



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Magíster en Biotecnología Molecular

**“DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE PLATAFORMA DE EVALUACIÓN DE
MOLÉCULAS CON ACTIVIDAD POTENCIAL FRENTE AL CÁNCER DE
PRÓSTATA RESISTENTE A LA CASTRACIÓN Y RESISTENTE A LA
ABIRATERONA”**

Tesis para optar al grado de Magíster en Biotecnología Molecular

YERKO IGNACIO RIVAS MORALES

CONCEPCIÓN-CHILE

2024

Profesor Guía: Dr. IVÁN ANTONIO GONZÁLEZ CHAVARRÍA

Laboratorio de Lipoproteínas y Cáncer

Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas,

Universidad de Concepción

*“¿Las aventuras no terminan nunca? Supongo que no. Alguien tiene que llevar
adelante la historia”*

-Bilbo Bolsón

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes de la Comisión Evaluadora:

Dr. Iván Antonio González-Chavarría
Profesor/a Guía
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Coralia Isabel Rivas Rocco
Facultad de
Universidad de Concepción

Dra. Violeta Marilyn Morín Muñoz
Facultad de
Universidad de Concepción

Dr. Francisco Javier Roa Cartes
Profesor/a Evaluador/a Externo/a
Facultad de
Universidad de

Dra. Coralia Isabel Rivas Rocco
Director/a
Programa de Magíster en Biotecnología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Primero:

Esta tesis fue financiada gracias a los fondos otorgados por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo, ANID, al Dr. Iván González-Chavarría. FONDECYT REGULAR N° 1231911.

Segundo. Los correspondientes:

Gracias a los que estuvieron y a los que siguen ahí.

Por último, pero no menos importante:

Quiero darme las gracias

Quiero darme las gracias por creer en mí

Quiero darme las gracias por hacer todo este trabajo duro

Quiero darme las gracias por no tener días libres

Quiero darme las gracias por no rendirme nunca

Quiero darme las gracias por ser siempre un dador

Y tratar de dar más de lo que recibo

Quiero darme las gracias por intentar hacer más bien que mal

Quiero darme las gracias por ser yo en todo momento.

ÍNDICE

1	RESUMEN	XII
2	ABSTRACT	XV
3	INTRODUCCIÓN	17
3.1	Generalidades del cáncer de próstata. Epidemiología; estadificación, tratamiento y costos asociados.	17
3.2	Dependencia hormonal del cáncer de próstata, desarrollo de resistencia a terapia de privación de andrógenos y resistencia a Abiraterona.	21
4	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	34
5	HIPÓTESIS.....	37
6	OBJETIVOS.....	38
6.1	Objetivo general	38
6.2	Objetivos específicos.	38
6.2.1	Objetivo específico 1	38
6.2.2	Objetivo específico 2	38
7	METODOLOGÍA	39
7.1	Cultivo celular y generación de modelos celulares de CRPC resistentes a la Abiraterona.	39
7.2	Evaluación de marcadores de resistencia a Abiraterona en los modelos celulares de CRPC generados.	43

7.3	Evaluación de compuestos con actividad potencial en CRPC resistente a Abiraterona.	47
8	RESULTADOS.....	49
8.1	El tratamiento crónico con acetato de Abiraterona genera resistencia a la droga en los modelos celulares de CRPC, C4-2B y 22RV1.....	49
8.2	Las células de CRPC resistentes a Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR presentan un aumento en la expresión de marcadores de resistencia a terapia de castración y resistencia a Abiraterona.	61
8.3	Los ensayos de proliferación y muerte en tiempo real en células resistentes a Abiraterona de las líneas celulares C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR permiten la identificación de compuestos con actividad potencial contra el CRPC resistente a Abiraterona.	71
9	DISCUSIÓN	116
10	CONCLUSIÓN	126
11	SUPLEMENTARIOS.....	127
12	BIBLIOGRAFÍA	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías esteroidogénicas en el CPRC.	28
Figura 2. Esquema gráfico del problema de investigación que aborda esta tesis.	36
Figura 3. Curvas dosis/respuesta a Abiraterona en modelos sensibles y resistentes a Abiraterona.	50
Figura 4. Los porcentajes de supervivencia frente a Abiraterona son superiores en células AbiR.	52
Figura 5. Las células AbiR presentan una mayor proliferación celular en el tiempo que las células wt.	54
Figura 6. Las células AbiR tratadas con concentraciones crecientes de Abiraterona presentan una mayor proliferación celular que las células wt.	55
Figura 7. Los porcentajes de supervivencia frente a Abiraterona son significativamente mayores en células AbiR.	57
Figura 8. Las células AbiR disminuyen la muerte celular en el tiempo frente a la Abiraterona.	58
Figura 9. Las células AbiR poseen menor muerte celular frente a 10 μ M de Abiraterona.	59

Figura 10. Las células de CRPC resistentes a la Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR aumentan la expresión AR.	64
Figura 11. Las células de CRPC resistentes a la Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR aumentan la expresión de la enzima esteroidogénica CYP17A1.	66
Figura 12. Las células de CRPC resistentes a la Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR aumentan la expresión de la enzima esteroidogénica 17b-HSD.	69
Figura 13. Las células de CRPC resistentes a la Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR aumentan la expresión del marcador de progresión bioquímica de PSA.	71
Figura 14. El tratamiento con BSO genera efectos diferenciales en células C4-2B wt y AbiR.....	74
Figura 15. El tratamiento con BSO genera efectos diferenciales en células 22RV1 wt y AbiR.	75
Figura 16. El tratamiento con IKE genera efectos diferenciales en células C4-2B wt y AbiR.....	78
Figura 17. El tratamiento con IKE genera efectos diferenciales en células 22RV1 wt y AbiR.....	79
Figura 18. Los co-tratamientos de Abiraterona y BSO o Abiraterona e IKE no generan disminución de la proliferación celular en la línea celular C4-2B AbiR....	82
Figura 19. Las células 22RV1 AbiR disminuyen la proliferación celular frente al co-tratamiento de Abiraterona e IKE.	85

Figura 20. La muerte celular en células C4-2B AbiR no se ve alterada significativamente frente a los co-tratamientos de Abiraterona y BSO o Abiraterona e IKE.	88
Figura 21. Las células 22RV1 aumentan la muerte celular cuando son co-tratadas con Abiraterona. e IKE.	90
Figura 22. El tratamiento con Quercetina genera efectos diferenciales en la proliferación celular de células C4-2B wt y AbiR.	93
Figura 23. El tratamiento con Quercetina genera efectos diferenciales en la proliferación celular de células 22RV1 wt y AbiR.	95
Figura 24. El tratamiento con IAKT genera efectos diferenciales en la proliferación de células C4-2B wt y AbiR.	98
Figura 25. El tratamiento con IAKT genera efectos diferenciales en la proliferación de células 22RV1 wt y AbiR.	100
Figura 26. Las células C4-2B AbiR disminuyen la proliferación celular cuando son co-tratadas con Quercetina o IAKT y Abiraterona.	103
Figura 27. Los co-tratamientos de Quercetina o IAKT y Abiraterona generan aumento de la muerte celular en células C4-2B AbiR.	106
Figura 28. Las células 22RV1 AbiR disminuyen la proliferación celular cuando son co-tratadas con Quercetina o IAKT y Abiraterona.	108
Figura 29. Los co-tratamientos con Quercetina o IAKT y Abiraterona no generan cambios significativos en la muerte celular de células 22RV1 AbiR.	110

Figura 30. Los tratamientos con AV3 generan diferencias significativas en la proliferación de células C4-2B AbiR.....	112
Figura 31. Los tratamientos con AV-3 generan disminución de la proliferación de células 22RV1 wt pero no de células 22RV1 AbiR.....	113
Figura 32. Los tratamientos con AV-3 generan efectos diferenciales en la muerte celular de células wt y AbiR.....	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la detección y cuantificación de marcadores de resistencia a Abiraterona en células de CRPC.....	45
Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot.....	46
Tabla 3. Concentraciones utilizadas y mecanismo de acción conocida de las moléculas evaluadas en modelos de CRPC y CRPC AbiR.....	48
Tabla 4. Porcentajes de supervivencia celular y porcentajes de resistencia a Abiraterona para células 22RV1 AbiR y C4-2B AbiR, tratadas con concentraciones crecientes de acetato de Abiraterona.....	51
Tabla 5. Porcentajes de supervivencia celular y porcentajes de resistencia a Abiraterona para células 22RV1 AbiR y C4-2B AbiR, tratadas con distintas concentraciones de Abiraterona.....	56

1 RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En Chile, el cáncer de próstata (CaP) es la neoplasia maligna más prevalente y con mayor mortalidad en hombres, y el costo de tratamiento asociado a esta patología es elevado, lo que la convierte en un problema de salud pública. El tratamiento principal para el cáncer de próstata avanzado es la terapia hormonal o terapia de privación de andrógenos (ADT). Sin embargo, un porcentaje significativo de pacientes que recibe ADT desarrolla resistencia, evolucionando a cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). La alternativa terapéutica de última línea para el CRPC es la Abiraterona, un inhibidor selectivo de la enzima esteroideogénica CYP17A1, pero un tercio de los pacientes tratados con este fármaco también desarrollan resistencia, reduciendo su eficacia y limitando la sobrevida. Por lo tanto, es esencial encontrar nuevas estrategias y moléculas para tratar el CRPC resistente a Abiraterona.

La evidencia científica actual indica que no existen herramientas celulares y moleculares comerciales o metodologías estandarizadas para evaluar compuestos con potencial terapéutico contra el CRPC resistente a la Abiraterona. En esta tesis, desarrollamos un prototipo de plataforma para la identificación de compuestos y/o moléculas contra el CRPC resistente a la Abiraterona mediante la generación de dos modelos celulares resistentes y la

estandarización de una metodología para evaluar la actividad citotóxica o citostática de dichos compuestos. Los modelos celulares de CRPC resistente a la Abiraterona fueron generados mediante el tratamiento crónico de células de CRPC 22RV1 y C4-2B con concentraciones crecientes del fármaco. La estandarización de la metodología de evaluación de compuestos se realizó comparando la información obtenida y las limitaciones metodológicas de los métodos de cristal violeta y el análisis de proliferación y muerte en tiempo real.

Nuestros resultados muestran que es posible generar dos modelos de CRPC resistente a la Abiraterona (AbiR), diferenciados fenotípicamente por la sobreexpresión de los marcadores de resistencia a ADT y Abiraterona: AR, CYP17A1, 17 β -HSD y PSA, en comparación con las células parentales (wt). Los modelos de CRPC resistentes a la Abiraterona fueron validados por un aumento significativo en la resistencia al fármaco, con un porcentaje de resistencia mayor al 20%. Además, el análisis de proliferación y muerte en tiempo real presentó múltiples ventajas en términos de cantidad de información, precisión, y tiempos, en comparación con el método de cristal violeta.

Se evaluaron 5 compuestos con actividad potencial frente al CRPC resistente a la Abiraterona utilizando un sistema semiautomatizado de ensayos de citotoxicidad mediante tratamientos con una plataforma robótica y análisis de proliferación y muerte en tiempo real. Esto permitió identificar actividad diferencial de estos 5 compuestos en los modelos de CRPC AbiR en comparación con las células CRPC wt.

2 ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide. In Chile, prostate cancer (CaP) is the most prevalent and the most lethal malignant neoplasm in men, and the cost of treatment associated with this condition is high, making it a public health issue. The main treatment for advanced prostate cancer is hormonal therapy or androgen deprivation therapy (ADT). However, a significant percentage of patients receiving ADT develop resistance, leading to castration-resistant prostate cancer (CRPC). The last-line therapeutic option for CRPC is Abiraterone, a selective inhibitor of the steroidogenic enzyme CYP17A1, but about one-third of patients treated with this drug also develop resistance, reducing its effectiveness and limiting survival. Therefore, it is essential to find new strategies and molecules to treat Abiraterone-resistant CRPC.

Current scientific evidence indicates that there are no commercial cellular and molecular tools or standardized methodologies available for evaluating compounds with potential therapeutic action against Abiraterone-resistant CRPC. In this thesis, we developed a prototype platform for identifying compounds and/or molecules against Abiraterone-resistant CRPC by generating two resistant cellular models and standardizing a methodology for evaluating the cytotoxic or cytostatic activity of these compounds. The cellular models of Abiraterone-resistant CRPC were generated through chronic

treatment of CRPC 22RV1 and C4-2B cells with increasing concentrations of the drug. The standardization of the compound evaluation methodology was performed by comparing the information provided and the methodological limitations of the crystal violet method and real-time proliferation and cell death analysis.

Our results show that it is possible to generate two models of Abiraterone-resistant CRPC (AbiR), phenotypically differentiated by the overexpression of resistance markers to ADT and Abiraterone: AR, CYP17A1, 17 β -HSD, and PSA, compared to the parental (wt) cells. The Abiraterone-resistant CRPC models were validated by a significant increase in drug resistance, with a resistance percentage higher than 20%. Furthermore, the real-time proliferation and cell death analysis showed multiple advantages in terms of the amount of information, accuracy, and time compared to the crystal violet method.

We evaluated 5 compounds with potential activity against Abiraterone-resistant CRPC using a semi-automated cytotoxicity assay system with a robotic platform and real-time proliferation and cell death analysis. This allowed us to identify differential activity of these 5 compounds in the AbiR CRPC models compared to the wt cells.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Generalidades del cáncer de próstata. Epidemiología; estadificación, tratamiento y costos asociados.

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad crónica a nivel mundial. En el año 2020 se diagnosticaron alrededor de 20 millones de casos y se produjeron aproximadamente 10 millones de decesos debido a esta enfermedad (GLOBOCAN, 2022a). En América, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el cáncer es la segunda causa de muerte, siendo responsables del 47% de los fallecimientos en personas menores de 69 años (Salud, 2019).

A nivel nacional, en el año 2019 las neoplasias malignas se convirtieron en la principal causa de muerte, superando incluso a las enfermedades cardiovasculares (Estadísticas, 2019). En Chile, durante el año 2020, se registraron más de 50 mil nuevos casos de cáncer y se proyecta que esta cifra aumente a más de 90 mil para el año 2040, lo cual genera un impacto socioeconómico importante para la salud pública (GLOBOCAN, 2022c). En este sentido, un estudio sobre los costos de la atención médica del cáncer en Chile reveló que se destinan más de 2.100 millones de dólares al año para el

tratamiento de esta enfermedad, lo que equivale aproximadamente al 1% del Producto Interno Bruto (PIB) del país y representa más del 4,31% del gasto total en salud. Los tipos de cáncer que generan un mayor impacto en términos de costos son el cáncer de estómago (17,6%), el cáncer de mama (7%) y el cáncer de próstata (4,2%) en el sector público, y el cáncer de mama (14%), el cáncer de pulmón (7,5%) y el cáncer de próstata (4,1%) en el sector privado (Camilo Cid 2016). Así, el cáncer se ha convertido en un problema a resolver para la salud pública a nivel nacional y la investigación científica del área oncológica es un desafío en la búsqueda de nuevas terapias, o sistemas de detección, que permitan una mayor esperanza y calidad de vida para los pacientes.

Particularmente, durante el 2020, el cáncer de próstata (CaP) fue el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, con cifras de 222 mil y 59 mil casos respectivamente (GLOBOCAN, 2022b). Este tipo de cáncer se define como una neoplasia que se presenta en el tejido prostático en hombres, generalmente mayores de 50 años y se caracteriza por un crecimiento lento y una alta incidencia. En esta línea, se estima que en más del 70% de las autopsias de hombres mayores de 80 años se encuentra un tumor prostático [10]. Además, en Chile el cáncer de próstata es la mayor causa de muerte por cáncer y según el Instituto Nacional del Cáncer, la cifra de muertes por cáncer de próstata se duplicaría en un período de 20 años [4]. De esta manera, el cáncer de próstata puede considerarse un problema de

salud pública tanto a nivel mundial como nacional y, además, un problema actual y futuro.

El cáncer de próstata puede clasificarse según su estadio clínico-patológico según el sistema de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) denominada como (TNM), o bien, según la escala de Gleason. Brevemente, la clasificación TNM resulta de la estadificación del cáncer según el tamaño del tumor, la invasividad hacia ganglios linfáticos cercanos y la capacidad para generar metástasis. Esta estadificación va en una escala de T I a T IV, donde I es un tumor pequeño en un solo lóbulo prostático lo que corresponde a un estadio temprano, hasta los estadios III y IV, los que corresponden a cáncer de próstata avanzado. En estos estadios avanzados, el tumor ocupa más de un lado de la próstata y se ha propagado al tejido circundante extraprostático (Society, 2021). En ese sentido, el tratamiento del cáncer de próstata depende principalmente del estadio clínico-patológico de la enfermedad, denotado por los niveles de antígeno específico prostático (PSA) y la salud del paciente. En estadios tempranos (I y II) se adoptan terapias clásicas como la vigilancia activa radioterapia local o prostatectomía (Grimm et al., 2012; MINSAL, 2015). En el caso del cáncer de próstata avanzado (etapa TNM III o IV) el tratamiento consiste en la terapia de privación androgénica (ADT) mediante castración quirúrgica (orquiectomía) o química mediante agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) para reducir los niveles de testosterona (T) circulante (Dai et al., 2017) , ya que este tipo de cáncer

depende de las hormonas sexuales masculinas testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) para su desarrollo y progresión (Chandrasekar et al., 2015). Sin embargo, entre el 10% y el 20% de los pacientes tratados con ADT (aquellos que presentan un cáncer de próstata sensible a las hormonas) desarrollarán resistencia al tratamiento en un período de 3 a 5 años, lo que se conoce como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). Además, un 44% de los pacientes con cáncer de próstata metastásico no reciben tratamiento con ADT debido a la presencia de resistencia intrínseca a la castración (NCI, 2010).

En los casos de pacientes que padecen cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), la guía clínica del Ministerio de Salud de Chile (MINSAL) recomienda como primera opción de tratamiento el docetaxel, un taxano que actúa inhibiendo la polimerización de microtúbulos e interfiere con la división celular (MINSAL, 2015). Cuando el cáncer progresa y se vuelve refractario al docetaxel, se debe considerar el uso de enzalutamida, un antagonista del receptor de andrógenos (AR), como segunda opción, y, por último, el acetato de Abiraterona, cuya molécula activa (Abiraterona) actúa como un antagonista de la enzima esteroideogénica 17α -hidroxilasa (CYP17A1) que es clave en las rutas de síntesis de andrógenos. En este contexto, en términos monetarios, en el año 2016, los pacientes con cáncer de próstata representaron el 10% del total de pacientes tratados en el sistema de salud y el costo promedio anual

del tratamiento ronda los \$28.000.000 CLP. Sin embargo, este costo puede superar los \$80.000.000 CLP en casos de cáncer en etapa avanzada (Kimberly Langdon Cull, 2022).

3.2 Dependencia hormonal del cáncer de próstata, desarrollo de resistencia a terapia de privación de andrógenos y resistencia a Abiraterona.

Uno de los hechos más relevantes relacionados al desarrollo del CaP es que se ha demostrado que el crecimiento neoplásico de la próstata se asocia con la señalización mediada por las hormonas sexuales masculinas Testosterona y Dihidrotestosterona (andrógenos) y el receptor de andrógenos (AR).

El receptor de andrógenos es un receptor nuclear que se encuentra inactivo en el citoplasma (Fujita & Nonomura, 2019). Cuando AR se une a sus ligandos naturales T o DHT, heterodimeriza y trasloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción y promueve la expresión de genes diana involucrados en el desarrollo y progresión del CaP (Culig & Santer, 2014). Entre estos genes se encuentra el gen de Kalikreína 3 (KLK3), el que codifica el PSA y es usado en la clínica para la monitorización del paciente y seguimiento de la enfermedad (Riegman et al., 1991; Q. Zhou et al., 2021). Específicamente, se ha demostrado que la señalización de AR en el CaP genera un aumento de los niveles transcripcionales de PSA (Kim & Coetzee, 2004). Así, la evidencia muestra que los altos niveles de AR en células de CaP se asocian con

mayores niveles de PSA en el paciente y, por consiguiente, una mayor malignidad del tumor. A saber, una rápida diseminación; desregulaciones del ciclo celular e inhibición de la apoptosis (Huang & Tindall, 2002) Debido a esta relación entre AR y el desarrollo del CaP, es que la terapia de privación androgénica (ADT) o castración química como la primera alternativa de tratamiento en CaP avanzado (MINSAL, 2015). La ADT se basa en la inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, disminuyendo la síntesis de T por las células de Leydig en el testículo. Esto genera la disminución del 90% de los andrógenos séricos en el paciente. Si bien la mayoría de los pacientes con CaP responden a ADT, la mayoría desarrollará resistencia al tratamiento y generarán un CRPC (Wadosky & Koochekpour, 2016).

Como se mencionó anteriormente, existen alternativas de tratamientos para los pacientes que padecen CRPC, sin embargo, estas son más bien limitadas. De estas alternativas, la terapia con el antiandrógeno Abiraterona es la más reciente. La Abiraterona es un profármaco (CB7630) que se administra por vía oral y corresponde a la última alternativa de tratamiento en CRPC según la guía clínica del MINSAL (MINSAL, 2015). Una vez absorbido y distribuido, el acetato de Abiraterona se hidroliza para convertirse en Abiraterona (CB7598), el metabolito activo (Giatromanolaki et al., 2019). La Abiraterona inhibe selectiva e irreversiblemente la enzima CYP17A1, lo que resulta en la supresión de la síntesis de andrógenos (Thakur et al., 2018). Además, estudios *in vitro* han demostrado que la Abiraterona puede inhibir el receptor

de andrógenos (AR) (Richards et al., 2012). Estas propiedades antiandrogénicas de la Abiraterona se deben a su estructura $\Delta 5, 3\beta$ -hidroxilo, que comparte con esteroides como la Dehidroepiandrosterona (DHEA) y el 5-diol. La Abiraterona puede ser metabolizada por enzimas esteroidogénicas como la 3β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa isoformas 1 y 2 (HSD3B1 y HSD3B2) para generar $\Delta 4, 3$ - ceto ($\Delta 4$ - Abiraterona) (D4A), que posee una estructura similar al andrógeno testosterona. Esta similitud estructural podría explicar la interacción de la Abiraterona con la proteína AR y otras enzimas esteroidogénicas como la 5-alfa reductasa (SDRA5). En resumen, la conversión de Abiraterona a D4A genera múltiples objetivos terapéuticos y afecta varias vías androgénicas en tejidos periféricos (Li et al., 2015).

La actividad antiandrogénica de la Abiraterona hace que este tratamiento sea administrado tanto en pacientes con CRPC metastásico como no metastásico (Ryan et al., 2015) ,y se considera una opción costo-efectiva frente al CRPC refractario al docetaxel o resistente a la enzalutamida (Zhong et al., 2013), sin embargo, el costo promedio del tratamiento con acetato de Abiraterona es de alrededor de \$10000 USD mensuales (Naveen Premnath, 2020), lo que le convierte en uno de los fármacos más costosos en el mercado (NCI, 2018).

Si bien la Abiraterona muestra efectos positivos en pacientes con CRPC, no todos los pacientes responden al tratamiento y el tiempo de respuesta varía entre los pacientes (Simon et al., 2021). La resistencia al fármaco se

manifiesta en un aumento del marcador bioquímico PSA y se estima que aproximadamente el 30% de los pacientes tratados con Abiraterona desarrollan resistencia primaria, lo que se define como la falta de reducción en los niveles séricos de PSA durante los primeros 3 meses de tratamiento (Buttiglierio et al., 2015). Así, la última alternativa quimioterapéutica contra el CRPC, la Abiraterona, falla limitando el tratamiento y sobrevida de los pacientes.

Entre los mecanismos para la resistencia a Abiraterona se encuentra la sobreexpresión del receptor de andrógenos. En este contexto, Simon y colaboradores han demostrado que tanto la resistencia a Abiraterona, como a Enzalutamida, otro antiandrógeno de nueva generación se encuentra mediada por la reactivación transcripcional de AR, en modelos celulares de CaP y CRPC (Hu et al., 2012; Simon et al., 2021). En la misma línea, la evidencia muestra que la amplificación o sobreexpresión de AR se encuentra correlacionada con un peor pronóstico en pacientes que padecen CRPC y fueron tratados con Abiraterona (Csizmarik et al., 2021). En síntesis, la resistencia a Abiraterona se asocia con la sobreexpresión de AR, por lo que los niveles de la proteína pueden ser utilizados como un marcador de resistencia en CRPC resistente a la Abiraterona.

Otro mecanismo de resistencia a la Abiraterona en CRPC es la generación de variantes de empalme (*splicing*) del receptor de andrógenos que carecen de su dominio de unión a ligando y se mantienen constitutivamente activas, tales

como AR-V7 [17]. En este contexto, es importante comprender que el gen que codifica AR está compuesto por 8 exones. El exón 1 conforma el dominio N-terminal, que contiene el dominio de función de activación 1 (AF1). Los exones 2 y 3 forman los dominios de unión al ADN, mientras que parte del exón 4 contribuye al dominio bisagra. Desde una porción del exón 4 hasta el exón 8 se conforma el dominio de unión a ligando (LBD). Durante la generación de variantes de *splicing*, cuatro exones crípticos juegan un papel crucial al reemplazar uno o más exones del gen. En el caso de AR-V7, una de las variantes más significativas en el cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) y que es responsable de la activación constitutiva de la señalización del receptor de andrógenos incluso en ausencia de ligandos, solo se expresan los exones 1, 2 y 3 de la proteína nativa, además del exón críptico CE3. Esto da lugar a una proteína que carece del dominio LBD, pero conserva las regiones de activación funcional, AF1, y de unión al ADN (Antonarakis et al., 2014; Zhu et al., 2020), lo que genera la variante constitutivamente activa. Se ha demostrado que el tratamiento con Abiraterona no resulta eficaz en pacientes que presentan altos niveles de AR-V7, en comparación con pacientes que presentan una menor expresión de esta variante (Antonarakis et al., 2014).

En otra arista, la evidencia sobre la esteroidogénesis intratumoral como mecanismo relevante en la generación de resistencia a la castración (Dillard et al., 2008; Knuuttila et al., 2014; Mohler et al., 2004; Titus et al., 2005; Xiao et al., 2018) determinó que la señalización mediada por andrógenos y su

receptor es clave en la progresión del cáncer de próstata hacia estadios avanzados y de mayor malignidad. La esteroidogénesis intratumoral es un proceso en el cual las células de CaP, las cuales provienen de un órgano no esteroidogénico (células epiteliales prostáticas) generan un cambio fenotípico hacia la síntesis intracrina de andrógenos como testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT). Este es un mecanismo relevante en la generación de CRPC y que es dependiente de la activación de AR. La esteroidogénesis intratumoral corresponde a una serie de reacciones enzimáticas agrupadas en 3 vías que permiten la generación de andrógenos *de novo*, a partir del colesterol u otras fuentes como esteroides extraprostáticos, en las células de CRPC (Chandrasekar et al., 2015) (Figura 1). Este hecho resulta relevante para el CRPC resistente a Abiraterona puesto que se ha evidenciado la sobreexpresión de enzimas esteroidogénicas como mecanismo de resistencia a la Abiraterona. En ese sentido la sobreexpresión de la enzima CYP17A1 se ha identificado como mecanismo de resistencia a Abiraterona (Mostaghel et al., 2011). Esta enzima corresponde al blanco molecular de la Abiraterona, y también la sobreexpresión 3 β -hidroxiesteroideshidrogenasa (3 β -HSD) (Gomez et al., 2015; Mostaghel et al., 2011) la cuales también un coactivador del receptor de andrógenos y potencia la progresión del CaP dependiente de AR (Asangani et al., 2021). En este contexto, se han detectado concentraciones altas de 3 α 5 α -17-hidroxipregnanolona, que se relaciona con la síntesis de androsterona, un precursor de T y DHT. En conjunto, la evidencia muestra que vías alternativas de la androgénesis se encuentran activas y que la esteroidogénesis de células de CRPC jugaría un papel

importante en la progresión y resistencia a la Abiraterona (Mostaghel et al., 2011).

En general, si bien el tratamiento con Abiraterona muestra resultados positivos aumentando la sobrevida media del paciente de 10.9 a 14.8 meses (de Bono et al., 2011; NCI, 2012) la resistencia al fármaco Abiraterona en CRPC genera importantes limitaciones en el tratamiento y sobrevida de los pacientes que padecen la enfermedad. Esto, debido a que los algoritmos de tratamiento sitúan a la Abiraterona como terapia de última línea y no existen tratamientos alternativos a las terapias convencionales tales como la radioterapia o quimioterapia para el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración resistente a Abiraterona (MINSAL, 2015; UK, 2023). En ese sentido, el encontrar nuevas alternativas para el tratamiento del CRPC resistente a Abiraterona es mandatorio para la investigación en el área oncológica.

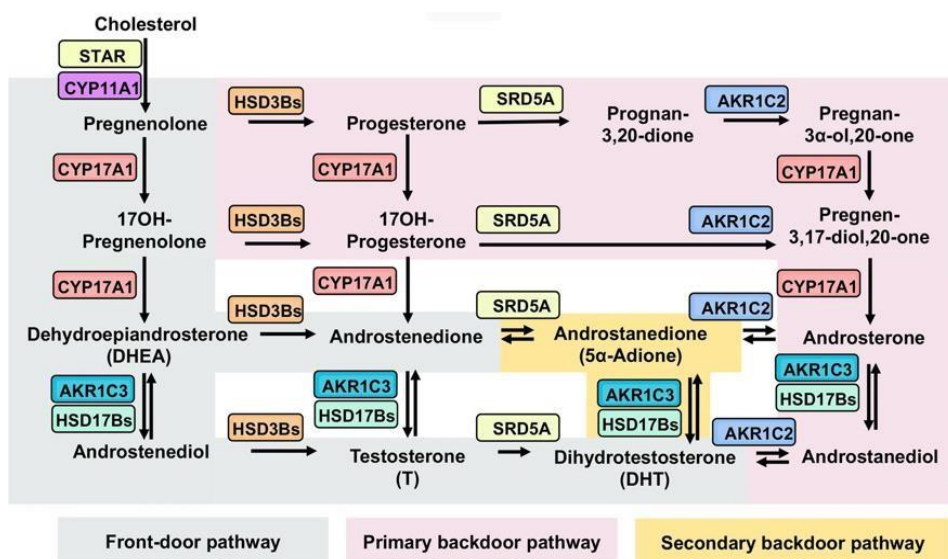


Figura 1. Vías esteroidogénicas en el CPRC. Se han definido tres vías principales para la síntesis de dihidrotestosterona en el CPRC. La vía de puerta frontal (en gris), caracterizada por la necesidad de testosterona (T) como precursor esencial de la DHT, la pregnenolona se convierte en dehidroepiandrosterona (DHEA) mediante la actividad hidroxilasa y liasa secuencial de CYP17A1. La DHEA (de origen intrínseco o suprarrenal) es entonces metabolizada por la HSD3B (3 β -HSD) para dar lugar a androstenediona o por la HSD17B3 (o AKR1C3, o 17 β -HSD) para dar lugar a androstenediol, que posteriormente se convierten en T, seguida de su 5 α -reducción a DHT por las SRD5As (5 α -reductasas). Por otro lado, las vías de puerta trasera se refieren al uso de diferentes sustratos y reacciones enzimáticas para sintetizar DHT, sin necesidad de contar con la T como intermediario. En la vía de puerta trasera primaria (en rosa), los intermediarios de la progesterona son reducidos en 5 α y 3 α por SRD5A y AKR1C2 sobre la actividad liasa de CYP17A1,

formando androsterona y luego a androstanediol por HSD17B para generar DHT. En la vía secundaria de puerta trasera (o vía 5 α -diona, en amarillo), la androstenediona producida en la vía clásica es convertida a 5 α -androstenediona (5 α -Adiona) por SRD5As en lugar de ser convertida a T, y luego a DHT por HSD17Bs. Observe que la enzima CYP17A1, blanco terapéutico del fármaco Abiraterona posee una función determinante en la esteroidogénesis intratumoral, pues participa de las tres vías de la esteroidogénesis. sTAR (proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis); CYP11A1 (enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol); CYP17A1 (esteroide 17 α -monooxigenasa); AKR1C3 (aldo-ceto reductasa 1C3); HSD17Bs, (17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas); HSD3Bs (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasas); SRD5As (5 α -esteroide reductasa); AKR1C2 (aldo-ceto reductasa 1C2). Modificado de "Orphan nuclear receptors as regulators of intratumoral androgen biosynthesis in castration-resistant prostate cancer". Jianfu Zhou, Et. Al. Oncogene. 2021 (J. Zhou et al., 2021).

