campo. N=3, ANOVA de dos vías.

OBJETIVO 4:

Evaluar la sensibilidad y resistencia a la deprivación androgénica y a la respuesta a tratamiento con enzalutamida en líneas celulares con sobreexpresión y silenciamiento de REST.

5.10. Evaluación de la viabilidad celular de las líneas *scramble* y silenciadas para REST frente a la incubación de dihidrotestosterona (DHT), enzalutamida (ENZ) y DHT + ENZ.

Con respecto a la comparación de viabilidad de cada una de las líneas celulares con los distintos tratamientos, vemos que la viabilidad es superior en DHT versus el tratamiento con ENZ en células LNCaP scr a las 24 y 48 horas (24 hrs, $p= 0.0343$; 48 hrs, $p = 0.0105$) (**Figura 26A**), mientras que en la comparación de la viabilidad entre DHT y la combinación de tratamientos existe una diferencia significativa solo a las 48 horas, favorable para DHT (48 hrs, $p= 0.0088$).

Respecto a las células shREST no se observó ninguna diferencia significativa en la viabilidad entre tratamientos (**Figura 26B**).

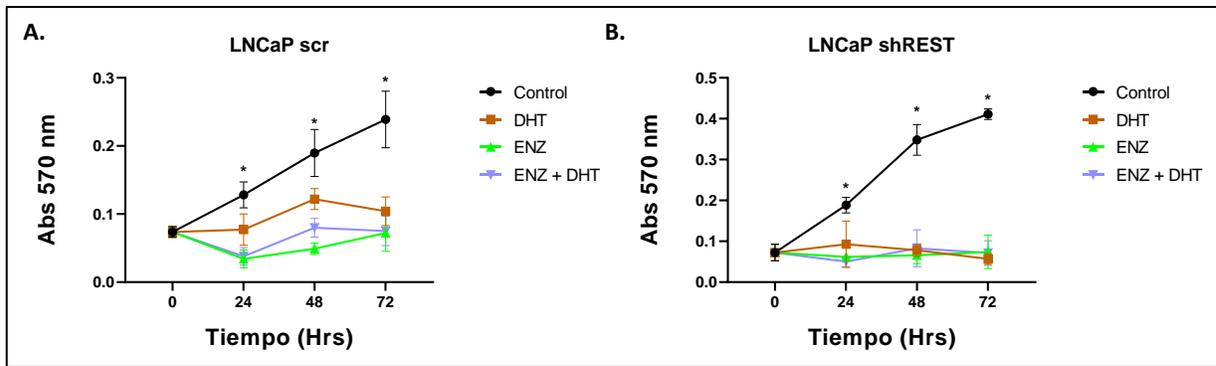


Figura 26. Evaluación de la viabilidad de células LNCaP scr y shREST a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos. A. Gráfico que representa la viabilidad de las células LNCaP scr. **B.** Gráfico que representa la viabilidad de las células LNCaP shREST para los distintos tratamientos. Prueba de ANOVA de dos vías, N=4, $p < 0.05$.

Cuando se realizó el análisis de comparación de la viabilidad entre las dos líneas con respecto a un tratamiento en particular, se observó que scr presenta una mayor viabilidad que la línea shREST para la exposición de DHT desde las 48 horas (48 hrs, $p = 0.0110$; 72 hrs, $p = 0.0069$) (**Figura 27A**).

Para el tratamiento con enzalutamida se observó una mayor viabilidad de las células shREST solo a las 24 horas de tratamiento (24 hrs, $p = 0.0379$), mientras que en los siguientes tiempos solo hubo una tendencia a la mayor viabilidad de estas células con respecto al control (**Figura 27B**).

En los resultados de la combinación de DHT + ENZ, no se observó ninguna diferencia significativa entre las dos líneas celulares (**Figura 27C**).

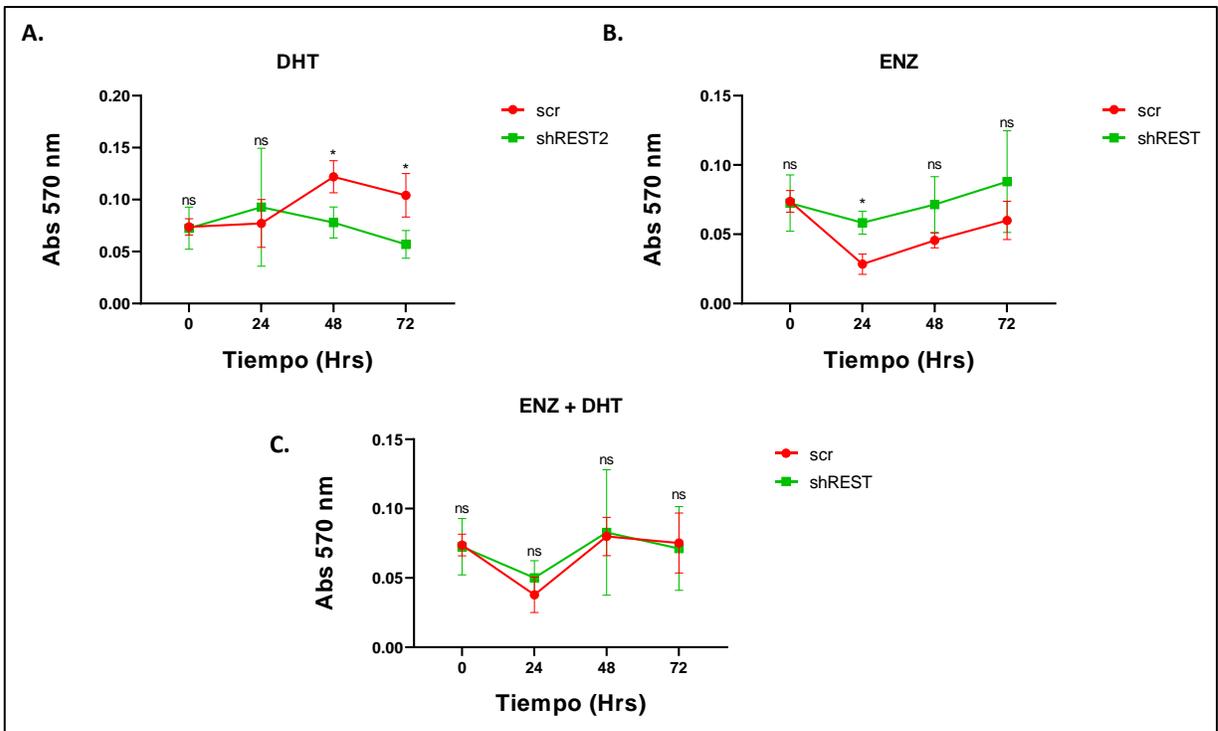


Figura 27. Comparación de la viabilidad de células LNCaP scr y shREST frente a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos. A. Gráfico que representa la viabilidad de scr y shREST a DHT. **B.** Gráfico que representa la viabilidad de scr y shREST a ENZ. **C.** Gráfico que representa la viabilidad de scr y shREST a la combinación de ENZ más DHT.

5.11. Evaluación de la viabilidad celular de las líneas NULL y sobreexpresadas para REST frente a la incubación de dihidrotestosterona (DHT), enzalutamida (ENZ) y DHT + ENZ.

Para evaluar si la sobreexpresión de REST tuvo algún efecto en la viabilidad de las células 22rv1 frente a la exposición de enzalutamida, las células 22rv1 NULL y REST-HA fueron expuestas a DHT, ENZ y la combinación de ambos.

De acuerdo con el análisis por línea celular, las células NULL no presentan diferencias significativas entre la viabilidad observada entre las condiciones DHT y ENZ **(Figura 28A)**.

Para el caso de las células con sobreexpresión de REST, se observaron resultados similares, no habiendo diferencias significativas entre los resultados de la exposición a las condiciones aplicadas **(Figura 28B)**.

Con respecto al análisis de cada uno de los tratamientos en particular, se observa que hubo diferencias significativas entre 22rv1 REST-HA y NULL para todos los tiempos evaluados, en todas las condiciones de exposición, teniendo las células con sobreexpresión de REST una menor viabilidad en comparación con su contraparte control frente a la exposición con enzalutamida **(Figura 29)**.

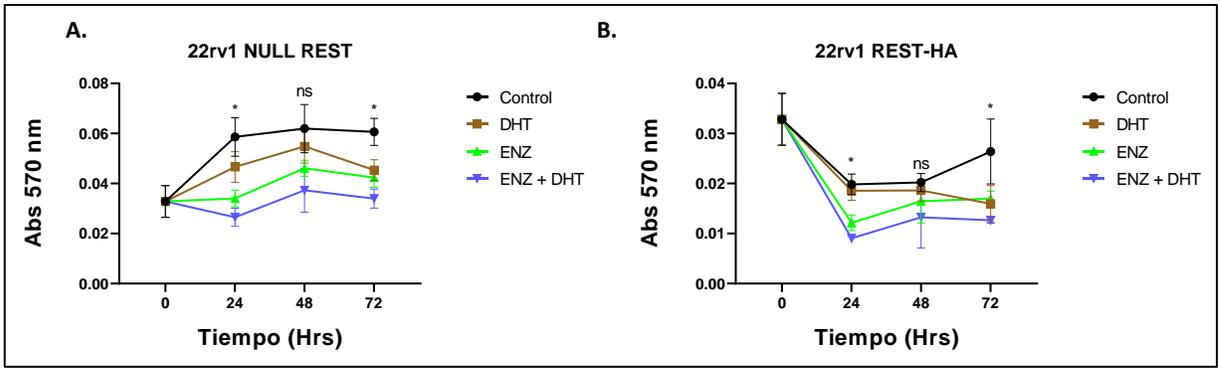


Figura 28. Evaluación de la viabilidad de células 22rv1 NULL y REST-HA a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos. A. Gráfico que representa la viabilidad de las células 22rv1 NULL. B. Gráfico que representa la viabilidad de las células 22rv1 REST-HA para los distintos tratamientos. Prueba de ANOVA de dos vías, N=4, $p < 0.05$

