

# Papel de *CEBPD* en el desarrollo de resistencias del cáncer de próstata al tratamiento hormonal y su posible regulación por AR-V7

Paula Ayuso García, 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.

**Palabras clave:** Cáncer de próstata; receptor de andrógenos; variante de splicing AR-V7 del receptor de andrógenos; ablación androgénica; proteína delta de unión al potenciador CCAAT (*CEBPD*)

## Resumen

El cáncer de próstata (CP) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo occidental. Inicialmente, el desarrollo del CP es dependiente de andrógenos, por lo que, el tratamiento convencional consiste en la ablación androgénica. Aunque se consigue la regresión del tumor, en un alto porcentaje de pacientes progresa hacia formas más agresivas de la enfermedad denominadas cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). Entre los mecanismos por los cuales se desarrolla la resistencia se ha descrito el incremento de la variante de *splicing* AR-V7 del receptor de andrógenos (AR). Basándonos en estudios previos en los que se definió el perfil de metilación en CRPC, se seleccionó *CEBPD* por estar silenciado por metilación de su promotor en una línea celular de CRPC (LNCaP abl), mientras que sí se expresa en células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (LNCaP). En este trabajo nos planteamos un doble objetivo: determinar el posible papel de AR-V7 en la regulación de *CEBPD* en las células LNCaP abl e intentar esclarecer el papel de este gen en el desarrollo de la resistencia de los tumores de próstata a la ablación androgénica. Nuestros resultados indican que AR interacciona con el promotor de *CEBPD* en células LNCaP, mientras que en células LNCaP abl se unen tanto AR como AR-V7. Por otro lado, se observó que el silenciamiento de *CEBPD* en células LNCaP induce apoptosis y, sorprendentemente, también aumenta la migración e invasión. A la vista de estos resultados podemos concluir: en primer lugar, que AR-V7 podría estar reprimiendo la expresión de *CEBPD* en células CRPC mediante el reclutamiento de complejos represores; en segundo lugar, que *CEBPD* podría desempeñar un papel dual impidiendo la apoptosis, así como la migración e invasión en células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos.

**Cita:** Ayuso García, Paula; Ropero Salinas, Santiago; Colás Escudero, Begoña (2019) Papel de *CEBPD* en el desarrollo de resistencias del cáncer de próstata al tratamiento hormonal y su posible regulación por AR-V7. *dianas* 8 (2): e201909fa09. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e201909fa09](http://www3.uah.es/dianas?e201909fa09)  
<http://www3.uah.es/dianas?e201909fa09>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Ayuso-García P, 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) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y la neoplasia con mayor incidencia en varones de occidente [1]. Numerosos estudios han demostrado el papel de los andrógenos en la progresión de esta patología, los cuales actúan a través de la unión al receptor de andrógenos (AR) [2]. En las primeras etapas, el desarrollo del CP es dependiente de andrógenos, por ello, el tratamiento convencional consiste en la deprivación androgénica, ya sea de forma química o quirúrgica, que inicialmente causa regresión del tumor. Sin embargo, entre un 80-90% de los pacientes que recibe esta terapia acaba progresando hacia formas más agresivas de la enfermedad denominadas cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) [3]. Aunque los mecanismos moleculares por los cuales se desarrolla esta resistencia son aún objeto de estudio, hasta el momento, se han descrito los siguientes: pérdida de expresión o sobreexpresión del AR, mutación del gen que codifica para el AR, expresión de variantes de *splicing* del AR como AR-V7, expresión o función alterada de los correguladores de AR y producción intratumoral de andrógenos [4].

El AR es un factor de transcripción citosólico activado por ligando que consta de cuatro dominios funcionales: un dominio de transactivación en el extremo N-terminal (NTD), un dominio de unión al DNA (DBD), una región bisagra y un dominio de unión a ligando en el extremo C-terminal (LBD). Se han descrito formas truncadas de este receptor que se producen por *splicing* alternativo, de las cuales AR-V7 es la mejor caracterizada. Esta variante carece del LBD, se activa en ausencia de ligando y es la variante que se expresa con mayor frecuencia en CRPC. Esta mayor expresión de AR-V7 se ha asociado con la ineficacia de algunos fármacos usados para la ablación androgénica como la abiraterona y la enzalutamida [3, 5].

En ausencia de andrógenos, el AR se encuentra en el citoplasma asociado a la chaperona HSP90. Cuando se produce la unión del ligando, como la dihidrotestosterona (DHT), el receptor sufre un cambio conformacional, se libera de la HSP90, dimeriza y el homodímero resultante se transloca al núcleo donde

reconoce y se une a secuencias específicas del DNA conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE), presentes en las regiones reguladoras de genes implicados en la regulación de la proliferación y diferenciación de la próstata. Para modular la expresión de estos genes, el AR interactúa con proteínas correguladoras que pueden actuar como coactivadoras o correpresoras. Entre estas proteínas encontramos aquellas encargadas de regular las modificaciones epigenéticas como las que presentan actividad histona acetil-transferasas (HAT) e histona metil-transferasas (HMT) [2, 6].

Un estudio, publicado en la última década, demostró que el patrón de expresión regulado por el AR es diferente en células sensibles y resistentes a andrógenos. En presencia de andrógenos aumenta la expresión de genes que regulan la transición G1/S del ciclo celular y en su ausencia la de genes que regulan la fase M del ciclo celular [7]. Este diferente patrón de expresión podría deberse a que el AR interactúa con diferentes correguladores en células sensibles y resistentes a andrógenos. Otra posibilidad es que sean las variantes de *splicing* del AR las responsables de este diferente patrón de expresión. En este sentido, hay estudios que indican que la variante de *splicing* AR-V7 heterodimeriza con AR y actúa como un represor de genes supresores de tumores en células de cáncer de próstata resistentes a la castración [8].