3.3 Cáncer de próstata resistente a la castración resistente a Abiraterona y desarrollo científico-tecnológico para búsqueda de alternativas terapéuticas.

En la actualidad, no existen alternativas de tratamiento para los pacientes que padecen CRPC resistente a la Abiraterona. Sin embargo, la identificación de los mecanismos de resistencia a la Abiraterona en CRPC sugieren que moléculas que presenten similitud estructural con la Abiraterona o con metabolitos intermediarios de la vía androgénica, o bien, moléculas que actúen a distintos niveles de la vía de señalización de AR, podrían resultar útiles para revertir la resistencia y tratar el CRPC resistente a la Abiraterona.

En esta línea, algunos estudios apuntan hacia el reposicionamiento de fármacos aprobados por la FDA para la resensibilización de CRCP resistente a Abiraterona. Uno de estos estudios recientes corresponde al estudio de fase Ib que evalúa el uso de Niclosamida para realizar sinergia con Abiraterona (Parikh et al., 2021) y se basa en la inhibición de AR-V7, proteína que confiere resistencia a Abiraterona en CRPC. Otro estudio basado en una biblioteca de drogas aprobadas por la FDA propone el uso de Idarubicina para el tratamiento de CRPC resistente a Abiraterona. El uso de Idarubicina se basa en su propiedad intercalante de ADN y, por tanto, capacidad de inhibir la replicación del ADN, interfiriendo con la división celular (Zhang et al., 2022). Por último,

existe el registro de propiedad intelectual reciente, respecto de usos de moléculas conocidas como degradadores selectivos de receptor de andrógenos (SARD) para el tratamiento de resistencia a Abiraterona [43]. Así, estos estudios muestran que existe interés y una necesidad respecto de la búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento del CRPC y CRPC resistente a la Abiraterona y que el desarrollo de herramientas que permitan la evaluación de compuestos como posibles terapias para revertir la resistencia y controlar la progresión del CRPC resistente a la Abiraterona es un área de interés científico-comercial.

A la fecha, es posible encontrar metodologías estandarizadas para la evaluación de nuevas moléculas para el tratamiento de la patología del cáncer en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Las metodologías más actuales se basan en el uso de procesos automatizados para el *screening* de un gran número de moléculas pequeñas. Este método se denomina *High-throughput screening* (HTS) (Attene-Ramos, 2014) y ha cobrado una importancia relevante en el descubrimiento de drogas para como tratamiento a diversas patologías incluyendo enfermedades infecciosas (Annang et al., 2015), desórdenes neuronales (Costamagna et al., 2021) y cáncer (Bialkowska & Yang, 2012). Particularmente el HTS ha sido usado previamente en la identificación de moléculas inhibidoras del receptor de andrógenos en un el modelo de CRPC C4-2 (Johnston et al., 2016), además de permitir la identificación de compuestos con actividad citotóxica frente a células de

cáncer de mama (Gupta et al., 2009; Zhang et al., 2012), tiroides (J. Zhao et al., 2019) y ovario (Mezencev et al., 2012).

El uso de este tipo de análisis de alto rendimiento requiere necesariamente de equipamiento especializado lo cual puede incurrir en altos costos (Environmental Protection Association, 2023) que pueden resultar una limitante para la investigación de compuestos bioactivos y/o reposicionamiento de fármacos, para el tratamiento de patologías como el CRPC resistente a Abiraterona. Además, para el caso de la investigación de nuevos tratamientos para CRPC resistente a Abiraterona, necesariamente se requieren de modelos representativos de la enfermedad, *in vivo* o *in vitro*, los cuales deben ser generados en el laboratorio resultando en importantes costos en términos de tiempo y dinero. En la misma línea, es importante notar que, si bien los estudios mencionados anteriormente hacen uso de modelos *in vitro* de CRPC resistentes a Abiraterona, estos fueron generados en el laboratorio mediante metodologías distintas para cada estudio y no se encuentran validados con un índice de resistencia a Abiraterona o similar. Considerando lo anterior, esta carencia de estandarización de la metodología de evaluación en las herramientas utilizadas en los estudios anteriores podría generar resultados disímiles respecto a la eficacia terapéutica de los compuestos frente al CRPC resistente a la Abiraterona. Por lo demás, en Chile o el mundo no existen productos o servicios disponibles comercialmente que permitan realizar la búsqueda y/o evaluación de moléculas con potencial actividad

terapéutica frente a CRPC resistente a Abiraterona, lo cual representa una importante oportunidad de desarrollo científico-tecnológico que debe ser abordada, con el fin de optimizar los procesos de búsqueda de moléculas con efecto terapéutico, que puedan servir para la reversión o tratamiento de esta resistencia.

En esta tesis mostramos una metodología semi-automatizada para el testeo de moléculas con actividad potencial frente al CRPC resistente a Abiraterona, basándonos en modelos celulares de CRPC resistentes a Abiraterona generados y caracterizados en nuestro laboratorio y el análisis de proliferación y muerte celular en tiempo real. Realizamos la comparación de esta metodología con la técnica clásica de medición de viabilidad celular por cristal violeta en términos cualitativos de cantidad de información, sencillez, sensibilidad y de tiempo empleado en el análisis. Adicionalmente, identificamos moléculas candidatas para estudios posteriores y discutimos sus efectos a nivel mecanístico como primera aproximación a nuevas terapias para pacientes que padecen de CRPC y CRPC resistente a Abiraterona.

4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El CRPC resistente a la Abiraterona es un problema de salud pública puesto que no existen alternativas terapéuticas para los pacientes que padecen la enfermedad. Así, el tratamiento y la sobrevida de los pacientes se ven limitados generando un impacto psicosocial y económico tanto para el paciente como para el ambiente que le rodea.

Si bien desde la investigación básica se han desarrollado metodologías para la evaluación de moléculas con potencial terapéutico para la resensibilización a la terapia con Abiraterona en CRPC o el tratamiento de CRPC resistente a Abiraterona, la disponibilidad de análisis específicos para esta patología son limitados debido a la carencia de herramientas estandarizadas que permitan su ejecución. Este defecto en las herramientas de evaluación disponibles podría generar resultados disímiles en cuanto a la efectividad de las moléculas evaluadas para el fin terapéutico del tratamiento del CRPC resistente a la Abiraterona. Particularmente, en Chile, no existen herramientas ni servicios disponibles comercialmente que permitan realizar esta tarea, lo cual representa una oportunidad de desarrollo científico-tecnológico. En este contexto, la evaluación de moléculas en modelos *in vitro* de CRPC resistentes a la Abiraterona se hace necesaria como una primera aproximación para llegar a resultados confiables en la identificación de moléculas con potencial

actividad terapéutica. Los modelos celulares pueden ser utilizados para el desarrollo de una metodología estandarizada y de alto rendimiento que permita la evaluación de moléculas con actividad potencial contra el CRPC resistente a la Abiraterona, y como valor agregado, posicionar compuestos bioactivos de origen natural de especies endémicas de Chile y/o moléculas identificadas con potencial actividad anticancerígena derivadas de la investigación nacional. Por lo anteriormente expuesto, en esta tesis desarrollamos un prototipo de plataforma de evaluación de moléculas con capacidad potencial de revertir la resistencia a Abiraterona en CRPC o tratar el CRPC resistente a la Abiraterona. Esta plataforma se basa en la generación de dos líneas celulares de CRPC resistentes a Abiraterona (C4-2B y 22RV1), su validación como modelos de resistencia mediante el cálculo de porcentajes de resistencia y su caracterización molecular mediante el análisis marcadores de resistencia a ADT y Abiraterona y la comparación de dos metodologías de medición de citotoxicidad y/o proliferación celular. Así establecimos una metodología confiable para la evaluación de compuestos con potencial actividad citotóxica o citostática contra el CRPC resistente a la Abiraterona.

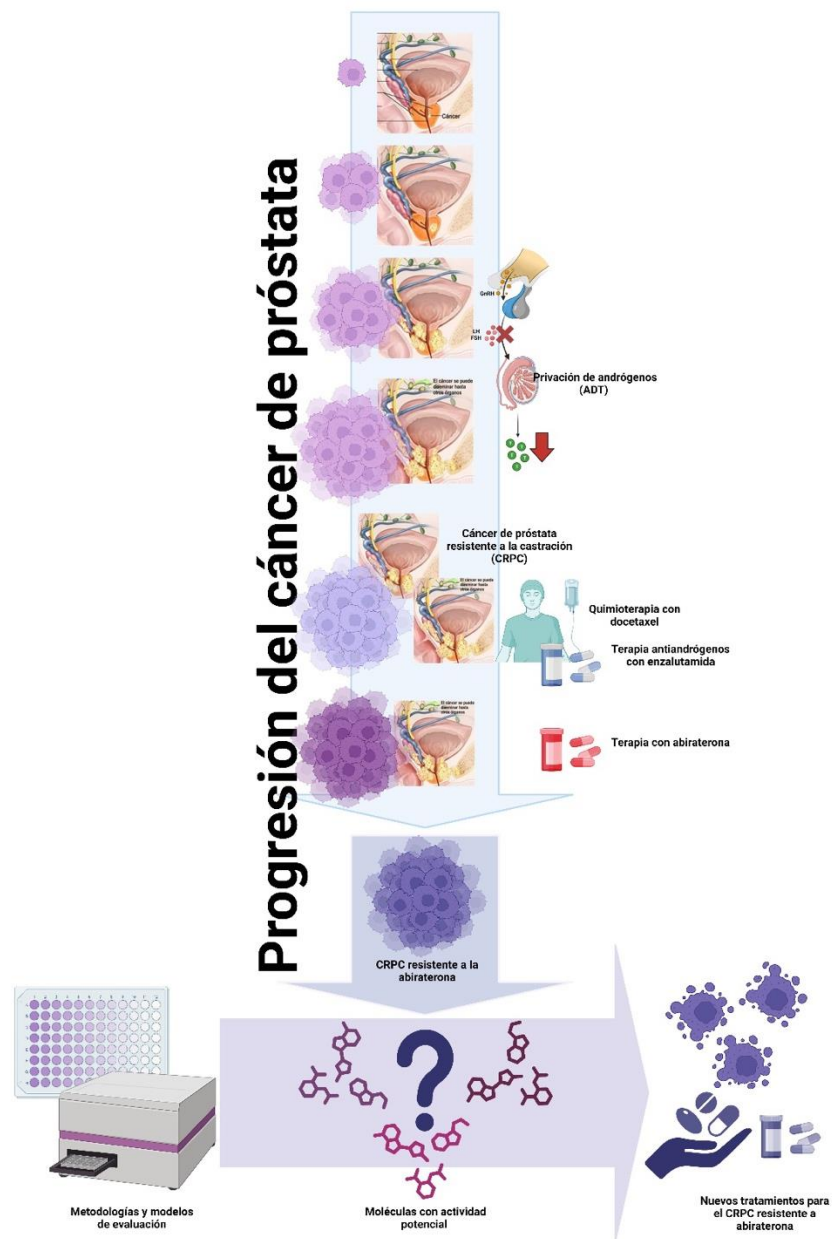


Figura 2. Esquema gráfico del problema de investigación que aborda esta tesis.

5 HIPÓTESIS.

El desarrollo de un prototipo de plataforma de evaluación de moléculas con potencial uso en el tratamiento de la resistencia a Abiraterona en cáncer de próstata resistente a la castración permite realizar un análisis de alto rendimiento de la actividad biológica de las moléculas, frente a células de CRPC resistente a Abiraterona.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Desarrollar un prototipo de plataforma de evaluación para la identificación de moléculas con potencial uso en el tratamiento de la resistencia a Abiraterona en cáncer de próstata resistente a la castración

6.2 Objetivos específicos.

6.2.1 Objetivo específico 1. Generar y caracterizar dos modelos celulares de cáncer de próstata resistente a la castración resistente a Abiraterona, basados en las líneas celulares de CRPC C4-2B y 22RV1

6.2.2 Objetivo específico 2. Estandarizar una metodología de evaluación de compuestos con potencial actividad citotóxica o citostática en células de CRPC resistente a Abiraterona, mediante la comparación de métodos de medición de proliferación y citotoxicidad celular en sistemas manuales y automatizados, en los modelos de CRPC resistentes a la Abiraterona generados.

7 METODOLOGÍA

7.1 Cultivo celular y generación de modelos celulares de CRPC resistentes a la Abiraterona.

Línea celular C4-2B: Esta línea celular comercial (ATCC) humana fue aislada desde metástasis óseas de xenoinjertos ortotópicos prostáticos de células C4-2 en ratones *nude* castrados y es ampliamente utilizada en el estudio de CRPC.

Línea celular 22RV1: Esta línea celular (ATCC) humana deriva desde el xenoinjerto de células CWR22 en ratones *nude* castrados. Al igual que la línea celular C4-2B, esta es ampliamente utilizada como modelo representativo de CRPC.

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco BRL, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, penicilina-estreptomicina 1% y L-glutamina 2mM (Gibco BRL, Carlsbad, CA). Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C en un ambiente humidificado y 5% de saturación de CO₂.

Para desarrollar modelos celulares de CRPC resistentes a la Abiraterona (AbiR) las células parentales (wt) fueron tratadas crónicamente con concentraciones crecientes de acetato de Abiraterona (Caymanchem ©). Las células de la línea 22RV1 se trataron con acetato de Abiraterona por un período superior a 500 días con concentraciones crecientes entre 5 μ M y 10 μ M. Paralelamente, las células de la línea C4-2B se trataron con concentraciones entre 5 μ M y 20 μ M de acetato de Abiraterona por un período superior a 400 días. Se realizó el cambio de medio completo fresco con la respectiva concentración de Abiraterona cada 3 días para garantizar la disponibilidad del acetato de Abiraterona y la mantención de la resistencia a la droga. Para la verificación de la resistencia a Abiraterona, se estableció que las células resistentes alcanzaran porcentajes de supervivencia celular superiores a los porcentajes de supervivencia de las células parentales en las concentraciones máximas de tratamiento crónico de Abiraterona, es decir, 20 μ M y 10 μ M de acetato de Abiraterona para las líneas celulares C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR, respectivamente. Las células fueron validadas como resistentes cuando la diferencia entre los porcentajes de supervivencia o porcentajes de resistencia a Abiraterona (Ecuación 1) en dichas condiciones fue igual o superior a 20%. Primero, la determinación de los porcentajes de resistencia se realizó mediante un ensayo de proliferación celular con cristal violeta cuando las células C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR poseían tiempos de tratamiento crónico con acetato de Abiraterona de 300 y 200 días, respectivamente. Para ello, en placas de 96 pocillos, se sembraron 5000 células por pocillo en medio RPMI

suplementado con 10% de SBF, tanto para las células de las líneas parentales, como para las células tratadas crónicamente con acetato de Abiraterona y se les trató con concentraciones crecientes de Abiraterona (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30 y 35 μ M) por 72 horas. Las células fueron fijadas con etanol al 75% y teñidas con cristal violeta al 0,1%. Se midió la intensidad de fluorescencia infrarroja a 680 nm con el fotodocumentador LICOR Odyssey (LI-COR Biosciences) y la cuantificación de la intensidad de fluorescencia se realizó mediante el software ImageStudio 5.1.

Luego, para confirmar la resistencia a Abiraterona en las células AbiR, se procedió a realizar un ensayo de proliferación y muerte celular en tiempo real en las células C4-2B y 22RV1 parentales, como C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR, cuyo tiempo con tratamiento crónico con acetato de Abiraterona era de 500 y 400 días, respectivamente. Para ello, en placas de 96 pocillos se sembraron 5000 células por pocillo de las líneas C4-2B wt y C4-2B AbiR, 22RV1 wt; 22RV1 AbiR. Luego de 24 horas en cultivo para garantizar la adherencia de las células, estas fueron tratadas de manera automatizada utilizando la plataforma robótica OT-2 (Opentrons ©) con concentraciones crecientes de acetato de Abiraterona (0; 5; 10; 20 y 40 μ M) y 30 nM de la sonda Sytox Green. Las células fueron monitorizadas en tiempo real por 72 horas con el sistema Incucyte S3. La adquisición de imágenes fue configurada con dos imágenes por pocillo en objetivo 10x, en contraste de fase y en el canal FITC. Los análisis cinéticos de proliferación y muerte se realizaron automáticamente cada 2 h

con el módulo de procesamiento y segmentación "Célula a Célula" (Sartorius # 9600-0031), donde el número de células totales se dividió constantemente por el número de células iniciales en cada imagen para determinar la proliferación celular en el tiempo (conteo de células por imagen normalizado a tiempo 0). Para la determinación de muerte celular, el número de células muertas (Sytox+) se dividió constantemente por el número total de células en cada imagen. Este sistema permite realizar un ensayo de proliferación y citotoxicidad en tiempo real evaluando cada una hora la viabilidad del cultivo en las condiciones de tratamiento.

Para el ensayo de viabilidad por cristal violeta se calculó el porcentaje de resistencia de las líneas celulares wt y AbiR frente a las concentraciones de 10 μ M; 20 μ M; 25 μ M; 30 μ M y 35 μ M de acetato de Abiraterona. De la misma manera, para el ensayo de proliferación y muerte en tiempo real se calculó el porcentaje de resistencia de las líneas celulares wt y AbiR frente a las concentraciones de 0 μ M; 5 μ M ; 10 μ M; 20 μ M y 40 μ M de Acetato de Abiraterona. Según la siguiente ecuación (Ec.1):

Ec.1

$$\% \text{ Resistencia} = [\text{fracción de supervivencia}_{\text{células AbiR}} - \text{fracción de supervivencia}_{\text{células wt}}] \times 100$$

Donde la fracción de supervivencia representa la razón de la intensidad de fluorescencia infrarroja o el conteo de células por imagen normalizado a

tiempo 0 de las células tratadas con acetato de Abiraterona frente al control sin tratamiento.

Una vez se alcanzó el porcentaje de resistencia deseado, las células se mantuvieron en cultivo con 10 μ M de acetato de Abiraterona para garantizar la mantención de la resistencia al fármaco.

La construcción de curvas dosis/respuesta, gráficos y análisis estadístico se realizó mediante el software Graphpad Prism 9.

7.2 Evaluación de marcadores de resistencia a Abiraterona en los modelos celulares de CRPC generados.

Se cultivaron 500,000 células por pocillo en placas de 12 pocillos para cada línea celular: wt y AbiR. Las células se mantuvieron en cultivo durante un periodo de 24 horas. En el caso específico de las células AbiR, se optó por no añadir Acetato de Abiraterona durante este tiempo. Esta decisión fue fundamental para asegurar que la evaluación de los marcadores moleculares reflejara cambios inducidos por el tratamiento crónico con la droga, así como la generación de resistencia, en lugar de ser el resultado de un efecto agudo derivado de la adición reciente del fármaco. Para la extracción de proteínas se utilizó RIPA Lysis Buffer System® (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se preparó una solución de 25 mM Tris-HCl; pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, suplementada con inhibidores de proteasas. La

solución fue agregada a cada uno de los pocillos con células previo retiro del medio de cultivo y se incubó por 10 minutos a 4°C. Los lisados celulares fueron extraídos desde la placa y se centrifugaron por 15 minutos a 4°C a 13000 RPM en una microcentrífuga MIKRO 220R Hettich Germany. Los sobrenadantes con las proteínas en suspensión fueron inmediatamente almacenados a -20°C.

Las proteínas fueron cuantificadas mediante el Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce (ThermoFisher Scientific, USA), según el protocolo del fabricante y la absorbancia fue medida a 526 nm en el espectrofotómetro SYNERGY HTX Multimode Reader (Biotech, Germany).

Se realizó una separación de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes y análisis por Western Blot. Para ello, se sembraron 30 µg de proteínas totales en un gel al 10% acrilamida-Bis acrilamida y se resolvieron a 100 V. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µM mediante transferencia húmeda a 100 V por 90 minutos. Las membranas se bloquearon por 1 hora con leche descremada al 5 % (p/V) en TBS 50 mM, previo secado a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, las membranas fueron incubadas por 16 horas con el respectivo anticuerpo primario anti-AR; anti CYP17A1, 17β-HSD y anti-PSA (Tabla 1) . Los anticuerpos fueron preparados en leche descremada al 2,5% p/V en buffer TBS 50 mM, Tween-20 al 0,01%. Finalmente, las membranas fueron lavadas con buffer TBS 50 mM, Tween-20 al 0.001% y SDS 0,1% y se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario (Tabla 2) por 2 horas a

temperatura ambiente. Los Western Blot fueron revelados con el fotodocumentador infrarrojo Odyssey CLX, LICOR (Texas, EE. UU.); la cuantificación de la fluorescencia de las bandas se realizó mediante el software LICOR Image Studio Lite 5.1 y el análisis estadístico se realizó mediante el software Graphpad Prism 9.

Anticuerpo	Proveedor	Código	Especie	Tipo	Título
Anti CYP17A1	Santa Cruz Biotechnology	sc- 518007	Ratón	Monoclonal	1/500
Anti 17 β -HSD (AKR1C3)	Santa Cruz Biotechnology	sc- 373902	Ratón	Monoclonal	1/500
Anti-AR	Santa Cruz Biotechnology	sc-13062	Conejo	Policlonal	1/1000
Anti-PSA	Santa Cruz Biotechnology	sc-7638	Cabra	Policlonal	1/250
Anti GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724	Ratón	Monoclonal	1/1000
Anti Alfa Tubulina	Santa Cruz Biotechnology	sc-5286	Ratón	Monoclonal	1/1000

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la detección y cuantificación de marcadores de resistencia a Abiraterona en células de CRPC.

Anticuerpo	Proveedor	Código	Especie	Tipo	Título
Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor® 790	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	715655150	Burro	Policlonal	1/10000
Anti-IgG de ratón (H+L) Alexa Fluor® 680	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	715625150	Burro	Policlonal	1/10000
Anti-IgG de conejo (H+L) Alexa Fluor® 680	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	711625152	Burro	Policlonal	1/10000
Anti-IgG de cabra (H+L) Alexa Fluor® 790	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.	705-655147	Burro	Policlonal	1/1000

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot.

7.3 Evaluación de compuestos con actividad potencial en CRPC resistente a

Abiraterona.

Para evaluar la actividad de los compuestos frente a células de CRPC y CRPC resistente a la Abiraterona se configuraron ensayos de citotoxicidad frente a las células wt y AbiR mediante análisis de proliferación y muerte en tiempo real. La racionalidad que justifica la prueba de estos compuestos, así como el rango de concentraciones utilizado en los ensayos de citotoxicidad se basa en bibliografía y estudios previos de nuestro laboratorio (Tabla 3).

En placas de 96 pocillos se sembraron 5000 células por pocillo de células C4-2B wt; C4-2B AbiR, 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. las células se trataron de manera automatizada utilizando la plataforma robótica OT-2 con concentraciones crecientes de los compuestos y 30 μ M de Sytox Green. Las células fueron monitorizadas en tiempo real por 72 horas según se detalló anteriormente (7.1).

Los compuestos utilizados, sus concentraciones y mecanismo de acción conocida se detalla en la Tabla 3.

Molécula	Abreviatura	Concentraciones usadas	Mecanismo de acción conocido	Referencia bibliográfica
L-butiniona- (S,R) Sulfoximina	BSO	1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400 μ M	Inhibición de la síntesis de glutación	(Griffith, 1982)
Imidazol Cetona Erastina	IKE	0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 μ M	Inhibición de la síntesis de glutación	(Ferrada et al., 2023)
Quercetina	QRC	0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 μ M	Inhibición de la vía PI3K/AKT	(Duprat et al., 2023)
KU-0063794	IAKT	0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 η M	Inhibición de la vía PI3K/AKT	(García- Martínez et al., 2009)
Toxina de pez Sapo	AV-3	1,88e-3; 3,75e-3; 0,01; 0,02; 0,03 mg/mL	Activación de p38 y Nf-kB	Datos no publicados

Tabla 3. Concentraciones utilizadas y mecanismo de acción conocida de las moléculas evaluadas en modelos de CRPC y CRPC AbiR.

8 RESULTADOS

8.1 El tratamiento crónico con acetato de Abiraterona genera resistencia a la droga en los modelos celulares de CRPC, C4-2B y 22RV1.

Con el objetivo de monitorizar el desarrollo de resistencia a Abiraterona, las células de las líneas C4-2B y 22RV1 incubadas crónicamente con 10 μ M de acetato de Abiraterona, se sometieron a un ensayo de citotoxicidad a Abiraterona cuando se encontraban en 200 y 300 días de incubación con la droga, respectivamente.

Los resultados mostraron que los tratamientos con dosis crecientes de Abiraterona generan efectos diferenciales en la fracción de supervivencia en células wt y AbiR (Figura 3). Particularmente, la línea celular C4-2B AbiR presentó diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de resistencia, en comparación con las células wt a concentraciones de 10 μ M y 20 μ M de acetato de Abiraterona (Figura 4A). Estas diferencias fueron de un 15,9% y 25,9%, respectivamente (Tabla 4). De igual manera, la línea celular 22RV1 AbiR presentó diferencias en el porcentaje de resistencia a Abiraterona a 10 μ M y 20 μ M de tratamiento con acetato de Abiraterona (Figura 4B). Estas diferencias fueron de un 27,5% y 66,7%, respectivamente (Tabla 4). En resumen, los resultados derivados del cálculo de los porcentajes de resistencia

mostraron que las células AbiR poseen una mayor supervivencia frente a la Abiraterona, en comparación con las células wt a concentraciones superiores a 10 μ M de acetato de Abiraterona.

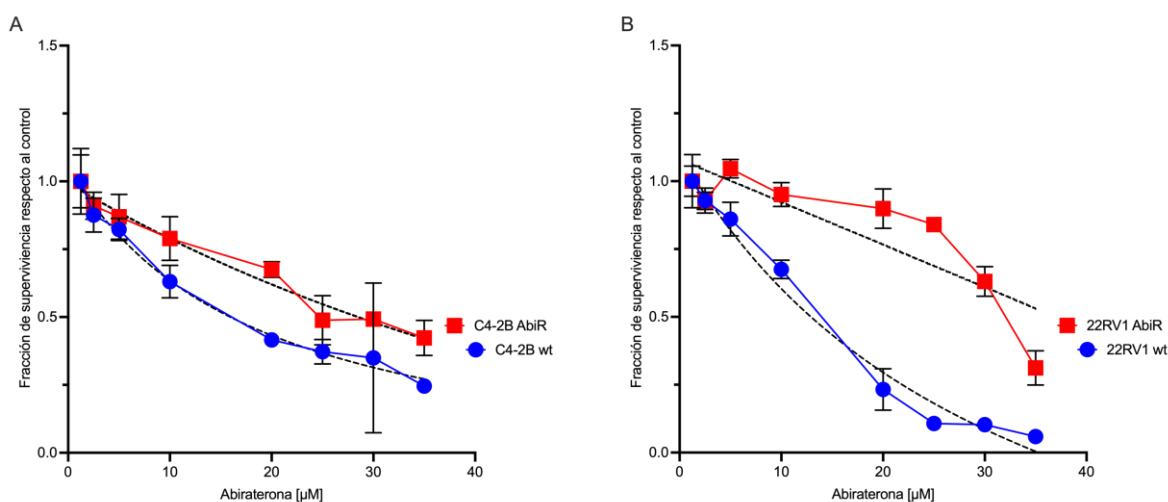


Figura 3. Curvas dosis/respuesta a Abiraterona en modelos sensibles y resistentes a Abiraterona a 72 horas de tratamiento.

Fracciones de supervivencia de líneas C4-2B (A) y 22RV1 (B) wt y AbiR. Los resultados se muestran como media de 4 réplicas independientes y las barras de error representan desviación estándar (SD).

Abiraterona [μM]	Porcentajes de supervivencia celular (%)					
	C4-2B wt	C4-2B AbiR	Diferencia (% de resistencia)	22RV1 wt	22RV1 AbiR	Diferencia (% de resistencia)
10	63.1	78.9	15.9	67.5	95.1	27.5
20	41.6	67.5	25.9	23.2	89.9	66.7
25	37.2	48.8	11.6	10.7	84.0	73.3
30	35.0	49.3	14.3	10.3	63.1	52.8
35	24.6	42.3	17.7	5.9	31.2	25.3

Tabla 4. Porcentajes de supervivencia celular y porcentajes de resistencia a Abiraterona para células 22RV1 AbiR y C4-2B AbiR, tratadas con concentraciones crecientes de acetato de Abiraterona.

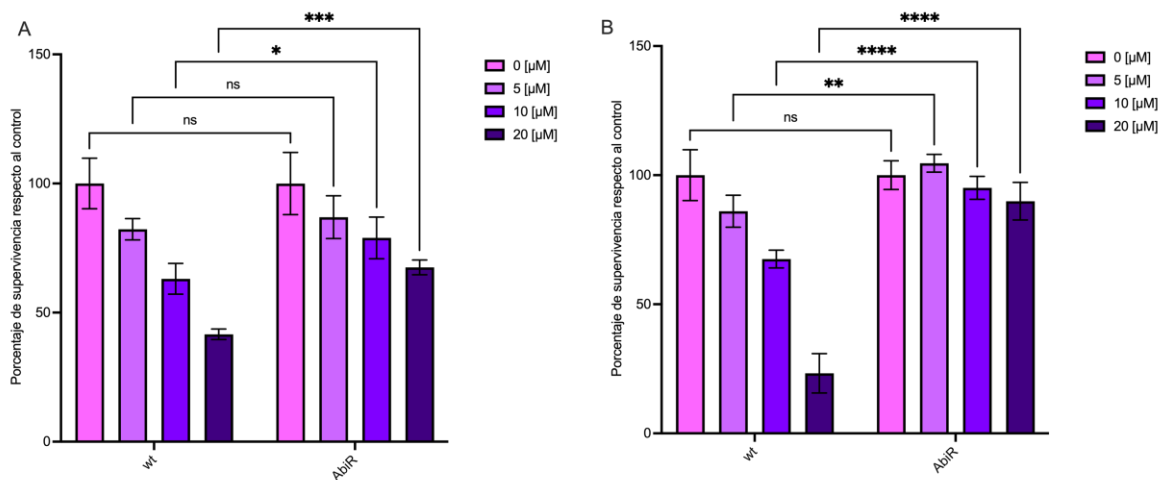


Figura 4. Los porcentajes de supervivencia frente a Abiraterona son superiores en células AbiR a 72 horas de tratamiento.

