

**RESISTENCIA A DROGAS Y AGRESIVIDAD TUMORAL ASOCIADAS A LA SEÑAL  
NOTCH EN TUMORES METASTÁSICOS Y NO METASTÁSICOS**

Trabajo Final de Grado

del alumno



**Agustina Chimento**

Este trabajo ha sido presentado como requisito  
para la obtención del título de

**Licenciado en Genética**

Carrera

**Licenciatura en Genética**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.**

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino,.....

**RESISTENCIA A DROGAS Y AGRESIVIDAD TUMORAL ASOCIADAS A LA SEÑAL  
NOTCH EN TUMORES METASTÁSICOS Y NO METASTÁSICOS**

Trabajo Final de Grado  
del alumno

**Agustina Chimento**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Ana Laura Fontanazza

**Evaluador**

Gabriel Erbiti

**Evaluador**

Ina Sevic

**Evaluador**

Sofía Perrone

**Co-Director**

Carolina Cristina

**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

## Índice

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
Glándula prostática .....	6
Receptor de Andrógenos .....	9
Cáncer de Próstata .....	12
Vía de señalización Notch .....	19
Vía de señalización Notch en Cáncer.....	24
Vía de señalización Notch en Cáncer de Próstata.....	26
Tratamientos farmacológicos en el Cáncer de Próstata .....	27
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
Hipótesis.....	31
Objetivos .....	31
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
Muestras de pacientes de tumores de próstata.....	34
Modelo experimental .....	34
Drogas .....	34
Técnicas.....	35
Cultivo de líneas celulares .....	35
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT – qPCR) .....	35
Western Blot (WB) .....	37
Ensayo de Viabilidad Celular MTS .....	38
Inmunohistoquímica (IHQ) .....	38
Ensayo de Cierre de Herida (ECH) .....	39
Análisis Estadístico .....	40
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
Expresión de los receptores NOTCH y del marcador de proliferación PCNA en muestras de pacientes con cáncer de próstata.....	42

Influencia de la señalización Notch y del receptor de andrógenos sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de próstata PC-3.....	45
Proliferación celular de la línea PC-3 bajo tratamiento con DAPT y Enzalutamida .....	47
Efecto del tratamiento con el inhibidor de Notch DAPT sobre la vía del receptor de andrógenos.....	48
Efecto del tratamiento con Enzalutamida sobre la vía de señalización Notch. ....	50
Efecto del tratamiento combinado con DAPT y Enzalutamida sobre la vía de señalización Notch y del receptor de los andrógenos. Determinación de la viabilidad celular. ....	51
Influencia de la señalización Notch y del receptor de andrógenos sobre la capacidad migratoria de la línea celular de cáncer de próstata PC-3.....	52
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>74</b>

# Introducción

# Glándula prostática

La próstata es una glándula sexual accesoria del aparato reproductor masculino situada alrededor de la uretra, por debajo de la vejiga y por delante del recto (Figura 1). Su función principal es la producción y secreción de fluido prostático, un componente esencial del líquido seminal, el cual está formado principalmente por citrato,  $Zn^{+}$  y serino proteasas (familia KLKs). La próstata comienza a desarrollarse durante la embriogénesis tardía a partir de brotes epiteliales en el seno urogenital. Bajo la influencia de andrógenos, estos brotes muestran una rápida extensión y morfogénesis que resulta en la formación de la arquitectura típica de los órganos glandulares. El crecimiento del órgano continúa después del nacimiento y se completa en gran parte antes de alcanzar la madurez sexual [1]. Durante su desarrollo, la próstata es un tejido altamente proliferativo; sin embargo, en el adulto la glándula se vuelve en gran medida quiescente, con muy pocas células en división celular o muertas debido a la apoptosis [2].

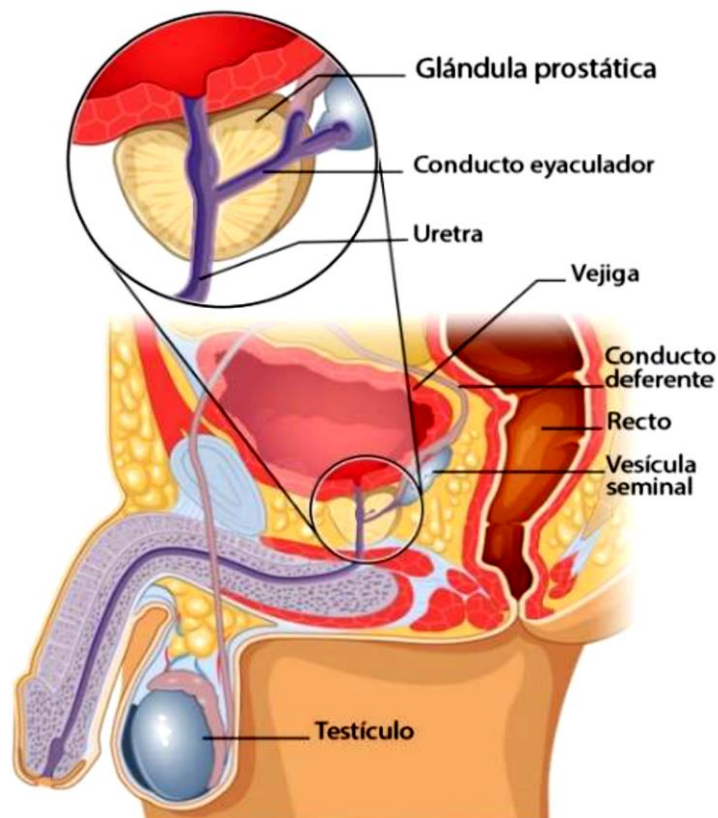


Figura 1. Esquema anatómico de la glándula prostática. Tomado y modificado de <https://www.cdc.gov/> (Centro para el control de enfermedades de EEUU).

En la organización del tejido prostático humano adulto se describen cuatro zonas: una periférica (corresponde al 70 % de la próstata glandular), una zona central (corresponde al 25% de la próstata glandular), una de transición (que corresponde al 5 % restante) y una zona anterior, que no presenta elementos glandulares se ubica por delante de la uretra y es fibromuscular. Dentro de la zona central, de transición y periférica se pueden diferenciar dos compartimientos: epitelial y estromal [1]. Los compartimientos estromales y epiteliales en la glándula prostática están separados por la membrana basal, una estructura compacta de fibras de colágeno que contiene varias proteínas de la matriz extracelular producidas tanto por las células epiteliales (lamininas) como estromales (colágenos) [3]. Los conductos prostáticos maduros contienen tres tipos de células principales: células epiteliales luminales secretoras, células epiteliales basales y células musculares lisas del estroma, que pueden diferenciarse por sus patrones de expresión de marcadores de diferenciación. Otros tipos de células menos comunes incluyen células neuroendocrinas así como células dentro de la capa basal denominadas células intermedias que co - expresan marcadores luminales y basales, así como marcadores adicionales tales como CK19 [4] (Figura 2). El lumen ductal está recubierto por células epiteliales luminales secretoras, que tienen un aspecto columnar y una polaridad apical - basal, cuya función es la de secretar proteínas y fluidos prostáticos, como el antígeno prostático específico (PSA) desde su superficie apical hacia la luz [5, 6]. En los seres humanos, las células epiteliales basales forman una capa casi continua entre las células secretoras y la membrana basal; mientras que las células neuroendocrinas están presentes dentro de la capa epitelial [1].

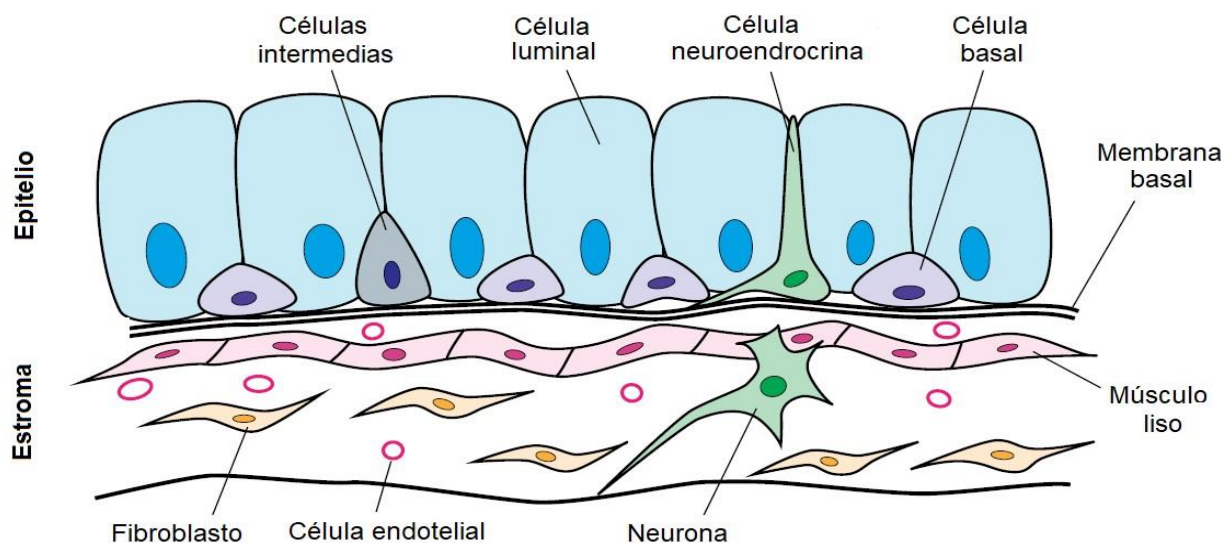


Figura 2: Esquema de los tipos de células en la próstata adulta. Tomado y modificado de Toivanen y Shen [7]

Las células basales y luminales también expresan diferentes proteínas específicas de tipo celular, que a menudo se utilizan para analizar la glándula y detectar patologías glandulares. Por ejemplo, las células luminales expresan altos niveles del receptor de andrógenos (AR), citoqueratinas de bajo peso molecular 8/18, CD57 y el factor de transcripción del dominio homeobox Nkx3.1. En contraste, las células basales expresan citoqueratinas de alto peso molecular 5/14, p63, CD44, GSTP1 y niveles mucho más bajos del AR [2, 5, 6]. En la próstata humana, una capa de células basales separa completamente las células luminales del estroma. El estroma está conformado por células del músculo liso, que representan el tipo de célula más abundante de este mismo [8], y también está compuesto por fibroblastos, que secretan la matriz extracelular (compuesta por proteínas fibrilares, glicoproteínas y proteoglicanos que forman una red y median la señalización a partir de los factores de crecimiento), células neuronales, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y células del sistema inmune, que han sido implicadas tanto en la regulación de las células madre como en la tumorigénesis dentro de la próstata [1, 4]. Las células epiteliales de la próstata requieren estar próximas a las células estromales y a los vasos sanguíneos para su supervivencia. En respuesta a los andrógenos, las células estromales secretan andromedinas, que son factores que promueven la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células epiteliales [2].



# Receptor de Andr6genos

La testosterona es una hormona sexual masculina y el principal andr6geno circulante. La producci3n de andr6genos se realiza principalmente en las c6lulas de Leydig testiculares y se regula a trav6s del eje hipotal6mico - hipofisario - gonadal. El hip6t6lamo secreta la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la cual se une a los gonadotropos en la hip6fisis anterior y estimula la liberaci3n de la hormona luteinizante (LH) y la hormona fol6culo estimulante (FSH). Cuando la LH llega a las c6lulas de Leydig del test6culo, estimula la producci3n de andr6genos, que a su vez inhiben la secreci3n de GnRH y LH. La testosterona es secretada principalmente por los test6culos, pero tambi6n se forma por conversi3n perif6rica de los esteroides suprarrenales y desempe1a un papel cr6tico durante el desarrollo inicial de la gl6ndula prost6tica, su morfog6nesis y mantenimiento [9]. Esta hormona circula en la sangre donde se une a la alb6mina y a la globulina fijadora de hormonas sexuales, aunque existe una peque1a fracci3n disuelta libremente en el suero. La se1alizacion de testosterona ocurre a trav6s del receptor de andr6genos y se encuentra activa en las c6lulas de los compartimentos epiteliales y estromales de la pr6stata. La se1alizacion a trav6s del receptor en el epitelio prost6tico es necesaria para la producci3n de las prote6nas secretoras y para promover la diferenciaci3n del mes6nquima circundante en m6sculo liso [4, 10]. Cuando la testosterona libre ingresa a las c6lulas de la pr6stata, el 90 % se convierte en dihidrotestosterona (DHT) por la acci3n de la enzima 5  $\alpha$  - reductasa. La DHT tiene una afinidad cinco veces mayor por el receptor de andr6genos (AR) que la testosterona. (Figura 3).

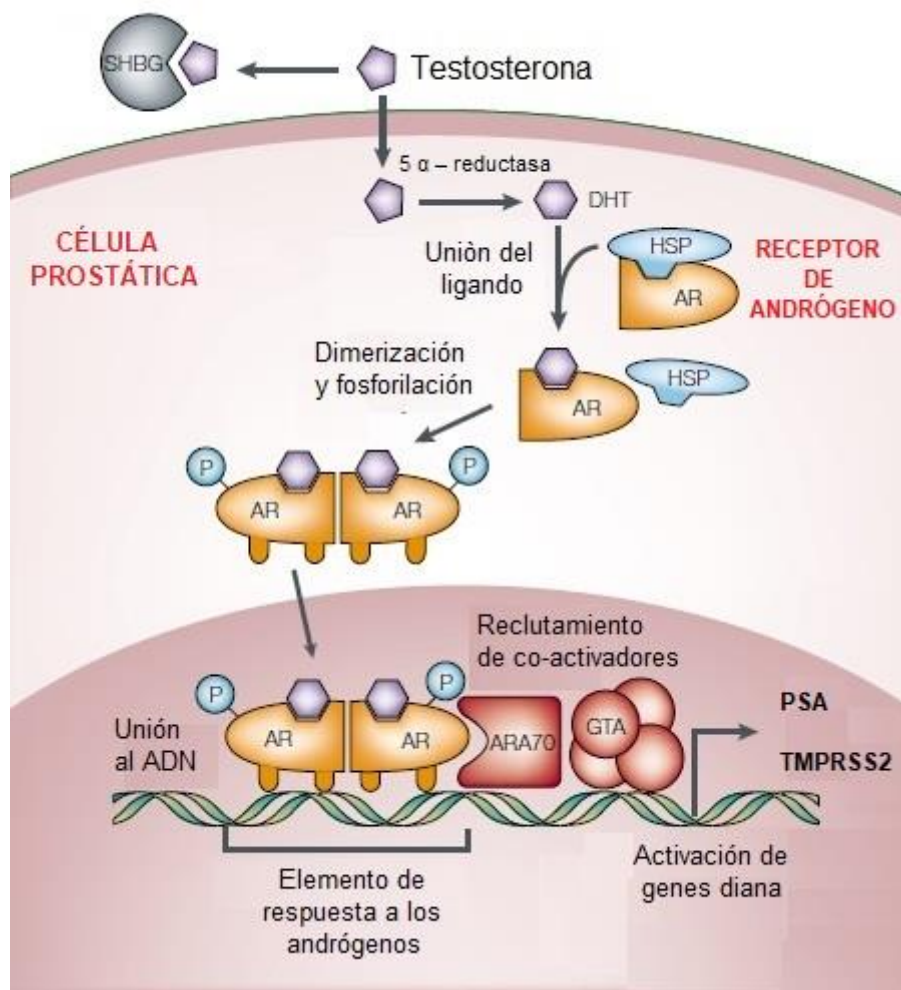


Figura 3: Señalización a través del receptor. Tomado y modificado de Feldman y colaboradores [11]

El AR pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares, contiene ocho exones que codifican una proteína de aproximadamente 919 aminoácidos y está formado por: un dominio de activación en el extremo amino-terminal, un dominio de unión a ligando en el extremo carboxi-terminal y un dominio de unión al ADN en la región media que contiene dos motivos de dedos de cinc; los dominios de transactivación AF-1 y AF-2 que son requeridos para una óptima función de transactivación, se encuentran en el dominio de activación y en el dominio de unión a ligando, respectivamente (Figura 4). Al igual que otros receptores nucleares, en el estado basal el AR está unido a proteínas de choque térmico y otras proteínas en una conformación que evita la unión al ADN [11, 12], específicamente a la Hsp90 (Proteínas de choque térmico 90) [10].

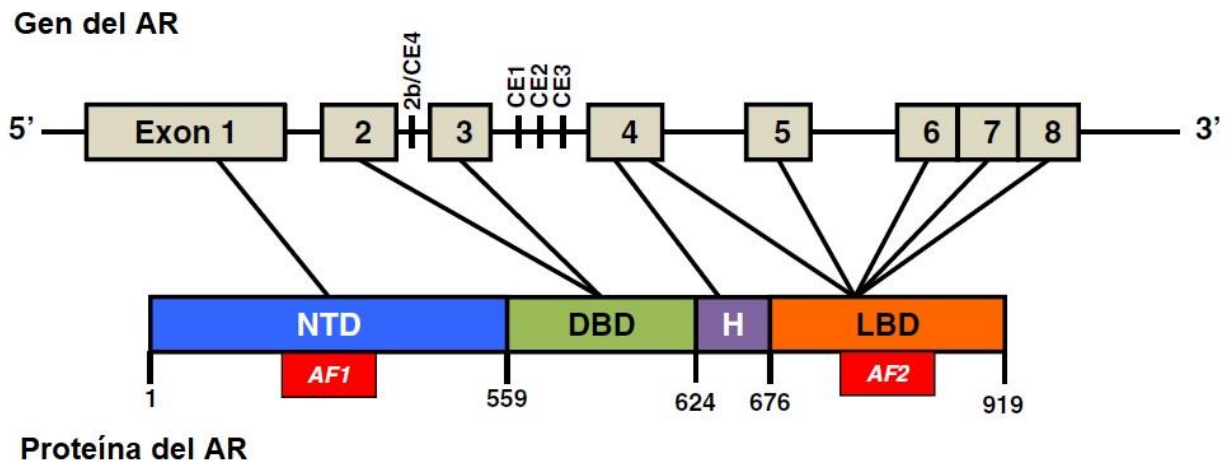


Figura 4: Estructura del receptor de andrógenos. Tomado y modificado de Shafi y colaboradores [10].

La unión a los andrógenos induce un cambio conformacional en el AR que conduce a la disociación de dichas proteínas y a la fosforilación del receptor, en parte mediada por la proteína quinasa A [13]. El cambio conformacional inducido por el ligando facilita la formación de homodímeros, que luego pueden unirse a los elementos de respuesta a los andrógenos (ARE) en las regiones promotoras de los genes diana y reclutar proteínas co - reguladoras, co - activadores o co - represores al complejo AR (Figura 3). Los co - activadores permiten la interacción del complejo AR con el aparato general de transcripción para estimular la transcripción de los genes diana [11].

La vía de señalización a través del AR regula el desarrollo y mantenimiento del tejido prostático normal y su desregulación es la principal responsable del desarrollo, crecimiento y progresión de los tumores de próstata [14]. La evidencia de la necesidad del receptor de andrógenos para el desarrollo de la próstata proviene de la observación de la ausencia de dicha glándula en ratones o humanos que poseen un receptor disfuncional [15, 16]. Este receptor funciona como un factor de supervivencia para las células luminales y como un supresor de la proliferación de las células basales [17]. La pérdida de la señalización en el ser humano adulto como consecuencia de la castración, da como resultado la muerte rápida de la mayoría de las células epiteliales luminales, que expresan altos niveles del AR y requieren de esta señalización para su supervivencia. Posteriormente la glándula prostática regresiona y solo una fracción de las células en la región proximal de la próstata sobrevive en este ambiente pobre de testosterona [1, 12].