Con el fin de observar cuales eran los genes que cambiaban su expresión en células CRPC, el laboratorio al que me he incorporado definió el perfil de metilación en CRPC y seleccionó un grupo de genes desregulado en este tipo tumoral. Se observó, entre otros, que CEBPD pierde la expresión por metilación de su promotor en una línea celular de cáncer de próstata resistente a la castración (LNCaP abl), mientras que sí se expresa en células de cáncer de próstata que dependen de andrógenos para crecer (LNCaP) [9].

La proteína delta de unión al potenciador CCAAT (CEBPD), es un factor de transcripción muy versátil que regula diferentes procesos biológicos: diferenciación, metabolismo y respuesta inmune, dependiendo del tejido en el que se exprese. En cuanto a su función en cáncer, los datos disponibles son contradictorios. Así hay estudios que demuestran que su sobreexpresión puede inducir parada del crecimiento y apoptosis, por lo que inicialmente se le consideró un supresor tumoral en leucemias, cáncer de mama y cáncer hepático, sin embargo, otros estudios realizados en cánceres uroteliales y cerebrales apuntan a un papel oncogénico [10]. En lo que respecta al cáncer de próstata, su papel también es controvertido. Por un lado, está regulado por AR en las células LNCaP, por lo que debe estar implicado en las respuestas celulares mediadas por los andrógenos, como proliferación y diferenciación, es decir, desempeñando un papel como oncogen en presencia de andrógenos [3]. Por otro lado, en otro trabajo se ha sugerido un posible papel como supresor tumoral, ya que demostraron que al aumentar la expresión de CEBPD en células LNCaP a través de la 1,25-dihidroxitamina D3 se inhibía la proliferación [11].

Por todo ello, los objetivos que nos planteamos con este trabajo son los siguientes: en primer lugar, determinar el posible papel de AR-V7 en la represión de CEBPD en las células LNCaP abl; en segundo lugar, intentar esclarecer el papel de este gen en el desarrollo de la resistencia de los tumores de próstata a la ablación androgénica mediante el silenciamiento de CEBPD en células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (LNCaP).

## Materiales y métodos

### Cultivos celulares

La línea celular de cáncer próstata LNCaP (ATCC CRL-140), obtenida de la American Type Culture Collection, procede de una metástasis en ganglio linfático. Las células LNCaP representan estadios tempranos del cáncer de próstata y se caracterizan por expresar el receptor de andrógenos y ser sensibles al tratamiento hormonal. Para su cultivo, se utilizó medio RPMI 1640 (*de Roswell Park Memorial Institute Medium, Sigma-Aldrich*) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS, *Gibco*) y antibióticos (0,25 mg/ml de penicilina, 0,25 mg/ml de estreptomycin, 2,5 mg/ml de fungizona, *Gibco*). Las células se mantuvieron en un incubador *Forma Scientific* en condiciones de esterilidad a 37° C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### Silenciamiento mediante RNA de interferencia (siRNA)

Para el silenciamiento con siRNA, las células se sembraron en placas p60 a una densidad de 10<sup>5</sup> células/placa. A las 48 horas, las células se transfectaron con siRNA específico para dos exones de CEBPD (*Ambion*) o con el control negativo (siRNA SCR) en presencia del reactivo Lipofectamine® RNAiMAX (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*), según las instrucciones del fabricante. Los ensayos para determinar la eficacia del silenciamiento y el efecto sobre la proliferación, migración e invasión se realizaron 72 horas después de la transfección.

### Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo del Trizol (*Invitrogen*). Las células se homogenizaron con 1 ml de Trizol (agente cariotrópico) y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente

(RT). Seguidamente, se añadió 0,2 ml de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó 2-3 minutos a RT. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 12000xg durante 15 minutos a 4°C y se extrajo la fase acuosa donde quedó el RNA. A continuación, se añadió 1 volumen de isopropanol a la fase acuosa recuperada para precipitar el RNA, se incubó 10 minutos a RT y se centrifugó a 12000xg 10 minutos a 4°C. Después, el sobrenadante se descartó, el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a RT. Una vez seco, el RNA se resuspendió en agua libre de RNasa (DEPC) y se incubó durante 10 minutos a 60°C. Por último, la concentración de RNA se determinó en un NanoDrop (*Thermo Scientific*) a una longitud de onda de 260 nm y se guardó a -80°C hasta su uso.

#### Cuantificación de mRNA mediante RT-PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa a tiempo real permite determinar la cantidad de mRNA de una muestra mediante una cuantificación relativa. Como control interno empleamos *GAPDH* por ser un gen constitutivo. Dado que partíamos de ARN total, el primer paso fue sintetizar cDNA. Para ello, se utilizó el *kit NZY First-Strand cDNA Synthesis*. La reacción se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit, utilizando 4 µg del ARN.

A continuación, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 10 µl que contenía: 2 µl de cDNA, 2 µl de H<sub>2</sub>O, 5 µl de 2X *SYBR Green PCR Master Mix (Applied biosystems)*, y 0,5 µl de los oligonucleótidos que amplifican el cDNA que codifica para *CEBPD* (10µM). Todas las reacciones se hicieron por triplicado. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de 10 minutos a 95°C; seguido de 40 ciclos con el esquema 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos; y un último ciclo de 10 min a 72°C. El análisis de los datos se realizó con el programa 7500 software v2.0.1.

#### Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y cuantificación de DNA inmunoprecipitado (qChIP)

Esta técnica permite estudiar interacciones entre DNA y proteínas. De forma resumida, para fijar las uniones proteínas-DNA, las células se fijaron con 1% de formaldehído y se dejaron 15 minutos a RT en agitación. A continuación, se añadió 0,125 M de glicina y se incubaron 5 minutos a RT. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1X, se levantaron y se resuspendieron en *SDS lysis buffer* (1% SDS, EDTA 10 mM, Tris-HCl pH8, 1 50 mM). A continuación, la cromatina se fragmentó mediante sonicación obteniendo fragmentos de aproximadamente 500 bp, se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm a 4°C y la cromatina contenida en el sobrenadante se midió en el NanoDrop. Para cada condición, se utilizaron 200 µl de muestra con una concentración de DNA comprendida entre 0.7 y 1mg/ml. Seguidamente, las muestras se diluyeron 10 veces con *ChIP dilution buffer* con inhibidores de proteasas (0,01% SDS, 1,1% Tritón-X-100, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl pH 8,1 16,7 mM, NaCl 167 mM).

Una vez diluidas, se pre-aclararon con Dynabeads Proteína G (*Life Technology*) durante 1 hora a 4°C. De modo paralelo, se incubaron Dyna Beads con 5 µg de anticuerpos específicos para AR (*Santa Cruz*), AR-V7 (*Biosciences*), H3 (*Abcam*) y H4 (*Abcam*) durante 45 min a RT, creándose así los complejos Proteína G-anticuerpo específico, que, posteriormente, se incubaron toda la noche con la muestra, previamente aclarada, a 4°C.

Al día siguiente, las muestras se lavaron 4 veces con tampones que presentan diferente carga iónica, y se eluyeron dos veces con 250 µl de *Elution buffer* (1% SDS, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M) durante 15 minutos a RT. A continuación, las muestras se desentrecruzaron con NaCl 0,2 M durante 4 horas a 65°C. Transcurrido este tiempo, las muestras se digirieron con proteinasa K durante 1 hora a 45°C. Una vez acabada la digestión, el DNA se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con acetato sódico (300 mM) y etanol absoluto. Seguidamente, se resuspendió en agua miliQ y se guardó a -20°C hasta su uso.

Para determinar la cantidad relativa de DNA inmunoprecipitado bajo estas condiciones, se realizó una PCR cuantitativa con las mismas condiciones que las descritas para la qRT-PCR.

#### Análisis del ciclo celular y TMRM mediante citometría de flujo

Para los experimentos de ciclo celular y TMRM (*tetramethylrhodamine methyl ester*), las células se sembraron en placas p60 a una densidad de 10<sup>5</sup> células/placa. Transcurridas 48 horas, las células se transfectaron con siRNA para *CEBPD* o siRNA SCR. 72 horas después, se recogió el sobrenadante de las placas, y se lavaron con 1 ml de PBS 1X, que también se recuperó. Las células adheridas a la placa se levantaron con 0,25 ml de tripsina durante 3 minutos a 37°C. Una vez inactivado el efecto de la tripsina, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a RT, y el precipitado celular se resuspendió en 1 ml de medio. A continuación, la muestra se utilizó para determinar dos parámetros: 472 µl para ciclo celular y 240 µl para TMRM.

Para estudiar el ciclo celular, a los 472µl se le añadió 25µl de NP40 al 10% y 3µl RNasa a 10 mg/ml, y se incubó 30 minutos a 4°C. Tras la incubación, se le añadió 25 µl de yoduro de propidio (agente intercalante del DNA). Por otro lado, para analizar el potencial de membrana se añadió a los 240 µl de células 10 µl

de solución de trabajo de sonda TMRM y se dejó incubando durante 30 minutos a 37°C en condiciones de oscuridad.

Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo modelo *FACScalibur de Beckton Dickinson* (Unidad de cultivos, UAH). Se excitó con un láser de argón a 488 nm y la fluorescencia emitida se recogió a 585 nm. Los datos obtenidos se analizaron mediante los programas informáticos WinMDI y Cylchred.

### Ensayo de migración e invasión celular

Estos ensayos se llevaron a cabo utilizando cámaras *transwell* (Costar; Sigma) que constan de dos compartimentos: uno superior cuya base es una membrana de policarbonato que se recubrió con fibronectina a una densidad de 8µg/transwell para los experimentos de migración y con matrigel para los experimentos de invasión; y otro inferior donde se adicionó medio RPMI-1640 al 21% en FBS. Se añadieron 50.000 células/transwell al compartimento superior y se incubaron 48 horas en el incubador. Transcurrido este tiempo, se eliminaron las células de la cara superior de la membrana con PBS 1x y bastoncillos de algodón. A continuación, las células que habían conseguido invadir o migrar se tiñeron con el protocolo siguiente: primero se incubaron con 1 ml de tricloroacético al 10% durante 15 min; a continuación, se retiró el tricloroacético y se incubó con 1 ml de cristal violeta (CV) al 0,2% en 25% metanol durante 15 min; por último, se retiró el exceso de CV, se lavó con PBS 1X, se dejó secar y se observó al microscopio.

### Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizaron dos programas informáticos: GraphPad Prims 5 y Microsoft Office Excel.

Para el análisis estadístico, se utilizó el test de la t-Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando el p-valor fue inferior a 0,05.

## Resultados y discusión

Estudios realizados previamente en este laboratorio demuestran que las células de CRPC presentan un perfil epigenético diferente al de las células sensibles a andrógenos que conduce a cambios en la expresión de genes con importantes funciones en las células de próstata [9]. Para este trabajo, se seleccionó *CEBPD* que se encuentra desregulado por cambios en la metilación de su promotor en CRPC.