Porcentajes de supervivencia celular en líneas celulares C4-2B (A) y 22RV1 (B) wt y AbiR. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Las gráficas muestran la media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Para verificar y confirmar la resistencia a la Abiraterona en las células AbiR, se realizó un ensayo en tiempo real de proliferación y muerte celular en tiempo real, en las líneas celulares 22RV1 AbiR y C4-2B AbiR, las cuales habían sometidas a tratamientos crónicos con acetato de Abiraterona por un tiempo mayor a 500 y 400 días, respectivamente.

Los análisis de proliferación y muerte en tiempo real mostraron que los porcentajes de supervivencia de las líneas C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR, frente a las concentraciones de 10 μ M y 20 μ M de acetato de Abiraterona, fueron mayores a los porcentajes de supervivencia de las células parentales, C4-2B wt y 22RV1 wt. Estas diferencias se observan claramente alrededor de la hora 40 de tratamiento con Abiraterona (Figura 5). Luego, el cálculo de los porcentajes de resistencia a la Abiraterona para las células C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR a 10 μ M fue de 31.4 % y 33.6 %, respetivamente, mientras que a 20 μ M estos fueron de 20.9% y 137.4% (Tabla 5). Estos resultados fueron concordantes con los resultados obtenidos anteriormente por la metodología de cristal violeta, donde de igual manera las células AbiR presentaron un porcentaje de resistencia a Abiraterona significativamente superior a 20% para ambas concentraciones (Figuras 6 y 7).

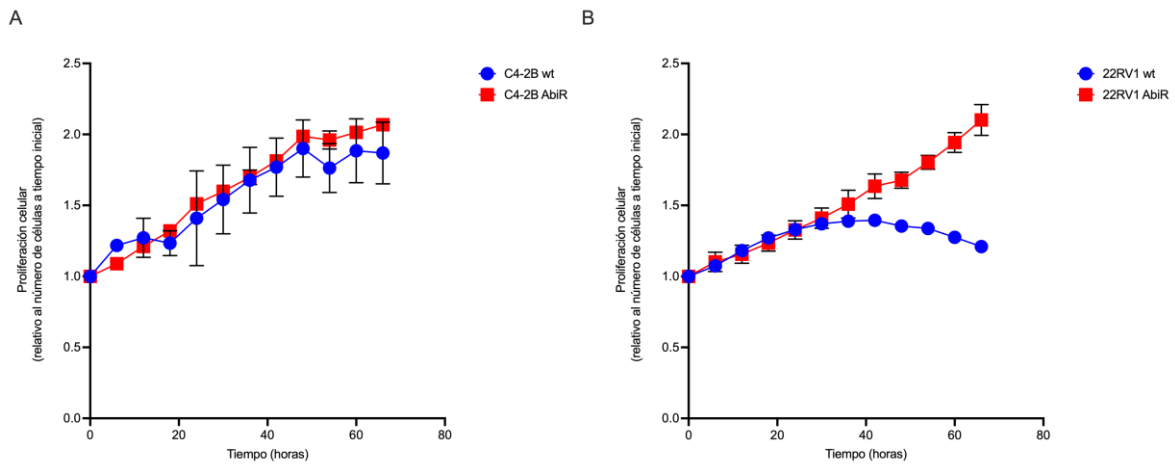


Figura 5. Las células AbiR presentan una mayor proliferación celular en el tiempo que las células wt. Gráficas de proliferación en líneas celulares (A) C4-2B y (B) 22RV1 parentales wt y AbiR tratadas con 20 μ M y 10 μ M de acetato de Abiraterona, respectivamente. Las gráficas muestran la media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan la desviación estándar (SD).

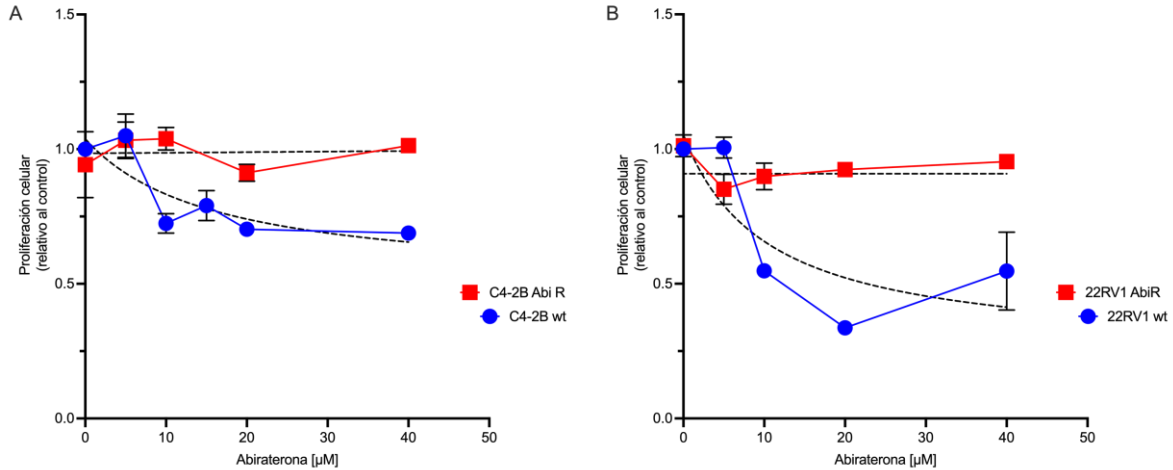


Figura 6. Las células AbiR tratadas con concentraciones crecientes de Abiraterona presentan una mayor proliferación celular que las células wt. Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas, por análisis de proliferación en tiempo real, en líneas celulares C4-2B (A) y (B) 22RV1 parentales wt y AbiR tratadas con concentraciones crecientes de acetato de Abiraterona. Las gráficas muestran la media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan la desviación estándar (SD).

Abiraterona [μM]	Porcentajes de supervivencia celular (%)					
	C4-2B wt	C4-2B AbiR	Diferencia (% de resistencia)	22RV1 wt	22RV1 AbiR	Diferencia (% de resistencia)
5	72.4	103.9	31.4	54.8	103.3	48.5
10	79.1	103.9	24.8	38.5	103.9	65.4
20	70.3	91.2	20.9	33.7	91.2	57.6
40	68.8	101.3	32.5	54.7	101.3	46.6

Tabla 5. Porcentajes de supervivencia celular y porcentajes de resistencia a Abiraterona para células 22RV1 AbiR y C4-2B AbiR, tratadas con distintas concentraciones de Abiraterona.

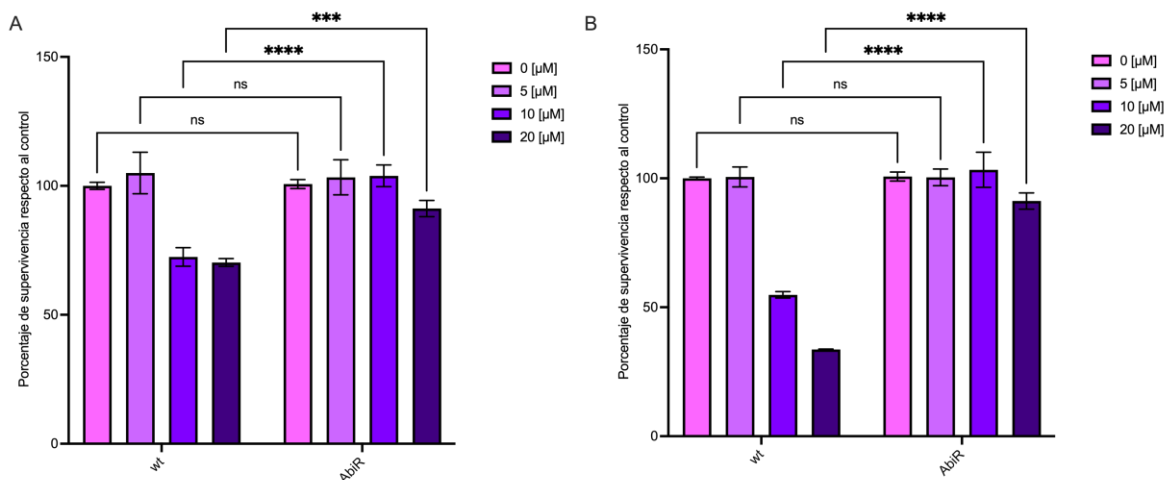


Figura 7. Los porcentajes de supervivencia frente a Abiraterona son significativamente mayores en células AbiR a 72 horas de tratamiento. Porcentajes de supervivencia en líneas celulares (A) C4-2B y (B) 22RV1 wt y AbiR. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Las gráficas muestran la media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Adicionalmente, el análisis de muerte en tiempo real mostró que las células AbiR presentaron una disminución estadísticamente significativa de los porcentajes de muerte celular, en comparación con las células wt, frente a 10 μ M de acetato de Abiraterona, tanto para las células C4-2B, como para las células 22RV1. Sin embargo, es importante notar que tanto las células wt

como AbiR no presentan porcentajes de muerte superiores al 50% de las células totales para todos los tiempos hasta 72 horas de tratamiento (Figuras 8 y 9).

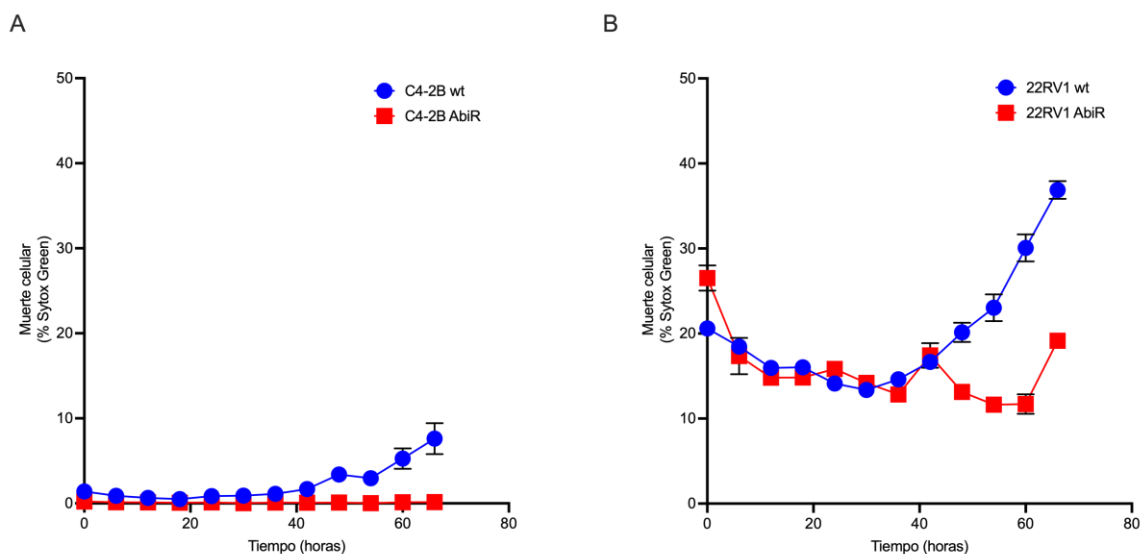


Figura 8. Las células AbiR disminuyen la muerte celular en el tiempo frente a la Abiraterona. Curvas de muerte por análisis en tiempo real, en líneas celulares (A) C4-2B y (B) 22RV1 wt y AbiR, tratadas con 20 μ M y 10 μ M de acetato de Abiraterona, respectivamente. Las gráficas muestran la media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan desviación estándar (SD).

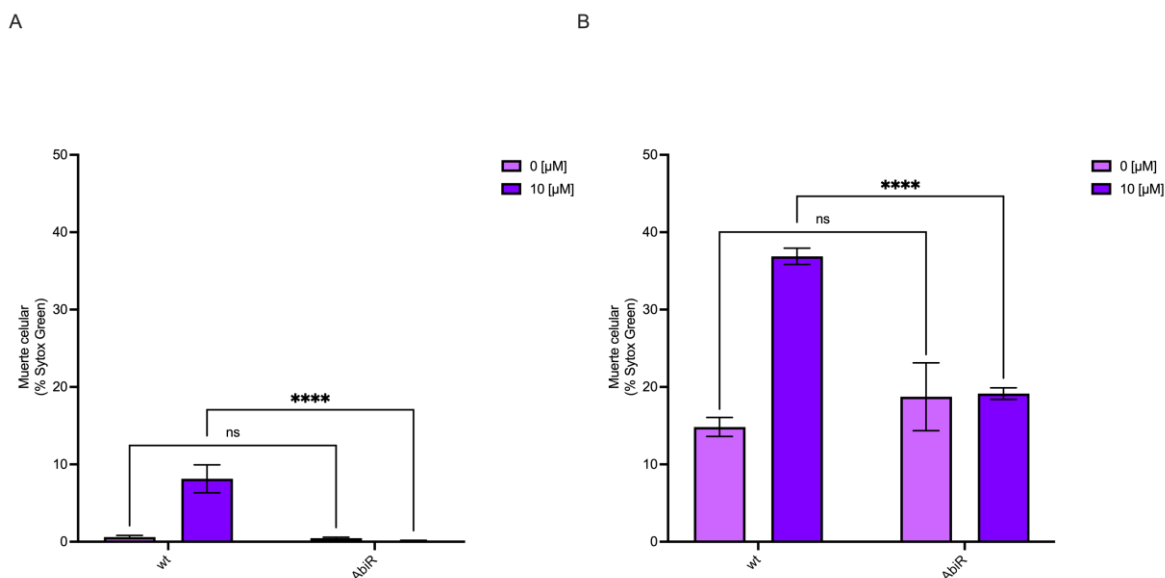


Figura 9. Las células AbiR poseen menor muerte celular frente a 10 μM de Abiraterona. Porcentajes de muerte a tiempo final de 72 horas en líneas celulares (A) C4-2B y (B) 22RV1 wt y AbiR. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Las gráficas muestran la media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Los análisis de proliferación y muerte celular en tiempo real mostraron que las diferencias más significativas en los porcentajes de supervivencia y muerte celular entre las células wt y sus contrapartes AbiR tratadas con este fármaco, se observan después de las 24 horas. Este hallazgo es crucial para los estudios posteriores destinados a evaluar la actividad biológica de

compuestos con potencial terapéutico contra células de los modelos de CRPC resistentes a la Abiraterona desarrollados.

En resumen, los análisis por cristal violeta y los análisis de proliferación celular en tiempo real muestran que tanto las células C4-2B AbiR, como 22RV1 AbiR presentan una supervivencia celular significativamente mayor frente a las máximas concentraciones utilizadas en el tratamiento crónico con acetato de Abiraterona, en comparación con sus pares wt.

Durante la validación de las células C4-2B y 22RV1 AbiR como modelos de resistencia a la Abiraterona, utilizamos dos metodologías para la medición de la proliferación celular: tinción con cristal violeta y análisis de proliferación en tiempo real. Cualitativamente, el análisis en tiempo real presenta ventajas significativas sobre el cristal violeta, especialmente en cuanto a tiempos de análisis. Aunque ambas técnicas se basaron en un tratamiento de 72 horas, el tiempo necesario para realizar los procedimientos difirió considerablemente. El tratamiento manual de cada placa de 96 pocillos con cristal violeta requiere un promedio de 2 horas, mientras que el análisis de proliferación en tiempo real, utilizando el sistema OP-2, reduce este tiempo a aproximadamente 20 minutos por placa.

Además, la metodología de cristal violeta requiere pasos adicionales, como el fijado con etanol y lavados posteriores, lo que en nuestra experiencia provoca

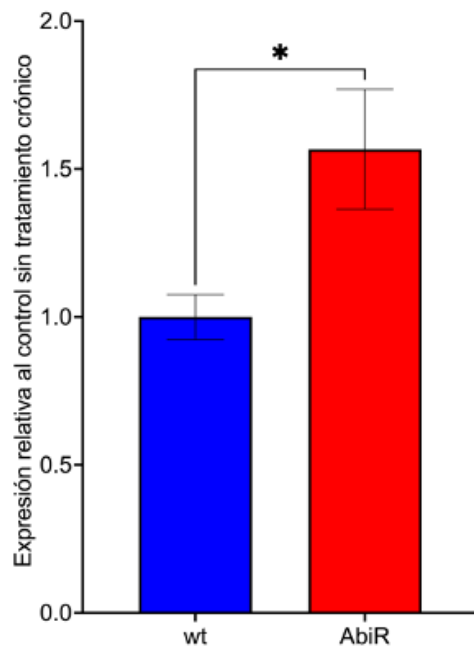
el desprendimiento de células fijadas, afectando la precisión de los resultados. Esto se refleja al comparar las curvas dosis-respuesta obtenidas por ambos métodos, las cuales, a pesar de indicar una misma tendencia, presentan discrepancias (Figura S1). El análisis de proliferación en tiempo real, por otro lado, no depende del operador y no requiere manipulaciones posteriores que puedan alterar los resultados, lo que lo convierte en una opción más fiable. En este sentido, la tinción con cristal violeta puede sobrestimar algunos resultados debido a los efectos del proceso de fijación, como se evidencia en los porcentajes de resistencia observados en las líneas celulares AbiR (Tabla S1). Por estas razones, la metodología seleccionada para evaluar compuestos, correspondiente al Objetivo 2 de esta tesis, fue el análisis de proliferación y muerte celular en tiempo real.

8.2 Las células de CRPC resistentes a Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR presentan un aumento en la expresión de marcadores de resistencia a terapia de castración y resistencia a Abiraterona.

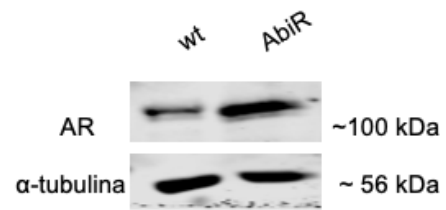
Con el objetivo de caracterizar las líneas celulares resistentes a Abiraterona, se analizó la expresión proteica de los marcadores de progresión de CRPC y resistencia a la Abiraterona: AR; PSA; CYP17A1 y 17 β -HSD mediante Western Blot. Los resultados muestran que las células C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR presentan un aumento en la expresión del marcador de progresión de CRPC y resistencia a Abiraterona, AR de 1,5 veces, con respecto a las líneas celulares wt (Figura 10).

Como se ha mencionado anteriormente, la sobreexpresión de AR ha sido ampliamente relacionada al desarrollo del CaP. Particularmente, se ha demostrado que AR se encuentra sobreexpresado en la mayoría de los casos de CRPC y puede actuar como parte de un mecanismo de resistencia a terapias antiandrogénicas como la Abiraterona.

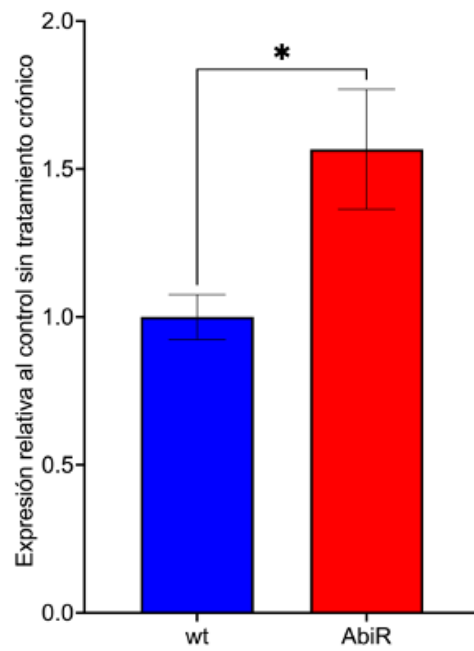
A



B



C



D

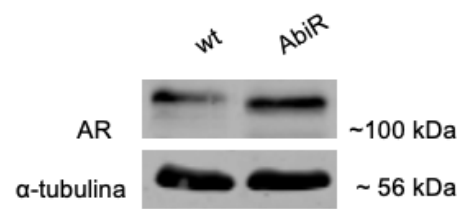
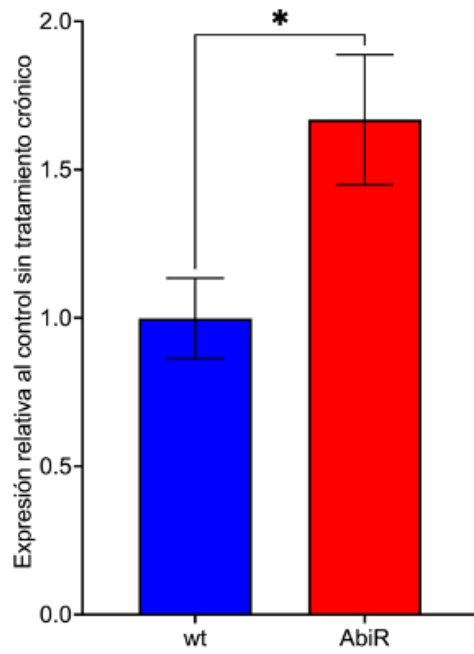


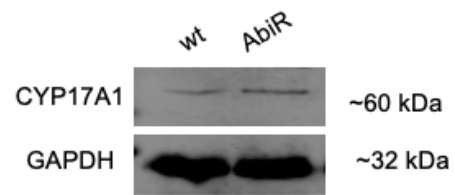
Figura 10. Las células de CRPC resistentes a la Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR aumentan la expresión AR. A) Gráfica de cuantificación de AR en células C4-2B AbiR con respecto a células wt. B) Western Blot de AR y alfa tubulina en células C4-2B wt y C4-2B AbiR. C) Gráfica de cuantificación de AR en células 22RV1 AbiR con respecto a células wt. D) Western Blot de AR y alfa tubulina en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. Las gráficas representan la media $\pm$ SEM de 4 réplicas independientes. Se evaluó la significancia mediante un test *t-student* con un $n=3$. * $p \leq 0.05$; n.s: no significativo ($p > 0.05$).

Los resultados obtenidos también revelan un incremento en la expresión de la enzima esteroideogénica CYP17A1 tanto en las células C4-2B AbiR como en las 22RV1 AbiR, con aumentos de 1,5 y 3 veces, respectivamente (Figura 11). CYP17A1 es fundamental en la esteroideogénesis intratumoral y constituye el principal blanco de la Abiraterona, desempeñando un papel clave en los mecanismos de resistencia a los antiandrogénicos. En este contexto, nuestros hallazgos sugieren la presencia de un mecanismo de retroalimentación negativa, en el cual el bloqueo de CYP17A1 mediado por la Abiraterona podría inducir una sobreexpresión compensatoria de esta enzima, contribuyendo a la resistencia terapéutica.

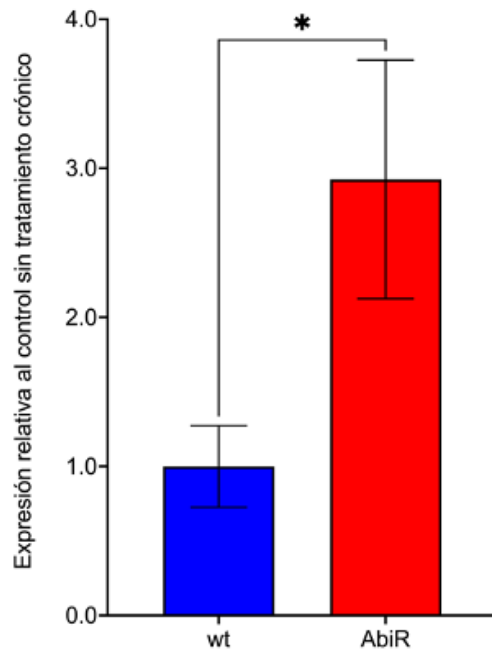
A



B



C



D

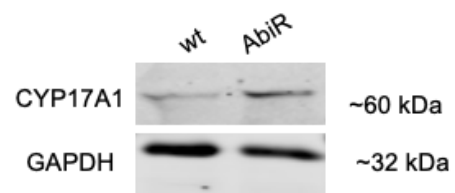


Figura 11. Las células de CRPC resistentes a la Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR aumentan la expresión de la enzima esteroidogénica CYP17A1. A) Gráfica de cuantificación de CYP17A1 en células C4-2B AbiR con respecto a células wt . B) Western Blot de CYP17A1 y GAPDH en células C4-2B wt y C4-2B AbiR. C) Gráfica de cuantificación de CYP17A1 en células 22RV1 AbiR con respecto a células wt. D) Western Blot de CYP17A1 y GAPDH en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM de 4 réplicas independientes. Se evaluó la significancia mediante un test *t-student* con un $n=3$. * $p\leq 0.05$; n.s: no significativo ($p>0.05$).

Adicionalmente, se evaluó la expresión de la enzima esteroidogénica 17β -HSD. Esta enzima cataliza otra de las reacciones claves en la esteroidogénesis intratumoral, la cual permite la conversión de dehidroepiandrosterona a androstenediol y de androsterona a testosterona y consiguiente conversión a DHT. De manera interesante, los resultados del Western Blot contra 17β -HSD mostraron un aumento de 1,8 veces en la expresión de una proteína de aproximadamente 80 kDa en la línea celular C4-2B AbiR, en comparación con la línea celular C4-2B wt (Figura 12A). Esta banda podría corresponder a la 17β -HSD tipo 4 (cuyo peso esperado es de 80 kDa) , la cual está relacionada con el desarrollo de otros tipos de cáncer, como el colorrectal (English et al., 2001). Dicha banda de 80 kDa también presenta un aumento en las células 22RV1 AbiR, con respecto a las células 22RV1 wt (Figura S2). Sin embargo, se requieren de otros estudios para verificar su

identidad. Por otro lado, las células 22RV1 AbiR presentaron un aumento de 1,7 veces en la enzima 17 β -HSD tipo 1, en comparación con las células wt (Figura 12B).

En conjunto, estos datos indican que las células C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR incrementan la expresión de marcadores previamente identificados como asociados a la resistencia a la Abiraterona.

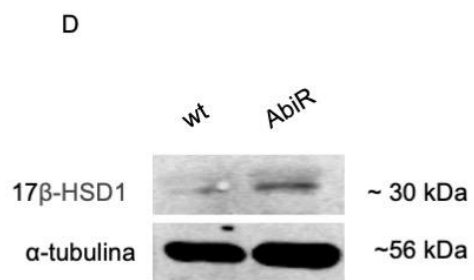
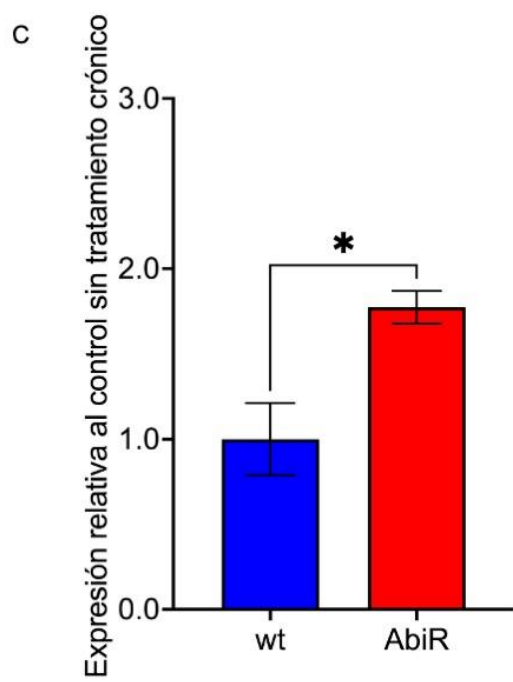
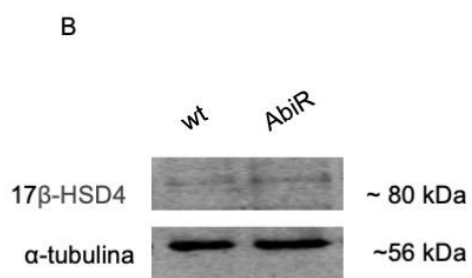
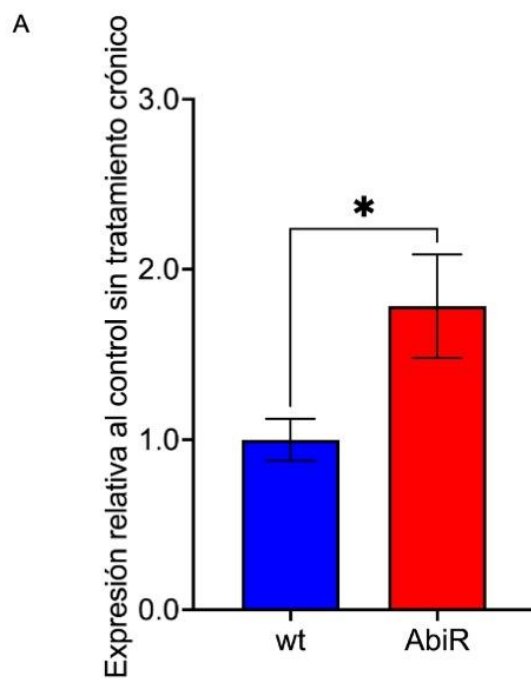


Figura 12. Las células de CRPC resistentes a la Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR aumentan la expresión de la enzima esteroidogénica 17 β -HSD. A) Gráfica de cuantificación de 17 β -HSD en células C4-2B AbiR con respecto a células wt. B) Western Blot de 17 β -HSD y alfa tubulina en células C4-2B wt y C4-2B AbiR. C) Gráfica de cuantificación de 17 β -HSD en células 22RV1 AbiR con respecto a células wt. D) Western Blot de 17 β -HSD y alfa tubulina en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM de 4 réplicas independientes. Se evaluó la significancia mediante un test *t-student* con un n=3. * $p \leq 0.05$; n.s: no significativo ($p > 0.05$).

Finalmente, el análisis de la expresión de PSA, el marcador clínico de la progresión del CRPC, mostró un aumento estadísticamente significativo en las células C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR en comparación con sus pares wt (Figura 13). Estos incrementos fueron de 2,1 y 17 veces, respectivamente y muestran la funcionalidad de AR sobreexpresado.

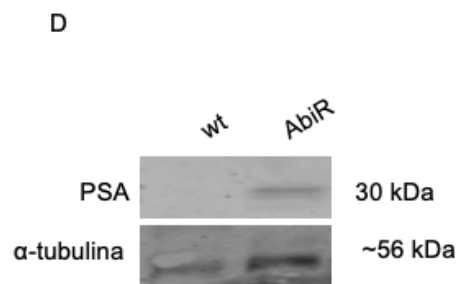
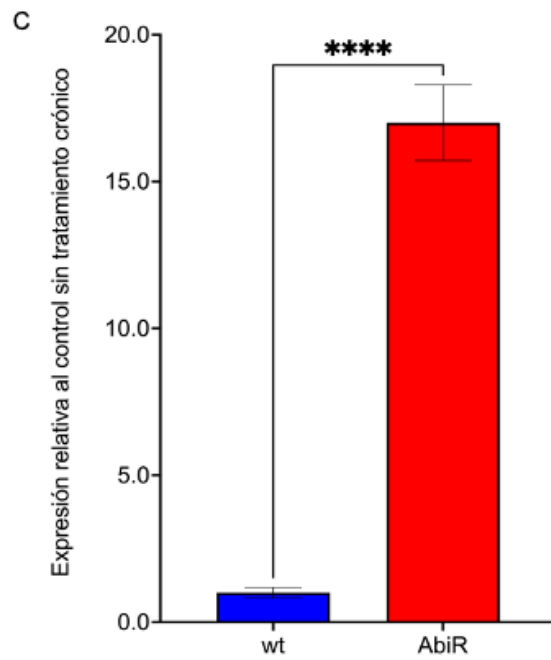
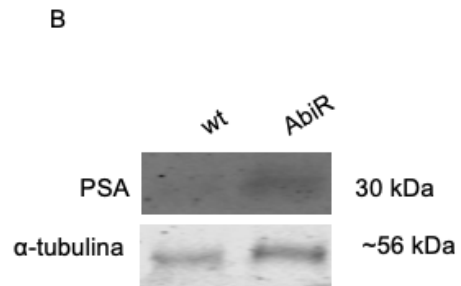
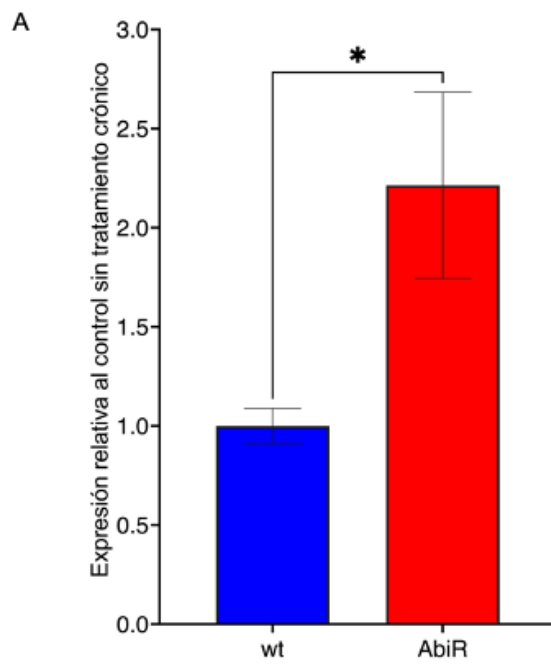


Figura 13. Las células de CRPC resistentes a la Abiraterona C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR aumentan la expresión del marcador de progresión bioquímica de PSA. A) Gráfica de cuantificación de PSA en células C4-2B AbiR con respecto a células wt. B) Western Blot de PSA y alfa tubulina en células C4-2B wt y C4-2B AbiR. C) Gráfica de cuantificación de PSA en células 22RV1 AbiR con respecto a células parentales. D) Western Blot PSA y alfa tubulina en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM de 4 réplicas independientes. Se evaluó la significancia mediante un test t-student con un n=3. * $p \leq 0.05$; n.s: no significativo ($p > 0.05$).