Estas células pueden invadir los tejidos circundantes y metastatizar hacia los ganglios linfáticos, la vejiga y el hueso. Varias mutaciones, deleciones, amplificaciones y, más recientemente, translocaciones genómicas se han asociado con el cáncer de próstata; algunas de estas alteraciones cambian la actividad/estructura del receptor o están regulados por este mismo y otros son independientes de la señalización a través de dicho receptor [10]. Varios grupos han demostrado que la actividad del AR también está regulada por el empalme alternativo, donde las variantes de empalme del AR (ARV) que carecen del dominio de unión a ligando promueven la transcripción de genes de manera constitutiva en ausencia de los andrógenos. La expresión de variantes ARV ha sido el mecanismo principal utilizado para explicar la actividad persistente del receptor, la supervivencia de las células cancerígenas y la progresión de la enfermedad luego de la terapia de privación de andrógenos (ADT) [18].

## Cáncer de Próstata

La glándula prostática es altamente susceptible a la transformación oncogénica con una frecuencia significativamente mayor que la de otros tejidos sexuales secundarios masculinos, como las vesículas seminales [4]. El cáncer de próstata es la neoplasia maligna diagnosticada con mayor frecuencia en los hombres [19] y la quinta causa principal de muerte relacionada con el cáncer entre ellos [20].

El carcinoma de próstata implica una acumulación de células epiteliales cancerosas; sin embargo, las células no epiteliales también desempeñan un papel importante en la iniciación y progresión del cáncer de próstata. En general, se producen cambios significativos en los compartimentos epitelial y estromal durante el inicio y la progresión de la enfermedad. Si bien la próstata adulta normal es mayormente inactiva, esto puede cambiar en las personas mayores lo que lleva a un epitelio de próstata hiperplásico. Este estado se denomina Hiperplasia Prostática Benigna (BPH) y no se considera que sea el precursor del carcinoma de próstata. Se caracteriza por la proliferación no maligna de las células epiteliales y estromales en la zona de transición que rodea la uretra. Si bien el número de células epiteliales lumbales aumenta en la BPH, el aspecto columnar y la

citología nuclear siguen siendo normales. A diferencia de la Hiperplasia Prostática Benigna, la Neoplasia Prostática Intraepitelial (PIN) de grado alto, o carcinoma *in situ*, se considera un estadio previo al establecimiento del carcinoma de próstata invasivo. La PIN puede dividirse inicialmente en lesiones de grado bajo y alto, y se considera un estadio previo al establecimiento y desarrollo del tumor en el tejido prostático. Este estadio se caracteriza por una proliferación celular de las células epiteliales del ducto prostático principalmente en la zona periférica de la glándula, observándose una marcada heterogeneidad genética y pérdida de diferenciación celular. La Neoplasia Prostática Intraepitelial suele aparecer en las regiones periféricas de la glándula prostática y se caracteriza por la displasia de las células epiteliales de la próstata; y aunque la integridad de la capa de células basales disminuye, las células basales aún se encuentran presentes. Mientras las células basales estén presentes la membrana basal se conservará, ya que estas células producen laminina. La primera evidencia histológica de cáncer es una progresiva pérdida de la membrana basal en la glándula, seguido de anomalías en los marcadores de diferenciación, incremento en el tamaño del núcleo de las células y variación del contenido genómico ocasionando inestabilidad genómica, y un aumento en la proliferación celular. Las células cancerosas de lesiones de grado alto pueden invadir y generar un carcinoma de próstata. La mayoría de los tumores en la próstata son Adenocarcinomas. Histológicamente, la transición desde la Neoplasia Prostática Intraepitelial de alto grado a los Adenocarcinomas se caracteriza por varios cambios histológicos en las células epiteliales invasivas con un perfil de citoqueratinas característico de las células lumbinales, morfogénesis y pérdida de la capa de células (Figura 5). A medida que los tumores se desarrollan se vuelven progresivamente menos organizados con estructuras ductales más pequeñas y, en última instancia, pueden perder estas estructuras por completo. Los tumores a menudo son multifocales y generalmente se desarrollan en la zona periférica de la glándula [2]. A medida que el cáncer de próstata progresa, las células malignas eventualmente pueden escapar de la próstata y hacer metástasis en los ganglios linfáticos y los huesos [9].

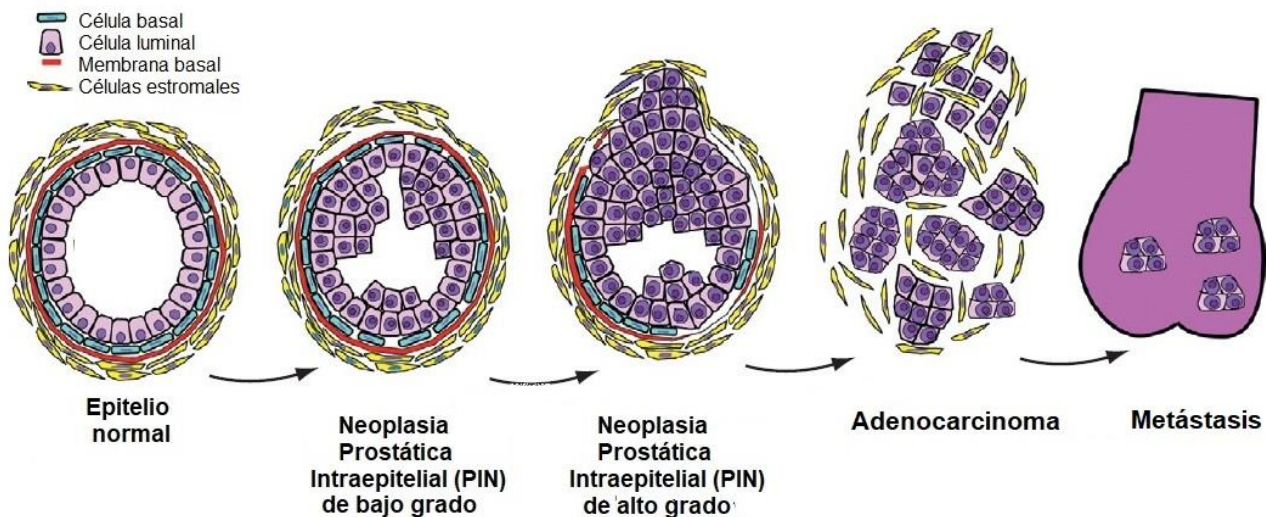


Figura 5: Modelo de progresión del cáncer de próstata. Tomado y modificado de Knudsen y colaboradores [2]

El esquema de clasificación del cáncer de próstata fue desarrollado por el patólogo Donald F. Gleason y se conoció como el sistema de puntuación de Gleason [23]. El sistema de puntuación de Gleason es el principal predictor de la recurrencia del tumor y de la progresión a enfermedad metastásica [2]. El diagnóstico del cáncer de próstata se basa en la evaluación microscópica del tejido prostático obtenido mediante biopsia, donde un patólogo se encarga de examinar estas muestras y clasificarlas en una escala de 1 a 5 (Figura 6) en función del patrón histológico que observe en el tumor. Los patrones 1 y 2 no se suelen usar para las biopsias; la mayoría de las muestras de biopsias muestran patrones de 3 o más. El patrón 3 de Gleason consiste en glándulas individuales y acinos bien formados de varios tamaños, las glándulas pequeñas son aceptables siempre que estén bien formadas y sin fusionar. El patrón 4 de Gleason incluye glándulas y acinos mal formados, fusionados, aglomerados y cribiformes. El patrón 5 de Gleason se caracteriza por estar formado por células individuales y cordones de células. Debido a menudo pueden encontrarse áreas con diferentes patrones histológicos, se asigna un patrón a cada una de las dos áreas más predominantes del tumor; estos dos patrones se suman para obtener un puntaje de Gleason. El puntaje de Gleason se considera el sistema de clasificación anatomopatológico de elección, ya que toma en cuenta la heterogeneidad morfológica inherente al cáncer de próstata y tiene un valor pronóstico demostrado por numerosos estudios [22]. Una puntuación alta de Gleason predice una progresión más

rápida de la enfermedad y sugiere que se necesitan tratamientos agresivos. Sin embargo, el puntaje de Gleason no proporciona información sobre la selección de la terapia. El sistema de puntuación de Gleason varía de 2 a 10, pero una puntuación de 6 es el más bajo asignado actualmente (las puntuaciones de Gleason de 5 o menos no se usan), y significa que es un cáncer de grado bajo. Una puntuación de Gleason de 6 es un cáncer de grado bajo o bien diferenciado, una puntuación de Gleason de 7 es un cáncer moderadamente diferenciado, y una puntuación de 8, 9 o 10 es un cáncer de grado alto o pobremente diferenciado. Un cáncer de grado más bajo crece más lentamente y tiene menos probabilidades de diseminarse que un cáncer de grado alto [23]. Los grupos de grados son una nueva forma de clasificación, que agrupa mejor a los distintos tipos de tumores según su comportamiento. Con el sistema de puntuación de Gleason se identifican solo tres grupos: aquellos tumores con una puntuación de Gleason de 6, de 7, y del 8 al 10. Esta información no es precisa, ya que el puntaje de Gleason 7 se compone de dos grados  $3 + 4 = 7$  y  $4 + 3 = 7$ ; este último con un pronóstico mucho peor. Del mismo modo, los puntajes de Gleason de 9 o 10 tienen un pronóstico peor que el puntaje de Gleason de 8. Para tener en cuenta estas diferencias, los grupos de grados van de 1 (más favorable) a 5 (menos favorable):

- Grupo de grado 1 = Puntaje de Gleason de 6 (o menos)
- Grupo de grado 2 = Puntaje de Gleason  $3 + 4 = 7$
- Grupo de grado 3 = Puntaje de Gleason  $4 + 3 = 7$
- Grupo de grado 4 = Puntaje de Gleason de 8
- Grupo de grado 5 = Puntaje de Gleason de 9 a 10

Aunque a la larga el sistema de grupo de grado puede sustituir al sistema de Gleason, los dos sistemas son en la actualidad reportados conjuntamente.

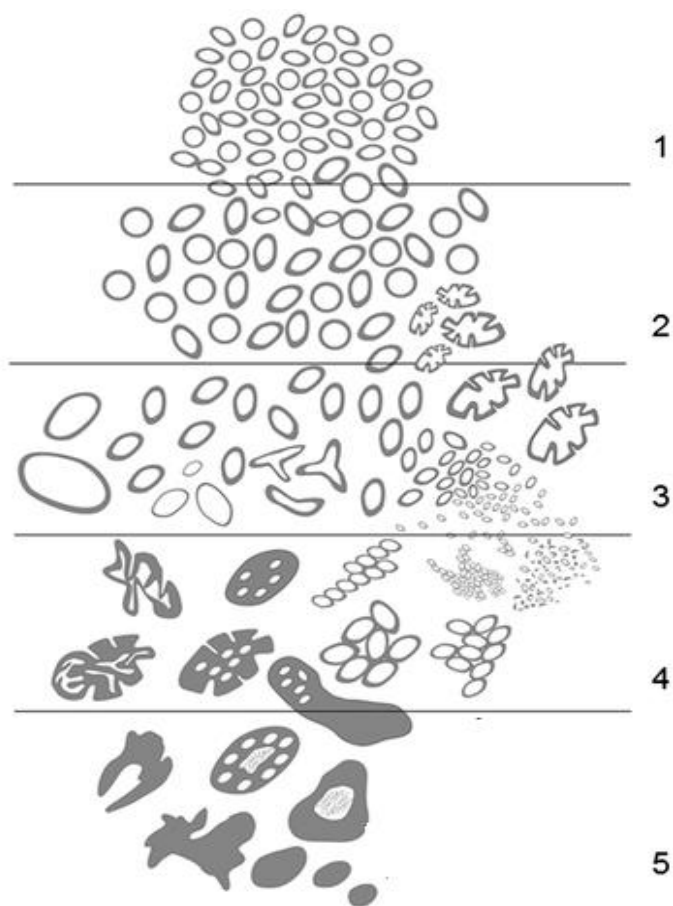


Figura 6: Sistema de puntuación de Gleason. Tomado y modificado de Shah y colaboradores [24].

El cáncer de próstata depende de la proporción de células que proliferan y de las que mueren y son los andrógenos quienes controlan dicha proporción al estimular la proliferación celular e inhibir la apoptosis. El AR se expresa en muchas células de cáncer de próstata y se ha demostrado que desempeña un papel importante en la tumorigénesis y metástasis del mismo [25]. La Serin Proteasa Transmembrana de tipo II (TMPRSS2) es un gen que responde a los andrógenos y si bien se expresa preferentemente en el tejido prostático normal, en el epitelio prostático neoplásico se encuentra sobreexpresada. Debido a su alta expresión podría ser un marcador potencial o un objetivo terapéutico para el cáncer de próstata [26]. Los miembros de la familia de ETS, como ERG, ETV1, ETV4 or ETV5, son factores de transcripción que cuando se expresan en exceso cumplen un rol en la tumorigénesis al regular la proliferación celular y migración celular, el control del ciclo celular y la apoptosis [27]. La identificación de fusiones frecuentes entre el gen TMPRSS2 y el homólogo del oncogén del virus E26 (ERG) de la eritroblastosis aviar, así



como fusiones adicionales que involucran a TMPRSS2 u otros genes regulados por el receptor, se asocia con un estadio tumoral avanzado, menor tiempo de supervivencia, puntaje alto de Gleason y metástasis [28, 29]. Las fusiones entre TMPRSS2 y ERG son mucho más comunes que las fusiones con otros miembros de la familia ETS, como ETV1 o ETV4. Probablemente, esto se debe a que el TMPRSS2 y ERG se ubican a una distancia de aproximadamente 3 Mb en el mismo cromosoma, mientras que los otros factores ETS se ubican en otros cromosomas. Se han descubierto ocho fusiones entre TMPRSS2 y ERG, las dos más frecuentes son la fusión tipo III encontrada en las células VCaP, que se forma fusionando el exón 1 del TMPRSS2 al comienzo del exón 4 del ERG, y la fusión tipo VI, que es causada por la fusión de los exones 1 y 2 del TMPRSS2 al comienzo del exón 4 del ERG [30] (Figura 7). La inhibición de las funciones del AR es un blanco importante en el tratamiento del cáncer de próstata primario para prevenir la progresión del tumor [31, 32]

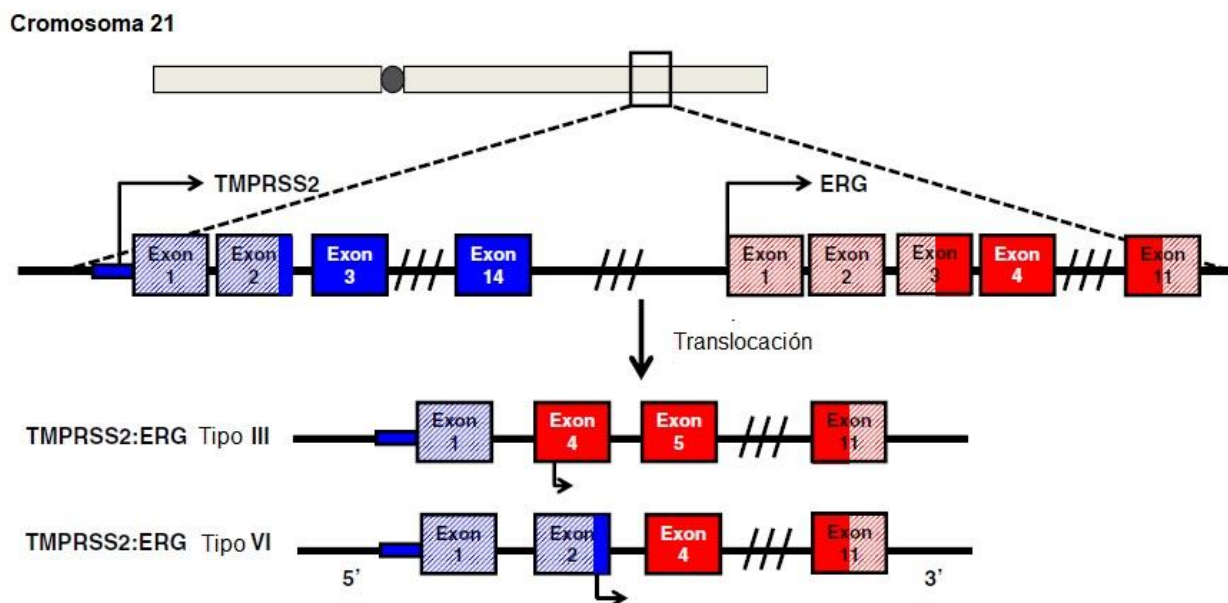


Figura 7: Estructura de la fusión TMPRSS2:ERG. Tomado y modificado de Shafi y colaboradores [10]

El hallazgo en los exámenes de detección de un aumento de los niveles del Antígeno Prostático Específico (PSA) sérico, un gen regulado por los andrógenos, es a menudo la primera indicación de cáncer de próstata [2]. El PSA sérico es una alarma de que las células de la próstata están liberando dicha proteína de manera inapropiada a la circulación en lugar de enviarla hacia el lumen de la próstata. Aunque el cáncer de

próstata a menudo causa esto, una lesión en la próstata también puede liberar PSA. Por lo tanto, debe existir una confirmación mediante un examen digital y/o mediante una biopsia [27].

El tratamiento estándar para el cáncer de próstata desde el año 1940 ha sido la terapia de privación de andrógenos (ADT, castración quirúrgica o médica) para suprimir la actividad transcripcional del receptor de andrógenos. Esta, resulta en un inicio efectiva pero la mayoría de los pacientes recae luego de varios años con una enfermedad que generalmente es más agresiva y que se conoce como Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CRPC). Las células de próstata benignas son sensibles a las hormonas y contienen receptores de andrógenos de manera que al inicio del bloqueo hormonal estas células responden y sufren apoptosis [33]. Los estudios de muchos grupos demuestran que el receptor de andrógenos se encuentra reactivado en el CRPC y esto puede haber sido impulsado, al menos en parte, por las hormonas esteroideas residuales de las glándulas suprarrenales. En los últimos años ha cambiado la terapia para el CRPC, ya que ahora se acepta que el AR se encuentra activo y estimula el crecimiento [28]. Las células tumorales pueden emplear varios mecanismos que promueven la supervivencia a pesar de la castración, como la sobreexpresión del receptor o el empalme alternativo del transcrito (ARV); además se han identificado varias mutaciones en el gen del AR que llevan a que las concentraciones de andrógenos necesarias para la activación del receptor sean menores respecto a las concentraciones normales, aumentan la afinidad del AR a progesterona y glucocorticoide, o afectan el reclutamiento de co - represores o co - activadores del AR [2]. Las variantes del AR generadas por empalme alternativo a menudo poseen truncado el dominio C - terminal del receptor, haciéndolo activo constitutivamente e insensible a las hormonas [34]. Otro mecanismo de resistencia a la castración es la activación autocrina de la síntesis de andrógenos por las células tumorales, que son capaces de sintetizar testosterona a partir de los andrógenos suprarrenales o el colesterol, lo que conduce a la persistencia de los andrógenos pese a la supresión de testosterona [35, 36]. Además, la disminución de los niveles circulantes de andrógenos en pacientes castrados puede aumentar a partir de la hiperactivación de diferentes vías de señalización, lo que resulta en una mayor actividad del AR [2].

Además del AR, existen otras proteínas que participan en una variedad de vías de señalización celular que también pueden afectar la muerte o supervivencia de las células

de próstata, como la señalización NF -  $\kappa$ B, JAK/STAT, MAPK, Wnt, PI3K/Akt y Notch. Entre estos, la vía de señalización de Notch, que está presente en la mayoría de los organismos multicelulares, desempeña un rol en la metástasis del cáncer al controlar el desarrollo del mismo, modular la transición epitelio – mesenquimal (EMT), la proliferación y afectar los procesos de angiogénesis tumoral [37]. Tanto los receptores Notch como los ligandos son proteínas transmembrana, por lo tanto, la señalización se activa por la interacción con células adyacentes. Esto último resulta muy importante para el proceso de metástasis, el cual depende de interacciones célula – célula y de la adhesión [38].

