



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tesis Doctoral

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES CRPC PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE ADQUISICIÓN DE RESISTENCIA A TRATAMIENTO EN CÁNCER DE PRÓSTATA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA
(B11.56.1)

Doctoranda

Iris Simón Sáez

Directores de Tesis

Pedro José Real Luna

María José Serrano Fernández

Granada, 2022



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Iris Simón Sáez
ISBN: 978-84-1117-512-8
URI <https://hdl.handle.net/10481/77144>

CRITERIOS DE CALIDAD PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

- Publicación en una revista de impacto en el ámbito de conocimiento de la tesis doctoral firmada por el doctorando, que incluya parte de los resultados de la tesis.

Iris Simon, Sonia Perales, Laura Casado-Medina, Alba Rodríguez-Martínez, María del Carmen Garrido-Navas, Ignacio Puche-Sanz, Juan J. Diaz-Mochon, Clara Alaminos, Pablo Lupiañez, Jose A. Lorente, María J. Serrano and Pedro J. Real, *Cancer* (2021). **Cross-Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Castration Resistance Prostate Cancer Cellular Models Is Mediated by AR Transcriptional Reactivation.** *Cancers* 2021, 13, 1483. <https://doi.org/10.3390/cancers13061483>

> Este artículo ha sido publicado en la revista *Cancers* (ISSN: 2072-6694), con un factor de impacto en el año 2020 de 6.639, ocupando la posición 51 de las 242 de la categoría ONCOLOGY del Rank title del Journal Citation Reports Science Edition en el año 2020. Esta revista pertenece al cuartil Q2.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	8
ABREVIATURAS.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	15
INTRODUCCIÓN	20
1. PRÓSTATA.....	21
2. SEÑALIZACIÓN ANDROGÉNICA.....	23
2.1. Biosíntesis androgénica fisiológica.....	23
2.2. Receptor de andrógenos (AR)	25
2.2.1. Estructura	26
2.2.1.1 Variantes de <i>splicing</i> de AR.....	27
2.2.3. Función y actividad	29
3. CÁNCER DE PRÓSTATA.....	31
3.1 Epidemiología e historia natural.....	31
3.2. Pruebas diagnósticas y pronósticas para el cáncer de próstata.....	32
3.3. Tratamiento y evolución	34
3.3.1. Manejo clínico del CRPC.....	36
4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS	40
4.1. Mecanismos dependientes del AR	40
4.1.1. Variantes de <i>splicing</i> y resistencia a las terapias hormonales.....	42
4.2. Mecanismos independientes del AR.....	46
5. HETEROGENEIDAD TUMORAL.....	48
5.1. Microambiente tumoral en CRPC	49
6. CARCINOGENÉISIS Y PLASTICIDAD CELULAR.....	51
6.1. Latencia celular (<i>dormancy</i>)	52

6.2. <i>Cancer stem cells</i> y transición epitelio-mesénquima	54
6.3. Cáncer de próstata neuroendocrino.....	58
1. Cultivos Celulares	70
1.1. Aplicación <i>in vitro</i> de tratamientos de segunda línea contra CaP	70
1.2. Establecimiento de Modelos Celulares de Resistencia a la Deprivación Androgénica (R-ADT).	71
1.3. Establecimiento de Modelos Celulares de Resistencia a la Deprivación Androgénica y a los antiandrógenos de segunda línea (R-ADT/Enz, R-ADT/AA, R-ADT/Enz+AA).	72
2. Generación de líneas celulares shARfl, shAR-V7 y shAR-V9 inducibles por doxiciclina mediante el sistema pLKO-Tet-On	73
2.1. Clonaje de pLKO-Tet-On	74
2.2. Producción de partículas lentivirales y transducción	75
3. Cálculo de IC50: Ensayo de MTT	76
4. Cuantificación de la expresión génica.....	77
4.1. Cuantificación de la expresión del AR-FL, AR-V7 y AR-V9 y secuenciación de las isoformas del AR.....	78
4.2. Análisis de la Actividad transcripcional del AR.....	79
4.3. Análisis de expresión de marcadores fenotípicos.....	80
5. Expresión proteica: Western-Blot.....	81
6. Estudios de proliferación celular.....	82
6.1. Proliferación celular a tiempo real (RTCA)	83
6.2. Tiempo de duplicación celular.....	83
7. Análisis del ciclo celular con IP.....	84
8. Ensayos de migración e invasión	84
9. Ensayos de clonogenicidad	85
10. Análisis Estadístico	86

GENERACIÓN DE MODELOS CELULARES DE RESISTENCIA A LA DEPRIVACIÓN ANDROGÉNICA.....	88
1.1. Clonaje y secuenciación de los productos de amplificación de las variantes <i>AR-V7</i> y <i>AR-V9</i>	88
1.2. Análisis genético y funcional de la respuesta de las líneas celulares de cáncer de próstata a ADT, Enz y AA como primera línea de terapia.....	89
1.3. Generación de modelos de resistencia a la deprivación androgénica (R-ADT)	97
1.3.1. Respuesta de los modelos de resistencia a ADT a los tratamientos de segunda línea Enz y AA.	100
1.4. Generación de modelos de resistencia a ADT y a los tratamientos de segunda línea Enz y AA (Modelos concomitantes R-ADT/NHAs).....	102
1.4.1. Respuesta de los modelos de resistencia concomitantes (R-ADT/NHAs) al tratamiento de segunda línea alternativo.....	106
1.5. Análisis de la capacidad tumorigénica de los nuevos modelos celulares de resistencia de CaP.....	109
SILENCIAMIENTO SELECTIVO DE LAS VARIANTES <i>AR-FL</i> , <i>AR-V7</i> Y <i>AR-V9</i> EN MODELOS CELULARES DE CaP.....	115
2.1. Desarrollo de líneas estables de CaP con silenciamiento selectivo de las variantes <i>AR-FL</i> , <i>AR-V7</i> y <i>AR-V9</i>	115
2.1.1. Clonación y secuenciación de shRNAs.....	115
2.1.2. Transducción de los shRNAs en modelos celulares de CaP.	116
2.2. Caracterización de la funcionalidad de las herramientas de silenciamiento en los diferentes modelos celulares.....	116
2.3. Análisis funcionales y de expresión génica.....	122
RESISTENCIA CRUZADA A LOS TRATAMIENTOS DE SEGUNDA LÍNEA APALUTAMIDA Y DOCETAXEL EN MODELOS CELULARES DE CRPC.....	130

3.1. Respuesta a Apa como tratamiento de segunda línea en modelos celulares de CRPC.....	130
3.1.1. Análisis funcional de los modelos de CRPC en respuesta Apalutamida.....	131
3.1.2. Análisis de expresión génica de la respuesta de los modelos de CRPC a Apalutamida.....	138
3.2. Resistencia cruzada a Dctx en modelos celulares de CRPC.....	143
3.2.1. Análisis funcionales de la respuesta de los modelos de CRPC a Dctx.....	144
3.2.2. Análisis de expresión génica de la respuesta de los modelos de CRPC a Docetaxel.....	148
1. La exposición continuada a ADT y NHAs induce resistencia en líneas celulares de cáncer de próstata	156
2. La adquisición de resistencia en cáncer de próstata incrementa la actividad transcripcional del AR.....	158
3. Los modelos celulares de CRPC desarrollan resistencia cruzada a otros tratamientos.....	164
4. La adquisición de resistencia a la deprivación androgénica está ligada a un aumento de la capacidad tumorigénica.....	168
BIBLIOGRAFIA.....	176

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es el tumor con mayor incidencia en varones no fumadores a nivel mundial. La señalización androgénica, a través del receptor de andrógenos (AR), juega un papel fundamental en su desarrollo, ya que regula la proliferación y el crecimiento del tejido prostático, tanto sano como canceroso. Por ello, la mayoría de las terapias empleadas en la actualidad van dirigidas a inhibir esta ruta. En este sentido, el tratamiento de elección para el CaP es la privación androgénica (ADT). Esta terapia es inicialmente muy efectiva, el problema radica en que la mayoría de pacientes desarrollan resistencia a este tratamiento (CRPC). Estos pacientes serán posteriormente tratados con antiandrógenos como el acetato de abiraterona (AA), la enzalutamida (Enz), la apalutamida (Apa) y agentes quimioterápicos como el docetaxel (Dctx). Sin embargo, estos tratamientos también fracasan ya que la mayoría de pacientes han desarrollado mecanismos comunes de resistencia y consecuentemente continúa la progresión tumoral. Además, el uso de estos fármacos de manera secuencial genera resistencias cruzadas, que tienen como consecuencia una disminución de su efectividad.

Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia a ADT, y entre ellas la expresión de variantes de dicho receptor (AR-Vs) tiene una especial importancia. Una de las isoformas más frecuentemente encontradas en los tumores de próstata es la AR-V7 que recientemente se ha demostrado que coexpresa con la variante AR-V9. Así mismo, la heterogeneidad tumoral también tiene un papel fundamental en la adquisición de resistencia a los diferentes tratamientos. Cada vez son más las evidencias que sugieren que la inhibición prolongada de la ruta del AR puede alterar el curso de la enfermedad, dando lugar a la desdiferenciación histológica y alteraciones en el linaje celular en forma de células madre tumorales (CSC), transición epitelio-mesénquima (EMT) o diferenciación neuroendocrina (NE).

Conocer los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a las terapias de privación androgénica permitiría predecir la efectividad de estas nuevas terapias y establecer una nueva línea de actuación terapéutica beneficiosa para

los pacientes de CaP. Por todo ello, nuestro objetivo principal es generar y caracterizar nuevos modelos celulares de CaP resistentes a las terapias de deprivación androgénica más habituales donde estudiar el papel del AR y sus variantes *AR-V7* y *AR-V9* en la adquisición de dicha resistencia. Finalmente, también proponemos evaluar la respuesta a los tratamientos usados como segunda o tercera línea en la práctica clínica en los diferentes modelos celulares generados.

En primer lugar, generamos modelos celulares de resistencia a ADT y a los tratamientos de segunda línea Enz y AA. Para ello se utilizaron dos líneas celulares de CaP con diferente sensibilidad a andrógenos (LNCaP y 22RV1) que fueron cultivadas durante 6 meses en un medio reducido en hormonas y, en el caso de los modelos concomitantes, con concentraciones crecientes de Enz y/o AA. Las líneas celulares generadas fueron capaces de proliferar con normalidad en presencia de los diferentes tratamientos. Además, al estudiar el papel del AR en ellas se observó que la adquisición de resistencia estaba ligada a un aumento en la actividad transcripcional del AR. Destacablemente, cuando se midió la sensibilidad a los antiandrógenos Enz y AA en las líneas resistentes a ADT se observó que presentaban mayor tolerancia que las líneas celulares silvestres originales. Del mismo modo, los modelos de resistencia a Enz o AA mostraron resistencia cruzada al antiandrógeno alternativo.

Como la adquisición de resistencia está ligada a una mayor malignidad tumoral, quisimos evaluar la capacidad tumorigénica de los diferentes modelos de resistencia. En concordancia con lo observado en la clínica, los modelos de resistencia generados presentaron una mayor capacidad de migración y, en el caso de las líneas resistentes a ADT, también mayor capacidad invasiva. Así mismo, se evaluaron los cambios genéticos ligados a la adquisición de resistencia. En este sentido, los modelos celulares de resistencia presentaron una gran plasticidad celular evidenciada por diferentes patrones de expresión de marcadores asociados a CSC, EMT y fenotipo NE.

A continuación, para estudiar con mayor profundidad el papel del receptor de andrógenos y sus variantes de *splicing* en la adquisición de resistencia en los modelos a ADT, se generaron líneas celulares estables conteniendo *short hairpin*

RESUMEN

RNAs (shRNAs) inducibles por Doxiciclina para el silenciamiento tanto del AR como de sus isoformas AR-V7 y AR-V9. Con el fin de confirmar la eficacia del silenciamiento en las diferentes líneas celulares generadas se midió la expresión génica y proteica del AR, AR-V7 y AR-V9, seleccionándose para los análisis posteriores aquellas que demostraron un silenciamiento inducible por Doxiciclina. Como la resistencia a ADT está ligada a un aumento transcripcional del AR, se evaluó como afectaba su silenciamiento a la proliferación celular. Observamos que el silenciamiento del AR-FL y AR-V7 provocaba una disminución en la tasa de proliferación de las líneas silvestres. Por el contrario, en las líneas resistentes a ADT el silenciamiento no indujo ningún cambio significativo a nivel de proliferación.

Por último, quisimos estudiar la respuesta a los tratamientos de segunda línea de uso en la clínica Apa y Dctx en los modelos celulares de resistencia generados (R-ADT, R-ADT/E, R-ADT/AA y R-ADT/Enz+AA). En el caso de Apa, se observó que la mayoría de modelos de resistencia presentaban una mayor tolerancia a nivel de proliferación y ciclo celular respecto a las líneas celulares silvestres. Además, en las líneas que presentaban resistencia cruzada a Apa, la exposición al fármaco inducía una represión en la expresión de las variantes AR-V7 y AR-V9, lo que sugiere que la resistencia cruzada podría ser independiente de éstas.

Por otro lado, cuando se estudió el efecto de Dctx en los modelos de resistencia, se observó que las líneas resistentes a ADT (R-ADT) presentaban resistencia cruzada a Dctx a nivel de proliferación y ciclo celular. Así mismo, la exposición a Dctx en las líneas resistentes a ADT inducía una sobreexpresión del AR total, pero no del AR-FL o las isoformas AR-V7 y AR-V9. Además, el tratamiento con Dctx se relacionó con la adquisición de un perfil de expresión de CSC en todas las líneas celulares estudiadas, independientemente de su sensibilidad.

Como conclusión, los nuevos modelos celulares de CRPC generados muestran que el tratamiento con Enz o AA podría ser más efectivo usándose como primera línea terapéutica en CaP, antes del desarrollo de resistencia a ADT. Además, recapitulan la resistencia cruzada entre los diferentes tratamientos observada en los pacientes de CRPC metastásico, así como la plasticidad celular reflejada por

la presencia de perfiles de expresión más agresivos como CSC, EMT o NE. Todos estos resultados ponen de manifiesto la enorme utilidad de estos modelos como herramienta para el estudio de los procesos moleculares que se esconden detrás de la adquisición de resistencia.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
3 β -HSD2	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
AA	Acetato de abiraterona
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
AD	Androstenediona
ADT	Deprivación androgénica
ALB	Albúmina
Apa	Apalutamida
AR	Receptor de andrógenos
AREs	motivos de reconocimiento de AR
AR-FL	AR-Full Length
AR-Vs	Isoformas del AR
Bcl-2	B-Cell lymphoma
BPH	Hiperplasia prostática benigna
BSA	Albúmina Serina Bovina
CAF	Fibroblastos asociados al cáncer
CAM	Moléculas de adhesión celular
CaP	Cáncer de próstata
CHGA	Cromagranina A
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CSC	Células madre tumorales
CSS	Charcoal Stripped Serum
CTC	Célula tumoral circulante
CYP17	17 α -hidroxilasa
DBD	Dominio de unión al ADN
DCC	Célula tumoral diseminada
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dox	Doxiciclina
DRE	Exámen digital rectal

ECM	Matriz extracelular
EGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
EMT	Transición epitelio-mesénquima
Enz	Enzalutamida
FACS	Citometría de flujo
FBS	Suero Bovino Fetal
FGF/FGF1	Factor de crecimiento de fibroblastos
Gn	Gonadotropina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GR	Glucocorticoides
HIF1α/HIFA	hipoxia-inducible factor 1 alpha
HSP	Proteínas de choque térmico
LBD	Dominio de unión a ligando
LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante
LIFR	Receptor del factor inhibidor de la leucemia
mCRPC	Cáncer de próstata metastásico resistente a la castración
mHSCaP	Cáncer de próstata metastásico hormonalmente sensible
mpMRI	Resonancia magnética de imagen multiparamétrica
MSC	Células madre mesenquimales
NCAM1	Molécula de adhesión neural 1
NEPC	Cáncer de próstata neuroendocrino
NHA	Novel hormonal agents
NLS	Nuclear Localization Sequence
nmCRPC	Cáncer de próstata no metastásico resistente a la castración
NSE/ENO2	Enolasa neuro específica
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAP/ACP3	Fosfatasa ácida prostática
PCA3	Prostate Cancer Gene 3
PHI	Índice de salud prostática
PI	Yoduro de propidio
PR	Progesterona
PSA/KLK3	Antígeno prostático específico
Puro	Puromicina
R-ADT	Resistencia a la Deprivación Androgénica

ABREVIATURAS

RTCA	Real-Time Cell Monitoring Assays
SG	Supervivencia global
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
SLP	Supervivencia libre de progresión
SYP	Sinaptofisina
Tet	Tetraciclina
TGF- β /TGFB	Factor de crecimiento transformador-beta
TME	Microambiente tumoral
VEGF/VEGFA	Factor de crecimiento vascular endotelial
WT	Fenotipo salvaje (Wild type)

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Anatomía del aparato urogenital masculino humano	21
Figura 2. Ruta de biosíntesis de andrógenos en el tejido normal y en cáncer de próstata	24
Figura 3. Eje hipotálamo hipofisario gonadal.....	25
Figura 4. Estructura del gen, del transcrito y la proteína del AR-Full length....	27
Figura 5. Variantes de splicing del AR identificadas en cáncer de próstata	28
Figura 6. Modulación de la actividad del AR.....	30
Figura 7. Nuevos casos de cáncer y número de muertes por cáncer en varones en España en 2020.....	31
Figura 8. Pruebas diagnósticas en el cáncer de próstata.....	33
Figura 9. Representación gráfica de la evolución del cáncer de próstata, indicando los tratamientos más comunes aplicados en cada uno de los estadios.	35
Figura 10. Mecanismo de acción de los antiandrógenos abiraterona (A), enzalutamida y apalutamida (B).....	37
Figura 11. Resumen de las recomendaciones recogidas en diferentes guías clínicas para el tratamiento de CPRC.....	39
Figura 12. Número de mutaciones en el AR presentes en pacientes de CaP y distribución de las mismas.....	41
Figura 13. Mecanismos moleculares de reactivación del receptor de andrógenos en CRPC	42
Figura 14. Estructura del gen, del transcrito y la proteína de la AR-V7 y AR-V9 representadas mediante el programa <i>Snagene</i>	44
Figura 15. Plasticidad celular y fenotipos asociados a la resistencia a fármacos	51
Figura 16. Proceso de invasión y metástasis	53

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 17. Contribución de EMT a la progresión tumoral.....	56
Figura 18. Mecanismos de plasticidad celular asociada a CSC.....	57
Figura 19. Mecanismos de diferenciación neuroendocrina en respuesta a los inhibidores del receptor de andrógenos	60
Figura 21. Esquema representativo del proceso de generación de modelos celulares de resistencia a ADT.....	72
Figura 22. Proceso de generación de modelos celulares de resistencia a ADT y a los NHAs Enz y/o AA.....	73
Figura 23. Vector lentiviral pLKO-Tet-On.....	74
Figura 24. shRNAs utilizados para el silenciamiento del AR y sus variantes AR-V7 y AR-V9	76
Figura 25. Reacción de reducción del MTT a formazano mediante la succinato deshidrogenasa.....	77
Figura 27. Representación gráfica de un cultivo celular en un pocillo de una E plate®	83
Figura 28. Resultado del alineamiento de las regiones codificantes (CDS) de las variantes AR-V7 y AR-V9 y los electroferogramas de los productos secuenciados.....	88
Figura 29. Respuesta de las líneas celulares silvestres a la deprivación androgénica. Proliferación, ciclo celular y cuantificación del <i>AR-FL</i> , <i>AR-V7</i> , <i>AR-V9</i> y algunos de sus genes diana.....	90
Figura 30. Expresión proteica del AR y sus genes diana en líneas celulares de CaP tratadas con ADT	91
Figura 31. Respuesta de las líneas celulares LNCaP, 22RV1 y PC3 a Enz y AA.	93
Figura 32. Cuantificación del <i>AR</i> , <i>AR-V7</i> , <i>AR-V9</i> y algunos de sus genes diana en respuesta a Enz y AA.....	95
Figura 33. Expresión proteica del AR y sus genes diana en líneas celulares de CaP tratadas con Enz, AA o Enz+AA	96

Figura 34. Imágenes de microscopía óptica de las células control y R-ADT.....	97
Figura 35. Caracterización de las líneas resistentes LNCaP R-ADT y 22RV1 R-ADT (Modelos de R-ADT).....	98
Figura 36. Expresión del AR y sus genes diana en los modelos de resistencia a ADT (LNCaP R-ADT y 22RV1 R-ADT).....	100
Figura 38. Imágenes de microscopía óptica de los modelos celulares de resistencia a ADT y NHAs (Enz y/o AA).....	102
Figura 39. Caracterización de las líneas resistentes a NHAs (R-ADT/Enz, R-ADT/AA and R-ADT/Enz + A).....	104
Figura 41. Análisis de la resistencia cruzada entre Enzalutamida y Abiraterona en los modelos de resistencia LNCaP.....	107
Figura 42. Análisis de la resistencia cruzada entre Enzalutamida y Abiraterona en los modelos de resistencia 22RV1.....	108
Figura 43. Análisis de la migración e invasión en los modelos celulares de resistencia derivados de las células LNCaP y 22RV1.....	110
Figura 44. Ensayos de clonogenicidad en los modelos de resistencia.....	111
Figura 45. Análisis de expresión de genes característicos de CSC, EMT y NE en los modelos celulares de resistencia.....	113
Figura 46. Generación de modelos celulares de resistencia a la deprivación androgénica. Resumen de las características de los modelos de resistencia LNCaP y 22RV1 generados. En la figura aparecen representados la capacidad proliferativa, ciclo celular, migración, invasión y la presencia de expresión de marcadores para fenotipos de CSC, EMT o NE.....	114
Figura 47. Digestión de los plásmidos pLKO-Tet-On EV, shAR-FL, shAR-V7 y shAR-V9 con la XhoI.....	115
Figura 48. Análisis del fenotipo de las líneas LNCaP WT shRNA.....	117
Figura 49. Análisis del fenotipo de las líneas 22RV1 WT shRNA.....	119
Figura 50. Análisis del fenotipo de las líneas LNCaP R-ADT shRNA.....	121
Figura 51. Análisis del fenotipo de las líneas 2RV1 R-ADT shRNA.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 52. Análisis funcional de las líneas celulares LNCaP WT shRNA	124
Figura 54. Análisis funcional de las líneas celulares LNCaP WT shRNA	127
Figura 55. Análisis funcional de las líneas celulares LNCaP WT shRNA	128
Figura 56. Silenciamiento selectivo de las variantes AR-FL, AR-V7 y AR-V9 en modelos celulares de CaP. Resumen de las características de las líneas celulares LNCaP y 22RV1 shRNAs generadas.....	129
Figura 57. Ensayo de MTT para el cálculo de IC50.....	131
Figura 58. Análisis de la respuesta de los modelos de resistencia LNCaP al tratamiento con Apa.....	133
Figura 59. Análisis de la respuesta de los modelos celulares de resistencia 22RV1 al tratamiento con Apa.....	135
Figura 60. Ensayos de clonogenicidad en modelos de CRPC LNCaP presencia de Apa.....	136
Figura 61. Ensayos de clonogenicidad en modelos de CRPC 22RV1 presencia de Apa.....	137
Figura 62. Cuantificación del AR total, AR-V7 y AR-V9 en respuesta a Apa en los modelos celulares de CRPC.....	139
Figura 63. Cuantificación de marcadores de CSC, EMT y NE en líneas celulares LNCaP y 22RV1 tratadas con Apa.....	140
Figura 64. Análisis de marcadores de CSC, EMT y NE en respuesta a Apalutamida.....	142
Figura 66. Análisis de la respuesta de los modelos celulares de resistencia LNCaP al tratamiento con Dctx.....	145
Figura 67. Análisis de la respuesta de los modelos celulares de resistencia 22RV1 al tratamiento con Dctx	146
Figura 68. Ensayos de clonogenicidad en modelos de resistencia en presencia de Dctx	147
Figura 69. Cuantificación del AR, AR-V7 y AR-V9 en respuesta a Dctx (Docetaxel) en los modelos de CRPC.....	149

Figura 70. Cuantificación de marcadores de CSC, EMT y NE en líneas celulares LNCaP y 22RV1 tratadas con Dctx.....150

Figura 71. Análisis de genes de CSC, EMT y NE en respuesta a Docetaxel.....152

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para los shRNAs.....75

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para el estudio del AR y su actividad transcripcional.....80

Tabla 3. Lista de cebadores utilizados para los análisis de fenotipo.81

Tabla 4. Anticuerpos para Western Blot utilizados en este trabajo.....82

Tabla 5. Líneas celulares CaP shARNs116

INTRODUCCIÓN

1. PRÓSTATA

La próstata es una glándula exocrina del tamaño de una nuez localizada en el sistema reproductor masculino (Figura 1). Su función principal es la síntesis y secreción del fluido prostático, que constituye aproximadamente un 30% del líquido seminal. Este fluido, junto con el líquido procedente de la vesícula seminal, se expulsa durante la eyaculación gracias a la contracción de la musculatura prostática¹. Además, el fluido prostático desarrolla una función clave en la activación de los espermatozoides y, por tanto, en la fertilidad del individuo². Otras funciones de la glándula son la regulación y coordinación del flujo urinario y eyaculatorio y la protección ante infecciones del tracto urinario^{1,2}. Así mismo, la próstata juega un papel importante en el metabolismo androgénico, ya que convierte la testosterona, hormona androgénica por excelencia, en dihidrotestosterona (DHT), uno de sus metabolitos más activos¹.

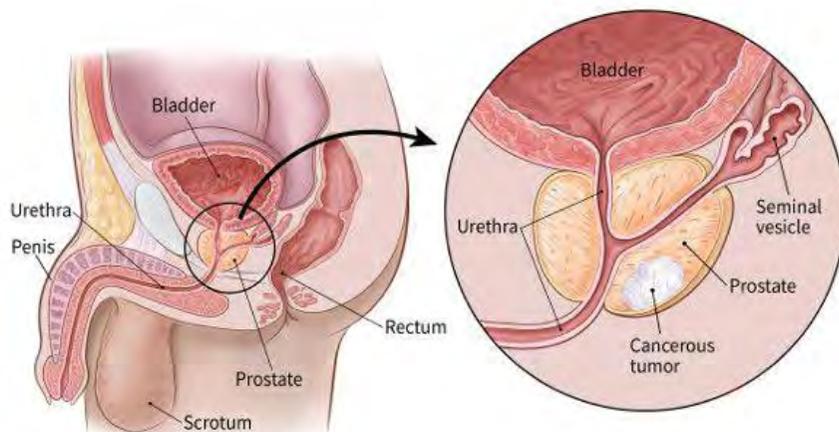


Figura 1. Anatomía del aparato urogenital masculino humano². La próstata está situada justo anterior al recto, debajo de la vejiga, donde envuelve la primera porción de la uretra masculina, y por encima de los músculos del suelo pélvico.

Dentro de la próstata existen distintas regiones histológicamente diferenciadas y anatómicamente separadas. Una zona anterior fibromuscular constituida por células de músculo liso y fibroblastos que rodea el órgano; y tres zonas glandulares: una zona central que constituye la base de la próstata y rodea a los conductos eyaculadores, una zona de transición que rodea la uretra y una zona periférica que

INTRODUCCIÓN

rodea las otras dos regiones³. En cuanto a los tipos celulares presentes en estas zonas se distinguen tres: epitelio basal, luminal y neuroendocrino¹.

Existen tres condiciones ampliamente estudiadas que afectan a la próstata; hiperplasia prostática benigna (*benign prostatic hyperplasia/BPH*), cáncer de próstata y prostatitis. Con la edad, la zona de transición presenta una tendencia a engrandecimiento, que da lugar a lo que se conoce como BPH³. Por otro lado, la zona central es relativamente resistente a la aparición de carcinomas, mientras que los tumores malignos suelen desarrollarse en la zona periférica².

2. SEÑALIZACIÓN ANDROGÉNICA

Los andrógenos son hormonas esteroideas que actúan uniéndose al receptor de andrógenos (*androgen receptor/AR*)⁴. La señalización androgénica es fundamental para el desarrollo del aparato urogenital masculino, incluyendo el desarrollo y la diferenciación de la próstata, así como la proliferación y la supervivencia de las células que constituyen la glándula^{4,5}. Debido a esta estrecha relación, tanto los andrógenos como el AR intervienen en el inicio y desarrollo del cáncer de próstata (CaP)⁶.

En este sentido, desde que Huggins y Hodges⁷ describieran por primera vez en 1941 el rol fundamental de la señalización androgénica en el desarrollo del CaP se han realizado numerosos estudios que demuestran que la mayoría de los tipos celulares que forman los tumores de próstata son dependientes de la señalización androgénica⁵. Además, el estudio de las bases moleculares de dicha señalización ha permitido una mejor comprensión de como el AR dirige el comportamiento y progresión de las células cancerosas⁸.

2.1. Biosíntesis androgénica fisiológica

Las etapas iniciales en la síntesis esteroideogénica tienen lugar en dos tejidos: la zona reticular del cortex adrenal y los testículos, donde las células de Leydig se encargan de la síntesis de la mayoría de la testosterona (90% del total)⁵.

Las células de Leydig testiculares, dependientes de la Hormona Luteinizante, se desarrollan en los testículos neonatales a partir de las células madre de Leydig y son las encargadas de sintetizar niveles elevados de testosterona en varones durante la pubertad y en la edad adulta, reduciendo dichos niveles durante la vejez^{4,9}.

La esteroideogénesis comienza a partir de una molécula de colesterol de 27 carbonos que será modificada enzimáticamente hasta producir testosterona (**Figura 2**). Durante la síntesis, la glándula adrenal secreta principalmente dehidroepiandrosterona (*dehydroepiandrosterone/DHEA*) sulfatada por la sulfotransferasa SULT2A1. Mientras que las células de Leydig expresan la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 2 (*3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 2/3 β -*

INTRODUCCIÓN

HSD2), la cual permite que continúen la ruta hasta producir testosterona en última reacción. La testosterona es convertida en DHT en los tejidos diana⁵.

Una vez sintetizada, la testosterona se libera al torrente circulatorio donde, debido a su carácter lipofílico, la mayor parte se une a la Globulina transportadora de hormonas sexuales (*sex hormone binding globulin*/SHBG) y a Albúmina (ALB). Existe un equilibrio entre la testosterona unida a estas proteínas y la testosterona libre en suero, que podrá ser internalizada en los tejidos mediante difusión pasiva⁵. Esta captación se encuentra altamente regulada, ya que se ha demostrado que la administración exógena de testosterona y DHT no induce un aumento en los niveles intraprostáticos de los andrógenos¹⁰.

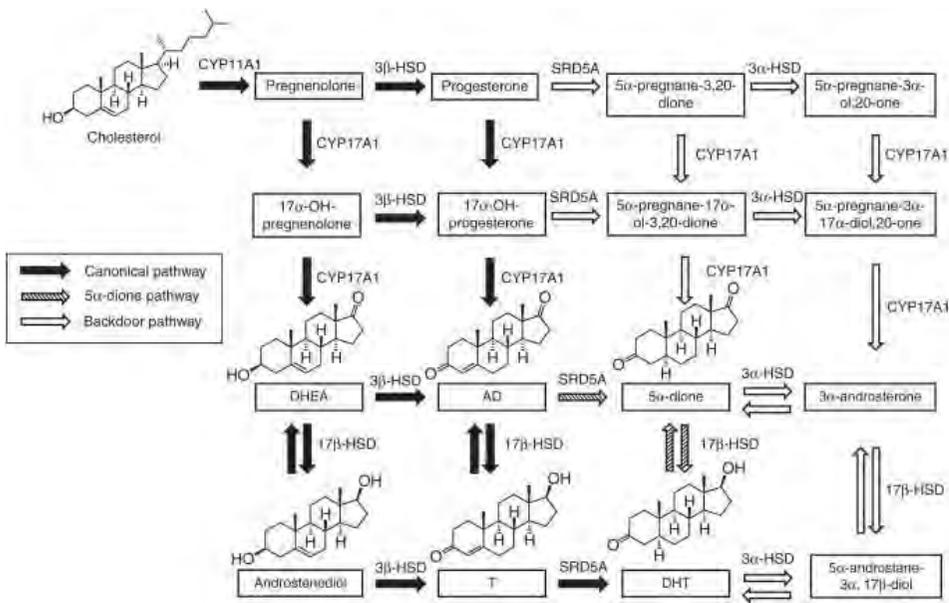


Figura 2. Ruta de biosíntesis de andrógenos en el tejido normal y en cáncer de próstata⁵. Las enzimas clave que participan en este proceso están indicadas junto a las flechas de cada reacción.

En las células prostáticas, la testosterona puede unirse al AR o ser convertida, de manera irreversible en DHT mediante 5α-reductasa (SRD5A1 y SRD5A2). La DHT es necesaria para el correcto crecimiento de la próstata. Aunque la afinidad por el AR de la testosterona y de la DHT son muy similares, en las células prostáticas es más común la presencia a nivel nuclear de DHT, la cual posee una capacidad transcripcional del AR mucho mayor^{5,10}.

El proceso de biosíntesis androgénica se encuentra regulado por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, encargado de estimular la actividad de las células de Leydig testiculares. La hormona liberadora de gonadotropina (*gonadotropin-releasing hormone/ GnRH*) es secretada por el hipotálamo y activa la síntesis de gonadotropina (Gn) en la pituitaria anterior. La Gn actúa sobre las células de Leydig de los testículos activando la producción de testosterona. La pituitaria también secreta la hormona adenocorticotropa (*adrenocorticotropic hormone/ACTH*) que estimula la síntesis androgénica en la glándula adrenal. En esta regulación la testosterona ejerce un papel central ya que su unión al AR activa un proceso de retroalimentación negativa¹¹ (Figura 3).

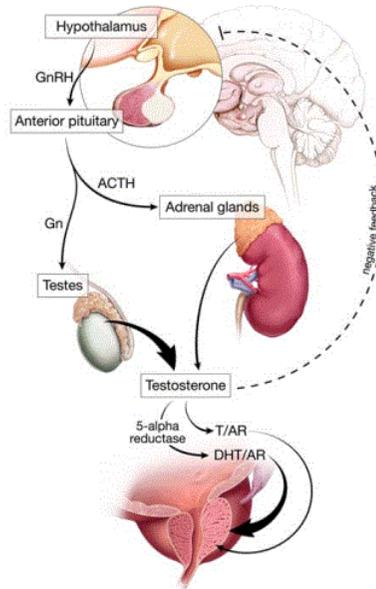


Figura 3. Eje hipotálamo hipofisario gonadal¹¹.

2.2. Receptor de andrógenos (AR)

El AR forma parte de la familia de receptores de hormonas esteroideas, que a su vez pertenece al grupo de receptores nucleares dependientes de ligando. El AR regula la expresión de cientos de genes bajo el control de la señalización androgénica. Su función principal en la próstata es regular el correcto desarrollo y proliferación de las células prostáticas. Debido a esta función esencial en la regulación de la

INTRODUCCIÓN

proliferación celular, también juega un rol determinante en el desarrollo del CaP^{5,12} y en el desarrollo de resistencia a los tratamientos farmacológicos frente a este¹³.

2.2.1. Estructura

El gen que codifica para el AR se encuentra localizado en el cromosoma Xq11-12 y tiene un tamaño de más de 90 kb. Está constituido por ocho exones, los cuales codifican para una isoforma proteica principal con cuatro dominios funcionales bien diferenciados denominada AR-*Full Length* (AR-FL) (**Figura 4**)¹⁴:

- Dominio N-terminal (NTD): constituye el 60% de la proteína. Contiene la región AF-1, que interviene en la activación transcripcional. Está codificado por el exón 1.
- Dominio de unión al ADN (*DNA-binding domain/DBD*): interacciona con los motivos de reconocimiento de AR (*androgen response elements/AREs*), gracias a un primer dedo de zinc, e interviene en la dimerización con otro AR necesaria para su activación gracias a su segundo dedo de zinc. Está codificado por los exones 2 y 3.
- Dominio bisagra: contiene la región NLS (*Nuclear Localization Sequence*), que interacciona con el citoesqueleto para la translocación al núcleo⁵. Se encuentra codificada por la región 5' del exon 4.
- Dominio de unión a ligando (*Ligand Binding Domain/LBD*): interacciona con testosterona y DHT. También interviene en la activación transcripcional a través de la región AF-2. Está codificado por los exones 4-8.

Tras la unión del AR a su ligando se favorece la interacción entre los dominios NTD y LBD, interacción necesaria para determinar la localización nuclear del AR.

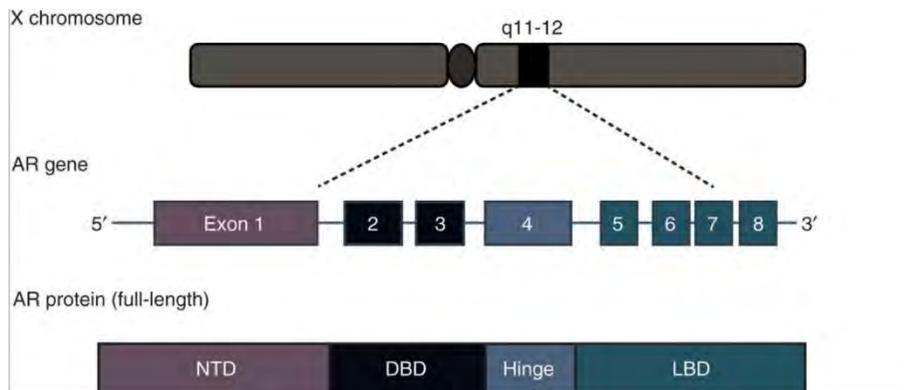


Figura 4. Estructura del gen, del transcritor y la proteína del AR-Full length⁵. El transcritor del AR-FL incluye 8 exones, que se corresponden con los cuatro dominios que componen la proteína del AR representados en la figura.

2.2.1.1 Variantes de *splicing* de AR

Cabe destacar, que la expresión del AR está caracterizada por el proceso de *splicing* o ajuste alternativo debido a la presencia de exones crípticos (CE) en su secuencia. Este proceso permite la generación de diferentes proteínas a partir de un único gen ya que, durante la maduración del transcritor, además de eliminarse los intrones se seleccionan aquellos exones que formarán el mRNA maduro. Cada una de estas proteínas se denominan isoformas del AR (AR-Vs)¹⁴. Hasta la fecha se han descrito alrededor de 20 variantes diferentes denominadas AR-Vs tanto en modelos celulares de CaP, xenógrafos y en tumores de pacientes¹⁵ (**Figura 5**) aunque las más destacables son AR-V7 y AR-V9 en las que nos centraremos en este trabajo.

INTRODUCCIÓN

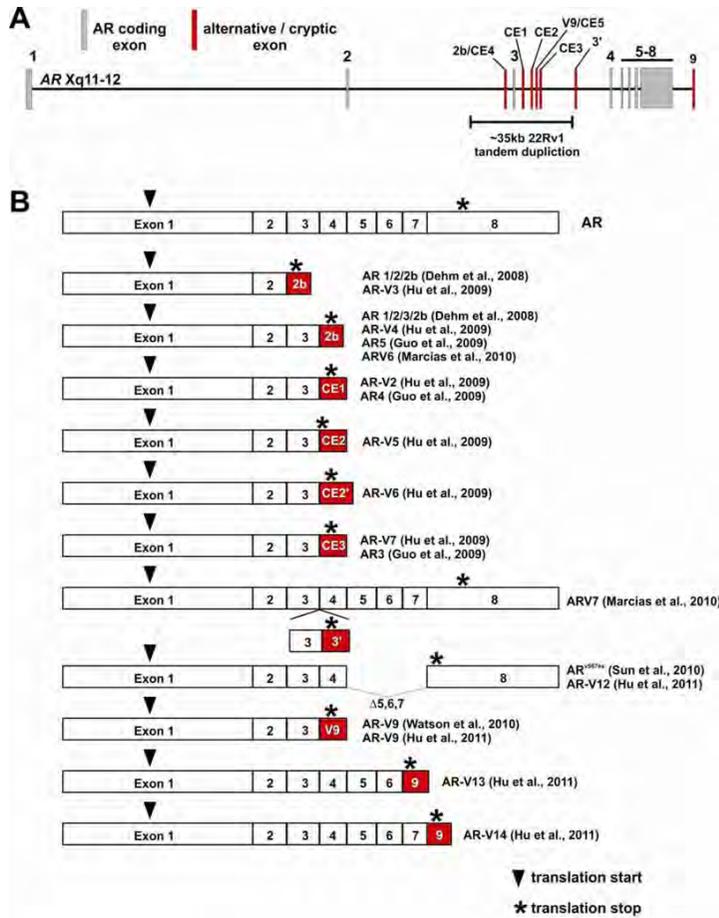


Figura 5. Variantes de splicing del AR identificadas en cáncer de próstata¹⁴. (A) Esquema del locus del AR con las localizaciones de *splicing* alternativo, los exónes crípticos aparecen representados en rojo. (B) Variantes de *splicing* del AR. El *splicing* alternativo utilizando exones crípticos localizados en los intrones 2 y 3 dan lugar a isoformas con el extremo COOH- truncado. Actúan como factores de transcripción independientes de ligando y se encuentran constitutivamente activados.

En ausencia de sus ligandos el AR se localiza en el citoplasma y, en condiciones normales, solo se activará en presencia de sus principales agonistas fisiológicos (testosterona y DHT). Sin embargo, algunas de las isoformas se encuentran constitutivamente activas al carecer del LDB.

2.2.3. Función y actividad

Tras la síntesis proteica del AR, éste se encuentra en el citoplasma de la célula protática anclado al citoesqueleto y a las proteínas de choque térmico (HSP), que lo protegen de ser degradado¹⁶. En un principio el AR se encuentra unido al complejo formado por HSP-70 y HSP-40. Seguidamente se ensamblará a HSP-90 y a diversas chaperonas, lo que conlleva a su disociación del complejo inicial (HSP-70/HSP-40). La unión a HSP-90 favorece que el AR presente una conformación de alta afinidad por la testosterona y la DHT. Mientras que HSP-27 impedirá la agregación y la degradación del AR en el citoplasma, promoviendo su translocación al núcleo y la unión al ADN¹⁷.

Una vez los andrógenos (testosterona y DHT) alcancen la próstata se unirán a la región LBD del AR. Tras la unión del ligando, el AR se disocia del complejo HSP y, tras diferentes eventos moleculares como cambios conformacionales que conllevan la dimerización del receptor, se produce su translocación al núcleo¹⁷. Además, se ha demostrado que la dimerización del AR favorece la remodelación de la cromatina lo que facilita la modulación de la expresión génica por parte del receptor¹⁸ (**Figura 6**). Cualquier alteración en esta región puede llevar a un mal funcionamiento del AR, tanto por defecto como por exceso de activación. Este último fenómeno se postula como uno de los mecanismos de carcinogénesis en CaP¹⁹.

La translocación nuclear está mediada por la región NLS que le permite interactuar con proteínas del citoesqueleto, y facilita el paso a través de la envoltura nuclear gracias a la contribución de la importina- α ⁵. Una vez en el núcleo el AR se une a los AREs localizados en promotores y *enhancers* de sus genes diana. Su unión promueve el reclutamiento de factores de transcripción, coactivadores y la ARN polimerasa II que iniciarán la transcripción de dichos genes, los cuales juegan un papel clave en el desarrollo de la próstata²⁰.

INTRODUCCIÓN

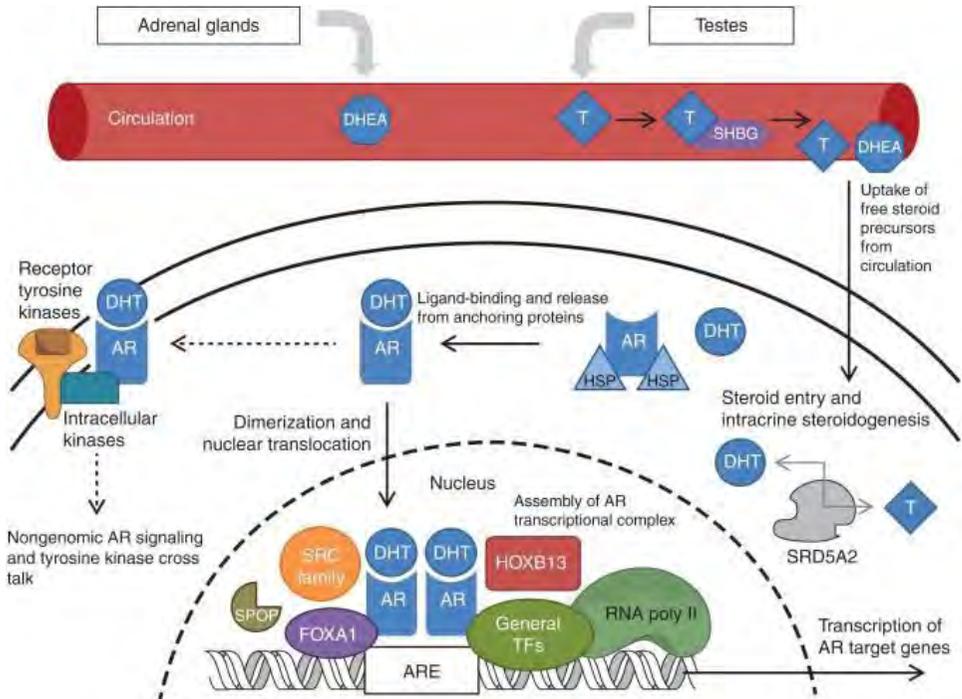


Figura 6. Modulación de la actividad del AR⁵.

Además de esta vía de activación, conocida como vía canónica, existe una vía de activación no canónica en la cual el AR interactúa con receptores asociados a otras vías de transducción de señal, como por ejemplo la vía de los receptores con actividad tirosina-quinasa, que también promueve su activación²¹.

3. CÁNCER DE PRÓSTATA

3.1 Epidemiología e historia natural

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el término “cáncer” engloba un conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo y se caracteriza por la presencia de células anormales que crecen de forma descontrolada y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y extenderse a otros órganos, lo que se denomina metástasis.

El cáncer de próstata es la neoplasia más frecuente en varones no fumadores a nivel mundial²². Este cáncer, se diagnostica raramente antes de los cincuenta años, pero a partir de esta edad su incidencia aumenta más rápido que en cualquier otra neoplasia. El 90% de los casos aparecen en varones mayores de 65 años. Además, a nivel mundial en 2020 se estima que se diagnosticaron unos 1.4 millones de nuevos casos de CaP. La prevalencia a 5 años está en torno a los 4,9 millones de varones²². En Europa se han diagnosticado algo más de 473.344 nuevos casos en 2020, con una prevalencia a 5 años próxima a 1,9 millones de varones adultos²².

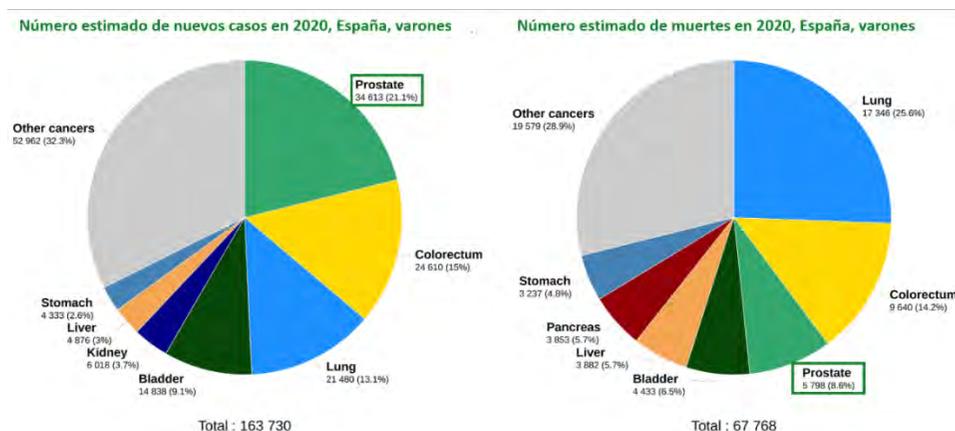


Figura 7. Nuevos casos de cáncer y número de muertes por cáncer en varones en España en 2020²². Se incluyen 36 tipos de tumores y todos los rangos de edad. Datos del “Global Cancer Observatory”.

Se estima que en el año 20 se diagnosticaron alrededor de 35.000 nuevos casos de cáncer de próstata en España, teniendo una prevalencia a 5 años de más de 100.000

INTRODUCCIÓN

casos, la mayor de todos los tipos de tumores en varones, lo que supone el 34% de todos los casos de cáncer en la población masculina adulta. Además, ocupa el tercer lugar como causa de muerte por cáncer en varones, por detrás sólo del cáncer de pulmón y colon. En 2020 esta patología causó 5.798 defunciones, correspondiente al 7,3% de todas las muertes provocadas por cáncer en varones adultos, aun así la mortalidad de esta enfermedad en nuestro país ha descendido en los últimos años²². La supervivencia relativa a los 5 años en nuestro país es del 54%, debido fundamentalmente a la falta de herramientas de pronóstico y herramientas terapéuticas de la enfermedad^{22,23}.

Según el Registro Nacional de Cáncer de Próstata (RNCP), el 71% de los pacientes diagnosticados de CaP tiene más de 65 años en el momento del diagnóstico; mientras que hasta un 14,6% tiene menos de 60 años. Además, un 90% de los pacientes se diagnostica con la enfermedad clínicamente localizada, siendo el 37% neoplasias de grado de bajo riesgo, el 23% de riesgo intermedio y el 28% de alto riesgo, mientras solamente un 5% de pacientes son diagnosticados con enfermedad ya diseminada²⁴.

3.2. Pruebas diagnósticas y pronósticas para el cáncer de próstata

Entre los principales factores de riesgo de CaP encontramos la edad, dieta, factores hereditarios o niveles de antígeno prostático específico o PSA/KLK3 (*Prostate-Specific Antigen*). La aplicación en los últimos años de cribados basados en los niveles del PSA ha llevado a un aumento en la detección precoz del CaP²⁵. Ante niveles elevados en sangre de PSA y un examen digital rectal (*Digital Rectal Examination*, DRE) con hallazgos se recomienda resonancia magnética de imagen multiparamétrica (multi-parametric magnetic resonance imaging/mpMRI)^{25,26}. Sin embargo, el diagnóstico definitivo siempre depende de la verificación histopatológica a partir de una biopsia tumoral, utilizando un mecanismo de ultrasonido transrectal por el que se obtienen entre 10 y 12 muestras de tejido prostático. Tras el examen de la estructura microscópica del tejido y la apariencia de las células que lo constituyen se establece el grado primario y secundario de Gleason, ambos en una escala del 1 al 5²⁷. Este parámetro junto con los niveles de PSA y el estadio clínico permite realizar una estratificación de los pacientes como de bajo, medio o alto riesgo²⁷. Además, debido a la heterogeneidad existente se han

establecido parámetros que permiten discriminar entre los diferentes casos pertenecientes a cada grupo de riesgo²⁷⁻²⁹. En la **figura 8** podemos ver representada la secuencia llevada a cabo para el diagnóstico del CaP.

El seguimiento de los pacientes también se lleva a cabo, principalmente, midiendo los niveles de PSA en suero. Su expresión disminuirá ante la adecuada respuesta al tratamiento y, por el contrario, aumentará si el tumor progresa.

Sin embargo, cabe destacar que la especificidad de estas técnicas es muy baja: un aumento del tamaño de la glándula o la detección de niveles elevados de PSA no siempre son indicadores de malignidad. La consecuencia de todo ello es la realización innecesaria de un gran número de biopsias a pacientes que finalmente resultaran ser falsos positivos²⁹.

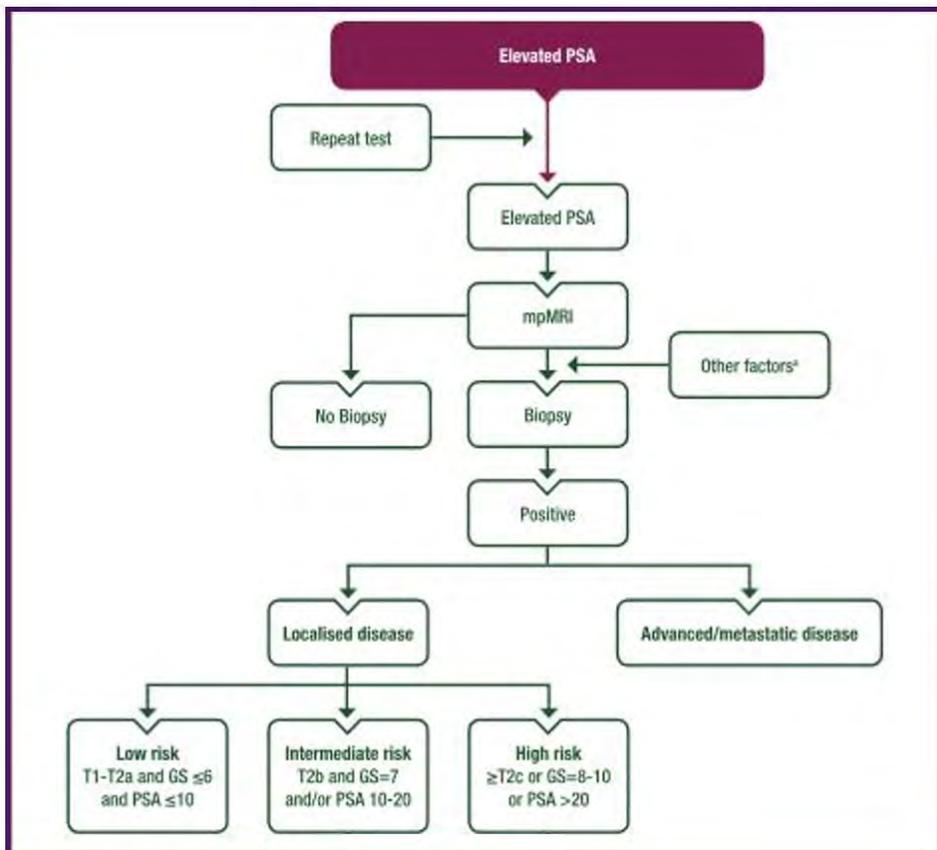


Figura 8. Pruebas diagnósticas en el cáncer de próstata²⁶.