En resumen, los resultados indican que las células C4-2B y 22RV1 resistentes a la Abiraterona muestran un aumento en la expresión de marcadores asociados a la resistencia a terapias antiandrogénicas, como la Abiraterona, y presentan diferencias moleculares en comparación con las células wt.

8.3 Los ensayos de proliferación y muerte en tiempo real en células resistentes a Abiraterona de las líneas celulares C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR permiten la identificación de compuestos con actividad potencial contra el CRPC resistente a Abiraterona.

Una vez que las líneas celulares C4-2B AbiR y 22RV1 AbiR fueron validadas como modelos de CRPC resistente a la Abiraterona, se evaluó la actividad de varios compuestos con potencial para tratar este tipo de cáncer resistente. Estos compuestos fueron seleccionados basándose en evidencia previa de nuestro

laboratorio que demuestra su eficacia contra modelos celulares de CaP y CRPC, lo que los posiciona como candidatos prometedores para combatir el CRPC resistente a la Abiraterona. La evaluación de los compuestos se realizó mediante la metodología de análisis de proliferación y muerte en tiempo real, debido que esta permite obtener información de tiempos, muerte y proliferación en el tiempo, en contraste con la metodología de cristal violeta que solo permite un análisis de la supervivencia celular a un tiempo final.

Por un lado se evaluó la actividad de las moléculas L-butionina-(S, R) Sulfoximina e Imidazol Cetona Erastina en los modelos de CRPC AbiR generados, así como también en sus contrapartes wt.

Estos dos compuestos corresponden a inhibidores de la síntesis de glutatión, lo cual podría generar un mecanismo de muerte celular por acumulación de ROS, como se expuso anteriormente, además de la disminución de los niveles de AR. Brevemente, la L-butionina-(S,R)-Sulfoximina (BSO) es un aminoácido sintético análogo al glutamato que bloquea la síntesis de glutatión al inhibir a la enzima γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -GCL) (Griffith, 1982). Por otro lado, la Imidazol Cetona Erastina (IKE) desencadena la inanición de cisteína en la célula y, por consiguiente, la depleción de glutatión en la célula (Ferrada et al., 2023). Por esto, tanto BSO como IKE podrían tener una potencial actividad frente al CRPC resistente a la Abiraterona.

Las células C4-2B exhibieron una proliferación celular 50% menor en comparación con sus pares wt, frente a la máxima concentración de BSO (Figura 14A).

Paralelamente, las células 22RV1 AbiR presentaron mayor sensibilidad a BSO desde los 12,5 μ M hasta los 400 μ M, donde se observa una disminución en la proliferación celular desde un 10% a un 50%, respectivamente, en comparación con sus pares wt (Figura 15A).

En conjunto resultados derivados del análisis de proliferación en tiempo real mostraron que tanto las células C4-2B AbiR como 22RV1 AbiR disminuyeron la proliferación celular cerca de un 50% en comparación a sus pares wt, frente a la máxima concentración de BSO utilizada, mostrando mayor sensibilidad al fármaco a una dosis de 400 μ M y un tiempo total de tratamiento de 72 horas (Figuras 14B y 15B).

Por último, los resultados de muerte por análisis en tiempo real mostraron que a 50 μ M de BSO, no se observa muerte celular ni diferencias estadísticamente significativas en las líneas celulares C4-2B wt y C4-2B AbiR, desde 0 hasta 72 horas (Figura 14D). Por otro lado, es posible observar, que tanto las células 22RV1 wt, como 22RV1 AbiR presentan una muerte basal de un 30%, sin embargo, luego de 10 horas con el tratamiento, la muerte celular se mantiene sin variaciones estadísticamente significativas a todos los tiempos (Figura 15D).

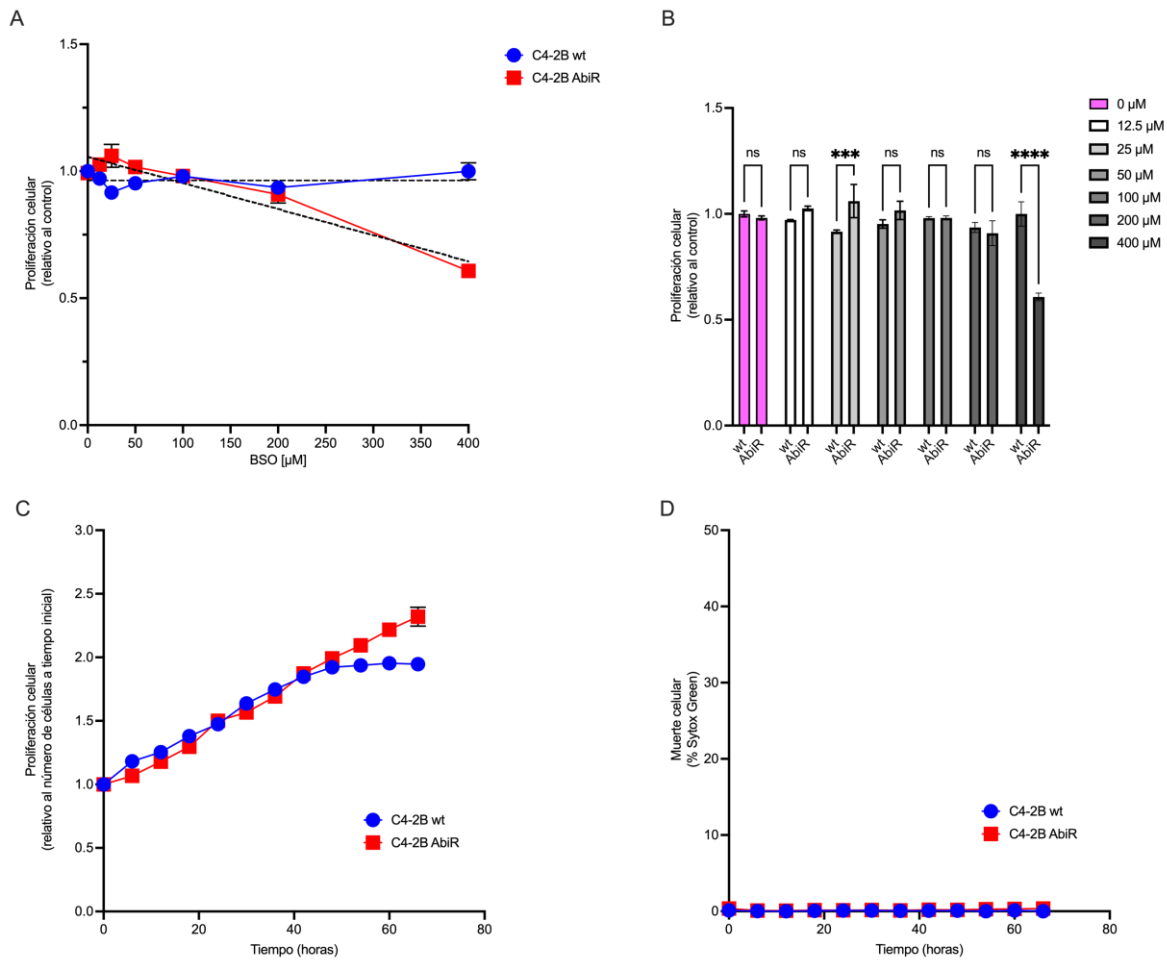


Figura 14. El tratamiento con BSO genera efectos diferenciales en células C4-2B wt y AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas, en líneas celulares C4-2B wt y C4-2B AbiR. (B) Proliferación celular en células C4-2B wt y AbiR, tratadas con concentraciones crecientes de BSO. (C) Proliferación celular en tiempo real en células C4-2B wt y C4-2B AbiR tratadas a 50 μM de BSO. (D) Muerte celular en tiempo real en células C4-2B wt y C4-2B AbiR tratadas con 50 μM de BSO. Prueba estadística *two way*

ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

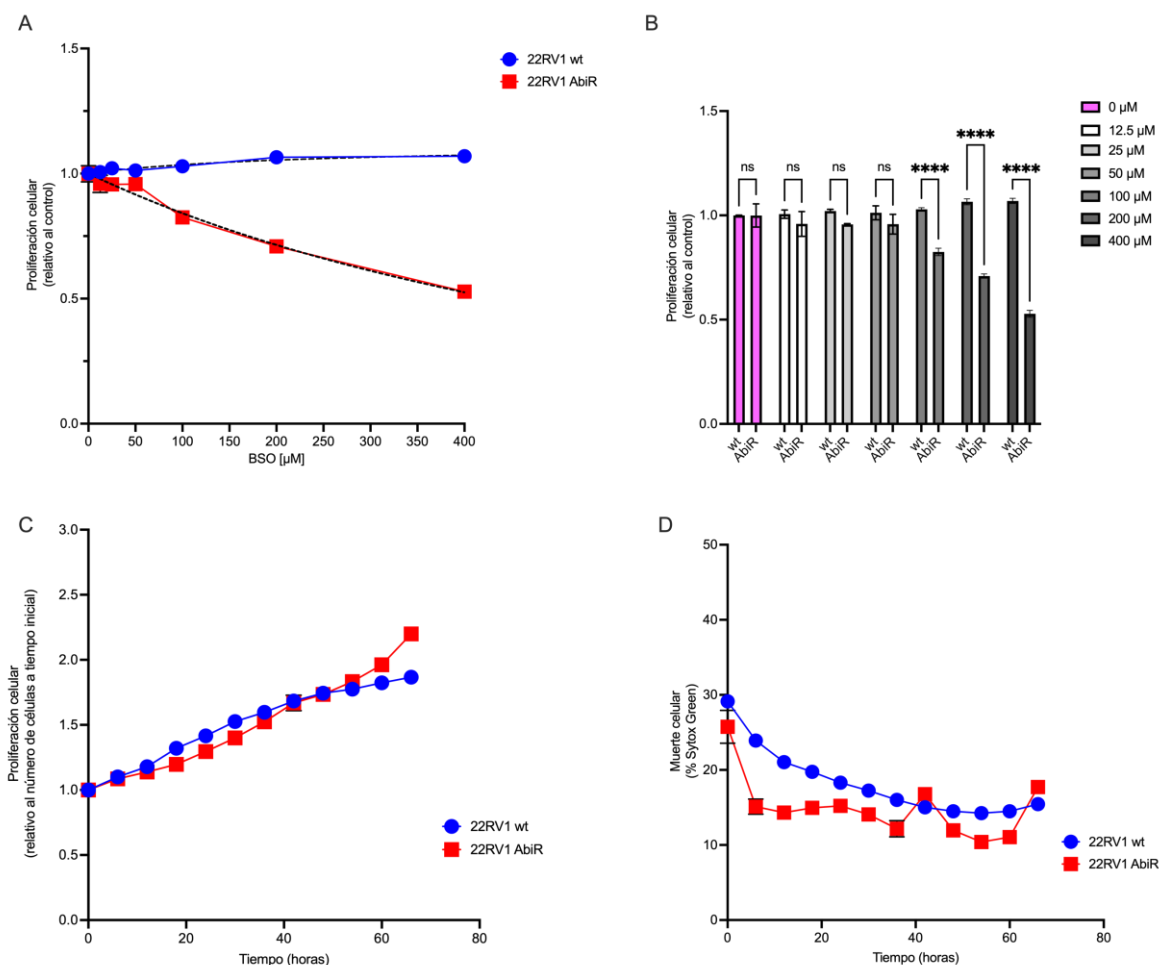


Figura 15. El tratamiento con BSO genera efectos diferenciales en células 22RV1 wt y AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas en líneas celulares 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. (B) Proliferación celular en células 22RV1 wt y AbiR, tratadas con concentraciones crecientes

de BSO. (C) Proliferación celular en tiempo real en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR, tratadas con 50 μ M de BSO. (D) Muerte celular en tiempo real en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR, tratadas con 50 μ M de BSO. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Por su parte, los tratamientos con IKE mostraron que tanto las células C4-2B AbiR, como 22RV1 AbiR presentaron una disminución en su proliferación celular, frente a sus pares wt, a la concentración máxima de IKE utilizada y un tiempo final de tratamiento de 72 horas. Dicha disminución en la proliferación corresponde a un 50% para ambas líneas celulares, presentando diferencias estadísticamente significativas en comparación con las células C4-2B wt y 22RV1 wt (Figuras 16A y 17A).

Particularmente, las células C4-2B AbiR presentaron una disminución en la proliferación celular al tiempo final de 72 horas, en comparación a las células C4-2B wt, a partir de los 10 μ M de IKE (Figura 16B). Análogamente, las células 22RV1 AbiR presentaron una disminución estadísticamente significativa de la proliferación respecto al control sin tratamiento de cerca de un 20%, también con un tiempo de tratamiento de 72 horas y una concentración de 10 μ M de IKE (Figura 17B).

Además, a una concentración de 5 μ M (IC_{25} para las líneas celulares AbiR), tanto las células C4-2B AbiR como 22RV1 AbiR presentaron una mayor proliferación

celular en comparación a las células wt, lo que podría indicar que las células AbiR poseen una tasa proliferativa superior a las células wt (Figuras 16C y 17C).

Los datos obtenidos desde los análisis de muerte celular mostraron que, al igual que en los tratamientos con 50 μ M de BSO, los tratamientos con 5 μ M de IKE no generaron muerte celular en las líneas celulares C4-2B wt y C4-2B AbiR. Por otro lado, tanto las células 22RV1 wt como 22RV1 AbiR presentan una muerte basal a tiempo 0 (20%), en las mismas condiciones descritas anteriormente, sin embargo, esta se mantiene prácticamente invariable hasta alcanzar las 72 horas de tratamiento (Figuras 16D y 17D).

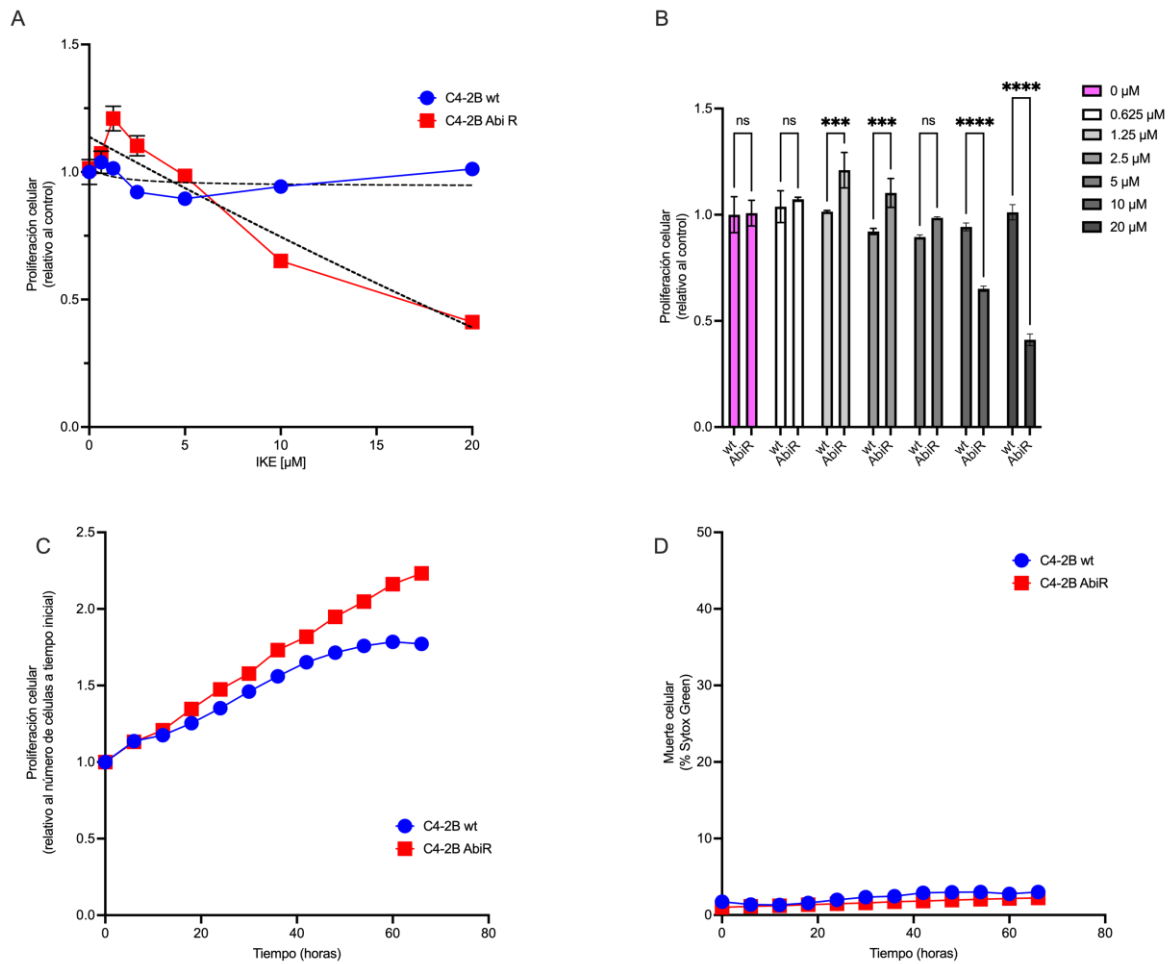


Figura 16. El tratamiento con IKE genera efectos diferenciales en células C4-2B wt y AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas en líneas celulares C4-2B wt y C4-2B AbiR. (B) Proliferación celular en células C4-2B wt y AbiR, tratadas con concentraciones crecientes de IKE. (C) Proliferación celular en tiempo real en células C4-2B wt y C4-2B AbiR tratadas con 5 μM de IKE. (D) Muerte celular en tiempo real en células C4-2B wt y C4-2B AbiR, tratadas con 5 μM de IKE. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Los resultados se muestran como

media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

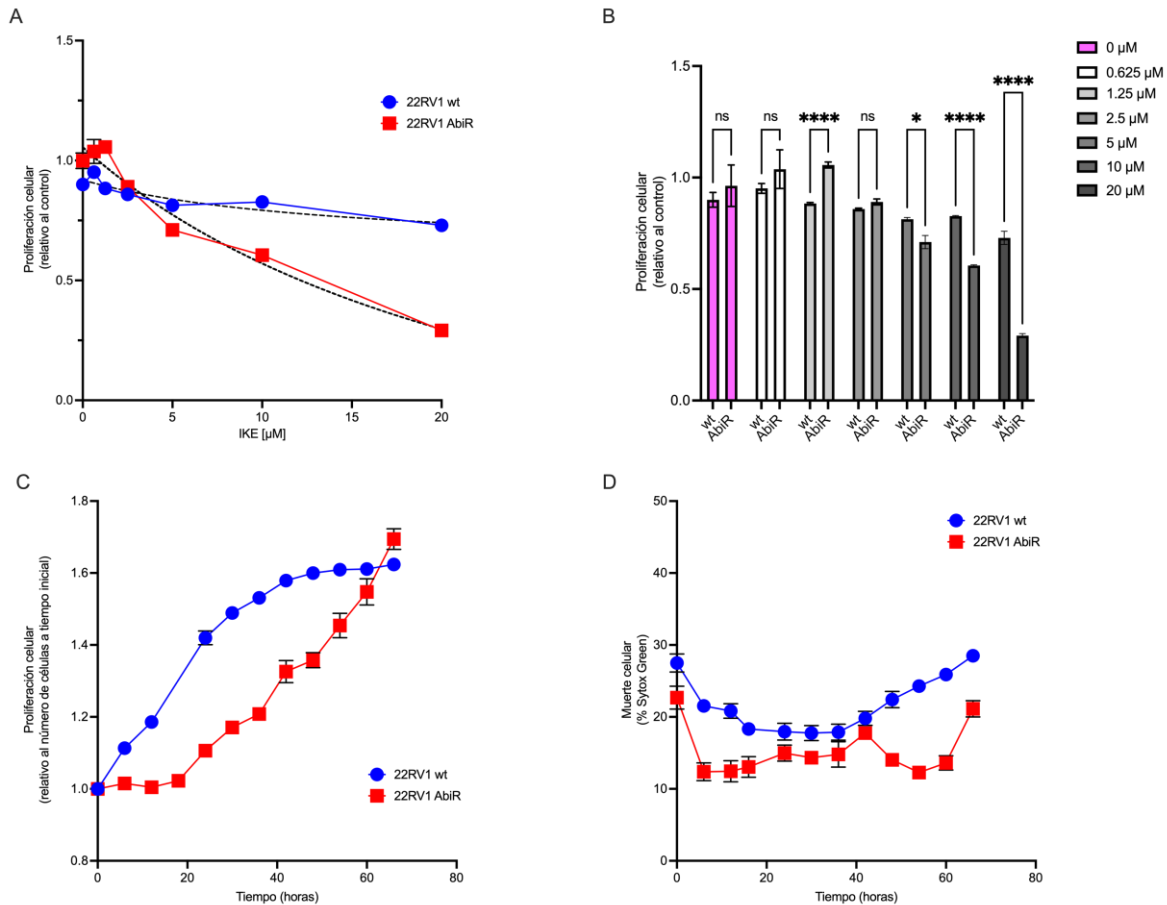


Figura 17. El tratamiento con IKE genera efectos diferenciales en células 22RV1 wt y AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas en líneas celulares 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. (B) Proliferación celular en células 22RV1 wt y AbiR, tratadas con concentraciones crecientes de IKE. (C) Proliferación celular en tiempo real en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR tratadas con 5 μM de IKE. (D) Muerte celular en tiempo real en células 22RV1

wt y 22RV1 AbiR tratadas con 5 μ M de IKE. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Luego de evaluar la acción de estas moléculas por sí solas frente a las células AbiR y sus pares wt, se propuso evaluar el co-tratamiento de estas moléculas en conjunto con Abiraterona, con el fin de emular el tratamiento clínico y su efecto frente a células de CRPC resistentes a Abiraterona.

El análisis de proliferación por microscopía en tiempo real mostró una disminución en la proliferación celular para las células C4-2B wt tratadas con 20 μ M de Abiraterona, al igual que los co-tratamientos con 20 μ M de Abiraterona y 50 μ M de BSO o 5 μ M de IKE. Estas disminuciones estadísticamente significativas a 72 horas de tratamiento constaron de valores cercanos al 50%, en comparación con el control sin tratamiento. Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular respecto al control a 72 horas para los tratamientos de 50 μ M de BSO o 5 μ M de IKE (Figuras 18A y B). Por otro lado, las células C4-2B AbiR no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación a tiempo final con respecto al control para ninguno de los tratamientos empleados, salvo el tratamiento de 20 μ M de Abiraterona en co-tratamiento con 50 μ M de BSO (Figuras 18C y D), lo cual podría mostrar un efecto sinérgico entre ambos fármacos en este modelo celular.

En conjunto, estos resultados muestran que las células de la línea celular C4-2B AbiR pierden sensibilidad frente al co-tratamiento de Abiraterona e IKE a concentraciones de 20 μ M y 5 μ M, respectivamente, a un tiempo final de 72 horas, en comparación con las células C4-2B wt. Por otro lado, las células C4-2B AbiR células mantienen la sensibilidad al co-tratamiento con 20 μ M de Abiraterona y 50 μ M de BSO a un tiempo final de 72 horas.

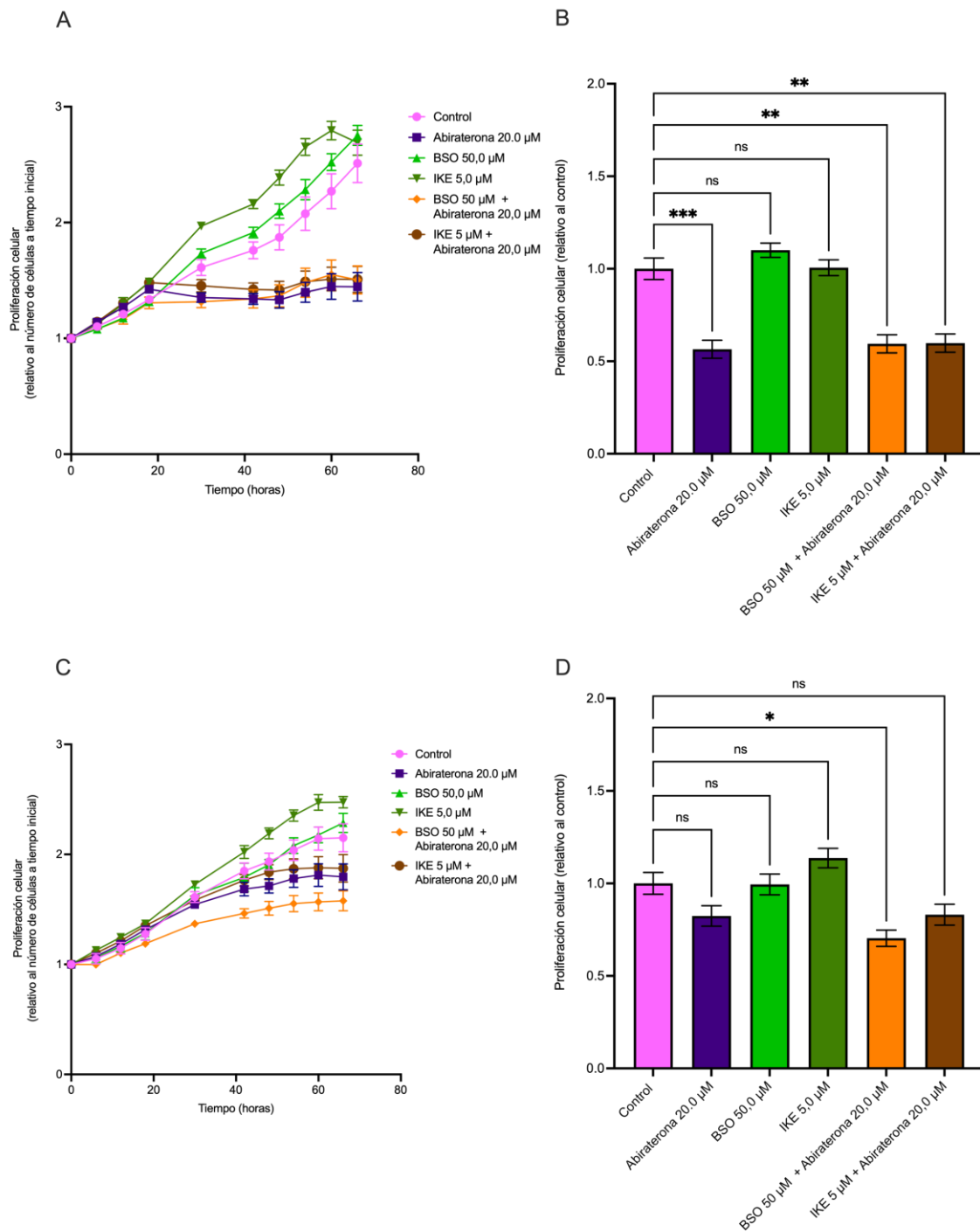


Figura 18. Los co-tratamientos de Abiraterona y BSO o

Abiraterona e IKE no generan disminución de la proliferación celular en la línea celular C4-2B AbiR. (A) Proliferación celular en tiempo real y (B) proliferación celular respecto al control sin tratamiento en células C4-2B wt tratadas con Abiraterona, BSO e IKE. (C) Proliferación celular en tiempo real y (D) proliferación celular respecto al control sin tratamiento en células C4-2B AbiR tratadas con Abiraterona, BSO e IKE. Prueba estadística *one way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Dunnet. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Por otro lado, las células de la línea celular 22RV1 wt exhibieron una disminución en la proliferación celular cercana al 50% frente a 10 μ M de Abiraterona, en comparación al control sin tratamiento. Además, se observó una disminución en la proliferación celular a un tiempo final de 72 horas, frente a los co-tratamientos de Abiraterona y BSO y Abiraterona e IKE, en las mismas condiciones expuestas anteriormente (Figuras 19A y B). Por otro lado, las células de la línea celular 22RV1 AbiR no mostraron sensibilidad al tratamiento de ninguno de los fármacos empleados por sí solos, lo cual se evidencia en que no existen diferencias estadísticamente significativas en la proliferación respecto al control sin tratamiento a un tiempo final de 72 horas. No obstante, las células 22RV1 AbiR disminuyeron la proliferación celular con respecto al control sin tratamiento al ser co-tratadas por 72 horas con Abiraterona e IKE, en concentraciones de 10 μ M y 5 μ M (Figuras 19C y

D), respectivamente, lo cual podría indicar un posible efecto sinérgico entre ambos fármacos.