## Vía de señalización Notch

Los receptores Notch y sus ligandos representan un sistema de señalización evolutivamente antiguo y muy conservado que se encuentra en especies tan diversas como moscas, gusanos y vertebrados [39, 40]. Aunque Notch ha sido originalmente descrito como un gen neurogénico en *Drosophila* [41], incluso el primer análisis de embriones de esta especie reveló que la señalización Notch es pleiotrópica, afectando muchos tejidos.

La primera demostración de la importancia de los genes Notch en el desarrollo de vertebrados provino del aislamiento de formas oncogénicas de NOTCH 1 en humanos [42] y del gen int-3 relacionado a Notch en ratón [43]. En ambos casos se expresaron formas truncadas en la mayor parte o en todo el dominio extracelular de estas proteínas, lo que provocó el desarrollo de leucemia y tumores de mama respectivamente. Asimismo, Notch también es esencial para el desarrollo embriogénico y posnatal, jugando un rol esencial en varios tejidos y resultando en una amplia variedad de efectos [44]. Por todo esto, no sorprende que en humanos la ganancia o pérdida de componentes de la señal Notch estén asociadas directamente a múltiples desórdenes [45].

Los receptores Notch son proteínas transmembrana tipo I de paso único. Mientras que el genoma de moscas contiene solo un receptor Notch, el de gusanos contiene dos que actúan de manera redundante, y el de mamíferos posee cuatro receptores parálogos que tienen tanto funciones redundantes como únicas (Notch 1 - 4) [45]. Los receptores Notch

se sintetizan como proteínas de longitud completa sin procesar en el retículo endoplasmático; y luego de su síntesis, estas proteínas sin procesar de 300 kDa se transportan utilizando la vía secretora a la superficie celular a través de la red del trans Golgi. Durante este transporte se clivan en un sitio llamado clivaje S1 por una convertasa del tipo furina para generar dos subunidades: una contiene la mayor parte del dominio extracelular (NECD) y la otra (NTMIC, o también llamada NEXT) se compone de lo que resta de este dominio y los dominios transmembrana (TMD) e intracelular (NICD) completos (Figura 8). Estas dos subunidades se asocian de manera no covalente, dando como resultado la expresión en la superficie celular de un receptor transmembrana maduro de tipo I; el receptor se ancla a la membrana plasmática por su único dominio transmembrana. [46]. El NECD de todas las proteínas Notch contiene entre 29 y 36 repeticiones en tándem del tipo EGF, algunas de las cuales median las interacciones con el ligando. Las interacciones con el ligando activadoras se llevan a cabo en células vecinas (interacciones trans) y son mediadas por las repeticiones 11 y 12, mientras que las interacciones inhibitorias con el ligando co – expresado en la misma célula (interacciones cis) son mediadas por las repeticiones 24 – 29. Algunas repeticiones EGF se unen a calcio, lo cual juega un rol importante en determinar la estructura y afinidad de Notch a sus ligandos. Estas repeticiones son seguidas por una única Región Regulatoria Negativa (NRR), importante en prevenir la activación del receptor en ausencia de ligando, y un Dominio de Heterodimerización (HD) [45]. El NICD posee un módulo de asociación al regulador transcripcional RBPJ (RAM), repeticiones tipo anquirina (ANK), señalizaciones de localización nuclear (NLS), un dominio de transactivación evolutivamente divergente (TAD) y un dominio de degradación (PEST) que modula la estabilidad del NICD. Estos dominios pueden ser modificados por fosforilación, hidroxilación, ubiquitinación o acetilación para alterar la señalización a través del NICD [47].

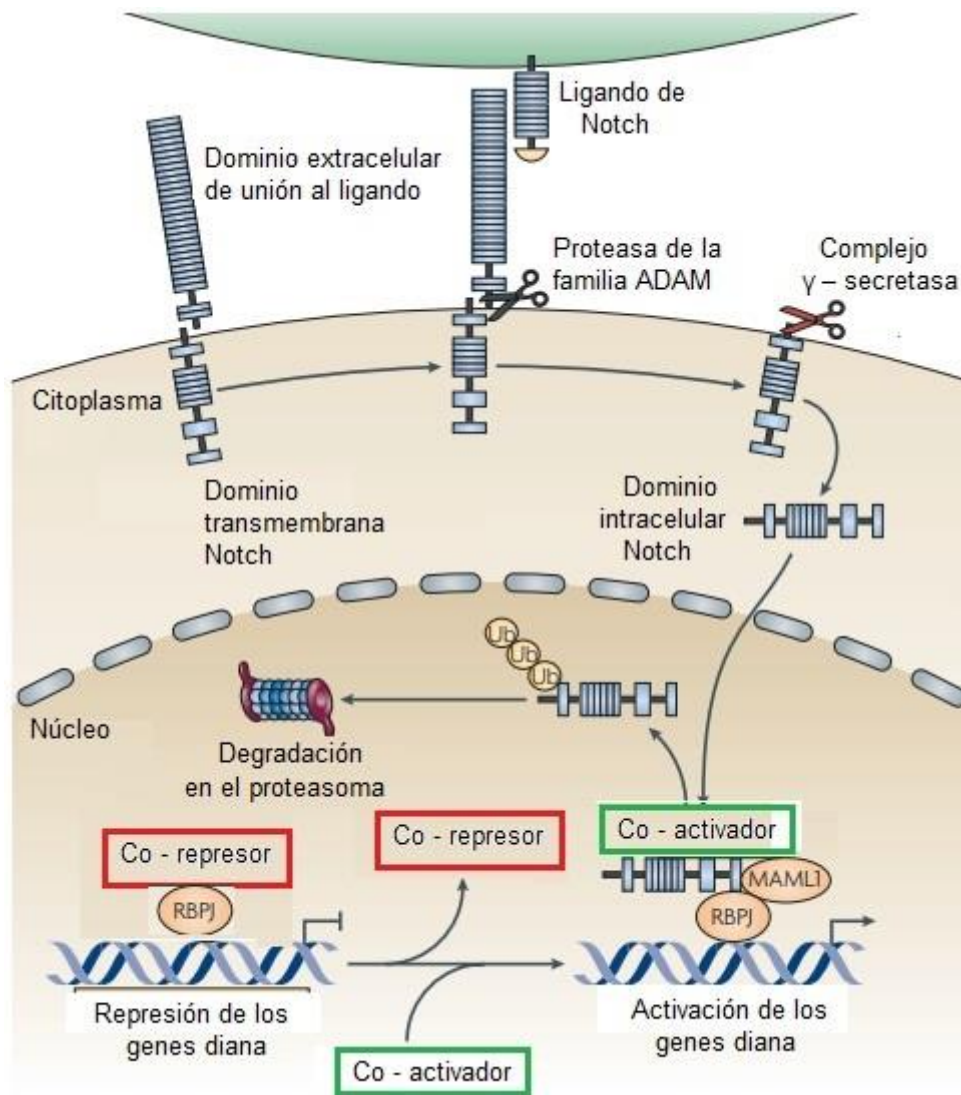


Figura 8: Esquema de la vía de señalización Notch canónica. Tomado y modificado de Amsen y colaboradores [48]

En mamíferos existen cinco miembros de la familia de ligandos Notch que, al igual que los receptores Notch, son proteínas transmembrana de tipo I: Jagged 1 y 2 y Delta 1, 3 y 4. Todos ellos se caracterizan por poseer tres motivos estructurales relacionados: un motivo DSL (Delta/Serrate/LAG – 2) en el extremo amino terminal, el dominio DOS constituidos por repeticiones de EGF en tándem y repeticiones similares a EGF. Tanto el motivo DSL como el dominio DOS están involucrados en la unión al receptor, y el DSL en las interacciones *trans* y *cis* [45, 49]

La vía de señalización iniciada en respuesta a ligandos Notch mejor caracterizada es conocida como la vía de señalización Notch canónica. Esta vía es yuxtácrina, de

comunicación célula – célula, en la cual un receptor Notch transmembrana interacciona extracelularmente con un ligando Notch transmembrana de una célula vecina, iniciando un clivaje proteolítico del receptor y la subsecuente liberación de su dominio intracelular (NICD). Luego el NICD transloca al núcleo donde interacciona con la región kappa de la Proteína de Unión a la Señal Recombinante J de las Inmunoglobulinas (RBPJ –  $\kappa$ ) e inicia la transcripción de genes diana. La señalización Notch no canónica difiere de la canónica en que puede ser iniciada por un ligando no canónico o puede no requerir el clivaje del receptor Notch [47] o incluso puede ocurrir sin los factores de transcripción RBPJ [49].

En ausencia de unión del ligando, los receptores Notch se encuentran inactivos. La unión de un ligando a las repeticiones 11 y 12 del tipo EGF de un receptor Notch adyacente induce un cambio conformacional en el dominio extracelular de Notch, exponiendo el sitio de clivaje S2 a la enzima metaloproteasa ADAM. De esta manera, se desprende el NECD que es trans – endocitado por la célula que expresa el ligando y degradado por el lisosoma. La parte remanente unida a membrana es ahora sustrato del complejo  $\gamma$  – secretasa (compuesto por presenilina, nicastrina, Pen – 2 y Aph – 1) que produce un clivaje proteolítico intramembrana regulado en el sitio S3/S4 que libera al NICD [46, 47], el cual es translocado al núcleo donde interacciona con proteínas de la familia de represores transcripcionales CSL (CBF1 o RBPJ en mamíferos) convirtiéndolas en activadoras [44]. Una familia de proteínas activadoras de la transcripción del tipo Mastermind (MAML), forma un complejo ternario con RBPJ – NICD por interacción directa con el NICD. MAML recluta la histona acetiltransferasa p300/CBP que acetila las histonas, alterando la estructura de la cromatina hacia una forma en la que puede activarse la transcripción. De este modo, el complejo ternario CBF1 – NICD – MAML recluta la maquinaria de transcripción y funciona como un activador transcripcional de genes diana de Notch [46].

Entre los blancos principales se encuentran varios genes que pertenecen a la familia de proteínas hélice – bucle – hélice (bHLH). En mamíferos, la síntesis de al menos dos familias de proteínas bHLH es inducida luego de la activación de Notch: la familia hairy/enhancer – of – Split (HES) y la familia del factor de transcripción asociado a hairy (HEY). Ambos, HES y HEY, son represores transcripcionales [46].

La vía Notch no actúa independientemente, forma parte de una compleja red donde muchas vías de señalización están interconectadas. Dentro de esta red, son necesarios bucles de retroalimentación para limitar la señal en tiempo y espacio durante el desarrollo.

La vía de señalización Notch se autorregula por mecanismos de retroalimentación positiva y negativa mediante reguladores que son genes blanco directos de Notch. Estos pueden clasificarse en base a los estadios donde actúan:

- La iniciación de la respuesta Notch: Los genes que codifican para los receptores Notch 1 y Notch 3, así como para sus ligandos Jagged 1 y Delta 1 son autorregulados por la vía Notch. La regulación de los receptores Notch resulta en una retroalimentación positiva. La activación de la expresión del ligando, sin embargo, lleva a un incremento en la respuesta Notch en la célula adyacente pero al mismo tiempo afecta negativamente la señalización Notch en la célula originante. Este proceso es conocido como Inhibición cis [44].

- La cantidad y estabilidad del complejo NICD: Una vez que el NICD cumple su función de activación génica, debe ser rápidamente degradado ya que su acumulación sostenida puede tener efectos deletéreos [45]. En muchos casos, la activación de Notch es pulsátil y transitoria, lo que permite regular de manera óptima la intensidad de la señal. Para su degradación, el dominio PEST del NICD es fosforilado y se convierte en blanco de ubiquitinaciones que llevan a su degradación proteosomal. Esto reduce la cantidad total de NICD en el núcleo, y así, el resultado de la transcripción.

- Co – regulación de genes diana de Notch: Muchos genes blanco de Notch son factores de transcripción que transmiten la señal Notch a los genes blanco ubicados aguas abajo. Hes 1, Hes 5 y Hey 1 se unen a sitios de regulación de la transcripción de genes diana y reclutan complejos represivos. Para este tipo de retroalimentación, Bray introdujo el término “lógica de red incoherente” para referirse a Notch como una vía de señalización que induce y también reprime la transcripción de sus genes diana [50]. El propósito de este tipo de retroalimentación podría ser crear una ventana de sensibilidad temporaria después de la activación de Notch.

Estos bucles de retroalimentación positiva y negativa en la vía Notch podrían tener un rol importante en el ajuste de la señalización y ser un componente esencial de la red de regulación celular para convertir señales externas en respuestas biológicas versátiles. [44].

Una de las características notables de la vía Notch es que carece de amplificación de señal, como sí poseen las vías de señalización clásicas, y que se consume cada molécula de receptor que es activada. La vía Notch es compleja, dependiente del contexto celular y

altamente regulada. Los procesos controlados por ella son determinantes tanto a nivel celular como del organismo entero. Estos procesos incluyen la proliferación, diferenciación, apoptosis, angiogénesis, especificación de destino y segregación de linajes celulares y el mantenimiento de células madre [46]. Esta diversidad de funciones es lograda por las distintas combinaciones que establecen los patrones de expresión ligando – receptor y por la intensidad de la señal, modulada en todos sus niveles: desde la producción de sus componentes, modificaciones postraduccionales (como glicosilación, fosforilación, acetilación, hidroxilación), ensamblaje a otras proteínas, hasta su degradación regulada [47].

## Vía de señalización Notch en Cáncer

Con su participación en el desarrollo normal de los tejidos, no es sorprendente que la desregulación de esta vía de señalización juegue un papel importante en los trastornos o enfermedades de los tejidos, donde el Notch esté implicado en actividades oncogénicas o supresoras de tumores [49].

La desregulación de la expresión de Notch se asoció por primera vez al cáncer en pacientes con leucemia linfoblástica aguda de las células T (T – ALL) mediante el análisis de la translocación cromosómica t(7; 9)(q34; q34.3), que trae como consecuencia la sobreexpresión de los transcritos truncados de Notch - 1 [51]. Por otra parte, la sobreexpresión de Notch - 3 por una variación en el número de copias obtenida en el cromosoma 19p13.12 contribuye a la progresión del tumor en el cáncer de ovario [52]; además, se ha demostrado que Notch3 forma un bucle yuxtacrino con su ligando Jagged1 en pacientes con cáncer de ovario promoviendo su malignidad [53]. Utilizando un modelo de ratón de tumorigénesis mamaria recurrente en combinación con análisis bioinformáticos de pacientes con cáncer de mama, se ha establecido que la actividad de Notch se encuentra asociada positivamente con la recurrencia del cáncer de mama en pacientes [54]. Asimismo, los pacientes con carcinoma hepatocelular con alta expresión de Notch - 3 muestran un peor pronóstico que aquellos con baja expresión de la proteína;



más aún, estudios *in vitro* sugieren que la señal Notch - 3 podría ser un objetivo terapéutico para los pacientes que no responden a la quimioterapia [55].

En cuanto a la función supresora de tumores de Notch, se ha reportado que la señalización de Notch induce la detención del crecimiento de células en el cáncer de pulmón de células pequeñas. La sobreexpresión de las formas activas de Notch - 1 y Notch - 2 en células de cáncer de pulmón de células pequeñas aumentó la expresión de p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>, y con ello a una detención del ciclo celular en G1 [56]. Otro grupo reportó que como la activación de Notch - 1 aumentó la expresión de p21<sup>Cip1</sup> e inhibió el crecimiento celular en los queratinocitos de ratón, la inactivación de Notch1 incrementó la hiperplasia epitelial y de la córnea, seguido del desarrollo de tumores de piel en un modelo experimental de ratón [57, 58]. La pérdida de Notch1 en la epidermis y en los queratinocitos conduce además a una activación inadecuada de la vía Wnt/ $\beta$  – Catenina, que generalmente se asocia con varias neoplasias malignas [59]. Incluso en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), se encontró que la vía de señalización de Notch está silenciada [51].

Los adenocarcinomas de la próstata surgen como lesiones heterogéneas multifocales como el resultado de alteraciones genéticas y epigenéticas, y una comunicación célula – célula desregulada. La vía de señalización Notch, participa en varios procesos celulares, como el mantenimiento de células madre, especificación del destino celular, diferenciación, proliferación, adhesión celular, migración, transición epitelio – mesenquimal (EMT) y apoptosis [60, 61]. Dado que la señalización de Notch se encuentra evolutivamente conservada y es necesario para el desarrollo normal de la próstata [60], esta podría contribuir al desarrollo del cáncer en la glándula.

# Vía de señalización Notch en Cáncer de Próstata

El desarrollo de la próstata es un excelente modelo para estudiar el destino celular, y no es sorprendente que la señalización de Notch se haya estudiado en este contexto. La señalización de Notch se induce en momentos de rápido crecimiento correspondientes a la formación de la glándula en el embrión y su regeneración tras la administración de andrógenos exógenos después de la castración. Sin embargo, si Notch promueve o restringe el crecimiento es controversial.

A pesar de que la expresión de Notch se encuentra regulada positivamente en el cáncer de próstata y más aún a medida que aumenta la gravedad de la lesión con respecto al grado de Gleason [62], el rol de la vía de señalización de Notch en el cáncer de próstata permanece poco esclarecido. Por un lado, se ha reportado que la señalización a través del Notch inhibe la proliferación celular a través de la acción de inhibidores del ciclo celular como lo es p21, por lo que la pérdida de Notch - 1 en el Adenocarcinoma de próstata elimina su capacidad supresora del crecimiento tumoral; mientras que otros trabajos sugieren que Notch promueve el crecimiento y la progresión tumoral. Un ejemplo de cómo dicha vía de señalización actúa como oncogén es el hecho de que Notch - 1 ayuda a la invasividad del cáncer de próstata al regular la metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP9) [63]. Si existen estudios que reportan una regulación negativa de Notch - 1 en varios adenocarcinomas de próstata, otros reportan que la vía se encuentra sobreexpresada en el tejido prostático maligno en comparación con los controles benignos [63]. No se encontró que la tumorigénesis sea impulsada por el aumento de la señalización de Notch -1 exclusivamente [63], por lo que la inhibición de Notch - 1 como terapia para esta neoplasia maligna se debe contextualizar cuidadosamente mediante el análisis de su expresión en las células cancerosas y en el microentorno circundante [64]. El rol de la vía de señalización Notch como supresor tumoral o como oncogén en el adenocarcinoma de próstata requiere una investigación más profunda para esclarecer estas controversias [49].

# Tratamientos farmacológicos en el Cáncer de Próstata

El tratamiento estándar actual para combatir el cáncer de próstata avanzado es la terapia de deprivación de andrógenos (ADT), que se logra a través de la orquiectomía, la administración de análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) con o sin un antiandrógeno, o antagonistas de la GnRH y estrógenos sintéticos, los que resultan en la remisión de la enfermedad en el 90 % de los casos aproximadamente [65]. Sin embargo, después de 5 años, aproximadamente entre el 10 – 20 % de los pacientes experimentan una progresión de la enfermedad conocida como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), caracterizada por un aumento del antígeno prostático específico (PSA), un peor pronóstico con un tiempo medio de supervivencia de 9 a 13 meses y un deterioro en la calidad de vida [65, 66].