INTRODUCCIÓN

Por ello, se está comenzando a implementar el uso de biomarcadores moleculares de CaP como herramienta suplementaria en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes²⁵. Entre ellos encontramos test biomarcadores para el diagnóstico inicial como el *Prostate Health Index* (PHI), *Progenesa Prostate cancer gene* (PCA3), las proteínas HOXC6 y DLX1, expresión génica de exosomas o cambios epigenéticos en *GSTP1*, *APC* y *RASSF*; así como test pronósticos para pacientes confirmados como los niveles de fosfatasa ácida prostática (PAP/ACP3), Oncotypex DX que predice la agresividad del tumor basándose en un panel de 17 genes, o Prolaris que combina la expresión de RNA de 46 genes para la estratificación del riesgo de metástasis^{25,29}. Además, en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC) se analiza la expresión del *AR-V7* para determinar terapias futuras²⁵.

3.3. Tratamiento y evolución

En los casos que se detectan de forma temprana, la cirugía (prostatectomía) y la radioterapia son procedimientos terapéuticos eficaces para acabar con el tumor³⁰. Sin embargo, los datos ponen de manifiesto que se necesitan nuevas herramientas para tratar el CaP en casos más avanzados o en las recaídas. De esta forma, sabiendo que la próstata es un tejido dependiente de andrógenos y que por tanto el desarrollo del CaP está muy relacionado con la señalización vía AR⁷, actualmente el principal tratamiento para el cáncer de próstata se basa en terapias hormonales, que sirven tanto en diagnóstico temprano como en caso más avanzados.

En este sentido el tratamiento de elección para el cáncer de próstata es la terapia de deprivación androgénica (*Androgen Deprivation Therapy/ADT*), no sólo para los casos en los que el tumor está localizado sino también en el 80% de los casos avanzados. Esta terapia consiste en disminuir los niveles de testosterona, de forma que la proliferación prostática se paralice. Entre ellas se encuentran la castración quirúrgica y la castración química con análogos y antagonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (*luteinizing hormone-releasing hormone/LHRH*), que es la más empleada^{31,32}. En el caso de usar agonistas, primero se obtiene un incremento rápido de testosterona para que después haya una caída súbita, mientras que con el uso de antagonistas se consigue una bajada de testosterona desde el inicio²⁸. En la actualidad, existe un ensayo clínico que describe

una ADT mediante administración diaria del antagonista oral de LHRH, Relugolix. Con este se observa un mayor efecto sin aumento inicial de testosterona, una recuperación de testosterona más rápida y una menor toxicidad cardiovascular con efectos cardiovasculares adversos tras 48 semanas³¹.

Esta terapia es inicialmente efectiva, el problema es que más del 50% de estos casos avanzados desarrollan resistencia a la deprivación hormonal después de varios años de tratamiento. Cuando esto ocurre se denomina cáncer de próstata resistente a castración (CRPC) y presenta una mayor malignidad que en el estadio inicial (Figura 9)^{4,8,32}.

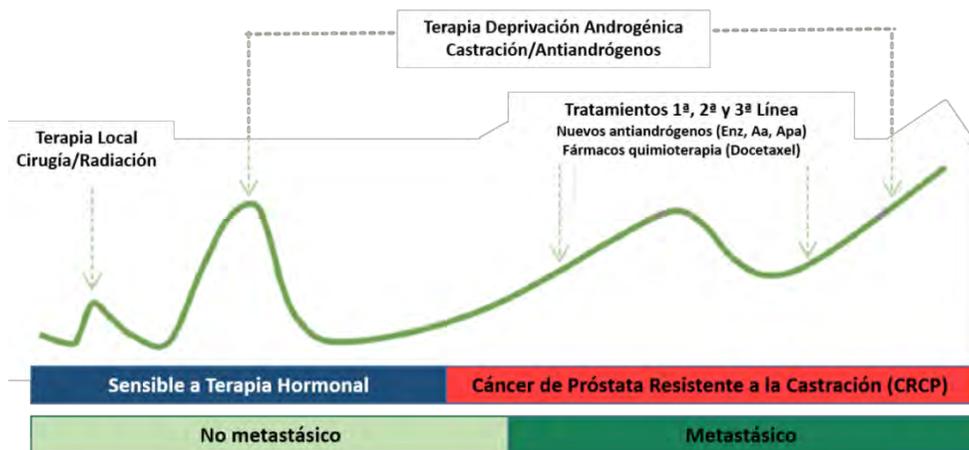


Figura 9. Representación gráfica de la evolución del cáncer de próstata, indicando los tratamientos más comunes aplicados en cada uno de los estadios.

Además, cabe destacar que una de las características de este tumor es su gran heterogeneidad, que supone un desafío en la mejora de los tratamientos. Alrededor de un 12% de pacientes de CaP avanzado presenta alteraciones en genes de reparación del ADN como BRCA2, ATM o CHEK2³³. Por otro lado, se ha visto que defectos en recombinaciones homólogas (PALB2, RAD1) sensibilizan ante inhibidores de la poli(ADP)-ribosa polimerasa, mejorando la supervivencia de estos pacientes. Además, las alteraciones en los mecanismos de reparación de apareamientos incorrectos (*mismatch repair*) y las aberraciones en CDK12 sensibilizan a la inmunoterapia³¹.

Por ello, mientras continúa la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas eficaces contra el CaP, se sigue avanzando en los tratamientos endocrinos.

INTRODUCCIÓN

3.3.1. Manejo clínico del CRPC

El CRPC se caracteriza principalmente por la pérdida de la sensibilidad a ADT, así como niveles de testosterona en suero inferiores a 1,7 nM (<50 ng/dL) (siendo los niveles habituales de 8,64–29 nM) junto a una progresión bioquímica o radiológica, a pesar de la retirada de los antiandrógenos durante al menos 4-6 semanas³⁴. Dentro del CRPC encontramos dos tipos según su estadio; metastásico (mCRPC) o no metastásico (nmCRPC), que normalmente evoluciona a mCRPC en un tiempo medio de 19 meses³⁵.

La evolución de los pacientes hacia CRPC hace necesaria el uso de nuevos tratamientos que inhiban la proliferación del tumor en otros puntos. En 2004 fue aprobado el uso de quimioterapia en mCRPC³⁶. Hasta entonces, los pacientes para los cuales la ADT ya no era efectiva, eran tratados con terapias hormonales de segunda generación que siguen teniendo como diana diversos elementos de la señalización androgénica, dada su relevancia incluso una vez desarrollado el CRPC. Las terapias hormonales de segunda generación se dividen en antiandrogénicos (como acetato de abiraterona) e inhibidores de la función androgénica (como enzalutamida o apalutamida), en los que nos centraremos en este trabajo³³.

El acetato de abiraterona (AA), el profármaco de la abiraterona fue aprobado como primera línea de actuación en CRPC en 2012 bajo el nombre comercial de Zytiga® (Janssen). Es un antiandrogénico que inhibe la síntesis de testosterona por la inhibición de la 17 α -hidroxilasa (CYP17), una enzima con un papel crucial en la síntesis de testosterona y estrógenos³⁷. La administración oral de este fármaco resulta en la presencia de unos niveles indetectables de andrógenos en suero, pero también y, muy importante, a nivel intratumoral³⁷. Los principales efectos adversos del tratamiento con Abi están relacionados con el incremento de mineralocorticoides, consecuencia de la activación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal como respuesta a la baja presencia de andrógenos, por lo que la solución es la coadministración de prednisona³³ (**Figura 10A**).

La enzalutamida (Enz), también conocida como MDV3100 y cuyo nombre comercial es Xtandi® (Astellas/Medivation), es un antiandrogénico no esteroideo de administración diaria y oral aprobado por la FDA desde 2012. De la misma manera que la mayoría de los antagonistas del AR, la Enz también actúa uniéndose al

dominio LBD. Sin embargo, la principal diferencia con los antagonistas de primera generación es que la Enz inhibe parte del cambio conformacional necesario para la activación del AR. Así pues, mientras que el AR unido a los antagonistas de primera generación puede ser translocado al núcleo y unirse a la cromatina, pudiéndose dar un cambio y convertirse el fármaco en un agonista provocando el efecto contrario al deseado, la Enz inhibe la translocación nuclear y la subsecuente función génica del AR. Además, también previene la unión del AR al ADN y su interacción con co-activadores³⁸ y promueve apoptosis³⁹. Más recientemente, en 2019, fue aprobado el uso de Apalutamida (Apa) (Erleada, Janssen) como tratamiento para pacientes con CRPC. Apa es un inhibidor competitivo del AR, actúa al mismo nivel que Enz, uniéndose al dominio de unión al ligando del AR y previniendo su translocación e unión al ADN³⁹ (Figura 10B).

El docetaxel (Dctx) es un derivado de los taxanos que actúa uniéndose a los microtúbulos y previene la traslocación nuclear del AR e induce apoptosis mediante la fosforilación de *B-Cell lymphoma* (Bcl-2) inhibidor de microtúbulos³⁶. En 2004 fue aprobado para su uso como primera línea de actuación en mCRPC tras demostrar su eficacia clínica³³ (Figura 10C).

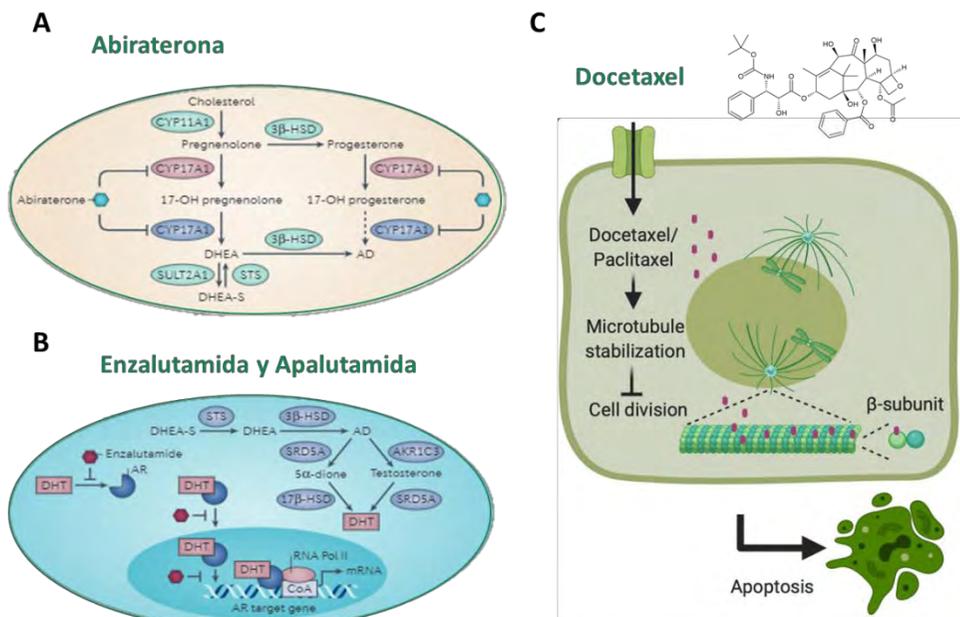


Figura 10. Mecanismo de acción de los antiandrógenos abiraterona (A), enzalutamida y apalutamida (B)⁴⁰ y del taxano docetaxel (C)⁴¹.

INTRODUCCIÓN

Los radioisótopos, como el radio-223, suponen otra opción terapéutica como monoterapia o combinación con quimioterapia en CRPC. Éste se une al microambiente de metástasis escleróticas aumentando la supervivencia en caso avanzados³³.

En el campo de la inmunoterapia, Sipuleicel-T es una inmunoterapia celular autóloga para el tratamiento de mCRPC asintomático que ha demostrado beneficio a nivel de supervivencia. Se compone de células presentadoras de antígenos autólogas cultivadas con la proteína de fusión PA2024, que consiste en una fosfatasa ácida prostática unida a un factor estimulador de colonias granulocito-macrófago³³.

En la actualidad tras la adquisición de resistencia a ADT, se produce la administración secuencial de los diferentes tratamientos disponibles. Según la SEOM⁴², la estrategia más recomendada para pacientes con nmCRPC es el uso de ADT junto con antiandrógenos. En el caso de los pacientes de mCRPC entre los criterios para la selección del orden secuencial de las diferentes opciones terapéuticas se recomienda el uso de Dctx como primera línea en pacientes sintomáticos, mientras que en pacientes asintomáticos se recomienda el uso de AA o Enz como primera línea de actuación. Además, el uso de tratamientos hormonales en pacientes que ya han recibido alguna terapia contra el AR ha demostrado no tener beneficio en la supervivencia, por lo que en esos casos se recomienda el uso de Dctx como tratamiento de segunda línea. Tras su uso, como tercera línea de actuación, se recomienda Cabatixel, un taxano semisintético cuyo mecanismo de acción es similar al de Dctx. Por último, en aquellos pacientes con metástasis óseas y contraindicación para el uso de Dctx, se ha demostrado el beneficio del uso de radio-223^{28,42} (**Figura 11**).

En la actualidad en alrededor del 15-20% de los pacientes no responden al tratamiento de primera línea y del 85 % que sí responden inicialmente, generan resistencia y progresión tumoral tras 9-15 meses^{37,38,43}. Además, ante el uso de estos fármacos como segunda línea de actuación alternando su administración, se ha comprobado que sólo responde un 15% de los pacientes, indicando que se desarrollan resistencias cruzadas a ambos tipos de tratamiento. El periodo promedio de establecimiento de resistencia a esta segunda línea de actuación se sitúa entre los 3-6 meses.

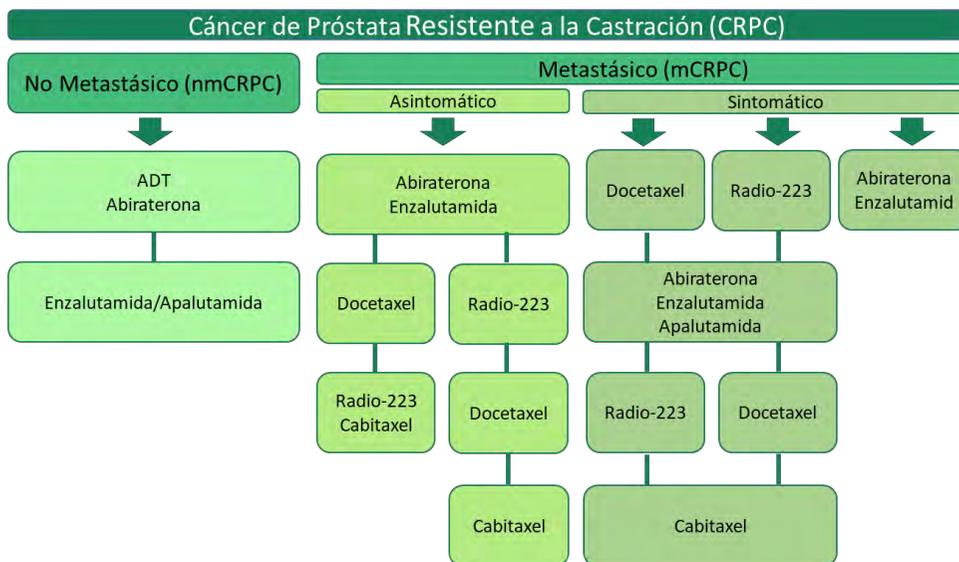


Figura 11. Resumen de las recomendaciones recogidas en diferentes guías clínicas para el tratamiento de CRPC.

Debido a esto en estos momentos se están estudiando los beneficios del uso de terapias combinadas, en lugar de su uso secuencial. En este sentido, se ha probado la administración del doble tratamiento Enz/AA con el objetivo de analizar si esta combinación mejora la supervivencia⁴³. Además, diversos ensayos clínicos en varones con cáncer de próstata metastásico hormonalmente sensible (mHSPC) han probado los beneficios, incluyendo un aumento en la supervivencia global, del uso de ADT en combinación con otros tratamientos como Dctx^{44,45}, AA^{37,46} o Enz⁴⁷. En este sentido, en 2018 AA fue aprobada para su uso en pacientes con mHSPC de alto riesgo⁴⁸. Todo ello, demuestra el beneficio que supone el uso combinado de los distintos fármacos en el tratamiento temprano de los pacientes de CaP, previo a su evolución a CRPC.

Sin embargo, a pesar de la mejora en las aproximaciones terapéuticas, aún no se conoce el orden óptimo de administración. Esto pone de manifiesto la necesidad de determinar los mecanismos moleculares que producen la resistencia a los diferentes tratamientos, así como los diferentes perfiles tumorales que componen esta enfermedad, para encontrar la combinación terapéutica más efectiva y selectiva para cada paciente.

4. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS

La principal limitación de las terapias hormonales en el CaP es que el tumor, a largo plazo, se vuelve resistente a dichos tratamientos avanzando con mayor malignidad y capacidad metastásica⁴⁹. Se han postulado varios mecanismos moleculares responsables de la adquisición de resistencia tras la terapia hormonal, entre ellos encontramos fundamentalmente mecanismos dependientes del AR, aunque también se han identificado mecanismos de resistencia independientes de este.

4.1. Mecanismos dependientes del AR

Es bien sabido que el AR influye definitivamente en la progresión del cáncer de próstata y, por tanto, está claro que debe estar implicado tanto en la resistencia tanto a la ADT como a las terapias de primera y segunda línea. Numerosos estudios respaldan este hecho, y gracias a estos se ha podido profundizar en los diferentes mecanismos que conllevan la aparición y desarrollo de CaP^{21,32,50,51}.

Persistencia en la producción de andrógenos. En el caso de la resistencia a ADT, la persistencia en la producción de andrógenos se produce por un incremento en la síntesis de andrógenos tanto en las glándulas adrenales como del propio tumor mediante el aumento de los niveles de enzimas implicadas en la síntesis como AKR1C3 y SRD5A1, que son capaces de convertir los esteroides derivados de la glándula adrenal en testosterona y DHT^{50,52}. Por tanto, la resistencia no solo potenciaría la activación del AR, sino que implicaría una selección de las células que sintetizan más andrógenos⁵².

Sobreexpresión del AR. Se ha descrito un aumento en la expresión del AR durante el desarrollo de CRPC, mientras que en los tumores primarios se observa generalmente una pérdida del AR⁵³. Este incremento de la expresión del AR puede deberse a una amplificación génica o a su sobreexpresión⁵². De hecho, un 80 % de los pacientes muestra un elevado número de copias del gen *AR* y aproximadamente un 30% muestra altos niveles de amplificación^{12,54}. En definitiva, la sobreexpresión hace que haya una hipersensibilidad a las pequeñas cantidades de andrógenos que

pueda haber en el microambiente tumoral.

Mutaciones activadoras del AR. La mayoría de las mutaciones descritas se encuentran en la región LBD, de modo que pueden aumentar la capacidad de activación del AR, por lo que se necesitarían menores cantidades de andrógenos para activar esta vía. Esto permite una sobreactivación del AR, con el consecuente incremento de la proliferación celular. También se han identificado mutaciones en el dominio de transactivación NTD que posibilita que el AR pueda ser activado por otros andrógenos adrenales o por metabolitos derivados de la DHT^{21,52}. Además, determinadas mutaciones hacen que algunos antiandrógenos que se podrían emplear a priori como tratamiento se transformen en activadores transcripcionales del AR, como es el caso de la flutamida^{21,54,55}. En la resistencia a Enz está implicada la mutación F877L, que transforma la Enz de antagonista en agonista, aunque esta mutación es poco común⁵⁶.

Además, en muchos pacientes de CaP se pueden identificar mutaciones que conllevan una ganancia de función en el dominio LBD. Dentro de estas mutaciones destacan L702H y T878A, asociadas con resistencia a AA⁵⁶, aunque hay muchas más distribuidas a lo largo del gen (Figura 12)^{54,55}.

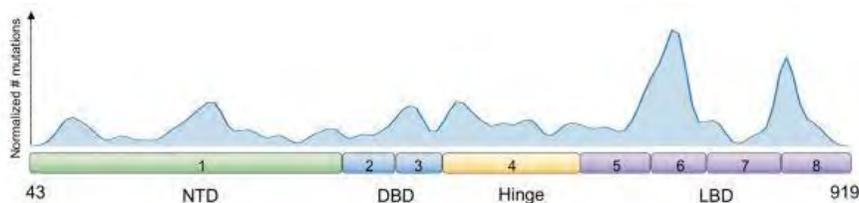


Figura 12. Número de mutaciones en el AR presentes en pacientes de CaP y distribución de las mismas⁵⁴. En la figura se observa que el dominio más afectado es el LBD.

Alteraciones estructurales en el gen del AR. Se han identificado diversas alteraciones estructurales en el AR como deleciones, inversiones y translocaciones⁵². Diversos estudios muestran que la estructura del AR se encuentra frecuentemente alterada en CRPC y, además, existe una alta heterogeneidad entre pacientes^{57,58}.

Actividad transcripcional del AR. Se han identificado modificaciones postraduccionales como la fosforilación del AR que pueden aumentar la función de

INTRODUCCIÓN

coactivadores como CBP, SRC, IL-6, TIF2 así como represores de AR que son también relevantes en la adquisición de resistencia⁵⁹.

En los últimos años se ha propuesto como mecanismo de resistencia la generación de variantes de *splicing* aberrantes del AR, denominadas **AR-Vs** ³⁸. En nuestro trabajo nos centraremos en evaluar este mecanismo.

A modo de resumen en la **Figura 13** se pueden encontrar la mayoría de los mecanismos moleculares asociados a la reactivación del AR en CRPC.

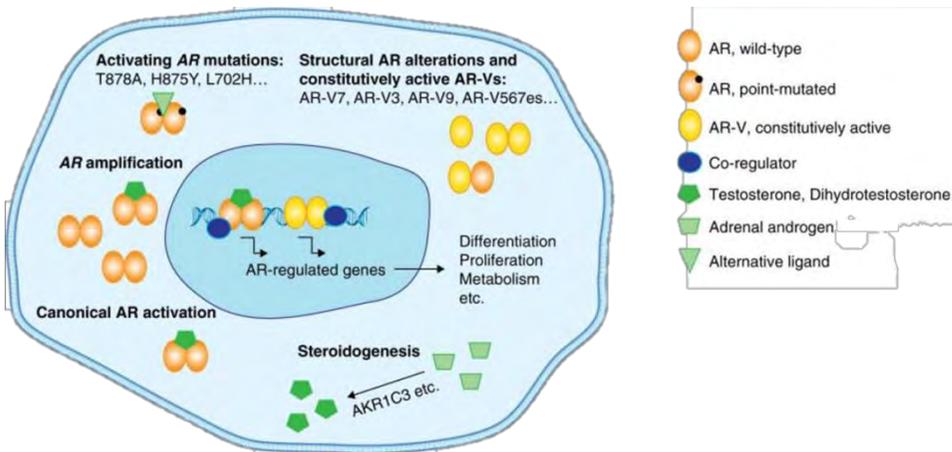


Figura 13. Mecanismos moleculares de reactivación del receptor de andrógenos en CRPC⁵². En la figura aparece una célula epitelial tumoral y los diferentes mecanismos; mutaciones activadoras, amplificación del AR, activación canónica del AR, producción tumoral de andrógenos, alteraciones estructurales en el AR y presencia de isoformas del AR.

4.1.1. Variantes de *splicing* y resistencia a las terapias hormonales

La activación del AR requiere de la unión a su ligando por el dominio LBD. Este *splicing* defectuoso se debe a la presencia de exones crípticos, fundamentalmente en el intrón 3, situado entre los exones 3 y 4. El principal problema de las variantes de *splicing* se encuentra en aquellas que han perdido la región de unión a andrógenos (LBD), ya que estas tienen una actividad transcripcional constitutiva, siendo capaces de translocarse al núcleo e iniciar la transcripción sin necesidad de unirse al ligando⁵².

Se ha identificado la presencia de AR-Vs en el tejido prostático normal, tumores primarios de próstata y metástasis de CaP sin tratamiento. Sin embargo, solo se ha

visto un incremento en sus niveles en CRPC^{60,61}, donde se asocia principalmente con una amplificación del AR^{52,62}. El enriquecimiento de las AR-Vs en CRPC podría estar relacionado con un aumento de la actividad transcripcional del AR o reordenamientos estructurales en el AR, así como el subsecuente reclutamiento de ciertos factores de *splicing*. Estas AR-Vs normalmente se coexpresan con el AR-FL, pudiendo formar con este homodímeros y heterodímeros⁵².

Cabe considerar que el transcriptoma de las AR-Vs también se encuentra condicionado por el tipo celular y la expresión de coreguladores del AR específicos. Por un lado, los cofactores que se unen al dominio NTD pueden afectar la actividad de la mayoría de AR-Vs⁶³, mientras que por otro lado, los cofactores que en presencia de andrógenos interactúan con el LBD en el AR-FL potencian la actividad de las AR-Vs, probablemente mediante su interacción con dominios alternativos⁵².

Una de las isoformas más frecuentemente encontradas en los tumores de próstata es la AR-V7. Esta isoforma consiste en un dominio de activación N-terminal conservado (AF-1), una región bisagra parcial y una secuencia única de C-terminal de 16 aminoácidos, en lugar de la clásica LBD (**Figura 14**). Además, a diferencia del AR-FL, se encuentra continuamente localizado en el núcleo⁶⁴ y ha demostrado encontrarse constitutivamente activo en diferentes sistemas celulares⁵². El AR-V7 tiene una función transcripcional principalmente de represión, que se mantiene en el tratamiento con ADT. Este papel represivo podría producirse mediante la unión a los corepresores NCRO1 y NCOR2 y la consecuente inhibición de H3K27ac. Otros estudios sugieren la regulación por parte del AR-V7 de genes asociados con la fase M del ciclo celular, como *UBE2C* y *CCNA2*⁶⁴. Además, AR-FL y la isoforma AR-V7 poseen transcriptomas específicos, lo que sugiere un papel transcripcional diferente en ambos, contrariamente a la hipótesis de que el AR-V7 actúa simplemente como una isoforma constitutivamente activa del AR⁶⁵.

Además, las AR-Vs actúan formando heterodímeros con el AR-FL^{8,65}. La heterodimerización está mediada tanto por interacciones entre el dominio NTD de las variantes y el CTD del AR como por interacciones DBD-DBD⁵². Esto hace que el AR se pueda translocar al núcleo con más facilidad debido a que AR-V7 no se ve afectado ni por Enz ni por AA, y que por tanto siga activo⁶⁶. Por otra parte, hay algunos estudios que sugieren que el panel de genes que activan las AR-Vs es

INTRODUCCIÓN

diferente al que activa el AR-FL. Sin embargo, otros estudios reflejan que el panel de activación génica es el mismo para el AR-FL y sus isoformas^{67,68}.

AR-V7, por tanto, tendría gran relevancia clínica ya que promovería la progresión a CRPC mediante la represión de genes que regulan negativamente el crecimiento tumoral, asociándose con mal pronóstico en CaP. Su expresión se ha correlacionado con la proliferación celular y progresión tumoral independiente de andrógenos⁶⁹. En este sentido, puesto que la localización primaria de las metástasis en CaP son los huesos, se ha observado un aumento de la expresión de AR-V7 en dichas metástasis relacionándose con un pronóstico negativo⁸.

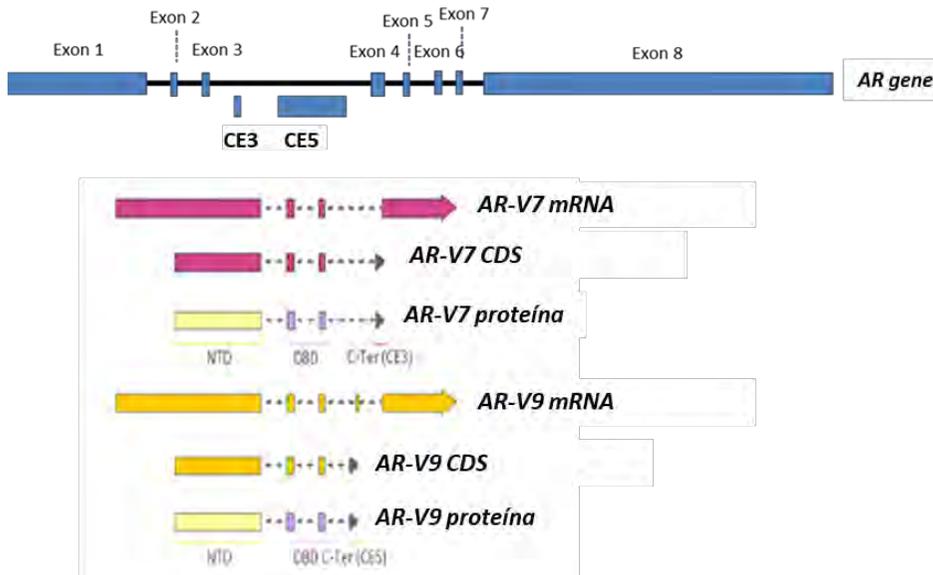


Figura 14. Estructura del gen, del transcrito y la proteína de la AR-V7 y AR-V9 representadas mediante el programa *Snapgene*.

Así, los niveles de AR-V7 se han visto incrementados en los pacientes de mCRPC y Robinson y col. identificaron la presencia de AR-V7 en más del 80% de las muestras de pacientes de CRPC⁶⁰. Además, en diversos estudios se ha visto que su aumento tras la castración confiere resistencia primaria y adquirida a AA y Enz^{61,70-72}. La detección de AR-V7 puede, por tanto, utilizarse como marcador pronóstico asociado a la resistencia a Enz y AA, tal y como se ha demostrado tanto en célula tumoral circulante (CTC)^{25,73} como en sangre periférica⁷⁴. Por el contrario, estudios similares que han analizado la expresión de esta variante de splicing en sangre

periférica completa o a partir de estas CTC, no han mostrado una buena correlación entre *AR-V7* y diagnóstico/pronóstico del cáncer de próstata, principalmente por la limitación de muestras y la necesidad de aplicar técnicas moleculares de amplificación que introducen falsos positivos⁷⁵.

Por otro lado, se ha visto que la *AR-V7* es un antagonista del *AR*, lo que soporta la hipótesis de que las isoformas del *AR* podrían contribuir a los cambios de fenotipo hacia un estado menos diferenciado. De hecho, se ha observado que las *AR-Vs* inducen transición epitelio-mesénquima (*epithelial-mesenchymal transition/EMT*) y expresión de marcadores de pluripotencia⁷⁶. En este sentido, se han visto un incremento de genes asociados a EMT como *N-cadherina/CDH2*, *Vimentina/VIM*, *SNAIL/SNAI1* o *TWIST* en células de CaP que expresaban *AR-V7*⁷⁷. Ensayos de cierre de herida demostraron que *AR-V7* es capaz de promover la migración celular⁷⁸. Además, el silenciamiento de *AR-V7*, pero no *AR-FL*, produce una disminución en los marcadores de pluripotencia *NANOG* y *Oct3/4 (POU5F1)*. Lo que sugiere que el *AR-V7* contribuye a la progresión a la metástasis y a mCRPC promoviendo el proceso de EMT y la adquisición de propiedades de células madre tumorales (*cancer stem cells/CSC*) o capacidad *stemness*⁸.

En las últimas décadas, la gran mayoría de estudios sobre el papel de las *AR-Vs* se han basado en la isoforma *AR-V7*. Sin embargo, un reciente trabajo el grupo de Kohli M y col.⁶⁷, demuestra que la variante *AR-V7* coexpresa con la variante *AR-V9*, puesto que comparte el exón CE3, haciendo necesario una detección más precisa para la discriminación de ambas isoformas (Figura 14). Esto podría determinar que la resistencia dependa tanto de *AR-V7* como de la *AR-V9*⁶⁷. En este sentido, la isoforma *AR-V9* promueve el crecimiento en células de cáncer de próstata. Así mismo, altos niveles de expresión de *AR-V9* en CPRC predicen resistencia primaria a AA⁶⁷.

Con el propósito de revertir la resistencia mediada por las *AR-Vs*, recientemente se está investigando el desarrollo de terapias selectivas frente a estas variantes. Existen varios ensayos clínicos en este ámbito centrados en la interferencia de co-activadores de las isoformas o actuando contra el dominio NTD o DBD por la vía del proteosoma⁷⁶. Un ejemplo de ello sería el uso de Niclosamida en CRPC o mCRPC^{79,80}. Además, que se ha identificado que la activación de la chaperona

INTRODUCCIÓN

GRP78 es capaz de inducir selectivamente de la degradación proteica del AR-V7⁸¹. Puesto que la AR-V7 se genera mediante *splicing* alternativo, otra estrategia para reducir la resistencia, sería atacar directamente a este mecanismo usando inhibidores del spliceosoma como thalidomida (moléculas que inhiben el *splicing* del AR interfiriendo en la interacción entre U2AF65 y SAP155) o usando moléculas inhibidoras de los dominios de activación de las AR-Vs^{76, 8}.

4.2. Mecanismos independientes del AR

Entre los diferentes mecanismos de resistencia a los tratamientos de CaP se encuentran los mecanismos generales de resistencia tumoral a fármacos como la sobreexpresión o desregulación de rutas de señalización alternativas⁸². Estos mecanismos son inespecíficos y frecuentemente están mediados por deficiencia en la entrada del fármaco a la célula cancerígena diana.

Numerosas rutas celulares asociadas con apoptosis, inflamación, angiogénesis o bombas de flujo han sido implicadas en el desarrollo de quimioresistencia en CaP⁸³. En este sentido, las bombas de membrana, como la glicoproteína-P dependiente de ATP, son capaces de expulsar agentes terapéuticos fuera de la célula. Este mecanismo es especialmente relevante, ya que Dctx tiene una alta afinidad por la Glicoproteína-P, lo que resulta en una disminución en la concentración intracelular de este agente en las células cancerosas⁷⁶.

La sobreactivación de rutas implicadas en la proliferación celular se ha visto implicada con la adquisición de resistencia. Uno de los casos mejor estudiados es la activación de receptores de Glucocorticoides (GR) y Progesterona (PR), que bajo ciertas circunstancias pueden activar los genes de respuesta a AR, promoviendo la transcripción de genes que median el fenotipo resistente⁸⁴. Se ha asociado un incremento en GR tras el tratamiento con Enz con la activación de ciertos genes diana del AR y un peor pronóstico⁷⁶. Esto puede deberse a que el transcriptoma del AR y del GR se solapan, llegando a alcanzar hasta un 50% los genes diana comunes a ambos receptores⁷⁶.

Otro mecanismo de resistencia sería el aumento en la presión del fluido intersticial debido a fugas en la vasculatura o alteraciones en el sistema de drenaje linfático. El aumento de presión actuaría como barrera contra el transporte transcápilar, lo que

produciría una alteración en la captación de los fármacos⁷⁶. En relación a este proceso, la heterogeneidad en el microambiente tumoral puede conducir a regiones de hipoxia y acidez, influenciando la respuesta tumoral a la terapia⁷⁶. Un ejemplo de ello sería la sobreexpresión mediada por hipoxia de *hipoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF1 α /HIFA), que bajo condiciones de normoxia es degradado. La sobreexpresión de HIF1 α se ha visto en pacientes de CRPC, donde regula la proliferación celular y la invasión⁸⁵. De modo que, la inducción de HIF1 α disminuye la eficacia de la quimioterapia y ADT, mientras su inhibición resensibiliza las células a la terapia convencional, facilitando otra diana de tratamiento para el CaP.

Aunque más de un 60% de las mutaciones presentes en pacientes de CRPC están relacionadas con el AR, existen otras mutaciones altamente frecuentes en estos pacientes. Entre ellas las mutaciones o deleciones en p53/TP53 o la pérdida de RB1 son concurrentes en pacientes metastásicos, lo que conduce a la plasticidad celular hacia fenotipos basales⁸⁶. Además, también se encuentran en algunos de estos pacientes la pérdida del gen supresor tumoral PTEN o la activación de la señalización mediada por AKT/AKT1^{82,86}. Se han identificado aberraciones en genes reparadores del ADN como BRCA2, ATM, BRCA1, PALB2 o RAD51D de más de un 20% de los pacientes de CaP^{33,86}. En este sentido, los defectos en la reparación del ADN tienen implicaciones, no solo en el tratamiento y el pronóstico de los pacientes, sino en el riesgo familiar de la enfermedad⁸⁶. Por otro lado, se ha ligado la resistencia a taxanos (Dctx) a cambios en la expresión o mutaciones en la Tubulina α TUBA1A, lo que previene la interacción entre el fármaco y su diana⁸⁷.

Por último, la heterogeneidad tumoral, en la que nos centraremos a continuación, también tiene un papel fundamental en la adquisición de resistencia a los diferentes tratamientos. Cada vez son más las evidencias que sugieren que la inhibición prolongada de la ruta del AR puede alterar el curso de la enfermedad, dando lugar a una desdiferenciación histológica y alteraciones en el linaje celular en forma de EMT o diferenciación neuroendocrina⁸⁸.

5. HETEROGENEIDAD TUMORAL

La heterogeneidad tumoral se basa en que tumores histológicamente similares pueden poseer diferentes características y comportamiento⁸⁹. Esta heterogeneidad puede ser tanto inter-tumoral, si las variaciones se producen entre diferentes pacientes con tumores del mismo tipo, como intra-tumoral, cuando se dan dentro de una misma neoplasia⁹⁰. En particular, la heterogeneidad intra-tumoral se encuentra determinada por variaciones genéticas y alteraciones epigenéticas, transición entre diferentes estados celulares y cambios ambientales^{89,90}. Por todo ello, la heterogeneidad intra-tumoral dirige la progresión tumoral y representa la principal causa del fracaso terapéutico⁹⁰.

Se han propuesto dos modelos que explican la presencia de la heterogeneidad tumoral: el modelo de selección clonal y el modelo de CSC⁹⁰. Haciendo referencia a la selección clonal, ésta juega un papel clave en la heterogeneidad tumoral. La mayoría de tumores sólidos se generan a partir de una sola célula que acumula una serie de alteraciones que producen un cambio de fenotipo; seleccionándose aquellos clones con una ventaja proliferativa. Del mismo modo, dentro de la población clonal, las células individuales siguen acumulando nuevas alteraciones genéticas, lo que resulta en que, dentro de un tumor, tanto las células tumorales como su microambiente pueden mostrar distintas características genéticas y fenotípicas. Esta variabilidad se ha observado tanto entre células tumorales individuales, como en grupos de células o lesiones tumorales topográfica o anatómicamente separadas⁹¹. El segundo modelo se basa en el desarrollo de las CSC, una población minoritaria de células de cáncer capaz de mantener los diferentes tipos celulares tumorales. Debido a su relevancia en la progresión tumoral desarrollaremos concretamente este apartado más adelante.

En cuanto a la heterogeneidad en CaP, debemos indicar que existe una gran diversidad en las características histopatológicas y moleculares. Se ha demostrado la presencia de una amplia heterogeneidad genómica tanto inter-tumoral como intra-tumoral^{89,92}. Además, existe una relación compleja entre los tumores primarios y las metástasis⁸⁹, en este sentido el mCRPC presenta un alto grado de heterogeneidad genómica y fenotípica⁹³. Esta heterogeneidad se ha observado tanto a nivel

somático, como a nivel de evolución clonal y de expresión génica, y su presencia dificulta la implementación de herramientas genómicas tanto para el seguimiento de los pacientes como para la aplicación de tratamientos específicos⁹².

5.1. Microambiente tumoral en CRPC

La heterogeneidad intra-tumoral se ha visto reflejada en la diversidad de tipos celulares y en la composición de la matriz extracelular que componen el microambiente tumoral (*tumor microenvironment/TME*). Dentro de los tipos celulares que componen el TME encontramos fibroblastos, células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells/MSCs*), células inmunes y células sanguíneas y linfáticas⁹⁴. La composición del TME es crucial en la regulación de la proliferación celular, angiogénesis, invasión inmune y la resistencia a fármacos, y se encuentra mediada por una señalización recíproca entre las células tumorales y distintas poblaciones presentes en el TME⁹⁵.

Entre los diferentes tipos celulares presentes en el TME, los fibroblastos asociados al cáncer (*cancer associated fibroblasts/CAFs*) son las células más abundantes y promueven la transformación oncogénica, angiogénesis y metástasis, entre otras funciones. En cuanto a las MSC, son células progenitoras multipotentes que contribuyen a la homeostasis del tejido conectivo. Estas son reclutadas al TME donde pueden promover la progresión tumoral en varios tipos de cáncer, entre los que se encuentra el de próstata⁹⁶. Por otro lado, los linfocitos son células clave en el sistema inmune adaptativo que tienen un papel fundamental en la biología del cáncer. Un estudio en tumores primarios de próstata reveló que la infiltración de células T reguladoras CD4⁺ se relacionaban con un incremento en el riesgo de letalidad. Mientras que las células B CD20⁺ se relacionaron con recurrencia y progresión de la enfermedad⁹⁷. En cuanto a las células mieloides, son esenciales en el mantenimiento de la función del sistema inmune innato y adaptativo. En pacientes de mCRPC la abundancia de células mieloides supresoras en sangre se correlaciona con marcadores pronóstico negativos como el PSA⁹⁸. Por último, se ha visto que los macrófagos promueven la progresión tumoral, migración y metástasis. Numerosos estudios han evaluado la relevancia clínica de los macrófagos en la progresión del CaP⁹⁹⁻¹⁰¹.

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, uno de los motivos de la generación de resistencia a fármacos en el cáncer podría ser la producción paracrina de factores como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF/FGF1) o el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF/VEGFA) y las interleucinas inflamatorias como IL-6 que pueden encontrarse en el estroma tumoral y participan en la adhesión de las células a la matriz extracelular (*extracellular matrix/ECM*)⁷⁶. En 2009 se observó la infiltración de una población heterogénea de células inmunes con actividad inmunosupresora en el microambiente de CRPC, activando la tumorigénesis mediante la secreción de IL-23, que activa la señalización androgénica¹⁰². La ECM puede inducir también quimioresistencia mediante la inhibición de la apoptosis mediada por AKT¹⁰³.

Con todo ello, la heterogeneidad del TME se manifiesta tanto en la composición celular como en diferencias fenotípicas y el estado funcional que cada tipo celular⁹⁴. En este sentido, la hipoxia, presente en regiones tumorales poco vascularizadas contribuye a la plasticidad celular mediante la activación del proceso de EMT y la diferenciación neuroendocrina en tumores de próstata⁸⁸. Bajo condiciones de hipoxia, se produce una regulación al alza de HIF1 α , el regulador central de la respuesta a hipoxia, y una transición hacia un estado más mesenquimal. Estas células en condiciones de hipoxia poseen características *stem cell-like*, incluyendo un aumento en la expresión de NANOG, Oct3/4 y CD44¹⁰⁴. Además, existe una conexión directa entre HIF1 α y el fenotipo neuroendocrino, por medio de la interacción de HIF1 α con el factor de transcripción neuroendocrino FOXA2¹⁰⁵.

Además, en el estroma tumoral se pueden producir cambios reactivos que contribuyan a un ambiente adecuado para el crecimiento celular y proliferación. Estos cambios incluyen abundancia de CAFs y pérdida de las células inmunes y endoteliales. Además, como en otros tumores, se ha observado una infiltración tumoral de linfocitos T y una pérdida de células inmunes y endoteliales en CaP⁷⁶.

6. CARCINOGENÉISIS Y PLASTICIDAD CELULAR

La mayoría de muertes en CaP se producen en pacientes diagnosticados con enfermedad avanzada o metastásica. En este sentido la latencia y la plasticidad celular, conceptos ampliamente ligados, juegan un papel clave en el proceso metastásico ya que les proporcionan a las células tumorales una ventaja de supervivencia. La plasticidad celular se define como la capacidad de las células para cambiar de fenotipo en respuesta a señales ambientales sin que se produzcan mutaciones genéticas. El cáncer se ha relacionado con un incremento en la plasticidad celular, que podría estar causada por la inestabilidad epigenética y genómica en el microambiente tumoral¹⁰⁶.

El proceso de latencia tumoral ha sido asociado a distintos tipos de tumores sólidos. En el caso del CaP, su historia natural se caracteriza por largos periodos de enfermedad asintomática debido a un estado de latencia o reposo (*dormancy*) que tiene especial relevancia por su papel en la diseminación del cáncer.

Además, diferentes fenotipos celulares se han asociado a la adquisición de resistencia a los fármacos y a CRPC. Entre ellos encontramos el cáncer de próstata neuroendocrino (NEPC), las CSC y el proceso de EMT(Figura 15)¹⁰⁷.

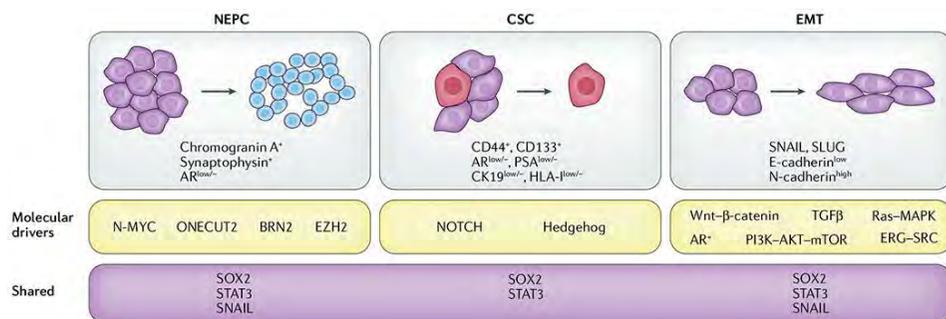


Figura 15. Plasticidad celular y fenotipos asociados a la resistencia a fármacos⁷⁶. Las NEPC se caracterizan por la presencia de marcadores como la cromogranina A y la sinaptofisina y un estado AR^{low} y están dirigidas por factores de transcripción y epigenéticos como ONECUT2 y EZH2, entre otros. Las CSC se caracterizan por un fenotipo CD44⁺CD133⁺ y AR^{low}/PSA^{low}/CK19^{low}/HLA^{low}. La EMT es promovida por factores de transcripción como SNAIL y SLUG e impulsada por vías como ERG-SRC y PI3K-AKT-mTOR, lo que da lugar a un cambio en la expresión celular de E-cadherina a N-cadherina.

INTRODUCCIÓN

6.1. Latencia celular (*dormancy*)

El término *dormancy* o latencia celular, descrito por Rupert A. Willis por primera vez en 1934¹⁰⁸, se define como un estado reversible en el que las células permanecen quiescentes, mediante un arresto mitótico en fase G₀-G₁, en el que continúan siendo viables sin entrar en fase proliferativa^{109,110}.

La biología molecular que subyace a la latencia celular ha sido ampliamente estudiada. Ésta podría estar relacionada con el balance entre dos vías de señalización clásicas mediada por las MAPK: la ruta de ERK y la vía de p38 MAPK, donde uPAR tendría un importante papel regulador^{111,112}. A su vez, la activación de estas vías implicará la activación de otros procesos biológicos como la reprogramación metabólica que podría estar también implicada en el mantenimiento de la latencia¹¹³.

El estado de latencia se caracteriza por ser una fase del proceso metastásico en la cual las células tumorales son capaces de sobrevivir en condiciones extremas durante largos periodos de tiempo, lo que podría ser un mecanismo de adaptación a nuevos microambientes que permite a las células tumorales dotarse de plasticidad celular tanto fenotípica como genética. En concordancia con ello, diversos estudios sugieren que la diseminación de las células cancerosas está precedida por periodos extensos de latencia celular en los sitios premetastásicos (**Figura 16**)¹¹². Además, durante la latencia celular las células tumorales son generalmente resistentes a las terapias, que son más efectivas frente a las células tumorales proliferativas¹¹⁰.

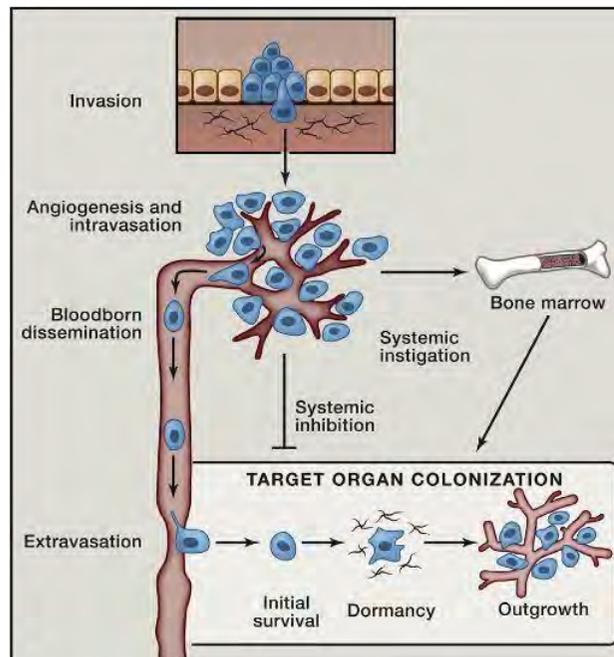


Figura 16. Proceso de invasión y metástasis¹¹². El proceso comienza con la disociación de las células tumorales de las células epiteliales adyacentes que permite el paso a la matriz intersticial (*invasión*). En un proceso altamente regulado, las células tumorales se asocian a otras células para crear un microambiente permisivo. Al reclutar las células angiogénicas endoteliales (*angiogénesis*), las células tumorales entran en la circulación (*intravasación*) y se diseminan a través de la circulación sanguínea. Al detenerse en la microcirculación, las células cancerosas alteran las uniones endoteliales y penetran en el estroma del órgano diana (*extravasación*). En el último paso, resisten a la apoptosis pasando por un periodo variable de latencia que, finalmente, vuelven a activar su proliferación dando lugar a la metástasis.

En referencia al CaP, éste se caracteriza por la presencia de largos periodos de recurrencia debido a la existencia de largos periodos de latencia celular, de hecho, la mediana del tiempo transcurrido desde la recidiva con PSA tras la prostatectomía radical hasta la metástasis ósea y la muerte supera los 16 años¹¹². Asimismo, como sucede en otros tumores hormono-dependientes, se ha sugerido que la terapia hormonal con antagonistas del AR podría promover la latencia celular en CaP¹¹².

En estos periodos, las células tumorales diseminadas (DCCs) son capaces de migrar de los sitios primarios de la enfermedad hacia los órganos secundarios. Estas células pueden mantenerse en un estado de latencia durante largos periodos antes de activarse, generando metástasis clínicas.

INTRODUCCIÓN

La médula ósea es la principal localización de las DCCs y de las metástasis en CaP. Existen evidencias que sugieren que la presencia de DCCs en el tejido óseo se relaciona con un pronóstico negativo¹¹⁴. De modo que, las células tumorales activadas pueden conducir el proceso de metástasis ósea, mientras que la interacción entre células tumorales latentes y el resto de componentes celulares óseos favorecería el equilibrio. Todo ello sugiere que el microambiente tumoral controla la conversión entre los estados de latencia y activación¹¹⁵.

Así mismo, el proceso de latencia y reactivación metastásica también ha sido relacionado con la selección clonal y la presencia de CSC que, como se expuso anteriormente, podrían dirigir la heterogeneidad tumoral¹¹².

6.2. Cancer stem cells y transición epitelio-mesénquima

Las células madre tumorales o CSC son una pequeña población celular con capacidad de auto-renovación, pero que, a diferencia de las células madre embrionarias, se dividen predominantemente de forma simétrica. En cuanto a su origen, podrían generarse por la transformación oncogénica de células madre adultas o mediante la dediferenciación o transdiferenciación de las células tumorales existentes¹¹⁶. Durante el desarrollo de los diferentes mecanismos de resistencia se genera, por tanto, una subpoblación de CSC que dotan de gran heterogeneidad intratumoral¹¹⁷ y gran plasticidad al tumor⁴⁹, lo que les permite moverse entre estados multipotentes y diferenciados. En el caso del CaP, se ha identificado la presencia de CSC que se caracterizan por expresar diversos marcadores de superficie como CD44⁺/α2β1/CD133⁺ y poseer una alta capacidad clonogénica. Además, en esta población celular también se ha identificado la expresión de la bomba de membrana ABCG2, que como ya se vio con anterioridad, tiene un papel esencial en la resistencia a fármacos. A nivel molecular, las CSC expresan genes típicos de pluripotencia como SOX2, NANOG u Oct3/4, y generalmente tiene una baja expresión de marcadores de diferenciación como PSA o AR¹¹⁸. De hecho, los tumores con baja expresión de AR tienen propiedades *stem cell-like* y son capaces de activar los procesos de ciclo celular, lo que resulta en una mayor agresividad⁸⁸.

La transición epitelio-mesénquima es un proceso biológico reversible que permite a

las células epiteliales, que normalmente interaccionan con la superficie de la membrana basal, someterse a diferentes cambios bioquímicos que les permiten adquirir un fenotipo mesenquimal que incluye un mayor potencial de migración e invasión, una elevada resistencia a la apoptosis y un incremento en la producción de componentes de la ECM. La finalización del proceso de EMT está marcada por la degradación de la membrana basal y la formación de células mesenquimales que tienen la capacidad de migrar fuera de la capa epitelial donde se originaron (**Figura 16**)¹¹⁹. Así mismo, esta transición promueve la metástasis a sitios distales, así como la resistencia a fármacos y, con ello, la recurrencia⁹⁰. Molecularmente, el proceso de EMT se caracteriza por una disminución en la expresión de E-cadherina/CDH1, un marcador epitelial; y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales como Vimentina, N-cadherina y SNAIL/SNAI1¹²⁰.