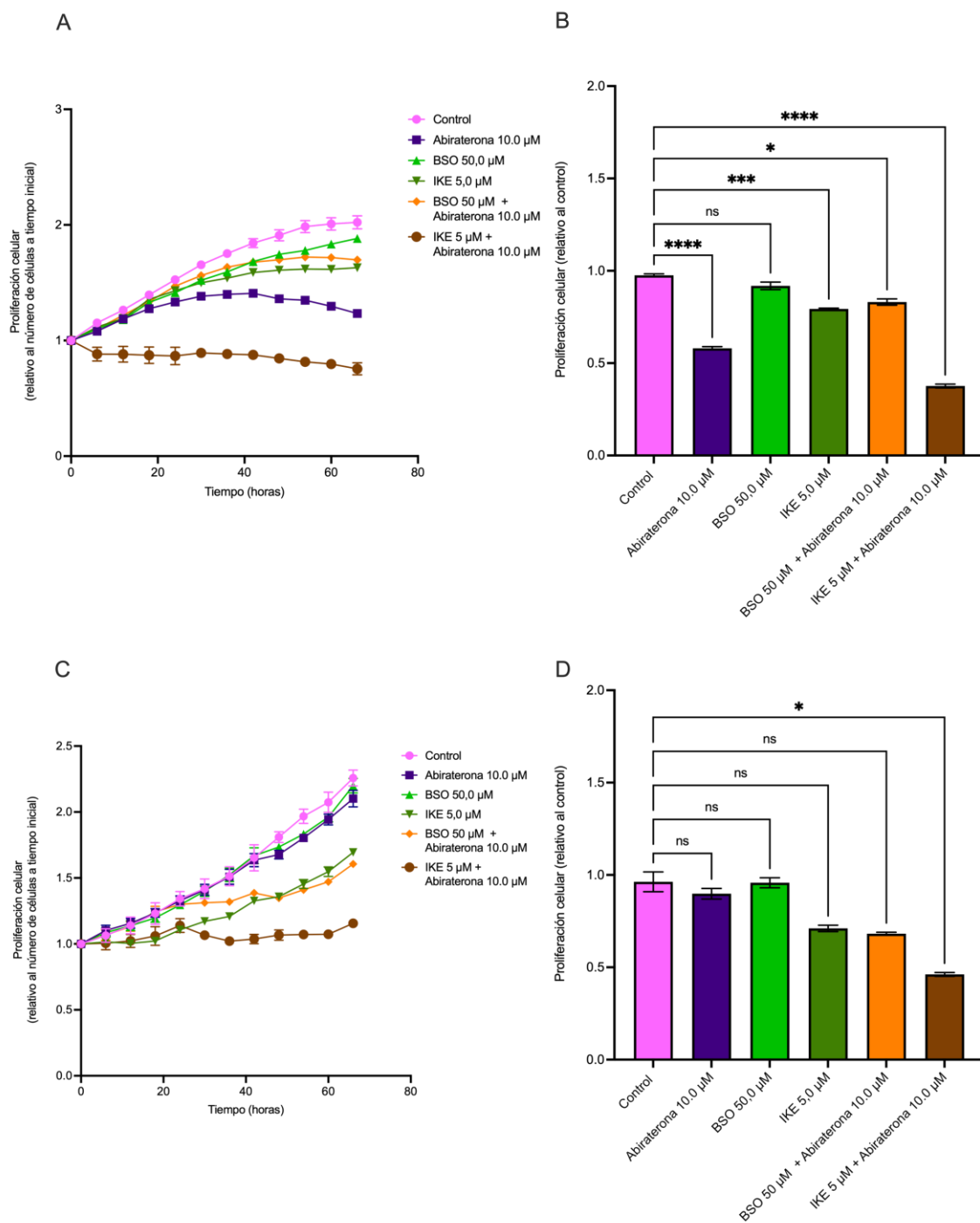


Figura 19. Las células 22RV1 AbiR disminuyen la proliferación celular frente al co-tratamiento de Abiraterona e IKE. (A)

Proliferación celular en tiempo real y (B) proliferación celular respecto al control sin tratamiento en células 22RV1 wt. (C) Proliferación celular en tiempo real y (D) proliferación celular respecto al control sin tratamiento en células 22RV1 AbiR. Prueba estadística *one way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Dunnet. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Los análisis de muerte celular en tiempo real mostraron que las células de la línea celular C4-2B wt presentaron un mayor porcentaje de muerte celular (16,4%) cuando fueron tratadas con una combinación de 20 μ M de Abiraterona y 5 μ M de IKE a un tiempo final de 72 horas. En cambio, el tratamiento con cada fármaco por separado no generó diferencias estadísticamente significativas en la muerte celular. Sin embargo, es importante destacar que el tratamiento con 5 μ M de IKE, aunque no significativo, aumentó la muerte celular en un 15,1% en comparación con el control sin tratamiento (Figuras 20 A y B), lo que sugiere que el incremento observado en el co-tratamiento con Abiraterona e IKE podría deberse principalmente al efecto del IKE. De manera similar, en la línea celular C4-2B AbiR no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la muerte celular al final del experimento para ninguno de los tratamientos aplicados. No obstante, se detectó un aumento en la muerte celular cuando las células fueron tratadas con una

combinación de 10 μ M de Abiraterona y 5 μ M de IKE (Figuras 20C y D).

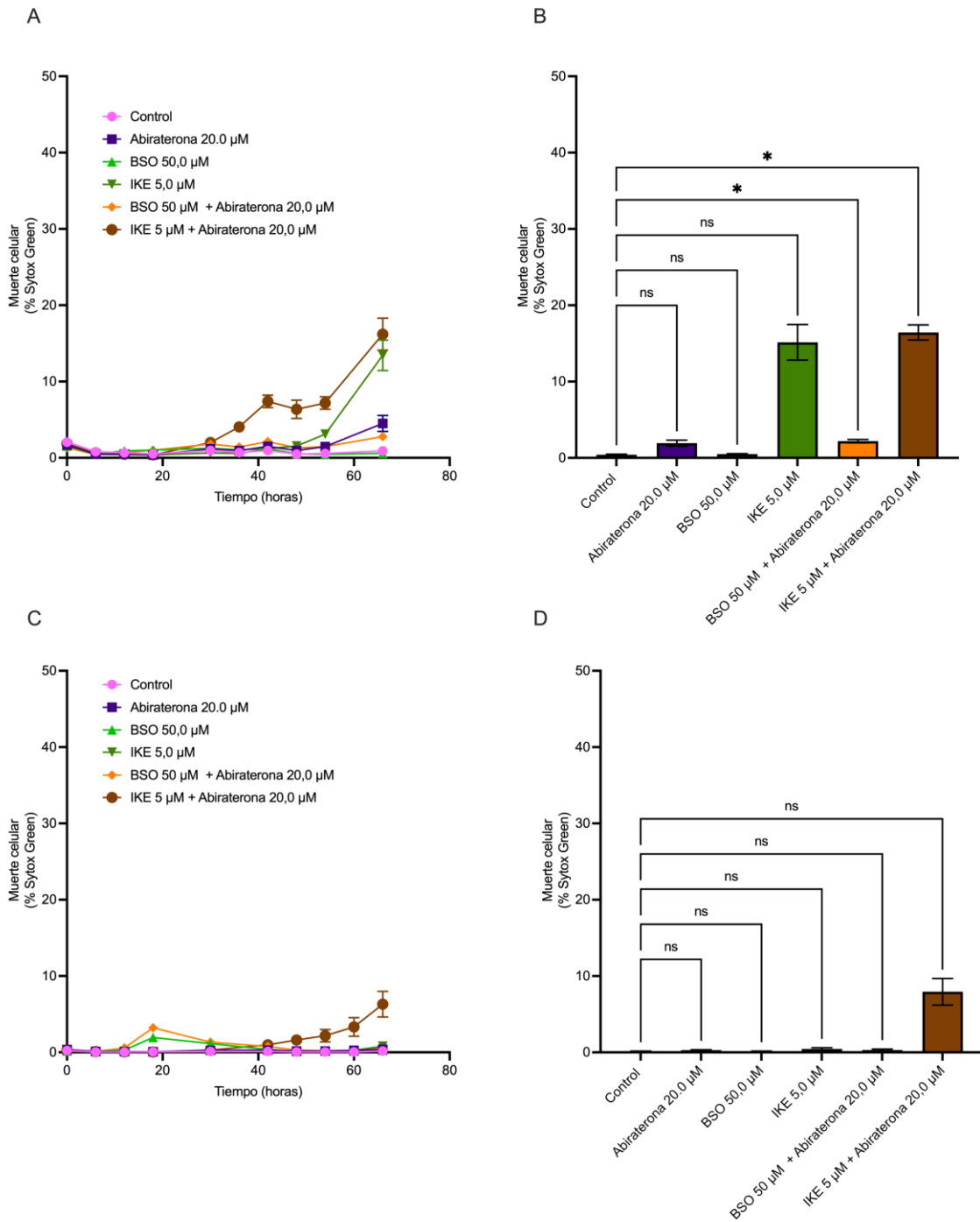


Figura 20. La muerte celular en células C4-2B AbiR no se ve alterada significativamente frente a los co-tratamientos de

Abiraterona y BSO o Abiraterona e IKE. (A) Muerte celular en tiempo real y (B) muerte celular respecto al control sin tratamiento en células C4-2B wt. (C) Muerte celular en tiempo real y (D) muerte celular respecto al control sin tratamiento en células C4-2B AbiR. Prueba estadística *one way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Dunnet. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

En los análisis de muerte celular en la línea celular 22RV1 wt, se registró una muerte basal del 19,1 % en el control sin tratamiento. Los tratamientos con Abiraterona, IKE, Abiraterona combinada con BSO y Abiraterona combinada con IKE mostraron un aumento estadísticamente significativo en la muerte celular, alcanzando un 41,7 %, 30,1 %, 35,7 % y 82,9 %, respectivamente (Figuras 21A y B). En cambio, el tratamiento con BSO no produjo un incremento significativo en comparación con el control. Por otro lado, en la línea celular 22RV1 AbiR, se observó una muerte celular basal del 12%, y solo el tratamiento combinado de Abiraterona y BSO logró un aumento significativo en la muerte celular, alcanzando un 37,8%. Sin embargo, este efecto fue menor en comparación con el observado en las células 22RV1 wt (Figuras 21 C y D)

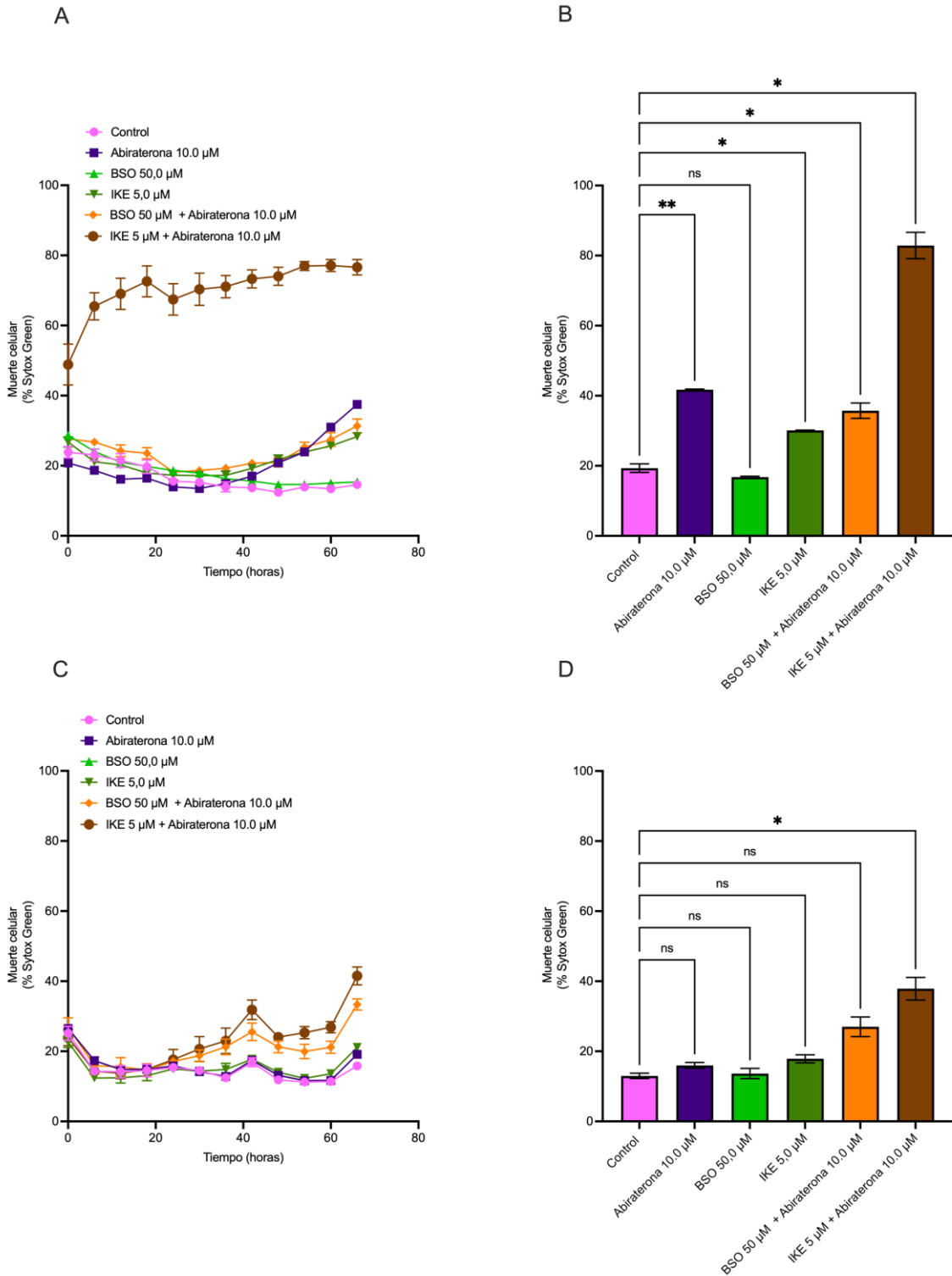


Figura 21. Las células 22RV1 aumentan la muerte celular cuando son co-tratadas con Abiraterona. e IKE. (A) Muerte celular en tiempo

real y (B) muerte celular respecto al control sin tratamiento en células 22RV1 wt. (C) Muerte celular en tiempo real y (D) muerte celular respecto al control sin tratamiento en células 22RV1 AbiR. Prueba estadística *one way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Dunnet. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

PI3K/AKT/mTOR corresponde a una vía de señalización que cobra importancia en cáncer al estar involucrada en procesos de supervivencia y proliferación celular (Franke et al., 2003; Samakova et al., 2019). Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la vía AKT se activa al tratar líneas celulares de CRPC con lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL). Sin embargo, los mismos resultados muestran que la Quercetina previene esta activación inducida por oxLDL en las mismas líneas celulares (Duprat et al., 2023). Debido a estos hallazgos es que se propone que Quercetina podría tener efectos en la proliferación y muerte celular inducida por activación de AKT en células de CRPC resistentes a Abiraterona.

Los análisis de proliferación celular en tiempo real muestran que la Quercetina reduce significativamente la proliferación de las células C4-2B AbiR a una concentración de 3,13 μM , en comparación con las células C4-2B wt, lo que sugiere que las células AbiR son más sensibles a la Quercetina que las células

wt. Esta diferencia en la sensibilidad también se mantiene a concentraciones de 6,25 μ M y 12,5 μ M (Figura 22A y B).

Es importante destacar que a una concentración de 25 μ M de Quercetina, tanto las células wt como AbiR experimentan una disminución en la proliferación celular después de 72 horas, sin que se observe un efecto diferencial entre ambas líneas celulares en ninguno de los tiempos analizados (Figura 22C).

Los análisis de muerte celular en tiempo real revelan que las células C4-2B AbiR presentan una muerte basal cuando son tratadas con 25 μ M de Quercetina desde el inicio del tratamiento (tiempo 0), y este efecto se mantiene constante hasta aproximadamente las 40 horas de tratamiento. En cambio, las células C4-2B wt no mostraron diferencias en la muerte celular en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 22D). Estos hallazgos refuerzan la idea de una sensibilidad diferencial a la Quercetina entre las células C4-2B wt y C4-2B AbiR.

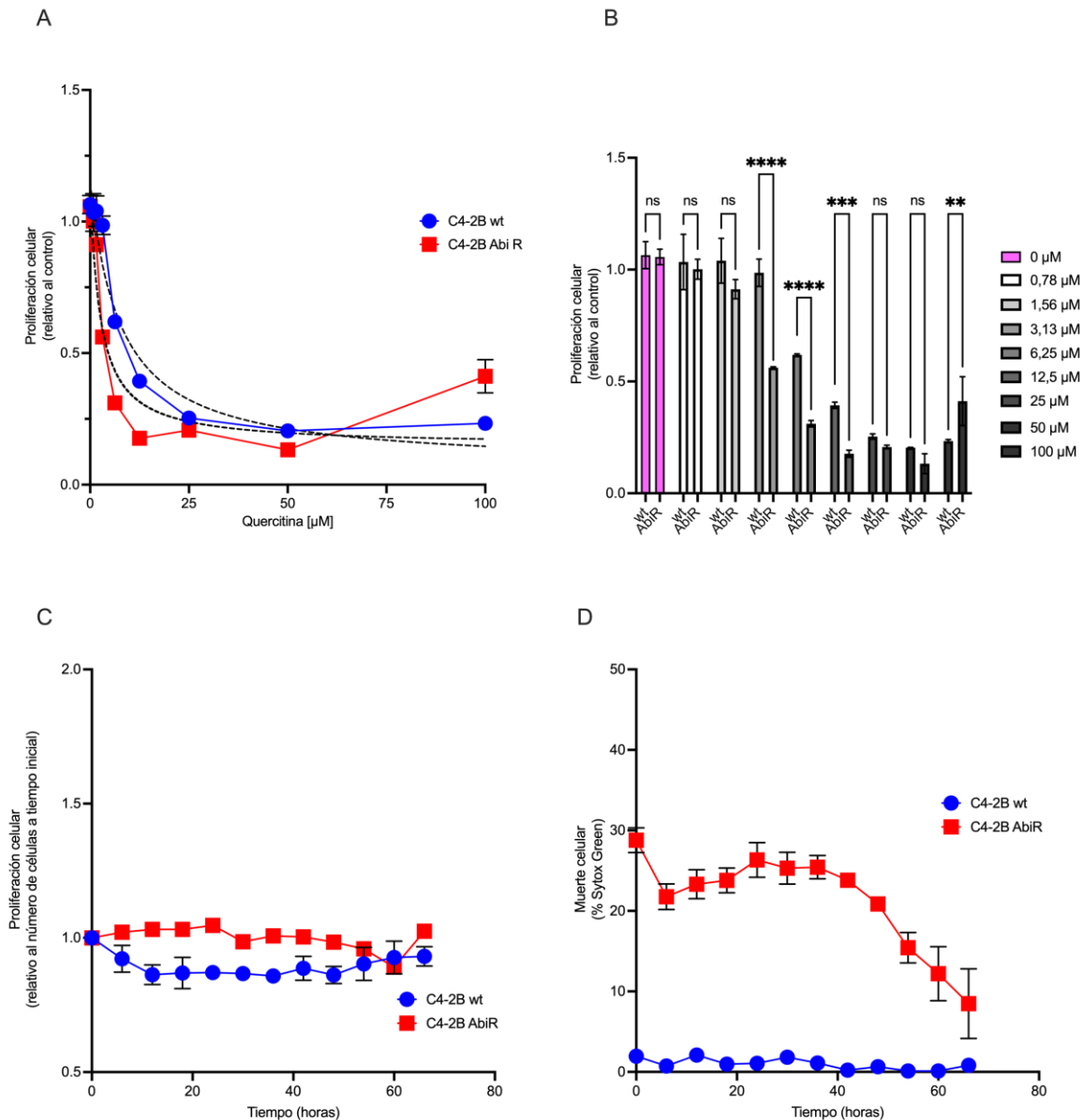


Figura 22. El tratamiento con Quercetina genera efectos diferenciales en la proliferación celular de células C4-2B wt y AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas en líneas celulares C4-2B wt y C4-2B AbiR. (B) Proliferación celular en células C4-2B wt y AbiR, tratadas con concentraciones crecientes de Quercetina. (C)

Proliferación celular en tiempo real en células C4-2B wt y C4-2B AbiR tratadas con 25 μ M de Quercetina. (D) Muerte celular en tiempo real en células C4-2B wt y C4-2B AbiR tratadas con 25 μ M de Quercetina. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Tanto las células 22RV1 wt como las 22RV1 AbiR muestran una disminución en la proliferación celular cuando se tratan con Quercetina a partir de una concentración de 6,25 μ M; sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambas líneas celulares a tiempo final para ninguna de las concentraciones (Figura 23A y B) ni a todos los tiempos para una concentración fija de 25 μ M de Quercetina.

En cuanto a los análisis de muerte celular, se observa que las células 22RV1 wt presentan una muerte basal del 50% a tiempo 0, pero este valor disminuye con el tiempo (Figura 23D). Esto sugiere un proceso de degradación del ADN debido a la pérdida completa de la integridad celular, lo que impide la fluorescencia de la sonda SYTOX green utilizada en estos análisis. Estos resultados apuntan a un efecto diferencial de la Quercetina entre las células AbiR y wt, donde las células AbiR son significativamente más sensibles a la Quercetina en comparación con las células wt.

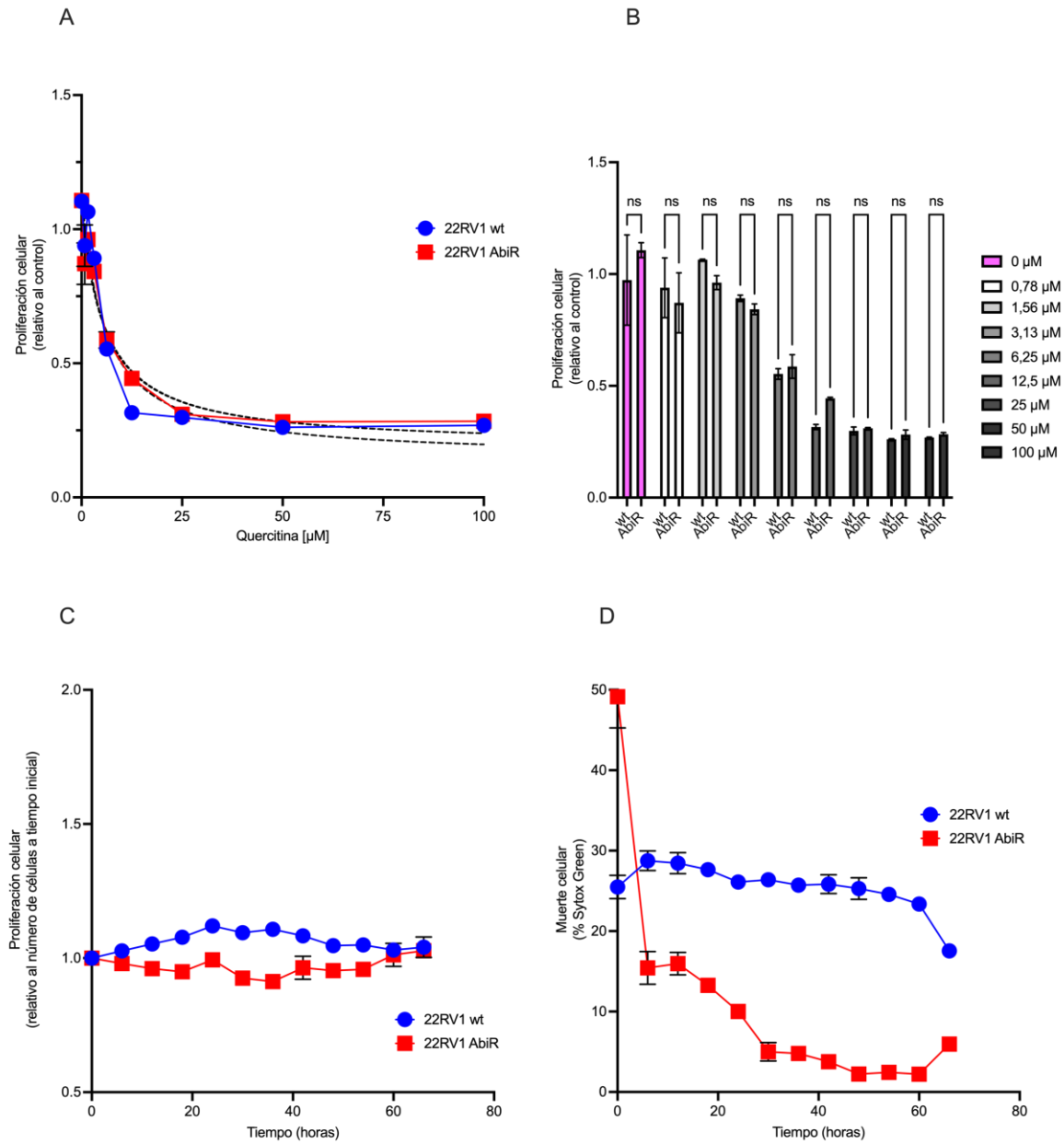


Figura 23. El tratamiento con Quercetina genera efectos diferenciales en la proliferación celular de células 22RV1 wt y AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas en líneas celulares 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. (B) Proliferación celular en células 22RV1

wt y AbiR, tratadas con concentraciones crecientes de Quercetina. (C) Proliferación celular en tiempo real en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR tratadas con 25 μ M de Quercetina. (D) Muerte celular en tiempo real en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR tratadas 25 μ M de Quercetina. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

En la misma línea de la importancia que cobra la vía AKT/mTOR, es que se evaluó la acción del inhibidor de AKT, KU-0063794 (IAKT), el cual ha sido previamente evaluado en otros modelos celulares de cáncer, donde se ha demostrado su efecto y modulación de la proliferación celular.

Los análisis de proliferación celular en tiempo real mostraron una respuesta diferencial entre las células C4-2B wt y C4-2B AbiR cuando se trataron con concentraciones de IAKT que oscilaron entre 0,78 η M y 6,25 η M. En este rango, se observaron diferencias en la proliferación celular con respecto al control sin tratamiento, con una reducción del 30% y 50% para las respectivas concentraciones de IAKT (Figura 24A y B). Además, las curvas de proliferación celular a lo largo del tiempo, frente a 6,25 η M de IAKT, mostraron un menor crecimiento en las células C4-2B AbiR en comparación con las células C4-2B wt a partir de aproximadamente 40 horas de tratamiento (Figura 24C). Estos resultados sugieren que las células C4-

2B AbiR son más sensibles al IAKT en comparación con las células wt, bajo las mismas condiciones de tratamiento.

No se observó muerte celular estadísticamente significativa frente al control, ni diferencias entre las dos líneas celulares para los tratamientos con 6,25 η M de IAKT (Figura 24D).

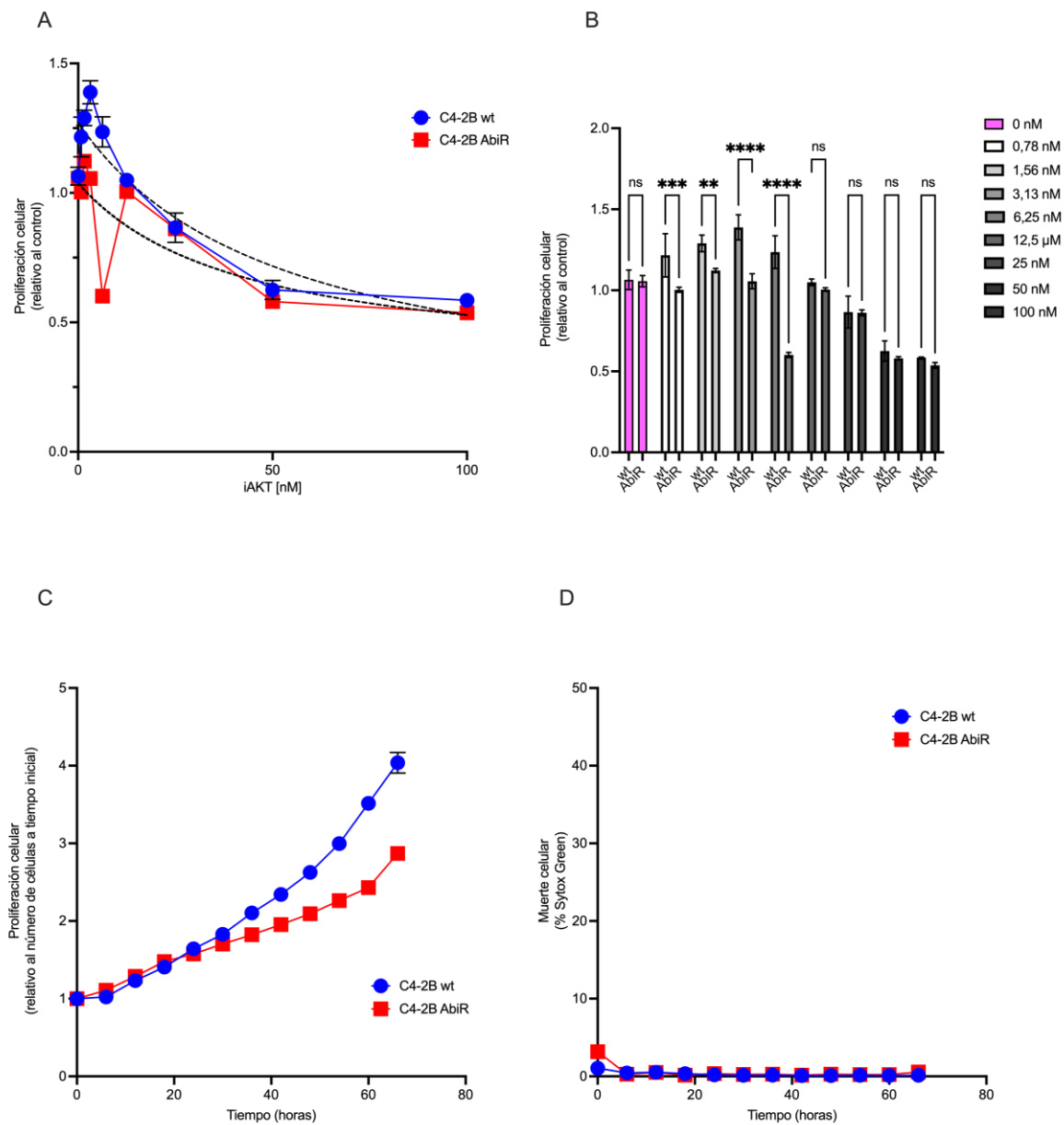


Figura 24. El tratamiento con IAKT genera efectos diferenciales en la proliferación de células C4-2B wt y AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas en líneas celulares C4-2B wt y C4-2B AbiR. **(B)** Proliferación celular en células C4-2B wt y AbiR, tratadas con concentraciones crecientes de KU-0063794. **(C)** Proliferación celular en

tiempo real en células C4-2B wt y C4-2B AbiR tratadas con 6,25 η M de IAKT.

(D) Muerte celular en tiempo real en células C4-2B wt y C4-2B AbiR tratadas con 6,25 η M de IAKT. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

De manera similar, el análisis de proliferación celular mostró efectos diferenciales en la proliferación relativa al control a las 72 horas solo a concentraciones de 3,13 η M (10%) y 100 η M (16%) entre las líneas celulares 22RV1 wt y 22RV1 AbiR (Figura 24A y B). Es importante destacar que, al igual que en las células C4-2B, se observaron diferencias a 6,25 η M de tratamiento, lo cual concuerda con los análisis de proliferación a lo largo de todos los tiempos desde el inicio del experimento. Sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 24C).

Asimismo, al tratar las células con 6,25 η M de IAKT, no se observaron diferencias en la muerte celular en tiempo real, al igual que en el caso de las células C4-2B (Figura 24D).

