

Papel del antiandrógeno apalutamida en la regulación de la expresión génica en células de cáncer de próstata.

Óscar González Personat^a, Santiago Ropero Salinas, Begoña Colás Escudero

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. oscar.gonzalezp@edu.uah.es

Palabras clave: receptor de andrógenos; cáncer de próstata resistente a la castración, resistencia, apalutamida; mecanismos moleculares; RNAseq

Resumen

El cáncer de próstata (CP) es una de las neoplasias malignas más comunes en hombres en los países occidentales, causante de numerosas muertes. Los tratamientos actuales van dirigidos a inhibir la vía del receptor de andrógenos (RA), debido a su papel en el desarrollo normal y patológico de la próstata. Aunque en un primer momento responden favorablemente a estos tratamientos, en muchos casos se alcanza un estadio más grave de la enfermedad conocido como cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) donde los tratamientos son paliativos. Por ello el estudio de los mecanismos moleculares responsables de estos procesos de resistencia es prioritario para poder desarrollar nuevas terapias, así como mejorar las ya existentes. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto del antiandrógeno apalutamida sobre la expresión génica en dos líneas celulares de CP que representan distintos estadios de la enfermedad y con distinta sensibilidad a la apalutamida con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares por lo que las células de cáncer de próstata desarrollan resistencia a los tratamientos hormonales. Según los datos obtenidos en un RNAseq, el tratamiento con apalutamida cambiaba la expresión de un mayor número de genes en la línea celular sensible LNCaP con respecto a la línea celular resistente 22Rv1. Con el objetivo de validar estos resultados, se llevó a cabo una criba de esos genes, seleccionando aquellos cuyos cambios de expresión eran significativos y cuya función era relevante y pudiera ayudarnos a explicar las diferencias de sensibilidad al tratamiento. Mediante RT-qPCR se consiguió validar los cambios de expresión de los genes *KLK2* y *TP53INP1* en la línea sensible LNCaP, cuya función podría ayudarnos a entender la sensibilidad que presenta la línea celular LNCaP. Estudios futuros son necesarios para determinar el alcance de su importancia y su futuro uso como dianas terapéuticas.

Cita: González Personat, Óscar; Ropero Salinas, Santiago; Colás Escudero, Begoña (2024) Papel del antiandrógeno apalutamida en la regulación de la expresión génica en células de cáncer de próstata. *dianas* 13 (2): e202409fp02. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202409fp02 <https://dianas.web.uah.es/journal/e202409fp02>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © González-Personat, Ropero-Salinas S, Colás-Escudero B. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

El cáncer de próstata (CP) supone un grave problema para la sociedad actual debido a que es la principal causa de muerte en hombres de mediana edad en los países occidentales. Se considera fundamentalmente una enfermedad asociada a la edad y es por ello por lo que su incidencia ha aumentado en los últimos años como consecuencia del incremento de la esperanza de vida. Existen además otros factores de riesgo que facilitan la predisposición a padecer esta enfermedad como son las alteraciones genéticas, la etnia y la obesidad [1].

El CP se caracteriza por ser una enfermedad heterogénea y multifocal [2]. Estos hechos hacen que el abordaje terapéutico sea complicado y varíe en función del estadio de la enfermedad en el que sea diagnosticada. En estadios tempranos de la enfermedad, los tratamientos estándar suelen ser prostatectomía radical y radioterapia, mientras que en estados más avanzados o metastásicos los tratamientos se basan en actuar contra la vía del receptor de andrógenos (RA) [1].

Los andrógenos como la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) son los responsables de la homeostasis y desarrollo fisiológico normal de la próstata, pero también juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Estas hormonas ejercen su función mediante su unión a RA que es un factor de transcripción que consta de tres dominios: un dominio N-terminal, un dominio de unión al ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) y un dominio de unión al DNA (DBD, *DNA Binding Domain*). Los ligandos (testosterona y DHT) se unen al LBD iniciando un cambio conformacional en RA que provoca la disociación de las chaperonas a las que está unido en su forma inactiva, permitiendo su homodimerización y translocación al núcleo, donde ejerce su función como factor de transcripción al unirse a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a andrógenos (ERA). Esto promueve la transcripción de genes involucrados en la proliferación de la próstata, así como de genes antiapoptóticos, favoreciendo la

progresión de la enfermedad [3]. Para la regulación de la expresión génica, el RA interacciona con un gran número de correguladores entre los que encontramos otros factores de transcripción y las proteínas que regulan las modificaciones epigenéticas. [4].