El proceso de EMT depende tanto de mutaciones genéticas como modificaciones epigenéticas o de la modulación transcripcional de las células tumorales por medio del microambiente tumoral a través de factores de crecimiento, citoquinas, fibroblastos y macrófagos asociados al cáncer. Entre las diferentes señales responsables de la inducción de EMT se encuentra el factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β /TGFB), que podría ser responsable de la activación en las células tumorales de diferentes factores de transcripción, que participan en la inducción de EMT, como SNAIL, SLUG/SNAI2 o TWIST¹¹⁹. TGF- β tiene papeles opuestos en la tumorigénesis del CaP, ya que actuaría como inhibidor en el crecimiento normal y las etapas tempranas de la enfermedad, y como promotor en CaP avanzado. Su función se encuentra regulada por rutas tanto independientes como dependientes de SMAD1. En CRPC la inhibición de SMAD1 induciría la producción paracrina de TGF- β , promoviendo el proceso de EMT. Por otro lado, algunos datos sugieren que p38-MAPKs y RhoA/RHOA podrían mediar la inducción de EMT por TGF- β en células epiteliales de ratón¹²¹.

Además, el proceso de EMT depende de otra serie de rutas de señalización intracelular en las que intervienen, entre otras ERK/MAPK1, PI3K, AKT, β -catenina/CTNNB1 y diferentes moléculas de adhesión celular (*cell adhesion molecules/CAM*) como la integrina β 4/ITGB4, integrina α 5 β 1 (ITGA5-ITGB1) e integrina α V β 6 (ITGAV-ITGB6). Por otro lado, la conexión entre la

INTRODUCCIÓN

perdida de E-cadherina e EMT ha sido descrita en diversas investigaciones. Se ha demostrado que el control epigenético de E-cadherina y la actividad β -catenina/LEF1 es importante en el potencial metastásico de las células de CaP¹¹⁹.

Por último, los microARNs no codificantes también forman parte del circuito de señalización que regula el proceso de EMT. Entre ellos, se ha visto que miR-21 se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de tumores, entre ellos CaP, y facilita el proceso de EMT¹²².

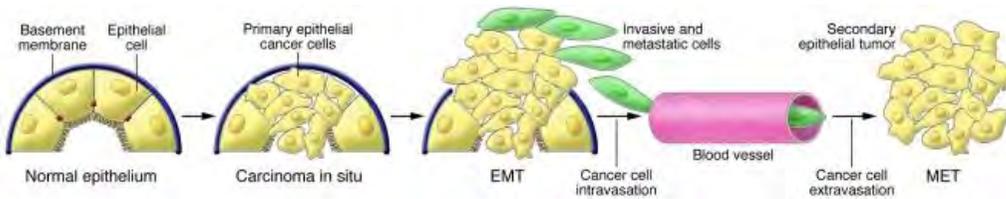


Figura 17. Contribución de EMT a la progresión tumoral¹¹⁹. En la primera etapa del proceso de progresión invasiva las células epiteliales pierden su polaridad y se desprenden de la membrana plasmática, produciéndose también cambios en la composición de esta. El siguiente paso implica EMT y un cambio angiogénico, facilitando el crecimiento del tumor. La progresión hasta el tumor metastásico también implica EMT, lo que permite a las células cancerosas entrar en la circulación y salir del torrente sanguíneo otras localizaciones, donde pueden formar micro y macrometástasis, que pueden implicar MET y, por tanto, una reversión a un fenotipo epitelial.

En relación a la implicación de estos procesos en la progresión tumoral, cada vez existen más evidencias que apoyan la teoría de que las células tumorales responsables del inicio y el mantenimiento del proceso de proliferación metastásica son las CSC^{90,112} y de que este potencial iniciador del tumor está guiado por el proceso de EMT⁹⁰. De modo que, las CSC pueden pasar de un estadio epitelial a mesenquimal (**Figura 18**)¹¹².

Con todo ello, la capacidad pluripotente de las células tumorales podría estar asociada con un fenotipo parcial de EMT y, por tanto, las células que muestran un estado intermedio de EMT tendrían una mayor plasticidad⁹⁰. En concordancia con ello, en un modelo murino de CaP se observó que las células en un estadio intermedio de EMT presentaban un potencial de iniciación tumoral similar a las células mesenquimales¹²³.

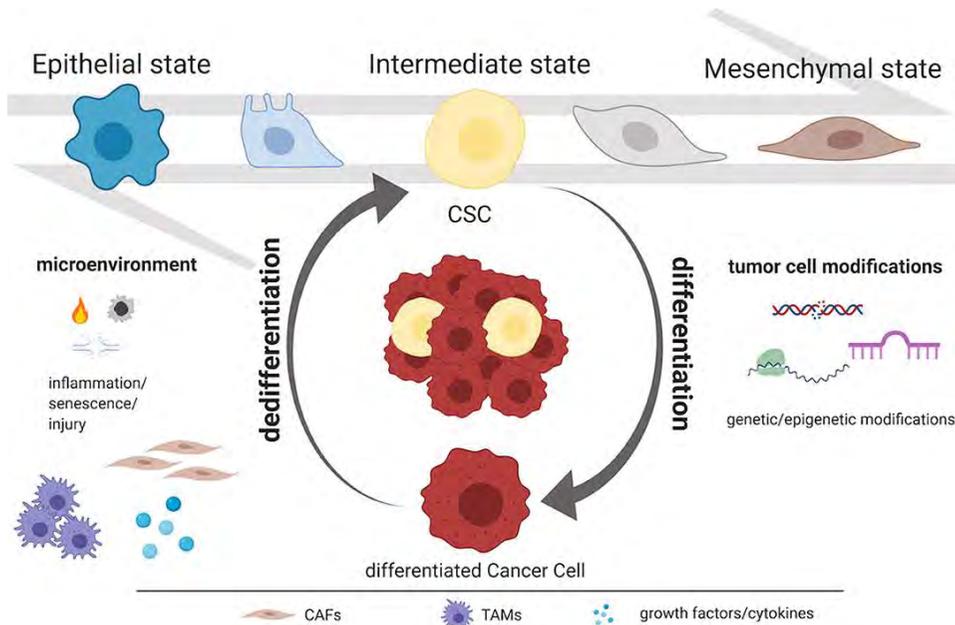


Figura 18. Mecanismos de plasticidad celular asociada a CSC⁹⁰. La heterogeneidad intratumoral está ligada a la capacidad de cambiar reversiblemente entre un estado CSC y un estado de diferenciación. Las modificaciones como alteraciones genéticas y epigenéticas y las perturbaciones en el microambiente tumoral como la inflamación y la senescencia representan la mayor causa de la plasticidad celular. Además, las CSC inducen EMT y, particularmente, la presencia de un estado intermedio de EMT. Este proceso depende tanto de mutaciones genéticas y modificaciones epigenéticas como de la modulación transcripcional de las células tumorales y señales por parte del microambiente tumoral.

La resistencia a los tratamientos en CaP mediada por EMT ha sido relacionada con la agresividad tumoral y la metástasis. Por ello, E-cadherina es ampliamente usada para monitorizar el fenotipo epitelial; ya que, durante los procesos de progresión como migración e invasión, se produce una disminución en su expresión. Así mismo, se ha visto que la quimiorresistencia ligada a la desregulación de E-cadherina podría estar mediada por la señalización vía NOTCH1, por lo que su inhibición podría restaurar la quimiorresistencia¹⁰⁷. En concordancia con ello, uno de los procesos de EMT relacionado con la resistencia y la metástasis sería la pérdida de las interacciones entre las células epiteliales y la ECM, mediada por las CAM. De hecho, numerosos estudios han descrito la desregulación de diferentes CAMs en CaP metastásico, entre ellos se ha relacionado la reducción en la expresión de diferentes CAMs (integrina $\alpha 5$ /ITGA5, integrina $\alpha 7$ /ITGA7, E-cadherina, etc.), así

INTRODUCCIÓN

como la sobreexpresión de N-cadherina en pacientes de CaP¹²⁴. Además, cabe destacar, que el papel de EMT en la diseminación metastásica requiere del desprendimiento del fenotipo mesenquimal durante el proceso de colonización subsecuente (Figura 17)¹²⁵.

En este ámbito, se ha propuesto que EMT podría tener un papel crítico en la metástasis de varios tipos de tumores, entre ellos el CaP. Las células de CaP, tras someterse a EMT, se diseminan en la circulación como CTCs, donde atraviesan varias barreras físicas como las paredes de los sinusoides y el estroma de la médula ósea antes de migrar hasta la superficie ósea endosteal donde se establecen las metástasis⁹⁴.

En definitiva, la EMT podría desempeñar un papel en la generación de células tumorales con alta capacidad invasiva y con características de CSC, que podrían facilitar la formación de tumores secundarios por parte de las DCCs.

6.3. Cáncer de próstata neuroendocrino

Así mismo, se ha asociado la diferenciación de las células tumorales a fenotipo neuroendocrino con la progresión tumoral y peor pronóstico¹²⁶. El CaP es típicamente un adenocarcinoma, sin embargo, se ha descrito la presencia de variantes neuroendocrinas en una minoría de casos, principalmente en pacientes con enfermedad avanzada. Además, algunas evidencias indican que los tumores neuroendocrinos son más propensos a surgir después de los tratamientos de ADT, con una frecuencia de entre un 10-20% de casos de CRPC^{86,127}. Clínicamente, se identifica con niveles bajos o moderados de PSA y predominancia de metástasis óseas. Mientras que desde el punto de vista molecular, se caracteriza por la expresión de marcadores neuroendocrinos, como enolasa neuro específica (NSE/ENO2), sinaptofisina/SYP, cromagranina A/CHGA o la molécula de adhesión neural 1 (NCAM1), detectados mediante inmunohistoquímica; y por la frecuente pérdida del AR^{127,128}.

El NEPC engloba varios subtipos entre los que se incluyen: a) adenocarcinoma de próstata con diferenciación neuroendocrina; b) tumor carcinoide; c) adenocarcinoma con diferenciación de células de Paneth neuroendocrina; d) carcinoma de células pequeñas; e) carcinoma de células grandes neuroendocrinas;

f) carcinoma mixto neuroendocrino – adenocarcinoma acinar. Siendo el más agresivo de los subtipos de NEPC el carcinoma neuroendocrino de células pequeñas¹²⁷.

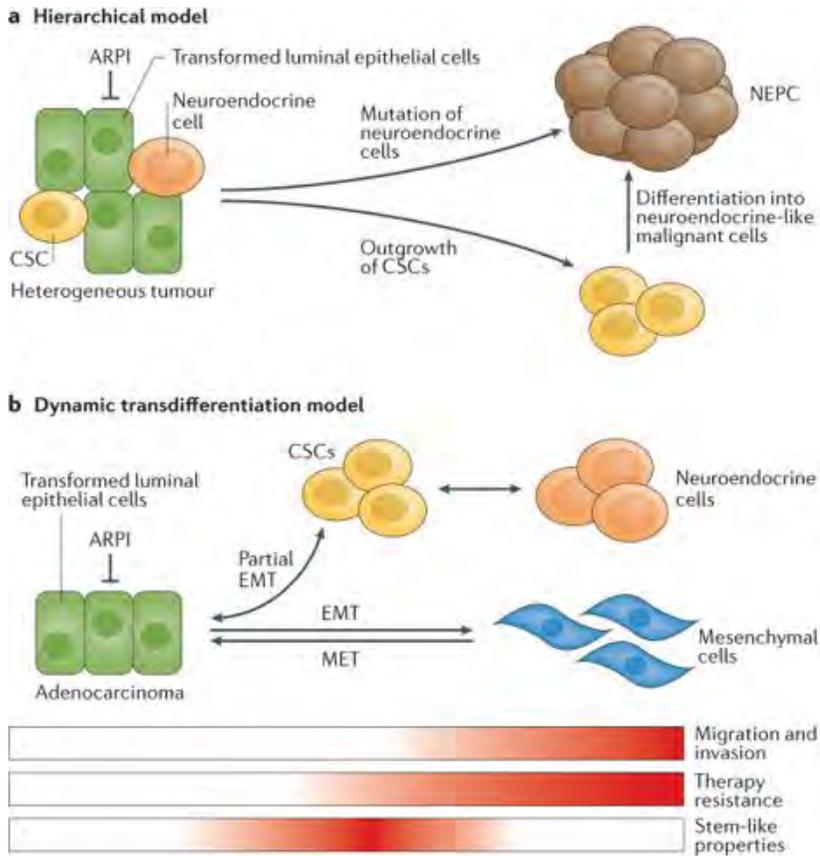
En cuanto al origen del NEPC, se han postulado dos modelos diferentes de diferenciación a fenotipo NE (**Figura 19**):

El **modelo jerárquico** se basa en que NEPC proviene de la expansión de las CSC o células NE presentes en un pequeño número dentro de un tumor heterogéneo. Tras la terapia de ADT, estas células independientes del AR tendrían una ventaja proliferativa, por lo que las células tumorigénicas CSC se expandirían tras los tratamientos¹²⁸. Así mismo, la plasticidad de estas células les permite diferenciarse en células neuroendocrinas, que constituirán el NEPC. Por otro lado, la adquisición de nuevas mutaciones en las células neuroendocrinas preexistentes también puede originar el NEPC⁸⁸.

Los tumores de próstata con fenotipos NE presentan un perfil molecular con una amplia similitud respecto a otros tumores neuroendocrinos¹²⁷, lo que sostiene la idea de que el NEPC viene de la selección clonal de un adenocarcinoma precursor¹²⁹. En este contexto, la secuenciación del exoma completo de pacientes de CRPC, mostró un enriquecimiento en la pérdida de *RBI* y mutaciones y deleciones en *TP53*, alteraciones comúnmente observadas en tumores neuroendocrinos⁹³. Además, en modelos preclínicos, la combinación de *RB1* y *TP53* dirigen el desarrollo de NEPC^{130–132}, lo que apoya su contribución en la patogénesis de NEPC.

El **modelo de transdiferenciación** se basa en que el fenotipo NE proviene de las transdiferenciación de las células del adenocarcinoma mediante un estado intermedio de CSC. La transdiferenciación es un proceso por el cual células diferenciadas cambian hacia otro linaje celular para evadir la presión asociada a los tratamientos¹¹⁶, con ello, la deprivación androgénica ha probado dirigir la transdiferenciación de las células dependientes del AR mediante un estado multipotente intermedio. Así, la re-exposición también facilita su diferenciación al estado inicial de dependencia del AR, lo que señala la enorme plasticidad de estas células. Esta observación apoya estudios anteriores en las que se detectaron que diferentes aberraciones genéticas, como la fusión de *TMPRSS2-ERG*, se conservaban tras la conversión a NEPC⁸⁸.

INTRODUCCIÓN



Nature Reviews | Urology

Figura 19. Mecanismos de diferenciación neuroendocrina en respuesta a los inhibidores del receptor de andrógenos⁸⁸. Modelo jerárquico (a) y modelo de transdiferenciación (b). La capacidad de migración e invasión, resistencia a las terapias hormonales y propiedades *stem cell-like* varían durante la transdiferenciación a NEPC (el rojo indica un nivel alto).

Recientes evidencias, subrayan el papel de EMT y la multipotencia como factores desencadenantes durante la transdiferenciación neuroendocrina. Se ha visto que los cambios de expresión en los marcadores de NE se acompañan comúnmente de la desregulación de las rutas de señalización implicadas en la plasticidad celular, características de CSC y EMT¹²⁸. Por ejemplo, se ha observado la sobreexpresión del inductor de EMT SNAIL en modelos celulares de CaP, lo que potencia la expresión de marcadores neuroendocrinos como NSE y CHGA¹¹⁶. Por tanto, previo a la transdiferenciación NE, la deprivación androgénica induciría el proceso de EMT y el enriquecimiento de poblaciones CSC. Otra prueba de ello es que se ha demostrado

que existe un amplio solapamiento entre factores de transcripción y receptores de superficie que definen la plasticidad celular y el fenotipo NE. Por último, se ha visto en varias investigaciones que la expresión de factores de transcripción relacionados con EMT potencia la adquisición de fenotipo NE y, además, este efecto también se produciría de manera recíproca⁸⁸.

Dentro de las evidencias que apoyan la idea de que las células de adenocarcinoma usan el proceso de EMT para transdiferenciarse a NEPC, se ha identificado el factor de transcripción SOX11, implicado en EMT, como conductor de la diferenciación NE en un modelo murino transgénico Np53, lo que sugiere que ambos procesos están ligados. Con todo ello, el paso por EMT para la diferenciación NE dependería del origen celular, perfil mutacional y características epigenéticas⁸⁸.

Asimismo, se han identificado diferentes rutas de señalización ligadas a la plasticidad celular y la diferenciación NE. Entre ellas, la señalización de STAT3 por medio de IL-6 conduce el proceso de EMT, el fenotipo CSC y la diferenciación NE en CaP¹³³. En este sentido, se han observado niveles elevados de IL-6 en pacientes con CaP metastásico, lo que se relaciona con una menor supervivencia¹³⁴. La ruta de WTN- β -catenina también se encuentra comúnmente activada en CRPC, lo que resulta en una resistencia a ADT y fenotipo NE. Todo ello indica que la plasticidad celular y el cambio de fenotipo están controlados por una compleja serie de mecanismos transcripcionales que aún requieren de su investigación.

Por otro lado, análisis de metilación han revelado que existe una desregulación epigenética en rutas relacionadas con EMT y CSC, entre otras, lo que sugiere el papel clave del epigenoma en la modulación del fenotipo NE¹²⁷. En este sentido, la metiltransferasa de histonas EZH2 está sobreexpresada en NEPC. Asimismo, el tratamiento con inhibidores de EZH2 en modelos de NEPC ha demostrado actividad antitumoral⁹³, apuntando que la plasticidad celular podría ser explotada terapéuticamente.

Con el uso de la *next generation RNA-sequencing* se ha visto que el transcriptoma de NEPC y de CaP son diferentes. Y se ha identificado la sobreexpresión de N-Myc/MYCN en tumores NE, el cual podría ser un elemento clave en el desarrollo del fenotipo NE. De modo que, la sobreexpresión de N-Myc en el contexto de la pérdida de PTEN o la sobreexpresión de AKT resulta en el desarrollo de

INTRODUCCIÓN

características agresivas, entre las que se encuentran NE y una baja señalización del AR que conllevan a la resistencia a las terapias contra el AR¹²⁷.

Uno de los principales mecanismos de evasión de las terapias hormonales es la transdiferenciación de las células de CaP dependientes del AR a fenotipo NE¹¹⁶. En este sentido, aunque en las diferentes cohortes de mCRPC la mayoría de metástasis retienen en cierto nivel la expresión de marcadores epiteliales típicos de próstata como AR, NKX3 y PSA, los cambios en la diferenciación celular asociados a los tratamientos han surgido como un mecanismo importante de resistencia a las terapias contra el AR⁹³. Esto puede dar lugar a la presencia de diferentes fenotipos celulares que contribuyen al comportamiento del tumor como el fenotipo NE⁹¹. Estas observaciones sugieren que, en respuesta a los tratamientos, algunos tumores pueden mostrar un aumento en la plasticidad celular⁸⁹.

Debido a la relevancia de la plasticidad celular en el CRPC y en la adquisición de fenotipos agresivos como el NE, el desarrollo de estrategias de tratamiento dirigidas contra los mecanismos que dirigen la plasticidad celular resulta prometedor. Se han propuesto al menos tres aproximaciones al respecto: la prevención de la inducción de NEPC mediante el bloqueo de las rutas asociadas a EMT y CSC; terapias dirigidas directamente contra las células neuroendocrinas; y revertir el proceso de diferenciación neuroendocrina forzando la reversión de las células neuroendocrinas a un estado epitelial⁸⁸.

Todo ello evidencia que el desarrollo de CRPC y la adquisición de resistencia a los tratamientos contra el AR es multifactorial, y sólo estamos empezando a comprender los diferentes mecanismos moleculares subyacentes. Por tanto, es crítico conocer los mecanismos que desencadenan la resistencia tanto a la deprivación hormonal como a los fármacos de primera y segunda línea para tratar de buscar dianas de pronóstico que nos permitan seleccionar la mejor estrategia terapéutica a seguir.

En este sentido, la generación de modelos celulares de cáncer de próstata resistentes a ADT, Enz y AA podrían ayudarnos a desentrañar dichos mecanismos. Se han desarrollado algunos modelos celulares de resistencia a diferentes fármacos¹³⁵⁻¹³⁹. Sin embargo, la información obtenida no ha sido suficiente para elucidar como se produce la proliferación independiente de testosterona. De aquí surgió la necesidad

INTRODUCCIÓN

Carcinogénesis y plasticidad celular

de desarrollar y caracterizar nuevos modelos celulares de CaP objetivo fundamental del presente trabajo de investigación.

HIPÓTESIS

Las terapias antiandrogénicas son el fundamento del tratamiento en los pacientes de cáncer de próstata metastásico. Sin embargo, estos tratamientos están fracasando en una gran parte de los pacientes que acaban desarrollando resistencia y evolucionando hacia estadios más agresivos de la enfermedad. Además, se ha visto que la presencia o ausencia del AR, junto con la aparición de ciertas variantes de *splicing* (*AR-Vs*), es determinante para definir la pérdida de beneficio de dichas terapias.

Conocer los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a la terapia hormonal y a los tratamientos farmacológicos implicados en la inhibición del AR (Enzalutamida y Abiraterona) permitiría establecer una correlación entre sensibilidad terapéutica y perfil molecular que podría ser empleado para predecir la efectividad de estas nuevas terapias y establecer una nueva línea de actuación terapéutica beneficiosa para los pacientes de CaP. Para ello necesitamos desarrollar nuevos modelos celulares de enfermedad para los diferentes estadios y tratamientos administrados como primera línea en la práctica clínica.

OBJETIVOS

Nuestro objetivo general es generar y caracterizar nuevos modelos celulares de cáncer de próstata resistentes a las terapias de deprivación androgénica más habituales. Así mismo, nos centraremos en estudiar el papel que tiene el AR y sus variantes AR-V7 y AR-V9 en la adquisición de dicha resistencia. Finalmente, también proponemos evaluar la sensibilidad frente a otros tratamientos usados como segunda o tercera línea en la práctica clínica.

Para ello nos proponemos desarrollar los siguientes objetivos específicos:

OBJETIVO 1. Desarrollar líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y 22RV1 resistentes a:

- 1.1. Deprivación androgénica.
- 1.2. Enzalutamida o Abiraterona y combinación de Enzalutamida más Abiraterona.
- 1.3. Caracterización de las diferentes líneas en función de su proliferación, perfil de expresión del AR y sus variantes de *splicing* y su capacidad tumorigénica.

OBJETIVO 2. Silenciamiento del AR-FL y sus variantes AR-V7 y AR-V9 en las líneas celulares LNCaP y 22RV1 WT y resistentes a la deprivación androgénica mediante shRNAs.

- 2.1. Desarrollo de los shRNA y generación de las líneas celulares.
- 2.2. Caracterización de las líneas celulares en función de su proliferación, perfil de expresión del AR y sus variantes a nivel de ARNm y proteína.
- 2.3. Análisis de la respuesta a los tratamientos de segunda línea y resistencia cruzada.

OBJETIVO 3. Estudio de la resistencia cruzada de los modelos celulares de resistencia a los tratamientos de segunda línea Apalutamida y Docetaxel.

- 2.1. Análisis de la resistencia cruzada a Apalutamida en función de la proliferación, perfil de ciclo celular y análisis de su capacidad tumorigénica *in vitro*.

OBJETIVOS

2.2. Análisis de la resistencia cruzada a Docetaxel en función de la proliferación, perfil de ciclo celular y análisis de su capacidad tumorigénica *in vitro*

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos Celulares

Se utilizaron tres líneas celulares de CaP con diferente sensibilidad a andrógenos: LNCaP¹⁴⁰ y 22RV1¹⁴¹, ambas obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA), y PC3¹⁴², que fue cedida por el Dr. Ignacio Gil Bazo (CIMA, Pamplona).

LNCaP fueron aisladas en 1977 de la metástasis linfática de un adenocarcinoma prostático. Se las considera células sensibles a los andrógenos, son positivas para PSA y con un bajo potencial metastásico *in vivo*. La línea celular 22RV1 fue derivada mediante un xenotrasplante a ratón de una línea celular humana previamente establecida a partir de un carcinoma prostático con metástasis ósea (CER22R). Esta línea celular expresa el AR a nivel de ARNm y proteico; y presenta una sensibilidad intermedia a andrógenos. La línea celular PC3 fue establecida en 1979 a partir de una metástasis ósea de grado IV de un adenocarcinoma de próstata. Las células PC3 son independientes de la señalización androgénica. Todas las líneas celulares fueron autenticadas usando STR en el Laboratorio de Identificación Genética del Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada.

Las líneas celulares fueron cultivadas con *RPMI-1640 medium* (Biowest, Riverside, USA) suplementado con un 10% de *Fetal Bovine Serum* (FBS) y 1% de *Penicillin-Streptomycin Solution 100X* (Gibco, Waltham, USA) e incubadas con un 5% de CO₂, a 37°C y en un entorno humidificado. Al alcanzar una confluencia del 80%, las líneas celulares fueron sub-cultivadas mediante disociación celular con *TrypLE™ Express Enzyme* (GIBCO, Waltham, USA). Las líneas celulares fueron chequeadas periódicamente para Mycoplasma por la Unidad de Cultivo Celular de GENyO.

1.1. Aplicación *in vitro* de tratamientos de segunda línea contra CaP

A partir de un cultivo celular mantenido en las condiciones estándar, las diferentes líneas celulares fueron sembradas a la densidad celular adecuada

según la línea celular y el experimento y tratadas con las diferentes terapias de CaP por un periodo de 5 días para determinar el efecto en cada caso (**Figura 20**).

Las células fueron tratadas con concentraciones de 20 y 40 μM para AA (Sigma-Aldrich, Burlington, USA, Ref. SML1527-5MG) y Enz (Sigma-Aldrich, Burlington, USA) respectivamente. El rango de concentraciones descrito en la literatura para ambas drogas es muy amplio: entre 5-30 μM para AA y 10-80 μM para Enz. Seleccionamos una concentración intermedia para cada fármaco teniendo en cuenta la concentración fisiológica administrada a pacientes con CaP.

Para los experimentos con Apa (Selleck-Chemicals, Houston, USA, Ref. R16071-25MG) y Dctx (Selleck-Chemicals, Houson, USA, Ref. S1148) la concentración utilizada fue la correspondiente a su IC₅₀ siendo 130 nM y 1.14 nM respectivamente.

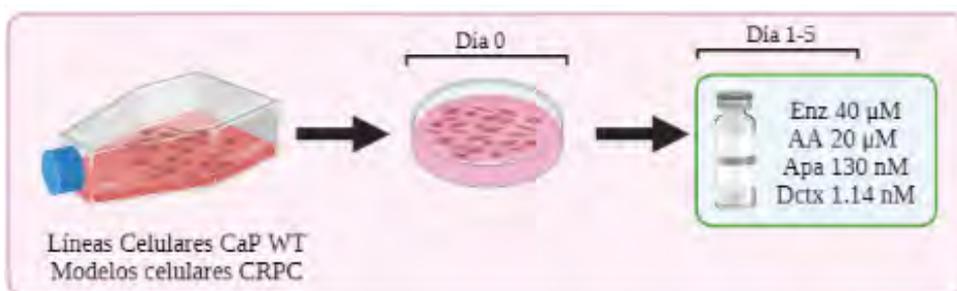


Figura 20. Esquema representativo de las condiciones de cultivo para testar la respuesta de cada una de las líneas celulares a las distintas terapias contra el CaP. Las células se mantuvieron en las mismas condiciones durante 24h y posteriormente se aplicaron los distintos tratamientos durante 5 días: Enz, AA, Apa o Dctx. Creada con BioRender.com.

1.2. Establecimiento de Modelos Celulares de Resistencia a la Deprivación Androgénica (R-ADT).

Para el desarrollo de la resistencia a ADT, las líneas celulares LNCaP y 22RV1 fueron cultivadas durante 6 meses con RPMI suplementado al 10% con un suero reducido en hormonas *Charcoal Stripped Serum* (CSS) (Sigma-Aldrich, Burlington, USA, Ref. s181f), como se indica en la Figura 21.

MATERIALES Y MÉTODOS

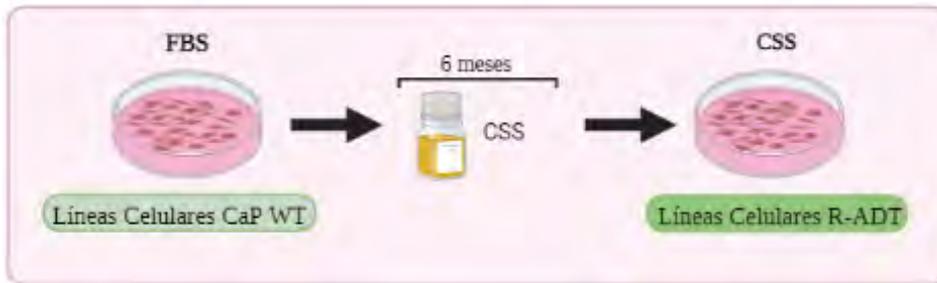


Figura 21. Esquema representativo del proceso de generación de modelos celulares de resistencia a ADT. 24h después de llevar a cabo el subcultivo de las células, se realizó un cambio de medio manteniendo las mismas condiciones, pero substituyendo el FBS por el 10% de CSS. Las líneas celulares se mantuvieron en estas condiciones a lo largo de 6 meses, realizando los pases necesarios a cada uno de los cultivos cuando éstos asumían una confluencia de aproximadamente el 80%. Creado con BioRender.com.

1.3. Establecimiento de Modelos Celulares de Resistencia a la Deprivación Androgénica y a los antiandrógenos de segunda línea (R-ADT/Enz, R-ADT/AA, R-ADT/Enz+AA).

Las líneas de células tumorales resistentes a ADT y a las terapias hormonales de segunda generación Enz y/o AA (*Novel Hormonal agents* o NHA), fueron obtenidas por la continua exposición de células a ADT y a concentraciones crecientes de los tratamientos. Los medios de cultivo con el tratamiento se cambiaron cada 5 días para mantener la concentración constante del fármaco durante el proceso de selección. Para evitar la letalidad inicial de ambos tratamientos, el protocolo fue dividido en 4 fases incrementando gradualmente en cada una de ellas la concentración de los tratamientos con el objetivo de seleccionar de manera progresiva las células resistentes. La resistencia al tratamiento se adquirió después de 6 meses de tratamiento continuado (**Figura 22**). Las concentraciones finales de los NHA para el mantenimiento de líneas celulares resistentes fueron: 20 μM para R-ADT/AA, 40 μM para R-ADT/Enz y 20 μM AA + 40 μM Enz para R-ADT/Enz+AA. En el caso de la línea celular LNCaP no fue posible generar el modelo R-ADT/Enz+AA debido a la gran letalidad promovida por este tratamiento.

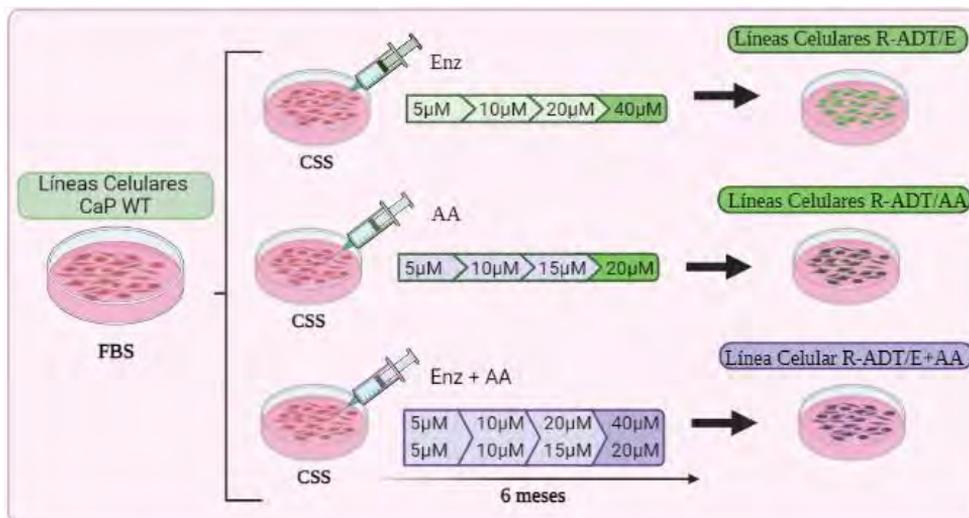


Figura 22. Proceso de generación de modelos celulares de resistencia a ADT y a los NHAs Enz y/o AA. Para generar los modelos de resistencia se aumentó gradualmente cada 4 pases la concentración de los tratamientos. En primer lugar, las células se cultivaron en RPMI 1640 con el 10% de CSS y con una concentración de Enz y/o AA de 5µM. En el segundo periodo del proceso las dosis de ambos tratamientos fueron aumentadas hasta 10µM. En el siguiente periodo, las células se mantuvieron en cultivo en presencia de una concentración de 20µM y 15µM, de Enz y/o AA respectivamente. Finalmente, se inicia la fase final de la adquisición de resistencia, que se alarga hasta alcanzar los 6 meses en cultivos, en la que las dosis de los tratamientos añadidas al cultivo son consideradas las máximas *in vitro* (40µM Enz y/o 20µM AA) y equiparables a la concentración en sangre alcanzada en los pacientes tratados; dichas condiciones de cultivo se mantuvieron hasta el final del proyecto. Creado con BioRender.com.

2. Generación de líneas celulares shAR^{fl}, shAR-V7 y shAR-V9 inducibles por doxiciclina mediante el sistema pLKO-Tet-On

Las diferentes líneas celulares inducibles shEV, shAR-FL, shAR-V7 y shAR-V9 fueron generadas mediante la transducción lentiviral de las líneas LNCaP WT, LNCaP R-ADT, 22RV1 WT y 22RV1 R-ADT con el vector lentiviral pLKO-Tet-On (Addgene, Watertown, USA) (Figura 23). Este sistema inducible permite la generación de líneas celulares estables con la expresión de shRNAs regulable mediante la administración de tetraciclina (Tc) o derivados como la doxiciclina (dox) (Sigma-Aldrich, Burlington, USA).

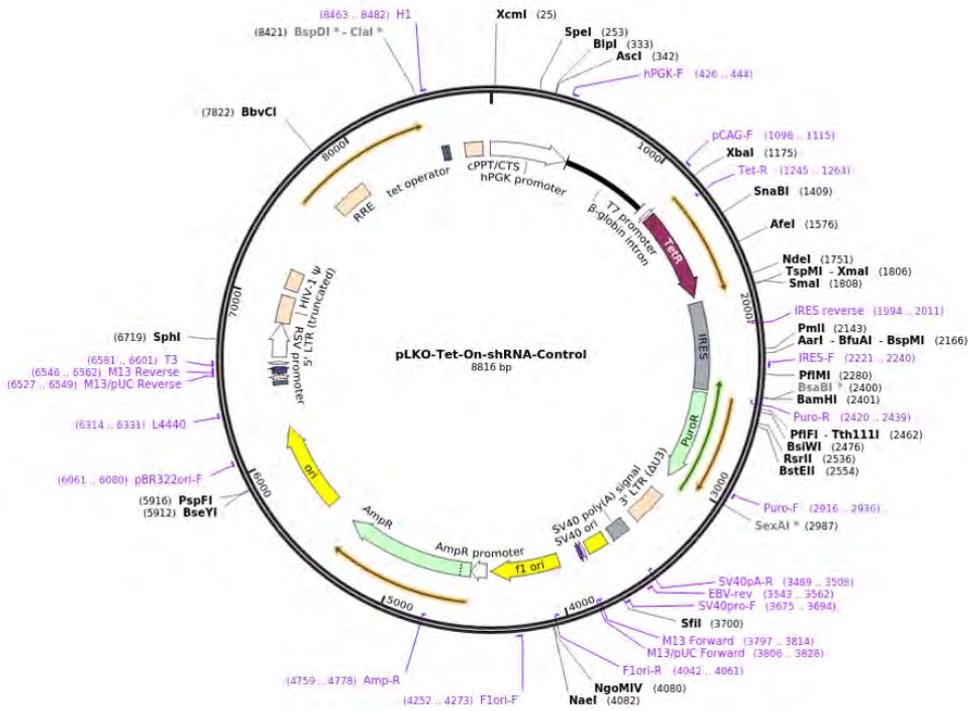


Figura 23. Vector lentiviral pLKO-Tet-On.

2.1. Clonaje de pLKO-Tet-On

Los plásmidos fueron obtenidos mediante el clonaje de oligonucleótidos codificando el shRNA de interés y la diana para las enzimas AgeI/EcoRI sobre el esqueleto plasmídico Plko-Tet-On. Las secuencias de cebadores para AR-FL y AR-V7 fueron las ya descritas por Cato y cols.¹⁴³, mientras que para AR-V9 fueron diseñadas en el laboratorio dos secuencias diferentes (Tabla 1).

Los oligonucleótidos fueron hibridados usando tampón de hibridación 1x (NaCl 1M, Tris-HCl 100 mM, pH=7.4) y calentados durante 5 min a 95°C. A continuación, fueron ligados en el plásmido pLKO-Tet-On previamente digerido con las enzimas de restricción EcoRI/AgeI (New England Biolabs, Ipswich, USA) y transformados en bacterias competentes *E. coli* DH5α. Los plásmidos generados fueron mandados a secuenciar con el fin de confirmar la secuencia de silenciamiento específica.

Tabla 1. Secuencia de cebadores utilizados para los shRNAs

	AgeI/EcoRI	Sense	loop(XhoI)	Antisense
shAR-FL	FL-Fw: 5'- CCGG CCTGCTAATCAAGTCACACAT CTCGAG ATGTGTGACTTGATTAGCAGG TTTTT G-3'			
	FL-Rv: 5'- AATT CAAAAACCTGCTAATCAAGTCACACAT CTCGAG ATGTGTGACTTGATTAGCAGG-3'			
shAR-V7	V7-Fw: 5'- CCGG GTAGTTGTGAGTATCATGA CTCGAG TCATGATACTCACAAC TTTTT G-3'			
	V7-Rv: 5'- AATT CAAAAAGTAGTTGTGAGTATCATGA CTCGAG TCATGATACTCACAAC TTTTT G-3'			
shAR-V9	V9.1-FW: 5'- CCGG AGCTGCTTTTTGGAGACATTTGC CTCGAG GCAAATGTCTCCAAAAAGCAGC TTTTT G-3'			
	V9.1-Rv: 5'- AATT CAAAAAGCTGCTTTTTGGAGACATTTGC CTCGAG GCAAATGTCTCCAAAAAGCAGC-3'			
	V9.2-FW: 5'- CCGG TGCTTTTTGGAGACATTTGCACA CTCGAG GTGCAAATGTCTCCAAAAAGC TTTTT G-3'			
	V9.2-RV: 5'- AATT CAAAAATGCTTTTTGGAGACATTTGCACA CTCGAG TGTGCAAATGTCTCCAAAAAGCA-3'			

2.2. Producción de partículas lentivirales y transducción

Las partículas lentivirales fueron generadas co-transfectando células 293T con tres plásmidos: el plásmido vector de silenciamiento (pLKO-Tet-On, pLKO-Tet-On shAR-FL, pLKO-Tet-On shAR-V7 o pLKO-Tet-On shAR-V9) (**figura 24**), el plásmido de empaquetamiento pCMVR8.9 y el plásmido de envuelta VSV-G; producidos a gran escala mediante un kit de maxi-producción de plásmidos (Nucleobond Xtra Maxi, Macherey-Nagel, Allentown, USA). La transfección de las células empaquetadoras fue llevada a cabo con LipoD293TM (SignaGen, Frederick, Ref. 189SL100668). A las 48 horas se recogieron las partículas lentivirales y se filtraron.

Las líneas celulares fueron transducidas con las partículas lentivirales suplementadas con Polybrene (Sigma-Aldrich, Burlington, USA). A las 12-18 horas se substituyó el sobrenadante con los virus por medio fresco. Al cuarto día post-transducción comenzó el proceso de selección con 1 µg/mL de puromicina (puro) para LNCaP WT y 2 µg/mL para el resto de líneas celulares durante 48 horas. Una vez recuperadas las células del primer proceso selectivo se repitió nuevamente este procedimiento para asegurar la selección de las células transducidas. La expresión de los shRNA fue inducida mediante la adición de 1 µg/mL de dox durante 5 días, refrescando la dox cada 48 horas.

MATERIALES Y MÉTODOS

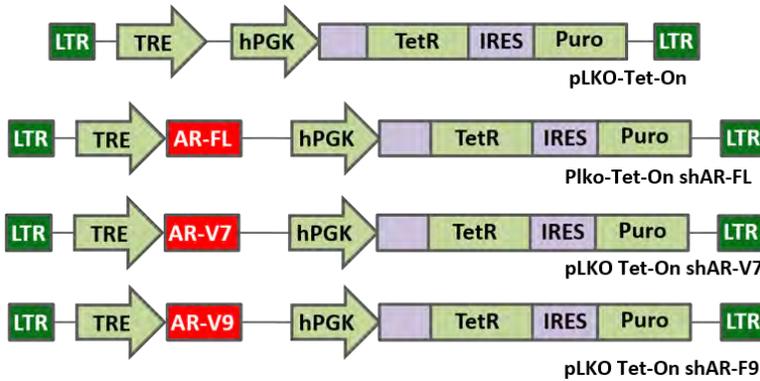


Figura 24. shRNAs utilizados para el silenciamiento del AR y sus variantes AR-V7 y AR-V9. A partir de pLKO-Tet-On (EV) se obtuvieron los vectores plasmídicos: pLKO-Tet-On shAR-FL (shAR-FL), pLKO-Tet-On shAR-V7 (shAR-V7) y pLKO-Tet-On shAR-V9 (shAR-V9).

3. Cálculo de IC50: Ensayo de MTT

Para calcular la concentración de Apa y Dctx para el tratamiento de las líneas celulares LNCaP y 22RV1 con Apa y Dctx se calculó su IC50 mediante el ensayo MTT. Este ensayo mide la actividad metabólica de las células como indicador de viabilidad, proliferación y citotoxicidad celular. Se trata de un método colorimétrico estándar: el compuesto oxidado es de color amarillo y vira a violeta intenso. El ensayo se basa en la reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, una sal de tetrazolio, en formazano mediante la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (Figura 25).

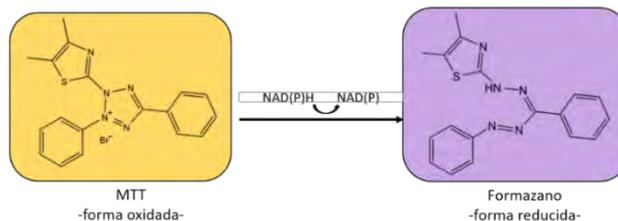


Figura 25. Reacción de reducción del MTT a formazano mediante la succinato deshidrogenasa.

Para unificar la concentración de tratamiento utilizada en los posteriores experimentos, el ensayo de MTT para Apa y Dctx fue llevado a cabo en las líneas celulares LNCaP y 22RV1 WT. En placas de 96 pocillos se sembraron 15.000 células por pocillo sembrando 8 pocillos por condición, y, a las 24 horas, fueron tratadas con concentraciones decrecientes de Apa o Dctx durante 5 días.

El rango concentraciones utilizadas para los dos tratamientos fueron las siguientes:

- Apalutamida (μM): 0,5-0,25-0,125-0,0625-0,0312-0,0156-0,0078-0,0039-0,0019-0,00097
- Docetaxel (nM): 100-50-25-12,5-6,25-3,125-1,5625-0,7812-0,3906-0,1953

Para cuantificar la reacción, se aspiró el medio de los pocillos y se añadieron 100 μL del reactivo MTT diluido en PBS. Tras un periodo de incubación de 3 horas, el compuesto ya reducido se disolvió en 100 μL DMSO (dimetilsulfóxido) (Fisher Scientific, Waltham, USA), y se midió la coloración mediante una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 570 nm. Finalmente, el cálculo de la IC50 para ambos tratamientos se llevó a cabo mediante la representación gráfica dosis-respuesta utilizando el programa *GraphPad Prism*TM (San Diego, USA).

4. Cuantificación de la expresión génica

El ARN total de las distintas líneas celulares se aisló usando *TRI Reagent* (Life Technologies, Carlsbad, USA). La transcripción inversa fue realizada con 1 μg

MATERIALES Y MÉTODOS

del ARN total utilizando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche Life Science, Penzberg, Germany). El cDNA resultante se usó para PCR a tiempo real a cuantitativa (qPCR) empleando *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, Hercules, USA) en los sistemas de PCR rápido en tiempo real HT7900 o QuantStudiotm 6 Flex (Applied Biosystems, Bedford, USA). Las condiciones de qPCR fueron 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s.

Los resultados de las qPCRs se analizaron utilizando el software online *Thermo Fisher ConnectTM* y se representaron gráficamente con el programa *GraphPad PrismTM*. Las curvas estándar se utilizaron para evaluar la eficiencia de los cebadores y el incremento de la expresión de los ARNm se calculó mediante el método comparativo de Ct utilizando la fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ y utilizando la expresión del gen *GADPH* (Tabla 2) como control endógeno.

4.1. Cuantificación de la expresión del AR-FL, AR-V7 y AR-V9 y secuenciación de las isoformas del AR.

Para la cuantificación del AR y sus variantes se diseñaron cebadores de acuerdo con la estructura de las variantes de AR descritas por Kohli M. y cols.¹⁴⁴, y las ya descritas secuencias de codificación (CDS) de AR *Full-Length* y AR-V7 (Tabla 2) (Figura 26).

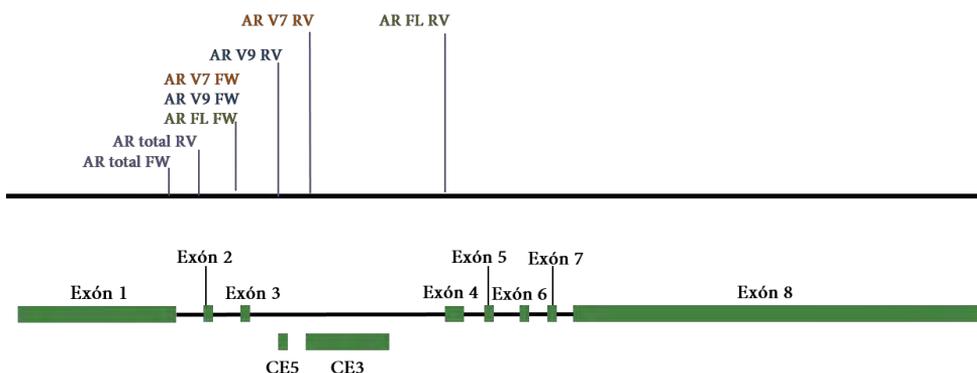


Figura 26. Esquema del mapa del gen del AR indicando los puntos de hibridación de los cebadores. En base a la estructura del gen del AR y de las secuencias codificantes (CDS) ya descritas del AR full length y de las isoformas AR V7 y AR V9 se diseñaron las siguientes

parejas de primers indicadas en el esquema. AR total FW y AR total RV nos permiten detectar el total de las isoformas del AR ya que hibridan en los exones 1 y 2 respectivamente, zona común en todas las isoformas del AR. AR full length FW y AR full length RV amplifican solo la isoforma completa del gen ya que hibridan en los exones 3 y 4 respectivamente, estando el exón 4 únicamente presente en la CDS del AR full length. AR V7 FW y AR V7 RV que hibridan en el exón 3, común para todas las isoformas, y en el CE3 tal que amplifican únicamente la isoforma AR V7. AR V9 FW y AR V9 RV, que hibridan en el exón 3 y en el CE5 dando un producto de amplificación específico para la isoforma AR V9.

Además, se quiso confirmar la amplificación de las variantes de *splicing* AR deseadas mediante secuenciación. Primero, partiendo de muestras de cDNA de la línea LNCaP, positiva para el AR, se realizó una PCR convencional bajo las mismas condiciones utilizadas en las qPCR para amplificar AR-V7 y AR-V9. Los productos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa (Sigma) al 2% y purificados con el kit comercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Allentown, USA, Ref. 740588.250). Estos productos de PCR fueron subclonados sobre el vector pCR2.1 (ThermoFisher Scientific) y posteriormente secuenciados utilizando el cebador M13 FW (Tabla 2) en un analizador genético ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

4.2. Análisis de la Actividad transcripcional del AR

La actividad transcripcional de AR se midió indirectamente realizando el análisis de expresión de un panel de genes regulados por AR (*CDK1*, *CDK2*, *FGF8*, *FKBP5*, *KLK3*, *NDRG1*, *PMEPA1*, *TMPRSS2* y *UBE2C*) mediante qPCR (Tabla 2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para el estudio del AR y su actividad transcripcional

	Secuencia FW (5´-3´)	Secuencia RV (5´-3´)
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGATGGGATTC
M13 FW	GTAAAACGACGGCCAG	
AR Total	CCACTTGTGTCAAAGCGAA	AAGACCTGCCTGATCTGTGG
AR-Full length	TGTCCATCTTGTCTCTTCG	TTCAGATTACCAAGTTTCTTCAG
AR-V7	TGTCCATCTTGTCTCTTCG	TAGTCTGGAGAAACCT
AR-V9	TGTCCATCTTGTCTCTTCG	ACGTGATCCAAAAGATGTG
CDK1	TTTTCAGAGCTTTGGGCACT	CCATTTTGCCAGAAATTCGT
CDK2	CATTCTCTTCCCCTCATCA	CAGGGACTCCAAAAGCTCTG
FGF8 FW	GACCTACCAACTCTACAGCCG	CTCCTCGGACTCGAACTCTG
FKBP5	TCCCTCGAATGCAACTCTCT	AAACATCCTTCCACCACAGC
KLK3	GTTGTCTTCTCACCTGTCC	GCAGCTGTGAGGACCCACT
NDRG1	ACAACCCTGAGATGGTGGAG	TGTGGACCACTTCCACGTTA
PMEPA1	AAGATGCCCTGTCCTCAGAA	GTGCTGCAGGTACGGATAGG
TMPRSS2	CACTGTGCATCACCTTGACC	ACACGCCATCACACCAGTTA
UBE2C	ACCCAACATTGATAGTCCCTTG	GCTGGTGACCTGCTTTGAGT

4.3. Análisis de expresión de marcadores fenotípicos

La adquisición de resistencia a los tratamientos y la progresión en el CaP se han visto relacionadas con la presencia de CSC y EMT, así como la adquisición de un fenotipo neuroendocrino.

Para estudiar estos fenómenos se cuantificó la expresión de un panel de genes específicos de CSC (*NANOG*, *Oct3/4*, *REX1*, *SOX2*, *CD44* y *CD38*), EMT (*Vimentina*, *SNAIL*, *SLUG*, *SMAD2*, *ITGA2*, *E-Cadherina*) y fenotipo neuroendocrino (*CHGA*, *NSE*, *SYP*, *NCAM1*, *Ki67* y *FOXA2*) mediante qPCR utilizando los cebadores descritos (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de cebadores utilizados para los análisis de fenotipo.

	Secuencia FW (5'-3')	Secuencia RV (5'-3')	
NANOG	TGCAGTTCCAGCCAAATTCTC	CTAGTGGTCTGCTGTATTACATTAAGG	CSC
OCT3/4	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	ACACTCGGACCACATCCTTC	
SOX2	TCAGGAGTTGTCAAGGCAGAGAAG	CTCAGTCTAGTCTTAAAGAGGCGAC	
REX1	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA	
CD44	GGGAGTCAAGAAGGTGGAGC	AGCTCCATTGCCACTGTTGA	
CD38	GCGATGCGTCAAGTACACTG	AGGTACGGTCTGAGTCCCA	
Vimentina	CCAGGCAAAGCAGGAGTC	CGAAGGTGACGAGCCATT	EMT
SNAIL1	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA	ATCTCCGGAGGTGGGATG	
SLUG	TGGTTGCTTCAAGGACACAT	CAAATGCTCTGTTGCAGTG	
SMAD2	AGTGTGTAAAATTCACCAG	ATTCTAGTTAGCTGATAGACGG	
ITGA	CCCAGGGCATTGAAAACAC	CGGATAGTGCCTGATGACG	
E-Cadherina	CCCGGGACAACGTTTATTAC	GCTGGCTCAAGTCAAAGTCC	
CHGA	GCTCCAAGACCTCGTCTCC	CCTGATTGTTCCCTCAGCCT	Neuroendocrino
NSE	GGCACTTACCAGGACTTTG	GCGATGACTCACCATAACCC	
SYP	GTGCTGCAATGGGTCTTCG	CCGTGGCCAGAAAGTCCAG	
CD56	AGGAGACAGAAACGAAGCCA	GGTGTGGAAATGCTCTGGT	
Ki67	CTGGGTTACTGGTCTTAGTTC	GAGGCTGTTCTTGATGATTT	
FOXA2	CACCAACCCACAAAATGGACC	CTCTCTCACTGTCTCGATCC	

5. Expresión proteica: Western-Blot

Las células fueron lisadas en RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Burlington, USA) suplementado con inhibidores de proteasas como PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride), *Complete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, Penzberg, Germany, Ref. 697498001), un estabilizador de proteínas como DTT (Dithiothreitol), *Phosphatase Inhibitor Cocktail 2* y *Phosphatase Inhibitor Cocktail 3* (Sigma-Aldrich, Burlington, USA, Ref. P5726-1ML). Posteriormente se realizó la cuantificación proteica mediante el método de Bradford en un *Infinite® 200 PRO NanoQuant* (TECAN, Zürich, Switzerland) utilizándose Albúmina Serina Bovina (BSA) como proteína de referencia.

Tras el lisado, se sometieron 20 µg de extracto proteico a electroforesis mediante el método SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel*

MATERIALES Y MÉTODOS

Electrophoresis) en geles de poliacrilamida al 8%. Posteriormente se realizó la transferencia proteica en membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, USA). Las membranas fueron bloqueadas en buffer de bloqueo (5% leche en Tris-buffered saline y 1% Tween-20) e incubadas con los anticuerpos primarios (Tabla 4) a 4°C overnight. Como control de carga se usó el anticuerpo *anti-β-Actin* (clone AC-15; Sigma-Aldrich, Burlington, USA, Ref. A5441). Los anticuerpos secundarios se incubaron por 1 h a temperatura ambiente.

Tabla 4. Anticuerpos para Western Blot utilizados en este trabajo.