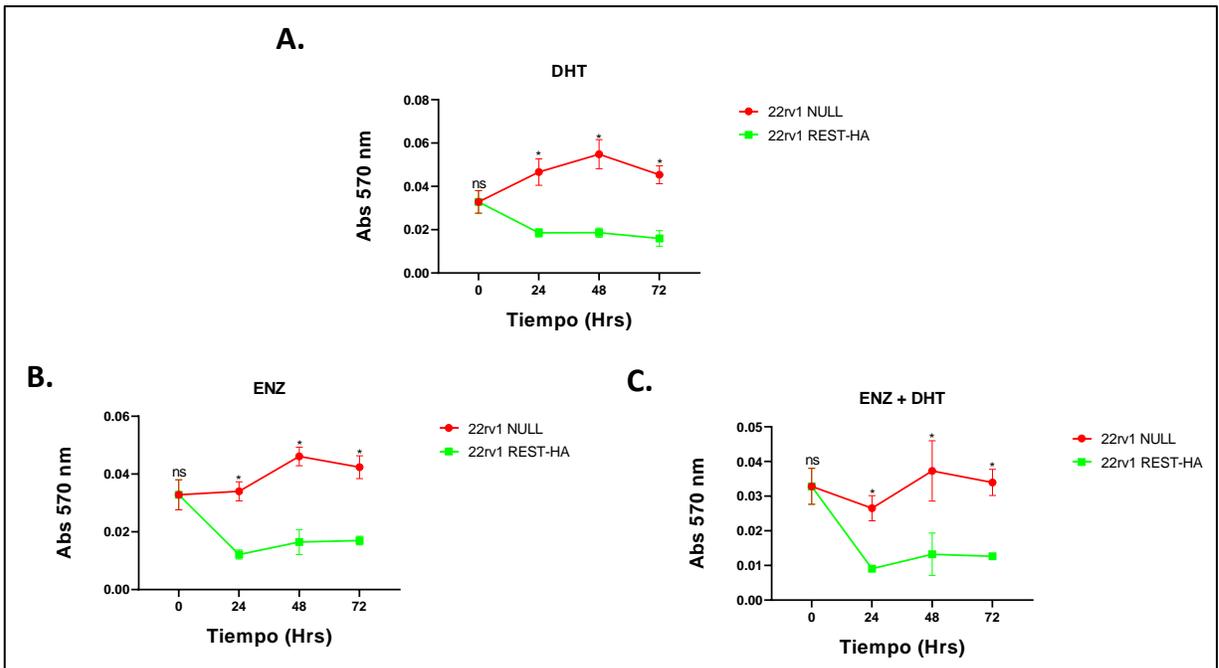


Figura 29. Comparación de la viabilidad de células 22rv1 NULL y REST-HA frente a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos. A. Gráfico que representa la viabilidad de NULL y REST-HA a DHT. B. Gráfico que representa la viabilidad de NULL y REST-HA a ENZ. C. Gráfico que representa la viabilidad de NULL y REST-HA a la combinación de ENZ más DHT.

De acuerdo con nuestra hipótesis, evaluamos las contrapartes privadas frente a cada DHT, ENZ y combinación de ambos. Las células 22rv1 NULL privadas presentaron un aumento significativo de su viabilidad frente a DHT en comparación a REST-HA, mientras que en la condición de enzalutamida sola y la combinación de DHT y ENZ, no se observaron diferencias significativas entre las dos líneas celulares (Figura 30).

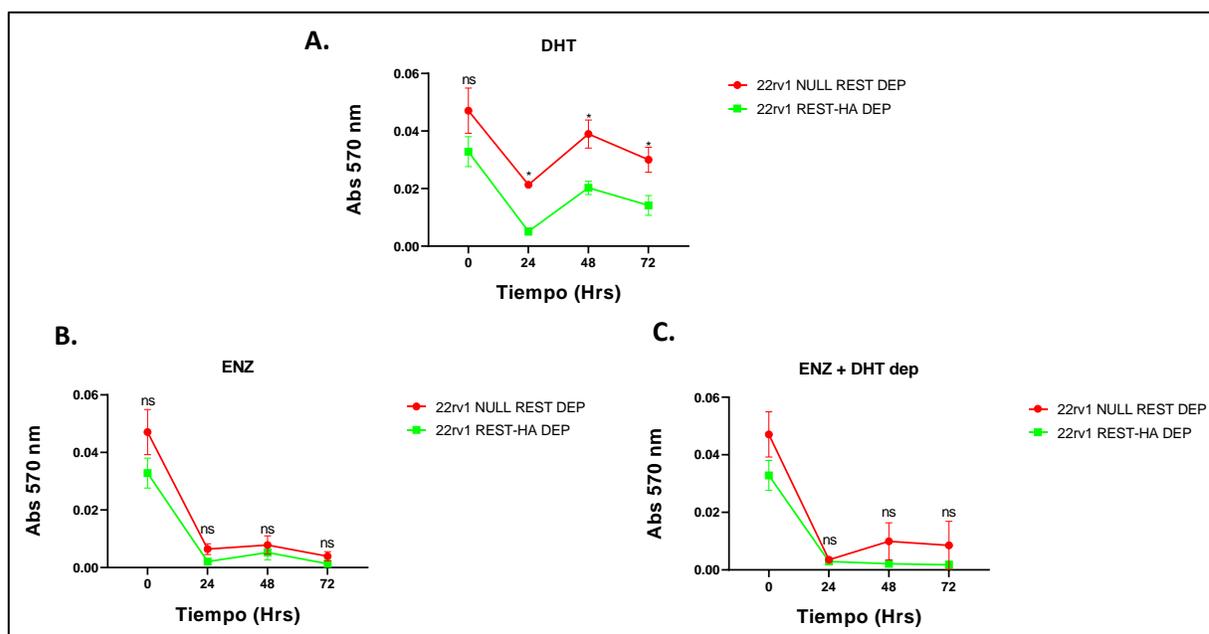


Figura 30. Comparación de la viabilidad de células 22rv1 NULL DEP y REST-HA DEP frente a la exposición de DHT, ENZ y combinación de ambos. A. Gráfico que representa la viabilidad de NULL DEP y REST-HA DEP a DHT. **B.** Gráfico que representa la viabilidad de NULL DEP y REST-HA DEP a ENZ. **C.** Gráfico que representa la viabilidad de NULL DEP y REST-HA DEP a la combinación de ENZ más DHT.

6. Discusión

6.1. Expresión de REST en líneas celulares y muestras de pacientes con CaP.

El factor REST fue evaluado en distintas líneas celulares de CaP, siendo la línea DU145 la que presentó mayores niveles de transcritos, y PC3 la que presentó mayores niveles de proteína del factor en fracciones nucleares. Estos resultados son similares a los encontrados en otras publicaciones respecto a niveles de mRNA de REST, coincidiendo con que DU145 presenta los mayores niveles, pero difiere con Chang et al. respecto a los niveles proteicos, en donde la línea LNCaP presentó los mayores niveles⁵⁴. Las diferencias con Chang et al, pueden deberse a que ellos realizaron sus evaluaciones de niveles proteicos en extractos totales, y no en extractos proteicos luego de un fraccionamiento celular.

Debido a que en esta tesis se desea evaluar el efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de REST en líneas celulares que responden a andrógenos, se escogió a LNCaP como la línea dependiente de andrógeno con mayores niveles de transcritos de REST para el silenciamiento, mientras que se seleccionó a 22rv1 para la sobreexpresión puesto que también responde a andrógenos y presenta los menores niveles de transcritos de REST.

Una observación interesante es que PC3 mostró los mayores niveles proteicos en fracción nuclear para REST. Esta línea celular representa una etapa avanzada de la enfermedad, siendo una de las líneas comerciales que no expresa receptor de andrógeno y utilizada como modelo para el estudio de CRPC. En la literatura se ha observado una alta expresión proteica de REST en esta línea celular⁵⁴, la cual además ha sido seleccionada como modelo para analizar los efectos de la inducción del

fenotipo neuroendocrino con dovitinib⁵⁹. La exposición de este fármaco por un periodo de 3 semanas produjo un aumento de los marcadores neuroendocrinos con una concomitante disminución de la expresión del transcrito de REST en células LNCaP y PC3. Estos resultados apoyarían a que los niveles de REST en células PC3 son suficientes para estimular la transdiferenciación a un fenotipo neuroendocrino una vez que se disminuyen⁵⁹. De acuerdo con búsquedas realizadas en la base de datos *The Human Protein Atlas* (disponible en <https://www.proteinatlas.org/>), las células PC3 muestran una alta expresión del mRNA PRICKLE1, que codifica para la proteína RILP, que es encargada de la traslocación de REST al núcleo⁶⁰, algo que podría explicar la alta concentración de este factor en el núcleo de esta línea, aun cuando PC3 muestra positividad a marcadores neuroendocrinos⁶¹.

Svensson et al. demostró que la expresión del AR en CaP está íntimamente relacionado a la acción de represión de REST y a su expresión⁶², por lo que células que tienen alta expresión de AR es esperable que también lo sean para REST, como LNCaP⁶¹, algo que concuerda con nuestros resultados. Por otro lado, 22rv1 muestran los menores niveles de REST entre las células dependientes de andrógeno evaluadas. Esto podría explicarse debido a que estas células presentan los mayores niveles de SRMM4 y β -TRCP, por lo que el mRNA de REST generado estaría siendo procesado para obtener una alta cantidad de REST⁴ y, además, β -TRCP estaría ubiquitinando el producto proteico para que sea degradado vía proteosoma (observaciones realizadas en *The Human Protein Atlas*).

Debido a que REST es un factor represor que interactúa con secuencias consenso específicas del DNA, en donde recluta maquinaria de represión transcripcional,

se esperó encontrar su localización en el núcleo, lo cual fue efectivamente demostrado por inmunofluorescencia indirecta en las cuatro líneas celulares evaluadas y por inmunohistoquímica cromogénica en las muestras de pacientes con CaP que fueron incluidas en el TMA, coincidiendo con otras publicaciones que muestran resultados similares⁶².

Además de la inmunotinción nuclear, en las muestras de pacientes con CaP se observó marca con DAB en citoplasma. En el conjunto de pacientes evaluados no se observó una correlación entre el tipo de marca con el puntaje Gleason. Este es el segundo trabajo en donde se observa este patrón en biopsias de pacientes con cáncer de próstata⁶².

REST es un factor represor, por lo que debe traslocarse al núcleo para ejercer su función. En su translocación participan algunas proteínas, tales como RILP (PRICKLE1), Huntingtina, dynactin p150^{glued} y HAP1⁶³. Por lo que en pacientes en donde se observa un patrón preferentemente citosólico podría tener alguna desregulación en el funcionamiento del complejo proteico que trasloca REST al núcleo. Sería interesante evaluar la localización de estos componentes para dilucidar si la acumulación/no transporte de REST se debe a una desregulación de esta maquinaria de transporte y/o a la de regulación post traduccional.

Adicionalmente, se muestra en nuestros resultados que no existe una relación de los niveles de REST con puntaje Gleason, algo también observado por Svensson et. al. a través de estudios inmunohistoquímicos⁶². Sería interesante evaluar REST en biopsias de pacientes sometidos ADT. Los pacientes incluidos en este estudio no poseían información de tratamiento al momento del análisis.

Además de identificar a REST en los modelos de estudio antes mencionados, quisimos evaluar la localización en cultivos 3D.