El conocimiento del papel que juega el RA en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata ha impulsado la creación de terapias dirigidas a esta diana molecular en aquellos pacientes que presentan un estadio más avanzado del tumor. Estos tratamientos consisten en la ablación androgénica, que consigue disminuir los niveles séricos de andrógenos a concentraciones por debajo de la cual no es capaz de activar al RA, junto con el uso de antiandrógenos. Esta terapia es conocida como terapia de privación androgénica (TDA) y, a pesar del éxito de estos abordajes terapéuticos, entre el 20-50% de los pacientes se hacen resistentes a los tratamientos y entran en la fase conocida como cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), que constituye la principal causa de mortalidad [5]. Estos pacientes son tratados con antiandrógenos de segunda generación como la enzalutamida; y de tercera generación como la apalutamida [3]. Se ha visto que la apalutamida aumenta la supervivencia en hombres que padecen CP y por ello su uso fue aprobado en Estados Unidos en 2018. El mecanismo de acción de la apalutamida consiste en unirse al dominio LBD del RA, impidiendo la unión de sus ligandos naturales y por lo tanto imposibilitando su homodimerización y translocación al núcleo, bloqueando de esta manera la actividad transcripcional de RA [6].

En el transcurso de estos tratamientos, algunos pacientes desarrollan una forma más agresiva y fatal de la enfermedad denominado cáncer de próstata neuroendocrino (CPNE), que se caracteriza por la pérdida del RA y por presentar características neuroendocrinas. Los tumores CPNE o de células pequeñas representan solo el 2% de incidencia en el momento del diagnóstico, pero el tratamiento continuado con los antiandrógenos mencionados anteriormente y el posterior desarrollo de resistencia ha disparado a un 30% la incidencia del CPNE inducido por la terapia [7]. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales el CP se hace resistente a estos tratamientos es prioritario ya que contribuirá a mejorar los tratamientos existentes y al desarrollo de nuevas terapias.

El trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación ha confirmado que existen diferencias de sensibilidad a la apalutamida dependiendo del estadio de la enfermedad y que en ambos casos la apalutamida sigue ejerciendo su acción al bloquear la translocación de RA al núcleo. Teniendo en cuenta la información recabada, el objetivo de este trabajo consiste en dilucidar el mecanismo molecular por el que la apalutamida ejerce un efecto antitumoral en una línea sensible al tratamiento, así como encontrar el desencadenante de la resistencia observada en un modelo de CPRC.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Para la realización de este estudio se han usado líneas celulares de cáncer de próstata que presentan diferente sensibilidad a los andrógenos: i) LNCaP: Línea celular extraída de un paciente de 50 años afectado por un cáncer de próstata metastásico en un ganglio linfático que se caracterizan porque expresan el RA y responden al tratamiento de privación de androgénica. ii) 22Rv1: Línea celular que representa un modelo de CPRC y se caracteriza por expresar la variante de splicing AR-V7. Las dos líneas celulares fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

Estas células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) de Sigma-Aldrich a 37 C y 5% de CO₂ y al que se le añadió 0,25mg/ml de penicilina, 0,25mg/ml de estreptomina y 2,5 mg/ml de fungizona y suero fetal bovino (FBS) a una concentración final del 10%. Para la realización de cada uno de los experimentos realizados con estas células, primero fueron sembradas en frascos de mantenimiento y, una vez alcanzaron la confluencia, se levantaron y sembraron en distintas placas dependiendo del experimento a realizar. Para levantarlas se us  tripsina-EDTA, encargada de romper los puentes establecidos entre las células y el frasco de mantenimiento, y se incubó a 37 C durante 5 minutos. Si no se realizaba ninguna siembra el medio era cambiado cada 2 días para permitir el adecuado crecimiento de las células y si estaban confluentes se realizaba un pase de mantenimiento.

Análisis de la expresión génica

Extracción de RNA

Se extrajo RNA de células tratadas con el fármaco apalutamida. La extracción se realizó con el kit comercial NZY total isolation RNA kit de NZYtech siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez eluido en agua libre de RNAsas se midió la concentración utilizando un Nanodrop. Las muestras se guardaron a -20 C para su uso a corto plazo, o a -80 C para almacenarlo a largo plazo.

Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA, a partir de entre 3 y 4  g de RNA total, se realizó con el kit comercial NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit de NZYtech de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Este proceso

consisti3 en una incubaci3n durante 10 minutos a 25°C, posteriormente se incub3 durante 10 minutos a 55°C para la síntesis de cDNA por la transcriptasa inversa seguido de una reacci3n de 5 minutos a 85°C para inactivar la enzima. Finalmente se a adi3 1 µl de NZY RNase H y se incub3 durante 20 minutos a 37°C para eliminar el RNA de la muestra.