ANTICUERPOS PRIMARIOS		
TARGET	REF	DILUCIÓN
AR	ab133273	1:1000
FGF-8	sc-293479	1:1000
PMEPA1	sc-293372	1:1000
NDGR1	sc-100786	1:500
PSA	sc-7316	1:500
ACTIN	A2066	1:1000
ANTICUERPOS SECUNDARIOS		
Goat anti-ms HRP	ab97023	1:5000
Goat anti-rb HRP	ab97051	1:5000

Las diferentes proteínas analizadas fueron detectadas con el sistema *Odyssey* y las imágenes fueron analizadas usando *Image J*.

6. Estudios de proliferación celular

El efecto de los diferentes tratamientos sobre la proliferación celular se evaluó mediante el ensayo *Real-Time Cell Monitoring Assays (RTCA)* (xCELLigence; ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) y/o el tiempo de duplicación celular.

6.1. Proliferación celular a tiempo real (RTCA)

El xCELLigence® RTCA es una técnica no invasiva que mediante la medición de la impedancia eléctrica (resistencia al paso de corriente) permite cuantificar la proliferación celular a tiempo real (Figura 27).

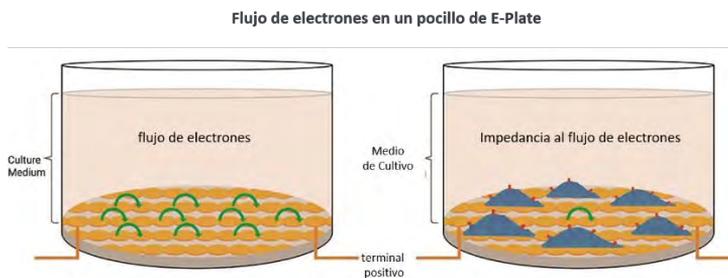


Figura 27. Representación gráfica de un cultivo celular en un pocillo de una E plate®. Los E-Plate® presentan microelectrodos de oro en la base de cada uno de sus pocillos y, cuando éstos se llenan con una solución que permite la conducción eléctrica (medios de cultivos celulares, por ejemplo), los electrones se mueven del polo negativo al positivo. La presencia de células adheridas dificultará el flujo eléctrico de manera más o menos significativa dependiendo del número de células, del tamaño y de la morfología de las mismas y de su capacidad de adhesión. Lo que permite registrar la proliferación celular como una media del cambio en la impedancia.

Se sembraron 10.000 células por pocillo en el caso de las PC-3 y 15.000 células por pocillo en el resto de líneas celulares en un volumen final de 200 μ L. Se mantuvieron en sus condiciones normales de cultivo 24 horas. Transcurrido ese tiempo se les aplicó el tratamiento correspondiente a las células y fueron analizadas en el RTCA durante 5 días. Se tomaron medidas de la impedancia cada hora, que fueron registradas como una medida del índice celular (IC). Se realizaron al menos 4 repeticiones experimentales para cada condición experimental. Los datos fueron relativizados con respecto a las células control y representados gráficamente utilizando el programa *GraphPad Prism™*.

6.2. Tiempo de duplicación celular

El tiempo de duplicación celular se realizó sembrando 75.000 células por pocillo en el caso de la línea celular LNCaP y 100.000 en el caso de las 22RV1 en placas

MATERIALES Y MÉTODOS

de 12 pocillos. Al día siguiente se trataron las células con Apa o Dctx, y a los 3 días fueron contadas y se volvieron a sembrar el mismo número. El procedimiento se repitió 3 veces. Se realizaron al menos 3 réplicas experimentales de cada condición.

Los datos fueron representados en *GraphPad Prism*[™] y el tiempo de duplicación fue calculado mediante la calculadora de la página <https://www.doubling-time.com>.

7. Análisis del ciclo celular con IP

Se analizó el efecto de la generación de resistencia y de los diferentes tratamientos en el ciclo celular mediante citometría de flujo (FACS) con Yoduro de Propidio (PI). El PI es un agente intercalante fluorescente que se introduce entre las bases nitrogenadas del ADN y permite analizar el contenido de ADN nuclear en las células por FACS.

Las líneas celulares se recolectaron, se lavaron con PBS frío, se fijaron en etanol al 70% frío y fueron conservadas *overnight* a -20°C. Inmediatamente antes del análisis en FACS, se realizaron dos lavados con PBS frío y se tiñeron las células con una solución de tinción (PI 5 µg/mL, NP-40 0,05%, EDTA pH 8.0 3 mM, RNAsa 200 µg/mL y PBS).

La distribución del ciclo celular fue analizada en el *BD FACSVerser™ flow cytometer*. Se midió la intensidad fluorescente, que indica la ploidía N y 2N, y estas se representaron como indicadores de las fases G0/G1 y G2/M, respectivamente, utilizando el programa *BDFACSuite™* para la adquisición y *FlowJo™* (FlowJo, LLC-BD Bioscience, Bedford, USA) y *GraphPad Prism™* para el análisis y la representación.

8. Ensayos de migración e invasión

Las células se resuspendieron en medio RPMI sin suplementar a una densidad de 200.000 células/mL. Se sembraron 200 µL de la suspensión celular en la parte superior de un *transwell* de 24 pocillos con un tamaño de poro de 8 µm (Merck

Millipore, Burlington, USA, Ref. 10002433) Mientras que en la cámara inferior se pusieron 700 μ L de medio RPMI suplementado con FBS al 10%. Las células se mantuvieron bajo estas condiciones durante 48 h. Luego, las células del compartimento superior del transwell fueron retiradas del pocillo usando hisopos húmedos. Por otro lado, las células que habían migrado al lado inferior del *transwell* fueron fijadas en metanol y teñidas con una solución de cristal violeta al 0,5%.

Para ensayos de invasión celular, se realizó el mismo método, con la excepción de que una capa de Matrigel™ Matrix (BD Biosciences, Bedford, USA, Ref. 354234) simulando una matriz extracelular, se agregó en la parte superior del *transwell*.

Para calcular las tasas de migración/invasión, el número total de células por inserto fue determinado calculando el número de células por el área del campo de visión del microscopio. Un promedio de 5 campos aleatorios con un aumento de 10x utilizando un microscopio (Olympus, Tokio, Japón) se utilizó para estimar el número de celdas por campo. Entonces, el número total células se volvió a calcular para toda el área del inserto *transwell*. Los resultados se expresaron como el número de células capaces de atravesar el transwell por cada 100.000 células sembradas de 3 réplicas experimentales independientes.

9. Ensayos de clonogenicidad

La clonogenicidad fue evaluada sembrando 800 células/pocillo en el caso de las células LNCaP y 1.000 células/pocillo en el caso de las 22RV1 en placas de 6 pocillos. A las 24 horas las células fueron tratadas con el fármaco correspondiente (Apa o Dctx) y 5 días más tarde se sustituyó el medio con tratamiento por medio fresco. A los 12 días las colonias fueron fijadas con etanol frío al 70% por 15 min y, posteriormente, teñidas con una solución al 0.05% de Cristal Violeta. Por último, los pocillos fueron lavados 3 veces con agua y se dejaron secar por completo. Se realizaron al menos 3 replicas experimentales independientes por condición.

MATERIALES Y MÉTODOS

La capacidad clonogénica fue cuantificada mediante el área ocupada midiendo la intensidad de señal con el sistema de imagen infrarrojo *Odyssey* (Li-cor Bioscience, Lincoln, USA) y mediante el número de colonias formadas, calculando el número de colonias por el área del campo de visión del microscopio. Un promedio de 5 campos aleatorios con un aumento de 10x fueron utilizados para estimar el número de colonias por campo. Posteriormente, el número total de colonias se volvió a calcular para toda el área del pocillo de 6 extrapolando el promedio de colonias en los diferentes campos utilizando la razón de proporcionalidad de áreas. Los resultados fueron representados gráficamente utilizando el programa *GraphPad Prism*TM.

10. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo en *GraphPad Prism*TM (versión 9.3.1 para Windows). Todos los experimentos fueron realizados por triplicados, al menos que no se especifique lo contrario, y los datos fueron expresados como media y SD. La comparación estadística llevada a cabo fue realizada mediante el test t-student no pareado Kolmogorov-Smirnov y Two-way Anova (test de comparación múltiple). Para los experimentos de proliferación se usó el modelo de regresión no lineal (polinómico de segundo orden), además se comparó la proliferación a tiempo final. Los valores fueron considerados estadísticamente significativos cuando alcanzaban los siguientes valores: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** y $p < 0.001$ ***.

RESULTADOS

RESULTADOS

GENERACIÓN DE MODELOS CELULARES DE RESISTENCIA A LA DEPRIVACIÓN ANDROGÉNICA.

1.1. Clonaje y secuenciación de los productos de amplificación de las variantes *AR-V7* y *AR-V9*.

Para el diseño de cebadores específicos, se anotaron las secuencias de los ARNm maduros de *AR-FL*, *AR-V7* y *AR-V9* indicando la secuencia que se correspondía con cada uno de los dominios proteicos. Para asegurarnos de la especificidad de los cebadores diseñados, partiendo del cDNA de la línea celular LNCaP, se realizó un clonaje de los productos de amplificación de ambas variantes en el plásmido pCR2.1 y, posteriormente, fueron secuenciados para confirmar su especificidad.

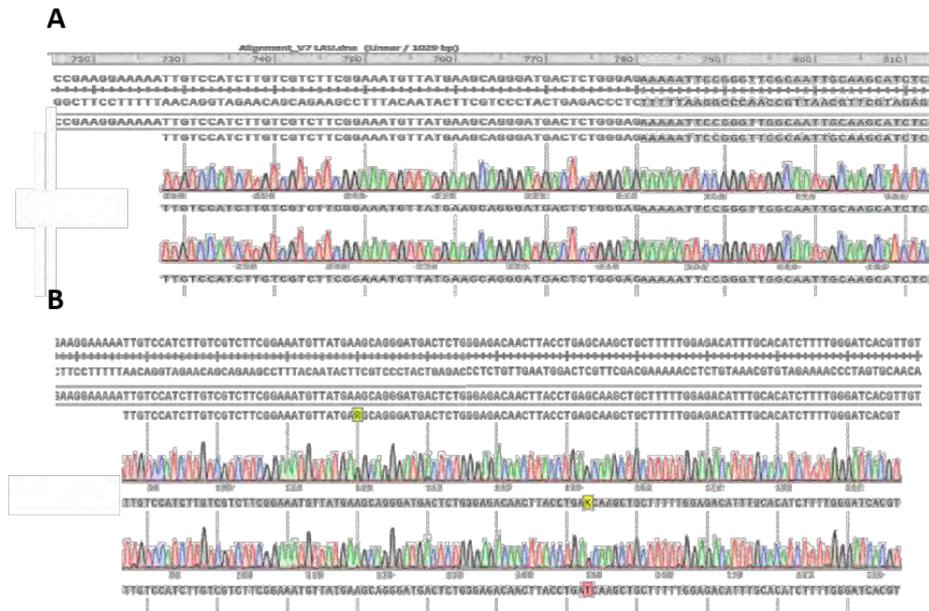


Figura 28. Resultado del alineamiento de las regiones codificantes (CDS) de las variantes *AR-V7* y *AR-V9* y los electroferogramas de los productos secuenciados. Ejemplos representativos de los alineamientos positivos obtenidos entre los productos clonados que fueron secuenciados, de las variantes *AR-V7* (A) y *AR-V9* (B).

Los resultados de secuenciación obtenidos permiten demostrar que el producto amplificado al utilizar estos cebadores se corresponde con una secuencia únicamente presente en la variante para la cual habían sido diseñados (**Figura 28**). Además, los resultados de las curvas de disociación (*melting curves*) obtenidas tras realizar las qPCRs nos permitieron confirmar que el producto amplificado era específico y único.

1.2. Análisis genético y funcional de la respuesta de las líneas celulares de cáncer de próstata a ADT, Enz y AA como primera línea de terapia.

En primer lugar, se analizó el efecto de la terapia de deprivación androgénica (ADT) sobre las líneas celulares de CaP LNCaP, 22RV1 y PC3. La terapia de ADT produce una disminución sobre la tasa de proliferación en las dos líneas celulares sensibles a andrógenos (51% y 24% para LNCaP y 22RV1, respectivamente), mientras que la línea celular PC3 no muestra diferencias respecto a las células control a nivel de proliferación (**Figura 29A**). En cuanto al análisis de ciclo celular, se observa una parada de ciclo celular en la fase G_0/G_1 tanto en las LNCaP como en las 22RV1. Además, en las células LNCaP esta parada en G_0/G_1 va acompañada por una inducción de muerte celular detectada por la presencia de un pico Sub- G_0 , lo que nos indica que esta línea celular es más sensible a ADT que las 22RV1. Como se ha descrito anteriormente, no se observa parada de ciclo celular o muerte celular en las células PC3, confirmando su resistencia al tratamiento ADT (**Figura 29B**).

Por otro lado, los análisis genéticos mostraron que, en el caso de las LNCaP hay un aumento de los niveles de ARNm del *AR* total y el *AR-FL*, mientras la expresión de la mayoría de los genes diana del *AR* se ve disminuida (**Figura 29C**). Para la línea celular 22RV1, no se observa una sobreexpresión del *AR* total y el *AR-FL*, mientras los niveles de las isoformas *AR-V7* y *AR-V9* se encuentran ligeramente elevados (**Figura 29C**). Además, la mayoría de los genes diana del *AR* mantienen sus niveles de expresión similares a las células no tratadas. Finalmente, en las células PC3 los niveles de *AR* total, *AR-V9*, *FKBP5*, *PMEPA1*

RESULTADOS

y *TMPRSS2* se encuentran incrementados dos veces respecto al control (células PC3 crecidas con FBS) (Figura 29C). Asimismo, *AR-V7* y algunos de los genes diana del AR (*FGF8*, *KLK3* y *NDRG1*) no fueron detectados en esta línea celular resistente.

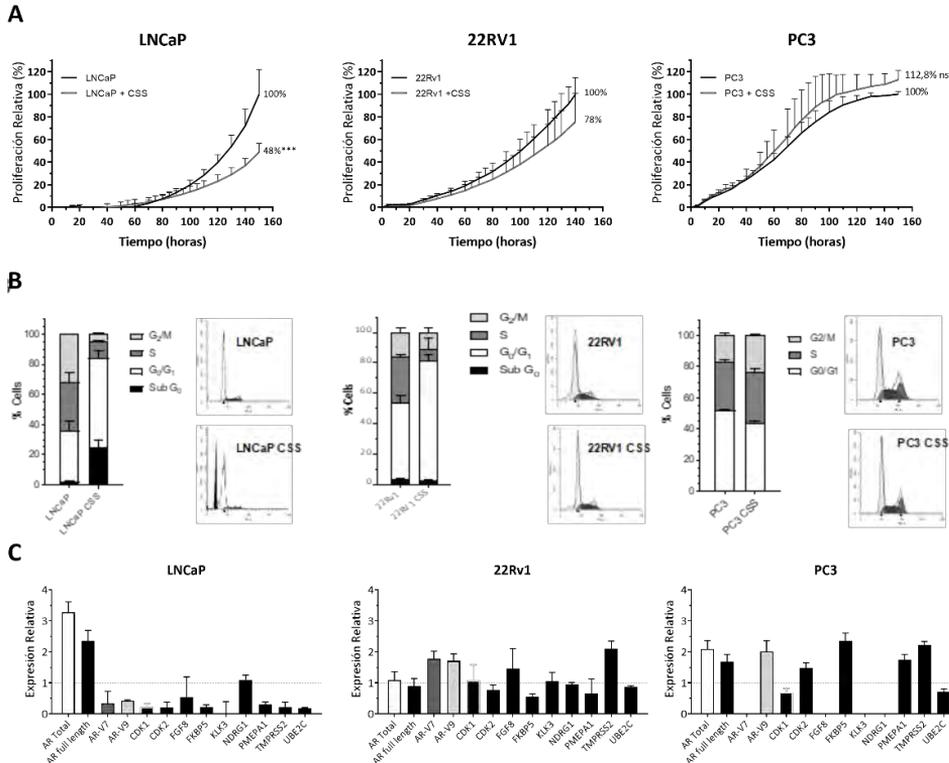


Figura 29. Respuesta de las líneas celulares silvestres a la deprivación androgénica. **Proliferación, ciclo celular y cuantificación del AR-FL, AR-V7, AR-V9 y algunos de sus genes diana.** (A) Análisis de la proliferación celular mediante xCELLigence. Resultados normalizados considerando 100% el valor de índice celular final de las células control creciendo en presencia de suero con hormonas ($n=3 \pm SD$). (B) Resultados del análisis del ciclo celular. El gráfico de barras muestra los porcentajes correspondientes a cada fase del ciclo celular ($n=3 \pm SD$). (C) Análisis de expresión mediante qPCR. Los resultados mostrados están normalizados respecto al control endógeno (*GAPDH*) y en referencia a las células control crecidas en presencia de suero con hormonas. Las barras de error se corresponden a la SD calculada de las réplicas independientes.

RESULTADOS

Generación de modelos celulares de resistencia a la deprivación androgénica

Cuando se estudiaron los niveles de proteína del AR y sus genes diana, en la línea LNCaP se observó un patrón opuesto a su expresión de ARNm, disminuía la expresión proteica del AR y de algunos de sus genes diana (PSA, FGF8 y PMEPA1) (Figura 30). En el caso de la línea celular 22RV1, tal y como ocurre con la expresión de ARNm, los niveles de proteína del AR y el resto de genes estudiados no se vio afectada. Por último, en las células PC3 no se detecta el AR, mientras hay un aumento en la expresión proteica de los genes diana (PSA, NDRG1, FGF8 y PMEPA1) (Figura 30).

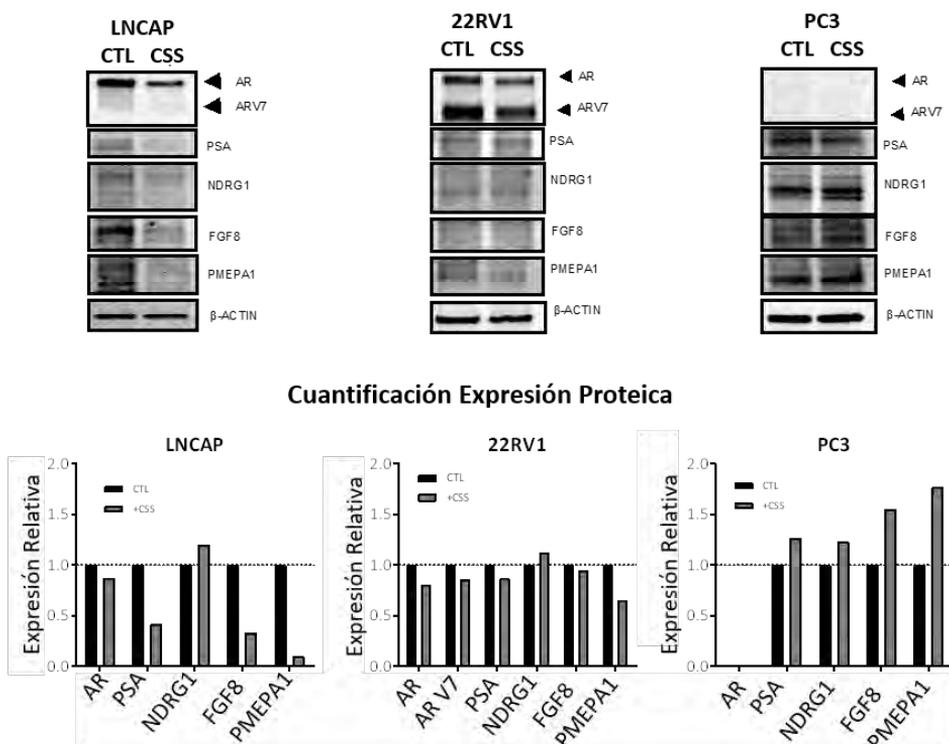


Figura 30. Expresión proteica del AR y sus genes diana en líneas celulares de CaP tratadas con ADT. Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante western-blot. Se usó β -Actina como control de carga. Los resultados mostrados están normalizados respecto a la línea control sin tratar.

Una vez los pacientes desarrollan CRPC, se administran las terapias con los NHAs Enz o AA. Para comprender los mecanismos moleculares detrás de estas

RESULTADOS

terapias, tratamos las líneas celulares de CaP con Enz (40 μ M), AA (20 μ M) o la combinación de ambas durante 5 días. Cuando se analizó la proliferación celular, observamos que AA es significativamente más eficiente reduciendo la tasa de proliferación que Enz en ambas líneas celulares LNCaP (20% vs. 41.4%; $p < 0.05$) y 22RV1 (41.5 vs. 79.5%; $p < 0.05$) (**Figura 31A**). Además, la combinación de Enz y AA tiene un efecto sinérgico en la inhibición de la proliferación celular en comparación con el tratamiento exclusivo con Enz o AA en LNCaP (3,1% vs. 41.4% para Enz, 3.1% vs. 20% para AA; $p < 0.05$) y para 22RV1 (28.9% vs. 79.5% para Enz, 28.9% vs. 41.5% para AA; $p < 0.05$) (**Figura 31A**). Nuevamente, las células LNCaP son más sensibles a la terapia con NHA que las 22RV1. Por el contrario, en las células PC3 no se observan diferencias a nivel de proliferación (**Figura 31A**), demostrando que esta línea celular también es resistente a NHA.

Asimismo, el análisis del ciclo celular demostró que tanto las células LNCaP como las 22RV1 son inicialmente sensibles al tratamiento exclusivo con Enz o AA. Ambos fármacos inducen una parada de ciclo celular en G_0/G_1 , así como muerte celular (fase Sub G_0), mientras que la combinación con ambos produce un incremento dramático de la muerte celular en ambas líneas celulares (**Figura 31B**). En cambio, la línea celular PC3 es resistente a ambos tratamientos de forma individual o en combinación, ya que no se observó ni una parada del ciclo celular en G_0/G_1 ni muerte celular, confirmando ser independiente de andrógenos.

RESULTADOS

Generación de modelos celulares de resistencia a la privación androgénica

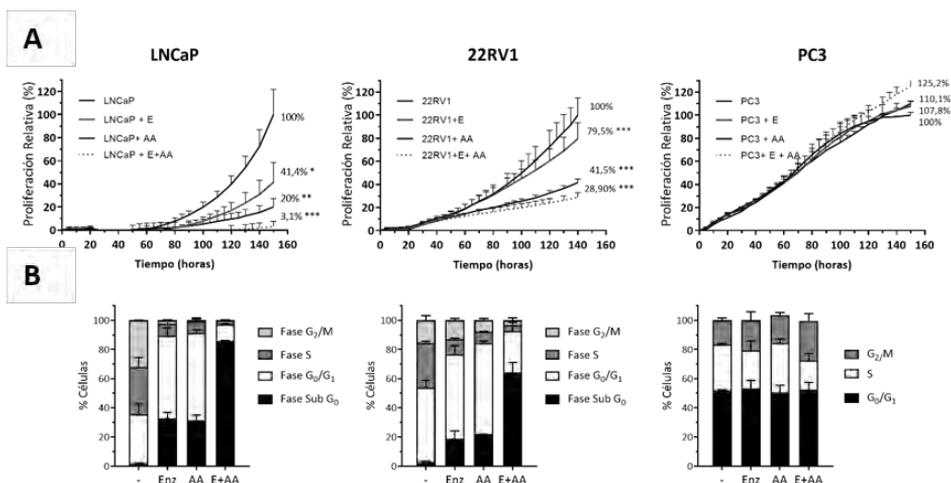


Figura 31. Respuesta de las líneas celulares LNCaP, 22RV1 y PC3 a Enz y AA. (A) Análisis de la proliferación celular usando xCelligence. Los resultados están normalizados considerando el valor a los 5 días de las células sin tratar el 100% (n=4 ±SD). **(B)** Resultados del análisis del ciclo celular. El gráfico de barras muestra los porcentajes correspondientes a cada fase del ciclo celular (n=3 ±SD).

En cuanto a las alteraciones en la expresión de ARNm en el eje del AR, no se observó una represión transcripcional del AR total y *AR-FL* respecto al control en las LNCaP tratadas con Enz. Sin embargo, sí que se produjo una disminución (>50%) en los niveles de expresión de *AR-V7*, *AR-V9* y el resto de genes diana del AR estudiados (**Figura 32A**). En relación al tratamiento con AA en las células LNCaP, observamos una disminución considerable de la expresión del AR total, *AR-FL* y las isoformas *AR-V7* and *AR-V9*, y como consecuencia, una reducción en la mayoría de los genes diana estudiados (**Figura 32A**). Además, al comparar el efecto de Enz vs. AA observamos que AA induce una mayor represión que Enz en los niveles de la mayoría de los genes analizados. Sorprendentemente, el tratamiento combinado con E+AA promueve la sobreexpresión de *AR-V7* y *AR-V9*, mientras los niveles de *AR-FL* fueron ligeramente reprimidos. A pesar del gran aumento en la expresión de estas dos variantes, la expresión de la mayoría de los genes diana del AR estudiados disminuyó, lo que sugiere que ni la expresión de *AR-V7* ni de *AR-V9* es necesaria para promover los cambios de expresión de los genes diana de AR.

RESULTADOS

El tratamiento de la línea celular 22RV1 con Enz produce la represión de todos los genes: *ARFL*, *AR total*, *AR-V7*, *AR-V9* y los genes diana del AR. En cambio, las células 22RV1 tratadas con AA no muestran una variación considerable en la expresión de *AR FL*, *AR total*, *AR-V7*, *AR-V9*, pero si se observa una clara disminución de los genes diana del AR. De nuevo, como ocurría con las células LNCaP, el tratamiento combinado (E+AA) promueve un aumento significativo de la expresión de las variantes *AR-V7* y *AR-V9* y, aunque en menor medida, del *AR-FL* y *AR total* (**Figura 32B**). Este efecto se vio acompañado por un mantenimiento o incluso un aumento en la expresión de los genes diana de AR.

Finalmente, el tratamiento de la línea celular resistente PC3 mostró patrones de expresión de ARNm opuestos a las líneas sensibles LNCaP y 22RV1. El tratamiento con Enz indujo un incremento en la expresión de *AR-V9*, *FKBP5* y *PMEPA1*, mientras la expresión de *AR-V7* desapareció como ya se describió previamente en el tratamiento con ADT (**Figura 32C**). En cambio, el tratamiento con AA no produjo ningún cambio en la expresión de las isoformas del AR, mientras promovió la inducción de los genes diana del AR. Por último, el tratamiento combinado (Enz+AA) indujo la represión en la expresión de las isoformas del AR, aunque los genes diana no mostraron un patrón de expresión claro (**Figura 32C**).

RESULTADOS

Generación de modelos celulares de resistencia a la privación androgénica

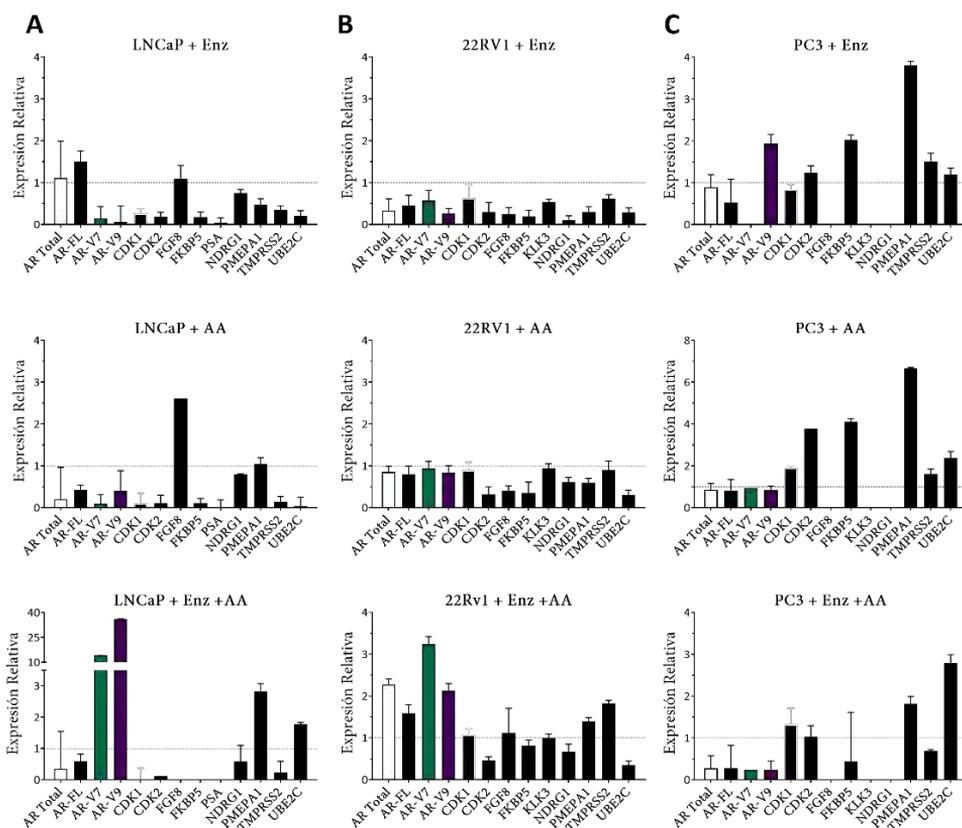


Figura 32. Cuantificación del AR, AR-V7, AR-V9 y algunos de sus genes diana en respuesta a Enz y AA. Las líneas celulares LNCaP (A), 22RV1 (B) y PC3 (C) fueron tratadas durante 5 días con 40 μ M de Enz, 20 μ M de AA o la combinación de ambas. Los resultados mostrados están normalizados respecto al control endógeno (*GAPDH*) y en referencia al grupo control (células sin tratar). Las barras de error se corresponden a la SD calculada de las réplicas.

Contrariamente a lo que ocurre a nivel de ARNm, en la línea LNCaP se produce una disminución en los niveles de proteína del AR y sus genes diana, mientras el resto de genes diana se mantienen en los tratamientos con Enz y AA. Además, cuando se tratan las células con la combinación de Enz y AA, no se detecta el AR, pero hay un aumento en algunos de los productos de los genes diana estudiados (*NDRG1* y *FGF8*) (Figura 33A).

RESULTADOS

Cuando analizamos los niveles de proteína de la línea 22RV1 tratadas con Enz, AA o la combinación Enz+AA, tal y como ocurría con las LNCaP, no se observa una correspondencia con los niveles de ARNm. Con el tratamiento con Enz y AA se mantienen niveles proteicos similares al control sin tratar, solamente se observa un aumento drástico en la expresión proteica de PMEPA1 cuando se tratan las células con AA, mientras con el doble tratamiento (Enz+AA) se observa una reducción en la expresión proteica (**Figura 33B**).

Por último, se cuantificaron los niveles de proteína del AR y sus genes diana en la línea PC3 tratada con Enz, AA o Enz+AA. Mientras no se detectó en ningún caso el AR, el resto de genes se mantuvieron estables con los tres tratamientos (**Figura 33C**). Confirmando que esta línea celular es independiente del AR.

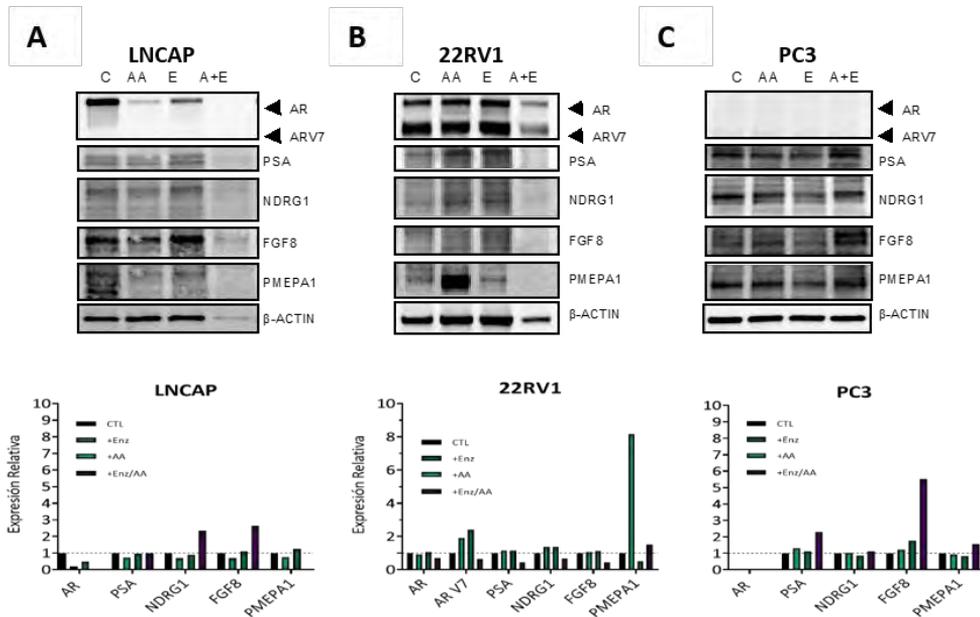


Figura 33. Expresión proteica del AR y sus genes diana en líneas celulares de CaP tratadas con Enz, AA o Enz+AA. Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante western-blot. Se usó β -Actina como control de carga. Los resultados mostrados están normalizados respecto a la línea control sin tratar.

1.3. Generación de modelos de resistencia a la privación androgénica (R-ADT)

Para generar un modelo celular que represente *in vitro* la progresión a CRPC, las líneas celulares LNCaP y 22RV1 fueron cultivadas en ausencia de hormonas esteroideas (CSS) durante 6 meses. Las líneas celulares generadas fueron denominadas LNCaP R-ADT y 22RV1 R-ADT respectivamente (**Figura 34**). La adquisición de la resistencia fue evaluada mediante ensayos de proliferación y fueron caracterizadas morfológica y funcionalmente.

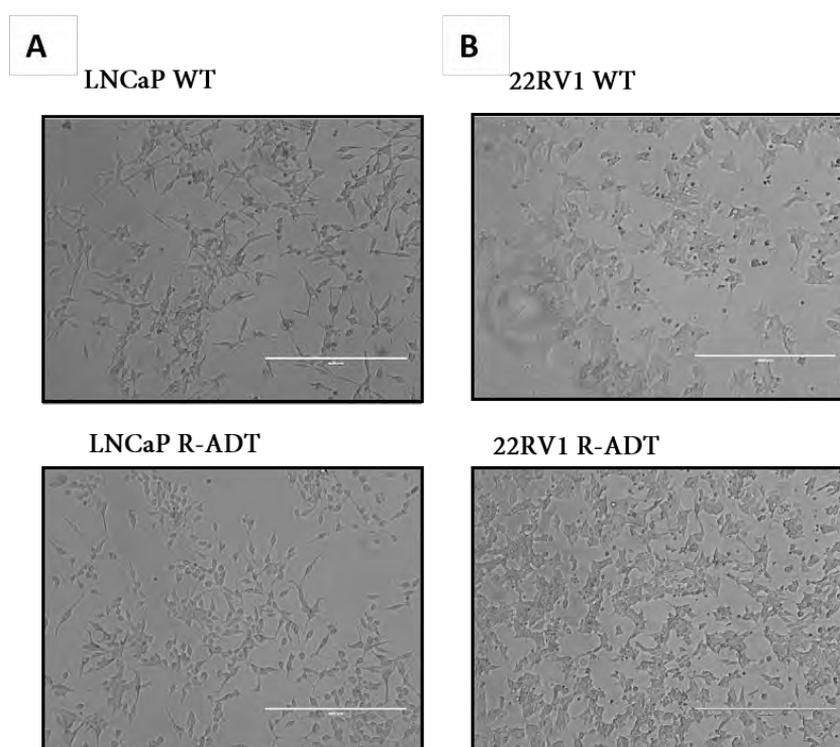


Figura 34. Imágenes de microscopía óptica de las células control y R-ADT. No se observan diferencias morfológicas entre las líneas celulares silvestres y las resistentes (R-ADT) tanto en las LNCaP (A) como en las 22RV1 (B).

Las líneas celulares generadas LNCaP R-ADT y 22RV1 R-ADT son capaces de crecer eficientemente en ausencia de andrógenos. LNCaP R-ADT muestra una tasa de proliferación significativamente mayor que la línea LNCaP silvestre (243.9% vs. 100%, $p < 0.05$), así como menor tiempo de duplicación (62 vs. 46

RESULTADOS

horas) (**Figura 35A**). Mientras que las células 22RV1 R-ADT presentan una tasa de proliferación y, por ende, un tiempo de duplicación similares a la de su línea control (103% y 49 horas vs. 100% y 48 horas, respectivamente) (**Figura 35A**). En cuanto al ciclo celular, ambas líneas control y R-ADT muestran una distribución del ciclo celular similar (**Figura 33B**). Destacablemente, las células LNCaP R-ADT ya no presentan la muerte celular inducida por ADT que se observaba en las LNCaP WT.

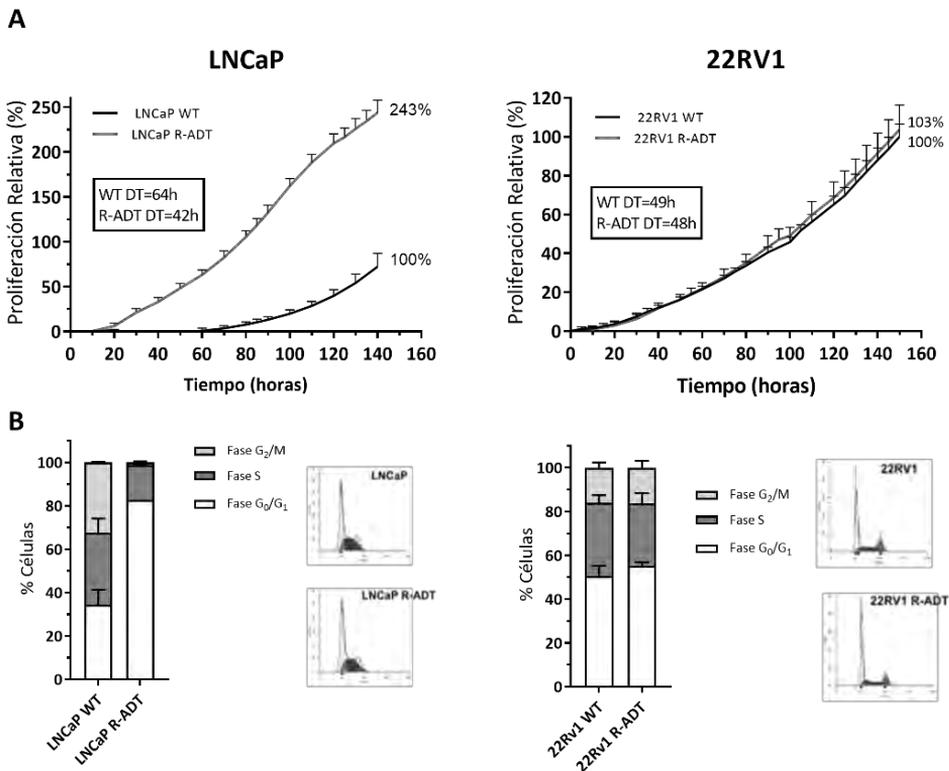


Figura 35. Caracterización de las líneas resistentes LNCaP R-ADT y 22RV1 R-ADT (Modelos de R-ADT). (A) Análisis de la proliferación celular usando xCelligence. Resultados estandarizados considerando el valor final de las líneas control el 100% ($n=4 \pm SD$). (B) Análisis del ciclo celular en las líneas de CaP silvestres y resistentes (R-ADT). Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo ($n=3 \pm SD$).

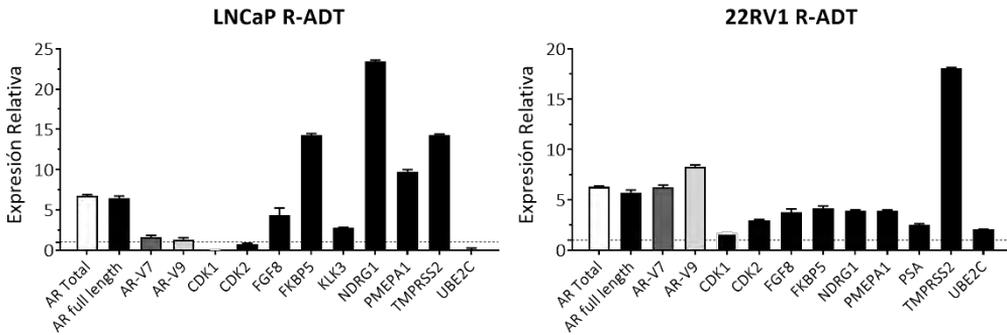
En las LNCaP R-ADT, la adquisición de resistencia a ADT está asociada a un aumento de seis veces del *AR total* y *AR-FL* a nivel de ARNm, mientras las

variantes *AR-V7* and *AR-V9* solo se incrementaron ligeramente (**Figura 36A**). Además, se observó una sobreexpresión de varios genes diana del AR (*FKBP5*, *NDRG1* y *TMPRSS2*). En el caso de las 22RV1 R-ADT, la expresión de las variantes del AR (*AR* total, *AR-FL*, *AR-V7* y *AR-V9*) se vio consistentemente incrementada en las células 22RV1 R-ADT (**Figura 36A**). De nuevo, esta inducción se ve reflejada en un aumento general de la expresión de la mayoría de los genes diana del AR (**Figura 36A**).

También se estudiaron los niveles de proteína para el AR y algunos de sus genes diana en los modelos de resistencia a ADT (R-ADT). En el caso de la línea celular LNCaP, al contrario del perfil de expresión de ARNm, se produjo una disminución en la expresión proteica tanto del AR como de sus genes diana (PSA, *NDRG1*, *FGF8* y *PMEPA1*). Además, no se detectó la isoforma *AR-V7*. Del mismo modo, en las células 22RV1 R-ADT la expresión proteica tampoco se correspondía con la expresión de ARNm y no se observaron cambios en el nivel de proteína del AR y la isoforma *AR-V7* o la mayoría de genes diana de AR estudiados (**Figura 36B**).

RESULTADOS

A



B

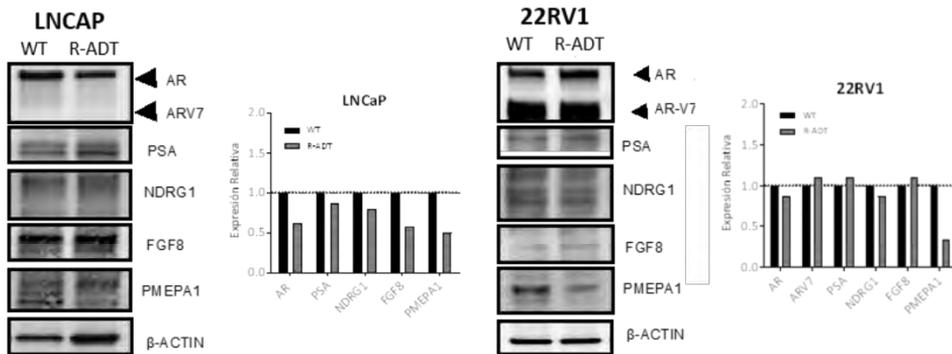


Figura 36. Expresión del AR y sus genes diana en los modelos de resistencia a ADT (LNCaP R-ADT y 22RV1 R-ADT). (A) Análisis por qPCR de las variantes del AR y de sus genes diana tras la adquisición de resistencia. Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (GAPDH) y referenciados a las líneas celulares silvestres. Las barras de error se corresponden a la SD calculada de los triplicados. (B) Los niveles de proteína fueron cuantificados mediante western-blot. Se usó β -Actin como control de carga. Los resultados mostrados están normalizados respecto a sus respectivas células silvestres.

1.3.1. Respuesta de los modelos de resistencia a ADT a los tratamientos de segunda línea Enz y AA.

Una vez obtenidos los modelos de resistencia a ADT, quisimos evaluar si la adquisición de resistencia condicionaba la respuesta a las terapias con NHA. Para ello, se administraron Enz y AA como segunda línea de tratamiento tras la adquisición de resistencia (**Figura 37**). En las células LNCaP R-ADT, se observó una mayor tolerancia a Enz, mostrando un crecimiento relativo del 55.5%

RESULTADOS

Generación de modelos celulares de resistencia a la privación androgénica

comparado con las células sin tratar. En el caso del tratamiento con AA, la tasa de proliferación relativa a la línea sin tratar fue del 45,8%. La combinación de Enz y AA también fue analizada, observándose una tasa de proliferación relativa del 23%. Estos resultados sugieren que la adquisición de resistencia a ADT en la línea LNCaP promueve un aumento de la tolerancia a NHAs como segunda línea de tratamiento (Figura 37A).

En cuanto a las 22RV1 R-ADT, al ser tratadas con Enz se mantuvo una tasa de proliferación relativa del 88,5%, mientras que el tratamiento con AA produjo una disminución de la proliferación a un 44,2% respecto al control 22RV1 R-ADT (Figura 37B). Cuando se analizó el efecto del tratamiento combinado (Enz + AA), las tasas de proliferación fueron similares a las del tratamiento individual con AA, lo que sugiere que el efecto del tratamiento con Enz se ve enmascarado por el tratamiento con AA (39,8% vs. 44,2% para Enz + AA y AA, respectivamente). De nuevo, la adquisición de resistencia a ADT aumenta la supervivencia a NHAs en las células 22RV1.

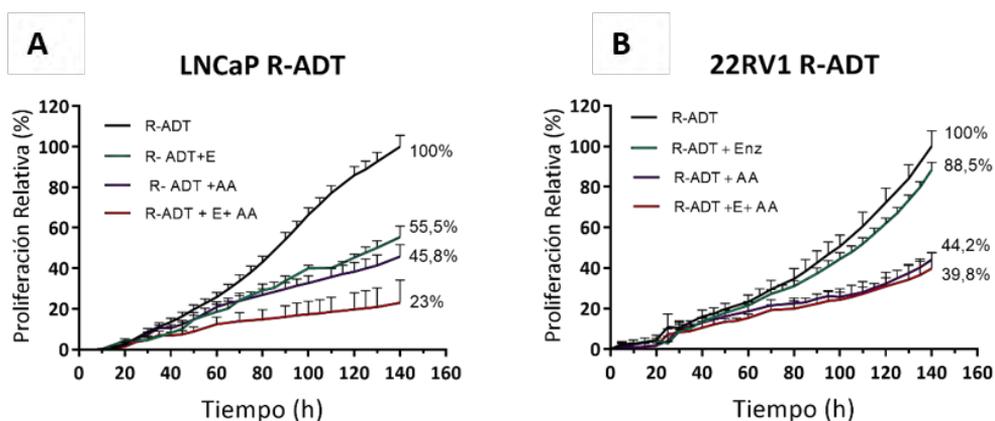


Figura 37. Respuesta de los modelos R-ADT a los tratamientos de segunda línea Enz y AA. Las líneas celulares LNCaP R-ADT (A) y 22RV1 R-ADT (B) fueron tratadas con 40 μ M Enz (R-ADT + Enz); 20 μ M AA (R-ADT + AA) y 40 μ M Enz + 20 μ M AA (R-ADT Enz + AA) durante 5 días. Los resultados están estandarizados considerando el valor final de las líneas control el 100%. Los datos mostrados se corresponden a la media \pm SD calculada de los cuadruplicados de cada condición.

RESULTADOS

1.4. Generación de modelos de resistencia a ADT y a los tratamientos de segunda línea Enz y AA (Modelos concomitantes R-ADT/NHAs)

La mayoría de pacientes tratados con Enz o AA desarrollan resistencia entre 9 y 15 meses después de comenzar el tratamiento. Para analizar el efecto del uso concomitante de ADT en combinación con NHAs, las líneas de CaP LNCaP y 22RV1 fueron cultivadas con CSS y concentraciones crecientes de Enz o AA (Figura 38). Tras 6 meses de selección, se evaluó la proliferación celular de los nuevos modelos generados, así como la expresión génica de las variantes de AR y sus genes diana.

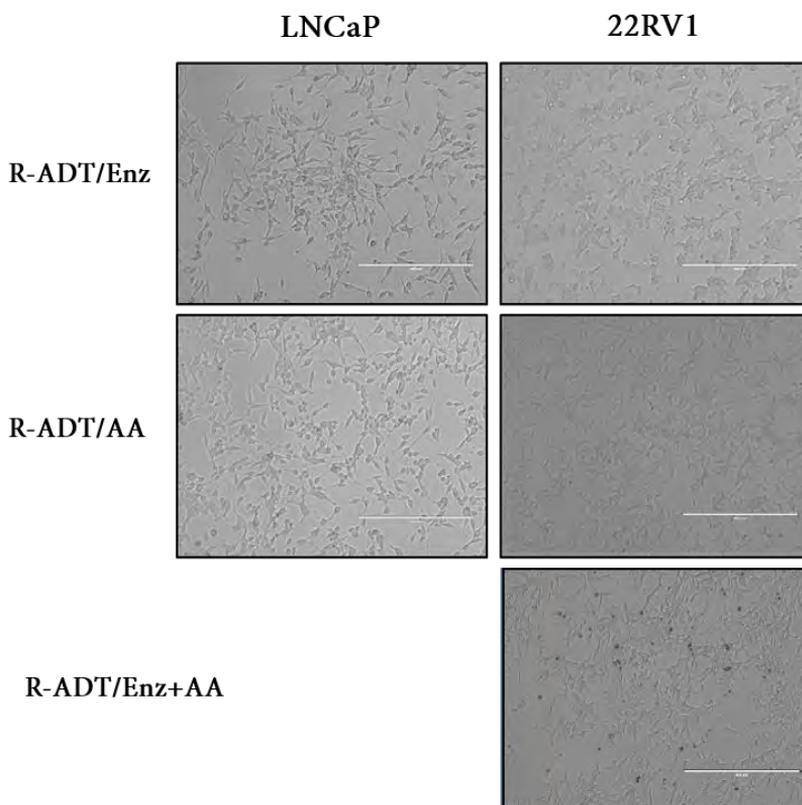


Figura 38. Imágenes de microscopía óptica de los modelos celulares de resistencia a ADT y NHAs (Enz y/o AA). A la izquierda las LNCaP y a la derecha las 22RV1. Todas las líneas celulares generadas fueron capaces de crecer en presencia de ADT y los diferentes tratamientos (Enz o AA) y no presentaron diferencias morfológicas.

En el caso de las LNCaP, cuando se utilizó Enz en combinación con ADT, la tasa de proliferación de las células LNCaP R-ADT/Enz fue ligeramente inferior a la de la línea celular control y presentaron una curva de proliferación significativamente diferente (86% vs. 100%, $p < 0.05$) (**Figura 39A**). Sin embargo, cuando se analizó el tiempo de duplicación de las células a lo largo de los pases, se observó que éste era inferior al de las células silvestres (49 vs. 62) (**Figura 39B**).

La combinación de AA con ADT promovía el mismo efecto. La tasa de proliferación de la línea LNCaP R-ADT/AA también disminuyó en comparación con las células silvestres LNCaP (72% vs. 100%) (**Figura 39A**), mientras que el tiempo de duplicación con los pases disminuyó respecto a la línea silvestre (44 vs. 62) (**Figura 39B**). Destacablemente, las células LNCaP no fueron capaces de proliferar de manera estable bajo el tratamiento concomitante de Enz y AA con ADT, ya que la exposición prolongada a ambos medicamentos en condiciones de deprivación androgénica producía una parada del ciclo celular y la inducción de muerte celular que imposibilitó el establecimiento de esta línea celular.

En cambio, en la línea celular 22RV1 sí se pudieron establecer los tres modelos concomitantes de resistencia. La línea 22RV1 R-ADT/Enz mostró mayor proliferación que las células 22RV1 silvestres (107.9% vs. 100%; $p < 0.05$) y un tiempo de duplicación similar (53 horas vs. 49 horas), mientras que las células 22RV1 R-ADT/AA mostraron menor tasa de proliferación que su control (73.1% vs. 100%; $p < 0.05$), aunque presentaron un tiempo de duplicación con los pases muy similar a la línea control (43 horas vs. 49 horas) (**Figura 39A-B**).

En cuanto al doble tratamiento con Enz y AA, las células 22RV1 R-ADT/Enz + AA mostraron una tasa proliferativa significativamente inferior a la línea celular silvestre (51.9 vs. 100%; $p < 0.05$) (**Figura 39A**), lo que sugiere que la combinación de ambos fármacos en condiciones de deprivación androgénica potencia la inhibición de la proliferación celular mediada por AA.

RESULTADOS

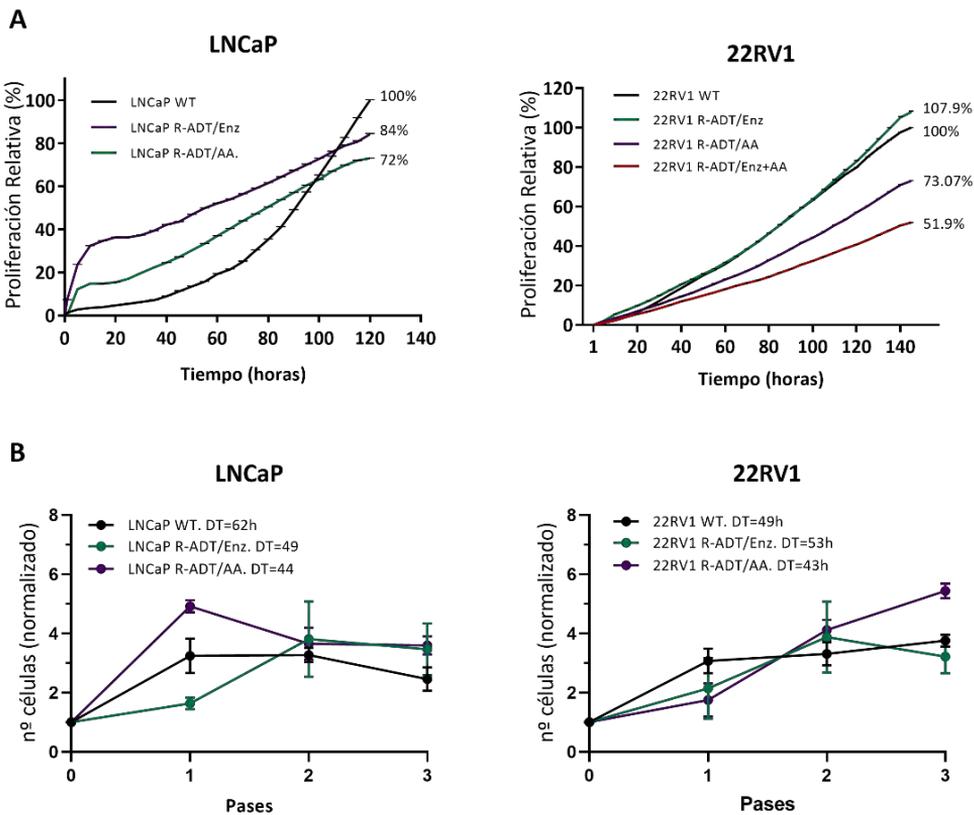


Figura 39. Caracterización de las líneas resistentes a NHAs (R-ADT/Enz, R-ADT/AA and R-ADT/Enz + A). (A) Análisis de proliferación usando xCELLigence en LNCaP (panel izquierdo) y 22RV1 (panel derecho). Los resultados están estandarizados considerando el valor final de las líneas control el 100%. Los datos mostrados se corresponden a la media \pm SD calculada de los cuadruplicados hechos de cada condición. (B) Tiempo de duplicación celular. Los datos mostrados han sido normalizados respecto al número de células inicial sembradas en cada pase ($n=3 \pm$ SD). El tiempo de duplicación calculado representa la media de los 3 tiempos de conteo realizados.