### Análisis del papel de AR-V7 en la regulación de CEBPD en las células CRPC

Los datos previos de los que disponíamos indican que *CEBPD* está metilado en células LNCaP abl. Dado que la metilación del DNA en la región promotora de los genes es una marca epigenética que se relaciona con la pérdida de expresión [12], el primer paso fue determinar el nivel de expresión de *CEBPD* en las células LNCaP y LNCaP abl mediante PCR cuantitativa. Como se muestra en la figura 1A, con esta técnica, comprobamos que el nivel de expresión de *CEBPD* es significativamente menor en las células LNCaP abl, lo que concuerda con los resultados de metilación de su promotor en este tipo celular.

Como hemos descrito en la introducción, uno de los principales mecanismos por los que se desarrolla la resistencia a los tratamientos hormonales es la expresión de variantes del AR que se activan en ausencia de ligando, como AR-V7. AR-V7 heterodimeriza con AR e interacciona con el complejo correpressor NCOR que contiene, entre otras, histonas desacetilasas (HDAC) [8]. La acetilación de las histonas es una marca de promotores transcripcionalmente activos, por lo que la desacetilación se relaciona con la disminución de la expresión génica [13]. Además, la desacetilación de histonas coopera con la metilación del DNA en el silenciamiento transcripcional. Por todo ello, nos planteamos la posibilidad de que AR-V7 fuera el responsable del silenciamiento de *CEBPD* en células CRPC mediante la interacción con complejos represores. Para ello, en primer lugar, determinamos los niveles de expresión de AR-V7 en células LNCaP y LNCaP abl y observamos una mayor expresión de AR-V7 en células LNCaP abl (figura 1A). Estos datos coinciden con otros trabajos que han demostrado que la expresión de AR-V7 se encuentra elevada significativamente en CRPC, por lo que se utiliza AR-V7 como marcador de recurrencia tras el tratamiento hormonal en pacientes con cáncer de próstata [14].

Los datos de expresión de *CEBPD* y AR-V7 muestran una correlación inversa, las células LNCaP expresan mucho *CEBPD*, pero poco AR-V7, mientras que las células CRPC pierden la expresión de *CEBPD*, pero expresan AR-V7 en mayor medida. Teniendo en cuenta los trabajos que han demostrado que, en las células LNCaP, AR regula la expresión de *CEBPD* [3], nos planteamos la posibilidad de que fuese AR-V7, en lugar de AR, el encargado de regular la expresión de este gen en las células LNCaP abl. Para comprobarlo, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos que reconocen específicamente AR y AR-V7, seguida de la determinación de la presencia del promotor de *CEBPD* en el DNA inmunoprecipitado mediante PCR cuantitativa con oligonucleótidos que

amplifican esta región. Como se muestra en la figura 1B, por un lado, se observa que en las células LNCaP solo AR interacciona con el promotor de este gen, mientras que, en las células LNCaP abl interaccionan ambos. La interacción de ambos, AR y AR-V7, con el promotor de *CEBPD* se explica apoyada en el hecho de que AR-V7 forma heterodímeros con AR y reconoce las mismas secuencias que AR [8].

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que AR-V7 podría participar en la represión de CEBPD en las células CRPC al interactuar con complejos correpresores.

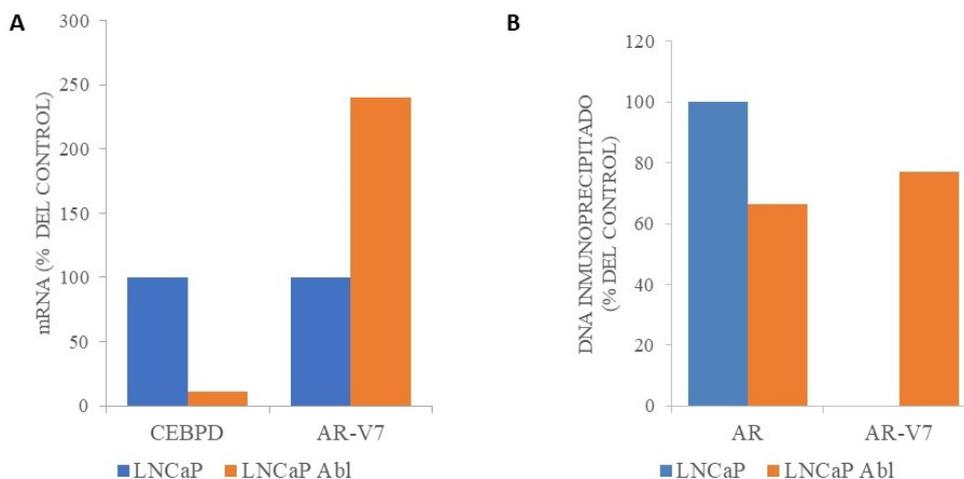


Figura 1.- A. Análisis de la expresión de CEBPD y AR-V7 por qRT-PCR en las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y LNCaP abl. Los datos representan el % de expresión respecto a las células LNCaP. B. Resultados de los ensayos de qChIP. Representación gráfica de la cantidad de DNA inmunoprecipitado utilizando anticuerpos específicos contra AR y AR-V7 en líneas de cáncer de próstata LNCaP y LNCaP abl para el gen CEBPD. Los % están calculados respecto a la cantidad de AR unido en las células LNCaP.