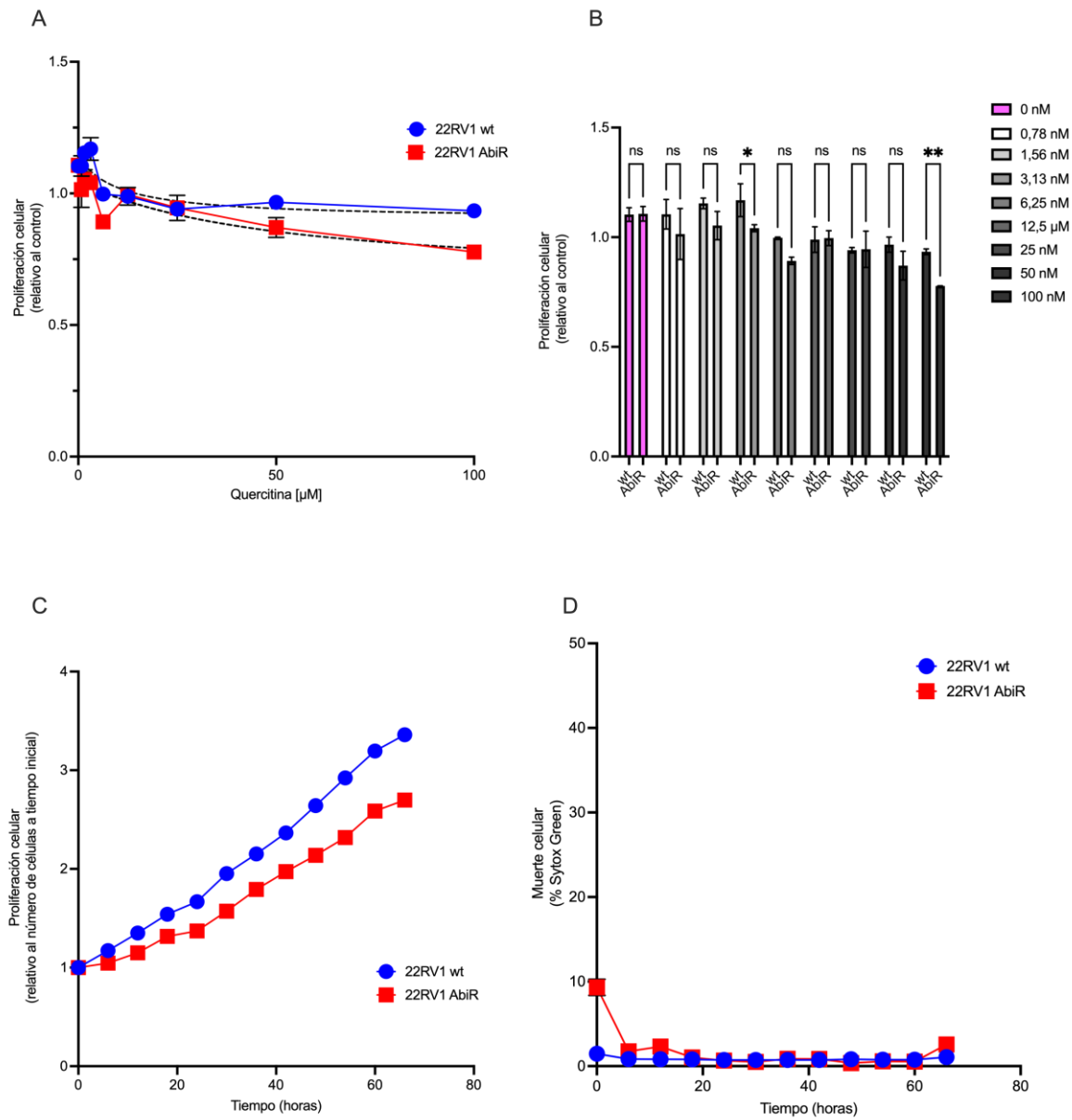


Figura 25. El tratamiento con IAKT genera efectos diferenciales en la proliferación de células 22RV1 wt y AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta a tiempo final de 72 horas, por análisis de proliferación en tiempo real, en líneas celulares 22RV1 wt y 22RV1 AbiR. (B) Proliferación celular en células 22RV1 wt y AbiR, tratadas con concentraciones crecientes

de IAKT. (C) Proliferación celular en tiempo real en células 22RV1 wt y 22RV1 AbiR, frente a 6,25 η M de IAKT. (D) Muerte celular en tiempo real en células 22RV1 wt y 22RV1AbiR, frente a 6,25 η M de IAKT. Prueba estadística *two way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Šidák. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Al igual que con los inhibidores de la síntesis de GSH, una vez evaluada la acción individual de estas dos moléculas, Quercetina e IAKT, frente a las líneas celulares wt y AbiR, se procedió a evaluar su efecto en combinación con Abiraterona.

Los resultados muestran que tanto las células C4-2B wt muestran una disminución en la proliferación celular a 72 horas cuando son tratadas con 20 μ M en conjunto con 6,25 η M de IAKT o 25 μ M de Quercetina, sin embargo, no se observan efectos diferenciales con respecto al tratamiento con Abiraterona por sí sola. En todos los casos, se observa una disminución en la proliferación celular cercana al 75% (Figura 26A y B).

Por otro lado, las células C4-2B AbiR, mostraron una disminución en la proliferación celular del 32%, diferencia estadísticamente significativa, mientras que el tratamiento con Abiraterona en conjunto con IAKT y Quercetina generó una disminución en la proliferación celular estadísticamente significativa del 79,2% para ambos casos (Figura 26C y D), lo cual podría ser indicativo que la inhibición de AKT

por IAKT o Quercetina puede restaurar el efecto de la Abiraterona en células resistentes a esa droga.

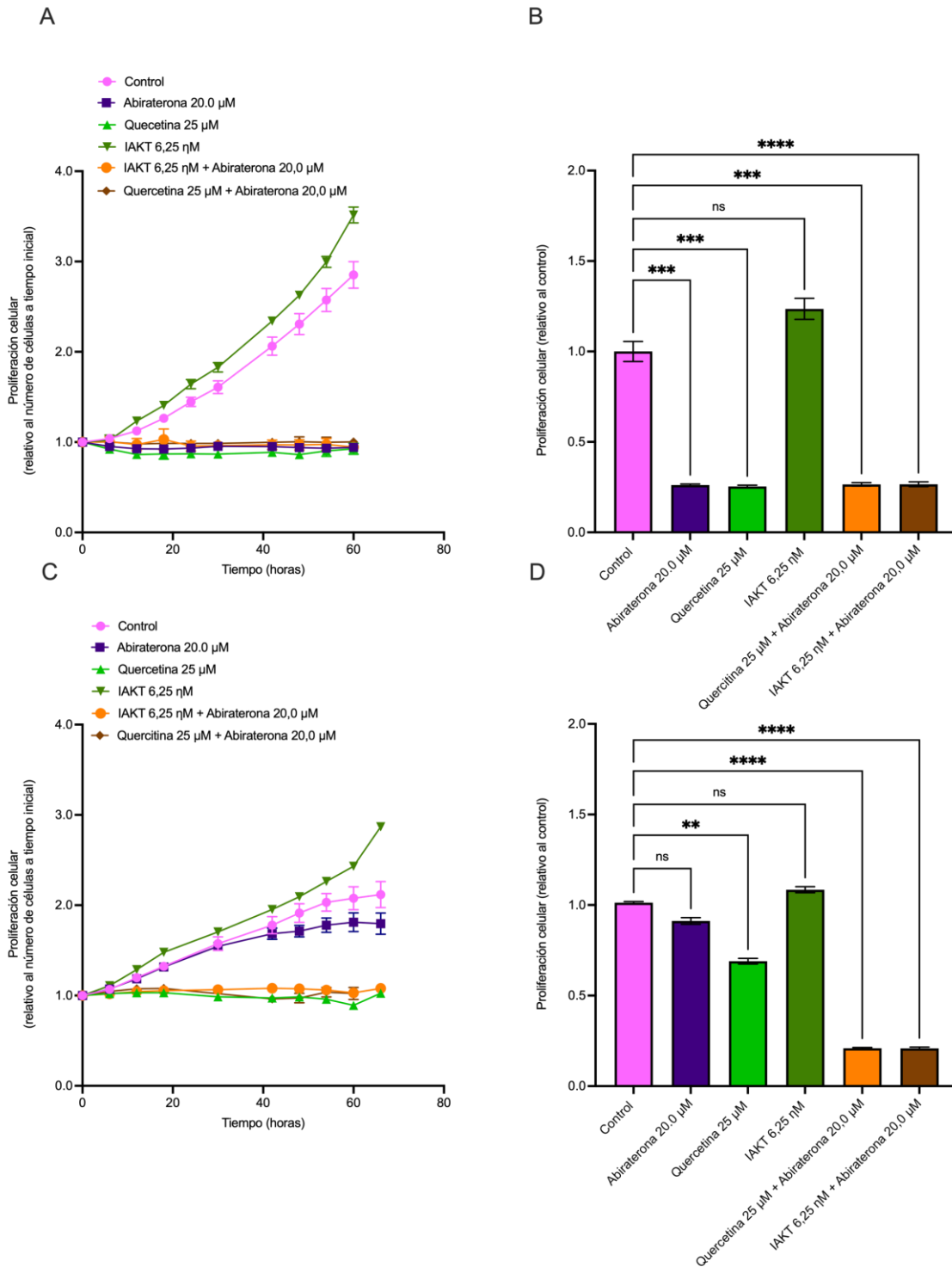


Figura 26. Las células C4-2B AbiR disminuyen la proliferación celular cuando son co-tratadas con Quercetina o IAKT y

Abiraterona. (A) Proliferación celular en tiempo real y (B) proliferación celular respecto al control sin tratamiento en células C4-2B wt. (C) Proliferación celular en tiempo real y (D) proliferación celular respecto al control sin tratamiento en células C4-2B AbiR. Prueba estadística one way ANOVA con comparaciones múltiples por test Dunnet. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

En cuanto a la muerte celular, los resultados indican que las células C4-2B wt presentan un aumento en la muerte celular al final del experimento en comparación con el control sin tratamiento cuando se les administra IAKT o Quercetina en combinación con Abiraterona. Sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (Figura 27A y B).

Por otro lado, las células AbiR muestran un aumento significativo en la muerte celular en comparación con el control sin tratamiento cuando se les trata con Quercetina o IAKT, alcanzando valores de 22,5% y 16,8%, respectivamente (Figura 27C y D).

En conjunto, estos datos sugieren que tanto las células C4-2B wt como las AbiR se sensibilizan a la Abiraterona cuando se combinan con un inhibidor de AKT, lo que resalta la importancia de esta vía en la resistencia a la Abiraterona

en el CRPC. Este mecanismo podría ser un posible foco terapéutico que debería explorarse en estudios futuros.

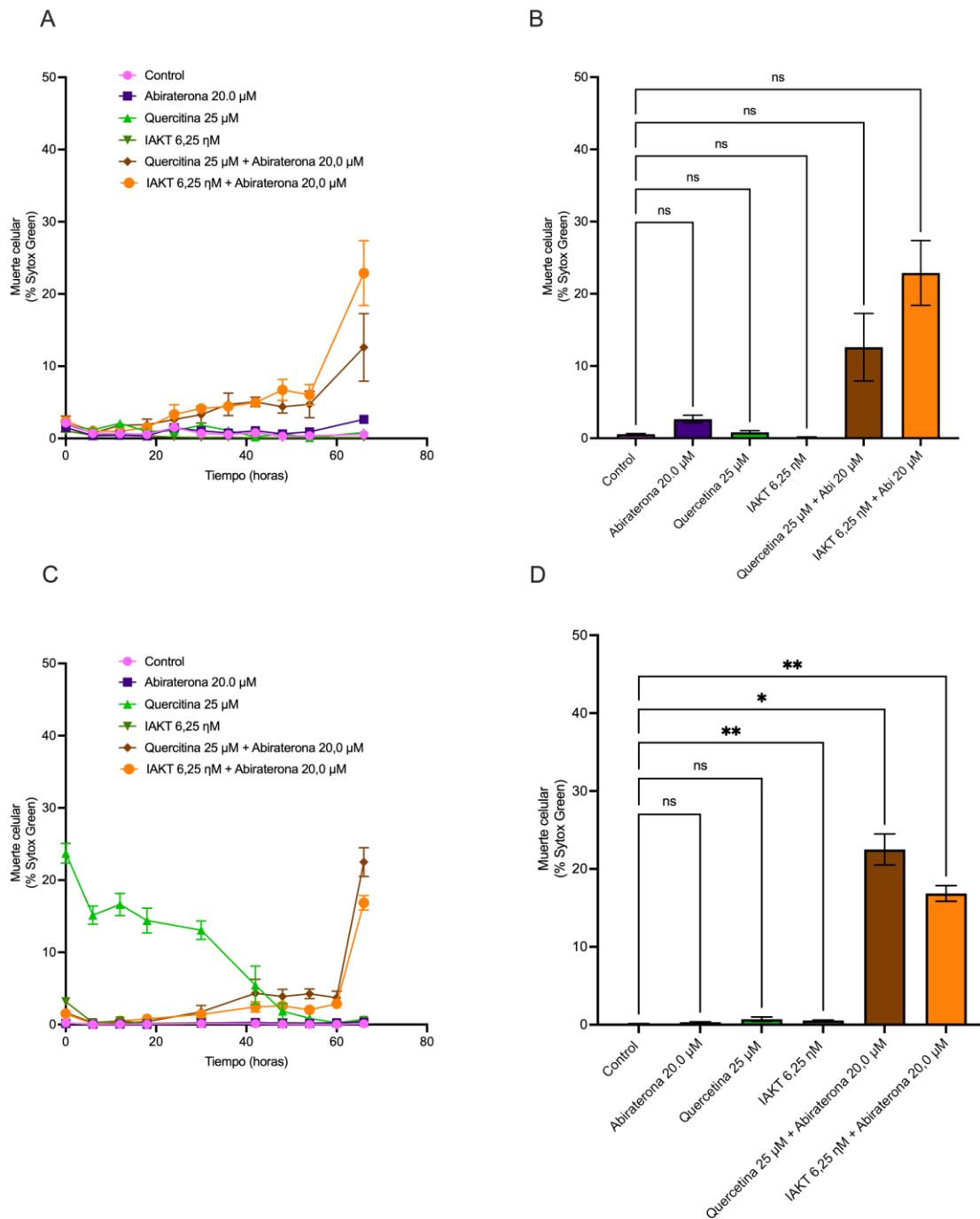


Figura 27. Los co-tratamientos de Quercetina o IAKT y Abiraterona generan aumento de la muerte celular en células C4-

2B AbiR. (A) Muerte celular en tiempo real y (B) muerte celular respecto al control sin tratamiento en células C4-2B wt. (C) Muerte celular en tiempo real y (D) muerte celular respecto al control sin tratamiento en células C4-2B AbiR. Prueba estadística *one way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Dunnet. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Paralelamente, las células de la línea 22RV1 wt no mostraron diferencias significativas en comparación con el control sin tratamiento. Sin embargo, se observó que tanto el tratamiento con Quercetina como con Abiraterona disminuyeron la proliferación celular después de 72 horas (Figura 28A y B). Por otro lado, las células 22RV1 AbiR experimentaron una reducción en la proliferación celular en comparación con el control cuando fueron tratadas con Quercetina, Quercetina en combinación con Abiraterona, e IAKT con Abiraterona (Figura 28C y D). Nuestros resultados sugieren que las células 22RV1 AbiR se sensibilizan a la Abiraterona cuando se combinan con un inhibidor de AKT, similar a lo observado en las células C4-2B AbiR.

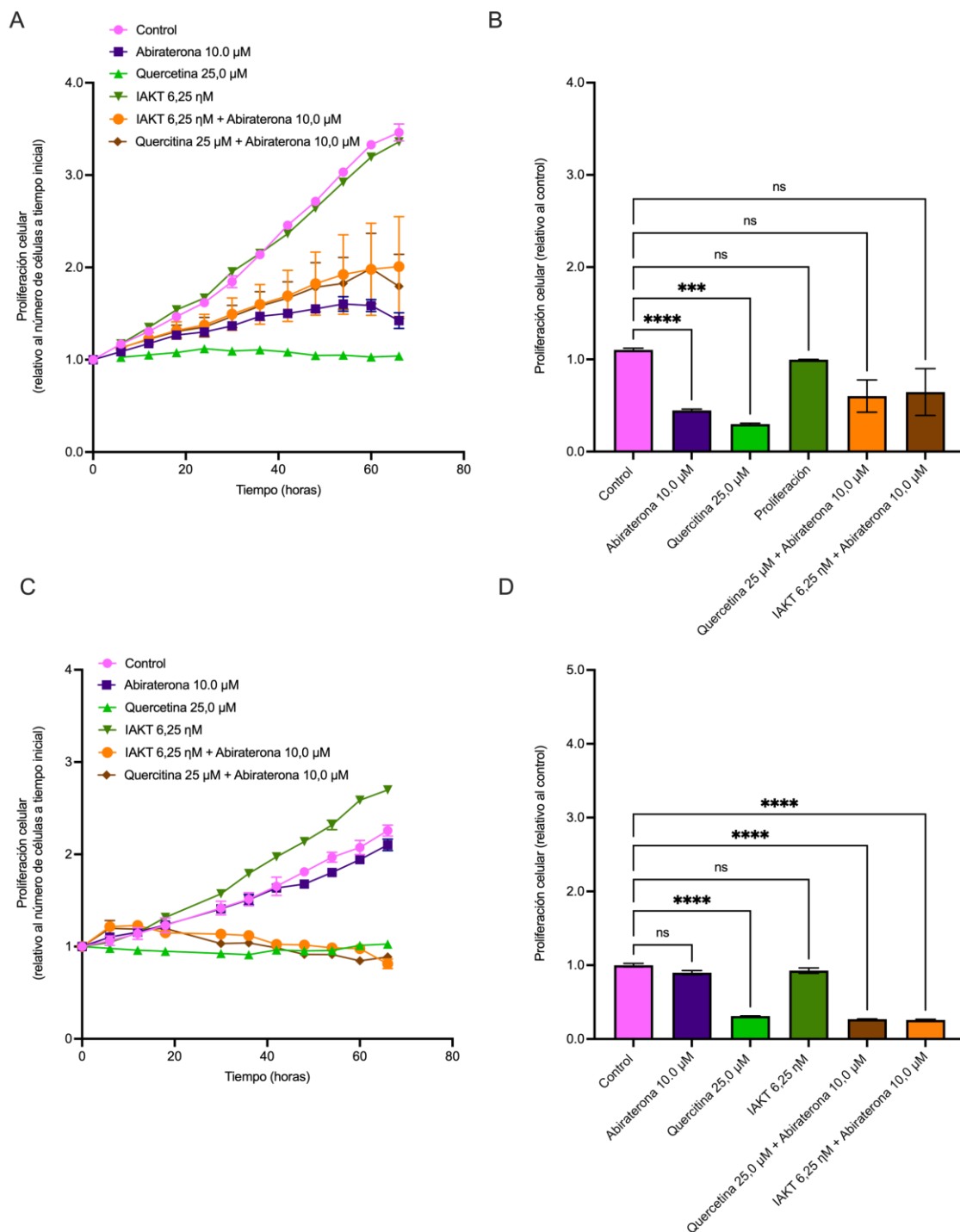


Figura 28. Las células 22RV1 AbiR disminuyen la proliferación celular cuando son co-tratadas con Quercetina o IAKT y

Abiraterona. (A) Proliferación celular en tiempo real y (B) proliferación celular respecto al control sin tratamiento en células 22RV1 wt. (C) Proliferación celular en tiempo real y (D) proliferación celular respecto al control sin tratamiento en células 22RV1 AbiR. Prueba estadística *one way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Dunnet. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Por último, los análisis de muerte celular en tiempo real mostraron que las células 22RV1 wt, al igual que en ensayos anteriores, presentan una muerte basal cercana al 20%. De manera interesante, esta muerte basal en el tiempo 0 se reduce cuando las células son tratadas con IAKT en combinación con Abiraterona o con Quercetina, aunque estas reducciones se acercan al 0%, lo cual se considera ruido instrumental (Figura 29A y B). Paralelamente, las células 22RV1 AbiR no mostraron un aumento en la muerte celular en respuesta a ninguno de los tratamientos. Estos resultados indican que, aunque la combinación de Abiraterona con IAKT o Quercetina previene la proliferación celular, no induce muerte celular, lo que sugiere que estos tratamientos pueden considerarse citostáticos (Figura 29C y D).

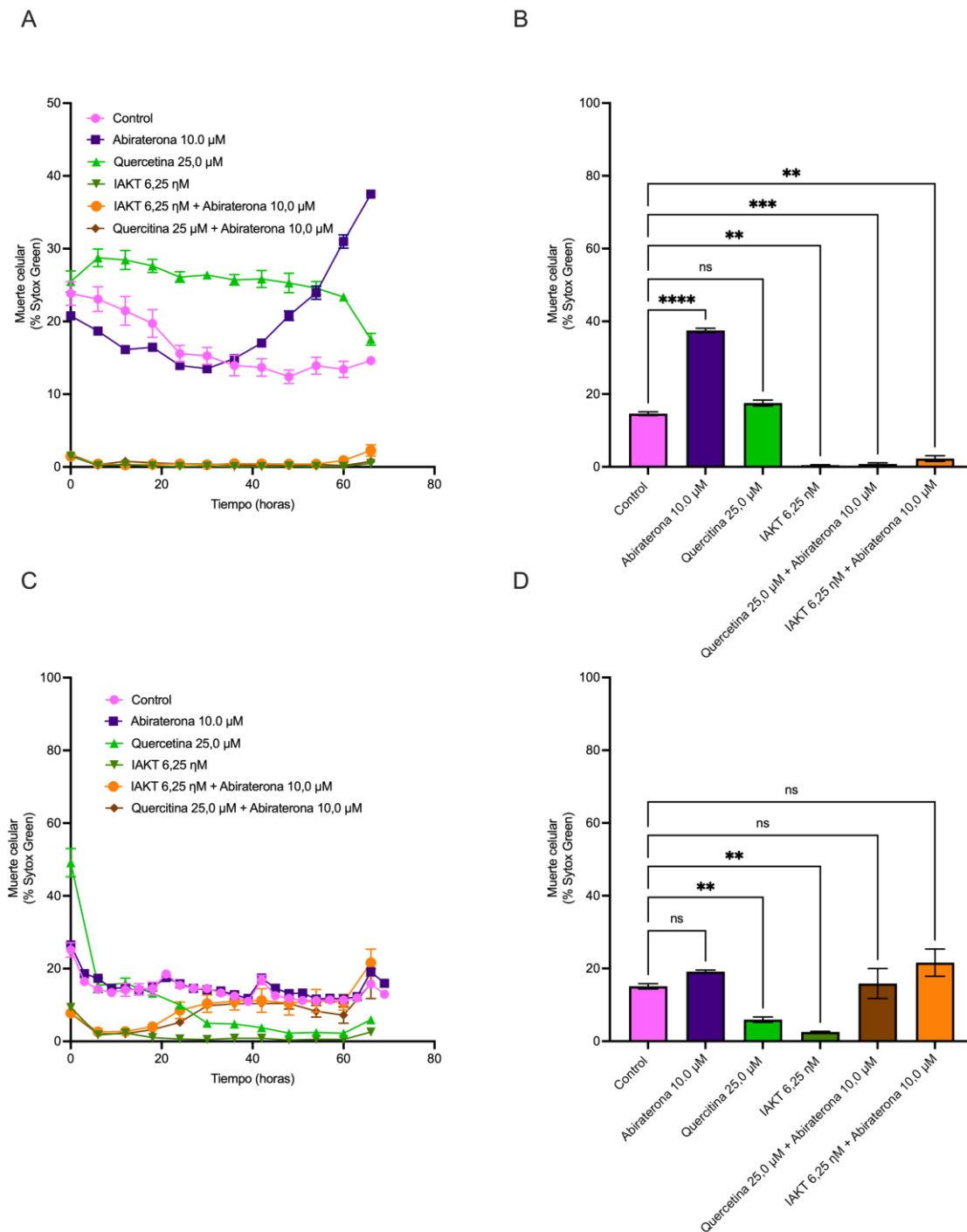


Figura 29. Los co-tratamientos con Quercetina o IAKT y Abiraterona no generan cambios significativos en la muerte

celular de células 22RV1 AbiR. (A) Muerte celular en tiempo real y (B) muerte celular respecto al control sin tratamiento en células 22RV1 wt. (C) Muerte celular en tiempo real y (D) muerte celular respecto al control sin tratamiento en células 22RV1AbiR. Prueba estadística *one way* ANOVA con comparaciones múltiples por test Dunnet. Los resultados se muestran como media de 3 réplicas independientes y las barras de error representan error estándar (SEM). (**** $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$, ns: diferencia estadística no significativa).

Finalmente, las células de todas las líneas fueron sometidas a ensayos de citotoxicidad frente a la toxina de pez sapo (*T. maculosa*) codificada como AV-3. Esta toxina produce una lesión caracterizada por una migración retardada de neutrófilos, producción de citoquinas proinflamatorias importantes y necrosis en el sitio de la herida, así como una respuesta inmune sistémica específica (Lopes-Ferreira et al., 2022). Esta toxina se compone de un conjunto de moléculas que presentan actividad proinflamatoria a través de la activación de p38 y Nf- κ B (datos no publicados).

El tratamiento de las células C4-2B wt y AbiR no exhibió disminución en la proliferación celular exceptuando a 0,02 mg/mL, donde es posible observar que la proliferación de las células C4-2B AbiR disminuye en un 25% con respecto al control sin tratamiento, sin embargo, no se observan efectos significativamente diferenciales con respecto a las células wt (Figura 30A, B y C).

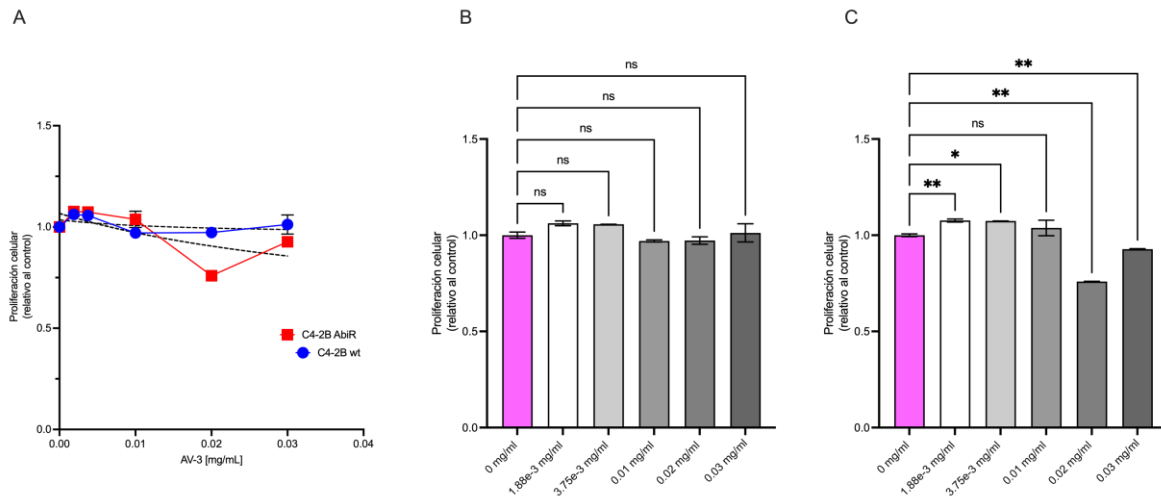


Figura 30. Los tratamientos con AV3 generan diferencias significativas en la proliferación de células C4-2B AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta para células C4-2B wt y C4-2B AbiR frente a concentraciones crecientes de AV-3. (B) Proliferación celular de células C4-2B wt respecto al control sin tratamiento. (C) Proliferación celular de células C4-2B AbiR respecto al control sin tratamiento.

Por otro lado, las células de la línea 22RV1 AbiR mostraron menor sensibilidad a la toxina, con respecto a sus pares wt, puesto que esta últimas reducen dramáticamente la proliferación celular al ser tratadas con 0.02mg/mL de la toxina en un 48 % (Figura 31A, B y C).

Esto muestra una diferencia importante en la acción de esta toxina al ser usada como tratamientos en los modelos celulares derivados de las líneas de CRPC C4-2B y 22RV1, indicando que existen diferentes vías de señalización que podrían estar

alteradas en el CRPC resistente a la Abiraterona, dependiendo del genotipo de las células.

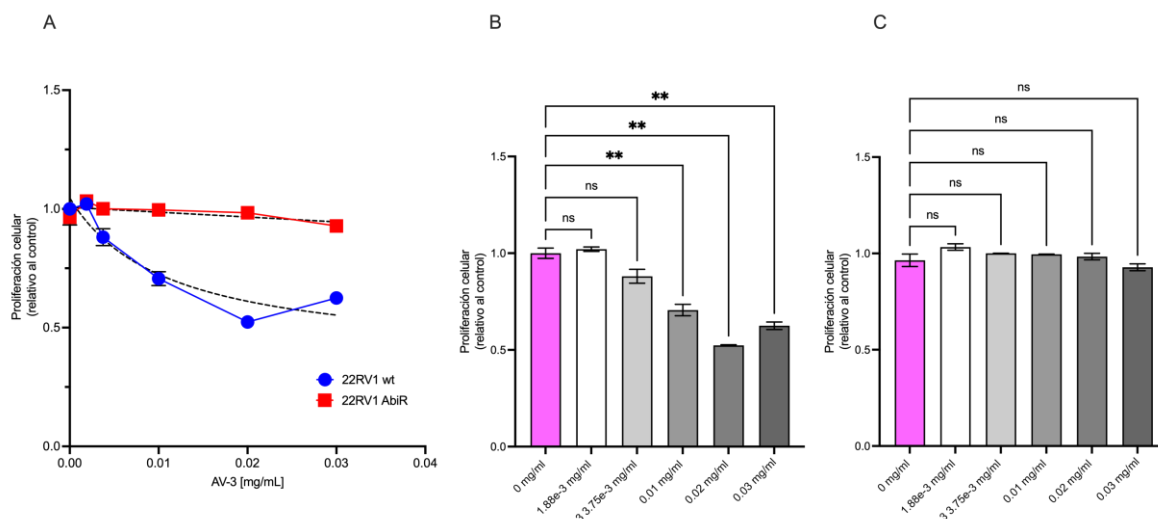


Figura 31. Los tratamientos con AV-3 generan disminución de la proliferación de células 22RV1 wt pero no de células 22RV1 AbiR. (A) Curvas dosis/respuesta para células 22RV1wt y 22RV1 AbiR frente a concentraciones crecientes de AV-3. (B) Proliferación celular de células 22RV1 wt respecto al control sin tratamiento. (C) Proliferación celular de células 22RV1 AbiR respecto al control sin tratamiento.

Además, los análisis de muerte celular muestran que las células C4-2B wt presentan una muerte celular inferior al 10% cuando son tratadas con la máxima concentración de AV-3, mientras que las células C4-2B AbiR experimentan un aumento en la muerte celular en comparación con el control sin tratamiento (Figura 32A y B).

Por el contrario, las células 22RV1 wt exhiben un incremento en la muerte celular del 40% cuando son tratadas con 0,02 mg/mL de AV-3, en comparación con las

células 22RV1 AbiR, que no muestran un aumento en la muerte celular a ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 32C y D), lo que refleja una respuesta diferenciada.

En conjunto, los datos revelan respuestas diferenciales entre las células wt y AbiR; sin embargo, los efectos son opuestos para cada fenotipo en los dos modelos de CRPC utilizados en estos estudios, C4-2B y 22RV1. En este contexto, las células C4-2B AbiR demostraron una mayor sensibilidad a la toxina en comparación con las células wt, mientras que las células 22RV1 wt mostraron una mayor sensibilidad que sus pares AbiR ante las mismas concentraciones de toxina.