En cuanto al análisis de expresión, en la línea LNCaP R-ADT/Enz se detectó un aumento significativo en la expresión del AR total y el AR-FL, así como en los genes diana *KLK3* and *TMPRSS2* ($p < 0.05$), mientras el resto de genes diana del AR mantuvieron niveles similares a la línea silvestre (*CDK2*, *FKBBS*, *NDRG1* and *PMEPA1*) (Figura 40A). Los análisis de qPCR en las LNCaP R-ADT/AA

RESULTADOS

Generación de modelos celulares de resistencia a la privación androgénica

mostraron un incremento en el perfil de expresión de *AR-FL*, mientras las variantes *AR-V7* y *AR-V9* disminuyeron (Figura 40A).

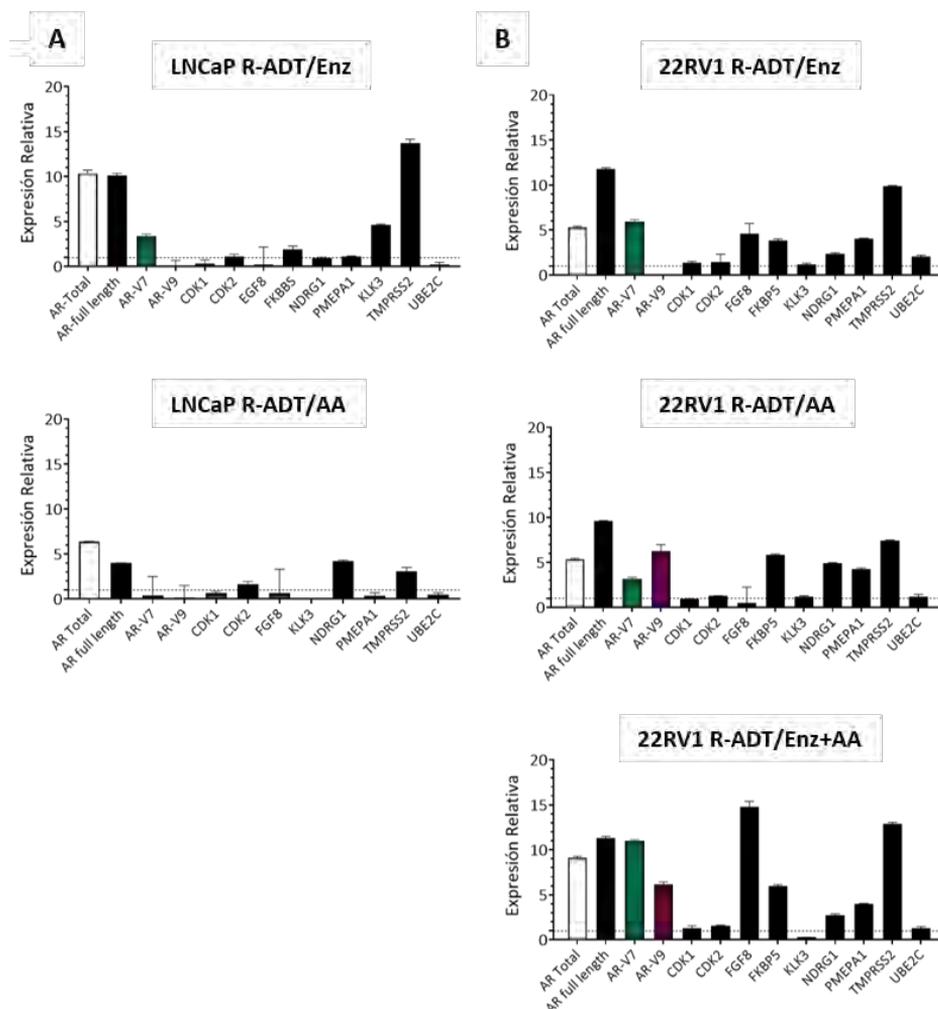


Figura 40. Expresión del AR y sus genes diana en los modelos de resistencia concomitantes (R-ADT/E, R-ADT/AA y R-ADT/E+AA). Análisis por qPCR de las variantes del AR y sus genes diana tras la adquisición de resistencia en LNCaP (A) y 22RV1 (B). Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (*GAPDH*) y referenciados a las líneas celulares silvestres. Las barras de error se corresponden a la SD calculada de los triplicados.

RESULTADOS

En el caso de los modelos de resistencia de la línea 22RV1, cabe destacar que el tratamiento concomitante con ADT y AA, Enz o el doble tratamiento Enz + AA produce un incremento general de los niveles de expresión de *AR-FL* y *AR-V7*. Además, en las células 22RV1 R-ADT/AA y 22RV1 R-ADT/Enz + A también se observó un aumento en la expresión de *AR-V9*, mientras que en las células 22RV1 R-ADT/E esta variante específica desaparece (**Figura 40B**). En general los tres modelos celulares de 22RV1 mostraron un aumento consistente de la expresión de diversos genes diana del AR, como *FKBP5*, *PMEPA1* y *TMPRSS2* (**Figura 40B**).

1.4.1. Respuesta de los modelos de resistencia concomitantes (R-ADT/NHAs) al tratamiento de segunda línea alternativo.

Una vez se establecieron los modelos celulares de resistencia a R-ADT y los fármacos de segunda línea Enz y AA, evaluamos la sensibilidad de cada línea celular al tratamiento con el NHA alternativo. La tasa de proliferación en las células LNCaP R-ADT/E tratadas con AA fue incluso ligeramente superior a la proliferación en presencia solo de Enz (117.4% vs. 100%) (**Figura 41A** panel izquierdo), mientras la línea celular LNCaP R-ADT/AA mantuvo una tasa de proliferación similar en presencia de Enz o AA (92.6% vs. 100%) (**Figura 41A** panel izquierdo).

En cuanto al análisis de la expresión génica, el uso secuencial de AA tras la adquisición de resistencia a ADT y Enz (LNCaP R-ADT/E + Abiraterona) no produjo grandes cambios en el perfil de expresión de *AR total* y *AR-FL*, así como de la mayoría de genes diana del AR. Sin embargo, se detectó una disminución en la expresión de las variantes *AR-V7* y *AR-V9* (**Figura 41B** panel izquierdo). Por otro lado, cuando las células LNCaP R-ADT/AA fueron tratadas con el fármaco de segunda línea Enz (LNCaP R-ADT/AA + Enzalutamida), observamos un incremento en los niveles de expresión del *AR total* que no se veía acompañada de un aumento del *AR-FL* ni de las variantes de *splicing AR-V7* y *AR-V9*. Estos resultados sugieren que podría haber una sobreexpresión de otras variantes del AR no amplificadas en nuestro estudio, aunque dichas

RESULTADOS

Generación de modelos celulares de resistencia a la privación androgénica

variantes alternativas no serían capaces de incrementar la expresión génica de los genes diana del AR estudiados (Figura 41B panel derecho).

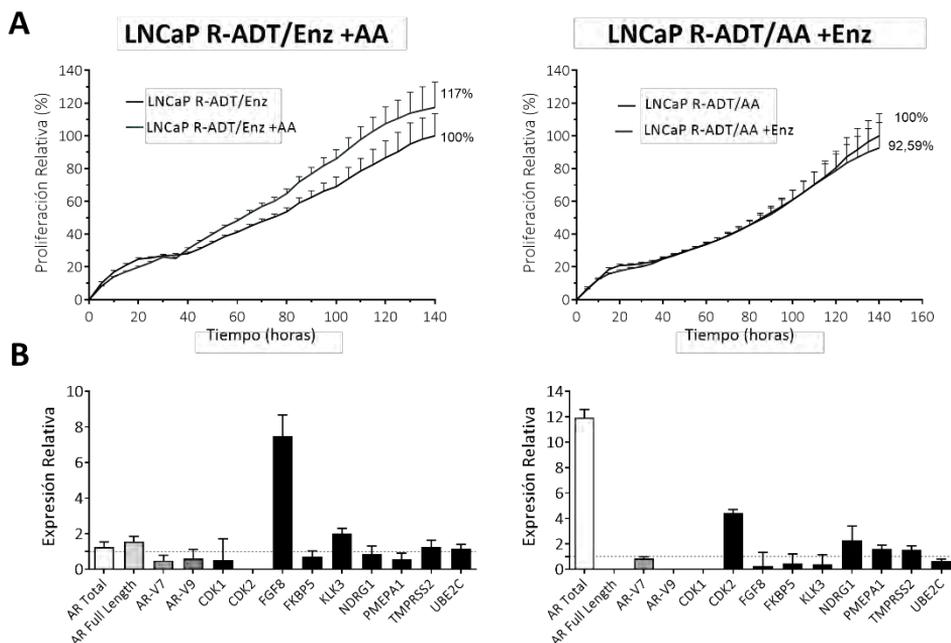


Figura 41. Análisis de la resistencia cruzada entre Enzalutamida y Abiraterona en los modelos de resistencia LNCaP. Las células resistentes fueron tratadas con el antiandrógeno complementario durante 5 días. (A) Proliferación celular mediante xCELLigence (n=3 ±SD). Los resultados están estandarizados considerando el valor final de las líneas control el 100%. (B) Análisis de expresión mediante qPCR de las variantes del AR y sus genes diana. Los datos mostrados están normalizados respecto al control endógeno (*GAPDH*). Las barras de error mostradas se corresponden a la SD calculada de los triplicados.

Del mismo modo que las LNCaP, las células 22RV1 R-ADT/AA mostraron unos niveles de proliferación similares en presencia de AA o Enz (Figura 42A panel derecho). Sin embargo, se observó una disminución significativa de la proliferación cuando se trató la línea 22RV1 R-ADT/Enz con AA (R-ADT/Enz + Abiraterona) (68.7% vs. 100%) ($p < 0.05$) (Figura 42A panel izquierdo). De los cuatro modelos concomitantes evaluados, éste fue el único que no mostró resistencia cruzada entre los tratamientos Enz y AA. Finalmente, los análisis de expresión génica por qPCR demostraron que en ambas líneas resistentes 22RV1

RESULTADOS

(22RV1 R-ADT/Enz y 22RV1 R-ADT/AA), el uso secuencial de AA o Enz, respectivamente, como tratamiento de segunda línea promueve un silenciamiento de las isoformas del AR, así como de sus genes diana (Figura 42B).

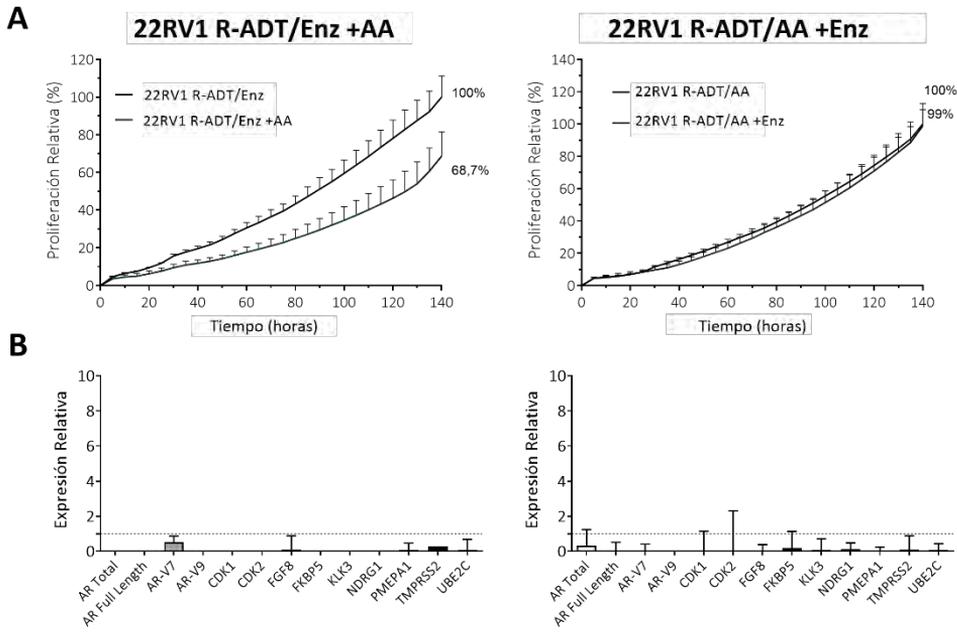


Figura 42. Análisis de la resistencia cruzada entre Enzalutamida y Abiraterona en los modelos de resistencia 22RV1. Las células resistentes fueron tratadas con el antiandrógeno complementario por 5 días. (A) Proliferación celular mediante xCELLigence. ($n=3 \pm SD$). Los resultados están estandarizados considerando el valor final de las líneas control el 100%. (B) Análisis de expresión mediante qPCR de las variantes del AR y sus genes diana. Los datos mostrados están normalizados respecto al control endógeno (*GAPDH*). Las barras de error mostradas se corresponden a la SD calculada de los triplicados.

En resumen, hemos desarrollado análisis funcionales y de expresión de las líneas celulares de CaP sensibles y resistentes a los tratamientos hormonales, demostrando que el tratamiento previo con ADT, y la subsecuente adquisición de resistencia, disminuye la efectividad de AA y Enz. Además, la adquisición de resistencia a Enz y AA en los nuevos modelos de CaP generados está mediada por un aumento en la actividad transcripcional del AR.

1.5. Análisis de la capacidad tumorigénica de los nuevos modelos celulares de resistencia de CaP.

A continuación, quisimos estudiar si la adquisición de resistencia a ADT (R-ADT) y al uso concomitante de ADT y los tratamientos de segunda línea (R-ADT/E, R-ADT/AA y R-ADT/E+AA) estaba ligada a un aumento de la capacidad tumorigénica. Para ello se evaluó la capacidad de migración e invasión, la clonogenicidad, la inducción de EMT y la adquisición de características de CSC o fenotipo NE.

Importantemente, las tres líneas celulares LNCaP mostraron un incremento significativo en la capacidad de migración en comparación con la línea control (LNCaP WT) (**Figura 43A**). Este efecto fue muy destacado en el caso de las células LNCaP R-ADT ($p < 0.001$), mientras que también se observó, aunque en menor medida, en ambos modelos celulares concomitantes: LNCaP R-ADT/E y LNCaP R-ADT/AA ($p < 0.01$). En el caso de los ensayos de invasión, solo se observó un incremento significativo para la línea celular LNCaP R-ADT ($p < 0.01$) (**Figura 43B**). A diferencia de la migración, la resistencia a ADT y los tratamientos de segunda línea no se asoció con un aumento de la capacidad invasiva (**Figura 43B**).

De manera similar, en los modelos celulares de las 22RV1, la resistencia a ADT produjo un aumento muy significativo de la capacidad migratoria ($p < 0.01$) (**Figura 43A**). En cambio, los tres modelos concomitantes mostraron menor incremento en la migración celular, siendo solo estadísticamente significativa en la línea 22RV1 R-ADT/E ($p < 0.01$) y en 22RV1 R-ADT/E+A ($p < 0.05$). Tal y como se observó en los modelos celulares de LNCaP, solo las células resistentes a ADT (22RV1 R-ADT) presentaron una capacidad potencial de invasión ($p < 0.01$) (**Figura 43B**), mientras que ninguno de los modelos de resistencia a ADT y los tratamientos de segunda línea presentaron diferencias en términos de invasividad.

RESULTADOS

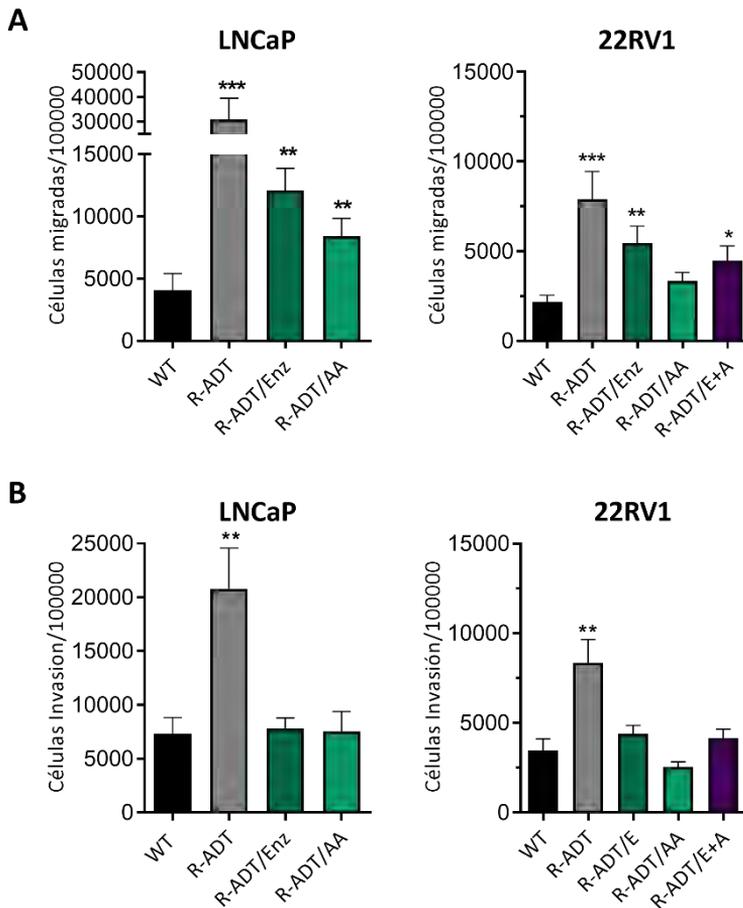


Figura 43. Análisis de la migración e invasión en los modelos celulares de resistencia derivados de las células LNCaP y 22RV1. (A) Ensayos de migración en LNCaP (panel izquierdo) y 22RV1 (panel derecho). (B) Ensayos de invasión en LNCaP (panel izquierdo) y 22RV1 (panel derecho). En ambas secciones los histogramas representan el número de células migradas o invadidas por cada 100,000 células sembradas ($n=3 \pm SD$). Las diferencias significativas se muestran respecto a las líneas celulares silvestres (WT).

A continuación, se analizó la capacidad clonogénica de los modelos de resistencia generados respecto a las líneas LNCaP y 22RV1 silvestres (WT). En el caso de los modelos de resistencia de la línea LNCaP, en todas las líneas celulares (LNCaP R-ADT, LNCaP R-ADT/Enz y LNCaP R-ADT/AA) se observó un incremento del número de colonias ($p < 0.01$) y éstas presentaron una mayor área de ocupación ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.01$, respectivamente) respecto a

la línea silvestre (WT), que tiene una muy reducida capacidad de formar colonias (Figura 44A).

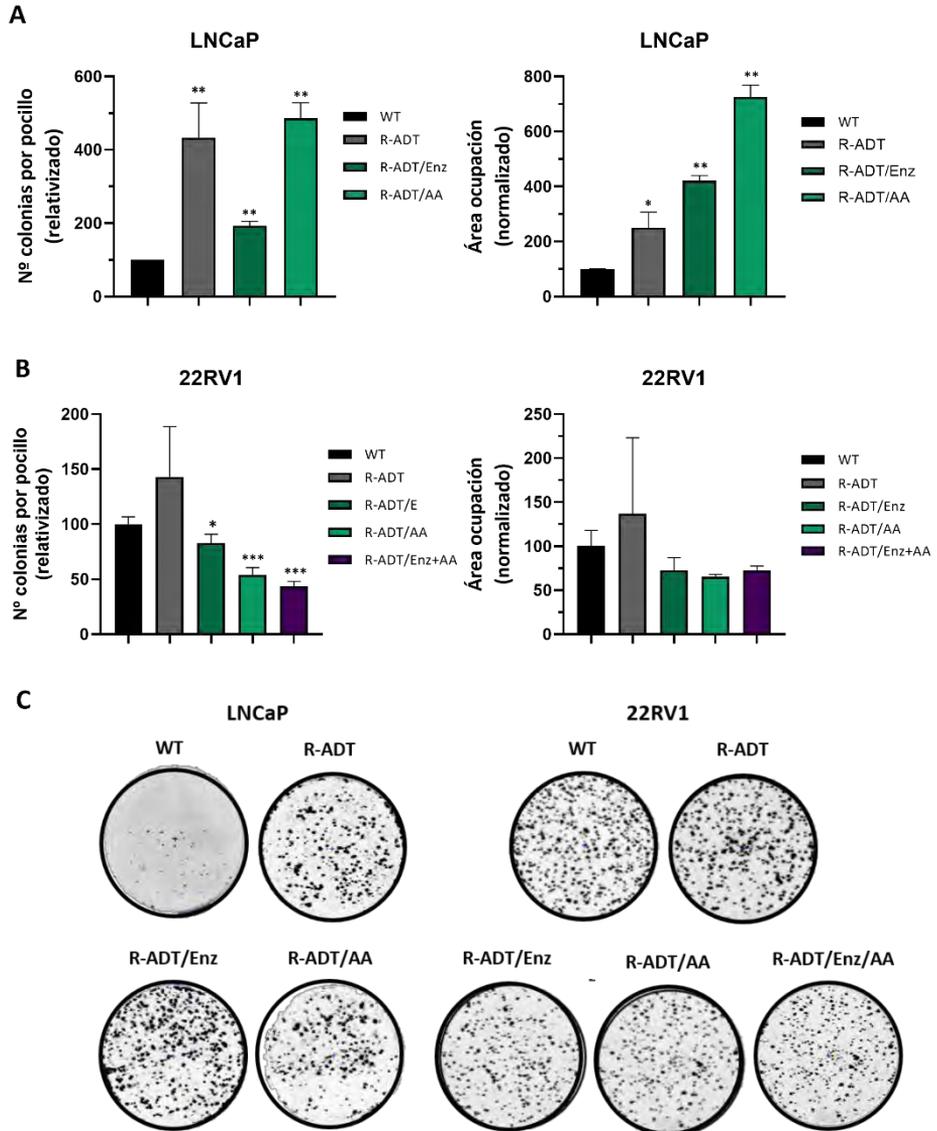


Figura 44. Ensayos de clonogenicidad en los modelos de resistencia. (A) Número de colonias por pocillo y Área de ocupación de las colonias en los modelos celulares resistentes de LNCaP ($n=3 \pm SD$). (B). Ídem para los modelos celulares resistentes 22RV1. En ambas secciones los datos presentados están normalizados a las líneas celulares silvestres (WT) y

RESULTADOS

las diferencias significativas se muestran con respecto a dichas líneas. (C) Imágenes representativas de las colonias generadas en las distintas líneas celulares de CaP.

En el caso de las líneas celulares 22RV1, la línea resistente a la deprivación androgénica (22RV1 R-ADT) mostró una ligera tendencia a incrementar tanto el número de colonias como el área de ocupación respecto a la línea 22RV1 WT, pero dicho incremento no fue estadísticamente significativo. Por el contrario, todas las líneas resistentes a los tratamientos de segunda línea mostraron una disminución en el número de colonias (22RV1 R-ADT/E, $p < 0.05$; 22RV1 R-ADT/AA, $p < 0.001$; 22RV1 R-ADT/E+AA, $p < 0.001$), que se vio acompañado por una menor área de ocupación en todas ellas (**Figura 44B**).

Por último, se analizaron los perfiles de expresión asociados a la generación de CSCs, EMT y desarrollo de fenotipo NE en los modelos de resistencia. En el caso de las células LNCaP R-ADT éstas mostraron un aumento en la expresión de la mayoría de genes analizados relacionados con un fenotipo de CSC (*OCT3/4*, *NANOG*, *REX1*, *SOX2*, *CD44* y *CD38*) ($p < 0.01$), así como de la mayoría de genes relacionados con un fenotipo NE (*CHGA2*, *FOXA2*, *Ki67*, *CD56* y *SYP*) ($p < 0.05$). Por el contrario, no presentaron un fenotipo de EMT. En cuanto a los modelos de resistencia a ADT y los tratamientos de segunda línea, en la línea LNCaP R-ADT/E se observa un aumento en el nivel de ARNm de los genes relacionados con características de CSC (*OCT3/4*, *NANOG*, *REX1*, *SOX2*, *CD44* y *CD38*) ($p < 0.05$), mientras que no muestra diferencias significativas de expresión en los genes de EMT y NE. Por último, en la línea LNCaP R-ADT/AA se observa una sobreexpresión generalizada en los genes estudiados para CSC, EMT y NE ($p < 0.05$) (**Figura 45**).

Del mismo modo, se analizó la expresión génica en los modelos de resistencia de la línea celular 22RV1. En la línea 22RV1 R-ADT se observó una sobreexpresión de los genes estudiados para el fenotipo CSC ($p < 0.01$) y NE ($p < 0.05$), mientras no se observaron diferencias significativas en la expresión de genes de EMT. Por otro lado, en las dos líneas resistentes a Enz (22RV1 R-ADT/E) se observó una disminución generalizada a nivel de ARNm en los genes relacionados con características CSC y fenotipo mesenquimal ($p < 0.05$ para ambos) y un aumento en los genes relacionados con fenotipo NE ($p < 0.01$). En

RESULTADOS

Generación de modelos celulares de resistencia a la privación androgénica

la línea 22RV1 R-ADT/AA se observó un aumento generalizado a nivel de ARNm en los genes relacionados con fenotipo mesenquimal (EMT) ($p < 0.01$) y fenotipo NE ($p < 0.05$), mientras no se observaron diferencias significativas en los genes relacionados con las características CSC. Por último, la línea resistente al doble tratamiento (22RV1 R-ADT/E+AA) solo presentó una sobreexpresión en los genes relacionados con características CSC (*NANOG*, *REX1*, *SOX2*, *CD44* y *CD38*) ($P < 0.01$) (Figura 45).

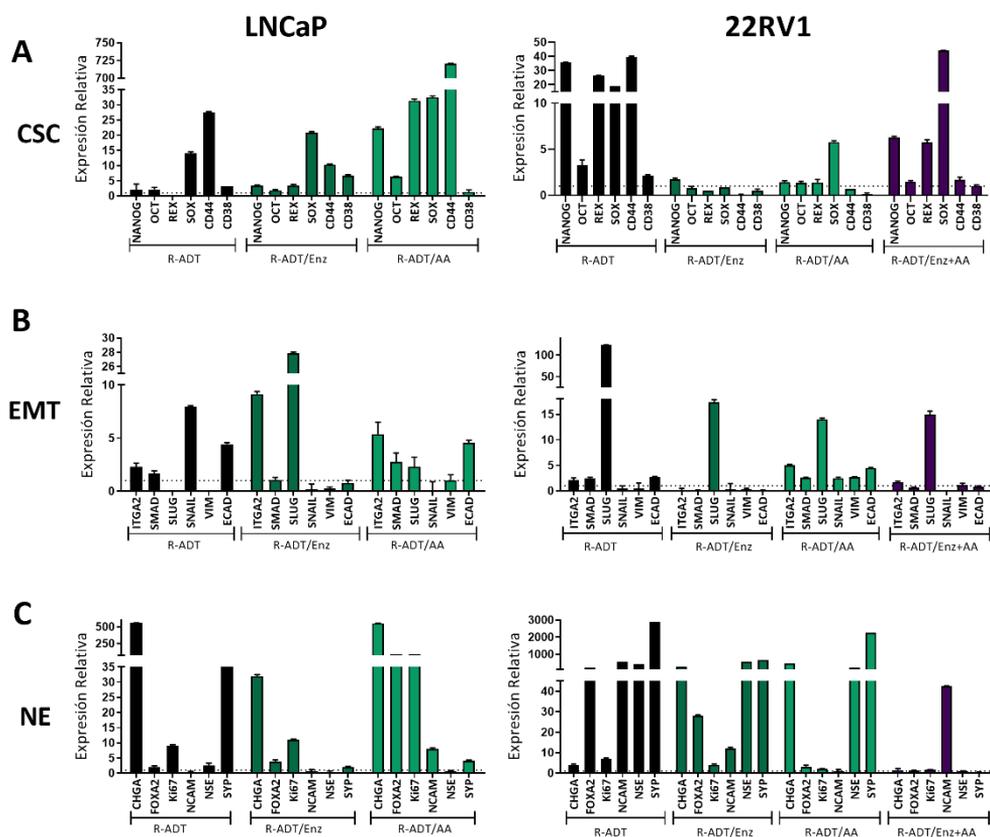


Figura 45. Análisis de expresión de genes característicos de CSC, EMT y NE en los modelos celulares de resistencia. Análisis de expresión mediante qPCR tras la adquisición de resistencia en líneas celulares LNCaP (paneles izquierdos) y 22RV1 (paneles derechos). Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (*GAPDH*) y referenciados a las líneas celulares silvestres (línea de puntos). Las barras de error se corresponden a la SD calculada de los triplicados.

RESULTADOS

Estos datos sugieren que la adquisición de resistencia a la privación androgénica y a los tratamientos de segunda línea Enz y AA están ligados a la adquisición de características de CSC, así como un fenotipo EMT y/o neuroendocrino.

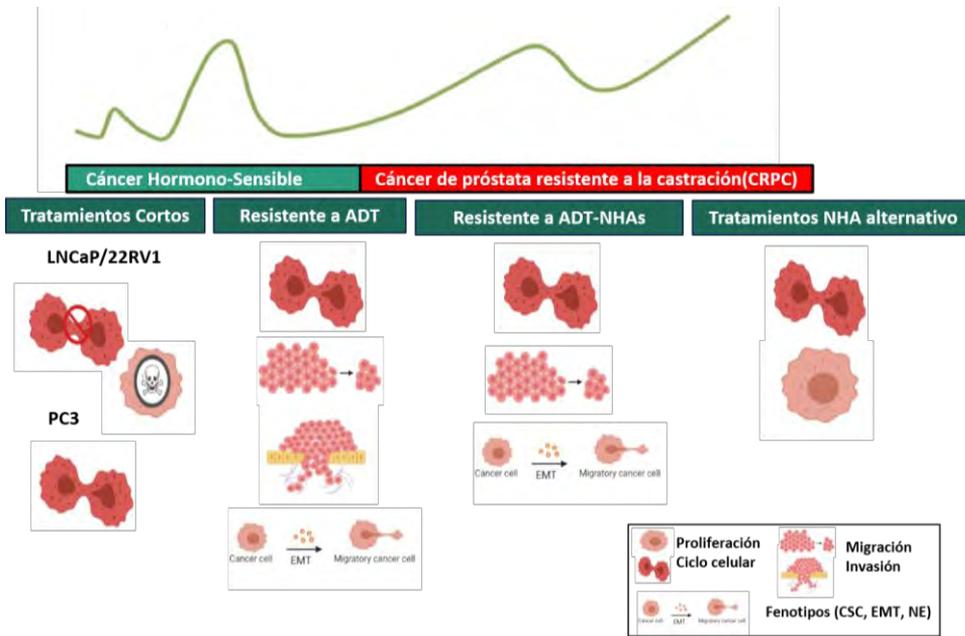


Figura 46. Generación de modelos celulares de resistencia a la privación androgénica. Resumen de las características de los modelos de resistencia LNCaP y 22RV1 generados. En la figura aparecen representados la capacidad proliferativa, ciclo celular, migración, invasión y la presencia de expresión de marcadores para fenotipos de CSC, EMT o NE.

SILENCIAMIENTO SELECTIVO DE LAS VARIANTES *AR-FL*, *AR-V7* Y *AR-V9* EN MODELOS CELULARES DE CaP

2.1. Desarrollo de líneas estables de CaP con silenciamiento selectivo de las variantes *AR-FL*, *AR-V7* y *AR-V9*.

Para estudiar con mayor profundidad el papel del receptor de andrógenos y sus variantes de *splicing* en la adquisición de resistencia a las terapias hormonales en CaP se generaron líneas celulares estables LNCaP y 22RV1 silvestres y resistentes a ADT conteniendo *short hairpin RNAs* (shRNAs) inducibles por dox para el silenciamiento tanto del *AR-FL* como de sus variantes de *splicing* *AR-V7* y *AR-V9*.

2.1.1. Clonación y secuenciación de shRNAs.

Tras el emparejamiento de los oligonucleótidos sentido y antisentido de shAR-FL, shAR-V7 y shAR-V9, éstos fueron clonados en el plásmido pLKO-Tet-On. La correcta inserción fue comprobada mediante digestión con XhoI seguida de una electroforesis en gel de agarosa (Figura 47).

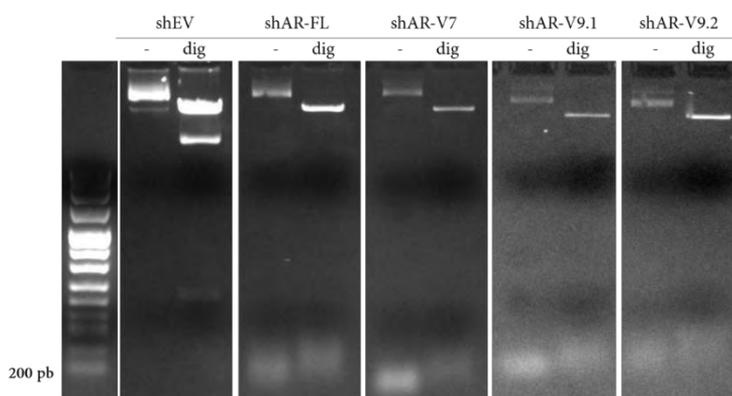


Figura 47. Digestión de los plásmidos pLKO-Tet-On EV, shAR-FL, shAR-V7 y shAR-V9 con la XhoI. En los plásmidos con la inserción de las secuencias correspondientes a los shRNAs se puede observar una banda de unos 200 pb ausente en el plásmido de origen.

RESULTADOS

Además, para comprobar la correcta secuencia de los insertos los plásmidos fueron secuenciados. Los resultados confirmaron la correcta obtención de los diferentes vectores plasmídicos.

2.1.2. Transducción de los shRNAs en modelos celulares de CaP.

El siguiente paso para la obtención de las líneas celulares expresando los shRNAs específicos para cada una de las variantes fue la transducción de las células LNCaP WT, 22RV1 WT, LNCaP R-ADT y 22RV1 R-ADT con los vectores plasmídicos EV, shAR-FL, shAR-V7 y shAR-V9. Por último, las células transducidas fueron seleccionadas mediante la adición de 2 µg/mL de Puro durante 2 días, estableciéndose todas las líneas celulares estables incluidas en la Tabla 5.

Tabla 5. Líneas celulares CaP shARNs

LNCaP WT	pLKO EV	pLKO shAR-FL	pLKO shAR-V7	
22RV1 WT	pLKO EV	pLKO shAR-FL	pLKO shAR-V7	
LNCaP R-ADT	pLKO EV	pLKO shAR-FL	pLKO shAR-V7	pLKO shAR-V9
22RV1 R-ADT	pLKO EV	pLKO shAR-FL	pLKO shAR-V7	pLKO shAR-V9

2.2. Caracterización de la funcionalidad de las herramientas de silenciamiento en los diferentes modelos celulares

Para confirmar la eficacia del silenciamiento en las diferentes líneas celulares generadas se midió la expresión génica del *AR-FL* y sus variantes *AR-V7* y *AR-V9* y la expresión proteica del AR y AR-V7 tras la inducción con Dox en las diferentes líneas celulares generadas. AR-V9 no pudo ser analizada ya que esta isoforma proteica no es reconocida por el anticuerpo empleado. Las líneas celulares transducidas con el vector pLKO vacío (EV) fueron utilizadas como control.

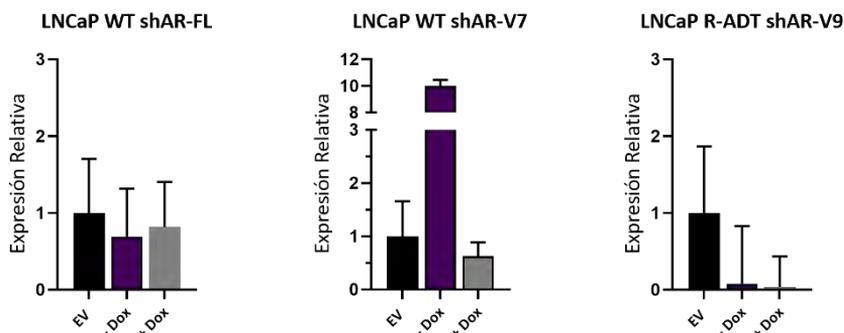
En primer lugar, se analizaron las líneas LNCaP WT shRNA. En la línea LNCaP WT shAR-FL se consiguió un silenciamiento parcial del *AR-FL* a nivel de ARNm, aunque este silenciamiento también se observó en la línea sin Dox (0.7 vs. 0.81, +/- dox) (**Figura 48A**). Además, se consiguió un silenciamiento

RESULTADOS

Silenciamiento selectivo de las variantes *AR-FL*, *AR-V7* y *AR-V9* en modelos celulares de CaP

selectivo a nivel de proteína en el *AR-FL*, que se acompañó de una disminución de la expresión proteica de la isoforma *AR-V7* respecto a la línea EV (1.2 vs. 0.67 y 1.98 vs. 0.64, -/+ dox respectivamente) (**Figura 48B**).

A



B

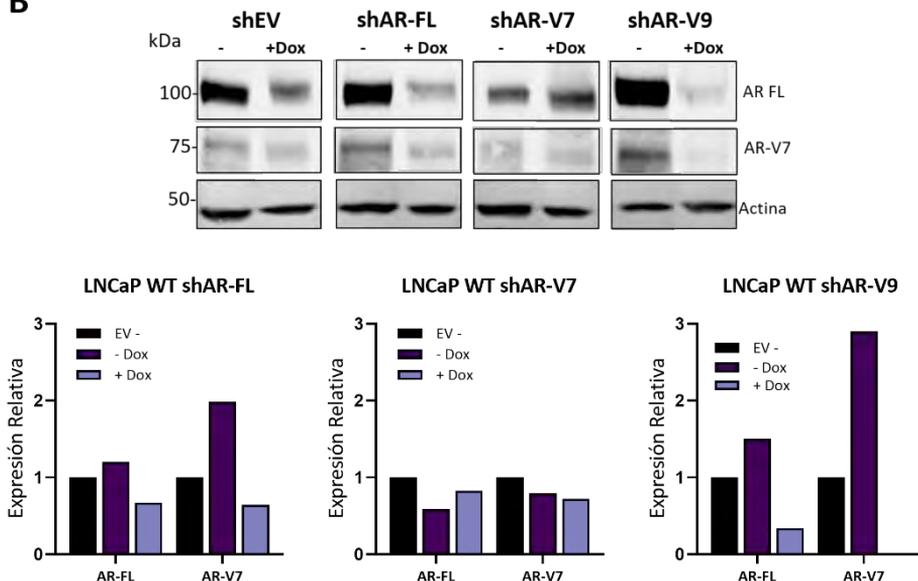


Figura 48. Análisis del fenotipo de las líneas LNCaP WT shRNA. (A) Análisis de expresión mediante qPCR del *AR-FL* (panel izquierdo), *AR-V7* (panel central) y *AR-V9* (panel derecho). Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (*GAPDH*) y referenciados a la línea celular LNCaP WT EV ($n=3 \pm SD$). (B) Cuantificación de los niveles de proteína de AR y la isoforma *AR-V7* mediante western-blot. Se empleó β -

RESULTADOS

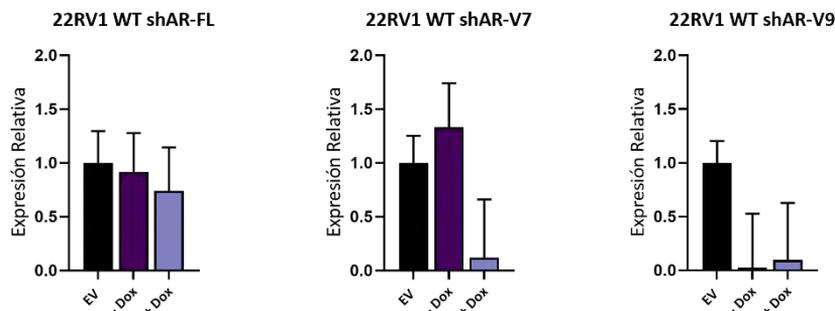
Actin como control de carga. Los resultados mostrados están normalizados respecto a la línea LNCaP WT EV.

En cuanto a las células LNCaP WT shAR-V7, aumentó su expresión de ARNm para el *AR-V7*, pero se observó una disminución en la expresión inducible por Dox (10.9 vs. 0.6, -/+ dox respectivamente) (**Figura 48A**). Respecto a los niveles de proteína para la isoforma *AR-V7*, su expresión disminuyó ligeramente respecto a la línea EV, pero ésta fue independiente de la inducción con dox (0.79 vs. 0.72, -/+ dox respectivamente) (**Figura 48B**).

Por último, en la línea LNCaP WT shAR-V9 se produjo un aumento de expresión de ARNm de la variante *AR-V9* respecto a la línea celular EV tanto en las células tratadas con Dox como sin ella (1.19 vs. 1.59, respectivamente) (**Figura 48A**). Sin embargo, en cuanto a los niveles de proteína, se observó una disminución en la expresión proteica tanto para el *AR-FL* como para la isoforma *AR-V7* (1.5 vs. 0.34 y 2.9 vs. 0, -/+ dox respectivamente) (**Figura 48B**).

De igual manera, se consiguieron establecer con éxito las líneas celulares 22RV1 WT *AR-FL*, 22RV1 WT shAR-V7 y 22RV1 WT shAR-V9, así como una línea control 22RV1 WT EV. En las líneas celulares 22RV1 WT *AR-FL*, 22RV1 WT shAR-V7 se consiguió el silenciamiento inducible por Dox para la expresión génica de *AR-FL* y *AR-V7* (0.91 vs. 0.74; 1.33 vs. 0.11, -/+ Dox respectivamente). Por el contrario, en las dos líneas 22RV1 WT shAR-V9 el silenciamiento se produjo independientemente de la dox (0.03 vs. 0.09, -/+ dox respectivamente) (**Figura 49A**). En cuanto a los niveles de proteína, contrariamente a lo observado a nivel de expresión génica, en la línea 22RV1 WT *AR-FL* se observó un aumento tanto del *AR-FL* como de la isoforma *AR-V7* (3.26 y 1.49, respectivamente). Por el contrario, en la línea 22RV1 WT shAR-V7 se observó una disminución de los niveles de proteína en el *AR-V7* y se mantuvieron los niveles del *AR-FL* (1 y 0.34, respectivamente). Por último, en la línea 22RV1 WT shAR-V9 se observó un aumento de la expresión proteica de dos veces para el *AR-FL*, mientras que no se detectó el *AR-V7* (**Figura 49B**). La línea 22RV1 WT shAR-V9 fue descartada para futuros experimentos ya que no manifestaba un efecto de silenciamiento inducido por dox ni a nivel de ARNm ni de proteína.

A



B

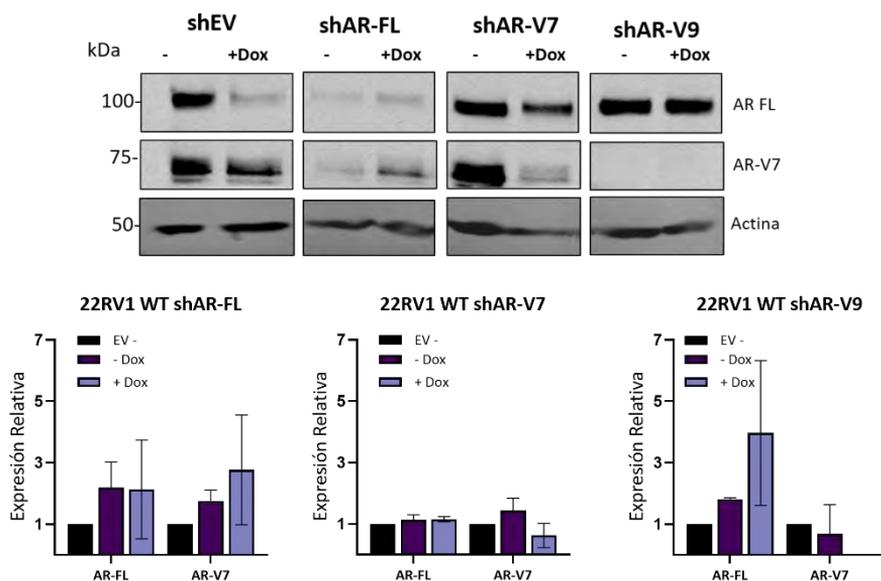


Figura 49. Análisis del fenotipo de las líneas 22RV1 WT shRNA. (A) Análisis de expresión mediante qPCR del *AR-FL* (panel izquierdo), *AR-V7* (panel central) y *AR-V9* (panel derecho). Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (*GAPDH*) y referenciados a la línea celular 22RV1 WT EV ($n=3 \pm SD$). (B) Cuantificación de los niveles de proteína de AR y la isoforma *AR-V7* mediante western-blot. Se empleó β -Actin como control de carga. Los resultados mostrados están normalizados respecto a la línea celular 22RV1 WT EV ($n=2 \pm SD$).

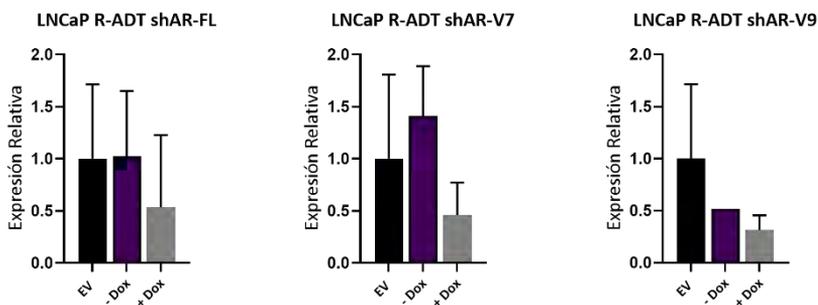
En el caso de las líneas LNCaP R-ADT se generaron cuatro líneas celulares: LNCaP R-ADT EV, LNCaP R-ADT shAR-FL, LNCaP R-ADT shAR-V7 y LNCaP R-ADT shAR-V9 y se midieron sus niveles de ARNm para el *AR-FL*,

RESULTADOS

AR-V7 o *AR-V9* y de proteína para el *AR-FL* y la isoforma *AR-V7*. En las líneas *shAR-FL* y *shAR-V7* se consiguió con éxito un silenciamiento inducible por Dox en la expresión del *AR-FL* (1 vs. 0.53, -/+ dox) y la variante *AR-V7* (1.4 vs 0.46, -/+ dox). Mientras que en la línea *shAR-V9* se silenciaba parcialmente (0.52 vs. 0.31, -/+ Dox respectivamente) (**Figura 50A**). Respecto a los niveles de proteína, se observó una disminución de la expresión proteica del AR inducida por dox en la línea LNCaP R-ADT *shAR-FL* en relación a la línea LNCaP R-ADT EV (1.15 vs. 0.28, -/+ dox) que se ve acompañada de una represión en la expresión proteica de la variante *AR-V7* (0.76 vs. 0, -/+ dox) (**Figura 50A**).

Por otro lado, en la línea *shAR-V7* no se observan diferencias significativas en los niveles de proteína del *AR-FL* (1.08 vs. 0.93, -/+ dox). En cuanto a la expresión de la variante *AR-V7*, se observaron mayores niveles de expresión que en la línea EV donde apenas era detectable (**Figura 50A**). Además, con la inducción con dox disminuyó su expresión proteica (3.51 vs. 1.74, -/+ dox). Por último, en la línea LNCaP *shAR-V9* no se observan diferencias significativas en los niveles de proteína del *AR-FL* (1.23 y 1.36, -/+ dox) y se observa un aumento en la expresión del *AR-V7* (9.42 y 6.37, -/+ dox) respecto a la línea EV (**Figura 50B**).

A



B

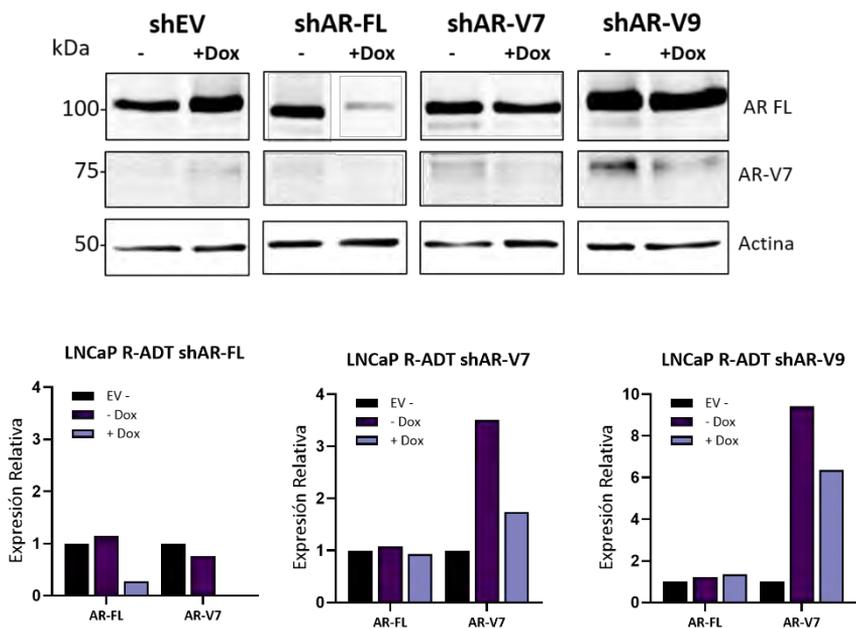


Figura 50. Análisis del fenotipo de las líneas LNCaP R-ADT shRNA. (A) Análisis de expresión mediante qPCR del *AR-FL* (panel izquierdo), *AR-V7* (panel central) y *AR-V9* (panel derecho). Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (*GAPDH*) y referenciados a la línea celular 22RV1 WT EV ($n=3 \pm SD$). (B) Cuantificación de los niveles de proteína de AR y la isoforma *AR-V7* mediante western-blot. Se empleó β -Actin como control de carga. Los resultados mostrados están normalizados respecto a la línea celular LNCaP R-ADT EV.

Por último, en la línea celular 22RV1 R-ADT se generaron tres líneas celulares: 22RV1 R-ADT shAR-FL, 22RV1 R-ADT shAR-V7 y 22RV1 R-ADT shAR-V9.

RESULTADOS

En todas las líneas celulares generadas se consiguió con éxito un silenciamiento inducible por Dox en la expresión del *AR-FL* (0.96 vs. 0.35, -/+ dox), la isoforma *AR-V7* (0.65 vs. 0.27, -/+ dox) y la isoforma *AR-V9* (0.68 vs. 0.0, -/+ dox) (Figura 51).

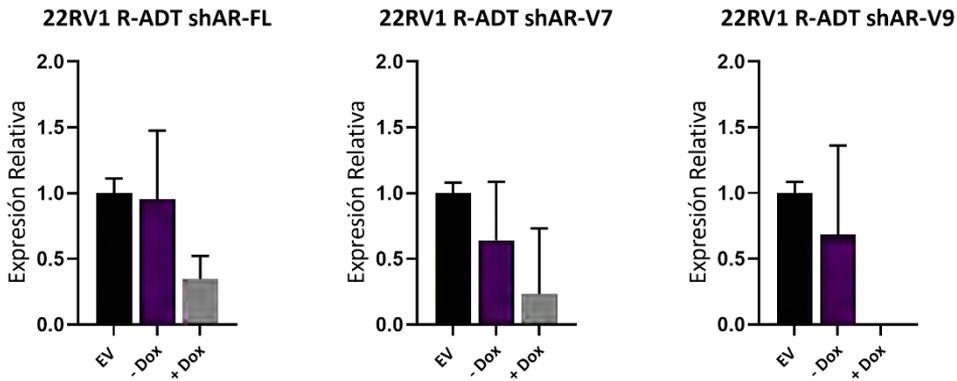


Figura 51. Análisis del fenotipo de las líneas 22RV1 R-ADT shRNA. Análisis por qPCR del AR-FL (panel izquierdo), AR-V7 (panel central) y AR-V9 (panel derecho). Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (GAPDH) y referenciados a la línea celular 22RV1 R-ADT. n=3 \pm SD

Como conclusión, de todas las líneas generadas han demostrado un silenciamiento selectivo las líneas: LNCaP WT shAR-FL, LNCaP WT shAR-V7, LNCaP R-ADT shAR-FL, LNCaP R-ADT shAR-V7, LNCaP R-ADT shAR-V9.2, 22RV1 WT shAR-FL, 22RV1 WT shAR-V7, 22RV1 R-ADT shAR-FL, 22RV1 R-ADT shAR-V7 y 22RV1 R-ADT shAR-V9. Por lo que nos centraremos en ellas para los análisis funcionales y genéticos.