La Abiraterona y la Enzalutamida se utilizados ampliamente como tratamientos estándares para el CRPC; sin embargo, la eficacia de estos mismos es muy variable y la resistencia a ellos ocurre cuando estos dos agentes se administran secuencialmente [67]. La Abiraterona inhibe de forma selectiva e irreversible la enzima CYP17A1, lo que produce una inhibición de la biosíntesis de testosterona en las glándulas suprarrenales, los testículos y las células tumorales [68]. La Enzalutamida es un compuesto no esteroideo y un antagonista de segunda generación del receptor de andrógeno que compete con los andrógenos para unirse al receptor, además bloquea la translocación nuclear del complejo ligando – receptor e impide la unión de este complejo a los elementos de respuesta a los andrógenos en el ADN y el reclutamiento de co – activadores de manera más efectiva que los antiandrógenos de primera generación [69]. La Enzalutamida no induce la expresión de los genes diana del receptor de andrógeno, como lo son PSA y TMPRSS2, lo que demuestra que carece de actividad agonista en aquellos pacientes que presentan una resistencia a la castración [65]. Este antiandrógeno ha logrado un control de la enfermedad en diferentes estadios de la misma, incluyendo aquellos pacientes con CRPC metastásico y no metastásico en varios ensayos clínicos [70]

Resulta fundamental comprender los mecanismos del desarrollo de la resistencia a la Enzalutamida, ya sea que se den a través de alteraciones en el AR directamente o de mecanismos de resistencia distintos al AR. La mayoría de las investigaciones se centran en el estudio de la activación de mutaciones en el dominio de unión al ligando del AR (LBD) y las variantes de empalme, particularmente aquellas constitutivamente activas que carecen del dominio de unión al ligando [71, 72]. Sin embargo, estas explican solo una fracción de los casos de resistencia clínica a la terapia dirigida al AR, y la contribución de los mecanismos de resistencia no mediados por AR sigue siendo poco conocidos [73, 74]. Se ha demostrado que las vías de la Fosfoinositol – 3 – quinasa (PI3K), la proteína quinasa B (AKT), la quinasa reguladas por señal extracelular (ERK) y la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), estimulan la expresión de los genes diana del AR en ausencia del ligando [71, 74]. La identificación y caracterización de esas vías de señalización independientes del AR podría conducir a terapias dirigidas adicionales.

Se ha descrito un aumento de los niveles del dominio intracelular de Notch - 1 (NICD1) en muestras de pacientes con cáncer de próstata de alto riesgo y CRPC respecto al observado en pacientes con cáncer de próstata de bajo riesgo; por lo que NICD1 actúa como un impulsor del adenocarcinoma de próstata agresivo y CRPC metastásico junto con otras alteraciones comunes observadas en el cáncer de próstata (sobreexpresión de cMyc, pérdida de PTEN o activación de la vía Ras/Raf/MAPK) [75]. La señalización del receptor Notch - 1 desempeña un papel central en el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata y puede servir como un objetivo terapéutico racional en cáncer de próstata de alto riesgo y CRPC metastásico [76]. Además, se ha reportado que la señalización Notch se activa después de la terapia de deprivación de andrógenos y contribuye a la resistencia a la misma en las células de cáncer de próstata, por lo que la inhibición de la vía podría ser una terapia adyuvante a la terapia de deprivación de andrógenos para tratar el cáncer de próstata [77].

El procesamiento proteolítico de Notch por la  $\gamma$  – secretasa es un paso necesario en la activación de esta vía de señalización. Por lo tanto, esta proteasa ha sido considerada como un objetivo prometedor para la inhibición de Notch con una clase de compuestos llamados inhibidores de la  $\gamma$  –secretasa (GSI). Todos los GSI que afectan la vía Notch actúan a través de su inhibición, a pesar de sus diferentes estructuras químicas. El tratamiento con el inhibidor de la  $\gamma$  –secretasa DAPT redujo el crecimiento de un

meduloblastoma e indujo a la detención del ciclo celular en G0 – G1 y la apoptosis en un modelo de ratón de T-ALL [78]. Y se ha demostrado que además inhibe el crecimiento de las células renales en el carcinoma en un modelos *in vitro* como *in vivo* e inhibe el crecimiento de las células de cáncer de páncreas *in vitro* a través de la inhibición de la señalización de Notch [79, 80]. Se ha demostrado que el DAPT inhibe la proliferación y la migración de células de cáncer de próstata a través de la regulación negativa de la activación de Notch – 1 y sus genes diana específicos [81].

# **Hipótesis y Objetivos**

# Hipótesis

Postulamos como hipótesis del trabajo que la activación de la señalización Notch en los tumores de próstata es diferencial según el grado de malignidad tumoral y determina su comportamiento frente a los tratamientos inhibitorios dirigidos al receptor de andrógenos.

# Objetivos

El objetivo general del presente plan de trabajo es estudiar la señalización Notch como mecanismo molecular asociado al desarrollo de agresividad tumoral y resistencia a los tratamientos específicos del cáncer de próstata.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

### **1 – Señalización Notch y comportamiento tumoral**

Evaluar la activación de la señalización celular Notch y su relación con el comportamiento tumoral tanto en:

- líneas celulares de cáncer de próstata *in vitro*
- piezas de tumores humanos de próstata de distinto grado de malignidad tumoral

.

### **2 – Señalización Notch y respuesta a las terapias dirigidas al receptor de andrógenos.**

Evaluar el efecto de la modulación de la activación de Notch sobre el comportamiento tumoral en líneas celulares de cáncer de próstata tratadas con un antagonista del AR:

- para evaluar el efecto de DAPT y Enzalutamida, aislados o en combinación, sobre la expresión de genes diana de las señalizaciones respectivas
- determinar el efecto de DAPT y Enzalutamida aislados o en combinación sobre la proliferación celular y la capacidad migratoria.



# **Materiales y Métodos**

# Muestras de pacientes de tumores de próstata

Se obtuvieron las muestras a partir de biopsias tumorales recibidas de la Clínica Centro, nosocomio de la región del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Los pacientes firmaron de manera previa el consentimiento informado correspondiente. Los tumores fueron previamente clasificados por el laboratorio de anatomía patológica. El laboratorio recibió hasta el momento 7 muestras de diferentes histotipos para la realización de las técnicas.

## Modelo experimental

La línea celular humana de cáncer de próstata PC-3 se originó a partir de la metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de grado IV.

## Drogas

Para el tratamiento de la línea celular PC-3 se utilizó 1) el inhibidor de la  $\gamma$  – secretasa, DAPT (Santa Cruz Biotechnology), un inhibidor de la activación de Notch, en las dosis de 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M; y 2) el antagonista del receptor de andrógenos, Enzalutamida (Selleckchem) (MDV3100) en la dosis 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M. Los tratamientos fueron realizados durante 24, 48 o 72 horas. Ambas drogas se disolvieron en DMSO y se almacenaron a -20 °C; para su uso en los tratamientos se diluyeron en medio de estímulo.

# Técnicas

## Cultivo de líneas celulares

La línea celular de cáncer de próstata PC-3 fue cultivada en adherencia en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 1 % de glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina. La línea celular fue mantenida a 37 °C y con 5 % de dióxido de carbono. Para la realización de los experimentos, las células fueron plaqueadas en medio completo y se dejan por 24 horas adherirse a la placa. Pasadas las 24 horas el medio completo de cada pocillo fue reemplazado por medio de estímulo fresco, compuesto por RPMI suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB), 1 % de glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina. Una vez agregado el medio de estímulo, las células fueron llevadas nuevamente a la estufa durante una hora para su estabilización y posteriormente se realizaron los tratamientos correspondientes. Para los experimentos de extracción de proteínas y de ARN se cultivaron las células en placas de 6 pocillos con  $1,2 \times 10^5$  células cada uno.

## Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT – qPCR)

Los experimentos de ARN realizados con las células PC-3 se procesaron mediante el método de Trizol para extracción del ARN total. Para esto, una vez finalizado el experimento, a cada pocillo de la placa se le agregó Trizol (Life Technologies) para disgregar de las células y se recolectó en un eppendorf el volumen total del pocillo. Las muestras fueron incubadas por 5 minutos a 30 °C, finalizado ese tiempo se agregó Cloroformo y se incubó nuevamente a la misma temperatura por 5 minutos más. Se

centrifugó a 4 °C por 15 minutos a 12000 g, y la fracción transparente presente en el sobrenadante se trasvasó a otro eppendorf para luego añadirle Isopropanol. Posteriormente, se incubó por 10 minutos a 30 °C y se centrifugó a 4 °C por 10 minutos a 12000 g. El sobrenadante se eliminó, quedando así el ARN en el pellet. Este se lavó con Etanol 70 % y se centrifugó a 7500 g a 4 °C por 5 minutos para eliminar dicho alcohol. Se dejó secar el Etanol remanente a temperatura ambiente y luego se resuspendió el ARN total en 5 µl de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas. Por último, las muestras fueron se incubaron durante 10 minutos a 60 °C. Después de cuantificar la cantidad de ARN por Picodrop (Microlat), se conservó en freezer a – 80 °C.

La retrotranscripción del ARN a ADN complementario (ADNc) fue realizada con 2 µl de dNTPs (10mM), 0,8 µl de oligos dTs, 4 µl de buffer 5X, 0,4 µl de enzima retrotranscriptasa MMLV (Promega), el volumen correspondiente a 2 µg de ARN de cada muestra y la cantidad de agua necesaria para llegar a 20 µl. El programa de retrotranscripción consistió en un ciclo de 10 minutos a 25 °C y uno de 50 minutos a 37 °C en un termociclador de punto final Veriti (Applied Biosystems).

Para el análisis de la transcripción génica, se realizó una PCR en tiempo real (qPCR) para los genes diana de la vía Notch y la vía del Receptor de Andrógenos, en termociclador LineGene 9600 (Bioer). La amplificación del ADNc se realizó utilizando 1,5 µl de cada muestra con 0,3 µl de cada cebador específico (sentido y antisentido a concentración 25 µM), 5,4 µl de agua y 7,5 µl del kit de PCR en tiempo real (TecnoLab). Los niveles de ARNm de cada gen fueron relativizados a los del gen de referencia G3PDH, por el método del delta Ct. Los cebadores para cada gen y el programa de ciclado utilizado se encuentran especificados en la siguiente tabla.

Gen	FO (5' → 3')	RE (5' → 3')	Ta (°C)
<i>Hes-1</i>	TGTCAACACGACACCGGATA	ATGCCGCGAGCTATCTTTCTT	56,5
<i>TMPRSS2</i>	AGCGGATCCACCAGCTTTAT	GCTCTGGCGGCTTGAGTT	65
<i>G3PDH</i>	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT	63

Temperatura (°C)	Tiempo
95 °C	10'
95 °C	20''
Ta	1'
72 °C	40''
95 °C	20''
60 °C	20''
95 °C	20''

} 40 X

## Western Blot (WB)

Las proteínas fueron extraídas de células PC-3 mediante la disgregación con pipeta en buffer de lisis (HEPES 50 mM, NaCl 140 mM, Glicerol 10 %, EDTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, NaF 100 mM, PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas 1 X y Tritón 1 %). La concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford y posterior lectura de absorbancia a 595 nm en lector de microplacas (iMark, BIO-RAD).

Las proteínas luego se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 12 % en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS – PAGE) según la experiencia del laboratorio [82, 83]. Un total de 50 µg de proteína se sembraron en buffer de carga y se corrieron a voltaje constante, 90 V para el gel de apilamiento y 120 V para el gel resolutivo, en buffer de corrida (Tris – Base, Glicina, SDS y agua bidestilada). Luego, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond, GE) por 115 minutos a 400 mA constantes en buffer de transferencia (Tris – Base, Glicina, Metanol y agua bidestilada). La membrana se bloqueó con leche 3% en PBS 1X – Tween 20 0,05 % (PBS – T) y los lavados se realizaron en PBS – T. Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante toda la noche con los anticuerpos primarios anti – PCNA (Santa Cruz Biotech), y anti – Tubulina (Sigma). Los valores fueron relativizados a los de la proteína constitutiva Tubulina. Luego se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (HRP) anti – IgG de conejo o ratón en función de la especie de origen del anticuerpo primario.

El revelado se realizó por adición de luminol, ácido p-cumárico y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sustratos de la HRP) y las imágenes fueron adquiridas con un detector de imágenes de electroquimioluminiscencia (ImageQuant LAS 4000, GE) con cámara CCD. Las bandas obtenidas se cuantificaron con el software ImageJ.

## Ensayo de Viabilidad Celular MTS

Para el ensayo de MTT se cultivaron  $1,8 \times 10^4$  células PC-3 en placas de 96 pocillos. Una vez finalizados los tratamientos se agregó 10  $\mu$ l de MTS (AbCam) y se incubó en estufa a 37 °C con 5 % de dióxido de carbono por 3 horas. El ensayo de viabilidad celular utilizando este reactivo se basa en la reducción del compuesto tetrazolio MTS por las células viables de mamíferos (y células de otras especies), que genera un colorante de formazán soluble en los medios de cultivo celular. Esta conversión es llevada a cabo por las enzimas deshidrogenasa dependientes de NAD(P)H en las células metabólicamente activas. El colorante de formazán se cuantifica midiendo la absorbancia a 490-500 nm. Las lecturas de la absorbancia a 490 nm en lector de microplacas (iMark, BIO – RAD) se realizaron cada media hora.

## Inmunohistoquímica (IHQ)

Se obtuvieron cortes histológicos a partir de muestras de tumores de próstata humanos incluidos en parafina, los cuales se cortaron en secciones de 4  $\mu$ m en micrótopo y se montaron en portaobjetos de vidrio con carga positiva. Las secciones fueron desparafinizadas en Xileno, rehidratadas en alcoholes de concentraciones decrecientes, lavadas con PBS y tratadas con citrato (10mM a pH = 6) en microondas a potencia máxima durante 10 minutos para la recuperación de antígenos. Las peroxidasa endógenas fueron inhibidas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % en PBS durante 30 minutos a temperatura

ambiente. Los cortes se pre – incubaron con leche 5 % en PBS 1X durante 1 hora para bloquear sitios de unión inespecífica. Luego se incubaron con anticuerpos primarios para detección el marcador de proliferación PCNA (Santa Cruz Biotechnology) y los receptores Notch - 1 (Santa Cruz Biotechnology), Notch - 2 (Millipore), Notch - 3 (Santa Cruz Biotechnology) y Notch - 4 (NeoBioLab) durante la noche a 4 °C en cámara húmeda. Seguido a esto, se lavaron con PBS, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y 30 minutos con un anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo, ratón o cabra (Santa Cruz Biotechnology) en función de la especie de origen del anticuerpo primario, y luego con un complejo de avidina y biotina (ABC) preformado por 30 minutos (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories). Al finalizar los lavados correspondientes, se agregó una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) 0,05 % (Sigma – Aldrich) conteniendo 0,01 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su revelado. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente, se sumergieron en Xileno y se montaron con DPX (Biochemika, Fluka).

Se realizaron controles negativos de la técnica para cada anticuerpo, en los cuales se omitió la incubación con el anticuerpo primario y en su lugar se realizó con PBS a 4 °C en las mismas condiciones que los cortes incubados con los anticuerpos respectivos.

Todos los preparados se analizaron con microscopio de campo claro PrimoStar (Zeiss) equipado con una cámara digital AxioCam ERc 5s (Zeiss). La cuantificación de PCNA se llevó a cabo contando con el programa Image J un mínimo de diez campos con un aumento 40x por experimento, determinando el número de núcleos positivos sobre núcleos totales.

## Ensayo de Cierre de Herida (ECH)

Para el ensayo de cierre de herida se cultivaron  $1,2 \times 10^5$  células PC-3 en una placa de 12 pocillos y una vez alcanzada la confluencia, se privaron de suero por 24 horas. Luego, se eliminó el medio de cultivo y se realizó una herida en cada pocillo utilizando un tip y una micropipeta. Se realizaron dos lavados con Solución Fisiológica para eliminar restos celulares y posteriormente se añadió a cada pocillo 500 µl de medio de cultivo de estímulo

(5 % de Suero Fetal Bovino) y los respectivos tratamientos. Se tomaron fotografías con microscopio de luz invertida acoplado a una cámara CCD a las 0, 4, 8 y 24 hs post – estímulo de cada campo elegido en cada herida para monitorear la migración celular y el área libre de células se cuantificó mediante software ImageJ.

## Análisis Estadístico

Para determinar la significancia estadística de las diferencias entre las condiciones estudiadas se utilizará Test de Student en el caso de comparaciones entre dos grupos, Análisis Factorial, ANOVA o prueba T para más de dos, dependiendo de la existencia o no de la interacción entre los distintos factores a analizar, respectivamente; corroborando previamente que los datos cumplan los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. En los casos en que dichos supuestos no se cumplieran, se utilizará la transformación de los datos a modo de alcanzarlos. El análisis de los datos obtenidos a partir de muestras de pacientes o de los datos a los cuales los supuestos no pudieron ser probados se hará en base a métodos no paramétricos. Los resultados se analizarán con el software Infostat y se considerarán estadísticamente significativos con un 95 % de confianza ( $p < 0,05$ ).



# Resultados

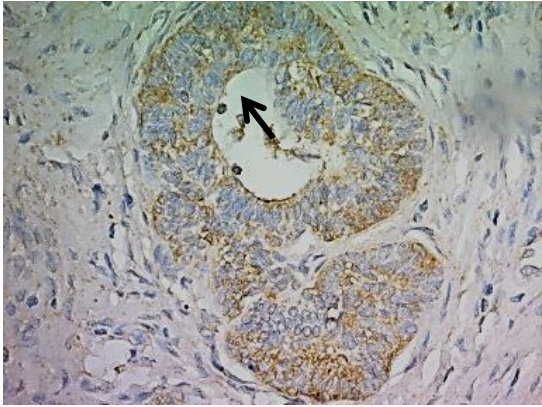
## Expresión de los receptores NOTCH y del marcador de proliferación PCNA en muestras de pacientes con cáncer de próstata.

A pesar de que la expresión de Notch se ha reportado desregulada en el cáncer de próstata, el rol de esta vía de señalización en el desarrollo de agresividad y metástasis en estos tumores permanece aún poco esclarecido. Nos propusimos, en primer lugar, evaluar mediante Inmunohistoquímica la expresión de los receptores Notch y del marcador de proliferación PCNA en cortes histológicos de muestras de pacientes con cáncer de próstata (Tabla 1). Detectamos expresión de los receptores NOTCH - 1, 2 y 4 (Figura 9 A – C), no así de NOTCH - 3 (Figura D), y del marcador de proliferación PCNA (Figura 9 E) en los distintos cortes histológicos. La expresión de los tres receptores NOTCH se observó principalmente en las células luminales secretoras del compartimiento epitelial. Del análisis cuantitativo de la expresión de PCNA (Figura 9 F), hallamos que la expresión de este marcador de proliferación mostro una tendencia a incrementarse cuanto mayor es el Score de Gleason con que fue clasificado el tumor.

