



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

CARACTERIZACION DE PINX1 COMO CORREGULADOR DEL RECEPTOR DE ANDROGENOS EN CÁNCER DE  
PROSTATA

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
**IVAN FLORES RAMIREZ**

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. ELIZABETH LANGLEY McCARRON  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DRA. MARIA DEL CARMEN MENDEZ HERRERA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. CARLOS GUADALUPE PEREZ PLASENCIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, FEBRERO, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# ÍNDICE

<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>6</b>
<b>1.Cáncer de próstata.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.Estadísticas mundiales.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.Estadísticas en México.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.Factores de riesgo.....</b>	<b>7</b>
<b>2.La próstata.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.Estructura de la próstata.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.Función de la próstata.....</b>	<b>11</b>
<b>3.Andrógenos.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.Función de los andrógenos.....</b>	<b>12</b>
<b>4.Receptor de andrógenos.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1.Dominio de unión a ligando.....</b>	<b>13</b>
<b>4.2.Dominio de unión a DNA.....</b>	<b>14</b>
<b>4.3.Región de bisagra.....</b>	<b>15</b>
<b>4.4.Dominio amino terminal.....</b>	<b>15</b>
<b>4.5.Mecanismo de acción del AR.....</b>	<b>16</b>
<b>5.Correguladores.....</b>	<b>17</b>
<b>6.Papel del AR en la próstata.....</b>	<b>19</b>
<b>6.1.Papel del AR en cáncer de próstata.....</b>	<b>19</b>
<b>7.Cáncer de próstata resistente a la Castración.....</b>	<b>20</b>
<b>7.1.Mecanismos dependientes de AR.....</b>	<b>20</b>
<b>7.1.1.Amplificación y sobreexpresión del AR.....</b>	<b>20</b>
<b>7.1.2.Mutaciones en el gen del AR.....</b>	<b>20</b>
<b>7.1.3.Desregulación de factores de crecimiento y citosinas.....</b>	<b>21</b>
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>24</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>24</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>25</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>31</b>

<b>1.PinX1 se encuentra incrementado en células de cáncer de próstata AR positivas</b>	<b>31</b>
<b>2.PinX1 interactúa in vivo e in vitro con el AR.</b>	<b>33</b>
<b>3.PinX1 incrementa la actividad transcripcional del AR ventaja y desventaja de 22rv1</b>	<b>34</b>
<b>4.PinX1 induce la expresión de genes blancos del AR</b>	<b>36</b>
<b>5.PinX1 es reclutado a promotores de genes blanco del AR</b>	<b>36</b>
<b>6.PinX1 incrementa la proliferación celular y la clonogenicidad</b>	<b>38</b>
<b>7.PinX1 incrementa la migración celular y la transición epitelio mesénquima</b>	<b>40</b>
<b>8.PinX1 actúa a través de una vía independiente de andrógenos</b>	<b>42</b>
<b>9.PinX1 modula la actividad del ER<math>\alpha</math> y del ER<math>\beta</math> de manera diferencial</b>	<b>43</b>
<b>Discusión</b>	<b>47</b>
<b>Conclusión</b>	<b>51</b>
<b>Referencias</b>	<b>52</b>

## **ANEXOS**

<b>1. Oncogenic role of PinX1 in prostate cancer cells through androgen receptor dependent and independent mechanisms</b>	<b>60</b>
---	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Anatomía de la próstata, tomado y modificado de Selman et al 2011. ....	10
Figura 2. Estructura de la secuencia del gen y proteína del AR, tomado y modificado de Lonergan et al., 2011.....	13
Figura 3. Mecanismo de acción del AR, tomado y modificado de Dai et al., 2017.....	17
Figura 4. Clasificación de los correguladores; coactivadores y correpresores, grupos y familias de cada uno por función y categoría.....	18
Figura 5. Estructura del corregulador PinX1, tomado y modificado de Li et al., 2015.....	22
Tabla 1. Secuencias de oligonucleotidos usados en el ensayo de RT-PCR, creación propia.....	28
Tabla 2. Secuencias de oligonucleotidos para amplificar secuencias dentro de promotores de genes blanco utilizados en el ensayo de inmunoprecipitación de cromatina, creación propia.....	30
Figura 6. Localización y expresión del corregulador PinX1 en líneas celulares de CaP.....	32
Figura 7. Corregulador PinX1 interactúa con AR.....	33
Figura 8. Corregulador PinX1s incrementa la actividad transcripcional de AR.....	35
Figura 9. Expresión de mRNA de genes blanco del AR en presencia del corregulador PinX1.....	36
Figura 10. Corregulador PinX1 es reclutado a secuencias dentro del promotor y enhancer de PSA y al promotor de Nkx3.1 en LNCaP.....	37
Figura 11. Corregulador PinX1 es reclutado a secuencias dentro del enhancer y promotor de PSA en 22Rv1.....	38
Figura. 12. Pinx1 promueve la proliferación y la clonogenicidad en presencia y ausencia de andrógenos.....	39
Figura. 13. Efecto del corregulador PinX1 sobre la migración celular.....	40
Figura. 14. Corregulador PinX1 induce la expresión de N-Cadherina y Vimentina en 22Rv1.....	41
Figura. 15. Pinx1 promueve la proliferación y la clonogenicidad en una línea celular AR negativa.....	42
Figura. 16. Efecto del corregulador PinX1 sobre la actividad transcripcional del ER en cáncer de próstata.....	44
Figura. 17. PinX1 incrementa la actividad transcripcional del ER $\beta$ .....	44
Figura. 18. PinX1 incrementa la actividad transcripcional del ER $\beta$ inducida por DPN.....	45