Cuantificaci3n de la expresi3n génica por PCR a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) permite determinar la cantidad de cDNA de una muestra mediante una cuantificaci3n relativa. Para realizar esta técnica se emple3 un termociclador QuantStudio Q5S. Los oligos usados para la reacci3n fueron adquiridos en Sigma-Aldrich e Invitrogen y sus secuencias se encuentran especificadas en la Tabla 1.

Primers	Oligo sentido (5'-3')	Oligo antisentido (3'-5')
PPIA	GACCCAACACAAATGGTTC	AGTCAGCAATGGTGATCTTC
TP53INP1	GTCACCTACTGAGCACCTT	AACCAGCTCTCCTCCATTGG
KLK2	GGCTCTGGACAGGTGGTAAA	GGCCCCATGATGTGATACCT
MYC	GTAGTGGAACCAGCAGCC	CCTCCTCGTCGCAGTAGAAA
STEAP 4	ATGACAGCAAAGCCAAGCAA	GCTGCCATGAGTGATCCTTG
BAMBI	ACATCTGCCAAGCCCAACAG	GAGAGAGAACATCGTGCAGC

Tabla 1.- Secuencias de los oligos usados en el estudio de la expresi3n en qRT-PCR.

Las reacciones de cuantificaci3n por PCR a tiempo real se realizaron en un volumen final de 10 µl. Cada mezcla de reacci3n contenía 2 µl de cDNA, 5 µl de 2x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) 0,5 µl de cada uno de los oligos específicos para cada gen, y 2 µl de agua. Las condiciones de reacci3n fueron las siguientes: 95 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificaci3n, cada uno de ellos a 95 °C durante 1 minuto y 60 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en cada uno de los experimentos. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando el gen de expresi3n constitutiva PPIA. El análisis de datos se realiz3 con el programa QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.2.

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se han utilizado los programas Microsoft Office Excel y GraphPadPrism 8.0.2. Para la comparaci3n de medias entre muestras independientes se utiliz3 la prueba de t-Student (estadística paramétrica).

Resultados y discusi3n

El objetivo principal de nuestro estudio ha consistido en validar los resultados obtenidos en el RNAseq realizado previamente a mi incorporaci3n en el grupo de investigaci3n, con el que se compararon los perfiles de expresi3n de líneas celulares de cáncer de pr3stata tratadas con el antiandrógeno apalutamida utilizando como control las mismas células sin tratar. Las líneas celulares que utilizamos son las células LNCaP que representan un estadio temprano de la enfermedad, y las células 22Rv1 que representan un modelo de CPRC. Los resultados previos obtenidos por el grupo de investigaci3n al que me he incorporado confirman que las células LNCaP son sensibles a la apalutamida, disminuyendo significativamente su viabilidad celular, mientras que las células 22Rv1 no responden al tratamiento. A pesar de estas diferencias de sensibilidad, sorprendentemente vieron que en ambas líneas celulares el RA no se translocaba al núcleo tras el tratamiento con la apalutamida. A raíz de estos datos decidimos profundizar en el mecanismo molecular por el cual las células LNCaP son sensibles, así como dilucidar el mecanismo por el que las células 22Rv1 se vuelven resistentes. Por tanto, la validaci3n de los cambios observados en el RNAseq podría ser útil para determinar la existencia de un gen o grupos de genes responsables tanto de la sensibilidad al fármaco en las células LNCaP, como de la resistencia a este en las células 22Rv1. De esta manera, estudios futuros centrados en estos genes podrían ayudar a solventar el problema que genera la aparici3n de esta resistencia.

Análisis y selección de los genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con el antiandrógeno apalutamida.

Ante la gran cantidad de genes que modifican su expresión en ambas líneas celulares al ser tratadas con apalutamida, lo primero que hicimos fue establecer una serie de parámetros de cribado para quedarnos con aquellos genes más relevantes que pudieran explicar los efectos vistos con anterioridad. Los parámetros elegidos son el *Log2FoldChange* que permite cuantificar el ratio de expresión entre muestras; y el *p*adj que es la corrección del pvalor que se realiza en pruebas múltiples, como es el caso del RNAseq, para eliminar los falsos positivos. El valor mínimo seleccionado del *Log2Foldchange* para aquellos cuya expresión aumenta fue de 0,5 y para los que disminuyen su expresión de -0,5 que se corresponde con una subida del 40% y una bajada del 30% respectivamente, asegurándonos así que los cambios de expresión son lo suficientemente grandes para facilitar su posterior validación; y el valor elegido por el *p*adj fue de 0,05 para quedarnos con los cambios de expresión significativos.