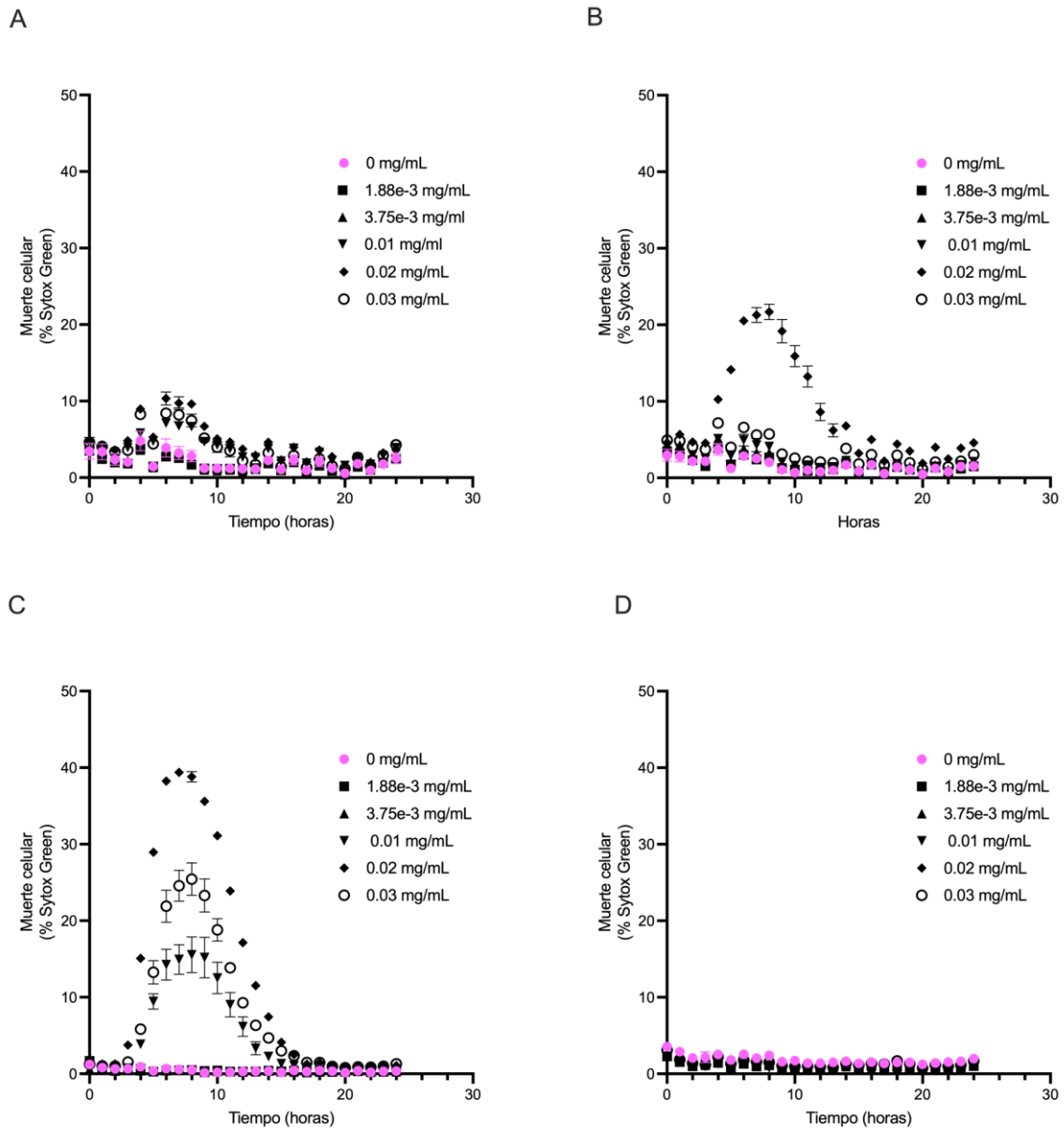


Figura 32. Los tratamientos con AV-3 generan efectos diferenciales en la muerte celular de células wt y AbiR. Muerte celular en tiempo real de (A) C4-2B wt, (B) C4-2B AbiR, (C) 22RV1 wt, (D) 22RV1 AbiR.

9 DISCUSIÓN

El CRPC es una enfermedad con importantes consecuencias socioeconómicas y es considerado un problema de salud pública (Kimberly Langdon Cull, 2022; NCI, 2010). Esta progresión del CaP depende de esteroidogénesis intratumoral como mecanismo de resistencia (Mohler et al., 2004; Titus et al., 2005) por lo cual la terapia de última línea para el CRPC es la Abiraterona, un inhibidor de la enzima esteroidogénica CYP17A1 clave en la esteroidogénesis intratumoral. Aunque la Abiraterona ha demostrado ser efectiva en el tratamiento del CRPC, una proporción considerable de pacientes desarrollan resistencia al fármaco, lo que limita su eficacia a largo plazo (Thakur et al., 2018; Zhu et al., 2020). En el marco de esta investigación, hemos desarrollado un prototipo de plataforma para la evaluación de moléculas con actividad potencial frente al CRPC resistente a la Abiraterona. Nuestros resultados muestran que los modelos celulares C4-2B y 22RV1, tratados crónicamente con acetato de Abiraterona, desarrollan resistencia al fármaco y presentan diferencias moleculares con respecto a las células parentales, caracterizadas por un aumento en la expresión del receptor de andrógenos AR, las enzimas esteroidogénicas CYP17A1 y 17 β -HSD, y el marcador de progresión del CRPC, PSA. Particularmente, el aumento en la expresión de CYP17A1 y 17 β -HSD en los dos modelos resistentes a la Abiraterona dan cuenta de un importante cambio molecular que puede ser explicado por un mecanismo compensatorio de las células. En ese sentido, nuestros resultados muestran que las células de los modelos CRPC

AbiR generados aumentan los niveles de enzimas esteroidogénicas para contrarrestar la inhibición de la síntesis de andrógenos mediada por la Abiraterona, lo cual es coincidente con estudios previos, donde la sobreexpresión proteica y de transcrito de enzimas esteroidogénicas se presenta como un mecanismo de resistencia a la ADT clásica (Hamid et al., 2020) y antiandrógenos de nueva generación (Buttiglierio et al., 2015; Mostaghel et al., 2011). En esta misma línea nuestros resultados se encuentran en concordancia con el aumento de AR, puesto que los andrógenos sintetizados *de novo* por la células de CRPC activan AR y promueven la sobreexpresión de AR vía retroalimentación positiva (Michmerhuizen et al., 2020). Este hecho, a su vez genera también la sobreexpresión de otro gen regulado por AR, el antígeno prostático específico, PSA (Saxena et al., 2012), lo cual fue también posible observar en nuestros resultados por un aumento significativo de la proteína PSA en células AbiR con respecto a las células wt. Las diferencias moleculares vislumbradas entre los modelos celulares wt y AbiR dan cuenta de un importante cambio entre las células resistentes a la abiraterona, con respecto a las células sensibles. Esto demuestra que la sobreexpresión de los marcadores evaluados asociados a los mecanismos de resistencia de activación del receptor de andrógenos y esteroidogénesis intratumoral reportada previamente en la literatura (Simon et al., 2021; Wadosky & Koochekpour, 2016; Zhu et al., 2020).

Es importante destacar que los modelos de CRPC resistentes a la Abiraterona generados en esta tesis fueron validados por el aumento en el porcentaje de resistencia a la droga. En ese sentido, tanto las células C4-2B AbiR, como 22RV1 AbiR presentaron un porcentaje de resistencia a Abiraterona superior al 20% al ser

expuestas a concentraciones de 10 μ M y 20 μ M, de lo cual no se tiene registro en la literatura actual (Parikh et al., 2021; Zhang et al., 2022). Así este resultado, contribuye al área, puesto que es la primera vez que se desarrolla una herramienta basada en dos modelos celulares de CRPC validados como resistentes a la Abiraterona que permiten, simultáneamente, la evaluación de compuestos para el tratamiento de esta progresión del CRPC.

En resumen, la generación, validación y caracterización de estas líneas celulares AbiR les convierte en herramientas valiosas para un sistema de análisis de compuestos contra el CRPC *in vitro*. Esta plataforma no solo permite evaluar rápidamente compuestos candidatos, sino que también proporciona una gran cantidad de información para futuros estudios sobre los mecanismos de acción de dichos compuestos.

Aunque esta plataforma representa un paso inicial hacia un sistema de cribado de alto rendimiento, no puede clasificarse como tal, ya que el cribado de alto rendimiento generalmente implica la evaluación simultánea de entre 1,000 y 10,000 compuestos (T G et al., 2017). A pesar de ello, durante el desarrollo de esta herramienta se evaluaron un total de 17 compuestos con actividad potencial para CRPC resistente a abiraterona (Figuras S4, S5 y S6) de los cuales identificamos 5 compuestos con efectos diferenciales en la generación efectos citostáticos y citotóxicos. Esto abre nuevas oportunidades de investigación en el campo. Con futuras optimizaciones, la plataforma adaptada a la metodología semiautomatizada por análisis de proliferación y muerte en tiempo real podría adaptarse para evaluar

dosís únicas de compuestos, lo que aumentaría la capacidad para testear un mayor número de candidatos antes de realizar análisis más detallados de dosis-respuesta.

En cuanto a la identificación de compuestos con actividad frente al CRPC resistente a la Abiraterona, observamos que IKE, BSO, QRC, IAKT y AV-3 mostraron actividad diferencial en los diferentes modelos celulares empleados. Estos compuestos se agruparon según sus mecanismos de acción conocidos para proporcionar una evaluación racional. IKE y BSO, son inhibidores de la síntesis de glutatión, un antioxidante clave que regula el equilibrio redox celular. Esto es particularmente relevante en el contexto del CRPC, ya que uno de los mecanismos asociados a la resistencia a la castración y a las terapias antiandrogénicas es el estrés oxidativo, el cual es inherente al cáncer de próstata y necesario para el desarrollo de un fenotipo más agresivo y la progresión del CRPC [68, 69].

En general, nuestros resultados mostraron que BSO no generó la disminución de la proliferación celular ni la inducción de muerte celular en los modelos de CRPC wt, lo cual contrasta con la evidencia que muestra la efectividad de BSO para disminuir la proliferación celular y generar muerte celular en CaP (Maeda et al., 2004; Qin et al., 2021). Sin embargo el tratamiento con concentraciones crecientes del fármaco (1,56µM a 400 µM), generaron la disminución de la proliferación celular en los modelos AbiR, un efecto diferencial que es más notorio en la comparación de las células 22RV1 AbiR frente a sus pares wt. Luego, el cotratamiento de BSO con abiraterona generó la disminución en la proliferación de células C4-2B AbiR, mientras que no se vieron diferencias en las células C4-2B wt. Por otro lado, las en

las células 22RV1 wt como 22RV1 AbiR se observó disminución de la proliferación celular, sin embargo, en estas últimas la diferencia no resultó estadísticamente significativa con respecto al control.

Con respecto a los tratamientos con IKE este produjo cambios en la proliferación y no indujo muerte celular en los modelos de CRPC usados, lo que coincide con lo reportado en literatura y nos permiten respaldar la idea de que las células de CRPC son resistentes a la inducción de muerte celular por IKE (Ferrada et al., 2023), sin embargo, los modelos de CRPC resistentes a abiraterona sí mostraron una sensibilidad a IKE, de manera dependiente de la dosis (0,16 μ M a 20 μ M) al observar las curvas dosis/respuesta. Además, el cotratamiento de esta molécula en conjunto con la abiraterona, mostró una reducción significativa en la proliferación de las células tanto wt como AbiR, lo cual muestra el potencial de esta molécula como resensibilizadora a la terapia antiandrogénica con abiraterona.

El estrés oxidativo surge como resultado de un desequilibrio en el estado redox de la célula, favoreciendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS inducen inestabilidad genómica y modulan vías de señalización que promueven la supervivencia y proliferación celular [70]. Las terapias oncológicas tradicionales han buscado modular los niveles de ROS para regular la proliferación celular o inducir la muerte celular [71]. Sin embargo, aunque el exceso de ROS promueve la progresión tumoral [72], las células cancerosas también aumentan sus niveles de antioxidantes, como el glutatión, para resistir la muerte celular inducida

por estrés oxidativo [73]. De este modo, las células cancerosas mantienen los niveles de ROS en un rango que activa las vías de señalización promotoras de la proliferación, sin alcanzar niveles letales que induzcan la muerte celular por estrés oxidativo. Este equilibrio contribuye al fracaso de quimioterapias convencionales, como la doxorrubicina [74]. Además, se ha demostrado una relación entre el aumento de los niveles de AR y el incremento de la síntesis de glutatión, lo que sugiere una conexión entre dos mecanismos clave de resistencia: la señalización del receptor de andrógenos y la regulación del equilibrio redox a través del glutatión. En este sentido, nuestros resultados muestran una mayor dependencia del glutatión de las células AbiR en comparación las células wt, lo cual se evidencia en la mayor sensibilidad a los fármacos inhibidores de la síntesis de glutatión IKE y BSO. Por lo demás, los niveles aumentados de AR en las células AbiR podrían reforzar esta dependencia al disminuir los niveles de AR dependientes de la síntesis de glutatión reportada previamente en literatura (Liang et al., 2023).

Estos hechos dan cuenta de efectos diferenciales que permiten hipotetizar que las células CRPC resistentes a abiraterona son dependientes de la síntesis de glutatión y su inhibición podría ser un blanco terapéutico importante en la terapia contra el CRPC resistente a la abiraterona.

En otra arista, evaluamos las moléculas Quercetina e IAKT, fármacos que bloquean la vía de señalización AKT. El tratamiento con Quercetina en células C4-2B AbiR generó una disminución en la proliferación celular, en comparación a las células wt. Por otro lado, las células 22RV1 AbiR, si bien no mostraron una diferencia

significativa en la proliferación celular, si exhibieron un aumento en la muerte celular, en comparación con las células wt, lo cual es concordante con la disminución de la proliferación celular en el modelo C4-2B AbiR. Así, se muestra que las células AbiR presentan mayor sensibilidad a Quercetina que las células wt. Sin embargo la inhibición de AKT por Quercetina no ha sido completamente estudiada y dado que la cascada de señalización de AKT se compone de múltiples proteínas, se hacen necesarios estudios posteriores para evaluar la acción y *target* específico de esta molécula y posicionarla como una alternativa coadyuvante al tratamiento con Abiraterona.

La evaluación del inhibidor químico de AKT, IAKT, mostró efectos diferenciales en los modelos sensibles y resistentes a la Abiraterona. Estos efectos son más notorios al comparar los modelos wt y AbiR de la línea celular C4-2B, donde se evidencia una disminución en la proliferación celular en el modelo AbiR, mientras que las diferencias entre las líneas celulares 22RV1 wt y AbiR no resultaron significativas. Sin embargo el cotratamiento con Abiraterona e IAKT en los modelos AbiR de las líneas C4-2B como 22RV1 presentaron una disminución de la proliferación celular, lo cual permite posicionar a la molécula de IAKT como un posible resensibilizador a la terapia con abiraterona, cuya acción debe ser estudiada más a fondo.

Diversas vías dependientes de ligando que se encuentran alteradas en cáncer , entre ellas, AKT/mTOR y MAPK. Estas vías juegan un papel importante en el desarrollo de cáncer dependientes de hormonas como el cáncer de mama donde se ha visto que es capaz de activar receptores esteroideos como el receptor de estrógenos (Paplomata & O'Regan, 2013), de manera análoga a lo que ocurre con

la señalización de AR en CRCP (Schweizer & Yu, 2015; Tortorella et al., 2023). Además, existe evidencia de que la activación de AKT aumenta la actividad de enzimas esteroideogénicas como la aromatasa y la 3 β -HSD, aumentando la señalización de AR por la unión de su ligando (Paplomata & O'Regan, 2013). lo cual podría explicar la sensibilidad de los modelos AbiR a los inhibidores de AKT, producto de la dependencia de AR sobreexpresado en estas líneas. En este sentido los resultados de esta tesis muestran un aumento de la expresión y la actividad de AR visualizada por el aumento en los niveles de PSA en modelos AbiR y el aumento en otras enzimas esteroideogénicas, lo cual muestra que las vías de señalización dependientes de ligando como AKT podrían ser un mecanismo importante de resistencia a Abiraterona.

Por último la activación de Nf- κ B, presenta una importancia en el desarrollo de CRPC y la disminución de efectos de otras terapias de antiandrogénicos como la enzalutamida (Duprat et al., 2023). Por este motivo, evaluamos la actividad de la toxina de pez sapo, *T. maculosa*. La cual se compone de una serie de moléculas aun no identificadas que poseen la capacidad de activar Nf- κ B por medio de p38 una MAPK.

En esta arista, observamos que ambos modelos de CRPC resistentes a la abiraterona responden de manera diferenciada con respecto a sus pares sensibles a la abiraterona. Mientras que las células C4-2B AbiR exhiben una disminución significativa en la proliferación celular y un aumento en la muerte celular, las células 22RV1 AbiR resultaron menos sensibles a la toxina, en comparación a sus pares

wt. Así, las células 22RV1 wt disminuyeron la proliferación celular y aumentaron la muerte celular al ser tratadas con las mismas concentraciones de la toxina. Esto muestra que las células de CRPC de distintas líneas responden de manera diferencial frente a ciertos compuestos. Dado que las células C4-2B y 22RV1 corresponden a dos modelos celulares de CRPC genotípicamente diferentes, el efecto diferencial generado por AV-3 visto en ambas líneas no puede ser atribuido únicamente a la activación de p38. Además, AV-3 corresponde a un conjunto de moléculas, cuya naturaleza y actividad no ha sido completamente estudiadas. Sin embargo, las diferencias en los efectos de AV-3 entre dos modelos de CRPC resistente a la Abiraterona permiten también mostrar que la evaluación de compuestos como primera aproximación a la identificación de nuevas moléculas para el tratamiento de la patología del CRPC resistente a la Abiraterona requiere de un estudio minucioso en más de un modelo celular, reforzando la importancia del desarrollo de plataformas como la desarrollada en esta tesis.

Como se mencionó anteriormente, la activación de vías dependientes de ligando como AKT y MAPK juegan un importante papel en el desarrollo de cáncer (Shorning et al., 2020). La activación de mitogen-activated protein kinases (MAPKs) que corresponden a serin/threonin protein kinasa que juegan un papel crucial en la transducción de señales extracelulares hacia el interior de la célula y que generan efectos diversos tales como proliferación; diferenciación, apoptosis, etc. (Yan et al., 2024). La vía MAPK inicia con la recepción de estímulos desde el extracelular, tales como factores de crecimiento o citoquinas proinflamatorias que activan receptores tirosina-kinasa y generan la activación de proteínas mediadoras de la transducción,

tales como Ras, TRAF o RAC-1. Estas, a su vez generarán la fosforilación y activación de las MAPK's, MEK, MEKK 3/6/4/7, para finalmente dar lugar a la activación de los efectores ERK, JNK y p38 (Y. Zhao et al., 2019) , entre otros factores de transcripción que promueven la expresión de genes involucrados en los procesos de supervivencia y muerte celular (Cargnello & Roux, 2011; Raman et al., 2007). Particularmente, en cáncer de próstata se ha demostrado que vías MAPK pueden activar por fosforilación al receptor de andrógenos en ausencia de ligandos (Ene et al., 2014; Lee et al., 2008; Yeh et al., 1999) pueden activar AR independiente de ligandos, a través de las vías MAPK y JAK/STAT (Ueda et al., 2002), además de la regulación positiva de AR por vía $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, lo cual genera la progresión del CaP vía AR. Por esto, la vía MAPK podría ser un importante foco de estudio al regular el desarrollo de CaP vía AR o independiente de AR y la evaluación de compuestos que tengan efectos a nivel de vías de señalización dependientes de ligando como AV-3 se sustenta para los fines de esta tesis.

El desarrollo de esta tesis y en particular la evaluación de compuestos con actividad diferencial entre modelos sensibles y resistentes a la Abiraterona evidencian que existe una multiplicidad de vías de señalización involucradas en el desarrollo y progresión del CRPC y el CRPC resistente a la Abiraterona, lo cual, si bien representa un problema inherente a la patología también representa una oportunidad, pues le hace susceptible de un abordaje farmacológico mucho más amplio que puede ser explorado y explotado con el fin de generar nuevas y efectivas alternativas de tratamiento para los pacientes que padecen la enfermedad.

10 CONCLUSIÓN

En esta tesis desarrollamos un prototipo de plataforma de evaluación de moléculas con potencial uso en el tratamiento de la resistencia a Abiraterona en cáncer de próstata resistente a la castración que permite realizar un análisis semiautomatizado de la actividad biológica de las moléculas, frente a células de CRPC resistente a Abiraterona y la identificación de moléculas con actividad diferencial en células sensibles y resistentes a la Abiraterona, sin embargo, se requiere la optimización de la metodología para poder generar una plataforma de alto rendimiento.

Por lo anterior, la hipótesis inicial de trabajo es aceptada parcialmente y se proyectan investigaciones que permitan la el desarrollo de una herramienta que permita evaluar una cantidad superior a 1000 compuestos de manera simultánea, a fin de optimizar los procesos de búsqueda de moléculas para el tratamiento del CRPC resistente a la Abiraterona.

11 SUPLEMENTARIOS

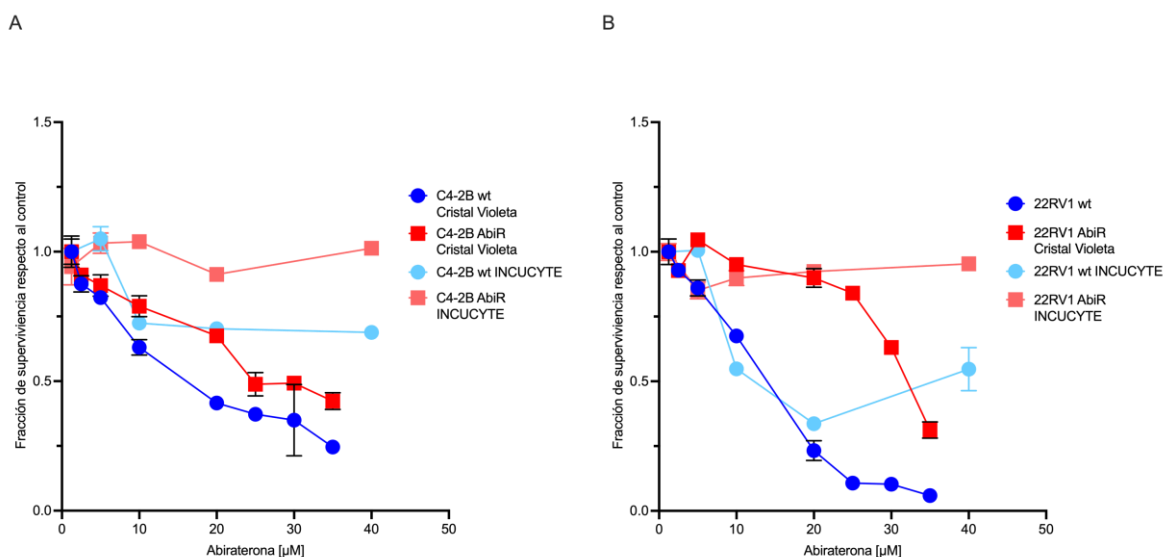


Figura S1. Diferencias entre curvas dosis respuesta obtenidas por diferentes metodologías. (A) Curvas dosis respuesta para líneas celulares C4-2B wt y C4-2B AbiR tratadas con concentraciones crecientes de acetato de Abiraterona por cristal violeta y análisis de proliferación en tiempo real (INCUCYTE). (B) Curvas dosis respuesta para líneas celulares 22RV1wt y 22RV1 AbiR tratadas con concentraciones crecientes de acetato de Abiraterona Abiraterona por cristal violeta y análisis de proliferación en tiempo real (INCUCYTE).

Abiraterona [μM]	10 [μM]			20 [μM]		
	% de resistencia CV	% de resistencia INCUCYTE	Diferencia	% de resistencia CV	% de resistencia INCUCYTE	Diferencia
C4-2B AbiR	78.9	31.4	47.5	27.5	20.9	6.6
22RV1 AbiR	67.5	65.4	2.1	66.7	57.6	9.1

Tabla S1. Diferencias entre los porcentajes de resistencia calculados por metodología de cristal violeta y análisis de proliferación en tiempo real (INCUCYTE).

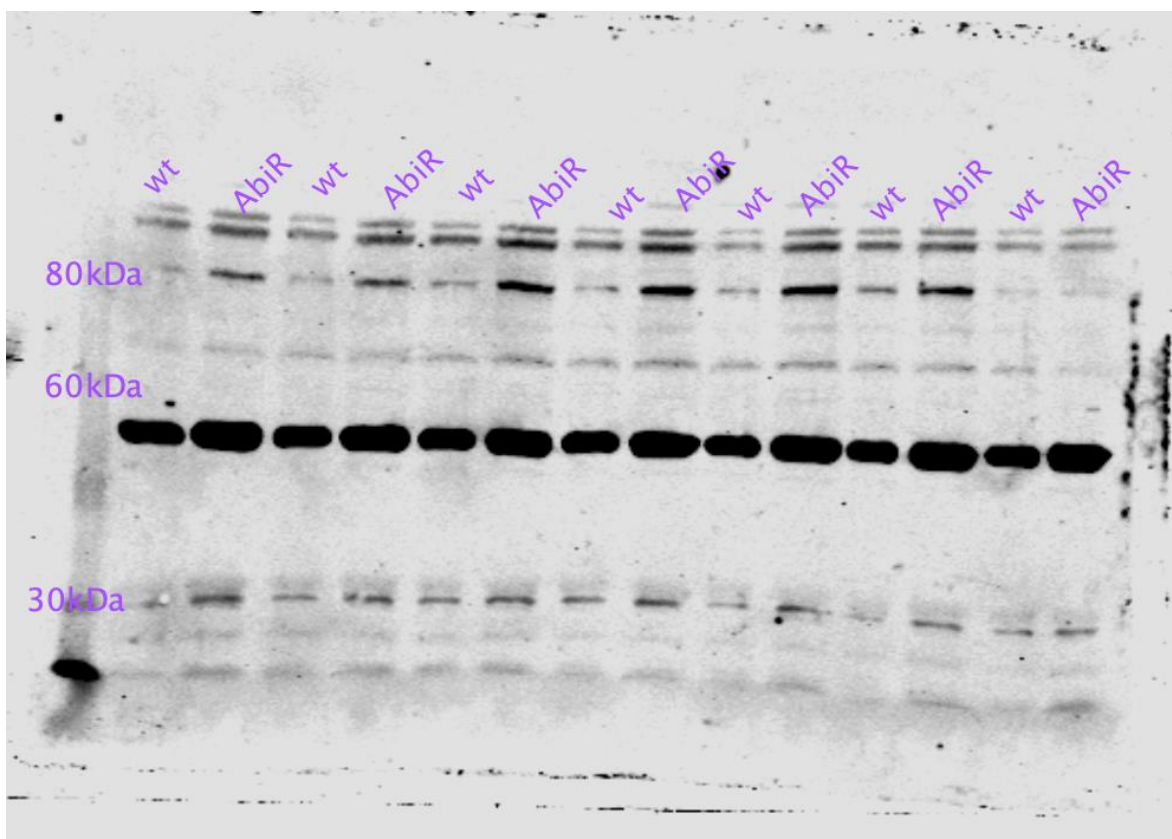


Figura S2. Western Blot contra enzima 17 β -HSD en células 22RV1 wt y AbiR.

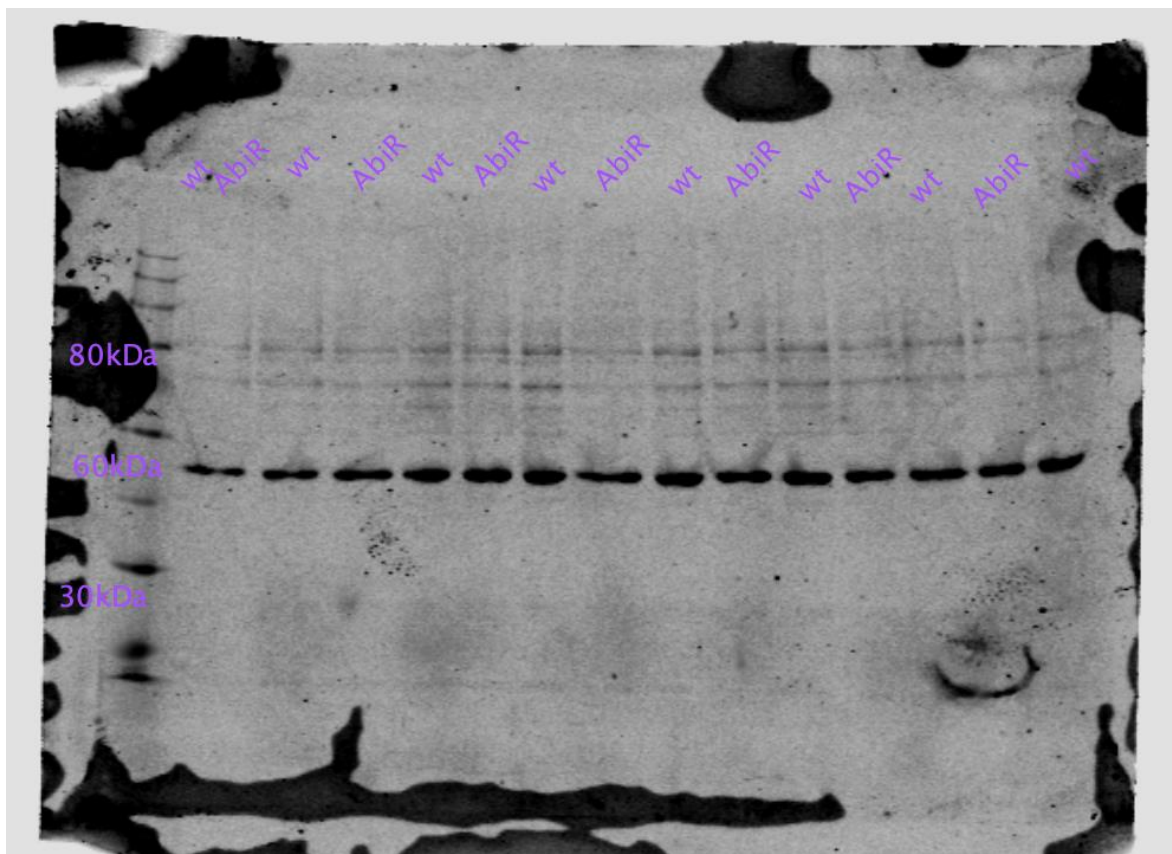


Figura S3. Western Blot contra enzima 17 β -HSD en células C4-2B wt y AbiR.