Los cultivos primarios provenientes de pacientes con CaP desarrollados en 3D, permiten entregar una mejor aproximación del desarrollo tumoral, preservando las interacciones celulares⁶⁴. Estos modelos permiten estudiar distintos marcadores y algunos ensayos funcionales, ej: liberación de andrógenos desde los cultivos en respuesta a diversos estímulos, identificación de diversos marcadores, etc, en los cuales se ha comenzado a trabajar paralelamente al desarrollo de esta tesis. De acuerdo con estas razones, quisimos validar nuestros resultados anteriores con este prometedor modelo confirmando que la ubicación de REST también es nuclear en estos cultivos, por lo que estas observaciones robustecen los resultados mostrados en los otros modelos analizados.

6.2. Evaluación de los genes inductores de la TEM y marcadores de epitelio-mesénquima.

En esta tesis se evaluaron los niveles de expresión de los FT inductores de la TEM, Snail (gen SNAI1), Slug (gen SNAI2), Twist (TWIST1) y ZEB1.

Los niveles de mRNA de SNAI1 no presentaron diferencias entre scr y shREST, pero hubo una tendencia a la disminución en la línea silenciada. SNAI2 presentó un aumento significativo a nivel de transcritos, Twist (mRNA y proteína) también se observó aumentado, mientras que ZEB1 no mostró diferencias. Por otro lado, en las líneas con sobreexpresión SNAI1 aumentó significativamente sus niveles de transcritos y proteicos, SNAI2 elevó sus niveles de mRNA, Twist disminuyó su expresión y ZEB1

disminuyó sus niveles de transcritos y proteicos a nivel nuclear, mientras que sus niveles citoplasmáticos mostraron una tendencia al aumento.

Para lograr un mejor análisis de los hallazgos realizados en esta tesis, se realizó un estudio de los promotores de los cuatro reguladores de la TEM estudiados para identificar si poseen sitios putativos de unión a REST. Esto mismo se realizó a la inversa, para evaluar si REST tiene sitios de unión a los reguladores. Para llevar a cabo este estudio se consultó la base de datos *Eukaryotic Promotes Database* disponible en el sitio <http://epd.vital-it.ch>. En ella se realizó una búsqueda de las regiones promotoras para REST, SNAI1, SNAI2, TWIST1 y ZEB1 en *Homo sapiens*. Una vez encontrados los genes, se realizó el análisis de las secuencias promotoras mediante la herramienta *Transcription Factor Motifs* (JASPAR CORE 2018 *vertebrates*). Cada una de las predicciones de la unión de un factor de transcripción fue calculado con un $p < 0.001$ (**Figura 31**).

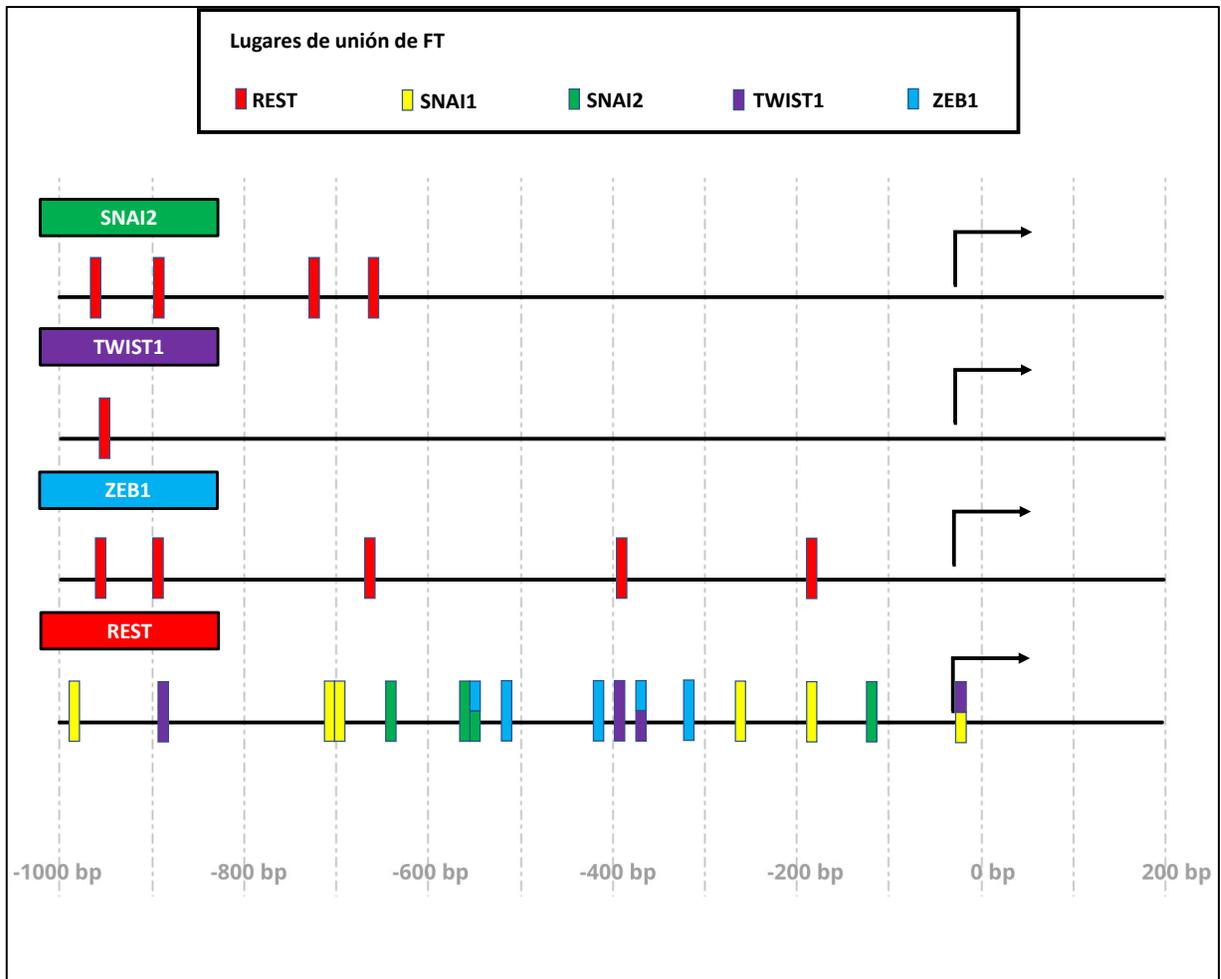


Figura 31. Genes reguladores de la TEM contienen elementos de unión a REST, y REST presenta elementos de unión para reguladores de la TEM. Las regiones promotoras de los genes SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1 y REST son representados desde 1000 pb río arriba a 200 pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción (representada por flechas). Los sitios putativos de unión son representados en rectángulos rojos para REST, verdes para SNAI2 (Slug), púrpuras para TWIST1, y azules para ZEB1. Rectángulos con distintos colores indican la posible unión de uno o más factores a un mismo sitio al promotor de un gen. Los sitios de unión son aproximados y fueron obtenidos desde la *Eukaryotic Promotes Database* (<http://epd.vital-it.ch>) mediante la herramienta JASPAR. Cada uno de los sitios de unión es calculado con un $p < 0.001$.

Entre los diferentes marcadores canónicos de TEM evaluados, los resultados de los niveles proteicos de Snail no coinciden con lo propuesto en nuestra hipótesis.

En el año 2013, se identificó que miR-124a es regulado por REST^{65,66}, y que la disminución de este microRNA aumenta la expresión de Snail⁶⁷. Aunque esta última observación se ha realizado en glioblastoma multiforme, sería interesante evaluar los niveles de este microRNA en nuestras células. Las células 22rv1 son las líneas celulares de CaP que presentan los mayores niveles de este miR (*The Human Protein Atlas*), por lo que el aumento de REST podría provocar un impacto significativo en los niveles de expresión de este regulador. Si bien las observaciones anteriores fueron realizadas en tejido de origen neural, no podemos descartar este fenómeno ya que el comportamiento de REST y la maquinaria de represión depende del contexto celular en el cual se haga la evaluación⁶⁸. Adicionalmente destacamos que Snail no posee ningún sitio putativo de unión a REST, por lo que es probable también que REST no ejerza una acción directa en Snail (figura 31).

Aun con el aumento o disminución de Snail a nivel proteico, los cambios en este factor no se relacionan con la modificación de la expresión de vimentina, la cual tiene un comportamiento inverso con la expresión de este factor de transcripción según nuestros resultados. Los niveles de vimentina se relacionan más con los cambios observados en Twist y ZEB1. Estos hallazgos podrían dar cuenta de que REST podría contribuir a establecer fenotipos de TEM incompleta, tal como se ha evidenciado en otras publicaciones. Destacamos que alguno de estos fenotipos posee expresión de genes relacionados a mesénquima, pero muchas veces conservando aquellos asociados a fenotipo epitelial, como E-cadherina^{69,70}. Esto último es coherente con nuestras

observaciones establecidas en células con silenciamiento de REST, en las cuales hay un aumento de vimentina, pero con una conservación de E-cadherina.

La tendencia al aumento de Twist1 coincide con los hallazgos de Chang y colaboradores en donde se observó un incremento significativo de este FT en células LNCaP con silenciamiento de REST y su disminución en células 22rv1 que lo sobreexpresan⁵⁴.

El análisis que se presentan en la figura 31 apoya los hallazgos del aumento significativo de Twist en las líneas silenciadas para REST, ya que según la base datos, REST tiene un único sitio putativo de unión al promotor de TWIST1, por lo que el silenciamiento de REST podría inhibir la represión transcripcional que ejerce REST al unirse a esta fracción reguladora de TWIST1 (representado por el pequeño rectángulo púrpura en la parte inferior izquierda del esquema). Algo similar podría estar ocurriendo con SNAI2, el cual presenta cuatro posibles sitios de unión para REST en su promotor.

Con respecto a ZEB1, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio que muestre una relación directa entre este inductor de TEM y REST. En la actualidad, se ha identificado que ZEB1 se encuentra sobreexpresado en muestras de pacientes con CRPC con diferenciación neuroendocrina⁷¹, algo que solo coincide con nuestros resultados de los niveles de transcritos de este factor en células LNCaP con silenciamiento de REST. Por otro lado, en nuestro trabajo mostramos que la sobreexpresión de REST provoca una disminución a nivel de transcritos, una tendencia a la disminución de la proteína ZEB1 a nivel nuclear y una tendencia al aumento en la fracción citosólica. Aunque los niveles de mensajero pueden contribuir a explicar su disminución a nivel nuclear en células con sobreexpresión de REST es interesante que ZEB1 presente una expresión diferencial entre núcleo y citoplasma. En el año 2022, Guo y

colaboradores reportaron que ZEB1 tiene roles distintos según la localización en la que se encuentre, ejerciendo su reconocida acción de activar el proceso de TEM cuando está en el núcleo, pero en el citoplasma es capaz de unirse a monómeros de actina libre y a RhoA, inhibiendo la migración, invasión y la proliferación⁷¹, lo que concuerda con nuestros resultados.