2.3. Análisis funcionales y de expresión génica

Como se ha mostrado en la primera parte de este trabajo, la terapia de privación androgénica induce un aumento en la expresión del AR y sus variantes de *splicing* *AR-V7* y *AR-V9* en las líneas LNCaP y 22RV1 silvestres (Figura 29). Del mismo modo, la adquisición de resistencia a ADT está ligada a la reactivación transcripcional del AR (Figura 36). Por ello, quisimos evaluar

Silenciamiento selectivo de las variantes *AR-FL*, *AR-V7* y *AR-V9* en modelos celulares de CaP como afectaba el silenciamiento del *AR-FL*, *AR-V7* o *AR-V9* en las diferentes líneas shRNA generadas.

En primer lugar, evaluamos la tasa de proliferación de las diferentes líneas inducibles LNCaP WT respecto a la línea control EV. Observamos que el silenciamiento tanto del *AR-FL* como de la variante *AR-V7* disminuyó la tasa de proliferación respecto a la línea EV (59%, $p < 0.001$ y 79%, $p < 0.001$, respectivamente) (**Figura 52A**). Lo siguiente que se evaluó fue el ciclo celular. En las líneas celulares LNCaP WT (EV, shAR-FL, shAR-V7) la inducción con Dox produce una parada en G0/G1, sin embargo, no se observan diferencias en el perfil de ciclo entre la línea EV y las líneas shAR-FL o shAR-V7 (**Figura 52B**).

Por último, se quiso evaluar como afectaba el silenciamiento del AR-FL y sus isoformas AR-V7 y AR-V9 a la actividad transcripcional del AR. En las LNCaP WT shAR-FL, el silenciamiento del AR-FL está asociado a un aumento de la isoformas *AR-V9* a nivel de ARNm. En el caso de las LNCaP WT shAR-V7, el silenciamiento del AR-V7 está asociado a un aumento de la expresión del *AR-FL*. Mientras que en ambas líneas se observó una represión en la mayoría de genes diana del AR (**Figura 52C**).

RESULTADOS

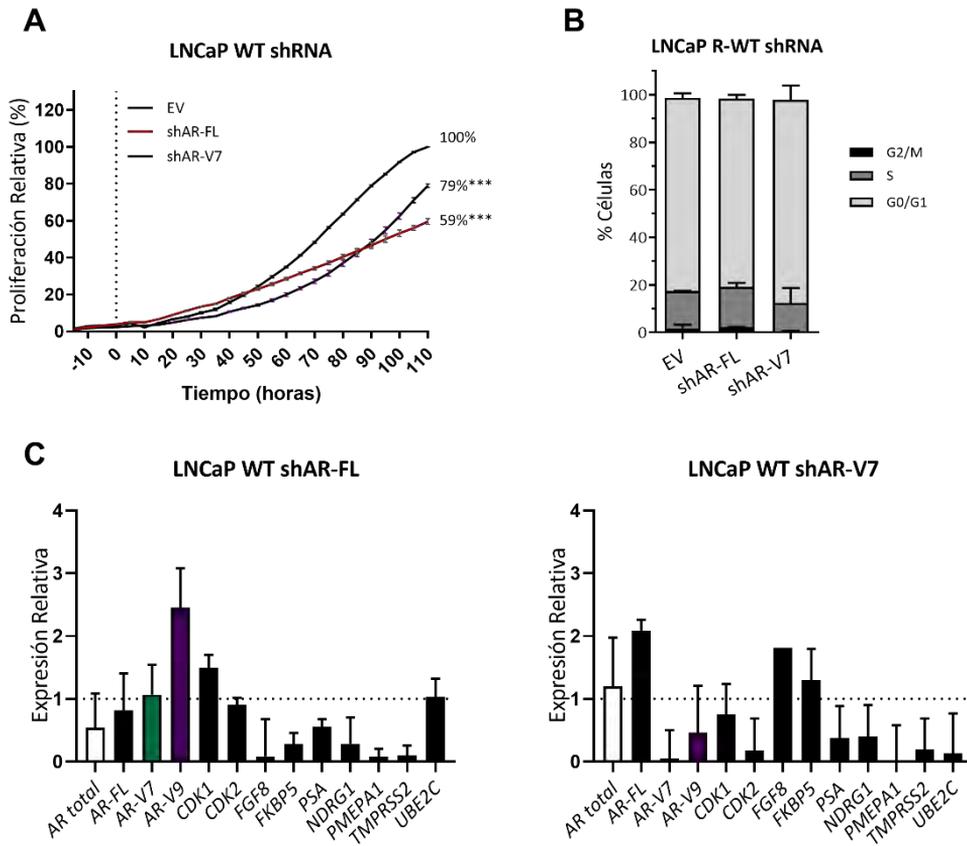


Figura 52. Análisis funcional de las líneas celulares LNCaP WT shRNA. (A) Análisis de la proliferación celular a tiempo real usando xCelligence. Los resultados mostrados han sido estandarizados considerando el valor final de las líneas EV el 100%. En la gráfica se muestra $n=4 \pm SD$. (B) Análisis de ciclo celular con IP. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo. $N=3 \pm SD$. En ambas secciones las diferencias significativas se muestran respecto a las líneas EV. (C) Cuantificación del AR, AR-V7, AR-V9 y algunos de sus genes diana. Los resultados mostrados están normalizados respecto al control endógeno (GAPDH) y en referencia a las células control (shEV). Las barras de error se corresponden a la SD calculada de las réplicas.

En el caso de las líneas inducibles 22RV1 WT shAR-FL y shAR-V7, el silenciamiento del *AR-FL* y del *AR-V7*, también disminuye la tasa de proliferación respecto a las líneas EV (63%, $p<0.001$ y 54%, $p=ns$, respectivamente) (**Figura 53A**). En cuanto al análisis del ciclo celular, en las líneas inducibles 22RV1 WT en presencia de Dox mostró que la línea 22RV1

RESULTADOS

Silenciamiento selectivo de las variantes *AR-FL*, *AR-V7* y *AR-V9* en modelos celulares de CaP

WT shAR-FL presenta un aumento significativo del porcentaje de células en fase S ($p < 0.01$) y una disminución de la fase G2/M ($p < 0.001$). Mientras que en la línea 22RV1 WT shAR-V7 también se observa una disminución de la fase G2/M ($p < 0.05$) (Figura 53B).

En la línea celular 22RV1 WT shAR-FL, el silenciamiento del AR-FL no produjo cambios significativos en la expresión de las isoformas *AR-V7* y *AR-V9* y los genes diana del AR estudiados. Por el contrario, en las 22RV1 WT shAR-V7, el silenciamiento del AR-V7 está asociado a una disminución de los niveles de ARNm las isoformas *AR-V7* y *AR-V9*, aunque no se observan diferencias significativas en la expresión del resto de genes estudiados (Figura 53C).

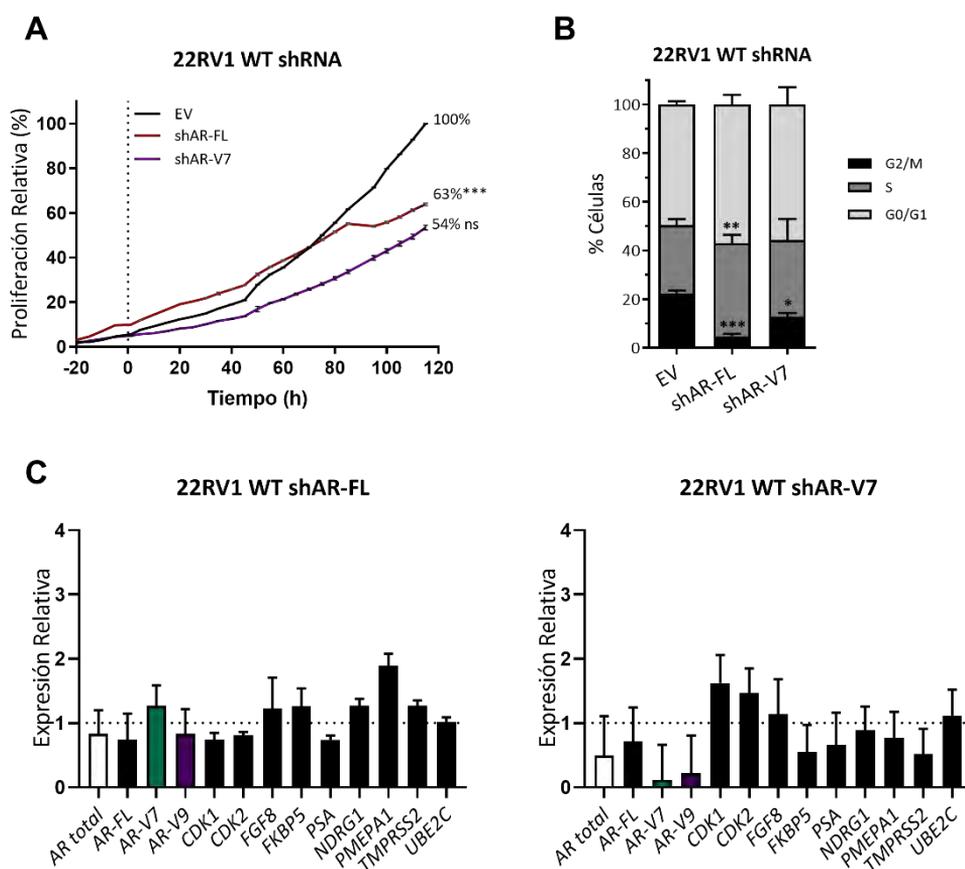


Figura 53. Análisis funcional de las líneas celulares LNCaP WT shRNA. (A) Análisis de la proliferación celular a tiempo real usando xCelligence. Los resultados mostrados han sido

RESULTADOS

estandarizados considerando el valor final de las líneas EV el 100%. En la gráfica se muestra $n=4 \pm SD$. (B) Análisis de ciclo celular con IP. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo. $N=3 \pm SD$. En ambas secciones las diferencias significativas se muestran respecto a las líneas EV. (C) Cuantificación del AR, AR-V7, AR-V9 y algunos de sus genes diana. Los resultados mostrados están normalizados respecto al control endógeno (GAPDH) y en referencia a las células control (shEV). Las barras de error se corresponden a la SD calculada de las réplicas.

Contrariamente a lo observado en las líneas inducibles silvestres, en el análisis de proliferación en las líneas resistentes a ADT no se observaron diferencias significativas a nivel de proliferación entre las líneas inducibles LNCaP R-ADT shAR-FL, shAR-V7 y shAR-V9 y la línea EV (87%, 76 y 74%, respectivamente) (**Figura 54A**). Sin embargo, las líneas inducibles LNCaP R-ADT también presentaron diferencias en el perfil de ciclo celular respecto a la línea EV tras la inducción con Dox. En la línea LNCaP R-ADT shAR-FL se observó un aumento en las fases G2/M y S ($p<0.001$ y $p<0.01$, respectivamente), así como una disminución de la fase G2/M ($p<0.001$). La línea LNCaP R-ADT shAR-V7 presentó mayor porcentaje de células en fase S ($p<0.05$). Mientras que en la línea LNCaP R-ADT shAR-V9 se observó un aumento de G2/M ($p<0.001$) (**Figura 54B**).

En la **figura 54C** se observa que el silenciamiento del AR-FL en la línea LNCaP R-ADT shAR-FL induce una disminución en la expresión de las isoformas AR-V7 y AR-V9 y la mayoría de los genes diana del AR estudiados. Por otro lado, en la línea LNCaP R-ADT shAR-V7, el silenciamiento del AR-V7, induce un aumento en la expresión de los genes diana del AR (**Figura 54C**). En el caso de la línea LNCaP R-ADT shAR-V9, el silenciamiento del AR-V9 induce una disminución de los niveles de ARNm del AR y un aumento en la mayoría de los genes diana estudiados.

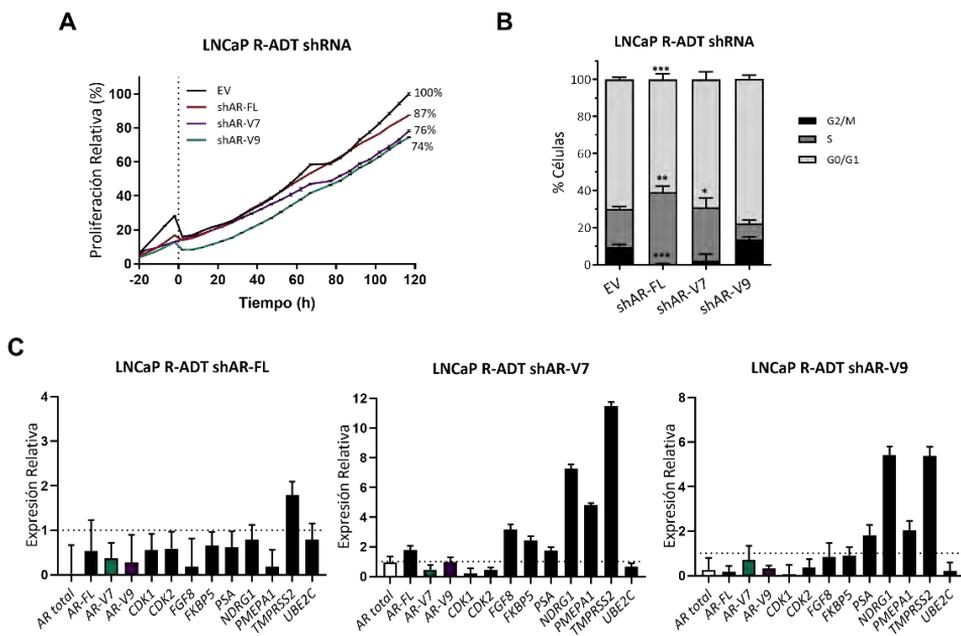


Figura 54. Análisis funcional de las líneas celulares LNCaP WT shRNA. (A) Análisis de la proliferación celular a tiempo real usando xCelligence. Los resultados mostrados han sido estandarizados considerando el valor final de las líneas EV el 100%. En la gráfica se muestra $n=4 \pm SD$. (B) Análisis de ciclo celular con IP. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo. $N=3 \pm SD$. En ambas secciones las diferencias significativas se muestran respecto a las líneas EV. (C) Cuantificación del AR, AR-V7, AR-V9 y algunos de sus genes diana. Los resultados mostrados están normalizados respecto al control endógeno (GAPDH) y en referencia a las células control (shEV). Las barras de error se corresponden a la SD calculada de las réplicas.

Por último, se analizaron las líneas celulares inducibles 22RV1 R-ADT. En las líneas celulares 22RV1 R-ADT shAR-FL y 22RV1 R-ADT shAR-V9, El silenciamiento parcial del *AR-FL* o *AR-V9* no afecta a la proliferación (98% y 97%, respectivamente), mientras que en la línea 22RV1 R-ADT shAR-V7 el silenciamiento parcial de la variante *AR-V7* disminuye ligeramente la tasa de proliferación (76%) (Figura 55A). En cuanto al análisis del ciclo celular, no se observan diferentes entre el perfil de ciclo de las líneas inducibles y la línea EV (Figura 55B).

RESULTADOS

En la línea 22RV1 R-ADT shAR-FL, la disminución de los niveles de *AR-FL* induce una disminución de los niveles de RNAm del *AR* total y la isoforma *AR-V7*, que va acompañado de una disminución en la expresión de algunos de los genes diana del *AR* como *FGF8*, *PMEPA1* o *TMPRSS2*. Por otro lado, el silenciamiento parcial del *AR-V7* en la línea 22RV1 R-ADT shAR-V7 induce un aumento de expresión en la mayoría de los genes diana del *AR*. Por último, en la línea 22RV1 R-ADT shAR-V9.2, el silenciamiento de la isoforma *AR-V9* induce una disminución de los niveles de RNAm tanto del *AR* total, *AR-FL* y la isoforma *AR-V7* como de la mayoría de los genes diana estudiados. Destacablemente, se observa un aumento de 9 veces del gen *FGF8* (Figura 55C).

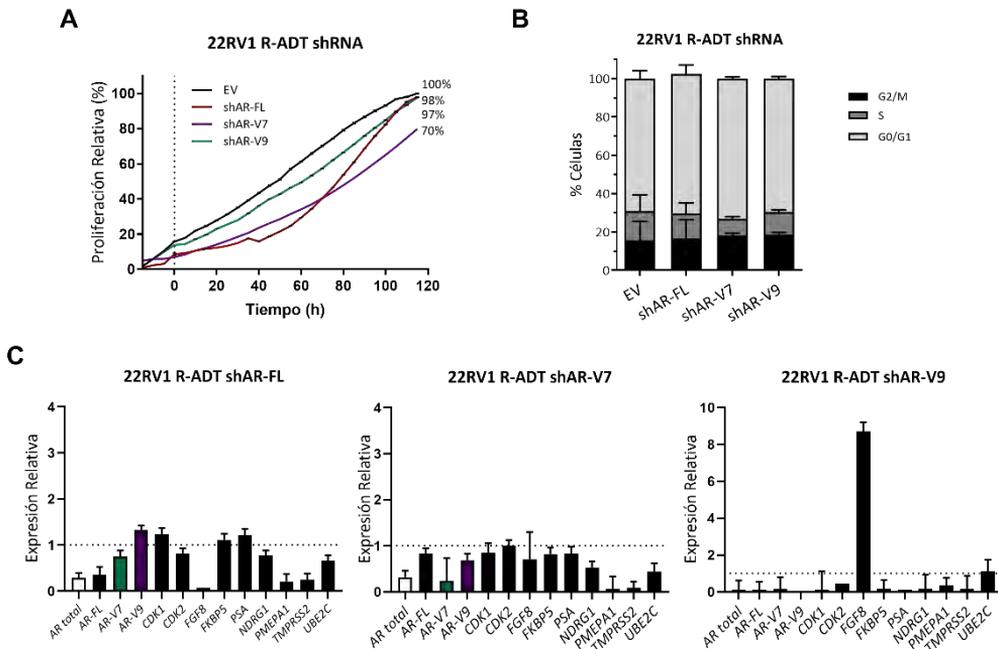


Figura 55. Análisis funcional de las líneas celulares LNCaP WT shRNA. (A) Análisis de la proliferación celular a tiempo real usando xCelligence. Los resultados mostrados han sido estandarizados considerando el valor final de las líneas EV el 100%. En la gráfica se muestra $n=4 \pm SD$. (B) Análisis de ciclo celular con IP. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo. $N=3 \pm SD$. En ambas secciones las diferencias significativas se muestran respecto a las líneas EV. (C) Cuantificación del AR, AR-V7, AR-V9 y algunos de sus genes diana. Los resultados mostrados están normalizados respecto al

RESULTADOS

Silenciamiento selectivo de las variantes *AR-FL*, *AR-V7* y *AR-V9* en modelos celulares de CaP control endógeno (*GAPDH*) y en referencia a las células control (*shEV*). Las barras de error se corresponden a la SD calculada de las réplicas.

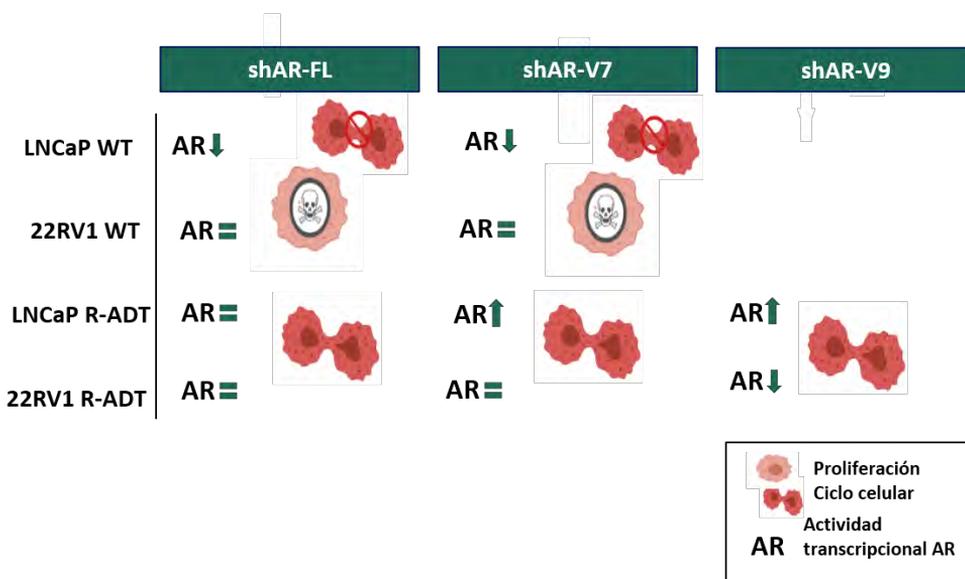


Figura 56. Silenciamiento selectivo de las variantes AR-FL, AR-V7 y AR-V9 en modelos celulares de CaP. Resumen de las características de las líneas celulares LNCaP y 22RV1 shRNAs generadas.

RESISTENCIA CRUZADA A LOS TRATAMIENTOS DE SEGUNDA LÍNEA APALUTAMIDA Y DOCETAXEL EN MODELOS CELULARES DE CRPC.

La aplicación en la clínica de los diferentes tratamientos disponibles para CaP se produce de manera secuencial. Tras el desarrollo de resistencia a la castración (CRPC), en los pacientes de CaP se suele administrar de forma individual un NHAs, habitualmente Enz o AA, como tratamiento de segunda línea. Sin embargo, en muchos de estos pacientes dicho tratamiento no es efectivo o acaban generando resistencia, pasándose a la administración de una tercera línea de tratamiento con el NHAs complementario o Apalutamida, o alternativamente a la administración de quimioterapia, habitualmente el taxano Docetaxel. Destacablemente, las sucesivas líneas de tratamiento suponen un importante problema clínico, ya que muchos pacientes pueden desencadenar resistencias cruzadas que reducen su eficacia e incrementan el riesgo de recaídas.

Por esta razón, quisimos evaluar la respuesta a los tratamientos de segunda línea de uso en la clínica en los modelos celulares de resistencia generados (R-ADT, R-ADT/Enz, R-ADT/AA y R-ADT/Enz+AA). Para ello tratamos las diferentes líneas celulares con el antiandrógeno Apalutamida (Apa), que tiene un mecanismo de acción similar a la Enzalutamida, o con el taxano Docetaxel, cuyo mecanismo de acción es totalmente independiente de la ruta de señalización del AR.

3.1. Respuesta a Apa como tratamiento de segunda línea en modelos celulares de CRPC

Para seleccionar una concentración estándar con la que se tratar todos los modelos celulares de resistencia se calculó la IC₅₀ de Apa para la línea silvestre más sensible de todas, las LNCaP. Para ello empleamos un ensayo de toxicidad a 5 días (MTT) utilizando un espectro amplio de concentraciones de Apa entre 0.5 y 0.00097 μM (Figura 57). De esta manera, y empleando el software GraphPad PrismTM pudimos calcular el valor de IC₅₀ de 0.130 μM . El resto de experimentos y análisis que realizamos a continuación fueron llevados a cabo tratando durante 5 días en las diferentes líneas celulares generadas.

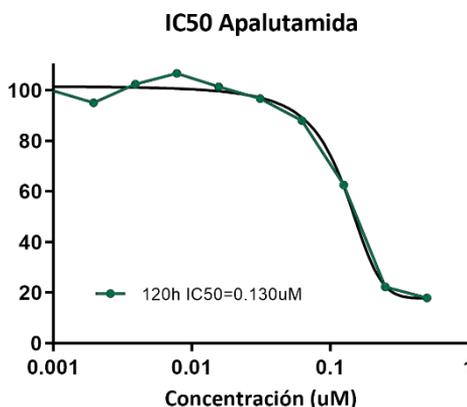


Figura 57. Ensayo de MTT para el cálculo de IC50. Cálculo de IC50 a 5 días para Apa en la línea LNCaP WT. En la gráfica aparece representado el porcentaje de células vivas para los diferentes rangos de concentración de fármaco. Los datos mostrados corresponden a la media calculada de los cuadruplicados para cada concentración de fármaco.

3.1.1. Análisis funcional de los modelos de CRPC en respuesta Apalutamida.

Para analizar el efecto de Apa en los modelos celulares de resistencia, se trataron las diferentes líneas celulares con 0.130 μ M durante 5 días.

Cuando se estudió el efecto de la exposición a Apa se observó que, en el caso de las LNCaP, todas las líneas celulares resistentes (LNCaP R-ADT, LNCaP R-ADT/E y LNCaP R-ADT/AA) presentaron una mayor tasa de proliferación que la línea LNCaP silvestre ($p < 0.001$). A pesar de presentar mayor tolerancia a Apa que la línea LNCaP WT, la sensibilidad a dicho tratamiento fue diferente en las distintas líneas celulares analizadas. En la línea LNCaP R-ADT se observó menor tasa de proliferación que en la línea sin tratar en presencia de Apa (60% vs. 100%). Destacablemente, en la línea resistente a Enz (LNCaP R-ADT/E), cuyo mecanismo de acción es similar a Apa, también se observó una disminución de la proliferación respecto a la línea sin tratamiento (59% vs. 100%). Mientras que en la línea LNCaP R-ADT/AA el tratamiento con Apa apenas disminuyó la tasa

de proliferación respecto a la misma línea sin tratamiento (90% vs. 100%) (Figura 58A).

Como otra medida de proliferación celular, se evaluó el tiempo de duplicación celular en las diferentes líneas celulares en presencia de Apa respecto a las líneas sin tratar durante tres pases celulares. Las células LNCaP WT, al igual que se observó a nivel de proliferación, muestran una sensibilidad inicial a Apa pero con los pases aumentan su tolerancia al tratamiento (tiempo de duplicación de 0.6; 0.84 y 0.99) (Figura 58B). En cuanto a los modelos de resistencia de la línea LNCaP, que presentaban resistencia cruzada a nivel de proliferación, en la línea LNCaP R-ADT se mantiene la tolerancia al tratamiento con los pases. Mientras que en las líneas LNCaP R-ADT/Enz y LNCaP R-ADT/AA se observan respuestas opuestas. En las células LNCaP R-ADT/Enz la tasa de proliferación aumenta a partir del segundo pase, en cambio en las LNCaP R-ADT/AA dicha tasa se reduce a partir del tercer pase indicando que se incrementa la sensibilidad a Apa con los pases (Figura 58B).

En cuanto al análisis de ciclo celular, demostró que tanto las LNCaP son inicialmente sensibles al tratamiento exclusivo con Apa. La exposición a Apa induce un arresto en G_0/G_1 ($p < 0.05$), además este va acompañado de una inducción de muerte celular detectada por la presencia de un pico Sub- G_0 ($p < 0.05$). Sorprendentemente la línea LNCaP R-ADT/AA, que presentaba tolerancia a Apa a nivel de proliferación, presenta una parada de ciclo celular en G_0/G_1 ($p < 0.01$) y una inducción de muerte celular (fase Sub G_0) al igual que la línea LNCaP WT. El resto de líneas celulares resistentes (LNCaP R-ADT, LNCaP R-ADT/Enz) presentan una distribución de ciclo celular inalterada en presencia de Apa (Figura 58C).

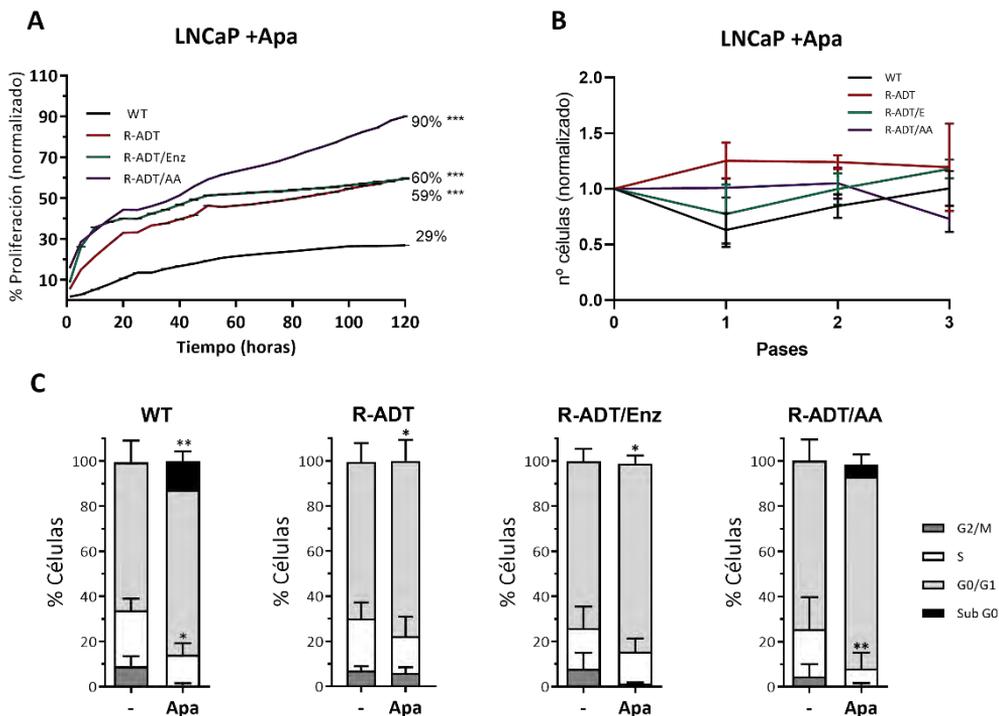


Figura 58. Análisis de la respuesta de los modelos de resistencia LNCaP al tratamiento con Apa. (A) Análisis de la proliferación celular a tiempo real usando xCelligence. Los resultados mostrados han sido estandarizados considerando el valor final de las líneas celulares control no tratadas el 100% (n=4 ±SD). (B) Tiempo de duplicación celular. Los datos mostrados han sido normalizados respecto a las líneas celulares silvestres sin tratamiento (n=3 ±SD). (C) Ciclo celular con IP. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular (n=6 ±SD).

Por otro lado, se analizó el efecto de la exposición a Apa en los modelos de resistencia de la línea celular 22RV1. El análisis de la proliferación celular en la línea 22RV1 R-ADT muestra la presencia de resistencia cruzada a Apa, esta línea celular es capaz de proliferar con normalidad en presencia de dicho tratamiento (114% vs. 100%, +/- Apa), además se observa aumento de la tolerancia a Apa respecto a la línea silvestre (114% vs. 50%) (p<0.001). Contrariamente a lo observado en las líneas LNCaP, los modelos concomitantes 22RV1 R-ADT/Enz, 22RV1 R-ADT/AA presentan una sensibilidad a Apa similar a la línea 22RV1 silvestre (54%, 52% vs. 50%). Por último, la línea resistente al tratamiento combinado con Enz y AA (LNCaP R-ADT/Enz+AA) mostró menor sensibilidad

a la exposición a Apa que la línea LNCaP WT (85 vs. 50%), aunque ambas curvas de proliferación no presentaron diferencias significativas (**Figura 59A**).

Por otro lado, en todas las líneas celulares 22RV1 que mostraban cierta sensibilidad a Apa (22RV1 WT, 22RV1 R-ADT/Enz y 22RV1 R-ADT/AA) se observa un aumento de la sensibilidad a este tratamiento con los sucesivos pases. Este efecto fue especialmente destacable en la línea 22RV1 R-ADT/Enz donde los tiempos de duplicación respecto a la línea sin tratar fueron de 1.44, 0.74 y 0.67 respectivamente (**Figura 59B**). Contrariamente, la línea 22RV1 R-ADT mostró valores similares a la línea sin tratar en el tiempo de duplicación en los tres pases analizados: 0.67; 1.00 y 0.89 respectivamente, sugiriendo que son relativamente resistentes a la presencia continuada de este NHA al que no han estado expuestas previamente (**Figura 59B**).

En cuanto al análisis de ciclo celular, las 22RV1 WT se mostraron inicialmente sensibles al tratamiento exclusivo con Apa. En esta línea celular se observó un arresto en G_0/G_1 ($p < 0.01$). El resto de líneas celulares (22RV1 R-ADT, 22RV1 R-ADT/E, 22RV1 R-ADT/AA y 22RV1 R-ADT/E+AA), que muestran resistencia cruzada, presentan una distribución de ciclo celular inalterada en presencia de Apa (**Figura 59C**).

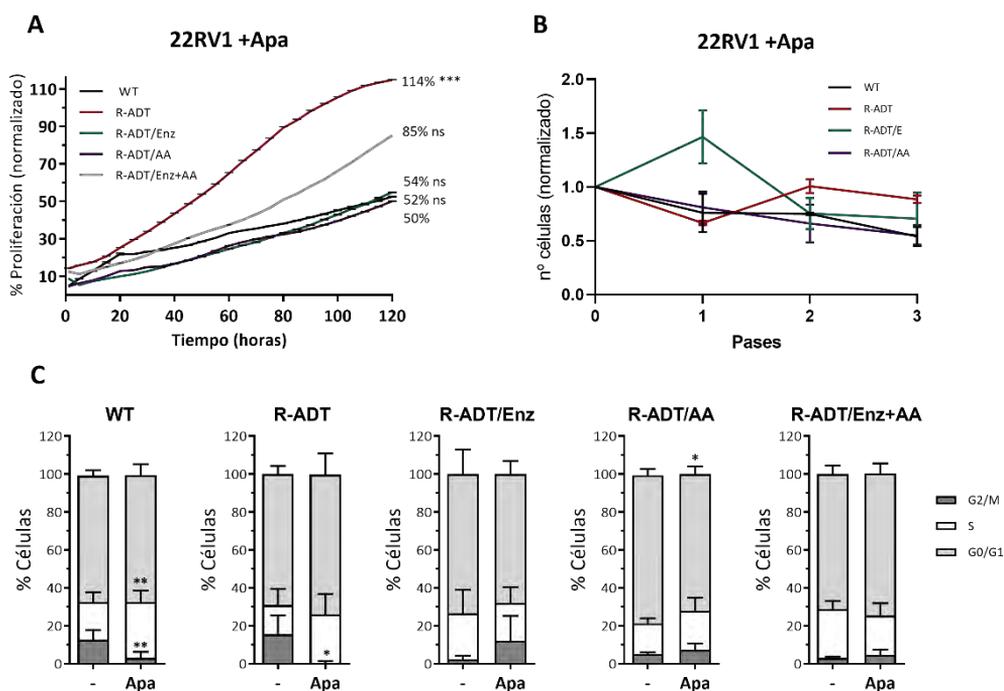


Figura 59. Análisis de la respuesta de los modelos celulares de resistencia 22RV1 al tratamiento con Apa. (A) Análisis de la proliferación celular a tiempo real usando xCelligence. Los resultados mostrados han sido estandarizados considerando el valor final de las líneas celulares control no tratadas el 100% (n=4 ±SD). (B) Tiempo de duplicación celular. Los datos mostrados han sido normalizados respecto a las líneas celulares silvestres sin tratamiento (n=3 ±SD). (C) Ciclo celular con IP. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular (n=6 ±SD).

Por último, se analizó la capacidad de formación de colonias de las diferentes líneas celulares en presencia de Apa en relación a las líneas sin tratamiento, considerándose colonias a partir de unas 100 células. La línea LNCaP WT tratada con Apa no fue capaz de formar colonias (Figura 60). En el caso de la línea LNCaP R-ADT se observó una tendencia a un mayor número de colonias y además el área de ocupación de estas fue mayor (Figura 60). En cuanto a los modelos de resistencia a ADT y los tratamientos de segunda línea (LNCaP R-ADT/Enz y LNCaP R-ADT/AA) tratadas con Apa mostraron el efecto opuesto, un menor número de colonias (Figura 60A) y una menor área de ocupación,

siendo de un 56% ($p < 0.001$) para la línea LNCaP R-ADT/Enz y 70% para la línea LNCaP R-ADT/AA respecto a las líneas sin tratamiento (Figura 60B).

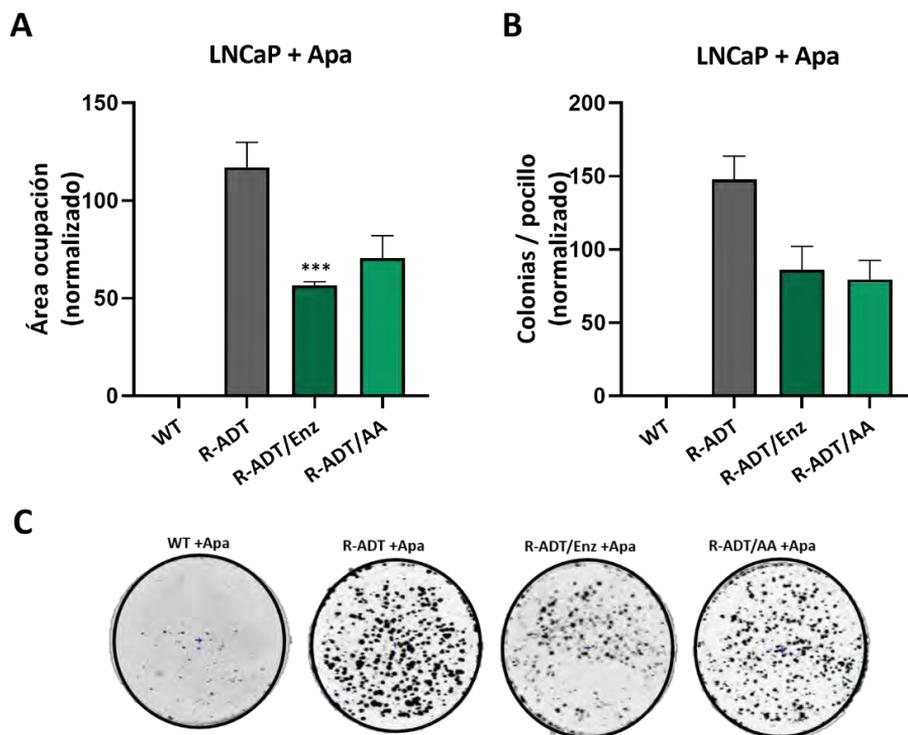


Figura 60. Ensayos de clonogenicidad en modelos de CRPC LNCaP presencia de Apa. (A) Área de ocupación de las colonias en los modelos celulares LNCaP en presencia de Apa. Los histogramas representan el % de ocupación normalizado a su respectiva línea sin tratar ($n=3 \pm SD$). (B) Número de colonias por pocillo. Los datos mostrados en los histogramas están normalizados respecto a las líneas sin tratar. En ambas secciones las diferencias significativas se muestran respecto a las líneas celulares sin tratamiento. (C) Imágenes representativas de las colonias generadas en las distintas líneas celulares.

De igual modo se analizaron los modelos de resistencia de las líneas 22RV1. En la línea 22RV1 WT tratada con Apa no se observaron diferencias ni en el número de colonias ni en el área de ocupación respecto a la línea sin tratar. Las células 22RV1 R-ADT en presencia de Apa mostraron un número de colonias similar a la línea sin tratar, sin embargo, el área de ocupación de estas fue del doble. En el caso de las líneas 22RV1 R-ADT/E y 22RV1 R-ADT/AA en presencia de Apa,

no mostraron diferencias significativas en su capacidad clonogénica con las líneas sin tratar ni en el número de colonias, ni en el área de ocupación de las mismas. Por último, en la línea 22RV1 R-ADT/E+AA se observó una tendencia a un mayor número de colonias (155% vs. 100%) pero éstas mostraron una menor área de ocupación (39%, $p < 0.001$) que las células sin tratar (Figura 61).

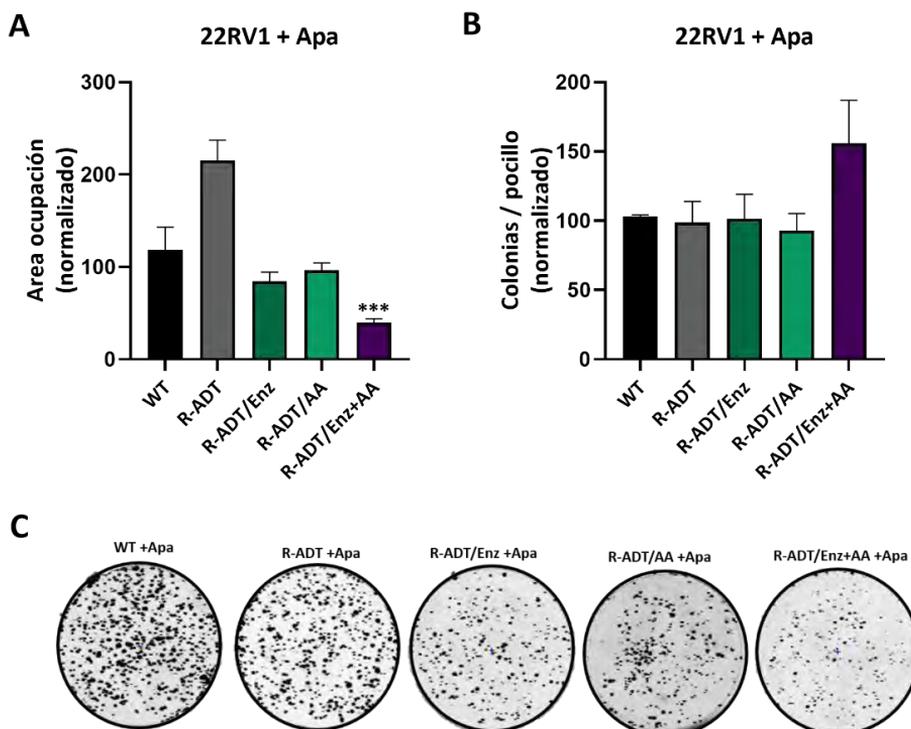


Figura 61. Ensayos de clonogenicidad en modelos de CRPC 22RV1 presencia de Apa. (A) Área de ocupación de las colonias en los modelos celulares 22RV1 en presencia de Apa. Los histogramas representan el % de ocupación normalizado a su respectiva línea sin tratar ($n=3 \pm SD$). (B) Número de colonias por pocillo. Los datos mostrados en los histogramas están normalizados respecto a las líneas sin tratar. En ambas secciones las diferencias significativas se muestran respecto a las líneas celulares sin tratamiento. (C) Imágenes representativas de las colonias generadas en las distintas líneas celulares.

3.1.2. Análisis de expresión génica de la respuesta de los modelos de CRPC a Apalutamida.

A continuación, se quisieron estudiar los cambios en la expresión génica que se producían en las diferentes líneas celulares al ser tratadas con Apa.

Primero se evaluó si la presencia de resistencia cruzada estaba relacionada con la reactivación transcripcional del AR. Para ello, se analizó la expresión génica del AR y sus isoformas *AR-V7* y *AR-V9* en los modelos de resistencia en respuesta a Apa. En ambas líneas control (LNCaP WT y 22RV1 WT), que mostraron sensibilidad al tratamiento con Apa a nivel proliferativo, este fármaco induce un aumento en los niveles de ARNm del AR total y AR FL, mientras que las isoformas *AR-V7* y *AR-V9* no se expresan (**Figura 62**).

En cuanto a los modelos de CRPC, tanto en la línea LNCaP R-ADT como la línea LNCaP R-ADT/Enz no se expresa a nivel de ARNm ni el AR ni sus variantes. Contrariamente, la línea LNCaP R-ADT/AA presenta un aumento en la expresión de AR total, AR FL y *AR-V9*, mientras que la variante *AR-V7* no se expresa (**Figura 62**).

En el caso de las líneas resistentes 22RV1, las células 22RV1 R-ADT no presentan diferencias de expresión significativas en el AR total y *AR-FL* respecto a la línea sin tratar. En las células 22RV1 R-ADT/E se observa una disminución de ARNm en *AR total* y un incremento drástico en el *AR-FL*. Tanto en las células 22RV1 R-ADT/AA como las resistentes al doble tratamiento 22RV1 R-ADT/E+AA la exposición a Apa produjo un incremento del *AR total*, especialmente en el caso de la línea 22RV1 R-ADT/E. Además, en todos los modelos de resistencia el tratamiento con Apa produjo una disminución en la expresión de las dos isoformas estudiadas, *AR-V7* y *AR-V9* (**Figura 62**).

Estos datos sugieren una reactivación transcripcional del AR en las líneas sensibles al tratamiento con Apa (LNCaP WT, 22RV1 WT, 22RV1 R-ADT/E y 22RV1 R-ADT/AA), aunque ésta es independiente de ambas variantes estudiadas (*AR-V7* y *AR-V9*). Mientras que en el caso de las líneas que presentaban resistencia cruzada a Apa, no presentan un patrón similar en la expresión del AR aunque sí se observa en todas ellas una represión a nivel de

ARNm de las variantes *AR-V7* y *AR-V9*, lo que sugiere que la resistencia cruzada podría ser independiente de dichas variantes.

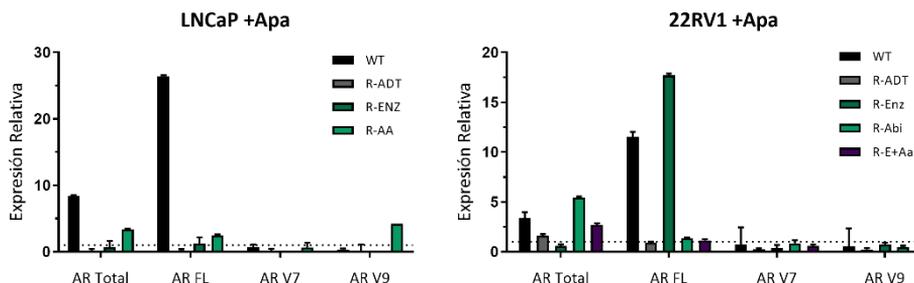


Figura 62. Cuantificación del AR total, *AR-V7* y *AR-V9* en respuesta a Apa en los modelos celulares de CRPC. Análisis de expresión mediante qPCR para las variantes del AR en las líneas LNCaP (panel izquierdo) y 22RV1 (panel derecho). Los datos mostrados están normalizados respecto al control endógeno (*GAPDH*) y relativizadas a las células sin tratar ($n=3 \pm SD$).

Por otro lado, se cuantificó la expresión de genes de EMT (*ITGA2*, *SMAD1*, *SLUG*, *SNAIL*, *VIMENTINA* y *E-CADHERINA/CDH1*), CSC (*NANOG*, *OCT3/4*, *REX1*, *SOX2*, *CD44* y *CD38*) o fenotipo NE (*CHGA2*, *FOXA2*, *Ki67*, *CD56*, *NSE* y *SYP*) en respuesta a Apa en los diferentes modelos de CRPC, así como en las líneas control.

En primer lugar, se cuantificó la expresión de los marcadores de los diferentes fenotipos en las líneas silvestres. El tratamiento con Apa en líneas LNCaP WT indujo un aumento en la expresión de la mayoría de genes analizados relacionados con un fenotipo de CSC, destacablemente *NANOG*, *REX1*, *SOX2*; EMT, donde la expresión de *VIMENTINA* se incrementó 30 veces y NE, donde se vio un aumento en la expresión de *FOXA2*, *Ki67*, *CD56* (**Figura 63A**). En las células 22RV1 WT tratadas con Apa también se observó un aumento en la expresión de los marcadores de CSC, EMT y NE, aunque en menor medida. En esta línea celular cabe destacar el aumento de expresión del marcador de CSC *SOX2*, el marcador de EMT *SLUG* y los marcadores de NE *CHGA2* y *FOXA2* (**Figura 63B**).

Tras los resultados obtenidos en las líneas silvestres, quisimos analizar el efecto conjunto que tenía la exposición a Apa en la inducción de los diferentes fenotipos (CSC, EMT y NE). Para ello se cuantificó la expresión del panel de marcadores utilizado y se calculó la media del valor de todos ellos para cada fenotipo, representándose como *score*. En la figura 63C se observa que en la línea LNCaP WT, que era la que mayor sensibilidad a Apa mostraba, se induce un incremento significativo en el *score* para los genes de CSC ($p < 0.01$) y EMT ($p < 0.05$) y una tendencia a NE ($p = ns$). Este efecto también se observa en la línea 22RV1 WT, aunque en menor medida (CSC $p < 0.01$; EMT y NE $p = ns$) (Figura 63D).

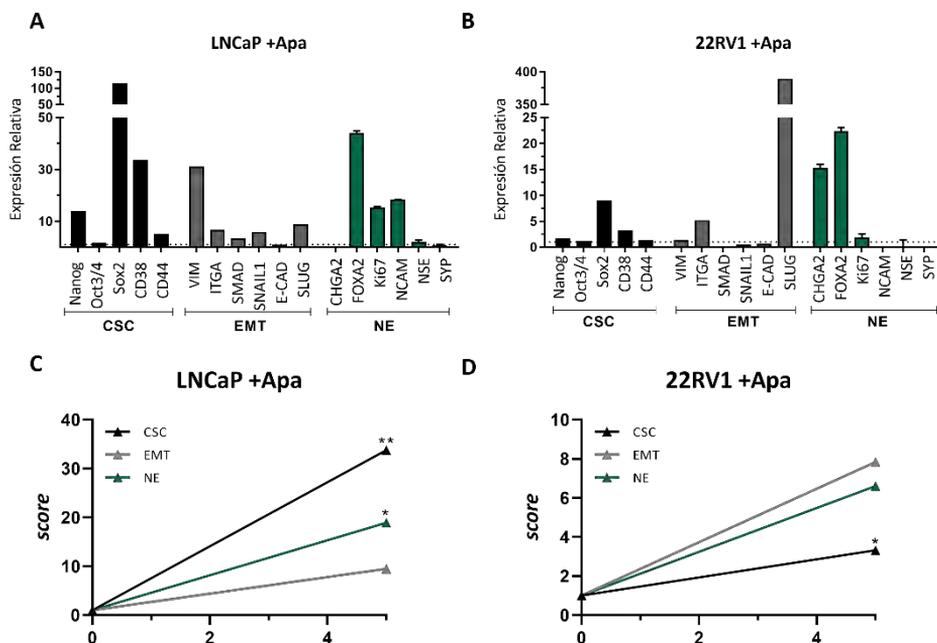


Figura 63. Cuantificación de marcadores de CSC, EMT y NE en líneas celulares LNCaP y 22RV1 tratadas con Apa. Análisis de expresión mediante qPCR en las líneas LNCaP (A) y 22RV1 (B) tras 5 días de exposición a Apa. Los datos mostrados están normalizados respecto al control endógeno (*GAPDH*) y relativizadas a las células sin tratar ($n=3 \pm SD$).

Del mismo modo, se realizó el *score* en los modelos de resistencia (Figura 64). Contrariamente a lo observado en las líneas silvestres, en las líneas R-ADT, que presentaban resistencia cruzada a nivel de proliferación, el tratamiento con Apa

produce una del *score* para CSC y EMT ($p < 0.05$ y $p < 0.05$, respectivamente). Además, en el caso de la línea LNCaP R-ADT se observa que el tratamiento con Apa induce un aumento del *score* para NE ($p < 0.01$) (**Figura 64**).

En el caso de los modelos concomitantes de resistencia, la exposición a Apa induce un incremento del *score* para EMT en las líneas LNCaP R-ADT/AA, 22RV1 R-ADT/E, 22RV1 R-ADT/AA y 22RV1 R-ADT/E+AA ($p < 0.05$), mientras que en la línea LNCaP R-ADT/E se observa una disminución ($p < 0.01$) (**Figura 64B**). Además, el tratamiento con Apa solo produce un aumento del *score* respecto a la línea control sin tratar en los genes de CSC en la línea LNCaP R-ADT/AA (**Figura 64A**). En cuanto a los genes relacionados con un fenotipo neuroendocrino no se observan diferencias significativas de *score* respecto a las líneas sin tratar (**Figura 64C**).

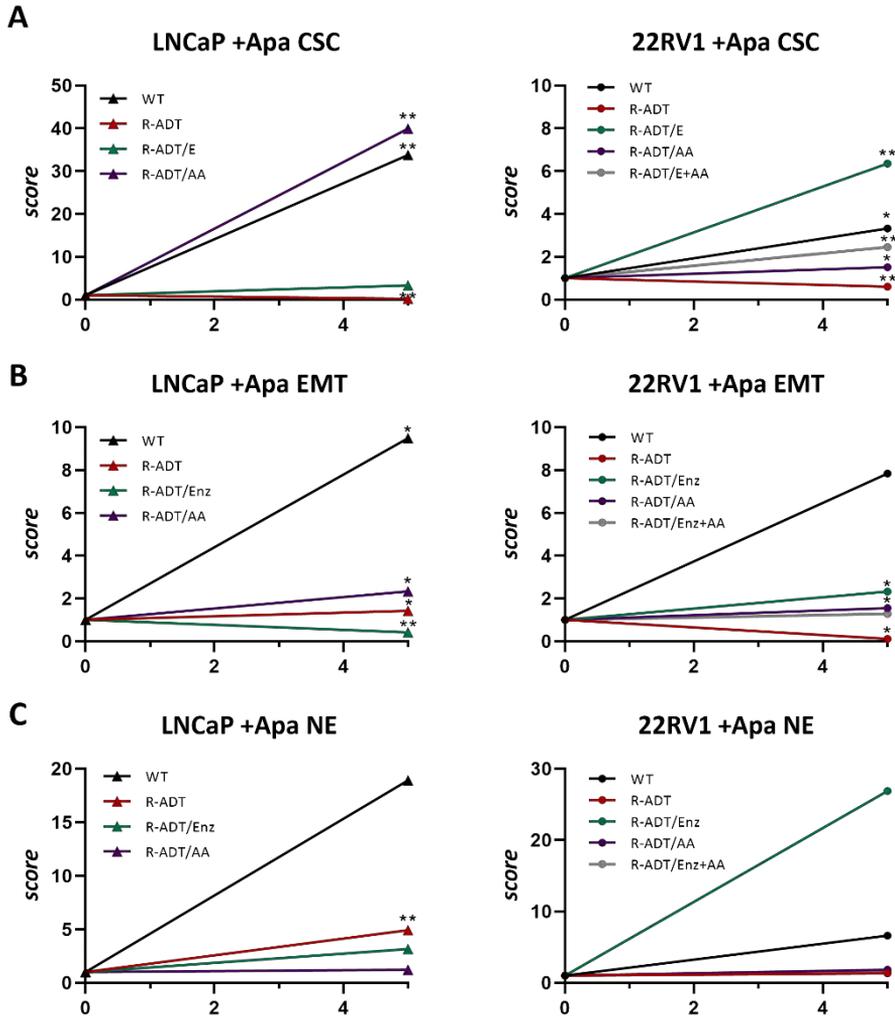


Figura 64. Análisis de marcadores de CSC, EMT y NE en respuesta a Apalutamida. Cuantificación por qPCR tras tratamiento con Apa en los modelos celulares de CRPC. Los puntos de la gráfica representan la expresión media de los genes estudiados para CSC (*NANOG*, *OCT3/4*, *REX1*, *SOX2*, *CD44* y *CD38*), EMT (*ITGA2*, *SMAD1*, *SLUG*, *SNAIL*, *VIMENTINA* y *E-CADHERINA/CDH1*) y NE (*CHGA2*, *FOXA2*, *Ki67*, *CD561*, *NSE* y *SYP*). Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (*GAPDH*) y referenciados a las líneas celulares silvestres ($n=3 \pm SD$).