### Efecto del silenciamiento de CEBPD sobre el fenotipo de las células LNCaP

Como se ha expuesto en la introducción, el papel de CEBPD en cáncer de próstata no está claro, ya que algunos estudios plantean su posible actuación como oncogen, mientras que otros sugieren un papel como supresor de tumores. Por ello, decidimos estudiar el efecto de la pérdida de expresión de CEBPD en el desarrollo de CRPC. Con este fin, llevamos a cabo el silenciamiento de CEBPD con RNA de interferencia en las células LNCaP y observamos el efecto de su disminución en el fenotipo celular.

La anulación transitoria de la expresión de CEBPD se llevó a cabo empleando RNAs pequeños de interferencia (siRNA), específicos para la región codificante de este gen (*CEBPD*). Los siRNAs inhiben la expresión de un gen a nivel post-transcripcional al unirse con secuencias complementarias del mRNA diana e inducir su degradación [15]. En nuestro caso, utilizamos siRNA sintético y prediseñado para dos exones de CEBPD y lo introducimos en las células mediante transfección con lipofectamina RNAiMAX (lípidio catiónico) según se indica en materiales y métodos. Como control negativo se utilizó un siRNA SCR, cuya secuencia no reconoce ningún gen humano. Este control nos permitió diferenciar los efectos causados por el procedimiento de transfección del siRNA de los causados por el silenciamiento del gen diana.

El primer paso fue analizar la eficacia del silenciamiento mediante la determinación de los niveles de mRNA de CEBPD mediante qRT-PCR en las células LNCaP transfectadas con los RNAs de interferencia específicos para este gen. Como se muestra en la figura 2A, se logró una disminución significativa de aproximadamente el 50% en las células transfectadas con los siRNAs para CEBPD respecto a las transfectadas con el siRNA SCR.

Una vez verificado el silenciamiento, el siguiente paso fue comprobar si los siRNAs para CEBPD alteraban el fenotipo de las células LNCaP. Para ello, estas células se observaron al microscopio óptico con diferentes aumentos y se compararon con las células transfectadas con el siRNA SCR. Como se muestra en la figura 2B, las células con siRNA SCR mantienen su morfología típica intacta con las prolongaciones características de este tipo celular. Mientras que, las células transfectadas con siRNAs para CEBPD cambian de apariencia: adquieren una forma redondeada, vesiculada y refringente. Cuando las células entran en apoptosis (muerte celular programada) se caracterizan por presentar una serie de cambios morfológicos entre los que destacan: la disminución de tamaño de la célula y la fragmentación en cuerpos apoptóticos que permanecen unidos a la membrana [16]. A la vista de estos resultados, nos planteamos que quizá los cambios observados fuesen consecuencia de la muerte celular programa. No

obstante, a partir de estas fotografías no se podía confirmar si se trataba o no de apoptosis. De ahí, que los siguientes ensayos fuesen dirigidos a tratar de confirmar nuestra nueva hipótesis.

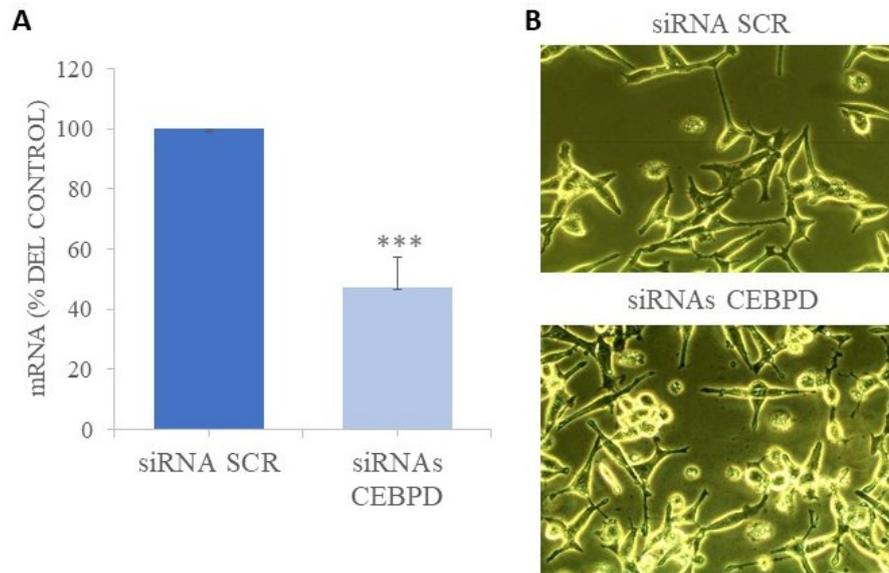


Figura 2.- A. Determinación de los niveles de mRNA de CEBPD mediante qRT-PCR en células LNCaP transfectadas con siRNAs específicos para CEBPD o siRNA SCR. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos realizados por triplicado. El % de silenciamiento se calcula en función del siRNA SCR. \*\*\* p valor < 0.0001. B. Fotografía tomada al microscopio óptico de células transfectadas con siRNA SCR y con siRNA para CEBPD.

### Efecto del silenciamiento de CEBPD sobre la apoptosis y el ciclo celular

Para determinar si el silenciamiento de CEBPD induce apoptosis en nuestro sistema celular, analizamos dos acontecimientos que caracterizan este proceso: la caída del potencial de membrana mitocondrial utilizando una sonda TMRM (indicador de apoptosis temprana) y la fragmentación del DNA utilizando yoduro de propidio (indicador de apoptosis tardía).