Por otro lado, la disminución del nivel de transcritos de ZEB1 puede explicarse por la acción que ejerce REST en los sitios reguladores de la expresión de genes, reclutando la maquinaria de represión a través de sus dominios N- y C-terminal. De acuerdo con nuestro análisis *in silico* de promotores, esto podría ser posible, ya que el gen ZEB1 presenta 5 sitios de unión putativos para REST (figura 31). Sin embargo, REST podría tener un papel en la regulación de ZEB1 a través de la familia de microRNAs 200 (miR-200). A este respecto, en el año 2020, se identificó en epitelio olfatorio una relación entre esta familia de miR con REST, observando que la reducción de miR-200a podía ser revertida por la expresión de REST. Lo anterior llama la atención puesto que este factor es descrito en muchas publicaciones como un represor de la transcripción, pero en algunas ocasiones puede funcionar como un activador, en especial, con su asociación a TET3, algo que también fue demostrado en el epitelio olfatorio⁷². Este mecanismo podría ser una vía alternativa a la disminución de la transcripción de ZEB1 en nuestras células, lo que provocaría un aumento de la expresión de miR-200 con la concomitante disminución en los niveles de transcritos de ZEB1.

Adicionalmente a los cambios descritos para los FT reguladores de la TEM, evaluamos los niveles de expresión de vimentina, filamento intermedio característico de células mesenquimatosas⁷³.

El promotor del gen VIM presenta varios sitios de unión a factores que activan e inhiben su transcripción. Entre ellos se destaca a Sp1, el cual, al unirse al promotor de VIM, aumenta su expresión significativamente. Por el contrario, el impedimento de la unión de Sp1 al promotor, hace que la expresión disminuya⁷⁴. Este impedimento, entre otros mecanismos, puede ser debido a la unión de factores represores al promotor, remodelando la estructura cromatínica y haciendo que el sitio de unión a Sp1 sea menos accesible. En estudios realizados en líneas celulares de neuroblastoma se observó que Sp1 aumenta la expresión de sinapsina I (SYN I), mientras que REST impide la unión de Sp1, disminuyendo SYN I⁷⁵ por lo que un mecanismo similar podría estar ocurriendo en nuestro modelo. Por otro lado, Sp1 tiene varios sitios putativos de unión a REST, por lo que este último podría estar regulando la expresión de Sp1, impactando de manera indirecta en la expresión de vimentina.

Por otra parte, en el proceso de TEM, los factores de transcripción estudiados en esta tesis son capaces de causar el aumento de vimentina⁷⁶, por lo que el aumento de Twist en nuestras células silenciadas, aumentarían a su vez los niveles de este filamento intermedio. A diferencia de lo que ocurre en las células sobreexpresadas, en donde la disminución de Twist y ZEB1 nuclear provocarían una disminución de vimentina.

Debido a los cambios observados en Twist y ZEB1, se realizó una evaluación de KLF4 a nivel de transcritos y proteínas.

KLF4 es un factor de transcripción relacionado a la adquisición de fenotipo de *cancer stem cell* (Figura 34 Anexo)⁷⁷ y uno de los cuatro genes esenciales en la inducción del fenotipo de *stem cells* pluripotentes⁷⁸. Nuestros resultados indican que células 22rv1 con sobreexpresión de REST mostraron una disminución significativa de este

factor a nivel de transcritos y de proteínas (figura 34). Estos resultados dan cuenta que REST también podría tener un rol en la represión de características de *cancer stem cell*, algo que también fue descrito por Chang et al., en donde se muestra el mismo comportamiento para CD44⁵⁴.

En nuestros modelos utilizados podemos dar cuenta que el factor REST es capaz de reprimir parcialmente la expresión de los factores iniciadores del proceso de transición epitelio mesénquima, al disminuir la expresión de Twist y ZEB1, asociado a la disminución de la expresión de vimentina. Estos resultados son apoyados en parte por el silenciamiento de REST, en donde se observó un aumento significativo de Twist a nivel nuclear. Es interesante el comportamiento que se observa a nivel de Snail, lo que da pie a realizar nuevas investigaciones para explicar su aumento en las líneas REST-HA. Una propuesta a considerar es que en las células 22rv1, REST podría funcionar como un activador de Snail bajo los mecanismos descritos anteriormente.

6.3. Evaluación de AR, ARv7 y KLK3 en células de CaP con silenciamiento y sobreexpresión de REST, y evaluación de la viabilidad a enzalutamida.

En las células LNCaP con silenciamiento de REST se observó una disminución significativa de los transcritos de AR y KLK3 en comparación a la contraparte *scramble*. Estos hallazgos se relacionan a la historia natural que posee el cáncer de próstata cuando adquiere características neuroendocrinas, lo que se traduce en una disminución de la expresión de AR con la consecuente disminución de PSA (KLK3)⁴⁶.

Lo anterior también se relaciona con los resultados observados en los ensayos de viabilidad de MTT. En las células LNCaP scr se observa una mayor viabilidad respecto a su contraparte shREST, debido a que efectivamente la línea scr posee una tendencia a tener mayor expresión de AR, por lo que la señalización de proliferación es más efectiva en comparación a la línea silenciada. Respecto a los tratamientos con enzalutamida, solo se observó una diferencia significativa a las 24 horas de haber iniciado el experimento. Luego de esto, las diferencias comienzan a estrecharse. Este fenómeno podría ser explicado de acuerdo con los efectos que podría tener el tratamiento con enzalutamida por tiempo prolongados, ya que se ha visto en otras publicaciones que tratamientos prolongados producen una disminución en la expresión de REST en conjunto con un aumento de marcadores neuroendocrinos. Lo anterior se puede relacionar con la reversión del comportamiento de enzalutamida al adicionar DHT, ya que DHT estimula la disminución de factores neuroendocrinos en conjunto con el aumento de REST. Esto se explica por la íntima relación regulatoria que se ha descrito entre REST y AR⁶².

Interesantemente, la sobreexpresión de REST provocó una disminución de AR a nivel nuclear y un aumento a nivel citosólico. Esto se contrapone a las observaciones realizadas por Svensson, ya que esta reducción se acompaña también por un bajo nivel de transcritos de KLK3⁶².

La diferencia entre los niveles de REST en las distintas fracciones celulares pueden tener que ver con la translocación de AR al núcleo. Este proceso tiene relación con la liberación de AR de su unión con HSP90, la cual es inhibida por la acción de la proteína quinasa A (PKA)⁷⁹. Es posible que, por algún mecanismo aun no conocido, REST inhiba la translocación de AR al núcleo.

Lo anterior se relaciona con los resultados observados cuando se incubaron las células REST-HA con DHT, ENZ y la combinación de ambos. Es posible que la inhibición de la translocación de AR sea altamente efectiva, y que ni la incubación de DHT pueda aumentar los niveles de viabilidad, comparables a la del control. Para el caso de la incubación con enzalutamida, las líneas REST-HA mostraron una viabilidad significativamente menor que las células control, pudiendo tener un efecto sumativo a la acción que ya ocurre por el solo hecho de sobreexpresar REST.

Adicionalmente, el tratamiento por un mes de las líneas NULL y REST-HA con deprivación androgénica acentúan aún más lo descrito anteriormente. La falta de andrógenos en el medio de cultivo disminuye significativamente la viabilidad de las células NULL, teniendo un mismo comportamiento que las REST-HA al estar expuestas a ENZ y a DHT + ENZ. Si las células NULL son incubadas únicamente con DHT, se muestra una mayor viabilidad que las células REST-HA, lo que se traduciría como un rescate en la viabilidad celular, algo que no ocurre en las células 22rv1 con

sobreexpresión de REST, siendo DHT insuficiente para revertir el efecto de la supuesta inhibición que ejerce REST en la expresión y/o la translocación de AR al núcleo.

El receptor de andrógenos actúa como factor de transcripción para una serie de genes, entre ellos algunos relacionados con la proliferación celular⁸⁰. Esta transcripción implica que AR se haya translocado al núcleo gracias a la acción de PKA y a su liberación de HSP90, por lo tanto, estos hechos son coherentes con nuestros resultados en las células 22rv1 con sobreexpresión de REST, ya que ellas presentan una disminución significativa de su proliferación.

Por otro lado, en los extractos nucleares y citosólicos de las líneas 22rv1 con sobreexpresión de REST hubo una disminución de los niveles de ARv7. Esta variante de *splicing* de AR es una de las variantes más frecuentes en aparecer en el contexto de privación androgénica y es funcional y, en este caso, su disminución también podría dar cuenta de los niveles de mensajero de KLK3.

En el año 2014, Antonarakis y colaboradores describieron que la expresión de ARv7 en CaP otorgaría resistencia frente a los tratamientos de enzalutamida y acetato de abiraterona⁸¹. Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados, en donde las células con alta expresión de REST presentaron bajos niveles proteicos de esta variante de *splicing* y una menor viabilidad a la incubación con enzalutamida.

6.4. Sobreexpresión de REST disminuye la proliferación, la migración e invasión en células 22rv1

Dentro de las características distintivas del cáncer, la proliferación es un proceso esencial en el comportamiento agresivo⁸².

En nuestras evaluaciones con ensayos MTT, encontramos que las células 22rv1 con sobreexpresión de REST mostraron una proliferación menor en comparación al control y una disminución en la capacidad de formación de colonias.

En varios estudios en tumores de origen epitelial se ha evaluado el efecto de REST sobre el proceso de proliferación, estableciéndose hasta este momento algunas propuestas que dan respuesta a este fenómeno. Uno de estos mecanismos incluye a la cascada de señalización de PI3K-Akt. En uno de estos estudios se observó que la disminución de los niveles de REST en células de cáncer de colon aumentó la fosforilación de Akt⁸³, factor relevante en las señales que conducen a las células a proliferación. Hallazgos similares fueron observados en células de cáncer de pulmón de células pequeñas⁴⁴. Otro mecanismo, es la relación de REST con LIN28A, proteína involucrada en procesos de desarrollo y autorrenovación de células troncales embrionarias. En células de cáncer de mama, la disminución en la expresión de REST provoca un aumento de LIN28A, lo que induce un incremento en la proliferación celular⁸⁴.

Estos estudios, sumado a lo ya descrito en relación con AR, apoyan a nuestros resultados, lo que plantea un nuevo desafío en investigación para dilucidar mediante cuál mecanismo REST disminuye la proliferación en células 22rv1 y la capacidad de formación de colonias.

Por otro lado, las células NULL y REST-HA deprivadas tuvieron un descenso en su proliferación con respecto a su contraparte no deprivada. Esto podría

relacionarse a que, en condiciones de privación, las células no son capaces de activar eficientemente al receptor de andrógenos, lo que disminuiría su capacidad proliferativa⁸⁰.