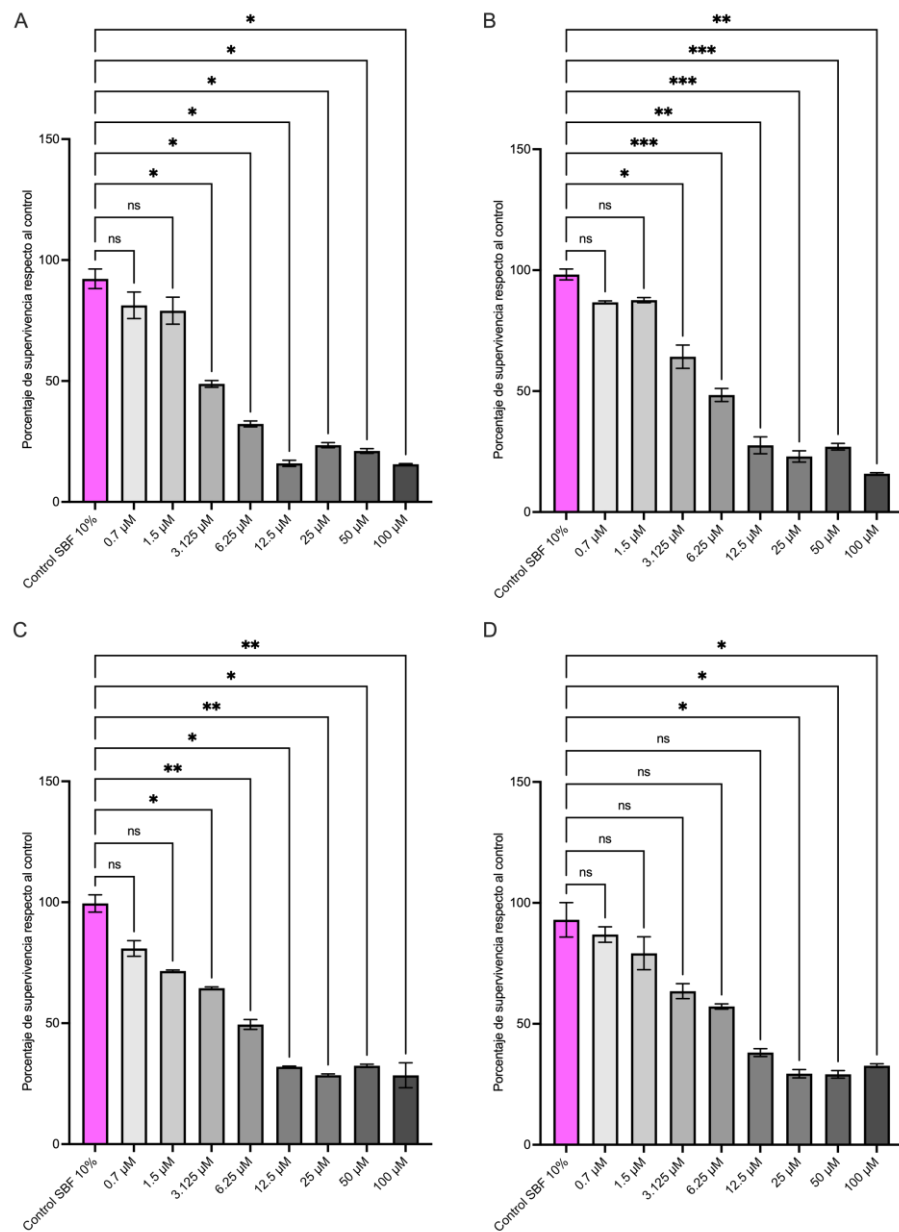


Figura S4. Porcentajes de supervivencia de células C4-2B AbiR frente a concentraciones crecientes de compuestos extraídos desde *Maytenus Disticha* CP 1 y CP 2 (A y B) y 22RV1 AbiR CP 1 y CP 2 (C y D). Metodología Cristal Violeta.

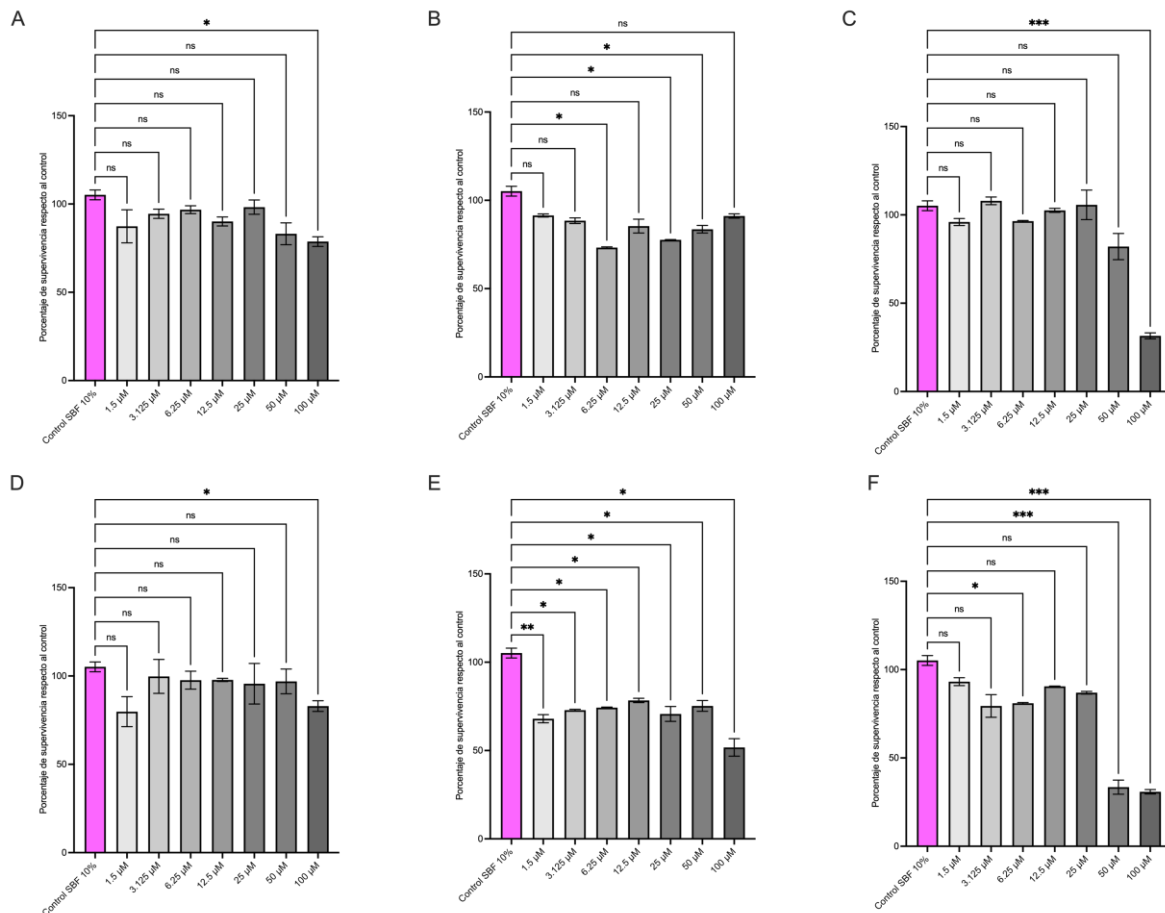


Figura S5. Porcentajes de supervivencia de células C4-2B AbiR frente a concentraciones crecientes de compuestos inhibidores de canales de potasio. DR 4 (A); DR 5 (B), DR 6 (C), DR 7 (D), DR 8 (E) y DR 9 (F). Metodología Cristal Violeta.

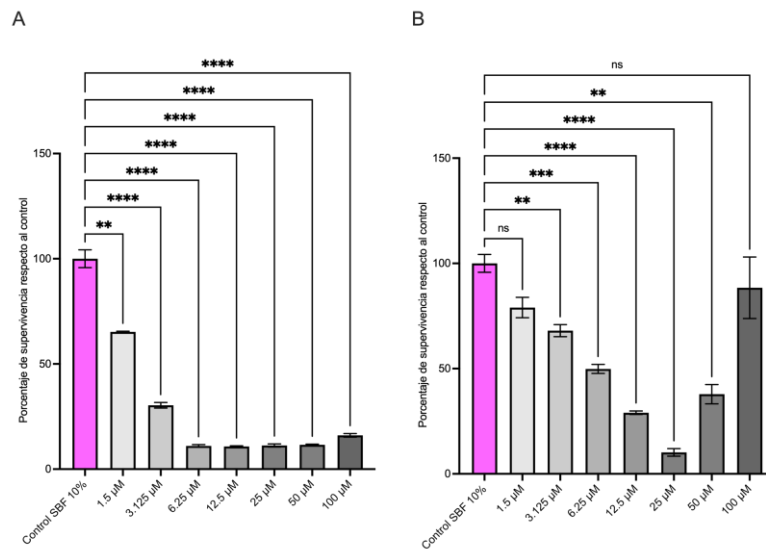


Figura S6. Porcentajes de supervivencia de celular C4-2B AbiR frente a concentraciones crecientes de otros compuestos. CAPE (A); Cloranfenicol (B). Metodología Cristal Violeta.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Annang, F., Pérez-Moreno, G., García-Hernández, R., Cordon-Obras, C., Martín, J., Tormo, J. R., Rodríguez, L., de Pedro, N., Gómez-Pérez, V., Valente, M., Reyes, F., Genilloud, O., Vicente, F., Castanys, S., Ruiz-Pérez, L. M., Navarro, M., Gamarro, F., & González-Pacanowska, D. (2015). High-throughput screening platform for natural product-based drug discovery against 3 neglected tropical diseases: human African trypanosomiasis, leishmaniasis, and Chagas disease. *J Biomol Screen*, 20(1), 82-91. <https://doi.org/10.1177/1087057114555846>
- Antonarakis, E. S., Lu, C., Wang, H., Lubber, B., Nakazawa, M., Roeser, J. C., Chen, Y., Mohammad, T. A., Chen, Y., Fedor, H. L., Lotan, T. L., Zheng, Q., De Marzo, A. M., Isaacs, J. T., Isaacs, W. B., Nadal, R., Paller, C. J., Denmeade, S. R., Carducci, M. A.,...Luo, J. (2014). AR-V7 and resistance to enzalutamide and Abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, 371(11), 1028-1038. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315815>
- Asangani, I., Blair, I. A., Van Duyne, G., Hilser, V. J., Moiseenkova-Bell, V., Plymate, S., Sprenger, C., Wand, A. J., & Penning, T. M. (2021). Using biochemistry and biophysics to extinguish androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Biol Chem*, 296, 100240. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.012411>
- Attene-Ramos, M. (2014). High Throughput Screening. In. *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edition).

- Bialkowska, A. B., & Yang, V. W. (2012). High-throughput screening strategies for targeted identification of therapeutic compounds in colorectal cancer. *Future Oncol*, 8(3), 259-272. <https://doi.org/10.2217/fon.12.19>
- Buttiglierio, C., Tucci, M., Bertaglia, V., Vignani, F., Bironzo, P., Di Maio, M., & Scagliotti, G. V. (2015). Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to Abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer. *Cancer Treat Rev*, 41(10), 884-892. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.08.002>
- Camilo Cid , C. H., Rodrigo Rodríguez, Gabriel Bastías, Jorge Jiménez. (2016). Assessing the economic impact of cancer in Chile: a direct and indirect cost measurement based on 2009 registries. *MEDWAVE*.
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83. <https://doi.org/10.1128/mmlbr.00031-10>
- Chandrasekar, T., Yang, J. C., Gao, A. C., & Evans, C. P. (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*, 4(3), 365-380. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02>
- Costamagna, G., Comi, G. P., & Corti, S. (2021). Advancing Drug Discovery for Neurological Disorders Using iPSC-Derived Neural Organoids. *Int J Mol Sci*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/ijms22052659>
- Csizmarik, A., Hadaschik, B., Kramer, G., Nyirady, P., & Szarvas, T. (2021). Mechanisms and markers of resistance to androgen signaling inhibitors in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Urologic*

- Oncology: Seminars and Original Investigations*, 39(10), 728.e713-728.e724.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2021.01.030>
- Culig, Z., & Santer, F. R. (2014). Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 33(2-3), 413-427. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9474-0>
- Dai, C., Heemers, H., & Sharifi, N. (2017). Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(9).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030452>
- de Bono, J. S., Logothetis, C. J., Molina, A., Fizazi, K., North, S., Chu, L., Chi, K. N., Jones, R. J., Goodman, O. B., Jr., Saad, F., Staffurth, J. N., Mainwaring, P., Harland, S., Flaig, T. W., Hutson, T. E., Cheng, T., Patterson, H., Hainsworth, J. D., Ryan, C. J.,...Investigators, C.-A.-. (2011). Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*, 364(21), 1995-2005.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1014618>
- Dillard, P. R., Lin, M. F., & Khan, S. A. (2008). Androgen-independent prostate cancer cells acquire the complete steroidogenic potential of synthesizing testosterone from cholesterol. *Mol Cell Endocrinol*, 295(1-2), 115-120.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.08.013>
- Duprat, F., Robles, C., Castillo, M. P., Rivas, Y., Mondaca, M., Jara, N., Roa, F., Bertinat, R., Toledo, J., Paz, C., & González-Chavarría, I. (2023). LOX-1 Activation by oxLDL Induces AR and AR-V7 Expression via NF- κ B and STAT3 Signaling Pathways Reducing Enzalutamide Cytotoxic Effects. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5082.
<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/6/5082>

- Ene, C., Ene, C. D., Nicolae, I., Coman, L., & Coman, O. A. (2014). Zinc and androgen hormones in benign prostatic hyperplasia. *Medicina*, 21(2), 106-111.
- English, M. A., Stewart, P. M., & Hewison, M. (2001). Estrogen metabolism and malignancy: analysis of the expression and function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in colonic cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 171(1-2), 53-60.
[https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00418-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00418-4)
- Environmental Protection Association, E. (2023). Use of High Throughput Assays and Computational Tools in the Endocrine Disruptor Screening Program. In.
- Estadísticas, I. N. d. (2019). *ANUARIO DE ESTADÍSTICAS VITALES, 2019 Período de información: 2019*.
- Ferrada, L., Barahona, M. J., Vera, M., Stockwell, B. R., & Nualart, F. (2023). Dehydroascorbic acid sensitizes cancer cells to system x(c)(-) inhibition-induced ferroptosis by promoting lipid droplet peroxidation. *Cell Death Dis*, 14(9), 637. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06153-9>
- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., & Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, 22(56), 8983-8998.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207115>
- Fujita, K., & Nonomura, N. (2019). Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health*, 37(3), 288-295.
<https://doi.org/10.5534/wjmh.180040>
- García-Martínez, J. M., Moran, J., Clarke, R. G., Gray, A., Cosulich, S. C., Chresta, C. M., & Alessi, D. R. (2009). Ku-0063794 is a specific inhibitor of the

- mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J*, 421(1), 29-42.
<https://doi.org/10.1042/bj20090489>
- Giatromanolaki, A., Fasoulaki, V., Kalamida, D., Mitrakas, A., Kakouratos, C., Lialiaris, T., & Koukourakis, M. I. (2019). CYP17A1 and Androgen-Receptor Expression in Prostate Carcinoma Tissues and Cancer Cell Lines. *Curr Urol*, 13(3), 157-165. <https://doi.org/10.1159/000499276>
- GLOBOCAN. (2022a). *Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, all cancers, both sexes, all ages*.
- GLOBOCAN. (2022b). *Estimated number of incident cases and deaths World, Chile, both sexes, all ages (excl. NMSC)*.
- GLOBOCAN. (2022c). *Estimated number of new cases from 2020 to 2040, Both sexes, age [0-85+]*.
- Gomez, L., Kovac, J. R., & Lamb, D. J. (2015). CYP17A1 inhibitors in castration-resistant prostate cancer. *Steroids*, 95, 80-87.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.021>
- Griffith, O. W. (1982). Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem*, 257(22), 13704-13712.
- Grimm, P., Billiet, I., Bostwick, D., Dicker, A. P., Frank, S., Immerzeel, J., Keyes, M., Kupelian, P., Lee, W. R., Machtens, S., Mayadev, J., Moran, B. J., Merrick, G., Millar, J., Roach, M., Stock, R., Shinohara, K., Scholz, M., Weber, E.,...Langley, S. (2012). Comparative analysis of prostate-specific antigen free survival outcomes for patients with low, intermediate and high risk prostate cancer treatment by radical therapy. Results from the Prostate

- Cancer Results Study Group. *BJU Int*, 109 Suppl 1, 22-29.
<https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10827.x>
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., & Lander, E. S. (2009). Identification of Selective Inhibitors of Cancer Stem Cells by High-Throughput Screening. *Cell*, 138(4), 645-659.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.034>
- Hamid, A. R. A. H., Kusuma Putra, H. W., Sari, N. P., Diana, P., Sesari, S. S., Novita, E., Gultom, F. L., Saraswati, M., Tanurahardja, B., Asmarinah, Umbas, R., & Mochtar, C. A. (2020). Early upregulation of AR and steroidogenesis enzyme expression after 3 months of androgen-deprivation therapy. *BMC Urology*, 20(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12894-020-00627-0>
- Hu, R., Lu, C., Mostaghel, E. A., Yegnasubramanian, S., Gurel, M., Tannahill, C., Edwards, J., Isaacs, W. B., Nelson, P. S., Bluemn, E., Plymate, S. R., & Luo, J. (2012). Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer [Article]. *Cancer Research*, 72(14), 3457-3462.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3892>
- Huang, H., & Tindall, D. J. (2002). The role of the androgen receptor in prostate cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 12(3), 193-207.
<https://doi.org/10.1615/critreveukaryotgeneexpr.v12.i3.30>
- Johnston, P. A., Nguyen, M. M., Dar, J. A., Ai, J., Wang, Y., Masoodi, K. Z., Shun, T., Shinde, S., Camarco, D. P., Hua, Y., Huryn, D. M., Wilson, G. M., Lazo, J. S., Nelson, J. B., Wipf, P., & Wang, Z. (2016). Development and Implementation of a High-Throughput High-Content Screening Assay to

- Identify Inhibitors of Androgen Receptor Nuclear Localization in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. *Assay Drug Dev Technol*, 14(4), 226-239. <https://doi.org/10.1089/adt.2016.716>
- Kim, J., & Coetzee, G. A. (2004). Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *J Cell Biochem*, 93(2), 233-241. <https://doi.org/10.1002/jcb.20228>
- Kimberly Langdon Cull, M. (2022). Prostate Cancer: Costs For Diagnosis, Treatment, And Care. In.
- Knuuttila, M., Yarkin, E., Kallio, J., Savolainen, S., Laajala, T. D., Aittokallio, T., Oksala, R., Hakkinen, M., Keski-Rahkonen, P., Auriola, S., Poutanen, M., & Makela, S. (2014). Castration induces up-regulation of intratumoral androgen biosynthesis and androgen receptor expression in an orthotopic VCaP human prostate cancer xenograft model. *Am J Pathol*, 184(8), 2163-2173. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.04.010>
- Lee, S. O., Pinder, E., Chun, J. Y., Lou, W., Sun, M., & Gao, A. C. (2008). Interleukin-4 stimulates androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells. *Prostate*, 68(1), 85-91. <https://doi.org/10.1002/pros.20691>
- Li, Z., Bishop, A. C., Alyamani, M., Garcia, J. A., Dreicer, R., Bunch, D., Liu, J., Upadhyay, S. K., Auchus, R. J., & Sharifi, N. (2015). Conversion of Abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer. *Nature*, 523(7560), 347-351. <https://doi.org/10.1038/nature14406>
- Liang, J., Liao, Y., Wang, P., Yang, K., Wang, Y., Wang, K., Zhong, B., Zhou, D., Cao, Q., Li, J., Zhao, Y., & Jiang, N. (2023). Ferroptosis landscape in prostate

- cancer from molecular and metabolic perspective. *Cell Death Discovery*, 9(1), 128. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01430-0>
- Lopes-Ferreira, M., Sosa-Rosales, I., Silva Junior, P. I., Conceicao, K., Maleski, A. L. A., Balan-Lima, L., Disner, G. R., & Lima, C. (2022). Molecular Characterization and Functional Analysis of the Nattectin-like Toxin from the Venomous Fish *Thalassophryne maculosa*. *Toxins*, 14(1), 2. <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/1/2>
- Maeda, H., Hori, S., Ohizumi, H., Segawa, T., Kakehi, Y., Ogawa, O., & Kakizuka, A. (2004). Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death & Differentiation*, 11(7), 737-746. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401389>
- Mezencev, R., Wang, L., & McDonald, J. F. (2012). Identification of inhibitors of ovarian cancer stem-like cells by high-throughput screening. *Journal of ovarian research*, 5, 1-11.
- Michmerhuizen, A. R., Spratt, D. E., Pierce, L. J., & Speers, C. W. (2020). ARe we there yet? Understanding androgen receptor signaling in breast cancer. *npj Breast Cancer*, 6(1), 47. <https://doi.org/10.1038/s41523-020-00190-9>
- MINSAL, M. d. S. d. C. (2015). Cáncer de próstata en personas de 15 años y más. In.
- Mohler, J. L., Gregory, C. W., Ford, O. H., 3rd, Kim, D., Weaver, C. M., Petrusz, P., Wilson, E. M., & French, F. S. (2004). The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 10(2), 440-448. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-1146-03>

Mostaghel, E. A., Marck, B. T., Plymate, S. R., Vessella, R. L., Balk, S., Matsumoto, A. M., Nelson, P. S., & Montgomery, R. B. (2011). Resistance to CYP17A1 inhibition with Abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clin Cancer Res*, 17(18), 5913-5925. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0728>

Naveen Premnath, M., University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX; and Ramy Sedhom, MD and Arjun Gupta, MD, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Johns Hopkins University, Baltimore, MD (2020). Potential Cost Savings With Low-Dose Abiraterone in the United States. In *Journal of Clinical Oncology (JCO)* (Vol. 6).

NCI, N. C. I. (2012). Abiraterone Improves Survival in Metastatic Prostate Cancer. In.

NCI, N. C. I. (2018). Tomar con alimentos: estudio prueba reducir la dosis de un fármaco para el cáncer de próstata. In.

NCI, N. C. I. (2010). *US Census NODB-IMPAC*.

Paplomata, E., & O'Regan, R. (2013). New and emerging treatments for estrogen receptor-positive breast cancer: focus on everolimus. *Ther Clin Risk Manag*, 9, 27-36. <https://doi.org/10.2147/tcrm.S30349>

Parikh, M., Liu, C., Wu, C. Y., Evans, C. P., Dall'Era, M., Robles, D., Lara, P. N., Agarwal, N., Gao, A. C., & Pan, C. X. (2021). Phase Ib trial of reformulated niclosamide with Abiraterone/prednisone in men with castration-resistant

- prostate cancer. *Sci Rep*, 11(1), 6377. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85969-x>
- Qin, Z., Ou, S., Xu, L., Sorensen, K., Zhang, Y., Hu, D. P., Yang, Z., Hu, W. Y., Chen, F., & Prins, G. S. (2021). Design and synthesis of isothiocyanate-containing hybrid androgen receptor (AR) antagonist to downregulate AR and induce ferroptosis in GSH-Deficient prostate cancer cells. *Chem Biol Drug Des*, 97(5), 1059-1078. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13826>
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26(22), 3100-3112. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392>
- Richards, J., Lim, A. C., Hay, C. W., Taylor, A. E., Wingate, A., Nowakowska, K., Pezaro, C., Carreira, S., Goodall, J., Arlt, W., McEwan, I. J., de Bono, J. S., & Attard, G. (2012). Interactions of Abiraterone, eplerenone, and prednisolone with wild-type and mutant androgen receptor: a rationale for increasing Abiraterone exposure or combining with MDV3100. *Cancer Res*, 72(9), 2176-2182. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3980>
- Riegman, P. H., Vlietstra, R. J., van der Korput, J. A., Brinkmann, A. O., & Trapman, J. (1991). The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol*, 5(12), 1921-1930. <https://doi.org/10.1210/mend-5-12-1921>
- Ryan, C. J., Smith, M. R., Fizazi, K., Saad, F., Mulders, P. F., Sternberg, C. N., Miller, K., Logothetis, C. J., Shore, N. D., Small, E. J., Carles, J., Flaig, T. W., Taplin, M. E., Higano, C. S., de Souza, P., de Bono, J. S., Griffin, T. W., De Porre, P., Yu, M. K.,...Investigators, C.-A.-. (2015). Abiraterone acetate plus

prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*, 16(2), 152-160. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71205-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71205-7)

Salud, O. P. d. I. (2019). *Plan de acción para la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles en las Américas 2013-2019*. OMS.

Samakova, A., Gazova, A., Sabova, N., Valaskova, S., Jurikova, M., & Kyselovic, J. (2019). The PI3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia. *Physiol Res*, 68(Suppl 2), S131-s138. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934345>

Saxena, P., Trerotola, M., Wang, T., Li, J., Sayeed, A., Vanoudenhove, J., Adams, D. S., Fitzgerald, T. J., Altieri, D. C., & Languino, L. R. (2012). PSA regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Prostate*, 72(7), 769-776. <https://doi.org/10.1002/pros.21482>

Schweizer, M. T., & Yu, E. Y. (2015). Persistent androgen receptor addiction in castration-resistant prostate cancer. *J Hematol Oncol*, 8, 128. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0225-2>

Shorning, B. Y., Dass, M. S., Smalley, M. J., & Pearson, H. B. (2020). The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *Int J Mol Sci*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124507>

- Simon, I., Perales, S., Casado-Medina, L., Rodriguez-Martinez, A., Garrido-Navas, M. D. C., Puche-Sanz, I., Diaz-Mochon, J. J., Alaminos, C., Lupianez, P., Lorente, J. A., Serrano, M. J., & Real, P. J. (2021). Cross-Resistance to Abiraterone and Enzalutamide in Castration Resistance Prostate Cancer Cellular Models Is Mediated by AR Transcriptional Reactivation. *Cancers (Basel)*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/cancers13061483>
- Society, A. C. (2021). Prostate Cancer Stages: The AJCC TNM staging system. In. T G, N., Venkatachalam, A., & Sugathan, S. (2017). High-Throughput and In Silico Screening in Drug Discovery. In. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3573-9_11
- Thakur, A., Roy, A., Ghosh, A., Chhabra, M., & Banerjee, S. (2018). Abiraterone acetate in the treatment of prostate cancer. *Biomed Pharmacother*, 101, 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.067>
- Titus, M. A., Schell, M. J., Lih, F. B., Tomer, K. B., & Mohler, J. L. (2005). Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 11(13), 4653-4657. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0525>
- Tortorella, E., Giantulli, S., Sciarra, A., & Silvestri, I. (2023). AR and PI3K/AKT in Prostate Cancer: A Tale of Two Interconnected Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2046. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2046>
- Ueda, T., Bruchovsky, N., & Sadar, M. D. (2002). Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction

pathways. *J Biol Chem*, 277(9), 7076-7085.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M108255200>

UK, P. (2023). Treatments Abiraterone. In.

Wadosky, K. M., & Koochekpour, S. (2016). Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Oncotarget*, 7(39), 64447-64470. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10901>

Xiao, L., Wang, Y., Xu, K., Hu, H., Xu, Z., Wu, D., Wang, Z., You, W., Ng, C. F., Yu, S., & Chan, F. L. (2018). Nuclear Receptor LRH-1 Functions to Promote Castration-Resistant Growth of Prostate Cancer via Its Promotion of Intratumoral Androgen Biosynthesis. *Cancer Res*, 78(9), 2205-2218. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2341>

Yan, Y., Dai, T., Guo, M., Zhao, X., Chen, C., Zhou, Y., Qin, M., Xu, L., & Zhao, J. (2024). A review of non-classical MAPK family member, MAPK4: A pivotal player in cancer development and therapeutic intervention. *Int J Biol Macromol*, 271(Pt 2), 132686. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132686>

Yeh, S., Lin, H. K., Kang, H. Y., Thin, T. H., Lin, M. F., & Chang, C. (1999). From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10), 5458-5463. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5458>

Zhang, L., He, M., Zhang, Y., Nilubol, N., Shen, M., & Kebebew, E. (2012). Quantitative high-throughput drug screening identifies novel classes of drugs with anticancer activity in thyroid cancer cells: opportunities for repurposing. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(3), E319-E328.

- Zhang, Y., Wei, W., Li, C., Yan, S., Wang, S., Xiao, S., He, C., Li, J., Qi, Z., Li, B., Yang, K., & Li, C. (2022). Idarubicin combats Abiraterone and enzalutamide resistance in prostate cells via targeting XPA protein. *Cell Death Dis*, 13(12), 1034. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05490-5>
- Zhao, J., Zhang, M., Liu, J., Liu, Z., Shen, P., Nie, L., Guo, W., Cai, D., Liu, J., Armstrong, C. M., Sun, G., Chen, J., Zhu, S., Dai, J., Zhang, H., Zhao, P., Zhang, X., Yin, X., Zhu, X.,...Zeng, H. (2019). AKR1C3 expression in primary lesion rebiopsy at the time of metastatic castration-resistant prostate cancer is strongly associated with poor efficacy of Abiraterone as a first-line therapy. *Prostate*, 79(13), 1553-1562. <https://doi.org/10.1002/pros.23875>
- Zhao, Y., Gui, W., Niu, F., & Chong, S. (2019). The MAPK Signaling Pathways as a Novel Way in Regulation and Treatment of Parasitic Diseases. *Diseases*, 7(1), 9. <https://www.mdpi.com/2079-9721/7/1/9>
- Zhong, L., Pon, V., Srinivas, S., Nguyen, N., Frear, M., Kwon, S., Gong, C., Malmstrom, R., & Wilson, L. (2013). Therapeutic options in docetaxel-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer: a cost-effectiveness analysis. *PLoS One*, 8(5), e64275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064275>
- Zhou, J., Wang, Y., Wu, D., Wang, S., Chen, Z., Xiang, S., & Chan, F. L. (2021). Orphan nuclear receptors as regulators of intratumoral androgen biosynthesis in castration-resistant prostate cancer. *Oncogene*, 40(15), 2625-2634. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01737-1>
- Zhou, Q., Tian, W., Jiang, Z., Huang, T., Ge, C., Liu, T., Zhao, F., Chen, T., Cui, Y., Li, H., Yao, M., Li, J., & Tian, H. (2021). A Positive Feedback Loop of

AKR1C3-Mediated Activation of NF-kappaB and STAT3 Facilitates Proliferation and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*, 81(5), 1361-1374. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2480>

Zhu, Y., Dalrymple, S. L., Coleman, I., Zheng, S. L., Xu, J., Hooper, J. E., Antonarakis, E. S., De Marzo, A. M., Meeker, A. K., Nelson, P. S., Isaacs, W. B., Denmeade, S. R., Luo, J., Brennen, W. N., & Isaacs, J. T. (2020). Role of androgen receptor splice variant-7 (AR-V7) in prostate cancer resistance to 2nd-generation androgen receptor signaling inhibitors. *Oncogene*, 39(45), 6935-6949. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01479-6>

13 GLOSARIO

ATCC: American Type Cell Culture Collection.

ADT: Terapia de privación de andrógenos (androgen deprivation therapy)

AR: Androgen Receptor (Receptor de Andrógenos).

AR-V7: Variante 7 del receptor de andrógenos que carece del dominio de unión a ligando.

AbiR: Abiraterone Resistant (Resistente a Abiraterona).

AKT: Protein Kinase B (Serina/treonina-proteína quinasa implicada en la regulación de múltiples funciones celulares).

AV-3: Toxina del pez sapo (Actividad proinflamatoria activando p38 y NF-kB).

BSO: L-butiniona-(SR) Sulfoximina (Inhibidor de la síntesis de glutatión).

CaP: Cáncer de Próstata.

CYP17A1: Cytochrome P450 17A1 (Enzima clave en la esteroidogénesis).

CRPC: Castration-Resistant Prostate Cancer (Cáncer de próstata resistente a la castración).

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHT: Dihydrotestosterone (Dihidrotestosterona).

HSD: Hydroxysteroid Dehydrogenase (Deshidrogenasa de Hidroxiesteroides).

HTS: Cribado de alto rendimiento (High throughput screening).

IAKT: Inhibitor of AKT (KU-0063794, inhibidor de la vía PI3K/AKT).

KLK-3: Kalikreína 3. Proteína regulada transcripcionalmente por AR y que es usado como marcador de progresión bioquímica en CaP.

IKE: Imidazole Ketone Erastin (Inhibidor de la síntesis de glutatión).

LH-RH: Hormona liberadora de gonadotropina.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases (Quinasas activadas por mitógenos).

Nf- κ B: Nuclear Factor Kappa B (Factor nuclear kappa B, regulador de la respuesta inmune).

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase (Quinasa de la fosfatidilinositol-3).

PSA: Prostate-Specific Antigen (Antígeno Prostático Específico).

QRC: Quercetina (Flavonoide con actividad anticancerígena).

T: Testosterona

wt: Wild Type (Tipo silvestre, se refiere a la línea celular no modificada genéticamente).