## **Abstract**

Coregulators play an important role in prostate cancer (PCa), modulating androgen receptor (AR) action and representing a possible cause of androgen deprivation therapy failure. Pin2-interacting protein X1 (PinX1) is a nucleolar protein described as a steroid hormone receptor coregulator in breast cancer cell lines. In this work, we studied the effect of PinX1 on AR action in PCa. Our results demonstrate that PinX1 acts as an AR coactivator, increasing its transcriptional activity and target gene expression, as well as proliferation, migration and colony formation in PCa cell lines. These effects are observed in the presence and absence of AR agonist and antagonists, suggesting a possible androgen independent pathway for PinX1. We present the first oncogenic roles described for PinX1, acting as a coactivator of the AR.

## **Resumen**

Los corre reguladores juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer de próstata, modulando la acción del receptor de andrógenos (AR), por lo que su desregulación representa una posible causa del fallo de la terapia de ablación de andrógenos. El corre regulador PinX1 (Pin2-interacting protein X1) es una proteína nuclear que fue recientemente descrita por nuestro grupo de investigación como un corre regulador de receptores hormonales esteroideos en líneas celulares de cáncer de mama. En el presente trabajo, se estudió el efecto de PinX1 sobre la acción del AR (receptor de andrógenos) en CaP (cáncer de próstata). Nuestros resultados demuestran que PinX1 actúa como un coactivador del AR, ya que es capaz de incrementar su actividad transcripcional y la expresión de sus genes blanco, así como la proliferación, la migración y la formación de colonias en líneas celulares de CaP. Estos efectos se observan en la presencia y ausencia de agonistas y antagonistas del receptor, sugiriendo una posible vía de señalización de PinX1 independiente del receptor. Estos resultados representan la primera actividad oncogénica descrita para PinX1, actuando como un coactivador del AR.

# Introducción

## 1. Cáncer de próstata

### 1.1. Estadísticas mundiales

De acuerdo con organismos internacionales como Globocan, para 2020 se diagnosticaron más de 1.4 millones de nuevos casos de CaP y se reportaron 375,000 muertes asociadas con el padecimiento (3.8% de todas las causas por cáncer), a nivel mundial. Asimismo, representa el segundo tipo de cáncer más diagnosticado en el género masculino, después del cáncer de pulmón. A nivel de mortalidad, representa el quinto lugar en hombres detrás del cáncer de pulmón, hígado, colorrectal y estomago (Sung et al., 2020).

El cáncer de próstata también representa el tipo de cáncer más diagnosticado en más de la mitad (112 países) de los 185 países del mundo, efecto que se observa de manera notoria en América, en el norte y oeste de Europa, sur de África y Australia. Este carcinoma también ocupa el segundo lugar como causa de mortalidad en 48 países detrás del cáncer de pulmón con 93 países.

Se sabe poco sobre su etiología, sin embargo, se han observado mayores tasas de incidencia entre hombres de descendencia africana, lo cual sugiere un proceso de predisposición genética y étnica (Sung et al., 2020).

Las tasas de incidencia de esta neoplasia varían considerablemente a nivel mundial. Las tasas de incidencia por edad estandarizada más altas se encuentran en Oceanía (79.1 por cada 100,000 personas) y Norteamérica (73.7), seguidas por Europa (62.1). Mientras que, de manera contraria África y Asia poseen tasas de incidencia que se encuentran por debajo de los países desarrollados, siendo de 26.6 y 11.5, respectivamente (Rawla et al., 2019). La tasa de mortalidad también varía a nivel mundial. En 2018, las tasas más altas fueron registradas en América Central (10.7 por 100,000 personas), seguidas por Australia y Nueva Zelanda (10.2) así como el oeste de Europa (10.1). Las tasas más bajas fueron reportadas en los países de Asia (Sur 3.3, Oeste 4.7 y Sudeste 5.4) y el norte de África (5.8) (Rawla et al., 2019). En la mayoría de los países desarrollados de Norteamérica, Oceanía, Europa del Norte y del Oeste se ha observado una disminución en la tasa de mortalidad por CaP. Dicha disminución ha sido atribuida principalmente a las mejoras en los tratamientos y en la detección temprana. Sin embargo, la contribución específica de la prueba de PSA (antígeno específico de próstata) permanece en controversia. En contraste, las tasas de mortalidad han aumentado en algunos países de Asia y Europa del centro y del este. Se ha postulado que este aumento es reflejo de factores de riesgo asociados con el desarrollo económico, incluyendo un aumento en el consumo de grasas animales, obesidad e inactividad física (Torre et al., 2015). Se estima que, para el periodo de 2018 a 2040, la mortalidad se duplicará con cerca de 379,005 muertes a nivel mundial (Rawla et al., 2019).