A continuación, analizamos el número total de genes que se expresaban diferencialmente tanto al alza como a la baja en cada línea celular tras el tratamiento con respecto a su control. En la Figura 1 observamos como en las células LNCaP el número de genes que varían significativamente su expresión es mucho mayor en comparación a los que varían en las células 22Rv1. A pesar de que estos datos eran los esperados al ser las células LNCaP un modelo sensible a estos tratamientos y las células 22Rv1 un modelo resistente al mismo, se esperaba un mayor número de genes diferencialmente expresados en las 22Rv1 que nos permitiera conocer cuáles podrían ser los mecanismos moleculares responsables de su resistencia. Esto podría deberse a la existencia de un mecanismo independiente de la se nalizaci n de RA o que, al tratarse de un modelo de CPRC, esta línea ya expresase genes responsables de que se genere dicha resistencia.

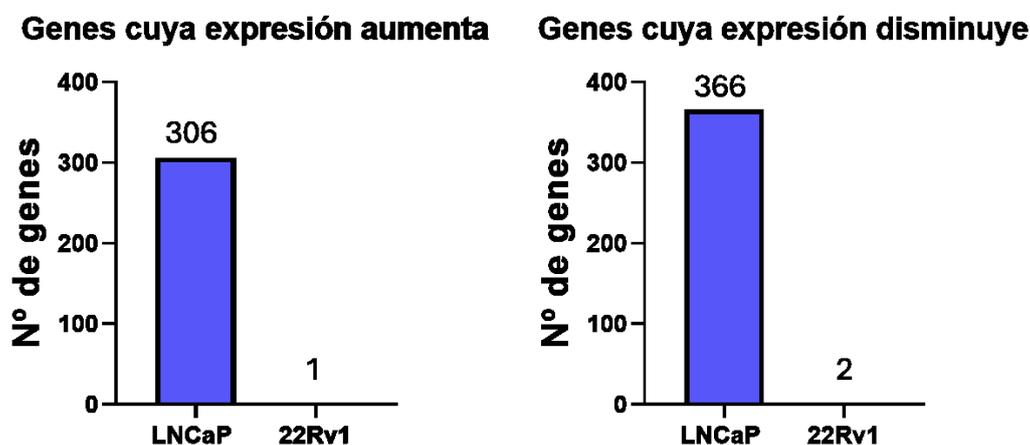


Figura 1.- Número de genes cuya expresión aumenta o disminuye al ser tratadas con la apalutamida en las células LNCaP y 22Rv1.

Una vez realizada la criba, seleccionamos aquellos genes cuya función podría ayudarnos a explicar las diferencias de sensibilidad al tratamiento observado en ambas líneas celulares. Los genes elegidos para su posterior validación en las células LNCaP fueron KLK2, TP53INP1, STEAP4 y MYC. Observando la Tabla 2, vemos que el tratamiento disminuye la expresión de KLK2, STEAP4 y MYC, mientras que en TP53INP1 la aumenta.

Genes LNCaP	KLK2	TP53INP1	STEAP 4	MYC
Log2FoldChange	-3.53	0.7	-2.91	-0.7
pvalor	5.7E-06	1.8E-06	0.0006	0.00017
padj	0.0004	0.00015	0.01	0.007

Tabla 2.- Genes seleccionados en las células LNCaP con sus respectivos valores de Log2FoldChange, pvalor y padj.

Dado que el tratamiento con apalutamida produce una disminución de la viabilidad celular en las células LNCaP, cabría esperar que el papel que estos genes desempeñan en la célula nos ayudase a explicar la sensibilidad de esta línea celular al tratamiento.

En primer lugar, KLK2 (calicreína humana 2) es una serín proteasa, miembro de la familia de las calicreínas que se expresa abundantemente en el epitelio luminal de la próstata y cuya expresión está regulada por andrógenos mediante su unión al RA, por lo que sus niveles de expresión reflejan el estado funcional y actividad del RA [8].