También nos interesó evaluar las capacidades migratorias e invasivas de las células con sobreexpresión de REST de manera de dar respuesta a nuestra hipótesis de que este factor reprime el fenotipo maligno. Entre nuestros resultados, observamos que en las células 22rv1 REST-HA disminuyen las capacidades de migración e invasión, asociándose con la disminución en la expresión de Twist, ZEB1 y vimentina.

En primer lugar, vimentina se ha relacionado con la motilidad celular. En estudios, en donde se transfectaron células de cáncer de mama con un vector de sobreexpresión de vimentina se observó un aumento de la motilidad, mientras que el silenciamiento lo disminuye. Además, se observa una desorganización de las interacciones célula-célula, como desmosomas⁷³. Estos resultados contribuirían a explicar nuestras observaciones en que las células con sobreexpresión de REST disminuyen su migración.

Vimentina es un filamento intermedio característico de células mesenquimales, las cuales tienen una alta capacidad de migración e invasión, lo que en el contexto del cáncer se traduciría en favorecer el proceso de metástasis y empeorar el pronóstico de los pacientes⁷⁴. La invasión de las células mesenquimales requiere la degradación de matriz extracelular a través de enzimas proteolíticas tales como metaloproteinasas de la matriz (MMPs). La expresión de MMPs es regulada por factores de la transición epitelio mesénquima⁸⁵, los cuales, algunos de ellos, disminuyen su expresión en las células 22rv1 con sobreexpresión de REST.

En cáncer de mama, se describió una relación entre la expresión del factor Twist con MMP-2 y MMP-9 evaluados por inmunohistoquímica. Estos autores proponen a Twist como un regulador directo de estas dos metaloproteinasas⁸⁶. Lo anterior podría contribuir a dar explicación a nuestros resultados, ya que la disminución de Twist a nivel nuclear reduciría su capacidad de transcribir estas dos metaloproteinasas, disminuyendo así la capacidad de invasión presentada en la figura 25.

Resultados de nuestro laboratorio también han demostrado que en líneas de CaP, ZEB1 se asocia a la expresión de MMP-2 y MMP-7, a través de la acción de SPARC. En líneas PC3 con silenciamiento de SPARC, ocurre una disminución de ZEB1 y de MMP-2/-7, lo que lleva a una disminución de las capacidades migratorias e invasivas de esta línea celular⁸⁷. Debido a que en nuestras células con sobreexpresión de REST, las capacidades migratorias e invasivas están disminuidas, y la expresión de ZEB1 a nivel nuclear también, podríamos especular que esto se acompañaría además con una disminución en ambas MMPs descritas.

Finalmente, en cáncer de mama se ha relacionado el papel que posee REST sobre la expresión de MMP24, gen que aumenta su expresión en CaP. En este trabajo del año 2022, se muestra que el silenciamiento de REST provoca un aumento en la expresión de MMP24, el cual tiene la secuencia consenso de unión de REST a su promotor, posiblemente regulándolo⁸⁸. Es posible que esto también ocurra en nuestras células, en donde la sobreexpresión de REST disminuye la invasión.

7. Proyecciones de nuestro estudio

Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de REST en células con cáncer de próstata disminuyen algunas características asociadas al fenotipo maligno, tales como proliferación, migración e invasión. Estos fenómenos podrían ser explicados por una disminución de la expresión de Twist y ZEB1, lo que estuvo acompañado por disminución de vimentina, AR y ARv7. La disminución de AR y ARv7 tienen relación con la caída en la viabilidad de las células con sobreexpresión de enzalutamida, algo que se ve acentuado con la deprivación androgénica. Estas observaciones *in vitro* podrían extrapolarse a las estrategias de tratamiento de los pacientes con CRPC, quienes fueron primero tratados con ADT para luego ser tratados con inhibidores competitivos de AR, tales como enzalutamida. Es interesante remarcar que en nuestras células con sobreexpresión de REST, existe una disminución significativa de ARv7, el cual ha sido relacionado con resistencia a enzalutamida y acetato de abiraterona. Por lo tanto, la recuperación de la expresión de REST en estos pacientes podrían mejorar el pronóstico de los pacientes.

Consideramos que una evaluación de los niveles de REST en muestras de pacientes con y sin tratamiento (ADT y enzalutamida) contribuiría a establecer a REST como un factor de seguimiento y pronóstico, ya que su disminución aumentaría el fenotipo neuroendocrino (mal pronóstico) y su aumento sería un indicador beneficioso. Adicionalmente, dependiendo de la bibliografía consultada, la aparición de características neuroendocrinas en pacientes CRPC varía desde un 10-100%, por lo que realizar un seguimiento del estado de REST y administrar una terapia que impida su disminución impactaría positivamente en este grupo de pacientes, contribuyendo así a la

personalización del tratamiento del CaP, sobre todo considerando que este cáncer es altamente heterogéneo.

Por otro lado, nuestra investigación abre diversos frentes de investigación, tales como demostrar la interacción directa de REST con los promotores de SNAI1, SNAI2, TWIST1 y ZEB1; dilucidar de qué manera REST produce el aumento de la expresión de Snail; evaluar distintas vías de señalización que expliquen la disminución de la proliferación y, finalmente, evaluar la expresión de metaloproteinasas de la matriz para robustecer los resultados obtenidos en la evaluación de la migración e invasión en nuestras células.

Finalmente, y de acuerdo con los resultados obtenidos, podemos confirmar parcialmente nuestra hipótesis.

8. Modelo propuesto del efecto de REST en células de CaP sensibles a andrógenos

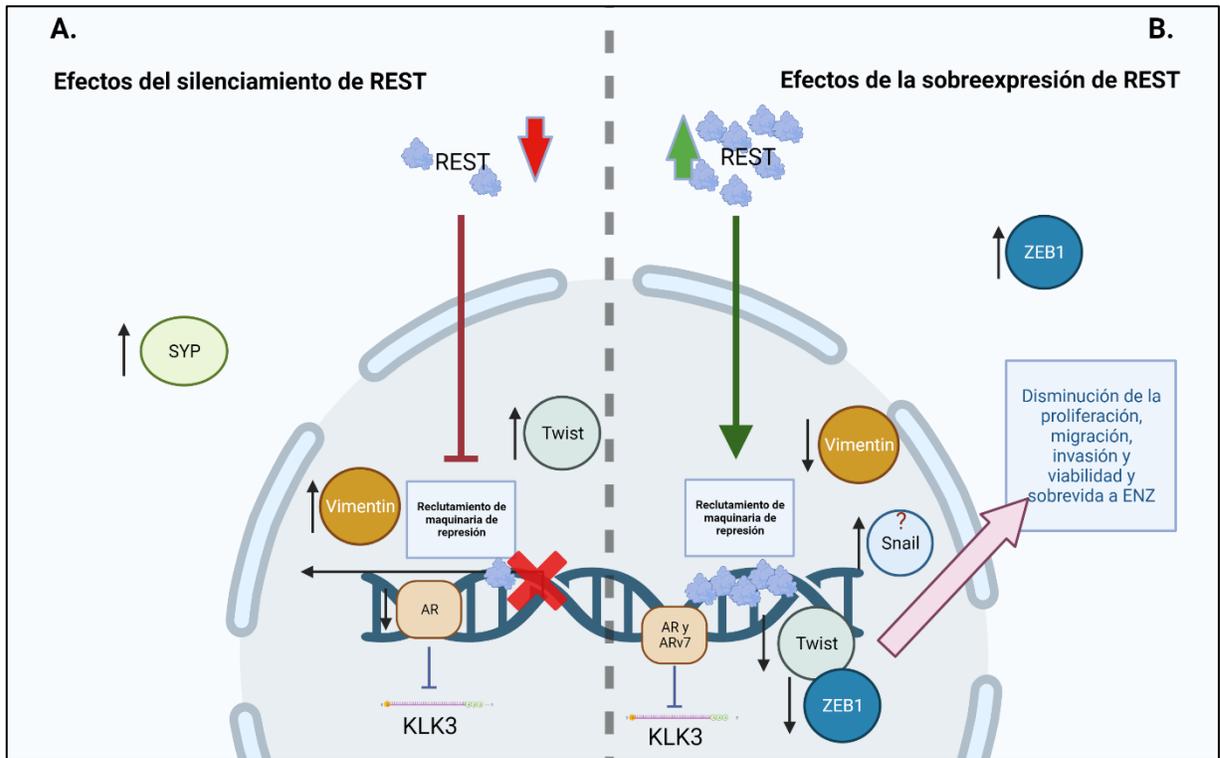


Figura 32. Efecto de REST en líneas celulares de CaP. Los cambios observados en las células de CaP evaluadas mostraron cambios a nivel de los factores reguladores de la TEM Snail, Twist y ZEB1. En A. se muestran los efectos a nivel celular del silenciamiento de REST, con aumento de sinaptofisina, Twist y vimentina, y disminución de AR. Hallazgos asociados a las características de NEPC. En B. se observan los efectos de la sobreexpresión de REST, con la disminución en la expresión de Twist, ZEB1 (nuclear), vimentina, AR, ARv7 y KLK3; y aumento de Snail y ZEB1 citosólico. Estos cambios pueden explicar parcialmente la disminución en proliferación, migración, invasión y la viabilidad a incubaciones con enzimas. Imagen creada a través de programa Biorender, Toronto, Ontario, Canadá.

9. Conclusiones

- REST disminuye la proliferación, migración e invasión en células 22rv1.
- El aumento de REST en células 22rv1 se correlaciona con la disminución de Twist, ZEB1 nuclear y vimentina, mientras que su silenciamiento en células LNCaP se correlaciona con aumento en la expresión de Twist y vimentina.
- REST disminuye la viabilidad de células 22rv1 a enzalutamida, lo que se ve acentuado con la deprivación androgénica, relacionándose con la disminución de AR a nivel nuclear, ARv7 y KLK3. Células LNCaP con silenciamiento de REST aumentan su viabilidad a enzalutamida.

10. Anexos

10.1. Evaluación de los niveles proteicos con control de carga RNA polimerasa

II

Para respaldar nuestros resultados obtenidos por *western blot*, realizamos la evaluación de otro control de carga adicional a histona H3. Esto con el fundamento de considerar como control alguna proteína de unión a DNA, al igual que la mayor parte de las proteínas de interés para esta tesis, tales como REST, Snail, Twist y ZEB1. Según sugerencias de la comisión evaluadora de tesis, escogimos RNA polimerasa II. En la figura 33, se muestran los resultados de *western blot* y su análisis con respecto a RNA polimerasa II. Los resultados obtenidos en esta evaluación son similares a los descritos con histona H3.