3.2. Resistencia cruzada a Dctx en modelos celulares de CRPC.

Para seleccionar la concentración con la que se tratar todos los modelos celulares de resistencia se calculó la IC₅₀ de Dctx para las dos líneas celulares silvestres, LNCaP y 22RV1. Para ello empleamos un ensayo de toxicidad a 5 días (MTT) utilizando un espectro amplio de concentraciones de Dctx entre 100 y 0.19 nM (Figura 63). De esta manera, mediante el software GraphPad Prism™ se calculó el valor de IC₅₀ de 0.38 nM para la línea LNCaP WT y 1,14 nM para la línea 22RV1 WT (Figura 65). Para utilizar una concentración estándar de Dctx se seleccionó la IC₅₀ de las células 22RV1 WT, que fueron las menos sensibles. Por tanto, el resto de experimentos fueron llevados a cabo tratando durante 5 días en las diferentes líneas celulares con 1.14 nM de Dctx.

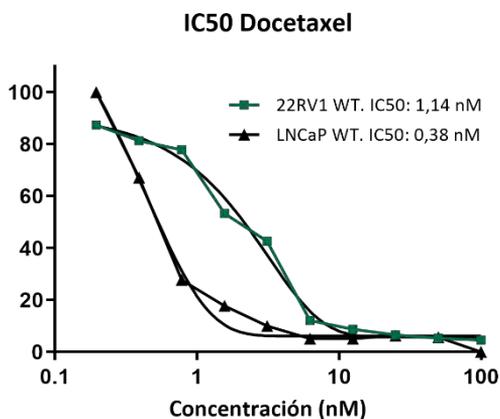


Figura 65. Ensayo de MTT para el cálculo de IC₅₀. Cálculo de IC₅₀ a 5 días para Dctx en las líneas celulares LNCaP WT y 22RV1 WT. En la gráfica aparece representado el porcentaje de células vivas para los diferentes rangos de concentración de fármaco. Los datos mostrados corresponden a la media calculada de los cuadruplicados para cada concentración de fármaco.

3.2.1. Análisis funcionales de la respuesta de los modelos de CRPC a Dctx.

Para analizar el efecto de Dctx en los modelos celulares de resistencia, se trataron las diferentes líneas celulares con 1.14 nM durante 5 días. En primer lugar, se analizó la proliferación a tiempo real de los diferentes modelos celulares de la línea LNCaP. Como era de esperar, la línea celular silvestre LNCaP WT presenta una alta sensibilidad al tratamiento con Dctx, que se vio reflejada por una disminución en su tasa de proliferación (24% vs. 100%, +/- Dctx). Por el contrario, la línea celular resistente a la deprivación androgénica LNCaP R-ADT, a pesar de que el mecanismo de acción de Dctx es independiente del receptor de andrógenos, es capaz de proliferar con normalidad en presencia de Dctx (100% vs. 100%, +/- Dctx) y muestra, por tanto, menor sensibilidad a este tratamiento que la línea silvestre ($p < 0.001$). En las células LNCaP R-ADT/E, también se observó, aunque en menor media, una mayor tolerancia a Dctx que la línea control (65% vs. 100, +/- Dctx) ($p < 0.01$, respecto a LNCaP WT). Por último, la línea LNCaP R-ADT/AA presentó una sensibilidad al tratamiento con Dctx similar a la línea silvestre (27% vs. 24%) (**Figura 66A**).

También se analizó el tiempo de duplicación de los diferentes modelos de resistencia en presencia de Dctx respecto a las mismas sin tratamiento a lo largo de los pases. En todas las líneas LNCaP analizadas (WT, R-ADT, R-ADT/E y R-ADT/AA) se observa que aumenta la sensibilidad a Dctx con el tiempo de exposición al tratamiento y los pases (**Figura 66B**). Además, destacablemente la línea LNCaP R-ADT muestra un tiempo de duplicación similar a la línea sin tratar en el primer pase (0.96 vs. 1, respectivamente), que va aumentando con la exposición continuada a Dctx en los pases dos (0.28) y tres (0.16) respecto al tiempo 0 (**Figura 66B**).

En relación al ciclo celular en presencia de Dctx, todos los modelos celulares LNCaP (WT, R-ADT, R-ADT/E y R-ADT/AA) presentaron un arresto de ciclo celular en fase G0/G1. Además, este arresto se vio acompañado de muerte celular (Sub G0) en el caso de las líneas LNCaP WT, LNCaP R-ADT/E y LNCaP R-ADT/AA ($p < 0.001$) (**Figura 66C**). Estos resultados concuerdan con los observados a nivel de proliferación, donde solo las líneas resistentes a

deprivación androgénica (R-ADT) presentaron una mayor tolerancia al tratamiento con Dctx.

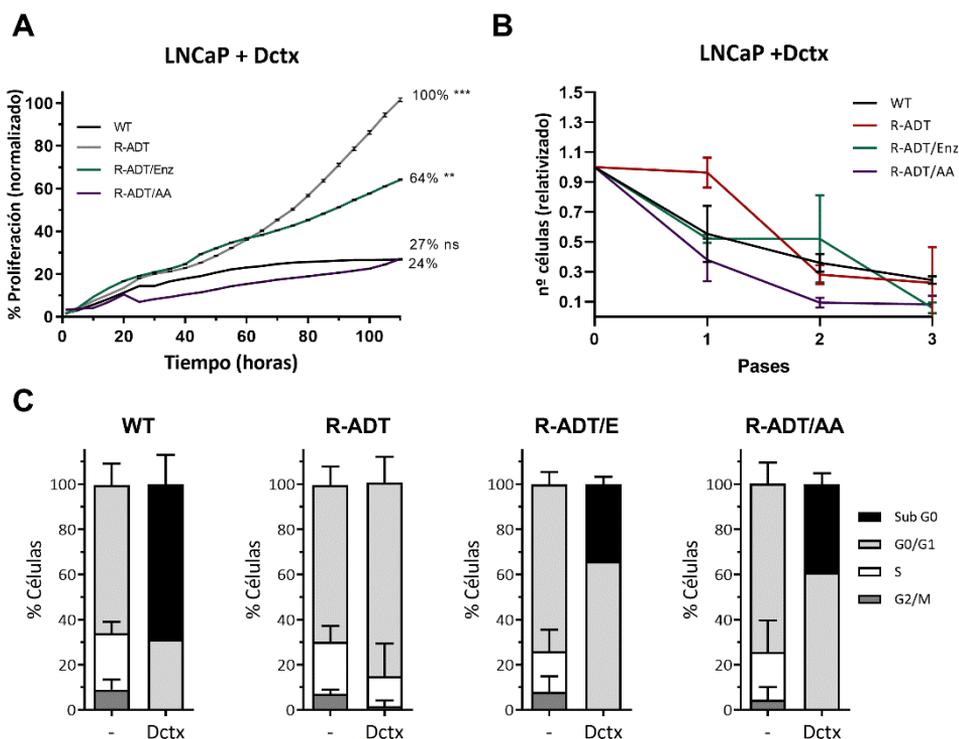


Figura 66. Análisis de la respuesta de los modelos celulares de resistencia LNCaP al tratamiento con Dctx. (A) Análisis de la proliferación celular a tiempo real usando xCelligence. Los resultados mostrados han sido estandarizados considerando el valor final de las líneas control el 100%. En la gráfica se muestra n=4 ±SD. (B) Tiempo de duplicación celular. Los datos mostrados han sido normalizados respecto a las líneas sin tratamiento (n=3 ±SD). (C) Análisis del ciclo celular con IP. Ciclo celular con IP. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular (n=6 ±SD).

De igual modo, se trataron los diferentes modelos de CRPC de la línea 22RV1 con 1.14 nM de Dctx durante 5 días y se analizó la proliferación a tiempo real. En primer lugar, se confirmó la sensibilidad de la línea celular 22RV1 WT al tratamiento con Dctx (100% vs. 55%, +/- Dctx). Además, al igual que se observaba en la línea LNCaP R-ADT, las células 22RV1 R-ADT fueron capaces de proliferar con normalidad en presencia de Dctx (92% vs. 100%, +/- Dctx) y

RESULTADOS

presentaron una tasa de proliferación significativamente mayor que la línea control en presencia de Dctx ($p < 0.001$). Por el contrario, las líneas 22RV1 R-ADT/Enz y 22RV1 R-ADT/Enz+AA mostraron una sensibilidad a Dctx similar a la línea silvestre (44% y 50% vs. 55%, respectivamente) (Figura 67A). Por último, en la línea celular 22RV1 R-ADT/AA se observó mayor tolerancia al tratamiento con Dctx que en la línea silvestre (78% vs. 55%), aunque no se observaron diferencias significativas en la curva de proliferación.

También se analizó el tiempo de duplicación de los diferentes modelos de resistencia en presencia de Dctx respecto a las mismas sin tratamiento a lo largo de los pases. Al igual que ocurría con las líneas LNCaP, en todos los modelos de la línea 22RV1 analizados (WT, R-ADT, R-ADT/E y R-ADT/AA) se observa que aumenta la sensibilidad a Dctx con el tiempo de exposición al tratamiento y los pases (Figura 67B).

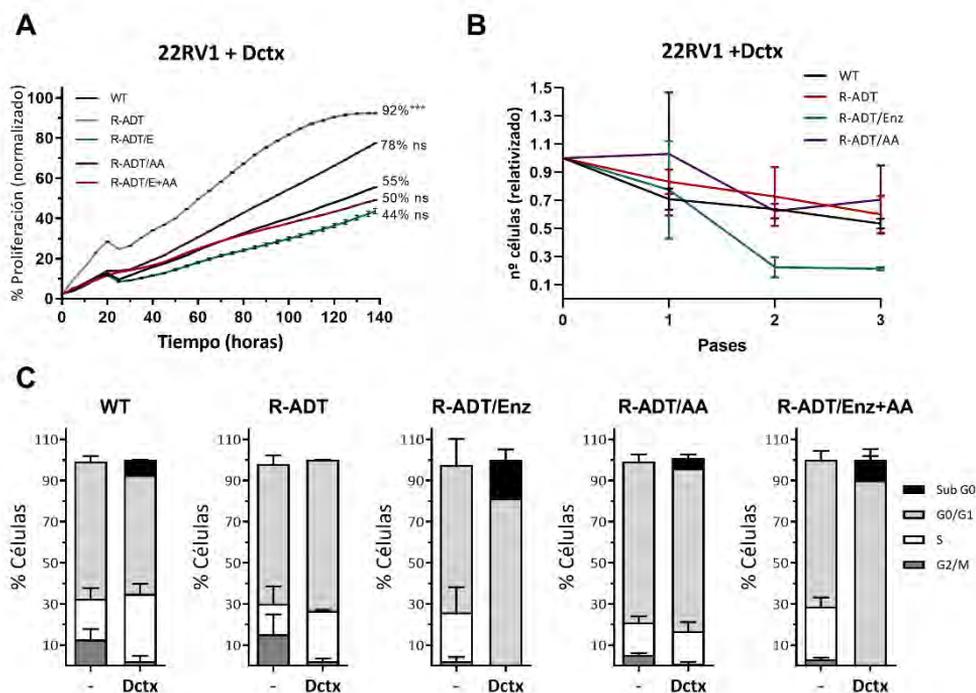


Figura 67. Análisis de la respuesta de los modelos celulares de resistencia 22RV1 al tratamiento con Dctx. (A) Análisis de la proliferación celular a tiempo real usando xCelligence. Los resultados mostrados han sido estandarizados considerando el valor final

RESULTADOS

Resistencia cruzada a Apalutamida y Docetaxel en los modelos celulares de CRPC

de las líneas control el 100%. En la gráfica se muestra $n=4 \pm SD$. (B) Tiempo de duplicación celular. Los datos mostrados han sido normalizados respecto a las líneas sin tratamiento ($n=3 \pm SD$). (C) Análisis del ciclo celular con IP. Ciclo celular con IP. Las gráficas de barras muestran el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular ($n=6 \pm SD$).

En relación al ciclo celular en presencia de Dctx, todas las líneas celulares estudiadas (22RV1 WT, R-ADT, R-ADT/E, R-ADT/AA y R-ADT/E+AA) presentaron un arresto de ciclo celular en fase G0/G1. Además, este arresto se vio acompañado de muerte celular (Sub G0) en las líneas 22RV1 R-ADT/E ($p<0.05$), y 22RV1 R-ADT/E+AA ($p<0.05$) (**Figura 67C**). Estos resultados concuerdan con los observados a nivel de proliferación, donde solo las líneas resistentes a deprivación androgénica (R-ADT) presentaron resistencia cruzada al tratamiento con Dctx.

Por último, se analizó la clonogenicidad de las diferentes líneas celulares tratadas con Dctx. Ninguna de las líneas celulares analizadas fue capaz de formar colonias en presencia de Dctx (**Figura 68**).

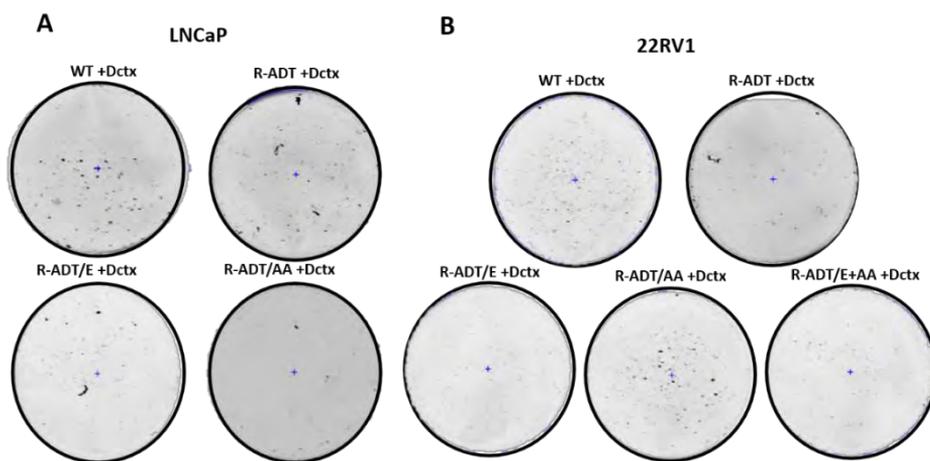


Figura 68. Ensayos de clonogenicidad en modelos de resistencia en presencia de Dctx. Imágenes representativas de las colonias generadas en las líneas celulares LNCaP (A) y 22RV1 (B).

3.2.2. Análisis de expresión génica de la respuesta de los modelos de CRPC a Docetaxel.

A continuación, se quisieron estudiar los cambios en la expresión génica que se producían en las diferentes líneas celulares al ser tratadas con Dctx.

En la línea LNCaP *wild-type* en presencia de Dctx se observa un aumento de cuarenta veces en la expresión del *AR FL*, mientras que no se observan diferencias de expresión en el *AR* total, *AR-V7* y *AR-V9*. De manera opuesta, en las células LNCaP R-ADT se produce una sobreexpresión del *AR* total y no hay diferencias de expresión en el *AR FL* o en las variantes de splicing *AR-V7* o *AR-V9*. Las células LNCaP R-ADT/E presentan una sobreexpresión tanto del *AR* total como del *AR FL* y las LNCaP R-ADT/AA solo presentan un aumento a nivel de ARNm en el *AR* total. Además, en ambas líneas el tratamiento con Dctx produce una represión en la isoformas *AR-V7* y *AR-V9* (Figura 69).

En relación a las 22RV1, en la línea 22RV1 silvestre se observa un aumento de expresión del *AR* total de 50 veces y también aumenta la expresión de la isoforma *AR-V9*, mientras que hay una disminución en el *AR-FL* y no se observan cambios de expresión en *AR-V7* respecto a la línea sin tratar. Al igual que ocurría con la línea LNCaP R-ADT, hay un aumento en la expresión del *AR* total en las células 22RV1 R-ADT, aunque en este caso la expresión del *AR-FL* y las isoformas *AR-V7* y *AR-V9* se encuentran disminuidas. En la línea celular 22RV1 R-ADT/E se observa una disminución a nivel de ARNm del *AR-FL*, *AR* total, *AR-V7* y *AR-V9*. Mientras que en las células 22RV1 R-ADT/AA se observa un aumento en la expresión del *AR-FL*, el *AR* total se mantiene y hay una disminución en la expresión de las variantes *AR-V7* y *AR-V9*. Por último, la línea resistente al tratamiento doble (22RV1 R-ADT/E+AA) presenta un aumento en la expresión del *AR* total y una disminución del resto de genes (*AR-FL*, *AR-V7* y *AR-V9*) (Figura 69).

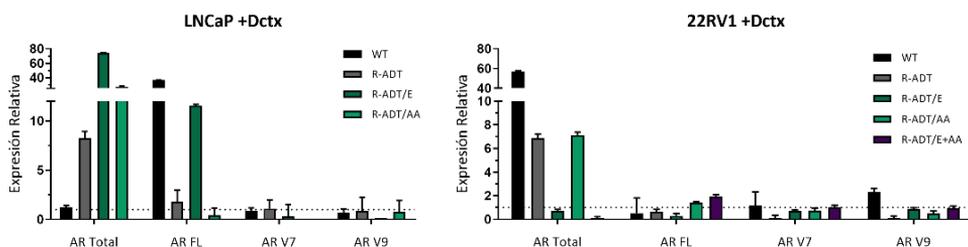


Figura 69. Cuantificación del AR, AR-V7 y AR-V9 en respuesta a Dctx (Docetaxel) en los modelos de CRPC. Análisis de expresión mediante qPCR para las variantes del AR en las líneas LNCaP (panel izquierdo) y 22RV1 (panel derecho). Los datos mostrados están normalizados respecto al control endógeno (*GAPDH*) y relativizadas a las células sin tratar ($n=3 \pm SD$).

Para analizar si la exposición a Dctx producía cambios en el perfil de expresión de genes reguladores de EMT (*ITGA2*, *SMAD1*, *SLUG*, *SNAIL*, *VIMENTINA* y *E-CADHERINA/CDH1*), CSC (*NANOG*, *OCT3/4*, *REX1*, *SOX2*, *CD44* y *CD38*) o fenotipo NE (*CHGA2*, *FOXA2*, *Ki67*, *CD561*, *NSE* y *SYP*) se analizó los niveles de expresión en los diferentes modelos de CRPC, así como en las líneas celulares control.

En primer lugar, se realizó la cuantificación en las líneas silvestres. El tratamiento de las células LNCaP y 22RV1 WT con Dctx indujo un aumento en la expresión de casi todos los marcadores de CSC estudiados, mientras que en los marcadores estudiados para EMT no se observó ningún efecto en los niveles de RNAm de la mayoría de genes estudiados. Destacablemente, en el caso de NE se observó un gran aumento de *FOXA2* en las células LNCaP WT y *FOXA2* y *CHGA2* en las células 22RV1 WT, pero no del resto de marcadores estudiados (Figura 70A-B).

Tras los resultados obtenidos en las líneas silvestres, para analizar posibles patrones de expresión de los diferentes fenotipos (CSC, EMT y NE) inducidos por Dctx, se cuantificó la expresión del panel de marcadores utilizado para cada fenotipo y se calculó la media de sus valores para cada fenotipo, representándose como score.

En la línea LNCaP silvestre, que mostró la mayor sensibilidad a nivel de tasa de proliferación y ciclo celular a Dctx, la exposición a este fármaco induce un aumento a nivel de expresión del score para CSC ($p < 0.01$). Por el contrario, no se observan diferencias significativas respecto a la línea sin tratar en EMT y NE (Figura 70C). El tratamiento de la línea 22RV1 silvestre con Dctx indujo un aumento del score para CSC y para EMT ($p < 0.01$), mientras no produjo cambios en NE (Figura 70D).

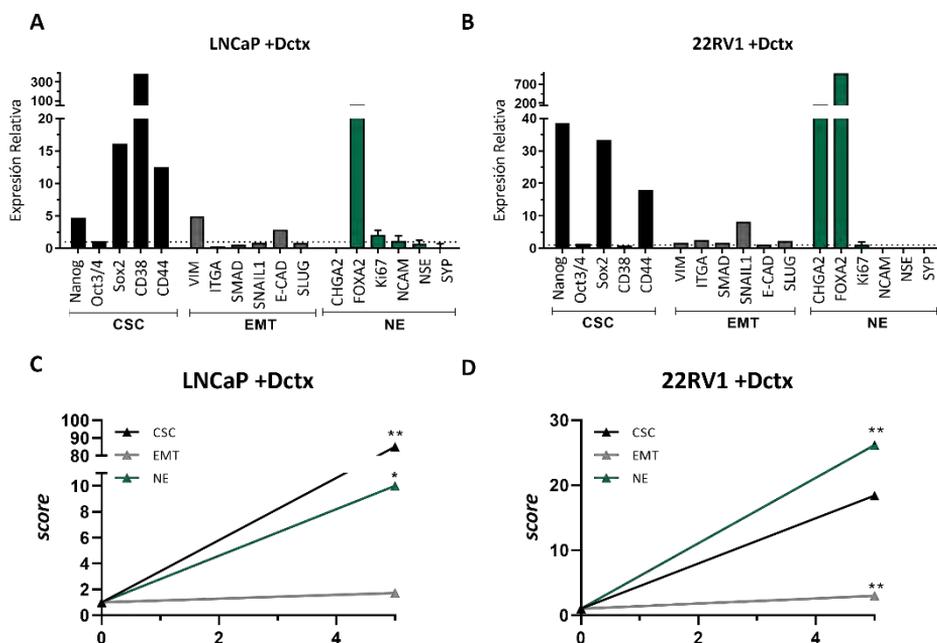


Figura 70. Cuantificación de marcadores de CSC, EMT y NE en líneas celulares LNCaP y 22RV1 tratadas con Dctx. Análisis de expresión mediante qPCR en las líneas LNCaP (A-C) y 22RV1 (B-D) tras 5 días de exposición a Dctx. Los datos mostrados están normalizados respecto al control endógeno (*GAPDH*) y relativizadas a las células sin tratar ($n = 3 \pm SD$).

Del mismo modo, se realizó el análisis de score en el resto de modelos celulares. En cuanto a las células resistentes a ADT (LNCaP R-ADT), que presentaron resistencia cruzada a Dctx, solo se observaron cambios significativos en el score de CSC, donde se observó un incremento generalizado ($p < 0.05$) (Figura 71A), mientras que el score para EMT y NE no se vio modificada (Figura 71B-C).

En el caso de los modelos de resistencia concomitantes; en las células LNCaP R-ADT/E el tratamiento con Dctx indujo una sobreexpresión en el score para CSC y fenotipo EMT ($p < 0.001$) (Figura 71A-B). Por el contrario, no presentó ningún patrón en el caso de NE (Figura 71C). Por último, en la línea LNCaP R-ADT/AA se observó un incremento generalizado en el score de CSC ($p < 0.05$) y una disminución para NE ($p < 0.05$), mientras que en el caso de EMT no se observaron diferencias significativas a nivel de expresión (Figura 71).

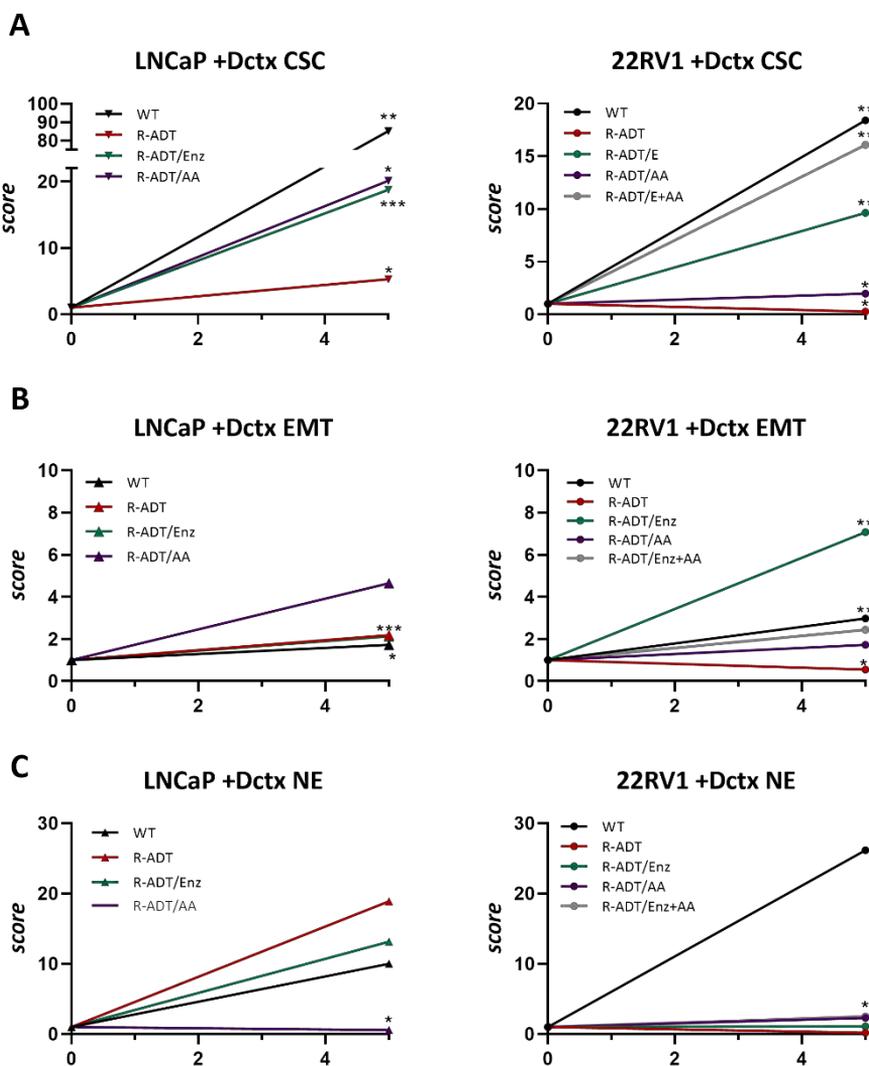


Figura 71. Análisis de genes de CSC, EMT y NE en respuesta a Docetaxel. Cuantificación por qPCR tras tratamiento con Dctx en los modelos celulares de CRPC para los genes de EMT (*ITGA2*, *SMAD1*, *SLUG*, *SNAIL*, *VIMENTINA* y *E-CADHERINA/CDH1*), CSC (*NANOG*, *OCT3/4*, *REX1*, *SOX2*, *CD44* y *CD38*) o fenotipo NE (*CHGA2*, *FOXA2*, *Ki67*, *CD56*, *NSE* y *SYP*). Los resultados están normalizados respecto a un control endógeno (*GAPDH*) y referenciados a las líneas celulares silvestres. N=3.

En el caso de la línea 22RV1 R-ADT, que mostró resistencia cruzada a Dctx a nivel de proliferación, el efecto del tratamiento con Dctx fue el opuesto a la línea silvestre; se observó una en el score de CSC, EMT y fenotipo NE ($p < 0.05$) (**Figura 71**). En relación a los modelos de resistencia a ADT y los tratamientos de segunda línea 22RV1 R-ADT/E y 22RV1 R-ADT/E+AA, se observó un aumento del score para CSC ($p < 0.01$) y en los genes de EMT ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente), de manera opuesta el tratamiento con Dctx indujo una disminución de NE ($p < 0.05$) (**Figura 71B-C**). Mientras que en la línea 22RV1 R-ADT/AA, que presenta menor sensibilidad a Dctx a nivel de proliferación, se observó un incremento del score para CSC ($p < 0.05$), pero no mostró un patrón de expresión para EMT o NE (**Figura 71**).

En resumen, el tratamiento corto con Dctx induce la expresión de los genes asociados a CSC en todas líneas celulares analizadas, independientemente de su sensibilidad a este fármaco. Además, en alguna de las líneas celulares estudiadas este fenotipo va acompañado de la adquisición del fenotipo mesenquimal (R-ADT/E, 22RV1 WT, 22RV1 R-ADT/E y 22RV1 R-ADT/AA) o de una represión en los genes estudiados para NE (LNCaP R-ADT/AA y 22RV1 R-ADT y 22RV1 R-ADT/E). Todos estos resultados indican que la respuesta genética al tratamiento con Dctx podría depender de la línea celular y no de la sensibilidad de éstas al mismo.

DISCUSIÓN

A pesar de los enormes esfuerzos de la comunidad científica por elucidar los mecanismos que se esconden detrás de la resistencia a la privación androgénica en cáncer de próstata, ésta sigue siendo el principal problema en el abordaje de la enfermedad.

La idea de que la señalización androgénica es esencial para el crecimiento y mantenimiento de la homeostasis de la próstata ha sido ampliamente aceptada. Durante décadas la ADT ha sido el tratamiento más importante en hombres con cáncer de próstata, especialmente para aquellos con enfermedad metastásica^{4,32}. Esto se basa en que el AR y su ruta de señalización están asociadas con un fomento de la proliferación celular y la invasividad¹⁴⁵. Sin embargo, el uso de ADT en la clínica ha sido motivo de controversia. El primer problema que presenta es que no supone una terapia curativa. Aunque hasta un 95% de los pacientes responden inicialmente, en la mayoría de casos la enfermedad termina progresando¹⁴⁶. Aun así, incluso cuando los pacientes desarrollan un estado de resistencia a la castración y la progresión de la enfermedad continúa, la terapia con ADT se suele mantener como tratamiento base independientemente de los tratamientos de segunda línea administrados. Así mismo, la ADT ha sido asociada con efectos metabólicos adversos, disfunción sexual y/o peor calidad de vida¹⁴⁷, lo que pone en duda si su uso debería ser continuado o intermitente¹⁴⁸.

Una vez los pacientes generan resistencia a ADT y progresan a CRPC, la administración de los tratamientos de segunda línea, tanto aquellos cuya diana es la señalización androgénica (Enz, AA, Apa) como los taxanos (Dctx), se produce de manera secuencial. A pesar de que las diferentes guías clínicas recogen una serie de recomendaciones sobre el orden de administración^{26,28,42}, no existe un claro consenso sobre que secuencia de tratamientos resulta la más beneficiosa para cada paciente¹⁴⁹. Además, otro de los problemas en el manejo clínico del CRPC es que el uso de los tratamientos de segunda línea de manera secuencial genera resistencia cruzada y no impide la progresión¹⁵⁰⁻¹⁵².

Se ha relacionado ampliamente la expresión de AR y las isoformas AR-Vs con la resistencia a NHAs. En este sentido, la mayoría de trabajos se basan en la AR-V7^{61,69-71}, aunque se ha identificado que ésta coexpresa con la variante AR-V9 lo que podría determinar que la resistencia dependa de la expresión de ambas

variantes¹⁴⁴. Con todo ello, la resistencia a los tratamientos es multifactorial por lo que conocer los mecanismos moleculares que intervienen es fundamental tanto para conseguir predecir la respuesta a los tratamientos de los pacientes, como para la búsqueda y el ensayo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

A pesar de que los avances genómicos de la última década han supuesto un gran paso en la investigación translacional y están permitiendo la evaluación directa de las muestras clínicas, el desarrollo de modelos preclínicos para el estudio de estrategias terapéuticas continúa siendo fundamental. Las líneas tumorales derivadas de pacientes continúan siendo el modelo más extendido para el estudio de los mecanismos moleculares que dirigen la progresión de la enfermedad y para mejorar la eficacia de las terapias contra el cáncer¹⁵³.

En este trabajo hemos desarrollado nuevos modelos celulares de resistencia que mimetizan los diferentes puntos en la evolución natural del CRPC. Consideramos que estos modelos suponen una herramienta de gran valor que permiten estudiar los mecanismos que se esconden detrás de la resistencia a la deprivación androgénica y a los NHAs Enz y AA, así como evaluar la respuesta a otros tratamientos de uso en la clínica, como Apa y Dctx. Además, hemos evaluado la implicación del AR y sus variantes *AR-V7* y *AR-V9* en la adquisición de resistencia; tanto en nuestros modelos celulares como mediante silenciamiento selectivo del *AR full length* y de sus variantes *AR-V7* y *AR-V9* en los modelos de resistencia a ADT. Así mismo, cabe destacar que nuestros modelos celulares recapitulan la heterogeneidad fenotípica observada en los pacientes de mCRPC, ayudándonos a comprender mejor los procesos implicados en la progresión de la enfermedad.

Finalmente nos gustaría proponer estos nuevos modelos celulares humanos de CRPC generados en este trabajo de investigación como un potencial banco de pruebas donde comprobar la efectividad de los presentes y futuros fármacos estudiados en los ensayos clínicos más actuales.

1. La exposición continuada a ADT y NHAs induce resistencia en líneas celulares de cáncer de próstata

Previo a la generación de los modelos de resistencia, quisimos evaluar la sensibilidad de las líneas de CaP utilizadas en este trabajo a los andrógenos. Las tres líneas celulares utilizadas (LNCaP, 22RV1 y PC3) demostraron tener una sensibilidad alta, intermedia y baja tanto a ADT como a NHAs, respectivamente.

Por un lado, cabe destacar que, aunque las células LNCaP presentan una mutación activadora del AR (T878A) que les confiere cierta resistencia a AA a concentraciones bajas (2-5 μM)^{154,155}, a la concentración utilizada en nuestro estudio (20 μM), observamos que las células LNCaP silvestres mostraban una alta sensibilidad a este antiandrógeno. Esto quedó comprobado por la evidente parada del ciclo celular en la fase G₀/G₁ y la acumulación de células muertas (pico Sub-G₀) tras 5 días de exposición continuada.

En cuanto a la línea celular 22RV1, ésta posee una duplicación en tándem de 35kb que contiene el exón 2 del gen del AR¹⁵⁶. A pesar de que las células 22RV1 muestran resistencia a 1 μM de Enz⁷¹, observamos una inducción de muerte celular (pico Sub-G₀) tras ser tratadas durante 5 días con una concentración de 40 μM .

Sin embargo, la existencia de células de CaP independientes del AR, como es el caso de las células PC3, es un ejemplo de que la insensibilidad a las terapias hormonales refleja la variabilidad y complejidad de la respuesta a las diferentes terapias en los pacientes de cáncer de próstata. Esto depende en cierto modo de las características iniciales de las células tumorales¹¹⁷. Mientras la ausencia del AR a nivel de proteína en la línea celular PC3 ha sido históricamente demostrada^{157,158}, la sensibilidad a Enz ha sido motivo de controversia. Nuestro trabajo y el de muchos otros laboratorio indica que las células PC3 pueden ser consideradas resistentes a este medicamento¹⁵⁹⁻¹⁶². Sin embargo, un trabajo reciente ha demostrado que el uso de altas dosis de Enz (30-100 μM) reduce la proliferación e induce apoptosis mediada por Bax, mediante la activación de la vía intrínseca o mitocondrial, y la desregulación del sistema de proteínas de choque térmico¹⁶³. Esta publicación mostró por primera vez los posibles efectos

adversos causados por la exposición continuada a Enz en líneas celulares de CaP, independientemente de la expresión del AR. En nuestro caso, no observamos ningún efecto antiproliferativo con el tratamiento durante 5 días con Enz (40 μ M) usando ensayos de proliferación a tiempo real o análisis de ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio.

La mayoría de pacientes de CaP progresa a CRPC tras el tratamiento prolongado con ADT¹⁶⁴. En concordancia con ello, en nuestros resultados hemos observado como las líneas celulares tumorales, LNCaP y 22RV1, inicialmente sensibles a las terapias hormonales, se vuelven resistentes a ADT tras 6 meses de privación continuada. Destacablemente, la inhibición de la proliferación celular mediada por NHA en las líneas celulares de CaP se ve revertida con la adquisición de resistencia a ADT tras 6 meses de presión selectiva. De hecho, observamos que la tasa de proliferación en las células tumorales 22RV1 y LNCaP dependientes de andrógenos al inicio no solo se ven incrementados, si no que la adquisición de resistencia a ADT promueve un comportamiento más agresivo, presentando incluso mayor proliferación que la línea celular resistente PC3. Es entonces, una vez los pacientes desarrollan resistencia, cuando se suelen administrar las terapias de segunda línea basados en NHAs o agentes quimioterápicos⁴².

Por tanto, la pregunta que necesitamos responder es: ¿Cuál es la mejor combinación de tratamientos de acuerdo con los mecanismos de resistencia implicados en los tratamientos previos¹⁶⁵? De hecho, esta misma cuestión es la que pretende contestar diversos ensayos clínicos recientes y actuales. Los ensayos clínicos COU-301 y AFFIRM mostraron diferentes resultados con el uso de AA o Enz como tratamiento de segunda línea tras ADT en mCRPC tratados previamente con Dctx. A pesar de que estos estudios han demostrado que la terapia antiandrogénica mejora la supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en mCRPC, estos pacientes podrían progresar y desarrollar resistencia a los antiandrógenos. Aunque en los últimos años han surgido numerosos avances en este campo, aún se desconoce cuál es el mejor NHA para el tratamiento de mCRPC. Nuestros resultados sugieren que la combinación de Enz y AA supone el tratamiento más eficiente para reducir la

proliferación en ambos modelos de resistencia a ADT, mientras el tratamiento con Enz fue el que presentaba una menor efectividad.

En cuanto al potencial del uso concomitante de ADT y AA o Enz como primera línea de tratamiento, los hallazgos de los ensayos clínicos CHARTED, LATITUDE y ARCHES han demostrado la mejora de la SG y SLP en mCRCP¹⁶⁶. Nuestros resultados experimentales en la línea celular dependiente de andrógenos (LNCaP) muestran que el uso concomitante de ADT y Enz no incrementan la eficiencia del tratamiento; por el contrario, se detectó menor habilidad para reducir el crecimiento tumoral. En la línea 22RV1, que mostraba mayor tolerancia a ADT, se obtuvieron resultados similares. Sin embargo, la combinación de ADT con AA mostró una habilidad significativa para reducir la tasa de proliferación previo a la adquisición de resistencia, especialmente en la línea LNCaP. Además, nuestros resultados son consistentes con la baja eficacia de la combinación de Enz y AA demostrada en el ensayo clínico Alliance en pacientes de mCRPC¹⁶⁷ y representan una justificación biológica para probar la combinación de ambos antiandrógenos en un ambiente hormono-sensible previo a la adquisición de CRPC. Esto se pone de manifiesto en las células LNCaP silvestres donde la combinación de ambos NHAs promovía la parada de ciclo celular y la posterior inducción de apoptosis.

2. La adquisición de resistencia en cáncer de próstata incrementa la actividad transcripcional del AR

Existen numerosas evidencias de que ADT incrementa la expresión de ARNm del AR y de sus genes diana tanto en líneas celulares como en muestras primarias de CRPC¹⁶⁸⁻¹⁷². En 2011, Cai C y col. determinaron los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la transcripción del AR y sus genes diana¹⁷³. En concordancia con ello, sería razonable creer que, en respuesta a los NHAs, las células intenten compensar la reducción de la señalización mediante el aumento de la expresión del AR. Sin embargo, si la terapia es efectiva, la actividad transcripcional del AR debería reducirse. Para corroborar esta hipótesis, en este trabajo se realizó el análisis de los niveles de expresión de un amplio panel de

genes diana del AR en diferentes líneas celulares de CaP. Nuestros resultados mostraron una represión transcripcional del AR especialmente en el caso de líneas celulares sensibles, como las células LNCaP, mientras que en la línea parcialmente sensible 22RV1, la reducción de la actividad del AR se observaba principalmente con los tratamientos de segunda línea (Enz y/o AA). En concordancia con ello, el silenciamiento parcial del *AR-FL* en la línea celular LNCaP WT, se relacionó con una represión de la actividad transcripcional del AR, mientras en línea 22RV1 WT no se observaron cambios en su perfil de expresión tras el silenciamiento. Además, se observó una disminución en la tasa de proliferación lo que concuerda con la sensibilidad de estas líneas a los andrógenos y su dependencia del AR. El efecto del silenciamiento de *AR-FL* también fue estudiado en las líneas R-ADT, observándose una disminución de la actividad transcripcional del AR, aunque en menor medida que en la línea celular LNCaP WT.

Por el contrario, cuando se estudió la expresión proteica del AR y sus genes diana se observó una disminución de AR, mientras que se mantuvo la expresión del resto de genes diana. Esta discordancia entre los niveles de ARNm y de proteína podría deberse a que los niveles de proteína del AR dependen del balance entre la síntesis y la degradación por el proteosoma, así como a la regulación post-traduccional a la que se encuentra sometido el AR en el contexto del CRPC. Entre los diferentes mecanismos de regulación, el transcrito del AR contiene una región 3'UTR de gran longitud cuya función es la regulación post-transcripcional mediante proteínas de unión que modulan la estabilidad y la eficiencia de la traducción del ARNm. Por ejemplo, se ha identificado la presencia de PCBP1, que actúa bloqueando la traducción del AR, en células LNCaP. Otro regulador post-transcripcional son los miRNAs, que controlan la expresión génica mediante la inhibición de la traducción proteica o la degradación selectiva del ARNm diana¹⁷⁴. Se han identificado miRNAs que regulan los niveles de proteína del AR en líneas celulares de CaP, entre ellas LNCaP y 22RV1¹⁷⁵. Además, nuestros resultados coinciden con el trabajo de Soifer y cols.¹⁷⁶, donde observaron que el tratamiento con AA producía la degradación proteica del AR en células LNCaP, mientras no se observaba disminución en la expresión de ARNm. En concordancia con ello, se ha

demostrado que en células LNCaP la degradación del AR es dependiente del proteosoma¹⁷³.

La progresión en los pacientes de CRPC envuelve modificaciones de rutas genéticas tanto directa como indirectamente asociadas con la señalización androgénica. Estas modificaciones incluyen la amplificación, sobreexpresión, cambios epigenéticos o mutaciones en el gen *AR*. Las variantes de *splicing* del *AR* han sido asociadas a la resistencia tanto a la resistencia a ADT como a los tratamientos de segunda línea Enz y AA⁶⁸. Existen una amplia controversia respecto a la correlación de la expresión de *AR-V7* y la evolución del CaP. Algunas publicaciones muestran que un incremento en su expresión conlleva menor respuesta a los tratamientos, mientras otras sugieren que no existe tal relación^{32,73,145,147,177}. Por ello es necesario conocer el papel del *AR-V7* y otras isoformas en la adquisición de resistencia para poder estandarizar las metodologías de detección de estas isoformas. De acuerdo con Kohli y cols.¹⁴⁴, los exones crípticos CE3 y CE5 se transcriben juntos, y ambos están presentes en el ARNm de la variante *AR-V9*. Nuestro diseño experimental nos permite detectar y diferenciar ambos amplicones confirmando la efectividad de nuestra aproximación y garantizando la detección diferencial mediante qPCR, lo cual tiene gran relevancia ya que, la mayoría de trabajos existentes, se limitan a la variante *AR-V7*.

Para conocer mejor la implicación de la señalización androgénica en esta resistencia estudiamos los niveles de expresión de *AR* y sus variantes *AR-V7* y *AR-V9* en los modelos de resistencia a ADT generados en nuestro laboratorio. Esta resistencia se vio acompañada de una sobreexpresión en el *AR-FL* pero no necesariamente de las variantes estudiadas, *AR-V7* y *AR-V9*. Asimismo, el silenciamiento parcial del *AR-FL* en la línea LNCaP R-ADT se relacionó con una disminución en la expresión de ambas isoformas *AR-V7* y *AR-V9*, mientras no indujo cambios en su expresión en la línea celular 22RV1 R-ADT. Todo ello sugiere que estas variantes no deben ser esenciales para la adquisición de resistencia a ADT.

En este contexto, se ha sugerido que el crecimiento de células tumorales con alta expresión de las *AR-Vs* no requiere del *AR full-length* para inducir la expresión de genes asociados a las *AR-Vs*¹⁷⁸. De hecho, en este estudio hemos detectado que en las líneas celulares de CaP silvestres, la inhibición del *AR full-length* se asociaba con un incremento en las *AR-Vs*. Mientras que el silenciamiento parcial del *AR-FL* en la línea LNCaP silvestre se asoció con un aumento del *AR-V9*, no teniendo ningún efecto en el *AR-V7*. Lo que nos sugiere que las variantes *AR-V7* y *AR-V9* no siempre mantienen el mismo patrón de regulación transcripcional conjunto. Por ejemplo, en la línea PC3 silvestre tratada durante 5 días con Enz, se produce la represión total de la *AR-V7* mientras que la *AR-V9* se inducía ligeramente; al contrario que en la línea celular 22RV1 R-ADT/Enz donde ambas *AR-Vs* siguen un patrón de expresión opuesto.

Para conocer mejor el papel de las variantes *AR-V7* y *AR-V9* en la adquisición de resistencia a ADT, quisimos estudiar el efecto de su silenciamiento parcial tanto en las líneas celulares silvestres como tras la adquisición de resistencia (R-ADT). En las líneas celulares silvestres el silenciamiento del *AR-V7* indujo una disminución en la tasa de proliferación. Además, este silenciamiento va acompañado de una disminución en la expresión del *AR-V9* y una disminución de la actividad transcripcional del AR, especialmente en la línea de mayor sensibilidad a andrógenos LNCaP WT donde además se produce un aumento en la expresión del *AR-FL*, probablemente como mecanismo de compensación. Estos resultados indican que *AR-V7* tendría un papel relevante en la proliferación tumoral y la respuesta a las terapias hormonales.

Por otro lado, en el caso de las líneas R-ADT, el silenciamiento tanto de la *AR-V7* como de la *AR-V9* induce una disminución del *AR total*. Además, el silenciamiento del *AR-V9* produce una disminución de los niveles de *AR-V7*, mientras el silenciamiento de la *AR-V7* no se relaciona con una disminución en la expresión de *AR-V9*, lo que apoyaría la teoría de que *AR-V9* coexpresa con *AR-V7*¹⁴⁴. Además, en la línea 22RV1 R-ADT, donde la adquisición de resistencia se relacionó con un aumento en la expresión de las variantes *AR-V7* y *AR-V9*, su silenciamiento indujo la represión de la actividad transcripcional del AR, indicando la relevancia de estas en la adquisición de resistencia. Por el

contrario, en la línea LNCaP R-ADT, donde la adquisición de resistencia no estaba asociada a las isoformas *AR-V7* y *AR-V9*, su silenciamiento se relacionó con un aumento de la actividad transcripcional del AR.

Cuando evaluamos los niveles de proteína en las líneas R-ADT observamos que no se correspondían con los niveles de expresión de ARNm. Mientras que la línea LNCaP R-ADT mostró una disminución en los niveles de proteína tanto del AR como de sus genes diana y, además, no se detectó el *AR-V7*. En cambio, en la línea 22RV1 R-ADT no se observaron cambios a nivel de proteína. Al igual que ocurría con las líneas silvestres cuando se sometían a los diferentes tratamientos, esta discordancia podría deberse a diversas modificaciones post-traduccionales que regulan el proceso de degradación del AR por el proteosoma^{173,174}. Con todo ello, todos los modelos de CRPC generados muestran una activación transcripcional del AR, independientemente del estado de las *AR-Vs*, al contrario de lo observado por Cato L y cols. en modelos preclínicos, que concluyeron que *AR-V7* heterodimeriza con AR full-length y es necesario para CRPC^{143,179}. Por ello, consideramos que es necesario el análisis de todas las isoformas del AR para confirmar la efectividad de los NHAs.

Con todo ello, la implicación de la señalización del AR en el desarrollo de resistencia ADT en CaP es compleja, involucrando diferentes alteraciones genéticas y dando lugar a respuestas adaptativas. Por ejemplo, ADT induce la reducción de los niveles de DHT, que es el principal mediador de la señalización androgénica en el tejido prostático. Como consecuencia, la mayoría de células de próstata sufren apoptosis, mientras algunas de ellas pueden escapar entrando en un estado de dormancia o letargo¹⁸⁰. Estas células tumorales bajo estado de letargo son capaces de adaptarse a ambientes bajos en andrógenos, reiniciando la progresión tumoral¹⁸¹. Además, el tratamiento con ADT promueve la senescencia de las células tumorales. En este estado las células dejan de dividirse permanentemente, pero no se destruyen. Con el tiempo, un largo número de células senescentes se acumulan en los órganos, causando inflamación y daños en las células sanas de los órganos colindantes. La senescencia ha sido asociada con un tratamiento con ADT neoadjuvante y con recidivas y resistencia a ADT¹⁸². Estos resultados coinciden con lo observado en nuestro trabajo, ya que

detectamos que en la línea celular 22RV1 silvestre ADT induce una parada de ciclo celular en G_0/G_1 que no va acompañado de muerte celular. Por otro lado, la relación entre *AR full-length* y la adquisición de resistencia a ADT fue previamente evaluada por Shiota M y cols.¹⁸³. En su trabajo identificaron una alta asociación entre la sobreexpresión de *AR full-length* y el proceso de EMT. La adquisición de esta característica fue más evidente en los modelos CRPC de la línea LNCaP que en la 22RV1.

Para evaluar las rutas moleculares que intervienen en los modelos celulares concomitantes, analizamos la expresión del *AR* y sus genes diana. Observamos que solo el *AR full-length* y *TMPRS2* fueron denominadores comunes en la emergencia de resistencia a todos los tratamientos, tanto en los modelos de CRPC de las células LNCaP como de las células 22RV1. La adquisición de resistencia se acompañó de una activación constitutiva del *AR*, detectada como una regulación al alza de diversos genes diana del *AR*.

La isoforma *AR-V7* ha sido extensamente relacionada con la adquisición de resistencia a Enz y AA mediante la activación de diferentes procesos transcripcionales⁶⁴. La presencia de *AR-V7* en CTCs de pacientes de mCRPC tratados con Enz o AA se relaciona con resistencia a los tratamientos⁷³. Sin embargo, apenas existen estudios sobre la implicación del *AR-V9* en la adquisición de resistencia. En este sentido, nuestros resultados mostraron que la inducción de las isoformas *AR-V7* y *AR-V9* no va necesariamente acompañada de un aumento en la activación del *AR*. Así mismo, la sobreexpresión de *AR-V9* va siempre asociada a un aumento en *AR-V7*. Por el contrario, la inducción de *AR-V7* no siempre se relaciona con un aumento en la expresión de *AR-V9*, como sugería el estudio de Kohli¹⁴⁴. Interesantemente, también detectamos que la expresión de *AR-V9* estaba asociada a la resistencia a AA en los modelos de CRPC de las 22RV1, pero esta correlación no se observó en los modelos derivados de células LNCaP. De hecho, observamos que la resistencia a ADT en combinación con AA (R-ADT/AA) no involucraba una regulación al alza de *AR-V9*. Cabe destacar que AA fue más efectiva en los modelos celulares de LNCaP que en los de 22RV1, mientras que Enz fue más eficiente en las células 22RV1. En este caso, sí se observó una regulación al alza de *AR-V9*. Estos

resultados sugieren la necesidad de detectar los niveles de expresión de ambas variantes, *AR-V7* y *AR-V9*, en los pacientes de CaP antes de elegir la mejor opción terapéutica (Enz o AA).

3. Los modelos celulares de CRPC desarrollan resistencia cruzada a otros tratamientos

El desarrollo de los NHAs ha supuesto un gran avance en el tratamiento en el manejo clínico del CRPC, lo que ha mejorado notablemente la supervivencia de los pacientes de CaP. Sin embargo, determinar la secuencia correcta en los tratamientos en CRPC sigue siendo complicado, ya que pueden desarrollarse resistencias cruzadas. Esto supone un reto aún mayor que la resistencia preexistente, que depende principalmente del perfil genético del individuo, ya que la resistencia adquirida se desarrolla como respuesta a los tratamientos dependiendo tanto de la heterogeneidad tumoral como de los procesos de selección clonal¹⁸⁴.

Normalmente, la resistencia cruzada a un fármaco surge debido al tratamiento previo con otro fármaco con un mecanismo de acción similar; por lo que sería lógico pensar que el uso secuencial de antiandrógenos en CRPC podría reducir la eficacia de los mismo. De acuerdo con esto, hemos visto que una vez que las líneas celulares de CaP adquieren resistencia tras el tratamiento concomitante con R-ADT/AA, el uso secuencial de Enz no reduce la tasa de proliferación, demostrando la adquisición de resistencia cruzada entre ambos NHAs, como ya ha sido descrito en pacientes de mCRCP^{146,185-188}. De igual manera, otros estudios han demostrado que en células de CaP resistentes a la castración, la adquisición de resistencia a Enz o AA exhibe resistencia cruzada al tratamiento alternativo^{150,189}.

Dentro de las recomendaciones para el manejo clínico del CRPC, ha sido aprobado el uso de Apa en CRPC no metastásico tras el tratamiento con AA^{26,28,42}, así como para el tratamiento del CaP metastásico sensible a la castración¹⁹⁰. De hecho, el ensayo clínico SPARTAN mostró que en pacientes de nmCRCP el tratamiento con Apa mejoraba la supervivencia libre de

metástasis¹⁹¹. Puesto que Apa es un análogo de Enz³⁹, cabría esperar que el desarrollo de resistencia cruzada a Apa se produjera especialmente tras el uso de Enz, y en menor medida tras la deprivación androgénica o el tratamiento con AA. Contrariamente a lo esperado, aunque la mayoría de los modelos de resistencia mostraron un aumento de la tolerancia a Apa, la mayor tolerancia se observó en el caso de la línea LNCaP R-ADT/AA y la línea 22RV1 R-ADT que fueron capaces de proliferar con normalidad y conservaron su capacidad clonogénica en presencia de Apa. En concordancia con nuestros resultados, un trabajo demostró la presencia de resistencia cruzada a Apa en modelos de resistencia a Enz o AA, y además, la resistencia adquirida a Apa desencadenaba resistencia cruzada al resto de antiandrógenos en células de CaP¹⁵². Todo ello evidencia que el uso combinado de los diferentes NHAs disponibles podría tener una ventaja frente a su uso secuencial en el abordaje del CRPC.