KLK2 suele colocalizar y coexpresarse junto a KLK3 conocido como antígeno prostático específico o PSA y al igual que este funciona como biomarcador de diagnóstico para CP [9]. La diferencia que presenta KLK2 con respecto a PSA es que sus niveles de expresión en CP son mayores en comparación a sus niveles en tejido prostático normal [10]. Este hecho ha convertido a KLK2 en objeto de estudio en CP en donde se informa que posee capacidad oncogénica al promover metástasis, invasión, crecimiento tumoral y supresión del sistema inmune. De acuerdo con esto, la disminución observada en LNCaP al tratar con apalutamida según los datos obtenidos en el RNAseq nos ayudaría a explicar la disminución de la viabilidad de esta línea celular.

Otro de los genes seleccionados, el que codifica para la proteína nuclear 1 inducida por la proteína tumoral p53 o TP53INP1, pertenece a una familia de genes compuesto por dos miembros, TP53INP1 y TP53INP2, que se encuentran altamente conservados en mamíferos. Dependiendo del contexto en el que se encuentre, TP53INP1 puede estar localizado en un compartimento subcelular diferente. En un contexto de estrés celular, TP53INP1 se localiza en el núcleo, mientras que en un contexto de autofagia se encuentra en el citosol, más concretamente en el autofagosoma. [11].

TP53INP1 está descrito como un gen diana de p53, pero también se ha visto que es capaz de activar la actividad transcripcional de p53 mostrando un bucle de retroalimentación positiva entre ambos. Estos hechos lo han convertido en un objeto de interés en el estudio del cáncer debido a que p53 está descrito como un supresor tumoral por excelencia al responder a numerosas situaciones de estrés celular como el estrés metabólico, la activación de oncogenes, el daño al DNA y la hipoxia [11,12].

Además, TP53INP1 interviene en numerosos procesos celulares tales como división celular, apoptosis, migración celular y adhesión. Estas funciones junto con el hecho de que numerosos estudios han demostrado que la expresión de TP53INP1 disminuye en diversos tipos de cáncer, hacen pensar que TP53INP1 presenta un papel como supresor de tumores. Es por eso por lo que el aumento de su expresión al tratar las células LNCaP con apalutamida respaldaría la actividad antitumoral del tratamiento.

En cuanto a STEAP4, esta metaloproteínasa perteneciente a la familia de las STEAP (antígeno epitelial transmembrana de la próstata), regula respuestas inflamatorias, el metabolismo de los ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa. Se localiza en tejido prostático normal y se ha visto que en CP se encuentra sobreexpresado, pareciendo desempeñar un papel fundamental en la progresión de la enfermedad. [13].

El hecho de que la expresión de STEAP4 aumente en CP lo ha convertido en un objeto de estudio como posible biomarcador de esta enfermedad, así como posible diana terapéutica. Los valores obtenidos en el RNAseq indican que la expresión de STEAP4 se reduce con el tratamiento. Esto, junto con el hecho de que STEAP4 muestra un papel oncogénico, lo hace un gen interesante capaz de explicar el efecto antitumoral de la apalutamida en LNCaP.

Por último, MYC está considerado como un oncogén que se encuentra activado en la gran mayoría de los cánceres humanos por mecanismos tanto genéticos como epigenéticos. MYC participa en una gran variedad de programas biológicos actuando como factor de transcripción al regular la expresión de numerosos genes [14].

Una gran variedad de estudios demuestran que la sobreexpresión de MYC es causante de la tumorigénesis en múltiples cánceres humanos al ser capaz de inducir tanto proliferación, crecimiento y diferenciación celular, así como una desregulación del microambiente tumoral y de las respuestas inmunitarias del paciente. Todo ello convierte a MYC en una diana interesante para combatir el crecimiento y proliferación tumoral en aquellos cánceres en los que se comporta como oncogén [14]. En el RNAseq los niveles de expresión de MYC disminuyen, de manera que, al tratarse de un oncogén, de nuevo los cambios en su expresión podrían ayudar a explicar el efecto generado por este tratamiento en las células LNCaP.

Genes 22Rv1	BAMBI
Log2FoldChange	1.2
pvalor	1.6E-06
padj	0.02

Tabla 3.- Genes seleccionados en las células 22Rv1 con sus respectivos valores de Log2FoldChange, pvalor y padj

En cuanto a las 22Rv1, se seleccionó el gen BAMBI, único gen diferencialmente expresado que es específico de esta línea celular y que cumple todos los parámetros antes mencionados. Los niveles de expresión obtenidos en el RNAseq muestran un aumento tras el tratamiento con apalutamida (Tabla 3).