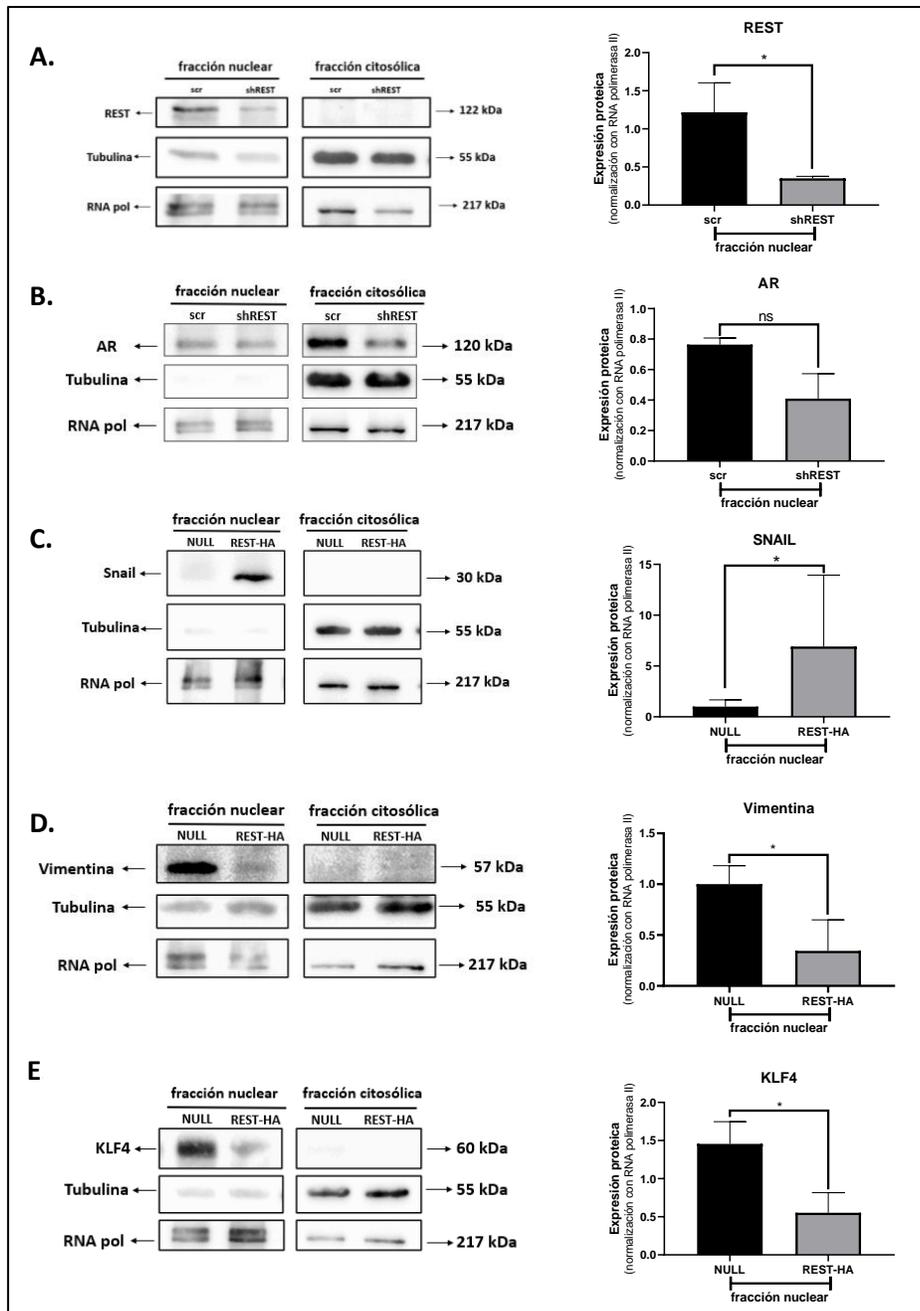


Figura 33. Evaluación de niveles de proteínas de interés en fracciones nucleares de células con silenciamiento y sobreexpresión de REST utilizando RNA polimerasa II como control de carga. A y B. Corresponden a la evaluación de REST y AR en células LNCaP con silenciamiento de REST, respectivamente. **C-E.** Corresponden a la evaluación de Snail, vimentina y KLF4 en células 22rv1 con sobreexpresión de REST, respectivamente. En la parte de la izquierda de la imagen se muestran los *westerns blot* representativos de cada determinación, mientras que a la derecha se presentan los gráficos de semi cuantificación.

10.2. Evaluación de KLF4 en líneas celulares 22rv1 con sobreexpresión de REST

Debido a que se encontró que Twist y ZEB1 se encuentran disminuidos a nivel nuclear, y que ambos se relacionan a la adquisición de características del fenotipo *cancer stem cells*, evaluamos adicionalmente la expresión de KLF4. En la figura 34, KLF4 disminuye sus niveles de transcritos y proteínas.

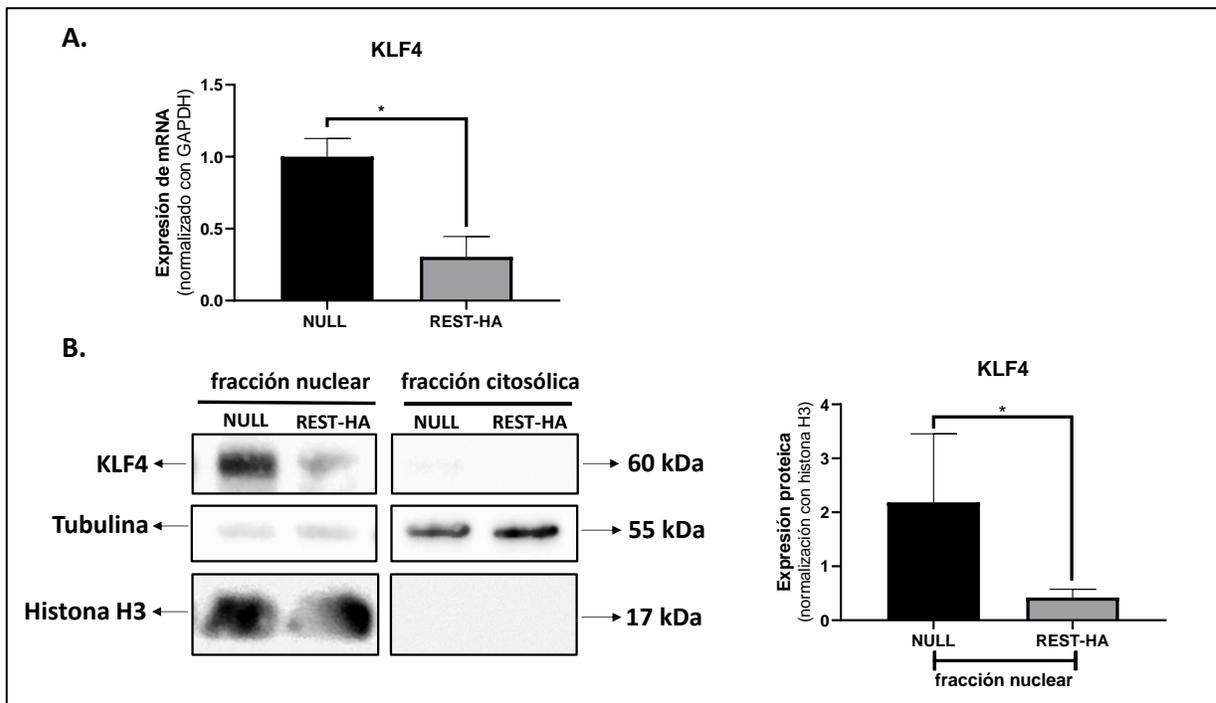


Figura 34. Evaluación KLF4 en células 22rv1 con sobreexpresión de REST. **A.** Expresión relativa del transcrito KLF4 en células NULL y REST-HA evaluado con RT-qPCR. **B.** Imagen representativa de los resultados de *western blot* de KLF4 (izquierda) y su gráfico de expresión relativa de niveles proteicos (derecha). Prueba Mann Whitney U, N=3, $p < 0.05$.

11. Referencias

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
2. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. Guía clínica próstata en personas de 15 años y más. MINSAL. ISBN 1ª. 2015.
3. Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN. World Health Organization [En línea] < <https://gco.iarc.fr/today/home> > [Consulta: agosto 2021].
4. Wong MC, Goggins WB, Wang HH, Fung FD, Leung C, Wong SY, Ng CF, Sung JJ. Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *European Association of Urology*, 70 (5): 862-874 (2016).
5. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*, 10(2): 63-89 (2019).
6. Barry MJ, Simmons LH. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. *Med Clin North Am.* 101(4): 787-806 (2017).
7. Borkenhagen JF, Eastwood D, Kilari D, See WA, Van Wickle JD, Lawton CA, Hall WA. Digital Rectal Examination Remains a Key Prognostic Tool for prostate Cancer: A National Cancer Review. *J Natl Compr Canc Netw*, 17(7): 829-837 (2019).
8. Chandrasekar T., et al., Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol.*, 4(3): 365-80. 2015.
9. Huang Y., et al., Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer (Review). *Oncology Letters* 15: 6063-6076 (2018).
10. Copeland BT, Pal SK, Bolton EC, Jones JO. The androgen receptor malignancy shift in prostate cancer. *Prostate.*, 78 (7): 521-531 (2018).
11. Soundararajan R, Paranjape AN, Maity S, Aparicio A, Mani SA. EMT, stemness and tumor plasticity in aggressive variant neuroendocrine prostate cancers. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018 Dec;1870(2):229-238. doi: 10.1016/j.bbcan.2018.06.006. Epub 2018 Jul 5. PMID: 29981816; PMCID: PMC6496942.
12. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, Marotz C, Giannopoulou E, Chakravarthi BV, Varambally S, Tomlins SA, Nanus DM, Tagawa ST, Van Allen EM, Elemento O, Sboner A, Garraway LA, Rubin MA, Demichelis F. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med.* 2016 Mar;22(3):298-305. doi: 10.1038/nm.4045. Epub 2016 Feb 8. PMID: 26855148; PMCID: PMC4777652.
13. Bluemm EG, Coleman IM, Lucas JM, Coleman RT, Hernandez-Lopez S, Tharakan R, Bianchi-Frias D, Dumpit RF, Kaipainen A, Corella AN, Yang YC, Nyquist MD, Monstaghel E., et al. Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer is Sustained through FGF Signaling. *Cancer Cell*, 32(4): 474-489 (2017).
14. Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, Zhang L, Feng FY, Thomas GV, Weinstein AS, Friedl V, Zhang C, Witte ON, Lloyd P, Gleave M, Evans CP, Youngren J, Beer TM, Retting M, Wrong CK, True L, Foye A, et al. Clinical and Genomic Characterization of Treatment-Emergent Small-Cell neuroendocrine Prostate Cancer: A Multi-institutional Prospective Study. *J Clin Oncol.*, 36(24): 2492-2503 (2018).