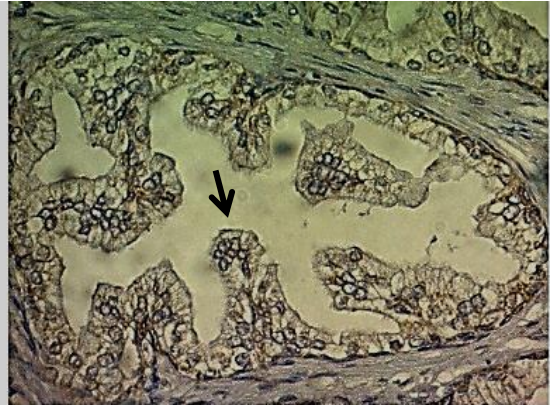
Tabla 1: Características clínicas y tumorales de las muestras de pacientes con cáncer de próstata (ND = No determinado)

Edad	Estadificación patológica	Score de Gleason	Clasificación	Invasión	Marca de anticuerpos por Inmunohisquímica				
					NOTCH 1	NOTCH 2	NOTCH 3	NOTCH 4	PCNA
70	pT2b; pN1	9 (Grupo grado 5)	Adenocarcinoma invasor de tipo acinar	Perineural	+	ND	-	+	25,67 %
65	pT3b; pN1	8 (Grupo grado 4)	Adenocarcinoma invasor de tipo acinar	Vascular y perineural	+	ND	-	+	11,62 %
61	pT3b; pNX	7 (Grupo grado 2)	Adenocarcinoma invasor de tipo acinar	Perineural	+	ND	-	+	6,77 %
67	pT3b; pNO	9 (Grupo grado 5)	Adenocarcinoma invasor de tipo acinar	Perineural	+	ND	-	+	12,15 %
72	pT3b	8 (Grupo grado 4)	Adenocarcinoma de tipo acinar	Perineural	+	ND	-	+	25,33 %
70	pT2b	7 (Grupo grado 3)	Adenocarcinoma de tipo acinar	Perineural	+	+	-	+	7,72 %
68	pT2c	7 (Grupo grado 3)	Adenocarcinoma de tipo acinar	Perineural	+	+	-	+	14,29 %

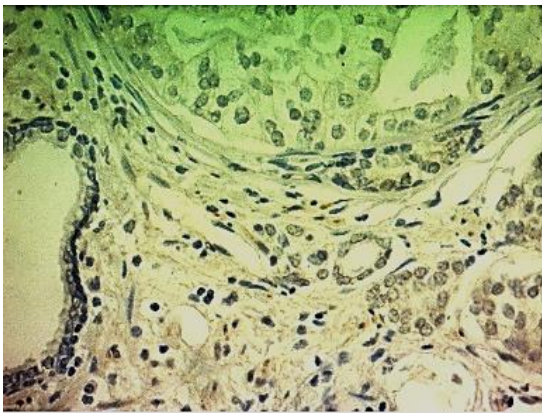
A



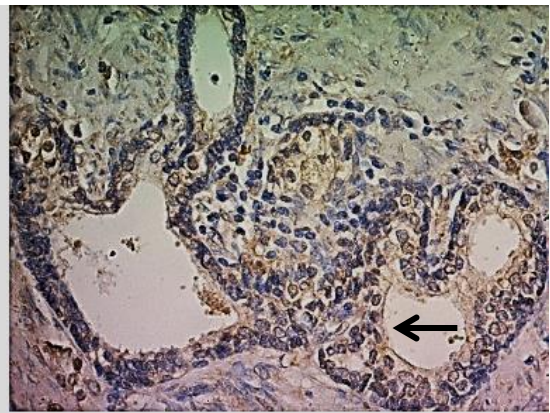
B



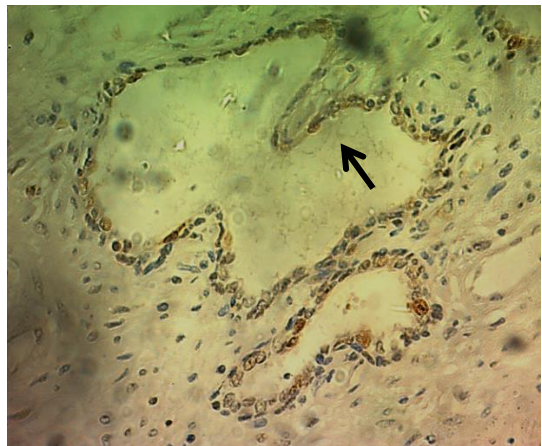
C



D



E



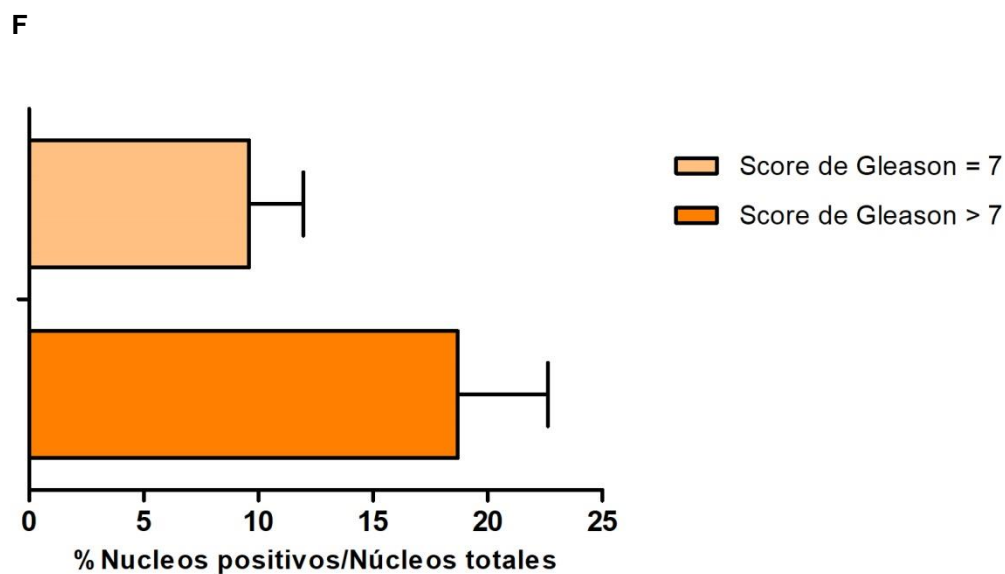


Figura 9: Expresión de los receptores NOTCH y del marcador de proliferación PCNA en muestras de pacientes con cáncer de próstata. Fotos representativas de la expresión de los receptores NOTCH - 1, 2 y 4 (A - C), y el del marcador de proliferación PCNA (E) en cortes histológicos de muestras de pacientes con cáncer de próstata. Foto representativa de la inmunotinción negativa de NOTCH - 3 (Figura D). La flecha negra indica la inmunotinción positiva en las células luminales secretoras del compartimiento epitelial. (F) Índice de proliferación determinado por cuantificación de la expresión nuclear del marcador PCNA en pacientes con un Score de Gleason > 7 (N = 4) o un Score de Gleason = 7 (N = 3). El porcentaje de las células en división se calculó como núcleos positivos respecto de núcleos totales.

### Influencia de la señalización Notch y del receptor de andrógenos sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de próstata PC-3.

Los procesos controlados por la vía de señalización Notch incluyen la proliferación, diferenciación, apoptosis, angiogénesis, especificación de destino celular y segregación de linajes celulares y el mantenimiento de células madre; por lo que no es sorprendente que la desregulación de esta vía de señalización juegue un papel importante en los trastornos o enfermedades de los tejidos, donde el Notch esté implicado en actividades oncogénicas o supresoras de tumores. Por estos motivos, nos propusimos evaluar que efecto tendría la utilización de DAPT. Por otra parte, el cáncer de próstata depende de la proporción de células que proliferan y de las que mueren y son los andrógenos quienes controlan dicha proporción al estimular la proliferación celular e inhibir la apoptosis. El AR

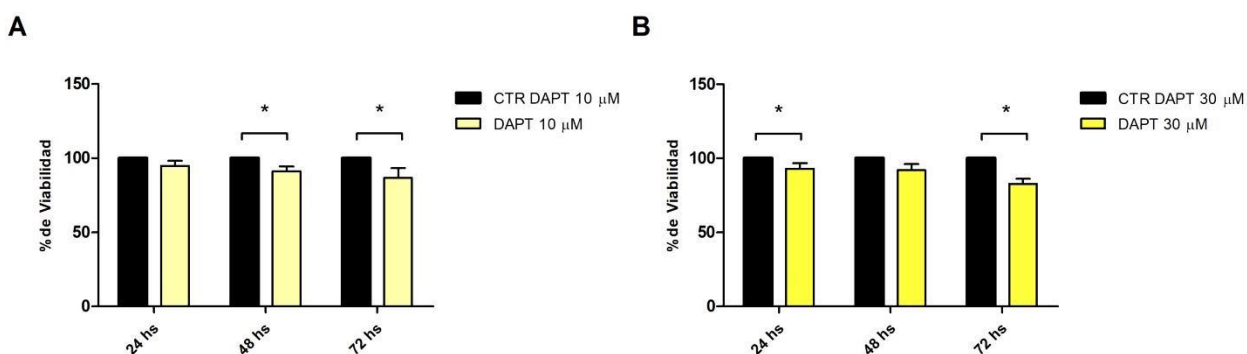
se expresa en muchas células de cáncer de próstata y se ha demostrado que desempeña un papel importante en la tumorigénesis y metástasis del mismo [25]. Es por ello que nos propusimos evaluar que efecto tendría la utilización de Enzalutamida.

Para analizar el rol de la inhibición de la vía de señalización Notch y del receptor de andrógenos sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de próstata PC-3 realizamos un ensayo de MTS. Para la inhibición de la vía Notch, empleamos dosis de DAPT de 10 y 30  $\mu\text{M}$  mientras que para el tratamiento con Enzalutamida, un inhibidor de segunda generación del eje de los andrógenos, se utilizaron dosis de 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$  para realizar las curvas de dosis respuesta con tiempos de tratamiento de 24, 48 y 72 horas en ambos casos.

Encontramos una disminución significativa de la viabilidad respecto al control (DMSO) luego de 48 y 72 horas con la dosis de 10  $\mu\text{M}$  de DAPT (Figura 10 A), y luego de 24 y 72 horas con la dosis de 30  $\mu\text{M}$  de DAPT (Figura 10 B)

Por otra parte, determinamos una disminución significativa de la viabilidad respecto al control (DMSO) luego de 72 horas con la dosis de 50  $\mu\text{M}$  de Enzalutamida (Figura 10 D), y para todos los tiempos evaluados con la dosis de 100  $\mu\text{M}$  de Enzalutamida (Figura 10 E). No hallamos diferencias en la viabilidad respecto al control (DMSO), en ninguno de los tiempos de tratamiento analizados con la dosis de 30  $\mu\text{M}$  de Enzalutamida (Figura 10 C).

#### Viabilidad celular



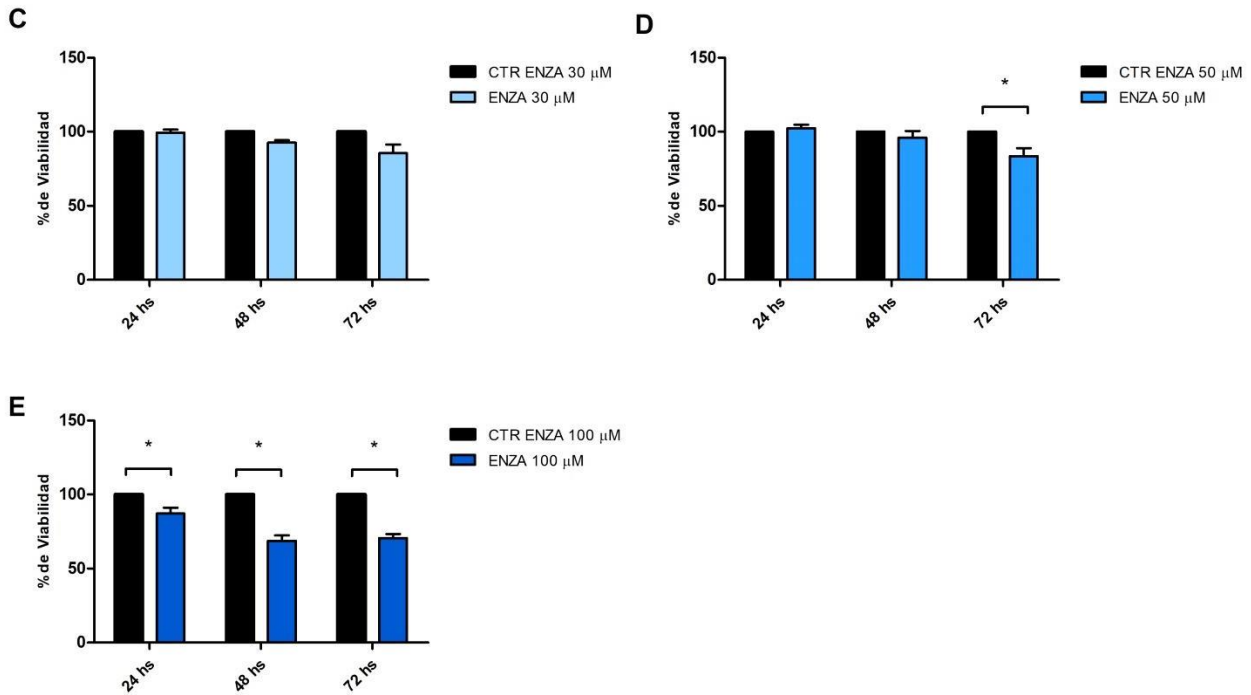


Figura 10: Influencia de la señalización Notch y del receptor de andrógenos sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de próstata PC-3. La viabilidad celular fue evaluada por ensayo de MTS en células prostáticas tratadas con 10 y 30 μM de DAPT (A y B) ( $p = 0,0027$ ;  $N = 3$ ) o 30, 50 y 100 μM de Enzalutamida (C – E) ( $p = 0,0018$ ;  $N = 3$ ) o DMSO como control por 24, 48 y 72 horas.

## Proliferación celular de la línea PC-3 bajo tratamiento con DAPT y Enzalutamida

Determinamos la expresión de marcador PCNA en los lisados de las células tratadas *in vitro*. No hallamos diferencias en la expresión de este marcador de proliferación evaluado por Western Blot, luego de haber tratado las células de manera aislada con dosis de 10 y 30 μM de DAPT (Figura 11 A y B) y con 30 y 50 μM de Enzalutamida (Figura 11 C y D), durante 24 y 48 horas.



## PCNA

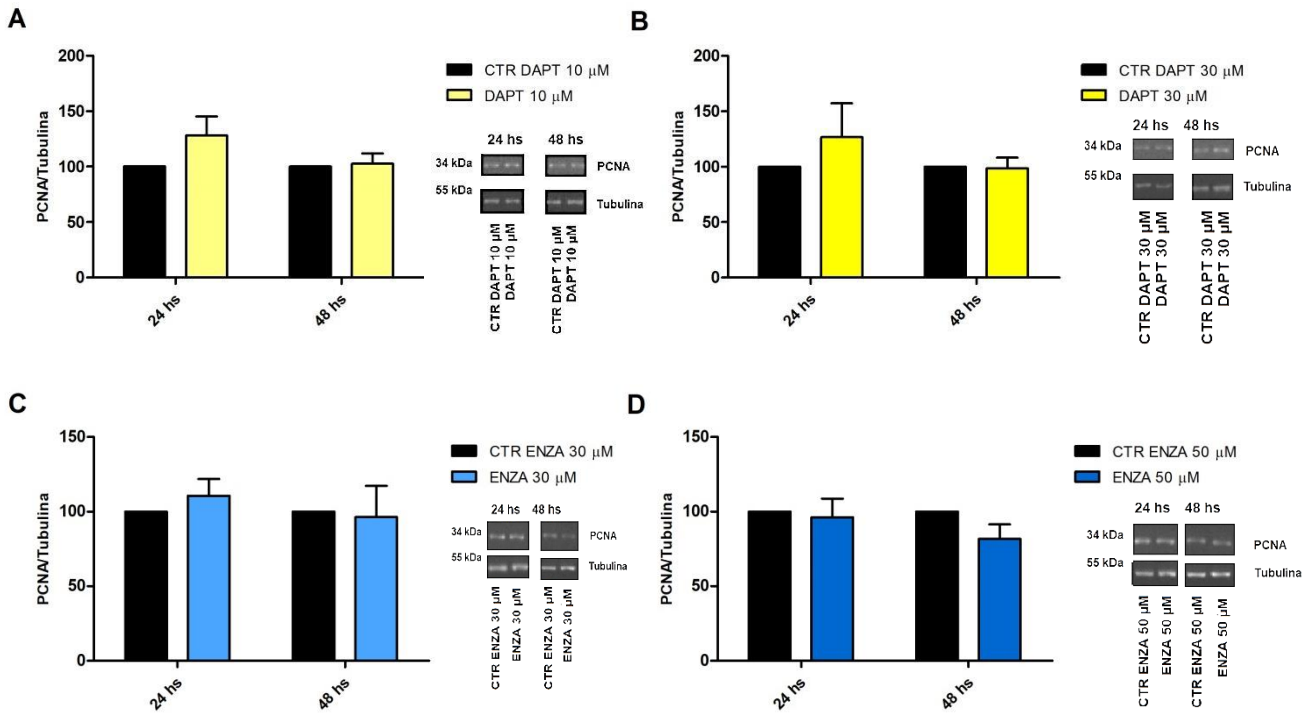


Figura 11: Proliferación celular de la línea PC-3 bajo tratamiento con DAPT y Enzalutamida. La expresión del antígeno de proliferación nuclear (PCNA) evaluada por WB en las células prostáticas tratadas con 10 y 30  $\mu$ M de DAPT o DMSO como control (A y B) (ns; N = 3) o con 30 y 50  $\mu$ M de Enzalutamida o DMSO como control (C y D) (ns; N = 3), por 24 y 48 horas y relativizada a la expresión de la proteína constitutiva GAPDH y se expresa como porcentaje del control.

Efecto del tratamiento con el inhibidor de Notch DAPT sobre la vía del receptor de andrógenos.

Dado que la respuesta de las células tumorales de próstata es variable e incluso se genera indefectiblemente resistencia al bloqueo de la acción sobre el AR en los tratamientos dirigidos en pacientes, evaluamos el efecto de la modulación de la activación de Notch sobre la activación de la vía del receptor de andrógenos. El receptor de andrógenos se expresa en muchas células de cáncer de próstata y se ha demostrado que desempeña un papel importante en la tumorigénesis y metástasis del mismo. Para ello las células prostáticas fueron tratadas con 10 y 30  $\mu$ M de DAPT durante 24 y 48 horas. Mediante qRT-PCR evaluamos la expresión del gen diana de Notch *HES-1* como control



específico del efecto de la droga, (Figura 12 A y B). Hallamos que la dosis de 30  $\mu\text{M}$  de DAPT produjo una disminución significativa en la expresión de *HES-1*, tras 24 y 48 horas de tratamiento. Corroborado el efecto del DAPT determinamos por qRT-PCR la expresión de *TMPRSS2*, un gen que responde a los andrógenos (Figura 12 C y D). Observamos que la dosis de 30  $\mu\text{M}$  de DAPT produjo una disminución significativa en la expresión de *TMPRSS2*, luego de 24 horas de tratamiento indicando que la activación de la señalización Notch modularía positivamente la señal del AR que media la transcripción de la enzima *TMPRSS2*.

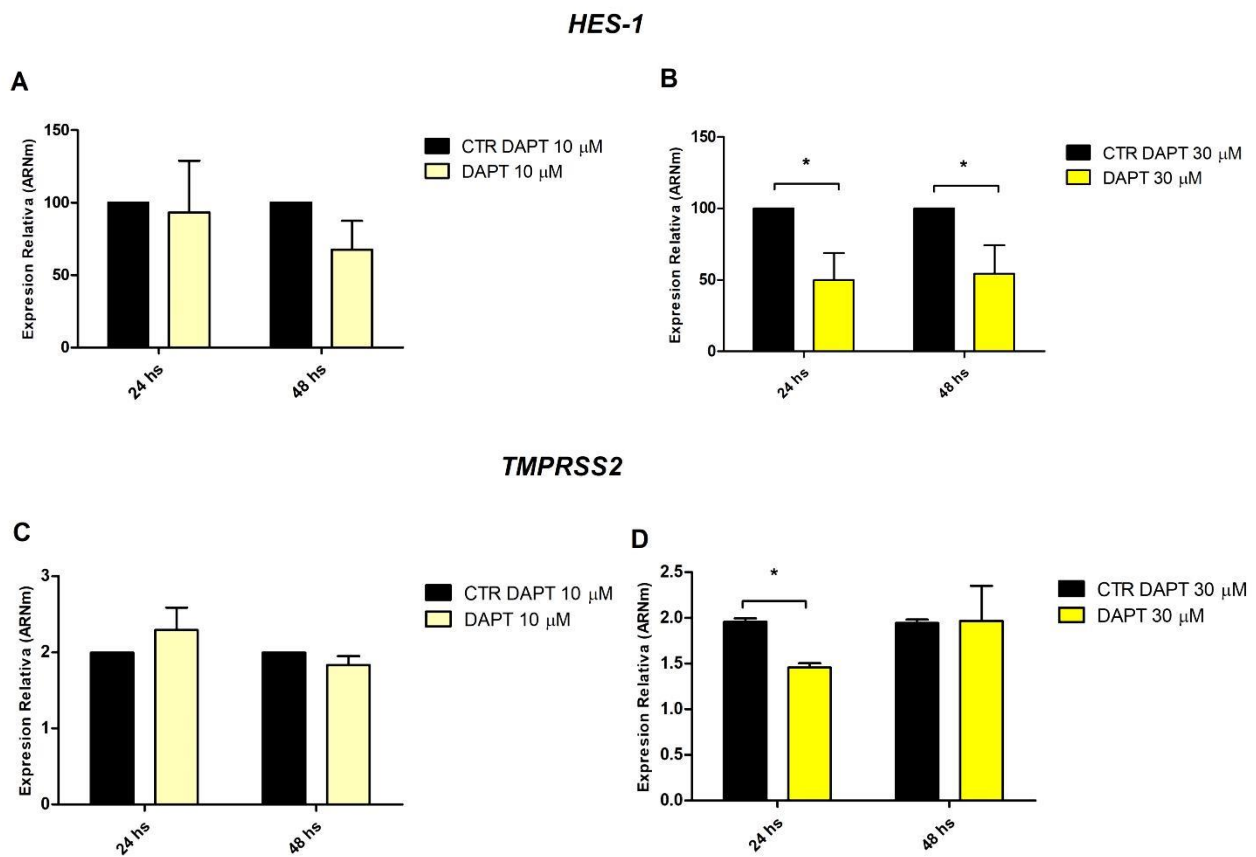


Figura 12: Efecto del tratamiento con el inhibidor de Notch DAPT sobre la vía del receptor de andrógenos. Expresión del ARN mensajero de *HES-1* (A y B) ( $p = 0,0235$ ;  $N = 3$ ) y *TMPRSS2* (C y D) ( $p = 0,0084$ ;  $N = 3$ ) analizada por qRT-PCR y relativizada a los niveles de expresión del gen constitutivo *G3PDH* y se expresa como porcentaje del control.