BAMBI es una glicoproteína transmembrana considerada como un pseudoreceptor de la vía de señalización de TGF- β . Estructuralmente, su dominio de unión a ligando presenta una gran similitud al del receptor 1 del factor de crecimiento transformante β (TGF β R1). Esta similitud le permite formar heterodímeros con TGF β R1 pudiendo interferir en su vía de señalización. Sin embargo, BAMBI carece de un dominio intracelular con actividad quinasa y como consecuencia de ello, no se produce la fosforilación de los aminoácidos bloqueando la progresión de la señal aguas abajo [15].

Además de este papel sobre la vía TGF- β , se ha visto también su intervención en la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Se ha demostrado que esta vía es capaz de aumentar la expresión de BAMBI y que, además, esta proteína mejora la actividad de la propia vía existiendo un bucle de retroalimentación entre ambos. Por ello, una activación aberrante de la vía provocado por su desregulación se relaciona con un aumento de los niveles de expresión de BAMBI [15]. Está demostrado que la desregulación de la vía Wnt/ β -catenina está implicada en tumorigénesis, por ello, diversos estudios han propuesto a BAMBI como posible diana que ejerce un papel importante en la progresión tumoral. En cáncer gástrico se ha visto que los niveles de expresión de BAMBI se encuentran aumentados y se correlacionaban con el grado del tumor, así como un peor pronóstico [16]. Además, también se observó un aumento de los niveles de este gen en cáncer de ovario asociado a un comportamiento oncogénico [17].

De acuerdo con el papel oncogénico descrito por estos estudios, el aumento de expresión de esta proteína al tratar con apalutamida podría ayudarnos a explicar el hecho de que en las 22Rv1 no se produce un descenso en la viabilidad celular como sí ocurre en las células LNCaP.

Validación de los resultados de secuenciación mediante RT-qPCR.

Una vez acabado con el estudio y selección de los genes candidatos, procedimos a su validación mediante RT-qPCR, tal y como se describe en el apartado de *Materiales y Métodos* para confirmar los datos de expresión obtenidos por RNAseq. Los datos obtenidos mediante RT-qPCR validaron los cambios de expresión para KLK2 y TP53INP1 en el caso de las células LNCaP, mientras que en las células 22Rv1, aunque se observa un aumento de la expresión como ocurría con los datos del RNAseq, el resultado no es estadísticamente significativo, por lo que sería necesario realizar más experimentos (Figura 2).

Como hemos mencionado anteriormente, KLK2 tiene un papel oncogénico que lo convierte en un marcador tumoral de mal pronóstico. Por tanto, es lógico pensar que la disminución de su expresión se traduzca en la reversión de los procesos oncológicos en los que interviene, tales como migración, invasión y crecimiento celular. Dado que los estudios previos obtenidos por el grupo de investigación confirmaron una disminución de la viabilidad celular en las células LNCaP al tratar con apalutamida, la disminución de KLK2 podría explicar este suceso. Asimismo, en otros estudios se observó que el uso de inhibidores de KLK2 reducía el crecimiento de los tumores en xenoinjertos de CP, apoyando lo descrito con anterioridad [18].

Además, al ser un gen regulado directamente por el RA, la disminución de KLK2 concuerda con el efecto esperado al tratar las células con apalutamida, pues al bloquear la translocación de RA al núcleo, se esperaría observar una desregulación de aquellos genes bajo su control.

Con respecto a TP53INP1 y como hemos mencionado anteriormente, este ejerce un papel de supresor tumoral en diversos cánceres. Por ejemplo, en cáncer de mama se ha visto que niveles bajos de TP53INP1 se correlacionaba con un peor pronóstico en pacientes con receptor de estrógenos (RE) positivos apoyando la idea de que TP53INP1 podría prevenir el desarrollo de este cáncer [19]. En cáncer de páncreas también se ha visto que los niveles de expresión de TP53INP1 se reducen drásticamente en etapas tempranas y, además, observaron que al reexpresar este gen en células tumorales pancreáticas se disminuyó su capacidad de desarrollar tumores [20]. También se ha demostrado que en cáncer de cuello uterino TP53INP1 posee un papel de supresor de tumores al ver la relación que presentaba con un miRNA llamado miR-155-5p que fomentaba la progresión tumoral. En este estudio demuestra que los niveles de TP53INP1 se asoció con unos niveles inversamente proporcionales a los del miRNA, viendo que al sobreexpresar TP53INP1 se revertía los efectos causados por el miRNA disminuyendo así el desarrollo del tumor [12].

Debido a esto, el aumento en su expresión producido por el tratamiento con apalutamida en células LNCaP también respaldaría el efecto biológico observado en dicha línea celular.