15. Vashchenko N, Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *Eur urol.*, 47(2): 147-55 (2005).
16. Hirano D, Okada Y, Minei S, Takimoto Y, Nemoto N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur Urol*, 45(5): 586-92; discussion 592 (2004).
17. Sasaki T, Komiya A, Suzuki H, Shimbo M, Ueda T, Akakura K, Ichikawa T. Changes in chromogranin a serum levels during endocrine therapy in metastatic prostate cancer patients. *Eur urol* 48(2): 224-9 (2005).
18. Tan MH, Li J, Xu HE, Mercher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.*, 36(1): 3-23 (2015).
19. He Y, Lu J, Ye Z, Hao S, Wang L, Kohli M, Tindall DJ, Li B, Zhu R, Wang L, Huang H. Androgen receptor splice variants bind to constitutively open chromatin and promote abiraterone-resistant growth of prostate cancer. *Nucleic Acids Res.*, 46(4): 1895-1911 (2018).
20. Jernberg E, Bergh A, Wikström P. Clinical relevance of androgen receptor alterations in prostate cancer. *Endocr Connect*, 6(8): R146-R161 (2017).
21. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Nakazawa M, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J. Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol* 1(5): 582-91 (2015).
22. Bastos DA, Antonarakis ES. CTC-derived AR-V7 detection as a prognostic and predictive biomarker in advanced prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn.*, 18(2): 155-163 (2018).
23. Kallio HML, Hieta R, Latonen L, Brofeldt A, Annala M, Kivinummi K, Tammela TL, Nykter M, Isaacs WB, Lilja HG, Bova GS, Visakorpi T. Constitutively active androgen receptor splice variants AR-V3, AR-V7 and AR-V9 are co-expressed in castration-resistant prostate cancer metastasis. *Br J Cancer*, 119(3): 347356 (2018).
24. Park SW, Kim JH, Lee HJ, Shin DH, Lee SD, Yoon S. The Expression of Androgen Receptor and Its Variants in Human Prostate Cancer Tissue according to Disease Status, and Its Prognostic Significance. *World J Mens Health*, 37(1): 68-77 (2019).
25. Hörnberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, Bergh A, Wikström P. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastasis is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One*, 6(4): e19059 (2011).
26. Thiel G, Lietz M, Cramer M. Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J Biol Chem*. 1998 Oct 9;273(41):26891-9. doi: 10.1074/jbc.273.41.26891. PMID: 9756936.
27. Thiel G, Ekici M, Rössler OG. RE-1 silencing transcription factor (REST): a regulator of neuronal development and neuronal/endocrine function. *Cell Tissue Res*, 359(1): 99-109 (2015).
28. Bithell A. REST: transcriptional and epigenetic regulator. *Epigenomics* 3(1): 47-58 (2011).
29. Zheng D, Zhao K, Mehler MF. Profiling RE1/REST-mediated histone modifications in the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(1):R9. doi: 10.1186/gb-2009-10-1-r9. Epub 2009 Jan 27. PMID: 19173732; PMCID: PMC2687797.

30. Raj B, O'Hanion D, Vessey JP, Pan Q, Ray D, Buckley NJ, Miller FD, Blencowe BJ. Cross-regulation between an alternative splicing activator and a transcription repressor controls neurogenesis. *Mol Cell* 43(5): 843-50 (2011).
31. Zhang X, Coleman IM, Brown LG, True LD, Kollath L, Lucas JM, Lam HM, Dumpit R, Corey E, Chéry L, Lakely B, Higano CS, Montgomery B, Roudier M, Lange PH, Nelson PS, Vessella RL, Morrisey C. SRRM4 Expression and the Loss of REST Activity May Promote the Emergence of the Neuroendocrine Phenotype in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 21(20): 4698-708 (2015).
32. Li Y, Donmez N, Sahinalp C, Xie N, Wang Y, Xue H, Mo F, Beltran H, Gleave M, Wang Y, Collins C, Dong X. SRRM4 Drives Neuroendocrine Transdifferentiation of Prostate Adenocarcinoma Under Androgen Receptor Pathway Inhibition. *Eur Urol* 71(1): 68-78 (2017).
33. Li Y, Zhang Q, Iovnicki J, Chen R, Fazil L, Wang Y, Gleave M, Huang J, Dong X. SRRM4 gene expression correlates with neuroendocrine prostate cancer. *Prostate* 79(1): 96-104 (2019).
34. Westbrook TF, Hu G, Ang XL, Mulligan P, Pavlova NN, Liang A, Leng Y, Maehr R, Shi Y, Harper JW, Elledge SJ. SCFbeta-TRCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation. *Nature*. 2008 Mar 20;452(7185):370-4. doi: 10.1038/nature06780. PMID: 18354483; PMCID: PMC2688689.
35. Huang Z, Wu Q, Guryanova OA, Cheng L, Shou W, Rich JN, Bao S. Deubiquitylase HAUSP stabilizes REST and promotes maintenance of neural progenitor cells. *Nat Cell Biol*. 2011 Feb;13(2):142-52. doi: 10.1038/ncb2153. Epub 2011 Jan 23. PMID: 21258371; PMCID: PMC3076066.
36. Charbord J, Poydenot P, Bonnefond C, Feyeux M, Casagrande F, Brinon B, Francelle L, Aurégan G, Guillermier M, Cailleret M, Viegas P, Nicoleau C, Martinat C, Brouillet E, Cattaneo E, Peschanski M, Lechuga M, Perrier AL. High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes. *Stem Cells*. 2013 Sep;31(9):1816-28. doi: 10.1002/stem.1430. PMID: 23712629.
37. Hermanson O. Stem cells have different needs for REST. *PLoS Biol*. 2008 Oct 28;6(10):e271. doi: 10.1371/journal.pbio.0060271. PMID: 18959489; PMCID: PMC2573942.
38. Huang Z, Bao S. Ubiquitination and deubiquitination of REST and its roles in cancers. *FEBS Lett*. 2012 Jun 4;586(11):1602-5. doi: 10.1016/j.febslet.2012.04.052. Epub 2012 May 5. PMID: 22569092; PMCID: PMC3361610.
39. Lawinger P, Venugopal R, Guo ZS, Immaneni A, Sengupta D, Lu W, Rastelli L, Marin Dias Carneiro A, Levin V, Fuller GN, Echelard Y, Majumder S. The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells. *Nat Med*. 2000 Jul;6(7):826-31. doi: 10.1038/77565. Erratum in: *Nat Med* 2000 Sep;6(9):1062. PMID: 10888935.
40. Taylor P, Fangusaro J, Rajaram V, Goldman S, Helenowski IB, MacDonald T, Hasselblatt M, Riedemann L, Laureano A, Cooper L, Gopalakrishnan V. REST is a novel prognostic factor and therapeutic target for medulloblastoma. *Mol Cancer Ther*. 2012 Aug;11(8):1713-1723. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0990. Epub 2012 Jul 30. PMID: 22848092; PMCID: PMC3763747.
41. Zhang D, Li Y, Wang R, Li Y, Shi P, Kan Z, Pang X. Inhibition of REST Suppresses Proliferation and Migration in Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2016 May 3;17(5):664. doi: 10.3390/ijms17050664. PMID: 27153061; PMCID: PMC4881490.
42. Wagoner MP, Gunsalus KT, Schoenike B, Richardson AL, Friedl A, Roopra A. The transcription factor REST is lost in aggressive breast cancer. *PLoS Genet*. 2010 Jun 10;6(6):e1000979. doi: 10.1371/journal.pgen.1000979. PMID: 20548947; PMCID: PMC2883591.

43. Lv H, Pan G, Zheng G, Wu X, Ren H, Liu Y, Wen J. Expression and functions of the repressor element 1 (RE-1)-silencing transcription factor (REST) in breast cancer. *J Cell Biochem.* 2010 Jul 1;110(4):968-74. doi: 10.1002/jcb.22610. PMID: 20564196.
44. Kreisler A, Strissel PL, Strick R, Neumann SB, Schumacher U, Becker CM. Regulation of the NRSF/REST gene by methylation and CREB affects the cellular phenotype of small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2010 Oct 28;29(43):5828-38. doi: 10.1038/onc.2010.321. Epub 2010 Aug 9. PMID: 20697351.
45. Westbrook TF, Martin ES, Schlabach MR, Leng Y, Liang AC, Feng B, Zhao JJ, Roberts TM, Mandel G, Hannon GJ, Depinho RA, Chin L, Elledge SJ. A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell.* 2005 Jun 17;121(6):837-48. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.033. PMID: 15960972.
46. Lapuk AV, Wu C, Wyatt AW, McPherson A, McConeghy BJ, Brahmbhatt S, Mo F, Zoubeidi A, Anderson S, Bell RH, Haegert A, Shukin R, Wang Y, Fazli L, Hurtado-Coll A, Jones EC, Hach F, Hormozdiari F, Hajirasouliha I, Boutros PC, Bristow RG, Zhao Y, Marra MA, Fanjul A, Maher CA, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Beltran H, Sahinalp SC, Gleave ME, Volik SV, Collins CC. From sequence to molecular pathology, and a mechanism driving the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. *J Pathol.* 2012 Jul;227(3):286-97. doi: 10.1002/path.4047. PMID: 22553170; PMCID: PMC3659819.
47. Orellana-Serradell O, Herrera D, Castellón EA, Contreras HR. The Transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. *Asian J Androl* 20(3): 294-299 (2018).
48. Orellana-Serradell O, Herrera D, Castellón EA, Contreras HR. The transcription factor ZEB1 promotes chemoresistance in prostate cancer cell lines. *Asian J Androl* (2019).
49. Odero-Marah V, Hawsawi O, Henderson V, Sweeney J. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol* 1095: 101-110 (2018).
50. Dicken H, Hensley PJ, Kyprianou N. Prostate tumor neuroendocrine differentiation via EMT: The road less traveled. *Asian J Urol* 6(1):82-90 (2019).
51. Paranjape AN, Soundararajan R, Werden SJ, Joseph R, Taube JH, Rodríguez-Canales J, Sphyris N, Wistuba I, miura N, Dhillon J, Mahajan N, Mahajan K, Chang JT, Ittmann M, Maity SN, Logothetis C, Tang DG, Mani SA. Inhibition of FOXC2 restores epithelial phenotype and drug sensitivity in prostate cancer cells with stem-cell properties. *Oncogene* 35(46):5963-5976 (2016).
52. McKeithen D, Graham T, Chung LW, Odero-Marah V. Snail transcription factor regulates neuroendocrine differentiation in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate.* 2010 Jun 15;70(9):982-92. doi: 10.1002/pros.21132. PMID: 20166136; PMCID: PMC2877267.
53. Esposito S, Russo MV, Airoidi I, Tupone MG, Sorrentino C, Barbarito G, Di Meo S, Di Carlo E. SNAI2/Slug gene is silenced in prostate cancer and regulates neuroendocrine differentiation, metastasis-suppressor and pluripotency gene expression. *Oncotarget.* 2015 Jul 10;6(19):17121-34. doi: 10.18632/oncotarget.2736. PMID: 25686823; PMCID: PMC4627296.
54. Chang YT, Lin TP, Campbell M, Pan CC, Lee SH, Lee HC, Yang MH, Kung HJ, Chang PC. REST is a crucial regulator for acquiring EMT-like and stemness phenotypes in hormone-refractory prostate cancer. *Sci Rep,* 7:42795 (2017).
55. Teo MY, Rathkopf DE, Kantoff P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Med.,* 70:479-499 (2019).
56. Gravis G. Systemic treatment for metastatic prostate cancer. *Asian J Urol,* 6(2): 162-168 (2019).