## Efecto del tratamiento con Enzalutamida sobre la vía de señalización Notch.

El receptor de andrógenos se expresa en muchas células de cáncer de próstata y se ha demostrado que desempeña un papel importante en la tumorigénesis y metástasis del mismo. Es por ello que nos propusimos estudiar que efecto tendría la utilización de Enzalutamida sobre la vía de señalización del receptor de los andrógenos y además si tendría algún efecto sobre la vía de señalización Notch. Para esto las células prostáticas fueron tratadas de manera aislada con dosis de 30 y 50  $\mu\text{M}$  de Enzalutamida, durante 24 y 48 horas. Mediante qRT-PCR evaluamos tanto la expresión de *TMPRSS2* (Figura 13 A y B) como la de *HES-1* (Figura 13 C y D) y observamos que con la dosis de 30  $\mu\text{M}$  de Enzalutamida tendió a disminuir la expresión tanto de *HES-1* como de *TMPRSS2*, luego de 24 horas de tratamiento.

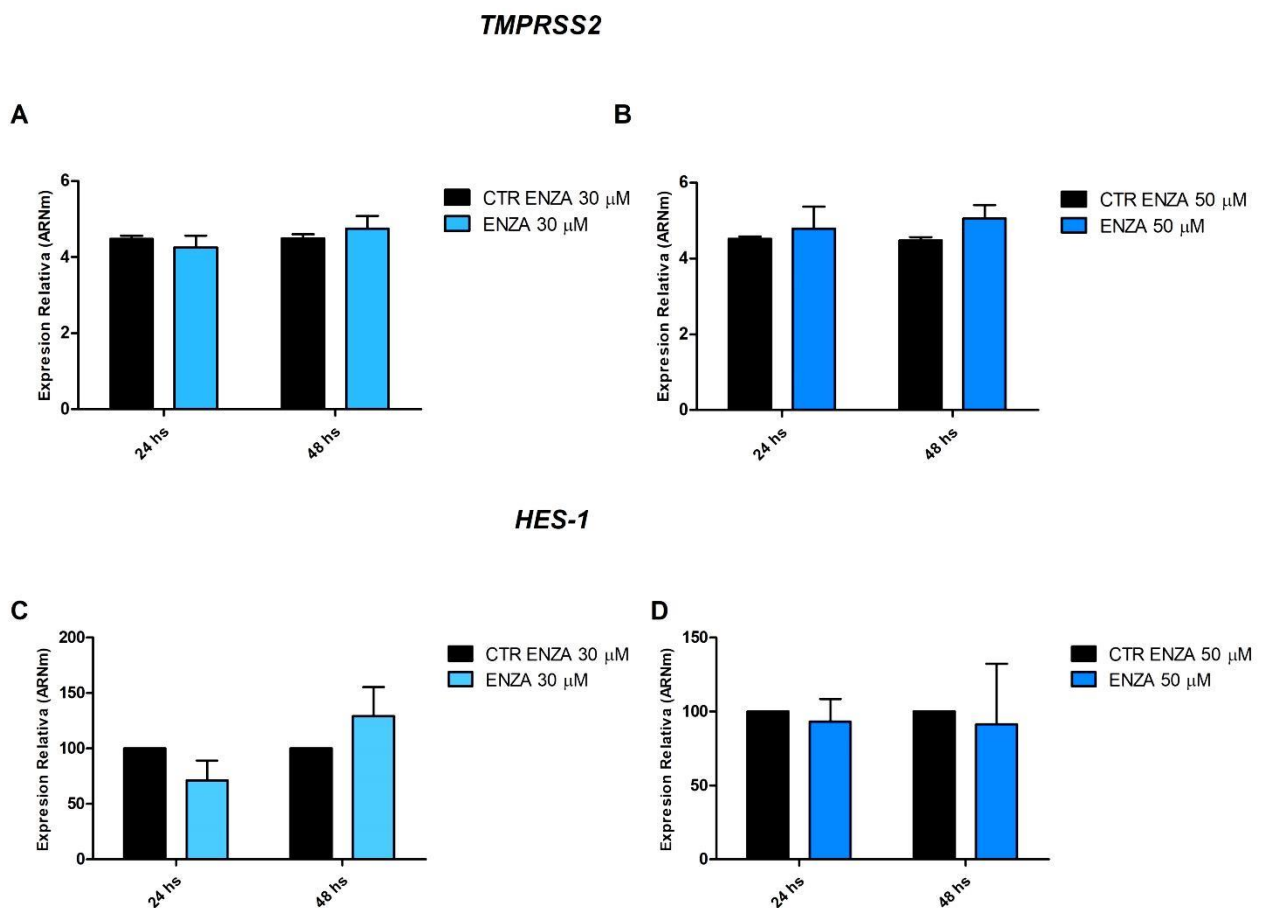


Figura 13: Efecto del tratamiento de la Enzalutamida sobre la vía de señalización Notch. Expresión del ARN mensajero de *TMPRSS2* (A y B) (ns; N = 3) y *HES-1* (C y D) (ns; N = 3) analizada por qRT-PCR y

relativizada a los niveles de expresión del gen constitutivo *G3PDH* y se expresa como porcentaje del control.

Efecto del tratamiento combinado con DAPT y Enzalutamida sobre la vía de señalización Notch y del receptor de los andrógenos. Determinación de la viabilidad celular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos realizados en la línea celular con tratamientos aislados con DAPT y Enzalutamida nos propusimos estudiar el efecto de la modulación conjunta de dichas vías de señalización con DAPT y Enzalutamida sobre la viabilidad celular. Las dosis a utilizar para los tratamientos combinados, en base a resultados del laboratorio para el DAPT y lo hallado para Enzalutamida por nosotros y otros autores, fueron de 10  $\mu$ M para DAPT y 30  $\mu$ M para Enzalutamida, durante 24 y 48 horas. Mediante qRT-PCR evaluamos en primer lugar la expresión de *HES-1* (Figura 14 A) y de *TMPRSS2* (Figura 14 B); y determinamos una disminución de la expresión de *HES-1* luego de 24 y 48 horas de tratamiento y una tendencia de *TMPRSS2*, a disminuir su expresión luego de 24 horas de tratamiento.

Para la evaluación del efecto en conjunto de la inhibición de la señalización Notch y del receptor de andrógenos sobre la viabilidad, y a partir de los experimentos realizados con ambos inhibidores de forma aislada determinamos las dosis a utilizar para el tratamiento combinado de las células, las cuales fueron: 10  $\mu$ M de DAPT y 50  $\mu$ M de Enzalutamida. Mediante el ensayo colorimétrico de MTS, encontramos una disminución significativa de la viabilidad respecto al control (DMSO) luego de 48 y 72 horas de tratamiento combinado con DAPT (10  $\mu$ M) y Enzalutamida (50  $\mu$ M) (Figura 14 C).

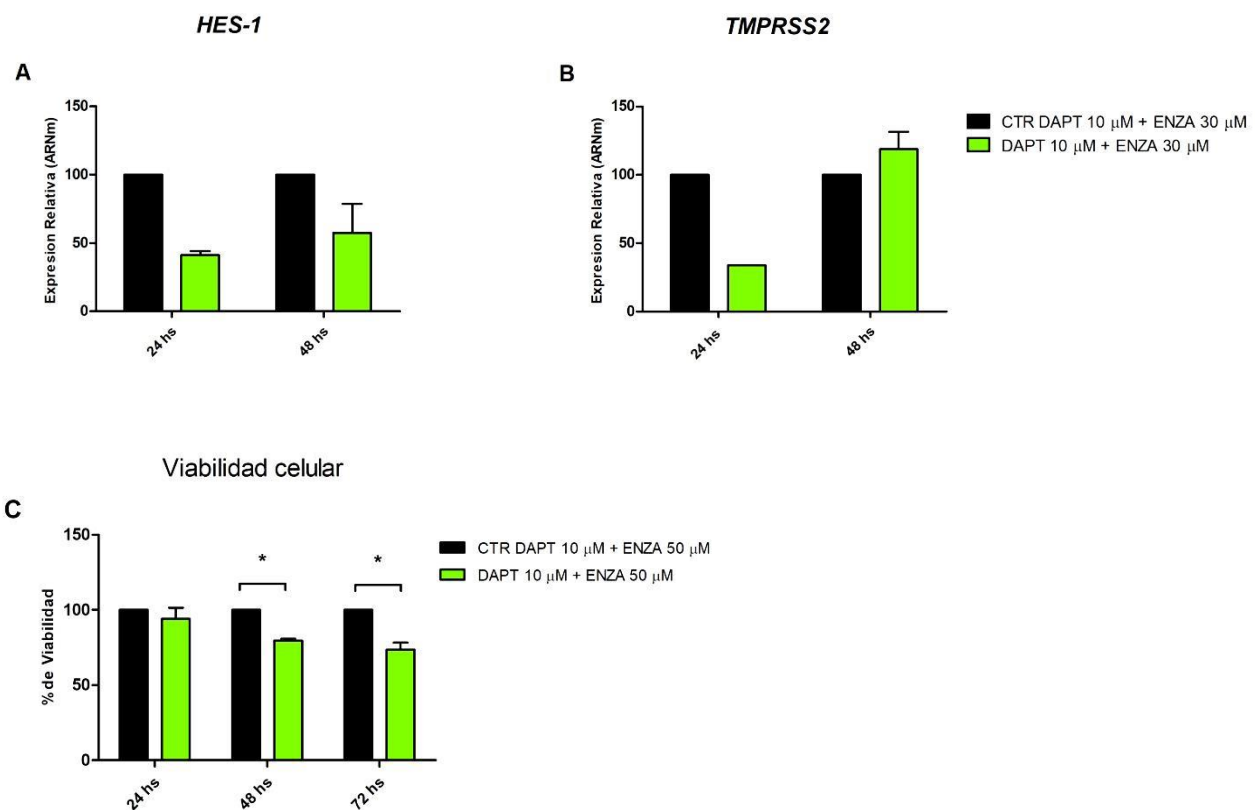


Figura 14: Efecto del tratamiento combinado del DAPT y la Enzalutamida sobre la vía de señalización Notch y del receptor de los andrógenos. Determinación de la viabilidad celular. Expresión del ARN mensajero de *HES-1* (A) (ns; N = 3) y *TMPRSS2* (B) (ns; N = 1,2 para 24 y 48 hs) analizada por qRT-PCR y relativizada a los niveles de expresión del gen constitutivo *G3PDH* y se expresa como porcentaje del control. La viabilidad celular fue evaluada por ensayo de MTS en células prostáticas tratadas con 10 de DAPT y 50  $\mu$ M de Enzalutamida (C) DMSO como control por 24, 48 y 72 horas ( $p = 0,0413$ ; N = 3).

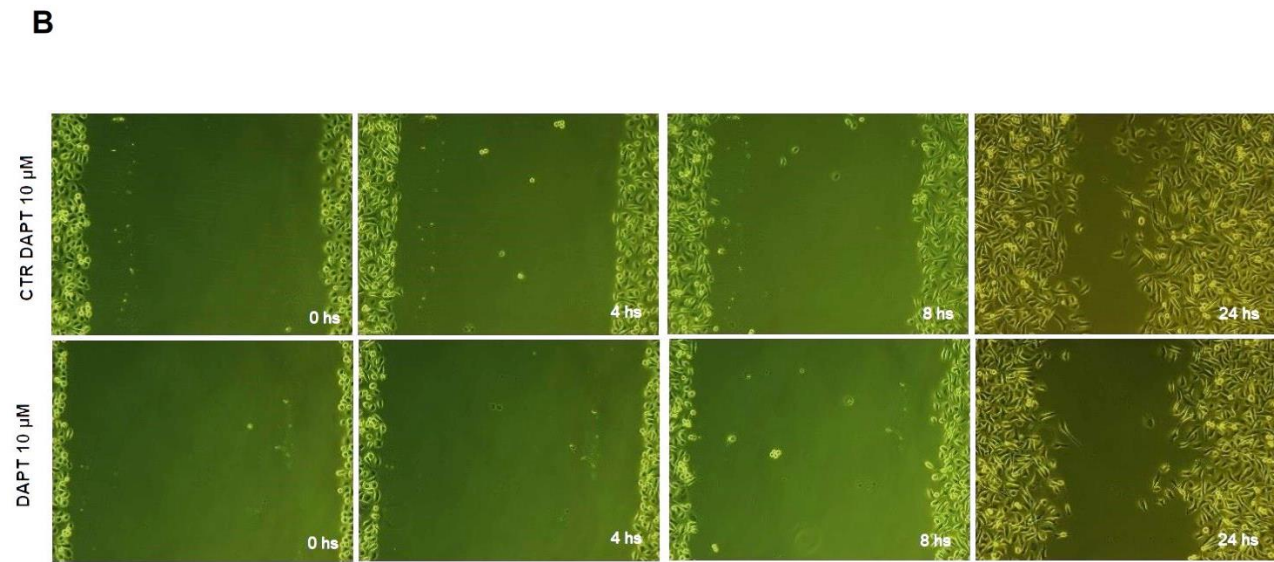
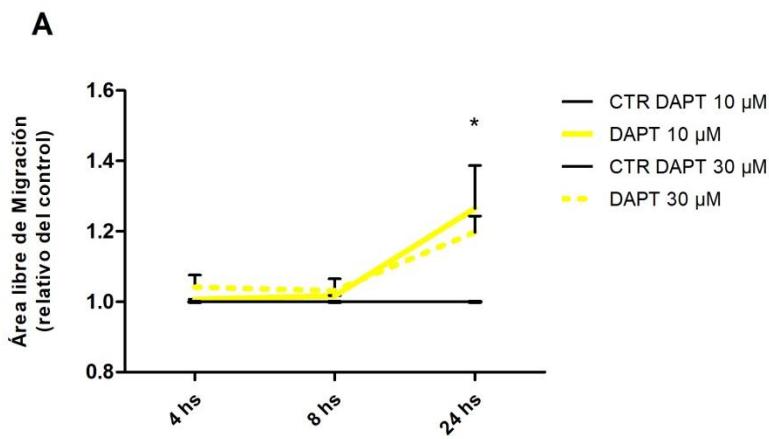
### Influencia de la señalización Notch y del receptor de andrógenos sobre la capacidad migratoria de la línea celular de cáncer de próstata PC-3.

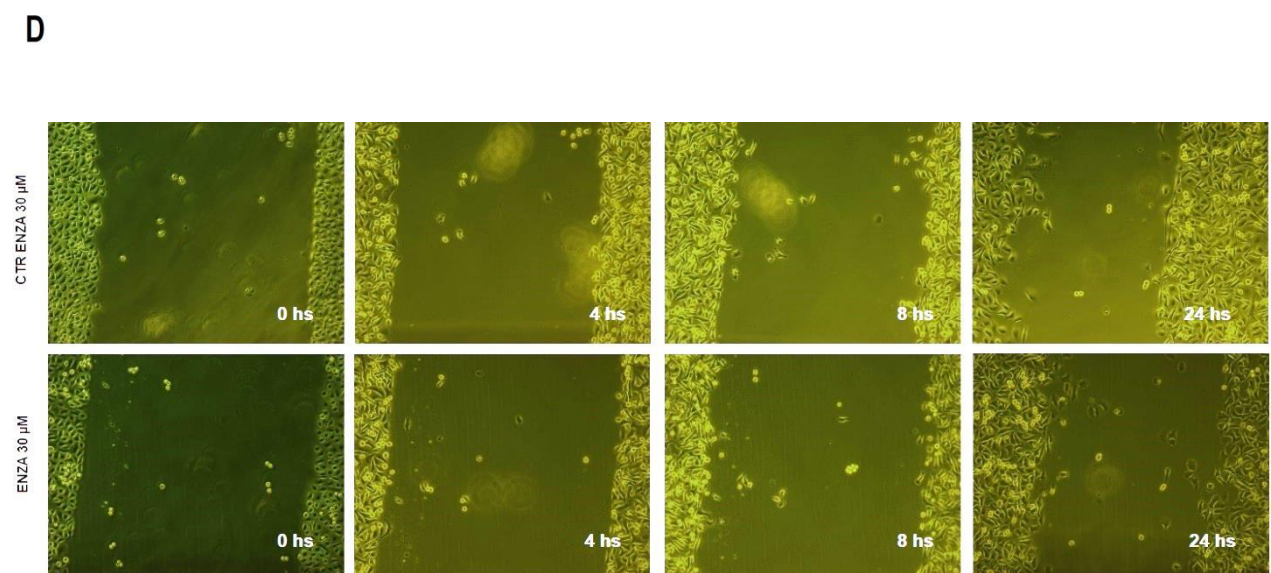
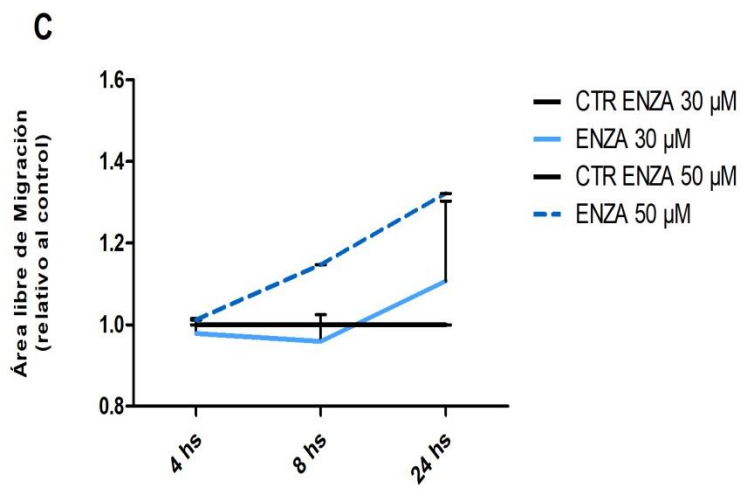
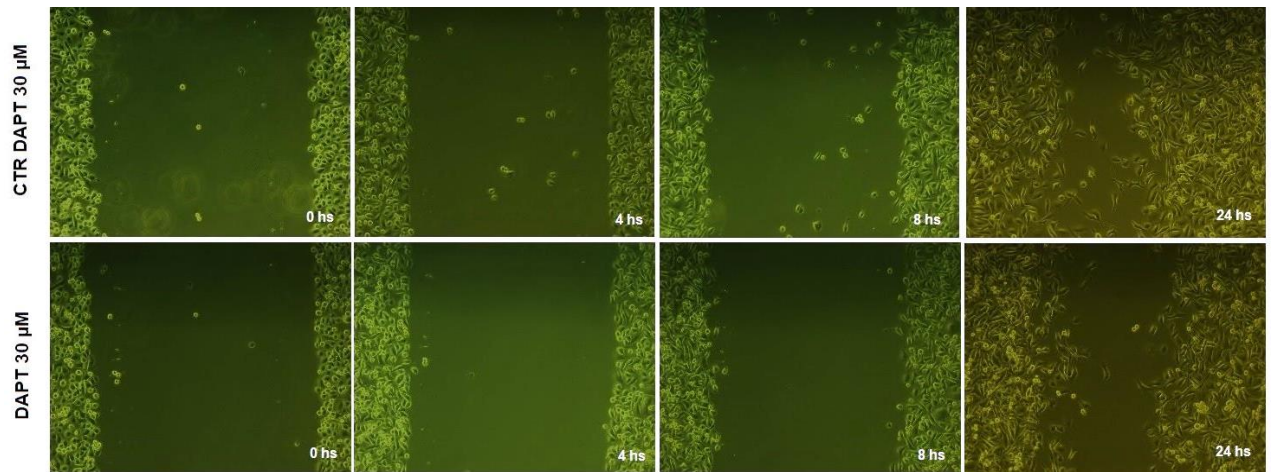
Los procesos controlados por la vía de señalización Notch incluyen, entre otros, a la migración celular. Para analizar el rol de la inhibición de la vía Notch y del Receptor de Andrógenos sobre la capacidad migratoria de la línea celular de cáncer de próstata PC-3 realizamos un ensayo de cierre de herida sobre cultivos de las células prostáticas tratadas con DAPT en forma aislada y combinada con Enzalutamida.