Aunque estos cambios de expresión nos ayuden a explicar el hecho de que respondan o no al tratamiento, aún serían necesario profundizar en este estudio en el futuro para determinar cuál es el mecanismo molecular que explique el efecto antitumoral en las células LNCaP y la resistencia en las células 22Rv1.

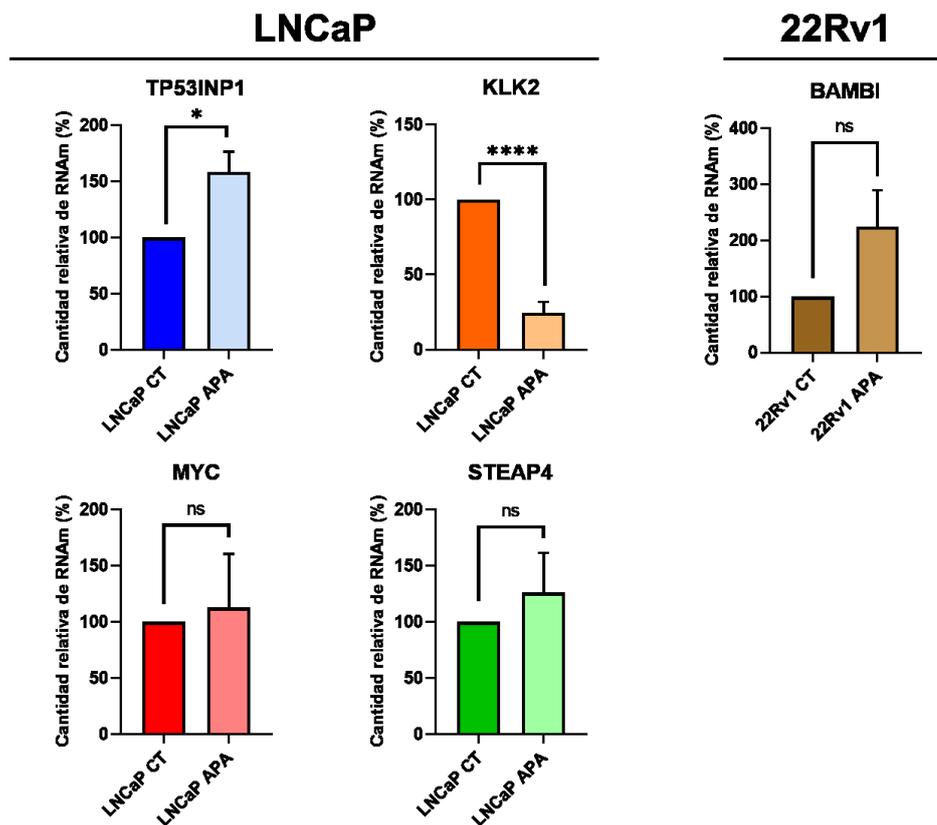


Figura 2.- Efecto de la apalutamida en los niveles de expresión de los genes seleccionados en las líneas celulares LNCaP y 22Rv1. Las células se sembraron en placas de 10 ml con medio completo y a las 24 horas las células se trataron con apalutamida a una concentración final de 5µM. Transcurridos 3 días desde el tratamiento se extrajo el RNA de las células tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Se analizó la expresión génica mediante RT-qPCR utilizando como control endógeno PPIA. Los datos representan la cantidad relativa de RNAm usando como control las células sin tratar (100%). Los valores representados son la media ± SEM de 3 experimentos independientes. La significancia se calculó usando una prueba t-Student (*p<0,05; ****p<0,0001 versus control).

Conclusiones

En el presente estudio hemos determinado que la distinta sensibilidad al apalutamida mostrada por nuestras líneas celulares se refleja claramente en que la expresión génica se ve alterada con una mayor magnitud en las células LNCaP que en las 22Rv1, donde apenas se modificaba. Además, hemos podido validar los resultados obtenidos por el RNAseq de dos genes de manera significativa y la tendencia a uno de ellos. Estudios futuros son necesarios para determinar si los cambios de expresión observados en estos genes son causa de la distinta sensibilidad al fármaco o por el contrario son consecuencia de este. De esta manera, podríamos estar más cerca de determinar si algunos de estos genes son potenciales dianas terapéuticas que nos ayuden a solventar el grave problema que supone el cáncer de próstata resistente a la castración.