57. Barata PC, Sartor AO. Metastatic castration-sensitive prostate cancer: Abiraterone, docetaxel, or... *Cancer*, 125(11): 1777-1788 (2019).
58. Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*. 2020 Mar 6;7:33. doi: 10.3389/fmolb.2020.00033. PMID: 32211418; PMCID: PMC7067892.
59. Yadav SS, Li J, Stockert JA, Herzog B, O'Connor J, Garzon-Manco L, Parsons R, Tewari AK, Yadav KK. Induction of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Cells by Dovitinib (TKI-258) and its Therapeutic Implications. *Transl Oncol*. 2017 Jun;10(3):357-366. doi: 10.1016/j.tranon.2017.01.011. Epub 2017 Mar 24. PMID: 28342996; PMCID: PMC5369368.
60. Shimojo M, Hersh LB. REST/NRSF-interacting LIM domain protein, a putative nuclear translocation receptor. *Mol Cell Biol*. 2003 Dec;23(24):9025-31. doi: 10.1128/MCB.23.24.9025-9031.2003. PMID: 14645515; PMCID: PMC309669.
61. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, Huang J. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*. 2011 Nov;71(15):1668-79. doi: 10.1002/pros.21383. Epub 2011 Mar 22. PMID: 21432867; PMCID: PMC3426349.
62. Svensson C, Ceder J, Iglesias-Gato D, Chuan YC, Pang ST, Bjartell A, Martinez RM, Bott L, Helczynski L, Ulmert D, Wang Y, Niu Y, Collins C, Flores-Morales A. REST mediates androgen receptor actions on gene repression and predicts early recurrence of prostate cancer. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(2):999-1015. doi: 10.1093/nar/gkt921. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24163104; PMCID: PMC3902919.
63. Shimojo M. Huntingtin regulates RE1-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150 Glued. *J Biol Chem*. 2008 Dec 12;283(50):34880-6. doi: 10.1074/jbc.M804183200. Epub 2008 Oct 15. PMID: 18922795; PMCID: PMC2596380.
64. Castellón EA. Patient-derived organoids: New co-clinical model to predict treatment response in cancer? *Oral Dis*. 2019 May;25(4):928-930. doi: 10.1111/odi.12988. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30281877.
65. Shi XB, Xue L, Ma AH, Tepper CG, Gandour-Edwards R, Kung HJ, deVere White RW. Tumor suppressive miR-124 targets androgen receptor and inhibits proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene*. 2013 Aug 29;32(35):4130-8. doi: 10.1038/onc.2012.425. Epub 2012 Oct 15. PMID: 23069658; PMCID: PMC4111479.
66. Tivnan A, Zhao J, Johns TG, Day BW, Stringer BW, Boyd AW, Tiwari S, Giles KM, Teo C, McDonald KL. The tumor suppressor microRNA, miR-124a, is regulated by epigenetic silencing and by the transcriptional factor, REST in glioblastoma. *Tumour Biol*. 2014 Feb;35(2):1459-65. doi: 10.1007/s13277-013-1200-6. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24068568.
67. Dong P, Xiong Y, Watari H, Hanley SJ, Konno Y, Ihira K, Suzuki F, Yamada T, Kudo M, Yue J, Sakuragi N. Suppression of iASPP-dependent aggressiveness in cervical cancer through reversal of methylation silencing of microRNA-124. *Sci Rep*. 2016 Oct 21;6:35480. doi: 10.1038/srep35480. PMID: 27765948; PMCID: PMC5073231.
68. Hwang JY, Zukin RS. REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2018 Feb;48:193-200. doi: 10.1016/j.conb.2017.12.008. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29351877; PMCID: PMC5892838.
69. Gloushankova NA, Zhitnyak IY, Rubtsova SN. Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Progression. *Biochemistry (Mosc)*. 2018 Dec;83(12):1469-1476. doi: 10.1134/S0006297918120052. PMID: 30878022.

70. Aggarwal V, Montoya CA, Donnenberg VS, Sant S. Interplay between tumor microenvironment and partial EMT as the driver of tumor progression. *iScience*. 2021 Jan 28;24(2):102113. doi: 10.1016/j.isci.2021.102113. PMID: 33659878; PMCID: PMC7892926.
71. Bery F, Cancel M, Guéguinou M, Potier-Cartereau M, Vandier C, Chantôme A, Guibon R, Bruyère F, Fromont G, Mahéo K. Zeb1 and SK3 Channel Are Up-Regulated in Castration-Resistant Prostate Cancer and Promote Neuroendocrine Differentiation. *Cancers (Basel)*. 2021 Jun 12;13(12):2947. doi: 10.3390/cancers13122947. PMID: 34204608; PMCID: PMC8231145.
71. Guo Y, Lu X, Chen Y, Clark G, Trent J, Cuatrecasas M, Emery D, Song ZH, Chariker J, Rouchka E, Postigo A, Liu Y, Dean DC. Opposing roles of ZEB1 in the cytoplasm and nucleus control cytoskeletal assembly and YAP1 activity. *Cell Rep*. 2022 Oct 4;41(1):111452. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111452. PMID: 36198275.
72. Yang D, Wu X, Zhou Y, Wang W, Wang Z. The microRNA/TET3/REST axis is required for olfactory globose basal cell proliferation and male behavior. *EMBO Rep*. 2020 Sep 3;21(9):e49431. doi: 10.15252/embr.201949431. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32677323; PMCID: PMC7507367
73. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010 Jun;24(6):1838-51. doi: 10.1096/fj.09-151639. Epub 2010 Jan 22. PMID: 20097873; PMCID: PMC2874471.
74. Paulin D, Lilienbaum A, Kardjian S, Agbulut O, Li Z. Vimentin: Regulation and pathogenesis. *Biochimie*. 2022 Jun;197:96-112. doi: 10.1016/j.biochi.2022.02.003. Epub 2022 Feb 11. PMID: 35151830.
75. Paonessa F, Latifi S, Scarongella H, Cesca F, Benfenati F. Specificity protein 1 (Sp1)-dependent activation of the synapsin I gene (SYN1) is modulated by RE1-silencing transcription factor (REST) and 5'-cytosine-phosphoguanine (CpG) methylation. *J Biol Chem*. 2013 Feb 1;288(5):3227-39. doi: 10.1074/jbc.M112.399782. Epub 2012 Dec 18. PMID: 23250796; PMCID: PMC3561544.
76. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):178-96. doi: 10.1038/nrm3758. PMID: 24556840; PMCID: PMC4240281.
77. van Schaijik B, Davis PF, Wickremesekera AC, Tan ST, Itinteang T. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *J Clin Pathol*. 2018 Jan;71(1):88-91. doi: 10.1136/jclinpath-2017-204815. Epub 2017 Nov 27. PMID: 29180509.
78. Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*. 2017 May 5;611:27-37. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.025. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28237823; PMCID: PMC5391259.
79. Tien AH, Sadar MD. Keys to unlock androgen receptor translocation. *J Biol Chem*. 2019 May 31;294(22):8711-8712. doi: 10.1074/jbc.H119.009180. PMID: 31152093; PMCID: PMC6552410.
80. Liao RS, Ma S, Miao L, Li R, Yin Y, Raj GV. Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Transl Androl Urol*. 2013 Sep;2(3):187-96. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.07. PMID: 26816736; PMCID: PMC4708176.
81. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Lubber B, Nakazawa M, Roeser JC, Chen Y, Mohammad TA, Chen Y, Fedor HL, Lotan TL, Zheng Q, De Marzo AM, Isaacs JT, Isaacs WB, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*. 2014 Sep 11;371(11):1028-38. doi: 10.1056/NEJMoa1315815. Epub 2014 Sep 3. PMID: 25184630; PMCID: PMC4201502.

82. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022 Jan;12(1):31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059. PMID: 35022204.
83. Westbrook TF, Martin ES, Schlabach MR, Leng Y, Liang AC, Feng B, Zhao JJ, Roberts TM, Mandel G, Hannon GJ, Depinho RA, Chin L, Elledge SJ. A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell.* 2005 Jun 17;121(6):837-48. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.033. PMID: 15960972.
84. Gunsalus KT, Wagoner MP, Meyer K, Potter WB, Schoenike B, Kim S, Alexander CM, Friedl A, Roopra A. Induction of the RNA regulator LIN28A is required for the growth and pathogenesis of REST-less breast tumors. *Cancer Res.* 2012 Jul 1;72(13):3207-16. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1639. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22532168; PMCID: PMC3539431.
85. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Feb;20(2):69-84. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4. PMID: 30459476.
86. Zhao M, Hu HG, Huang J, Zou Q, Wang J, Liu MQ, Zhao Y, Li GZ, Xue S, Wu ZS. Expression and correlation of Twist and gelatinases in breast cancer. *Exp Ther Med.* 2013 Jul;6(1):97-100. doi: 10.3892/etm.2013.1099. Epub 2013 May 2. PMID: 23935727; PMCID: PMC3735531.
87. López-Moncada F, Castellón EA, Contreras HR. The Transcription Factors Zeb1 and Snail Induce Cell Malignancy and Cancer Stem Cell Phenotype in Prostate Cells, Increasing Androgen Synthesis Capacity and Therapy Resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1393:51-64. doi: 10.1007/978-3-031-12974-2_2. PMID: 36587301.
88. Cloud AS, Vargheese AM, Gunewardena S, Shimak RM, Ganeshkumar S, Kumaraswamy E, Jensen RA, Chennathukuzhi VM. Loss of REST in breast cancer promotes tumor progression through estrogen sensitization, MMP24 and CEMIP overexpression. *BMC Cancer.* 2022 Feb 17;22(1):180. doi: 10.1186/s12885-022-09280-2. PMID: 35177031; PMCID: PMC8851790.