En primer lugar, establecimos la dosis de DAPT y Enzalutamida a utilizar para realizar los tratamientos combinados. Por este motivo, las células fueron tratadas por un lado con

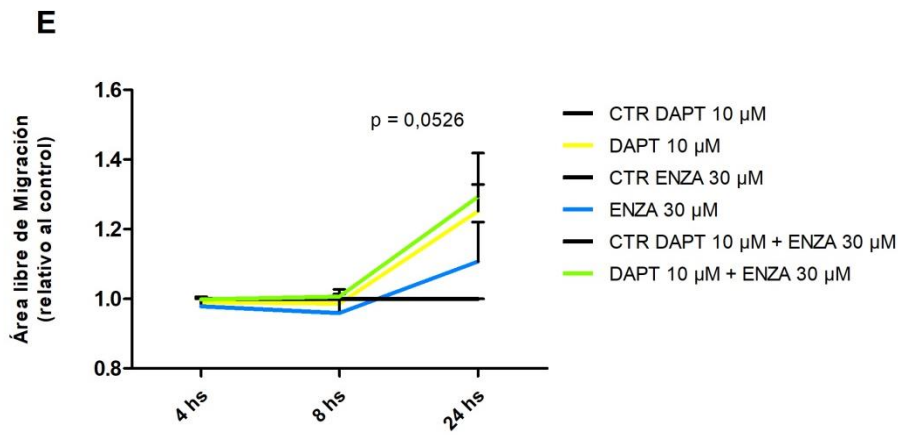
dosis de 10 y 30  $\mu\text{M}$  de DAPT, y por otro lado, se realizaron experimentos en donde las células fueron tratadas con dosis de 30 y 50  $\mu\text{M}$  de Enzalutamida. Hallamos que ambas dosis DAPT inhibían significativamente la migración, luego de 24 horas iniciado el tratamiento (Figura 15 A y B); y que ambas dosis de Enzalutamida inhibían marcadamente la migración, luego de 24 horas iniciado el tratamiento (Figura 15 C y D). A partir de estos resultados, decidimos utilizar la dosis de 10  $\mu\text{M}$  de DAPT y la dosis de 30  $\mu\text{M}$  de Enzalutamida para realizar el tratamiento combinado. Encontramos que el tratamiento combinado tendió a inhibir la migración luego de 24 horas de tratamiento (Figura 15 E y F).

### Ensayo de cierre de herida









**F**

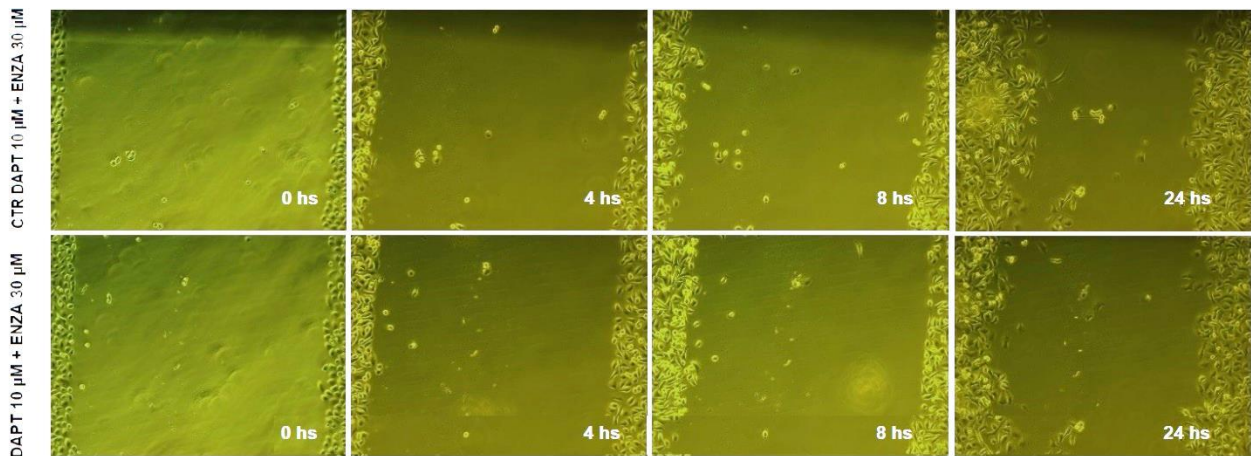


Figura 15: Influencia de la señalización Notch y del Receptor de Andr6genos sobre la capacidad migratoria de la lnea celular de c6ncer de pr6stata PC-3. Ensayo de cierre de herida en cultivos de la lnea celular de c6ncer de pr6stata PC-3 tratadas con 10 y 30 µM de DAPT (Figura A) ( $p = 0,0022$ ;  $N = 3$ ), con 30 y 50 µM de Enzalutamida (Figura C) y un tratamiento combinado de 10 µM de DAPT y 30 µM de Enzalutamida (Figura E) ( $p = 0,05260$ ;  $N = 3$ ). Se determin6 el 6rea libre de Migraci6n a distintos tiempos mediante el software ImageJ. Fotos representativas del ECH (Figura B, D y F).

# Discusión



Varios estudios han demostrado que se requiere la señalización de Notch para el crecimiento y desarrollo prostático embrionario y postnatal para la especificación adecuada del linaje celular dentro de la próstata, así como para el mantenimiento y la regeneración de la próstata adulta después de la castración y el reemplazo hormonal. Sin embargo, y a pesar de los crecientes estudios, el rol de la vía de señalización de Notch en el desarrollo del cáncer de próstata permanece aún poco esclarecido. Varios estudios sugieren que la vía de señalización de Notch estaría involucrada en el desarrollo, progresión y metástasis del cáncer de próstata [60, 62, 81]. En el presente trabajo detectamos mediante Inmunohistoquímica la expresión de los receptores NOTCH - 1, 2 y 4, mientras que no detectamos expresión de NOTCH - 3 en muestras de tumores de próstata humanos de distinto grado de malignidad. La expresión de los receptores Notch se encontró, principalmente, en las células secretoras luminales, al igual que lo reportado por otros grupos [84]. La expresión de los receptores Notch ha sido previamente reportada en otros tipos de tumores, como por ejemplo en el cáncer de mama donde se observó una mayor expresión de NOTCH - 1 y 2 respecto al tejido de mama normal [85]. En tumor de ovario en cambio, se reportó sobreexpresión de NOTCH - 3 en comparación con el tejido ovárico sano [86]. En cáncer pancreático, en contraposición a nuestro hallazgo en próstata se describió sobreexpresión de NOTCH - 3, siendo este de los receptores NOTCH el que más se expresa en la enfermedad, seguido de NOTCH - 4 [87]. Trabajos previos de nuestro laboratorio en tumores hipofisarios han abordado la expresión de receptores de la vía de señalización Notch y reportaron una mayor expresión del receptor NOTCH - 3 en corticotropinomas y somatotropinomas en comparación con los adenomas hipofisarios no funcionantes [88]. La bibliografía y trabajos del laboratorio muestran que el patrón de expresión de los receptores NOTCH sería dependiente del contexto tumoral.

En los tumores de próstata de pacientes hallamos inmunotinción positiva para el marcador de proliferación celular PCNA. A pesar de que la cohorte de pacientes es aun chica ( $n = 7$ ), la cuantificación de los núcleos positivos muestra que la expresión de PCNA tendió a ser mayor en aquellos pacientes con un score de Gleason de 8 o 9, en comparación con aquellos que tienen un score de Gleason de 7. La actividad proliferativa de los tumores malignos se ha postulado como un parámetro pronóstico de agresividad de tumores. En muchas lesiones incluidas el adenocarcinoma prostático y en otras neoplasias, el índice

de expresión de PCNA ha mostrado tener un valor pronóstico [89]. En efecto, nuestro resultado es coincidente con lo reportado por Bantis y colaboradores, quienes mostraron que la expresión de PCNA y Ki-67, otro marcador de proliferación, aumenta significativamente con el aumento del score de Gleason [85]. En este sentido, si bien continuamos ampliando el grupo de muestras de tumores provenientes de cirugía, nuestros resultados hasta el momento son congruentes con trabajos que han postulado que los tumores prostáticos con un score de Gleason por encima de 7 tendrían mayores tasas de crecimiento y una peor respuesta a las terapias con peor pronóstico que aquellos que tienen un score de 7 o menor [90].

La vía de señalización Notch se encuentra conservada evolutivamente y dependiendo del contexto contribuye en la determinación del destino celular, proliferación, angiogénesis y apoptosis. Asimismo, como se describió previamente, se reportó que Notch actuaría como un regulador del desarrollo, progresión y metástasis del cáncer de esta glándula [91, 92]. Se conoce además, que esta vía de señalización se encuentra sobreexpresada en varias líneas celulares de cáncer de próstata de diferentes grados de agresividad [76]. Con estos antecedentes decidimos iniciar los estudios *in vitro* en el presente trabajo evaluando el efecto de la inhibición de Notch sobre la proliferación de células tumorales de próstata. Los compuestos más utilizados para inhibir la activación de la vía de señalización Notch son los inhibidores de la  $\gamma$ - secretasa. Estos compuestos fueron desarrollados inicialmente para reducir los agregados de proteína  $\beta$  - amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Posteriormente, se descubrió que podrían funcionar como un tratamiento potencial para los cánceres que involucran una activación de la señalización [62, 93, 94]. El tratamiento de la línea celular de cáncer de próstata PC-3 con 10  $\mu$ M del inhibidor de Notch DAPT, redujo significativamente la viabilidad de las células prostáticas en nuestras condiciones de cultivo. Estos resultados concuerdan con los reportados por Cui y colaboradores donde utilizan las células prostáticas Du145 y también las PC3 como modelos *in vitro*, con un inhibidor de la  $\gamma$  - secretasa diferente al DAPT, PF-03084014 [95]. Además en este trabajo se demostró que el tratamiento con PF-03084014 induce la apoptosis en tumores generados *in vivo* a partir de la inoculación de ratones con células Du145 [95], las cuales se caracterizan por ser resistentes a la castración al igual que la línea PC3. La disminución de la viabilidad podría deberse, entre otros procesos, a una disminución de la proliferación o a aumento de la apoptosis. Nuestros resultados de expresión de PCNA

determinado por Western Blot no muestran diferencias en la expresión de esta proteína entre los lisados celulares tratados y controles por lo que la disminución de la viabilidad no se produciría debido a una menor proliferación celular. Sin embargo podría ser causada por un aumento de la apoptosis, proceso que debemos evaluar en los cultivos tratados con DAPT, por ejemplo por marcación con AnexinaV y Ioduro de Propidio (IP) y posterior citometría de flujo.

De importancia para el tratamiento del cáncer de próstata, y para el desarrollo de los objetivos de esta tesis, la señal Notch podría estar modulando, potenciando o interfiriendo, la respuesta a los bloqueantes del AR en estos tumores. Así, evaluamos *in vitro* el efecto del DAPT sobre la transcripción de la enzima TMPRSS2. Esta enzima fue ganando interés en el último tiempo debido a su expresión localizada en la glándula prostática y su sobreexpresión en el epitelio prostático neoplásico, diversos autores han reportado que podría estar implicada en la progresión del cáncer de próstata [26]. Lucas y colaboradores demostraron que TMPRSS2 es un potente activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y que a través de las interacciones de HGF con el receptor de tirosina quinasa c-Met, contribuye a procesos patológicos, incluida la carcinogénesis [96]. De manera interesante en nuestro trabajo observamos en la línea PC-3 que el tratamiento con 30  $\mu$ M de DAPT durante 24 horas disminuyó significativamente la expresión *TMPRSS2* vinculando de alguna forma las señales de Notch y el AR en estas células caracterizadas como respondedoras débiles a los bloqueantes del AR. Este resultado junto a la bibliografía en otras líneas celulares abrió expectativas en la búsqueda del potenciamiento del efecto de los bloqueantes del AR como tratamiento específico del cáncer de próstata, como sería por ejemplo la inhibición de Notch como terapia coadyuvante.

La señalización del receptor de andrógenos regula el desarrollo y mantenimiento del tejido prostático normal y su desregulación es la principal responsable del desarrollo, crecimiento y progresión de los tumores de próstata. La terapia de deprivación de andrógenos (ADT) es actualmente el tratamiento estándar para el cáncer de próstata y aunque se observa una respuesta inicial por parte de los pacientes, la mayoría eventualmente desarrolla resistencia a la misma. El reciente descubrimiento de que la señalización del AR persiste durante la castración sistémica a través de la producción intratumoral de andrógenos condujo al desarrollo de nuevas terapias antiandrógenas que

incluyen la Abiraterona y Enzalutamida [36]. La línea celular de cáncer de próstata PC-3, al igual que las Du145, se caracteriza por ser andrógeno independiente y el nivel de expresión del receptor de andrógenos en ellas ha sido cuestionado en diferentes publicaciones. Sin embargo, un trabajo exhaustivo y muy interesante de Alimirah y colaboradores demuestra la expresión del receptor a nivel del ARN mensajero por optimización para éste de la técnica de Real Time PCR y también de la proteína mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra las tres regiones que conforman el AR [97]. En el presente trabajo utilizando el antiandrógeno Enzalutamida en la búsqueda de la posible existencia de interacción entre la señal del AR y de los receptores Notch determinamos una reducción significativa de esta proliferación celular con 50  $\mu$ M de Enzalutamida tras 72 horas de tratamiento. Ghashghaei y colaboradores reportaron en una línea celular respondedora a los andrógenos, LNCaP, un efecto inhibitorio de la Enzalutamida con una dosis de 10  $\mu$ M; no ocurrió lo mismo en las PC-3 [98]. Nuestro resultado está en línea con la literatura existente y con la reducida sensibilidad a la inhibición de los AR que poseen las PC-3.

Para profundizar el estudio en la interacción entre las señales del AR y el Notch, al igual que evaluamos como el inhibidor de la vía de señalización Notch podía alterar la expresión de un gen diana de la vía del receptor de los andrógenos, evaluamos la expresión de *HES-1* bajo el tratamiento con Enzalutamida. La expresión de este gen diana de la vía Notch mostró una tendencia a disminuir después 24 horas de tratamiento con 30  $\mu$ M de Enzalutamida. A pesar de que este resultado no alcanzó significancia estadística, otros genes diana de la vía de Notch sí podrían alcanzarla, y/o un estudio de la expresión de los dominios activos de los receptores Notch podría avalar la existencia de interacción entre las dos señales.

En la búsqueda de mecanismos de resistencia a la terapia de privación de andrógenos se encuentran solo dos trabajos en la literatura que estudian la participación de Notch en la respuesta a los bloqueantes del AR: en uno de ellos los autores describieron en diferentes líneas celulares tumorales de próstata y también con modelos *in vivo* que la activación de la vía de señalización Notch contribuiría a la resistencia a la terapia de privación de andrógenos. Los autores reportaron que la combinación de la inhibición de Notch con la terapia de privación de andrógenos, condición creada mediante la utilización de un cultivo celular especial deprivados de andrógenos generados con suero

fetal bovino tratado con carbono/dextrano, condujo a una menor proliferación de las tres líneas celulares sensibles a los andrógenos estudiadas, LNCaP, 22Rv1 y C4-2 [99]. En otra publicación muy reciente, trabajando comparativamente con líneas tumorales de próstata sensibles a los andrógenos a través del uso del inhibidor de Notch PF-03084014 determinan la restauración de la sensibilidad de las células LNCaP, C4-2 y 22RV1 de cáncer de próstata a la Enzalutamida [100]. Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados obtenidos de la inhibición recíproca de la vía de señalización Notch y del receptor de andrógenos con los moduladores aplicados de manera aislada, evaluamos los efectos del tratamiento combinado con DAPT y Enzalutamida sobre la línea celular de cáncer de próstata PC-3. La viabilidad de las células prostáticas se redujo significativamente con el tratamiento combinado de DAPT y Enzalutamida. Estos resultados coinciden con los reportados por Rice y colaboradores, donde las células prostáticas 22RV1 tratadas con 50  $\mu$ M de DAPT y 5  $\mu$ M de Enzalutamida disminuyeron significativamente su proliferación respecto a los controles y en comparación con los tratamientos aislados [75]. Además, observamos que tanto la expresión de *HES-1* al igual que la de *TMPRSS2*, mostraban una tendencia a disminuir su expresión con el tratamiento combinado.

El tratamiento con fármacos dirigidos a los receptores de andrógenos puede inducir la regulación positiva de vías de plasticidad epitelial, las cuales cumplen un rol importante en la diseminación metastásica y la resistencia terapéutica. Se ha reportado que la expresión de Snail, un factor de transcripción involucrado en la regulación de la plasticidad epitelial a través del control de la expresión de genes involucrados en la migración y la invasión, se encuentra sobreexpresada en el cáncer de próstata metastásico en comparación con el cáncer de próstata localizado; y es elevada en las células de cáncer de próstata resistentes a Enzalutamida en comparación con las células sensibles a este antiandrógeno [101]. Se demostró que la Enzalutamida aumenta la invasividad en el CRPC mediante la alteración de la señalización del AR/EPHB6/JNK/MMP9, lo cual lleva a pensar en un enfoque de tratamiento combinado con un inhibidor de la vía de señalización Notch, para que revierta los efectos del antiandrógeno Enzalutamida [102]. Teniendo esto presente, y a partir del conocimiento de que la vía de señalización Notch está implicada en la generación de metástasis en distintos tipos de cáncer, como el cáncer de próstata, mama y de hígado [103, 104]. Estudiamos la capacidad de migración de la línea celular PC-3 bajo el tratamiento con DAPT en forma aislado y combinado con Enzalutamida, para

evaluar un posible efecto sinérgico de ambos inhibidores sobre la migración celular. Observamos que el área libre de migración resultó significativamente mayor cuando las células son tratadas con 10 y 30  $\mu\text{M}$  de DAPT aportando evidencia de la acción de la vía Notch en la migración celular en la línea PC3. En este sentido, resultados similares fueron reportados por Kong y colaboradores quienes hallaron que DAPT provoca una disminución en la migración de la línea celular Du145 [105].