Referencias

1. Wallis, C. J., and Nam, R. K. 2015. Prostate Cancer Genetics: A Review. *EJIFCC*. 26(2): 79–91.
2. Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., and DePinho, R. A. 2018. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & development*. 32(17-18): 1105–1140.
3. Aurilio, G., Cimadamore, A., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Verri, E., Scarpelli, M., Massari, F., Cheng, L., Santoni, M., and Montironi, R. 2020. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells*. 9(12): 2653.
4. Huang, Y., Jiang, X., Liang, X., and Jiang, G. 2018. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncology letters*. 15(5): 6063–6076.
5. Cai, Z., Chen, W., Zhang, J., and Li, H. 2018. Androgen receptor: what we know and what we expect in castration-resistant prostate cancer. *International urology and nephrology*. 50(10): 1753–1764.
6. Apalutamide. 2023. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

7. Patel, G. K., Chugh, N., and Tripathi, M. 2019. Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer- An Intriguing Example of Tumor Evolution at Play. *Cancers*. 11(10): 1405.
8. Thorek, D. L., Evans, M. J., Carlsson, S. V., Ulmert, D., and Lilja, H. 2013. Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. Established relevance and emerging roles. *Thrombosis and haemostasis*. 110(3): 484–492.
9. Shang, Z., Niu, Y., Cai, Q., Chen, J., Tian, J., Yeh, S., Lai, K. P., and Chang, C. 2014. Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 35(3): 1881–1890.
10. Hannu, K., Johanna, M., and Ulf-H kan, S. 2014. KLK-targeted Therapies for Prostate Cancer. *EJIFCC*. 25(2): 207–218.
11. Saadi, H., Seillier, M., and Carrier, A. 2015. The stress protein TP53INP1 plays a tumor suppressive role by regulating metabolic homeostasis, *Biochimie*. 118: 44-50.
12. Li, N., Cui, T., Guo, W., Wang, D., and Mao, L. 2019. MiR-155-5p accelerates the metastasis of cervical cancer cell via targeting TP53INP1. *OncoTargets and therapy*. 12: 3181–3196.
13. Dhanasekaran, R., Deutzmann, A., Mahauad-Fernandez, W. D., Hansen, A. S., Gouw, A. M., and Felsher, D. W. 2022. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nature reviews. Clinical oncology*, 19(1): 23–36.
14. Gironella, M., Seux, M., Xie, M. J., Cano, C., Tomasini, R., Gommeaux, J., Garcia, S., Nowak, J., Yeung, M. L., Jeang, K. T., Chaix, A., Fazli, L., Motoo, Y., Wang, Q., Rocchi, P., Russo, A., Gleave, M., Dagorn, J. C., Iovanna, J. L., Carrier, A., Jos phe P busque, M., and Dusetti, N. J.2007. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 104(41): 16170–16175.
15. Chen, X., Li, J., Xiang, A., Guan, H., Su, P., Zhang, L., Zhang, D., and Yu, Q. 2023. BMP and activin receptor membrane bound inhibitor: BAMBI has multiple roles in gene expression and diseases (Review). *Experimental and therapeutic medicine*. 27(1): 28.
16. Liu, K., Song, X., Ma, H., Liu, L., Wen, X., Yu, J., Wang, L., and Hu, S. 2014. Knockdown of BAMBI inhibits β -catenin and transforming growth factor β to suppress metastasis of gastric cancer cells. *Molecular medicine reports*. 10(2): 874–880.
17. Pils, D., Wittinger, M., Petz, M., Gugerell, A., Gregor, W., Alfan, A., Horvat, R., Braicu, E. I., Sehouli, J., Zeillinger, R., Mikulits, W., and Krainer, M. 2010. BAMBI is overexpressed in ovarian cancer and co-translocates with Smads into the nucleus upon TGF-beta treatment. *Gynecologic oncology*. 117(2): 189–197.
18. Hekim, C., Leinonen, J., N rv nen, A., Koistinen, H., Zhu, L., Koivunen, E., V is nen, V., and Stenman, UH. 2006. Novel peptide inhibitors of human kallikrein 2. *J Biol Chem*. 281: 12555-12560.
19. Xu, M., Evans, L., Bizzaro, C. L., Quaglia, F., Verrillo, C. E., Li, L., Stieglmaier, J., Schiewer, M. J., Languino, L. R., and Kelly, W. K. 2022. STEAP1-4 (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 1-4) and Their Clinical Implications for Prostate Cancer. *Cancers*, 14(16): 4034.
20. Li, W., Yin, X., Yan, Y., Liu, C., and Li, G. 2021. STEAP4 knockdown inhibits the proliferation of prostate cancer cells by activating the cGMP-PKG pathway under lipopolysaccharide-induced inflammatory microenvironment. *International immunopharmacology*, 101(Pt B): 108311.