La sonda fluorescente TMRM permite determinar cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Esta sonda catiónica y lipofílica se acumula en el interior de la mitocondria cuando el potencial de membrana mitocondrial es normal, por lo que, se consideran células viables aquellas con alta señal de fluorescencia y no viables las de baja [17]. Las células TMRM negativas pueden ser resultado de un proceso de apoptosis u otro tipo de daño celular que altere el  $\Delta\Psi_m$ . Como se observa en la figura 3A, el porcentaje de células no viables aumenta significativamente en las células LNCaP silenciadas con respecto a las transfectadas con el siRNA control. A pesar de que las diferencias son significativas, llama la atención la cantidad de células no viables que encontramos (aproximadamente 50%) en las células LNCaP transfectadas con siRNA SRC, que podría ser debido a que los reactivos que se usan para la transfección son considerablemente dañinos para las células. En cualquier caso, este experimento solo se ha llevado a cabo en dos ocasiones, por lo que sería necesario repetirlo para confirmar estos resultados preliminares.

El yoduro de propidio (IP) es una molécula fluorescente que se intercala en el DNA y RNA. En el ensayo de ciclo celular se emplea para distribuir las células en cada fase en función de su contenido en DNA, por lo que es importante tratar las células con RNAsa para evitar falsos positivos. En lo que respecta a este ensayo, se valoró la fase sub G0 que se corresponde con el DNA fragmentado. En la figura 3B, se muestra un ciclo celular representativo de las LNCaP transfectadas con siRNA SCR y siRNAs para CEBPD respectivamente. En la figura 3C, se observa un aumento significativo de la cantidad de DNA fragmentado en las células silenciadas respecto a las transfectadas con siRNA SCR.

En suma, los resultados de estos dos últimos ensayos junto con los cambios morfológicos observados apuntan a que la pérdida de expresión de CEBPD induce muerte celular programada, por lo que es lógico pensar que CEBPD desempeña un papel antiapoptótico en LNCaP. Estos datos están en consonancia con los estudios que demuestran que los andrógenos aumentan la expresión de CEBPD en este sistema celular, ya que, como se comentó en la introducción, los andrógenos estimulan la proliferación celular y podría ser que lo hiciesen a través del aumento de expresión de este factor de transcripción. Sin embargo, nuestros resultados entran en contradicción con otros trabajos en los que se observa que al aumentar la expresión de CEBPD disminuye la proliferación celular [11, 18] o incrementa la apoptosis [3] en cáncer de próstata. No obstante, en otros tejidos se ha descrito un papel antiapoptótico de CEBPD, por ejemplo, en las células beta pancreáticas se ha demostrado que la deficiencia de CEBPD, aumenta la expresión del

factor de transcripción CHOP, que, a su vez, aumenta la expresión de BIM (factor pro-apoptótico) [19]. Por lo que, podría ser que CEBPD actuase del mismo modo en las células beta pancreáticas que en las LNCaP.

Estos son resultados preliminares que habrá que confirmar con un mayor número de réplicas de los ensayos y con experimentos adicionales, como el de la anexina V, para poder confirmar que el silenciamiento de CEBPD desencadena la muerte celular programada.

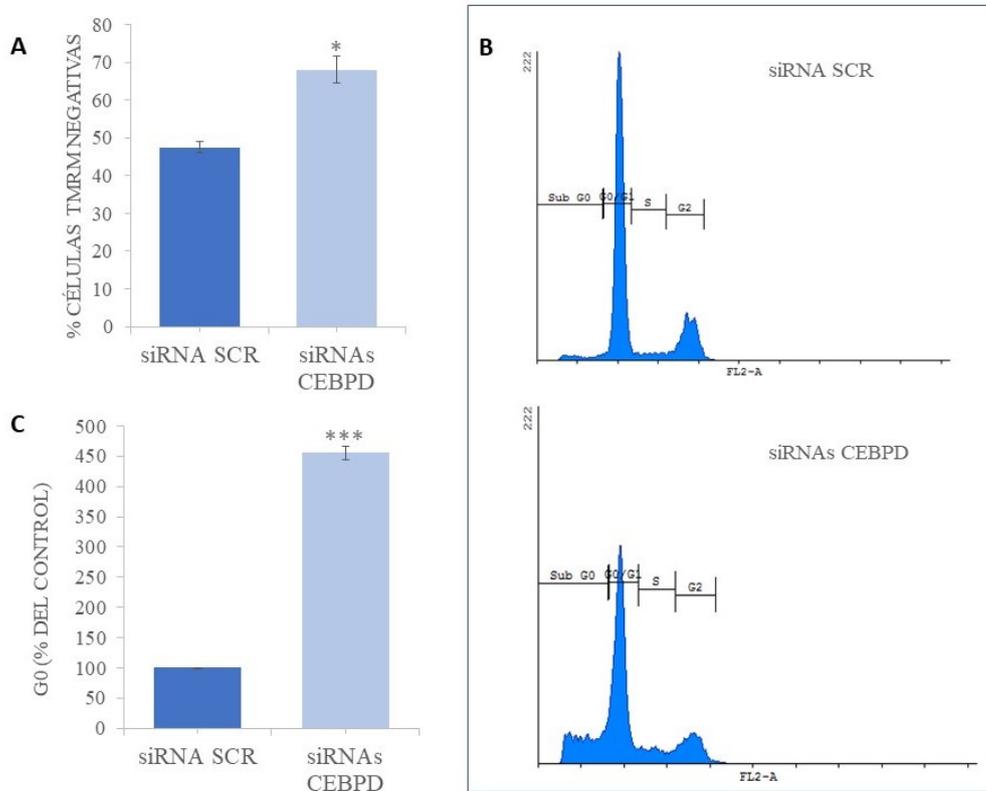


Figura 3.- A. Análisis del número de células TMRM negativas mediante citometría de flujo en células LNCaP transfectadas con siRNAs para CEBPD o siRNA SRC. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de dos ensayos. Los % están calculados respecto a siRNA SCR. \* p valor < 0.05. B. Ciclo celular representativo de células LNCaP transfectadas con siRNA SCR o siRNAs CEBPD. C. Determinación de la apoptosis en unidades relativas mediante citometría de flujo en células LNCaP transfectadas con siRNAs para CEBPD o siRNA SRC. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de la fase sub G0 de cuatro ensayos de ciclo celular. Los % están calculados respecto a siRNA SCR. \*\*\* p valor < 0,0001.