Finalmente, observamos que existe una marcada tendencia a mantener una mayor área libre de migración cuando las células fueron tratadas con los inhibidores de ambas vías en cuestión. Nuestros resultados, al igual que los reportados por Rice y colaboradores en las células C4-2 tratadas con una combinación del inhibidor de la activación de Notch y Enzalutamida, son indicativos de la existencia de puntos de interacción comunes entre la vía de los receptores de membrana Notch y la señal del AR en la célula prostática tumoral sugiriendo una acción protumoral conjunta de ambas señales y abriendo la posibilidad en un futuro de ensayos clínicos de terapia combinada dirigida e inhibitoria de Notch y del AR en los casos de resistencia a la deprivación androgénica o baja respuesta a esta terapia actual.

# Conclusión

En este trabajo demostramos que la vía de señalización Notch contribuiría al fenotipo tumoral en la línea celular PC-3 y el uso de DAPT tendría un efecto antitumoral tanto al ser aplicado de manera aislada como en combinación con el inhibidor del eje de los andrógenos Enzalutamida. Además, determinamos que esta actividad antitumoral podría involucrar al menos, la inhibición de la viabilidad y de la migración celular. Estos resultados sugieren que la señalización Notch mejoraría la respuesta a los tratamientos dirigidos contra el receptor de andrógenos.

Asimismo nuestros resultados en muestras de pacientes confirman que la vía de señalización Notch está presente en el cáncer de próstata y podría pensarse que el patrón de expresión de los receptores NOTCH sería dependiente del contexto tumoral. Sin embargo, debido a la complejidad de la vía de señalización Notch aún es necesario un análisis más exhaustivo de la expresión de receptores, ligandos y de la activación de la vía. Un aumento en el número de pacientes, como así también un mayor espectro de líneas tumorales de próstata de distinta agresividad, evaluadas *in vitro* e *in vivo* en xenotransplantes, nos permitirá ampliar el conocimiento respecto al rol de la vía en el desarrollo del cáncer de próstata y estudiar en mayor profundidad su interacción con el receptor de andrógenos.; como así también profundizar en los puntos de interacción entre las dos señales estudiadas en este trabajo de tesis.



# **Bibliografía**

1. Paul C. Marker, A.A.D., Rajvir Dahiya and Gerald R. Cunha, *Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development*. Developmental Biology 2003.
2. Knudsen, B.S. and Vasioukhin, V., *Mechanisms of Prostate Cancer Initiation and Progression*. 2010.
3. Bonkhoff, H., et al., *Basement membranes in fetal, adult normal, hyperplastic and neoplastic human prostate*. 1991.
4. Toivanen, R. and Shen, M.M., *Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification*. 2017.
5. LIU, A.Y., et al., *Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation*. Cell Biology, 1997.
6. Wang, Y., et al., *Cell differentiation lineage in the prostate*. 2001.
7. Toivanen, R. and Shen, M.M., *Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification*. The Company of Biologists, 2017.
8. Bartsch, G., et al., *Electron microscopic stereological analysis of the normal human prostate and of benign prostatic hyperplasia*. 1979.
9. Grossmann, M.E., et al., *Androgen Receptor Signaling in Androgen-Refractory Prostate Cancer*. Journal of the National Cancer Institute, 2001.
10. Shafi, A.A., et al., *Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer*. Pharmacology & Therapeutics, 2013.
11. Feldman, B.J.F.a.D., *THE DEVELOPMENT OF ANDROGEN-INDEPENDENT PROSTATE CANCER*. Nature, 2001. 1.
12. Lavery, D.N. and Bevan, C., *Androgen Receptor Signalling in Prostate Cancer: The Functional Consequences of Acetylation*. 2011.
13. Weigel, L.V.N.a.N.L., *Activation of the Human Androgen Receptor through a Protein Kinase A Signaling Pathway*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1996.
14. Jenster, G., *The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer*. 1999.
15. CW, B., et al., *Androgen metabolism and mechanism of action in male pseudohermaphroditism: a study of testicular feminization*. 1973.
16. TR., B., *Human androgen insensitivity syndrome*. . 1995.

17. Niu, Y., et al., *Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages*. 2007.
18. Wadosky, K.M. and Koochekpour, S., *Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside*. Oncotarget, 2017.
19. Kimberly D. Miller, M.R.L.S., MPH; Chun Chieh Lin, PhD, MBA; Angela B. Mariotto, PhD; Joan L. Kramer, MD; Julia H. Rowland, PhD; Kevin D. Stein, PhD; Rick Alteri, MD; Ahmedin Jemal, DVM, PhD, *Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016.
20. Bray, F., et al., *Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. 2018.
21. Litwin, M.S. and Tan, H.-J., *The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. A Review* American Medical Association, 2017.
22. Logothetis, C.J., et al., *Molecular Classification of Prostate Cancer Progression: Foundation for Marker driven-Treatment of Prostate Cancer*. National Institutes of Health (NIH), 2013.
23. Gleason, D.F., *Classification of prostatic carcinomas*. Cancer Chemotherapy Reports, 1966.
24. Shah, R.B. and Zhou, M., *Recent advances in prostate cancer pathology: Gleason grading and beyond*. Pathology International, 2016.
25. Chang, C.L., SO; Yeh, S and Chang, TM, *Androgen receptor (AR) differential roles in hormone-related tumors including prostate, bladder, kidney, lung, breast and liver*. Nature, 2014.
26. WILSON, S., et al., *The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells*. Biochemical Society, 2005.
27. Shafi, A.A., et al., *Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer*. 2013.
28. Yuan, X., et al., *Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis*. 2014.
29. WANG, Z., et al., *Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer*. MOLECULAR MEDICINE REPORTS, 2017.

30. Yuan, X.C., C; Chen, S; Chen, S; Yu, Z and Balk, SP, *Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis*. Oncogene, 2014.
31. Green, S.M.M., Elahe A and Nelson, Peter S. , *Androgen Action and Metabolism in Prostate Cancer*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2012.
32. Karantanos, T.C., Paul G. and Thompson, Timothy C. , *Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate-resistance and novel therapeutic approaches*. Oncogene, 2013.
33. St John Floyd Jr, M., et al., *Differential mechanisms of bicalutamide-induced apoptosis in prostate cell lines*. Nature, 2009.
34. Dehm, S.M., et al., *Splicing of a novel AR exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance*. National Institutes of Health (NIH), 2009.
35. Mostaghel, E.A., et al., *Intraprostatic Androgens and Androgen-Regulated Gene Expression Persist after Testosterone Suppression: Therapeutic Implications for Castration-Resistant Prostate Cancer* Cancer Research, 2007.
36. Page, S.T., et al., *Persistent Intraprostatic Androgen Concentrations after Medical Castration in Healthy Men*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006.
37. Yu, Y.Z., Yu; Guan, Wenbin; Huang, Tao; Kang, Jian; Sheng, Xujun and Qi, Jun *Androgen Receptor Promotes the Oncogenic Function of Overexpressed Jagged1 in Prostate Cancer by Enhancing Cyclin B1 Expression via Akt Phosphorylation* Molecular Cancer Research, 2014.
38. Hu, Y.-Y.Z., Min-hua; Zhang, Rui; Liang, Ying-Min and Han, Hua *NOTCH SIGNALING PATHWAY AND CANCER METASTASIS*. 2012.
39. Artavanis-Tsakonas, S., et al., *Notch signaling*. Science, 1995. **268**(5208): p. 225-32.
40. Simpson, P., *Developmental genetics. The Notch connection*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 736-7.
41. Artavanis-Tsakonas, S., et al., *Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(7): p. 1977-81.

42. Ellisen, L.W., et al., *TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms*. Cell, 1991. **66**(4): p. 649-61.
43. Robbins, J., et al., *Mouse mammary tumor gene int-3: a member of the notch gene family transforms mammary epithelial cells*. J Virol, 1992. **66**(4): p. 2594-9.
44. Borggrefe, T. and Liefke, R., *Fine-tuning of the intracellular canonical Notch signaling pathway*. Cell Cycle, 2012. **11**(2): p. 264-76.
45. Kopan, R. and Ilagan, M.X., *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. **137**(2): p. 216-33.
46. Leong, K.G. and Karsan, A., *Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2223-33.
47. Andersson, E.R., et al., *Notch signaling: simplicity in design, versatility in function*. Development, 2011. **138**(17): p. 3593-612.
48. Amsen, D., et al., *The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation*. Nature Reviews Immunology, 2009.
49. Deng, G., et al., *Notch signaling in the prostate: critical roles during development and in the hallmarks of prostate cancer biology*. 2015.
50. Bray, S.J., *Notch signalling: a simple pathway becomes complex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 678-89.
51. Ellisen, L., et al., *TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms*. 1991.
52. Park, J., et al., *Notch3 gene amplification in ovarian cancer*. 2006.
53. Choi, J.-H., et al., *Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion*. 2008.
54. Abravanel, D.L., et al., *Notch promotes recurrence of dormant tumor cells following HER2/neu-targeted therapy*. 2015.
55. Shi, C., et al., *Notch 3 Protein, not its Gene Polymorphism, is Associated with the Chemotherapy Response and Prognosis of Advanced NSCLC Patients*. 2014.
56. Sriuranpong, V., et al., *Notch Signaling Induces Cell Cycle Arrest in Small Cell Lung Cancer Cells*. 2001.
57. Rangarajan, A., et al., *Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation*. 2001.

58. Nicolas, M., et al., *Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin*. Nature Genetics, 2003.
59. Polakis, P., *Wnt signaling in cancer*. 2012.
60. Wang, X.-D., et al., *Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation*. 2006.
61. Artavanis-Tsakonas, S., et al., *Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development*. Science, 1999.
62. Carvalho, F.L.F., et al., *Notch Signaling in Prostate Cancer: A Moving Target*. Prostate, 2014.
63. O'Brien, R.a.M., Laure *The Notch-1 receptor in prostate tumorigenesis*. El Sevier, 2017.
64. Lefort, K., et al., *Dual tumor suppressing and promoting function of Notch1 signaling in human prostate cancer*. 2016.
65. Tran, C., et al., *Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer*. Science, 2009.
66. MERSEBURGER, A.S., et al., *Perspectives on Treatment of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer*. The Oncologist, 2013.
67. Antonarakis, G.A.a.E.S., *AR aberrations and resistance to abiraterone or enzalutamide*. Nature, 2016.
68. Buttiglieri, C., et al., *Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer*. Cancer Treatment Reviews, 2015.
69. Ciccarese, C., et al., *The safety and efficacy of enzalutamide in the treatment of advanced prostate cancer*. Expert Review of Anticancer Therapy, 2016.
70. Sternberg, C.N., *Enzalutamide, an oral androgen receptor inhibitor for treatment of castration-resistant prostate cancer*. Future Oncology, 2019.
71. Chandrasekar, T., et al., *Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC)*. Translational Andrology and Urology, 2015.
72. Antonarakis, E.S., et al., *AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer*. The New England Journal of Medicine, 2014.
73. Kregel, S., et al., *Acquired resistance to the second-generation androgen receptor antagonist enzalutamide in castration-resistant prostate cancer*. Oncotarget, 2015.

74. Fitzpatrick, J.S.a.J.M., *Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer*. BJU International, 2016.
75. Rice, M.A., et al., *Loss of Notch1 activity inhibits prostate cancer growth and metastasis and sensitizes prostate cancer cells to anti-androgen therapies*. American Association for Cancer Research, 2019.
76. Stoyanovaa, T., et al., *Activation of Notch1 synergizes with multiple pathways in promoting castration-resistant prostate cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), 2016.
77. Cui J, W.Y., Dong B, Qin L, Wang C, Zhou P, Wang X, Xu H, Xue W, Fang YX, Gao WQ, *Pharmacological inhibition of the Notch pathway enhances the efficacy of androgen deprivation therapy for prostate cancer*. Int J Cancer. , 2018.
78. Hallahan, A.R., et al., *The SmoA1 Mouse Model Reveals That Notch Signaling Is Critical for the Growth and Survival of Sonic Hedgehog-Induced Medulloblastomas*. Cell and Tumor Biology, 2004.
79. Sjölund, J., et al., *Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo*. The Journal of Clinical Investigation 2008.
80. Kimura, K., et al., *Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice*. Japanese Cancer Association, 2006.
81. Tao Kong, Y.J., Jingzhe Yang, Xin Wang, Chunsong Jia and Limin Liao, *Down-regulation of Notch-1 by  $\gamma$ -secretase inhibitor suppress the proliferation and migration of prostate cancer cells*. 2011.
82. Cristina, C., et al., *Increased pituitary vascular endothelial growth factor-a in dopaminergic D2 receptor knockout female mice*. Endocrinology, 2005. **146**(7): p. 2952-62.
83. Cristina, C., et al., *VEGF and CD31 association in pituitary adenomas*. Endocr Pathol, 2010. **21**(3): p. 154-60.
84. Soylyu, H., et al., *Characterization of Notch Signalling Pathway Members in Normal Prostate, Prostatic Intraepithelial Neoplasia (PIN) and Prostatic Adenocarcinoma*. Pathology & Oncology Researc, 2015.

85. PARR, C., et al., *The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer.* INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 2004.
86. Choi, J.-H., et al., *Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion.* National Institutes of Health, 2015.
87. Vo, K., et al., *Targeting notch pathway enhances rapamycin antitumor activity in pancreas cancers through PTEN phosphorylation.* Molecular Cancer, 2011.
88. Perrone, S., et al., *Notch system is differentially expressed and activated in pituitary adenomas of distinct histotype, tumor cell lines and normal pituitaries* Oncotarget, 2017.
89. Zhou, H., et al., *The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer.* Medicine, 2018.
90. Wang, X., et al., *ELEVATED EXPRESSION OF CANCER-ASSOCIATED PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN IN HIGH-GRADE PROSTATIC INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND PROSTATE CANCER.* National Institutes of Health (NIH), 2011.
91. Leong, K.G. and Gao, W.-Q., *The Notch pathway in prostate development and cancer.* International Society of Differentiation, 2008.
92. Villaronga, M.A., et al., *Notch Signaling: A Potential Therapeutic Target in Prostate Cancer.* Current Cancer Drug Targets, 2008.
93. GREENE, L.M., et al., *Inhibition of  $\gamma$ -secretase activity synergistically enhances tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induced apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells via upregulation of death receptor 5.* ONCOLOGY LETTERS, 2016.
94. LI, L.-C., et al., *Gastric cancer cell growth and epithelial-mesenchymal transition are inhibited by  $\gamma$ -secretase inhibitor DAPT.* ONCOLOGY LETTERS, 2014.
95. Cui, D., et al., *Notch pathway inhibition using PF-03084014, a  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI), enhances the anti-tumor effect of docetaxel in prostate cancer.* Clinical Cancer Research, 2015.
96. Lucas, J.M., et al., *The Androgen-Regulated Protease TMPRSS2 Activates a Proteolytic Cascade Involving Components of the Tumor Microenvironment and Promotes Prostate Cancer Metastasis.* Cancer Discovery, 2014.



97. Alimiraha, F., et al., *DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation*. Federation of European Biochemical Societies, 2006.
98. Ghashghaei, M., et al., *Enhanced radiosensitization of enzalutamide via schedule dependent administration to androgen-sensitive prostate cancer cells*. *The Prostate*, 2017.
99. Cui, J., et al., *Pharmacological inhibition of the Notch pathway enhances the efficacy of androgen deprivation therapy for prostate cancer*. *International Journal of Cancer*, 2018.
100. Farah, E., et al., *NOTCH signaling is activated in and contributes to resistance in enzalutamide-resistant prostate cancer cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2019.
101. Ware, K.E., et al., *Snail promotes resistance to enzalutamide through regulation of androgen receptor activity in prostate cancer*. *Oncotarget*, 2016.
102. Chen, J., et al., *Androgen-deprivation therapy with enzalutamide enhances prostate Q7 cancer metastasis via decreasing the EPHB6 suppressor expression*. *Cancer Letters*, 2017.
103. ZHANG, Y., et al., *Notch and breast cancer metastasis: Current knowledge, new sights and targeted therapy*. *ONCOLOGY LETTERS*, 2019.
104. Wu, C.X., et al., *Notch Inhibitor PF-03084014 Inhibits Hepatocellular Carcinoma Growth and Metastasis via Suppression of Cancer Stemness due to Reduced Activation of Notch1–Stat3*. 2017.
105. Kong, T., et al., *Down-regulation of Notch-1 by  $\gamma$ -secretase inhibitor suppress the proliferation and migration of prostate cancer cells*. *African Journal of Biotechnology*, 2011.

# Resumen

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna diagnosticada con mayor frecuencia en los hombres y la quinta causa principal de muerte relacionada con el cáncer entre ellos. El receptor de andrógenos se expresa en muchas células de cáncer de próstata y se ha demostrado que desempeña un papel importante en la tumorigénesis y metástasis del mismo.

El tratamiento estándar para el cáncer de próstata ha sido la terapia de privación de andrógenos (ADT, castración quirúrgica o química). Esta, resulta en un inicio efectiva pero la mayoría de los pacientes recae luego de varios años con una enfermedad más agresiva que se conoce como Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CRPC). La Enzalutamida, un compuesto no esteroideo y antagonista de segunda generación del receptor de andrógenos, es utilizada como tratamiento estándar para el CRPC. Sin embargo, la respuesta de las células tumorales de próstata es variable e incluso se genera indefectiblemente resistencia a estos tratamientos.

La vía de señalización Notch participa en el desarrollo normal de los tejidos, por lo que no es sorprendente que su desregulación se encuentre implicada en actividades oncogénicas o supresoras de tumores. A pesar de que la expresión de Notch se ha reportado desregulada en el cáncer de próstata, el rol de esta vía de señalización en el desarrollo de agresividad y metástasis en estos tumores permanece aún poco esclarecido.

En este trabajo nos propusimos estudiar la señalización Notch como mecanismo molecular asociado al desarrollo de agresividad tumoral y resistencia a los tratamientos específicos del cáncer de próstata.

Mediante Inmunohistoquímica detectamos expresión de los receptores NOTCH - 1, 2 y 4, no así de NOTCH - 3, y del marcador de proliferación PCNA en distintos cortes histológicos de tumores humanos de próstata. Del análisis cuantitativo de la expresión de PCNA, hallamos que la expresión de este marcador de proliferación mostró una tendencia a incrementarse cuanto mayor es el Score de Gleason con que fue clasificado el tumor.

Por otro lado, analizamos el efecto del DAPT, un inhibidor de la vía de señalización Notch, y de Enzalutamida, el inhibidor del receptor de andrógenos, sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer de próstata PC-3. Encontramos una disminución significativa de la viabilidad tanto con el tratamiento aislado como con la combinación de DAPT y Enzalutamida. Además observamos que el tratamiento con DAPT disminuyó significativamente la expresión *TMPRSS2*, un gen que responde a los andrógenos,

vinculando de alguna forma las señales de Notch y el AR en esta línea celular. De igual manera, evaluamos la expresión de *HES-1*, un gen diana de la vía Notch, bajo el tratamiento con Enzalutamida y observamos que la expresión de este gen mostró una tendencia a disminuir su expresión con el tratamiento. Finalmente, estudiamos el efecto de los inhibidores de ambas vías sobre la migración de las PC-3 y observamos que existe una inhibición de la migración celular luego del tratamiento aislado y en combinación de DAPT y Enzalutamida.

Nuestros resultados confirman que la vía de señalización Notch está presente en el cáncer de próstata y que contribuiría al desarrollo del fenotipo tumoral. El uso de DAPT tendría un efecto antitumoral tanto al ser aplicado de manera aislada como en combinación con el inhibidor del eje de los andrógenos Enzalutamida. Determinamos que esta actividad antitumoral podría involucrar al menos, la inhibición de la viabilidad y de la migración celular. Estos resultados sugieren que la inhibición de la señalización Notch podría mejorar la respuesta a los tratamientos dirigidos contra el receptor de andrógenos.