De hecho, un estudio clínico ha evaluado la combinación de AA y Apa en mCRPC demostrando su actividad antitumoral¹⁹². Se ha visto que la exposición continuada a los tratamientos de segunda línea en los pacientes de CRPC conlleva la adquisición de resistencia^{147,193}. En este sentido, se ha asociado una mayor heterogeneidad en las CTCs con una peor progresión y SG en pacientes tratados con antiandrógenos¹⁹⁴. De acuerdo con ello, observamos que la tolerancia a Apa en nuestros modelos de resistencia de las células LNCaP aumentaba con el tiempo de exposición al fármaco. Curiosamente, no observamos este mismo efecto en las líneas 22RV1 donde, a excepción de las células 22RV1 R-ADT que mostraron resistencia cruzada a Apa, el resto de líneas mostraron una tendencia a un aumento de la sensibilidad a este fármaco con el tiempo. Estos resultados evidencian la gran variabilidad en la respuesta a los tratamientos también observada en la práctica clínica.

Por otro lado, quisimos evaluar el papel del AR en la respuesta a Apa. Al igual que ocurría con el resto de tratamientos evaluados, la exposición a Apa en líneas sensibles se relacionó con una activación transcripcional del AR independiente de las variantes *AR-V7* y *AR-V9*. Por el contrario, Zhao y cols.¹⁵² observaron que el tratamiento con Apa no tenía ningún efecto en la expresión del AR en células 22RV1. En el caso de la línea LNCaP R-ADT/AA que mostró resistencia cruzada

a Apa, se observó un aumento tanto del *AR full-length* como de *AR-V9*. Mientras que en las líneas 22RV1 R-ADT y 22RV1 R-ADT/E+AA tratadas con Apa, no se observaron diferencias de expresión en el *AR full-length* pero sí una represión de las variantes *AR-V7* y *AR-V9*. Esto concuerda con nuestra teoría de que, la adquisición de resistencia a las terapias antriandrogénicas estaría ligada con un aumento de la actividad transcripcional del AR. Sin embargo, la presencia de resistencia cruzada a otros tratamientos provocaría que la administración de los mismos no ejerza ninguna presión sobre el eje de señalización del AR.

Aunque los principales tratamientos contra el CaP se basan en terapias hormonales, incluso en el caso de CRPC, las opciones disponibles para los pacientes con mCRPC han aumentado en los últimos años. A pesar de que la señalización androgénica es fundamental en las diferentes etapas de la enfermedad, el uso de quimioterapia como primera línea de actuación en aquellos pacientes con mCRPC ha demostrado mejorar la supervivencia global, especialmente en el caso de Dctx¹⁹⁵. Actualmente, la SEOM recomienda el uso de Dctx como primera línea de actuación tras el fallo de ADT en pacientes de mCRPC sintomático, y como segunda línea en pacientes de mCRPC asintomático en los que ha fallado el tratamiento con Enz o AA⁴².

El principal beneficio que aporta el uso de quimioterapia es que, mientras que los NHAs han demostrado generar resistencias cruzadas en CRPC, la quimioterapia tiene un gran potencial para retener su eficacia tras el desarrollo de resistencia a ADT¹⁹⁵. En nuestro trabajo, Dctx demostró tener una eficacia similar en la mayoría de modelos de resistencia concomitantes y en las líneas silvestres. Además, Dctx actúa mediante una unión a las proteínas constitutivas de los microtúbulos que previene la despolimerización, lo que provoca un bloqueo de la mitosis y como resultado la posterior inducción de apoptosis¹⁹⁵. De esta forma observamos una evidente parada del ciclo celular en G_0/G_1 y una acumulación de células muertas (pico Sub- G_0), así como la incapacidad de las células para formar colonias en presencia de Dctx. Sin embargo, los modelos de resistencia a ADT presentaron resistencia cruzada a Dctx, que se vio tanto por la capacidad de proliferativa como por el perfil de ciclo celular. Aunque cabe

destacar que esta tolerancia a Dctx disminuía con el tiempo de tratamiento y su efectividad se incrementaba con el número de pases. Así mismo, las líneas celulares R-ADT no conservaron su capacidad clonogénica.

La población de células de CaP es heterogénea, lo que hace que puedan darse varios mecanismos de resistencia simultáneamente. Esto resulta en una selección de aquellas células resistentes a Dctx o la modificación de aquellas sensibles para adquirir resistencia. Además, el microambiente tumoral también juega un papel esencial en la resistencia¹⁹⁶. Lo que podría explicar que una célula individual no sea capaz de proliferar en presencia de Dctx. La resistencia cruzada entre las terapias hormonales y los taxanos ha sido estudiada en diversos estudios *in vitro*. Algunos de ellos han mostrado que modelos de CaP resistentes a Enz o AA también exhibían resistencia a Dctx¹⁸⁴, contrariamente a lo observado en nuestro laboratorio. En definitiva, nuestros datos sugieren que la eficacia de Dctx sería mayor antes de la adquisición de resistencia a ADT o como segunda línea de actuación en mCRPC. En concordancia con ello, dos ensayos clínicos, CHARTED y STAMPEDE, han demostrado que el uso de Dctx junto a ADT en CaP sensible a la castración mejora la supervivencia¹⁹⁵. Esto sugiere que podría haber una interacción entre la ruta de señalización androgénica y la sensibilidad a Dctx.

Por ello, quisimos evaluar si la resistencia cruzada estaba mediada por la actividad transcripcional del AR. No se observó correlación entre la expresión del *AR full-length* y las variantes *AR-V7* y *AR-V9* y la respuesta a Dctx. Sin embargo, en los dos modelos de resistencia a ADT el tratamiento con Dctx inducía una sobreexpresión del *AR total*, pero no del *AR full-length* y las variantes *AR-V7* y *AR-V9*. Komura y cols.¹⁹⁷ observaron que en líneas celulares de CaP KDMD5 interacciona con el AR alterando su actividad transcripcional, y su pérdida durante la ADT resulta en la adquisición a resistencia Dctx. Además, estos resultados fueron corroborados en tumores de pacientes de CRPC, donde se relacionó una menor expresión de KDM5D con peor SG.

Por otro lado, diversos trabajos han investigado la expresión de *AR-V7* como biomarcador predictivo de respuesta a la quimioterapia, y todos ellos han concluido que, mientras que *AR-V7* se asocia con un peor pronóstico en la

respuesta a las terapias contra el AR, no se podía relacionar con la resistencia a taxanos¹⁹⁵. Nuestros resultados, junto con los de otros investigadores, evidencian que la sensibilidad a Dctx se encuentra modulada por la señalización androgénica, y hacen necesario su estudio en profundidad para determinar los mecanismos moleculares responsables del proceso y las importantes consecuencias en la mejora de las terapias actuales.

4. La adquisición de resistencia a la deprivación androgénica está ligada a un aumento de la capacidad tumorigénica

La adquisición de resistencia a los tratamientos en CaP promueve la progresión tumoral y, en última instancia, la metástasis. Puesto que la heterogeneidad tumoral juega un papel fundamental en la adquisición de resistencia a los tratamientos y que la inhibición prolongada de la señalización androgénica puede promover la plasticidad celular, quisimos evaluar los perfiles de expresión de los modelos de resistencia a ADT y NHAs. Se ha visto que las terapias antiandrogénicas dirigen la desdiferenciación y transdiferenciación celular, lo que resulta en la expresión de marcadores de EMT, NE y CSC¹⁹⁸. Por tanto, cabría esperar la presencia de estos fenotipos en los modelos de resistencia a la deprivación androgénica y a los tratamientos de segunda línea.

Cuando se estudió el perfil de expresión en los modelos de resistencia a ADT, se observó la sobreexpresión de marcadores relacionados con un fenotipo neuroendocrino, como *NSE* o *CHGA*, y de características *stem cell-like*, como *SOX2*, *NANOG* o *CD44*. De igual manera, en los modelos de resistencia a los tratamientos de segunda línea Enz y AA también se observaron cambios en dichos perfiles. La resistencia a Enz indujo perfiles diversos en los diferentes modelos. Por un lado, se observó un incremento generalizado de marcadores de CSC y fenotipo NE en los modelos de las células LNCaP y 22RV1 respectivamente. Por otro lado, en ambos modelos de resistencia a AA se observó un fenotipo EMT y NE, y en el caso de la línea LNCaP R-ADT/AA también características CSC. Por último, la línea resistente al tratamiento combinado con Enz y AA adquirió un perfil de expresión de CSC. Destacablemente, a pesar de encontrarse representados los tres perfiles de

expresión estudiados en los diversos modelos, existe una amplia heterogeneidad tanto entre los diferentes tratamientos como en las dos líneas celulares empleadas en estos modelos, LNCaP y 22RV1.

La amplia heterogeneidad fenotípica y la resistencia a los tratamientos antiandrogénicos que presentan nuestros modelos ya se ha descrito previamente en numerosos trabajos. Por un lado, casi todas las líneas resistentes presentan una sobreexpresión de marcadores de CSC, lo que se ve respaldado por la teoría de que las CSC son las células responsables de inicio del proceso metastásico y pueden cambiar de un estado epitelial a mesenquimal^{90,112}. Así mismo, diversos estudios han relacionado la privación androgénica con la expresión de marcadores de CSC. Entre ellos, Jeter y col. describieron que la sobreexpresión de *NANOG* en células LNCaP les confería resistencia a ADT¹⁹⁹. Así mismo, diversos trabajos han demostrado que la ADT induce la sobreexpresión de marcadores de CSC en tumores xenógrafos de células LNCaP, entre ellos *CD44*^{200,201}. Así mismo, se ha visto la sobreexpresión de genes relacionados con CSC como *SOX2*, *NANOG* o *CD44* en células LNCaP y C4-2B resistentes a Enz²⁰².

También existen evidencias de que la resistencia a la privación androgénica está relacionada con el fenotipo NE. En este sentido, Lin y col.²⁰³ identificaron la presencia de CHGA y ENO2 en tumores de CRPC. Además, observaron que ADT promueve la sobreexpresión del receptor del factor epidérmico de fibroblastos (EGFR) en CaP, lo que dirigiría la diferenciación NE mediante la regulación transcripcional del receptor del factor inhibidor de la leucemia (LIFR). De forma independiente, Komiya y col. identificaron una mayor frecuencia de marcadores de diferenciación NE como CHGA o NSE, así como la ausencia del AR, en pacientes de CRPC con respecto a pacientes de CaP hormono-sensibles, y se relacionó con un peor pronóstico²⁰⁴. En un ensayo clínico en pacientes de mCRPC que presentaban resistencia a Enz y/o AA, se observó NEPC de células pequeñas en un 17% de los pacientes y, además, se relacionó con una menor supervivencia²⁰⁵. De igual modo, otro estudio en pacientes de mCRPC tratados con Enz o AA observó la presencia de fenotipo NE en un 10% de los pacientes²⁰⁶.

Por último, solo los modelos de resistencia a AA han mostrado fenotipo EMT, lo que podría deberse a que las CSC y el proceso de EMT están altamente ligados, por tanto, las células con características CSC presentes en las células resistentes podrían sufrir cambios a un fenotipo parcial de EMT, lo que se ha asociado con la capacidad pluripotente de las células tumorales^{90,112}. En este sentido, Shang Z. y cols. vieron que la deprivación androgénica incrementaba las células *stem cell-like* CD44⁺ en tumores de CRPC en comparación con aquellos hormonosensibles, y además demostraron que estas células podrían ser las iniciadoras del proceso de EMT modulado por la señalización TGFβ1-CD44²⁰⁷. Además, la deprivación androgénica ha sido ampliamente relacionada con la inducción de EMT y con la plasticidad mediante la trans-diferenciación neuroendocrina²⁰⁸. Por ejemplo, la expresión constitutiva de SNAIL1, marcador relacionado con EMT, en células LNCaP indujo características de NE, entre ellas la expresión de marcadores típicos como CHGA y NSE²⁰⁹. En concordancia con ello, la remodelación en la transdiferenciación neuroendocrina tras la castración química en un modelo PDX resultó en una sobreexpresión de factores de transcripción de EMT SNAIL y ZEB1 y genes asociados a características *stem cell*, como LEF1²¹⁰. Tanaka y col. describieron que el bloqueo de EMT con anticuerpos monoclonales contra N-cadherin previene de la resistencia a la castración en líneas celulares de CaP y modelos xenógrafos²¹¹.

Una explicación a la presencia de esta gran diversidad fenotípica podría residir en el modelo de selección clonal. Existen diversas evidencias sobre las ventajas de la selección clonal en las células independientes de andrógenos²¹². Por ejemplo, tras la terapia de ADT las células con características CSC tendrían una ventaja proliferativa que les permitiría expandirse tras el tratamiento¹²⁸. Además, diferentes modelos de diferenciación NE sugieren que las NEPC provienen de la diferenciación de las CSC^{116,128}. Esta teoría de resistencia a la castración se basa en que las células resistentes agresivas presentan unos patrones de expresión génica y unas características moleculares que no se encuentran en las células parentales²¹². Del mismo modo, el proceso de EMT está asociado con la resistencia a las terapias, metástasis y agresividad de la enfermedad²⁰⁸.

Con todo ello, nuestros resultados concuerdan con la gran diversidad fenotípica presente entre los pacientes de CRPC. Lo cual le da gran importancia a la necesidad de estudiar la relación entre la adquisición de resistencia y los cambios genéticos y funcionales que conlleva. Por ello, quisimos evaluar la malignidad tumoral asociada a los diferentes fenotipos genéticos en las líneas celulares resistentes a la deprivación androgénica y NHAs.

Los dos modelos de resistencia a ADT mostraron un aumento de la capacidad de migración y de la capacidad invasiva, así como su capacidad clonogénica. Cabe destacar que la línea celular LNCaP silvestre, que presentó mayor sensibilidad inicial a los diferentes tratamientos, no fue capaz de formar colonias previo a la adquisición de resistencia. En el caso de los modelos concomitantes, la adquisición de resistencia fue ligada a un aumento en la capacidad de migración. Además, los dos modelos de resistencia a los tratamientos de segunda línea (R-ADT/Enz y R-ADT/AA) de la línea LNCaP presentaron un claro aumento de la capacidad clonogénica. Por el contrario, los modelos concomitantes de la línea 22RV1, presentaron una reducción en la capacidad clonogénica respecto a la línea silvestre. En conjunto, nuestros datos sugieren que la resistencia a las terapias antiandrogénicas va ligada a un aumento de la capacidad tumorigénica, especialmente en el caso de ADT.

La metástasis es la responsable de la mayoría de muertes asociadas a cáncer. En este sentido, la capacidad de migración e invasión son fundamentales para el inicio del proceso metastásico, ya que permiten a las células desprenderse de la masa tumoral y atravesar la membrana basal. Estas células tumorales alcanzan posteriormente la membrana extracelular de los tejidos colindantes a través del proceso de intravasación²¹³.

En este sentido, los fenotipos asociados a malignidad tumoral son esenciales para la diseminación tumoral²¹³. El crecimiento tumoral frecuentemente está mediado por el proceso de EMT que permite la separación de las células individuales del tumor primario mediante la regulación a la baja de los marcadores epiteliales y la pérdida de las uniones intercelulares, junto con un aumento de la motilidad celular típica de las células mesenquimales. Normalmente las células epiteliales que forman el tumor están fuertemente

unidas a las células subyacentes y a las membranas basales, lo que las inmoviliza. Durante la progresión tumoral, las células se liberan de estas uniones, haciendo posible el proceso de extravasación. Para ellos las células tumorales sufren diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas, que les confieren mayor agresividad. Además, diversos estudios han demostrado la aparición de tumores metastásicos y NE después de la terapia con ADT y los NHAs, lo que puede atribuirse a la activación de mecanismos clave de plasticidad celular que, además aumentan la invasión y la migración de las células tumorales¹⁹⁸. En definitiva, la adquisición de resistencia a ADT y a los NHAs Enz y AA, estaría ligada a una diferenciación hacia fenotipos más agresivos como CSC, EMT y NE. Consecuentemente, se incrementa la malignidad tumoral, lo que se ve reflejado en una mayor capacidad de migración e invasión, así como una mayor clonogenicidad.

Como conclusión nuestro trabajo ha identificado que el tratamiento con Enz o AA podría ser más efectivo usándose como primera línea terapéutica en el CaP sensible a andrógenos, ya que ADT induce mecanismos de resistencia adicionales que reducen la eficiencia de estos fármacos como segunda línea de tratamiento. Así mismo, nuestros modelos de CRPC recapitulan la adquisición de resistencia cruzada entre los diferentes NHAs observada en los pacientes de mCRPC. Así como la presencia de fenotipos de CSC, EMT y NE, que se relacionan con mayor malignidad tumoral. Todo ello le dan un gran valor como herramienta para el estudio e los procesos moleculares que se esconden detrás de la adquisición de resistencia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han generado modelos celulares de CaP resistentes a ADT (R-ADT) capaces de proliferar con normalidad en ausencia de andrógenos. Las líneas celulares R-ADT presentan una mayor tolerancia a los tratamientos de segunda línea Enz y AA.
2. Se han generado modelos de resistencia a ADT y NHAs (R-ADT/Enz, R-ADT/AA y R-ADT/Enz+AA) que son capaces de crecer con normalidad en ausencia de andrógenos y desarrollan resistencia cruzada al tratamiento alternativo.
3. La adquisición de resistencia a la deprivación androgénica está relacionada con la activación transcripcional del AR que se ve reflejada por una sobreexpresión del *AR full-length* y sus genes diana, pero no necesariamente de las variantes *AR-V7* y *AR-V9*.
4. Los modelos de resistencia a ADT (R-ADT) poseen mayor capacidad de migración e invasión, así como una mayor capacidad clonogénica.
5. Los modelos de resistencia a ADT y NHAs (R-ADT/Enz, R-ADT/AA y R-ADT/Enz+AA) poseen mayor capacidad de migración y una mayor capacidad clonogénica.
6. La adquisición de resistencia en los diferentes modelos de resistencia está relacionada con la adquisición de marcadores de fenotipo de CSC, EMT o NE.
7. Se han desarrollado líneas celulares estables de CaP silvestres y resistentes a ADT (R-ADT) con silenciamiento selectivo del *AR* y sus variantes *AR-V7* y *AR-V9* mediante shRNAs.
8. El silenciamiento parcial de *AR full-length* induce una menor capacidad proliferativa en líneas celulares LNCaP y 22RV1 silvestres, una disminución en la actividad transcripcional del AR en líneas LNCaP silvestre y LNCaP R-ADT y un aumento de la expresión de *AR-V9* en LNCaP silvestre.
9. El silenciamiento parcial de *AR-V7* induce una menor capacidad proliferativa, una disminución en la expresión de la isoforma *AR-V9*, una disminución de la actividad transcripcional del AR en las líneas celulares LNCaP y 22RV1 silvestres. Por el contrario, promueve un aumento de los genes diana de AR en la línea celular LNCaP R-ADT.

CONCLUSIONES

10. El silenciamiento parcial de *AR-V9* induce una menor capacidad proliferativa en la línea celular, una disminución de la expresión de las variantes *AR full length* y *AR-V7* y un aumento de la actividad transcripcional del AR en las células LNCaP R-ADT. Sin embargo, este mismo silenciamiento promueve la reducción de la actividad transcripcional del AR en la línea celular 22RV1 R-ADT.
11. La mayoría de los modelos celulares de CRPC desarrollan resistencia cruzada a Apalutamida, siendo capaces de proliferar, mantener perfiles de ciclo celular similares a las células sin tratar y conservar su capacidad clonogénica.
12. La resistencia cruzada a Apalutamida en los modelos de resistencia a ADT y ADT + Enz y/o AA es independiente de los niveles de expresión de las variantes *AR-V7* y *AR-V9*.
13. Los modelos celulares de resistentes a ADT (R-ADT) desarrollan resistencia cruzada a Docetaxel, permitiendo su proliferación y el mantenimiento de los perfiles de ciclo celular. Este fármaco induce la expresión de AR total, pero no del *AR full length* o las isoformas *AR-V7* y *AR-V9*.
14. Los modelos de resistencia a ADT y NHAs (R-ADT/Enz, R-ADT/AA y R-ADT/Enz+AA) son más sensibles a Docetaxel que induce parada del ciclo celular y apoptosis, bloquea su capacidad clonogénica y promueve la expresión del AR.
15. No se observó una relación entre la expresión de *AR full length*, las variantes *AR-V7* y *AR-V9* y la respuesta a Docetaxel en ninguno de los modelos celulares resistentes generados.

BIBLIOGRAFIA

1. Henry, G. H. *et al.* A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. *Cell Rep.* 25, 3530-3542.e5 (2018).
2. *How does the prostate work? InformedHealth.org [Internet]* (Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG), 2016).
3. Aaron, L., Franco, O. E. & Hayward, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol. Clin. North Am.* 43, 279–288 (2016).
4. Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R. & Zirkin, B. R. Androgen action in prostate function and disease. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* 6, 62–77 (2018).
5. Dai, C., Heemers, H. & Sharifi, N. Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7, a030452 (2017).
6. Shi, Y. *et al.* Androgens promote prostate cancer cell growth through induction of autophagy. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 27, 280–295 (2013).
7. Huggins, C. & Hodges, C. V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA. Cancer J. Clin.* 22, 232–240 (1972).

BIBLIOGRAFIA

8. Xu, J. & Qiu, Y. Role of androgen receptor splice variants in prostate cancer metastasis. *Asian J. Urol.* **3**, 177–184 (2016).
9. Barsoum, I. B., Kaur, J., Ge, R. S., Cooke, P. S. & Yao, H. H.-C. Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *FASEB J.* **27**, 2657–2666 (2013).
10. Thirumalai, A. *et al.* Stable Intraprostatic Dihydrotestosterone in Healthy Medically Castrate Men Treated With Exogenous Testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 2937–2944 (2016).
11. Aragon-Ching, J. B., Williams, K. M. & Gulley, J. L. Impact of androgen-deprivation therapy on the immune system: implications for combination therapy of prostate cancer. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **12**, 4957–4971 (2007).
12. Aggarwal, R. R. *et al.* Androgen receptor (AR) amplification in patients (pts) with metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC) resistant to abiraterone (Abi) and enzalutamide (Enz): Preliminary results from the SU2C/PCF/AACR West Coast Prostate Cancer Dream Team (WCDT). *J. Clin. Oncol.* (2015) doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.5068.
13. Shiota, M., Fujimoto, N., Kashiwagi, E. & Eto, M. The Role of Nuclear Receptors in Prostate Cancer. *Cells* **8**, E602 (2019).

14. Dehm, S. M. & Tindall, D. J. Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-Related Cancer* vol. 18 R183-96 (2011).
15. Lu, C. & Luo, J. Decoding the androgen receptor splice variants. *Transl. Androl. Urol.* 2, 178–186 (2013).
16. Smith, D. F. & Toft, D. O. Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 2229–2240 (2008).
17. Jiménez-Panizo, A., Pérez, P., Rojas, A. M., Fuentes-Prior, P. & Estébanez-Perpiñá, E. Non-canonical dimerization of the androgen receptor and other nuclear receptors: implications for human disease. *Endocr. Relat. Cancer* 26, R479–R497 (2019).
18. Jin, H.-J., Kim, J. & Yu, J. Androgen receptor genomic regulation. *Transl. Androl. Urol.* 2, 157–177 (2013).
19. Jenster, G. *et al.* Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 5, 1396–1404 (1991).
20. Heemers, H. V. & Tindall, D. J. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr. Rev.* 28, 778–808 (2007).

BIBLIOGRAFIA

21. Culig, Z. & Santer, F. R. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 413–427 (2014).
22. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>.
23. Registros de cáncer | Redecan. <https://redecn.org/es/registros-de-cancer>.
24. Cozar, J. M. *et al.* Registro nacional de cáncer de próstata 2010 en España. *Actas Urol. Esp.* **37**, 12–19 (2013).
25. Uhr, A., Glick, L. & Gomella, L. G. An overview of biomarkers in the diagnosis and management of prostate cancer. *Can. J. Urol.* **27**, 24–27 (2020).
26. Parker, C. *et al.* Prostate cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann. Oncol.* **31**, 1119–1134 (2020).
27. Litwin, M. S. & Tan, H.-J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA* **317**, 2532–2542 (2017).
28. Schaeffer, E. *et al.* NCCN Guidelines Insights: Prostate Cancer, Version 1.2021. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **19**, 134–143 (2021).
29. Adamaki, M. & Zoumpourlis, V. Prostate Cancer Biomarkers: From diagnosis to prognosis and precision-guided therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **228**, 107932 (2021).

30. EAU Guidelines on Prostate Cancer - Uroweb. *Uroweb - European Association of Urology* <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer>.
31. Paschalis, A. & de Bono, J. S. Prostate Cancer 2020: “The Times They Are a’Changing”. *Cancer Cell* **38**, 25–27 (2020).
32. Buttigliero, C. *et al.* Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 884–892 (2015).
33. Teo, M. Y., Rathkopf, D. E. & Kantoff, P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu. Rev. Med.* **70**, 479–499 (2019).
34. Scher, H. I. *et al.* Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: Recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1148–1159 (2008).
35. Sharifi, N. *et al.* A retrospective study of the time to clinical endpoints for advanced prostate cancer. *BJU Int.* **96**, 985–989 (2005).
36. Nader, R., El Amm, J. & Aragon-Ching, J. B. Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian J. Androl.* **20**, 221–229 (2018).
37. de Bono, J. S. *et al.* Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1995–2005 (2011).

BIBLIOGRAFIA

38. Scher, H. I. *et al.* Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1187–1197 (2012).
39. Smith, M. R. *et al.* Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1408–1418 (2018).
40. Watson, P. A., Arora, V. K. & Sawyers, C. L. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 701–711 (2015).
41. Kanno, Y., Chen, C.-Y., Lee, H.-L., Chiou, J.-F. & Chen, Y.-J. Molecular Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Head and Neck Cancers. *Front. Oncol.* **11**, 640392 (2021).
42. González del Alba, A. *et al.* SEOM clinical guidelines for the treatment of advanced prostate cancer (2020). *Clin. Transl. Oncol.* **23**, 969–979 (2021).
43. Yamada, Y. *et al.* Abiraterone acetate after progression with enzalutamide in chemotherapy-naïve patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a multi-center retrospective analysis. *BMC Res. Notes* **9**, 471 (2016).
44. Fizazi, K., Jenkins, C. & Tannock, I. F. Should docetaxel be standard of care for patients with metastatic hormone-sensitive prostate cancer? Pro

- and contra. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **26**, 1660–1667 (2015).
45. Kyriakopoulos, C. E. *et al.* Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHAARTED Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **36**, 1080–1087 (2018).
46. Nd, J. *et al.* Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N. Engl. J. Med.* **377**, (2017).
47. Stenzl, A. *et al.* Effect of Enzalutamide plus Androgen Deprivation Therapy on Health-related Quality of Life in Patients with Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer: An Analysis of the ARCHES Randomised, Placebo-controlled, Phase 3 Study. *Eur. Urol.* **78**, 603–614 (2020).
48. Zytiga (abiraterone acetate) Plus Prednisone Approved for Treatment of Earlier Form of Metastatic Prostate Cancer. *Drugs.com*
<https://www.drugs.com/newdrugs/zytiga-abiraterone-acetate-plus-prednisone-approved-earlier-metastatic-prostate-cancer-4697.html>.
49. Wang, Z. *et al.* Targeting prostate cancer stem-like cells by an immunotherapeutic platform based on immunogenic peptide-sensitized

BIBLIOGRAFIA

- dendritic cells-cytokine-induced killer cells. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 123 (2020).
50. Culig, Z. Molecular Mechanisms of Enzalutamide Resistance in Prostate Cancer. *Curr. Mol. Biol. Rep.* **3**, 230–235 (2017).
51. Vander Ark, A., Cao, J. & Li, X. Mechanisms and Approaches for Overcoming Enzalutamide Resistance in Prostate Cancer. *Front. Oncol.* **8**, 180 (2018).
52. Jernberg, E., Bergh, A. & Wikström, P. Clinical relevance of androgen receptor alterations in prostate cancer. *Endocr. Connect.* **6**, R146–R161 (2017).
53. Chen, C. D. *et al.* Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* **10**, 33–39 (2004).
54. Snow, O. *et al.* Androgen receptor plasticity and its implications for prostate cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.* **81**, (2019).
55. Mollica, V. *et al.* Molecular Mechanisms Related to Hormone Inhibition Resistance in Prostate Cancer. *Cells* **8**, E43 (2019).
56. Balbas, M. D. *et al.* Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. *eLife* **2**, e00499 (2013).

57. Henzler, C. *et al.* Truncation and constitutive activation of the androgen receptor by diverse genomic rearrangements in prostate cancer. *Nat. Commun.* **7**, 13668 (2016).
58. De Laere, B. *et al.* Comprehensive Profiling of the Androgen Receptor in Liquid Biopsies from Castration-resistant Prostate Cancer Reveals Novel Intra-AR Structural Variation and Splice Variant Expression Patterns. *Eur. Urol.* **72**, 192–200 (2017).
59. Galletti, G., Leach, B. I., Lam, L. & Tagawa, S. T. Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Treat. Rev.* **57**, 16–27 (2017).
60. Robinson, D. *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* **161**, 1215–1228 (2015).
61. Guo, Z. *et al.* A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res.* **69**, 2305–2313 (2009).
62. Djusberg, E. *et al.* High levels of the AR-V7 Splice Variant and Co-Amplification of the Golgi Protein Coding YIPF6 in AR Amplified Prostate Cancer Bone Metastases. *The Prostate* **77**, 625–638 (2017).

BIBLIOGRAFIA

63. Cao, S., Zhan, Y. & Dong, Y. Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **23**, T199–T210 (2016).
64. Hu, R. *et al.* Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* **72**, 3457–3462 (2012).
65. Cato, L. *et al.* ARv7 Represses Tumor-Suppressor Genes in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Cell* **35**, 401–413.e6 (2019).
66. Efsthathiou, E. *et al.* Molecular characterization of enzalutamide-treated bone metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* **67**, 53–60 (2015).
67. Kohli, M. *et al.* Androgen Receptor Variant AR-V9 Is Coexpressed with AR-V7 in Prostate Cancer Metastases and Predicts Abiraterone Resistance. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 4704–4715 (2017).
68. Nakazawa, M., Antonarakis, E. S. & Luo, J. Androgen receptor splice variants in the era of enzalutamide and abiraterone. *Horm. Cancer* **5**, 265–273 (2014).
69. Dehm, S. M., Schmidt, L. J., Heemers, H. V., Vessella, R. L. & Tindall, D. J. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active

androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance.

Cancer Res. **68**, 5469–5477 (2008).

70. Cao, B. *et al.* Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget* **5**, 1646–1656 (2014).
71. Li, Y. *et al.* Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* **73**, 483–489 (2013).
72. Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21807635/>.
73. Antonarakis, E. S. *et al.* AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1028–1038 (2014).
74. Seitz, A. K. *et al.* AR-V7 in Peripheral Whole Blood of Patients with Castration-resistant Prostate Cancer: Association with Treatment-specific Outcome Under Abiraterone and Enzalutamide. *Eur. Urol.* **72**, 828–834 (2017).
75. Takeuchi, T., Okuno, Y., Hattori-Kato, M., Zaitso, M. & Mikami, K. Detection of AR-V7 mRNA in whole blood may not predict the

BIBLIOGRAFIA

- effectiveness of novel endocrine drugs for castration-resistant prostate cancer. *Res. Rep. Urol.* **8**, 21–25 (2016).
76. Carceles-Cordon, M. *et al.* Cellular rewiring in lethal prostate cancer: the architect of drug resistance. *Nat. Rev. Urol.* **17**, 292–307 (2020).
77. Sun, F. *et al.* Androgen receptor splice variant AR3 promotes prostate cancer via modulating expression of autocrine/paracrine factors. *J. Biol. Chem.* **289**, 1529–1539 (2014).
78. Kong, D. *et al.* Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes. *The Prostate* **75**, 161–174 (2015).
79. Parikh, M. *A Phase II Study With a Lead-in Safety Phase of Abiraterone in Combination With PDMX1001/Niclosamide in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC)*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02807805> (2022).
80. Parikh, M. *A Safety Trial of Enzalutamide in Combination With PDMX1001/Niclosamide in Castration-Resistant Prostate Cancer (CRPC)*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03123978> (2022).

81. Liao, Y. *et al.* Targeting GRP78-dependent AR-V7 protein degradation overcomes castration-resistance in prostate cancer therapy. *Theranostics* **10**, 3366–3381 (2020).
82. Carver, B. S. *et al.* Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer Cell* **19**, 575–586 (2011).
83. Mahon, K. L., Henshall, S. M., Sutherland, R. L. & Horvath, L. G. Pathways of chemotherapy resistance in castration-resistant prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, R103–R123 (2011).
84. Kroon, J. *et al.* Glucocorticoid receptor antagonism reverts docetaxel resistance in human prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **23**, 35–45 (2016).
85. Jeong, C. W. *et al.* The role of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in androgen insensitive prostate cancer cells. *Urol. Oncol.* **31**, 1448–1456 (2013).
86. Sartor, O. & de Bono, J. S. Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 645–657 (2018).

BIBLIOGRAFIA

87. Martello, L. A. *et al.* Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation. *Cancer Res.* **63**, 1207–1213 (2003).
88. Ah, D., H, B. & A, Z. Cellular plasticity and the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **15**, (2018).
89. Haffner, M. C. *et al.* Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **18**, 79–92 (2021).
90. Fanelli, G. N., Naccarato, A. G. & Scatena, C. Recent Advances in Cancer Plasticity: Cellular Mechanisms, Surveillance Strategies, and Therapeutic Optimization. *Front. Oncol.* **0**, (2020).
91. Marusyk, A., Janiszewska, M. & Polyak, K. Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance. *Cancer Cell* **37**, 471–484 (2020).
92. Wu, B. *et al.* Intratumoral heterogeneity and genetic characteristics of prostate cancer. *Int. J. Cancer* **146**, 3369–3378 (2020).
93. Beltran, H. *et al.* Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat. Med.* **22**, 298–305 (2016).
94. Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J. & DePinho, R. A. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev.* **32**, 1105–1140 (2018).

95. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
96. Jung, Y. *et al.* Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat. Commun.* **4**, 1795 (2013).
97. Woo, J. R. *et al.* Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. *J. Transl. Med.* **12**, 30 (2014).
98. Idorn, M., Køllgaard, T., Kongsted, P., Sengeløv, L. & Thor Straten, P. Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **63**, 1177–1187 (2014).
99. Craig, M., Ying, C. & Loberg, R. D. Co-inoculation of prostate cancer cells with U937 enhances tumor growth and angiogenesis in vivo. *J. Cell. Biochem.* **103**, 1–8 (2008).
100. Gannon, P. O. *et al.* Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J. Immunol. Methods* **348**, 9–17 (2009).

BIBLIOGRAFIA

101. Fujii, T. *et al.* Immunohistochemical analysis of inflammatory cells in benign and precancerous lesions and carcinoma of the prostate. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* **80**, 119–126 (2013).
102. Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 162–174 (2009).
103. Ahmed, A. A. *et al.* The extracellular matrix protein TGFBI induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel. *Cancer Cell* **12**, 514–527 (2007).
104. Lau, E. Y. T. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Tumor-Initiating Cell Plasticity in Hepatocellular Carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 Signaling. *Cell Rep.* **15**, 1175–1189 (2016).
105. Qi, J. *et al.* Siah2-dependent concerted activity of HIF and FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype and neuroendocrine prostate tumors. *Cancer Cell* **18**, 23–38 (2010).
106. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–337 (2013).
107. Wang, W. *et al.* Down-regulation of E-cadherin enhances prostate cancer chemoresistance via Notch signaling. *Chin. J. Cancer* **36**, 35 (2017).
108. The Spread of Tumours in the Human Body. *Nature* **133**, 743–743 (1934).

109. Aguirre-Ghiso, J. A. & Sosa, M. S. Emerging Topics on Disseminated Cancer Cell Dormancy and the Paradigm of Metastasis. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2**, 377–393 (2018).
110. Park, S.-Y. & Nam, J.-S. The force awakens: metastatic dormant cancer cells. *Exp. Mol. Med.* **52**, 569–581 (2020).
111. Aguirre-Ghiso, J. A., Liu, D., Mignatti, A., Kovalski, K. & Ossowski, L. Urokinase Receptor and Fibronectin Regulate the ERKMAPK to p38MAPK Activity Ratios That Determine Carcinoma Cell Proliferation or Dormancy In Vivo. *Mol. Biol. Cell* **12**, 863 (2001).
112. Giancotti, F. G. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* **155**, 750–764 (2013).
113. Cheong, H., Lu, C., Lindsten, T. & Thompson, C. B. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat. Biotechnol.* **30**, 10.1038/nbt.2285 (2012).
114. Weckermann, D. *et al.* Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 1549–1556 (2009).

BIBLIOGRAFIA

115. Singh, D. K., Patel, V. G., Oh, W. K. & Aguirre-Ghiso, J. A. Prostate Cancer Dormancy and Reactivation in Bone Marrow. *J. Clin. Med.* **10**, 2648 (2021).
116. Tiwari, R., Manzar, N. & Ateeq, B. Dynamics of Cellular Plasticity in Prostate Cancer Progression. *Front. Mol. Biosci.* **7**, 130 (2020).
117. Yadav, S. S., Stockert, J. A., Hackert, V., Yadav, K. K. & Tewari, A. K. Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *Urol. Oncol.* **36**, 349–360 (2018).
118. Ojo, D., Lin, X., Wong, N., Gu, Y. & Tang, D. Prostate Cancer Stem-like Cells Contribute to the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers* **7**, 2290–2308 (2015).
119. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
120. Jia, W. *et al.* Epithelial-mesenchymal Transition (EMT) Markers in Human Pituitary Adenomas Indicate a Clinical Course. *Anticancer Res.* **35**, 2635–2643 (2015).
121. Cao, Z. & Kyprianou, N. Mechanisms navigating the TGF- β pathway in prostate cancer. *Asian J. Urol.* **2**, 11–18 (2015).

122. Arisan, E. D. *et al.* Upregulated Wnt-11 and miR-21 Expression Trigger Epithelial Mesenchymal Transition in Aggressive Prostate Cancer Cells. *Biology* **9**, 52 (2020).
123. Ruscetti, M., Quach, B., Dadashian, E. L., Mulholland, D. J. & Wu, H. Tracking and Functional Characterization of Epithelial-Mesenchymal Transition and Mesenchymal Tumor Cells during Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res.* **75**, 2749–2759 (2015).
124. Drivalos, A. *et al.* Expression of α 5-integrin, α 7-integrin, E-cadherin, and N-cadherin in localized prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **34**, 165.e11-165.e18 (2016).
125. Zeisberg, M., Shah, A. A. & Kalluri, R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J. Biol. Chem.* **280**, 8094–8100 (2005).
126. Komiya, A. *et al.* Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **16**, 37–44 (2009).
127. Vlachostergios, P. J., Puca, L. & Beltran, H. Emerging Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **19**, 32 (2017).

BIBLIOGRAFIA

128. Merkens, L. *et al.* Aggressive variants of prostate cancer: underlying mechanisms of neuroendocrine transdifferentiation. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **41**, 46 (2022).
129. Gustafson, W. C. *et al.* Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A. *Cancer Cell* **26**, 414–427 (2014).
130. Mu, P. *et al.* SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53- and RB1-deficient prostate cancer. *Science* **355**, 84–88 (2017).
131. Bianchi-Frias, D., Hernandez, S. A., Coleman, R., Wu, H. & Nelson, P. S. The landscape of somatic chromosomal copy number aberrations in GEM models of prostate carcinoma. *Mol. Cancer Res. MCR* **13**, 339–347 (2015).
132. Ku, S. Y. *et al.* Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science* **355**, 78–83 (2017).
133. Schroeder, A. *et al.* Loss of androgen receptor expression promotes a stem-like cell phenotype in prostate cancer through STAT3 signaling. *Cancer Res.* **74**, 1227–1237 (2014).
134. Nakashima, J. *et al.* Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **6**, 2702–2706 (2000).

135. Ishikura, N. *et al.* Establishment and characterization of an androgen receptor-dependent, androgen-independent human prostate cancer cell line, LNCaP-CS10. *The Prostate* **70**, 457–466 (2010).
136. Iwasa, Y., Mizokami, A., Miwa, S., Koshida, K. & Namiki, M. Establishment and characterization of androgen-independent human prostate cancer cell lines, LN-REC4 and LNCaP-SF, from LNCaP. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **14**, 233–239 (2007).
137. Liu, T. *et al.* Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol. Cell. Biochem.* **340**, 265–273 (2010).
138. Machioka, K. *et al.* Establishment and characterization of two cabazitaxel-resistant prostate cancer cell lines. *Oncotarget* **9**, 16185–16196 (2018).
139. Mohr, L. *et al.* Generation of Prostate Cancer Cell Models of Resistance to the Anti-mitotic Agent Docetaxel. *J. Vis. Exp. JoVE* (2017)
doi:10.3791/56327.
140. Horoszewicz, J. S. *et al.* LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* **43**, 1809–1818 (1983).
141. Sramkoski, R. M. *et al.* A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **35**, 403–409 (1999).

BIBLIOGRAFIA

142. Tai, S. *et al.* PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate* **71**, 1668–1679 (2011).
143. Cato, L. ARv7 Represses Tumor-Suppressor Genes in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Cell* **20** (2019).
144. Kohli, M. *et al.* Androgen Receptor Variant AR-V9 Is Coexpressed with AR-V7 in Prostate Cancer Metastases and Predicts Abiraterone Resistance. *Clin. Cancer Res.* **23**, 4704–4715 (2017).
145. Parker, C. & Sartor, O. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **365**, 767 (2011).
146. Loriot, Y. *et al.* Antitumour activity of abiraterone acetate against metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel and enzalutamide (MDV3100). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **24**, 1807–1812 (2013).
147. Scher, H. I. *et al.* Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1187–1197 (2012).
148. Tran, C. *et al.* Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* **324**, 787–790 (2009).
149. Chen, M. *et al.* Abiraterone, Orteronel, Enzalutamide and Docetaxel: Sequential or Combined Therapy? *Front. Pharmacol.* **13**, 843110 (2022).

150. Soest, R. J. van *et al.* Cross-resistance between taxanes and new hormonal agents abiraterone and enzalutamide may affect drug sequence choices in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur. J. Cancer* **49**, 3821–3830 (2013).
151. van Soest, R. J. *et al.* Targeting the Androgen Receptor Confers In Vivo Cross-resistance Between Enzalutamide and Docetaxel, But Not Cabazitaxel, in Castration-resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **67**, 981–985 (2015).
152. Zhao, J. *et al.* Cross-Resistance Among Next-Generation Antiandrogen Drugs Through the AKR1C3/AR-V7 Axis in Advanced Prostate Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **19**, 1708–1718 (2020).
153. Gillet, J.-P., Varma, S. & Gottesman, M. M. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 452–458 (2013).
154. Cai, C. & Balk, S. P. Intratumoral androgen biosynthesis in prostate cancer pathogenesis and response to therapy. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, R175–182 (2011).
155. Chen, E. J. *et al.* Abiraterone treatment in castration-resistant prostate cancer selects for progesterone responsive mutant androgen receptors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 1273–1280 (2015).

BIBLIOGRAFIA

- 156.Li, Y. *et al.* AR intragenic deletions linked to androgen receptor splice variant expression and activity in models of prostate cancer progression. *Oncogene* **31**, 4759–4767 (2012).
- 157.Katsuoka, Y., Hoshino, H., Shiramizu, M., Sakabe, K. & Seiki, K. Autoradiographic and cytochemical localization of androgen in human prostatic cancer cell lines. *Urology* **28**, 228–231 (1986).
- 158.Demura, T. *et al.* Establishment and characterization of monoclonal antibody against androgen receptor. *J. Steroid Biochem.* **33**, 845–851 (1989).
- 159.Smith, R. *et al.* Enzalutamide response in a panel of prostate cancer cell lines reveals a role for glucocorticoid receptor in enzalutamide resistant disease. *Sci. Rep.* **10**, 21750 (2020).
- 160.Wang, Y. *et al.* Multivalent Peptoid Conjugates Which Overcome Enzalutamide Resistance in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **76**, 5124–5132 (2016).
- 161.Ghashghaei, M. *et al.* Enhanced radiosensitization of enzalutamide via schedule dependent administration to androgen-sensitive prostate cancer cells. *The Prostate* **78**, 64–75 (2018).

- 162.Salami, J. *et al.* Androgen receptor degradation by the proteolysis-targeting chimera ARCC-4 outperforms enzalutamide in cellular models of prostate cancer drug resistance. *Commun. Biol.* **1**, 100 (2018).
- 163.Claessens, F. *et al.* Emerging mechanisms of enzalutamide resistance in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 712–716 (2014).
- 164.Kirby, M., Hirst, C. & Crawford, E. D. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int. J. Clin. Pract.* **65**, 1180–1192 (2011).
- 165.Antonarakis, E. S. *et al.* Androgen Receptor Splice Variant 7 and Efficacy of Taxane Chemotherapy in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* **1**, 582–591 (2015).
- 166.Jeong, C. W. *et al.* Importance of androgen-deprivation therapy during enzalutamide treatment in men with metastatic castration-resistant prostate cancer following chemotherapy: results from retrospective, multicenter data. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **22**, 150–158 (2019).
- 167.Morris, M. J. *et al.* Alliance A031201: A phase III trial of enzalutamide (ENZ) versus enzalutamide, abiraterone, and prednisone (ENZ/AAP) for metastatic castration resistant prostate cancer (mCRPC). *J. Clin. Oncol.* **37**, 5008–5008 (2019).

BIBLIOGRAFIA

168. Taplin, M. E. *et al.* Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1393–1398 (1995).
169. Gregory, C. W., Johnson, R. T., Mohler, J. L., French, F. S. & Wilson, E. M. Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res.* **61**, 2892–2898 (2001).
170. Chen, C. D. *et al.* Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* **10**, 33–39 (2004).
171. Stanbrough, M. *et al.* Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* **66**, 2815–2825 (2006).
172. Cai, C., Wang, H., Xu, Y., Chen, S. & Balk, S. P. Reactivation of androgen receptor-regulated TMPRSS2:ERG gene expression in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* **69**, 6027–6032 (2009).
173. Cai, C. *et al.* Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1. *Cancer Cell* **20**, 457–471 (2011).
174. Perner, S. *et al.* Adaptive responses of androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* **6**, 35542–35555 (2015).

- 175.Östling, P. *et al.* Systematic Analysis of MicroRNAs Targeting the Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **71**, 1956–1967 (2011).
- 176.Soifer, H. S. *et al.* Direct Regulation of Androgen Receptor Activity by Potent CYP17 Inhibitors in Prostate Cancer Cells*. *J. Biol. Chem.* **287**, 3777–3787 (2012).
- 177.Barrie, S. E. *et al.* Pharmacology of novel steroidal inhibitors of cytochrome P450(17) alpha (17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **50**, 267–273 (1994).
- 178.Hu, R. *et al.* Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* **72**, 3457–3462 (2012).
- 179.Bradley, C. A. AR-V7 - repress to impress. *Nat. Rev. Urol.* **16**, 269 (2019).
- 180.Agus, D. B. *et al.* Prostate Cancer Cell Cycle Regulators: Response to Androgen Withdrawal and Development of Androgen Independence. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 1869–1876 (1999).
- 181.Scher, H. I. & Sawyers, C. L. Biology of Progressive, Castration-Resistant Prostate Cancer: Directed Therapies Targeting the Androgen-Receptor Signaling Axis. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8253–8261 (2005).

BIBLIOGRAFIA

182. Blute, M. L. *et al.* Persistence of senescent prostate cancer cells following prolonged neoadjuvant androgen deprivation therapy. *PLoS One* **12**, e0172048 (2017).
183. Shiota, M. *et al.* Crosstalk between epithelial-mesenchymal transition and castration resistance mediated by Twist1/AR signaling in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **22**, 889–900 (2015).
184. Buck, S. A. J., Koolen, S. L. W., Mathijssen, R. H. J., de Wit, R. & van Soest, R. J. Cross-resistance and drug sequence in prostate cancer. *Drug Resist. Updat.* **56**, 100761 (2021).
185. Badrising, S. *et al.* Clinical activity and tolerability of enzalutamide (MDV3100) in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer who progress after docetaxel and abiraterone treatment. *Cancer* **120**, 968–975 (2014).
186. Bianchini, D. *et al.* Antitumour activity of enzalutamide (MDV3100) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC) pre-treated with docetaxel and abiraterone. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **50**, 78–84 (2014).
187. Nadal, R., Schweizer, M., Kryvenko, O. N., Epstein, J. I. & Eisenberger, M. A. Small cell carcinoma of the prostate. *Nat. Rev. Urol.* **11**, 213–219 (2014).

- 188.Suzman, D. L., Lubner, B., Schweizer, M. T., Nadal, R. & Antonarakis, E. S. Clinical activity of enzalutamide versus docetaxel in men with castration-resistant prostate cancer progressing after abiraterone. *The Prostate* **74**, 1278–1285 (2014).
- 189.Lombard, A. P. *et al.* Intra versus Inter Cross-resistance Determines Treatment Sequence between Taxane and AR-Targeting Therapies in Advanced Prostate Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 2197–2205 (2018).
- 190.Schmidt, K. T., Huitema, A. D. R., Chau, C. H. & Figg, W. D. Resistance to second-generation androgen receptor antagonists in prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **18**, 209–226 (2021).
- 191.Small, E. J. *et al.* Apalutamide and overall survival in non-metastatic castration-resistant prostate cancer. *Ann. Oncol.* **30**, 1813–1820 (2019).
- 192.Posadas, E. M. *et al.* Pharmacokinetics, Safety, and Antitumor Effect of Apalutamide with Abiraterone Acetate plus Prednisone in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Phase Ib Study. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **26**, 3517–3524 (2020).
- 193.Yamada, Y. *et al.* Abiraterone acetate after progression with enzalutamide in chemotherapy-naïve patients with metastatic castration-resistant

BIBLIOGRAFIA

- prostate cancer: a multi-center retrospective analysis. *BMC Res. Notes* **9**, 471 (2016).
- 194.Scher, H. I. *et al.* Circulating tumor cell biomarker panel as an individual-level surrogate for survival in metastatic castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 1348–1355 (2015).
- 195.Teply, B. A. & Hauke, R. J. Chemotherapy options in castration-resistant prostate cancer. *Indian J. Urol. IJU J. Urol. Soc. India* **32**, 262–270 (2016).
- 196.Magadoux, L., Isambert, N., Plenchette, S., Jeannin, J. F. & Laurens, V. Emerging targets to monitor and overcome docetaxel resistance in castration resistant prostate cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **45**, 919–928 (2014).
- 197.Komura, K. *et al.* Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 6259–6264 (2016).
- 198.Nouri, M. *et al.* Androgen-targeted therapy-induced epithelial mesenchymal plasticity and neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer: an opportunity for intervention. *Front. Oncol.* **4**, 370 (2014).

- 199.Jeter, C. R. *et al.* NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* **30**, 3833–3845 (2011).
- 200.Tang, Y., Hamburger, A. W., Wang, L., Khan, M. A. & Hussain, A. Androgen deprivation and stem cell markers in prostate cancers. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **3**, 128–138 (2009).
- 201.Seiler, D. *et al.* Enrichment of putative prostate cancer stem cells after androgen deprivation: upregulation of pluripotency transactivators concurs with resistance to androgen deprivation in LNCaP cell lines. *The Prostate* **73**, 1378–1390 (2013).
- 202.Verma, S. *et al.* Androgen Deprivation Induces Transcriptional Reprogramming in Prostate Cancer Cells to Develop Stem Cell-Like Characteristics. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E9568 (2020).
- 203.Lin, S.-R. *et al.* EGFR-upregulated LIFR promotes SUCLG2-dependent castration resistance and neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Oncogene* **39**, 6757–6775 (2020).
- 204.KOMIYA, A. *et al.* The prognostic significance of loss of the androgen receptor and neuroendocrine differentiation in prostate biopsy specimens

BIBLIOGRAFIA

- among castration-resistant prostate cancer patients. *Mol. Clin. Oncol.* **1**, 257–262 (2013).
205. Aggarwal, R. *et al.* Clinical and Genomic Characterization of Treatment-Emergent Small-Cell Neuroendocrine Prostate Cancer: A Multi-institutional Prospective Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **36**, 2492–2503 (2018).
206. Abida, W. *et al.* Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 11428–11436 (2019).
207. Shang, Z. *et al.* A switch from CD44⁺ cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer. *Oncotarget* **6**, 1202–1216 (2015).
208. Paranjape, A. N. *et al.* Inhibition of FOXC2 restores epithelial phenotype and drug sensitivity in prostate cancer cells with stem-cell properties. *Oncogene* **35**, 5963–5976 (2016).
209. McKeithen, D., Graham, T., Chung, L. W. K. & Odero-Marah, V. Snail transcription factor regulates neuroendocrine differentiation in LNCaP prostate cancer cells. *The Prostate* **70**, 982–992 (2010).
210. Akamatsu, S. *et al.* The Placental Gene PEG10 Promotes Progression of Neuroendocrine Prostate Cancer. *Cell Rep.* **12**, 922–936 (2015).

211. Tanaka, H. *et al.* Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat. Med.* **16**, 1414–1420 (2010).
212. Tso, C. L. *et al.* Androgen deprivation induces selective outgrowth of aggressive hormone-refractory prostate cancer clones expressing distinct cellular and molecular properties not present in parental androgen-dependent cancer cells. *Cancer J. Sudbury Mass* **6**, 220–233 (2000).
213. Wu, J. *et al.* Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Transl. Oncol.* **14**, 100899 (2021).