### Efecto del silenciamiento sobre la migración e invasión

La migración y la invasión celular son dos procesos clave en la progresión tumoral. Dado que las células LNCaP abl representan un modelo de progresión de cáncer de próstata que no responde a los tratamientos hormonales, el siguiente paso fue determinar si la pérdida de expresión de CEBPD que hemos observado en este sistema celular tiene algún papel en la progresión tumoral. Para ello, determinamos el efecto del silenciamiento de CEBPD sobre el fenotipo migratorio e invasivo de las células que lo expresan.

En primer lugar, evaluamos la capacidad migratoria de las células LNCaP con silenciamiento transitorio de CEBPD utilizando pocillos con membranas de policarbonato porosas (*transwells*), usando como matriz extracelular fibronectina. Como se muestra en la figura 4A, las células transfectadas con siRNA SCR no migran prácticamente nada en comparación con las transfectadas con siRNA para CEBPD. En segundo lugar, analizamos el efecto del silenciamiento de CEBPD en la capacidad invasiva de las células utilizando *transwells* recubiertos con matrigel. Como se observa en la figura 4B, las células transfectadas con siRNA para CEBPD migran en mayor medida.

En definitiva, en ambos ensayos, se observó una mayor migración e invasión en las células que tienen silenciado CEBPD. Lo que nos sorprendió a la vista de los resultados obtenidos en apoptosis. En este sentido, a principios de año, se publicó un trabajo en el que se describe un papel dual de CEBPD regulando la proliferación y migración de forma contraria. En concreto, en este estudio, demuestran que la sobreexpresión de CEBPD en líneas celulares de cáncer epitelial humano produce una parada en el ciclo celular y aumenta la migración [20]. Por otro lado, en otro trabajo en el que silenciaron este gen en células epiteliales mamarias y en fibroblastos de embrión de ratón demostraron que la disminución de CEBPD promovía la migración, lo que coincide con nuestros resultados [21]. Por lo que, planteamos un posible papel dual de CEBPD en las LNCaP actuando en los primeros estadios como oncogen y como

supresor de la progresión tumoral en etapas más avanzadas de la enfermedad. No obstante, es necesario hacer más réplicas de este ensayo y experimentos adicionales para confirmar nuestros resultados y observar que genes regula en cada uno de estos procesos.

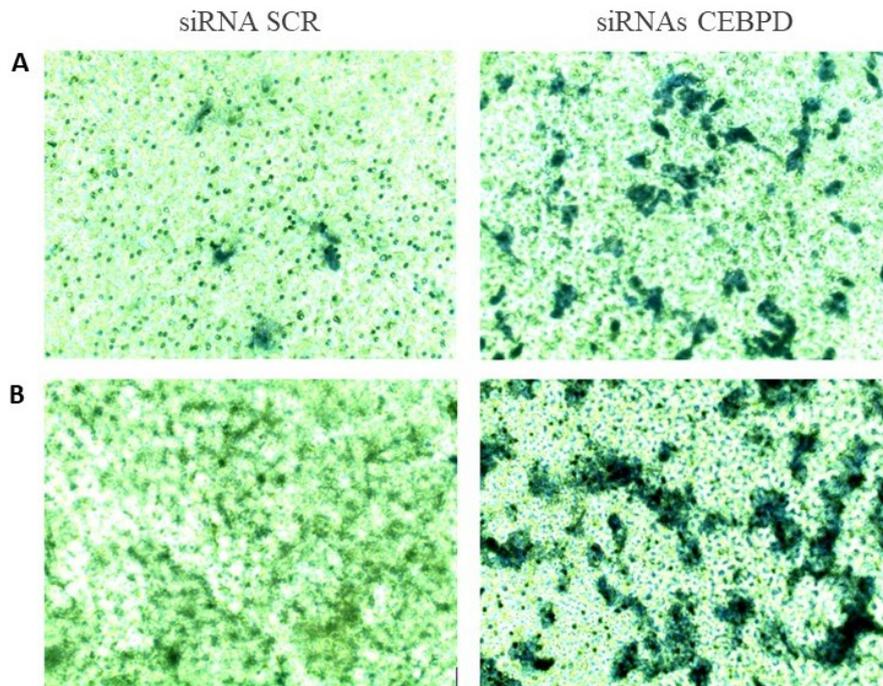


Figura 4.- Efecto del silenciamiento de CEBPD sobre la migración e invasión de las células LNCaP. A. Se muestra un campo representativo de la migración de las células LNCaP transfectadas con siRNA SCR o siRNAs para CEBPD. B. Fotografías representativas de la invasión en las células LNCaP transfectadas con siRNA SCR o siRNAs para CEBPD.

## Conclusiones

Las conclusiones del presente trabajo son:

- AR regula la expresión de CEBPD mediante su interacción con la región promotora en células sensibles a andrógenos, mientras que la variante de *splicing* AR-V7 podría estar reprimiendo su expresión en células CRPC.
- CEBPD podría desempeñar un papel como oncogen en células sensibles al tratamiento hormonal, ya que su silenciamiento en células LNCaP induce apoptosis.
- Por otro lado, la pérdida de expresión de CEBPD aumenta la migración e invasión, lo que sugiere un papel como supresor de la progresión a CRPC.
- CEBPD podría desempeñar un papel dual actuando como oncogen en los primeros estadios del cáncer de próstata y como supresor de la progresión tumoral en etapas más avanzadas de la enfermedad.

## Bibliografía

1. Siegel, R., Miller, K., & Jemal, A. 2019. Cancer statistics, 2019. CA: A Cancer Journal For Clinicians, 69(1), 7-34. doi: 10.3322/caac.21551
2. Dehm, S., & Tindall, D. 2007. Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. Molecular Endocrinology, 21(12), 2855-2863. doi: 10.1210/me.2007-0223
3. Chuang, C., Wang, W., Li, C., Ko, C., Chou, Y., & Chuu, C. et al. 2014. The combination of the prodrugs perforin-CEBPD and perforin-granzyme B efficiently enhances the activation of caspase signaling and kills prostate cancer. Cell Death & Disease, 5(5), e1220-e1220. doi: 10.1038/cddis.2014.106
4. Huang, Y., Jiang, X., Liang, X., & Jiang, G. 2018. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer (Review). Oncology Letters. doi: 10.3892/ol.2018.8123
5. Sobhani, N., Generali, D., D'Angelo, A., Aieta, M., & Roviello, G. 2018. Current status of androgen receptor-splice variant 7 inhibitor niclosamide in castrate-resistant prostate-cancer. Investigational New Drugs, 36(6), 1133-1137. doi: 10.1007/s10637-018-0653-2

6. Cai, C., Yuan, X., & Balk, SP. 2013. Androgen receptor epigenetics. *Translational Andrology and Urology*, 2(3), 148-157.
7. Comstock, C., & Knudsen, K. 2007. The Complex Role of AR Signaling After Cytotoxic Insult: Implications for Cell Cycle Based Chemotherapeutics. *Cell Cycle*, 6(11), 1307-1313. doi: 10.4161/cc.6.11.4353.
8. Cato, L., de Tribolet-Hardy, J., Lee, I., Rottenberg, J., Coleman, I., & Melchers, D. et al. 2019. ARv7 Represses Tumor-Suppressor Genes in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Cell*, 35(3), 401-413.e6. doi: 10.1016/j.ccell.2019.01.008
9. Angulo, J., Andrés, G., Ashour, N., Sánchez-Chapado, M., López, J., & Ropero, S. 2016. Development of Castration Resistant Prostate Cancer can be Predicted by a DNA Hypermethylation Profile. *Journal Of Urology*, 195(3), 619-626. doi: 10.1016/j.juro.2015.10.172
10. Balamurugan, K., & Sterneck, E. 2013. The Many Faces of C/EBP $\delta$  and their Relevance for Inflammation and Cancer. *International Journal Of Biological Sciences*, 9(9), 917-933. doi: 10.7150/ijbs.7224
11. Ikezoe, T., Gery, S., Yin, D., O'Kelly, J., Binderup, L., & Lemp, N. et al. 2005. CCAAT/Enhancer-Binding Protein  $\delta$ : A Molecular Target of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in Androgen-Responsive Prostate Cancer LNCaP Cells. *Cancer Research*, 65(11), 4762-4768. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-3619
12. Turek-Plewa, J., & Jagodzinski, PP. 2005. The role of Mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular & Molecular biology letters*, 10, 631-647.
13. Ropero, S., & Esteller, M. 2007. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*, 1, 19-25.
14. Qu, Y., Dai, B., Ye, D., Kong, Y., Chang, K., & Jia, Z. et al. 2015. Constitutively Active AR-V7 Plays an Essential Role in the Development and Progression of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Scientific Reports*, 5(1). doi: 10.1038/srep07654
15. Ortiz-Quintero, B. 2009. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Revista De Investigación Clínica*, 61(5), 412-427.
16. Saraste, A. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528-537. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00384-3
17. Scaduto, R., & Grotyohann, L. 1999. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophysical Journal*, 76(1), 469-477. doi: 10.1016/s0006-3495(99)77214-01
18. Pan, Y., Li, C., Ko, C., Pan, M., Chen, P., & Tseng, J. et al. 2010. CEBPD Reverses RB/E2F1-Mediated Gene Repression and Participates in HMDB-Induced Apoptosis of Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 16(23), 5770-5780. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-10-1025
19. Moore, F., Santin, I., Nogueira, T., Gurzov, E., Marselli, L., Marchetti, P., & Eizirik, D. 2012. The Transcription Factor C/EBP delta Has Anti-Apoptotic and Anti-Inflammatory Roles in Pancreatic Beta Cells. *Plos ONE*, 7(2), e31062. doi: 10.1371/journal.pone.0031062
20. Sowamber, R., Chegade, R., Bitar, M., Dodds, L., Milea, A., & Slomovitz, B. et al. 2019. CCAAT/enhancer binding protein delta (C/EBP $\delta$ ) demonstrates a dichotomous role in tumour initiation and promotion of epithelial carcinoma. *Ebiomedicine*. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.002
21. Yu, X., Si, J., Zhang, Y., & DeWille, J. 2010. CCAAT/Enhancer Binding Protein-delta (C/EBP-delta) regulates cell growth, migration and differentiation. *Cancer Cell International*, 10(1), 48. doi: 10.1186/1475-2867-10-48