## 1.1. Estadísticas en México

En nuestro país el CaP ocupa el segundo lugar en incidencia en varones con más de 26,000 casos nuevos reportados en el año 2020, representando el 13.7% de todos los casos de cáncer. En hombres representa el cáncer con mayores casos diagnosticados ocupando casi el 30% de todos los tipos de cáncer.

Considerando la mortalidad para ambos sexos, el CaP se coloca en el segundo lugar después del cáncer colorrectal y en hombres ocupa la primera causa de muerte por cáncer (Ferlay et al., 2022)

## 1.2. Factores de riesgo

### Edad

El riesgo de desarrollar CaP es mayor en adultos mayores y tienden a tener una menor supervivencia general; como resultado, la edad juega un papel central en la elección del tratamiento (Perdana 2016). La edad promedio de diagnóstico es a los 66 años; mientras que raramente se da antes de los 40, asimismo la probabilidad de desarrollar este padecimiento aumenta rápidamente después de los 50 años de edad. En particular, a los 55 años se eleva el riesgo 17 veces comparado con una edad menor (Bashir, 2016).

### Etnia

Las diferencias en el riesgo del cáncer de próstata por raza pueden verse reflejadas en 3 factores: diferencias en la dieta, diferencias en la forma y tiempo de detección y diferencias genéticas hereditarias (Bostwick, 2004).

Se ha observado que los hombres de raza Afroamericana y de Sudamérica poseen una mayor incidencia y tasa de mortalidad por cáncer de próstata. La incidencia más baja es típicamente encontrada en hombres asiáticos, asociado con una susceptibilidad genética pero también con la dieta, el estilo de vida y factores ambientales.

Reportes han asociado variantes del cromosoma 8q24 con riesgo al cáncer de próstata de mayor frecuencia en hombres Afroamericanos. Mientras que otros estudios han mostrado una mayor tasa de variaciones en genes involucrados con la apoptosis tales como BCL2 y supresores de tumores como EphB2 en hombres afroamericanos (Perdana, 2016).

### Familia

Se ha reportado que aquellos hombres con familiares en primer grado con una historia positiva de cáncer de próstata poseen de 2 a 3 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad. Sumado a eso, hombres que poseen 2 o más familiares de primer grado afectados con cáncer de próstata poseen un riesgo casi 5 veces mayor de padecerlo.

La mayoría (64%) de los casos de cáncer de próstata en edad temprana reportan una historia familiar con esta enfermedad y más del 40% tienen familiares de primer grado afectados (Bashir 2016). Diferentes metaanálisis (3) han confirmado la asociación entre la historia familiar del cáncer de próstata con el riesgo a desarrollar la enfermedad. En este sentido se ha propuesto que puede haber un componente hereditario, y se han

señalado genes en 7 diferentes loci genéticos. Adicionalmente, se ha observado que mutaciones en los genes de *BRCA1* y *BRCA2* incrementan el riesgo de CaP (McNevin, 2021). Aunque el papel que juegan estos genes en el desarrollo de la enfermedad son desconocidos, se estima que contribuyen a menos del 5-10% del riesgo a desarrollar CaP (Perdana 2016), a pesar de esto, algunos autores atribuyen hasta el 40% de todos los casos de cáncer de próstata a factores genéticos. (Ferris-i-Tortajada et al., 2011)

## Dieta y Obesidad

La obesidad se sospecha como un factor de riesgo para el cáncer de próstata agresivo debido a su asociación con niveles alterados de metabolitos como el factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1) y hormonas sexuales circulantes involucradas en el desarrollo y oncogénesis de la próstata, en particular la testosterona y la dihidrotestoterona. Una consecuencia metabólica específica de la obesidad, especialmente combinada con inactividad física, es una reducción en la respuesta tisular a la insulina, especialmente en términos de una menor absorción de glucosa. La resistencia a la insulina conduce a niveles elevados crónicos de la misma, la cual se conoce es una hormona inductora de crecimiento y por lo tanto un factor de riesgo plausible para el desarrollo y la progresión del cáncer (Perdana, 2016).

## 2. La próstata

Es una glándula sexual accesoria masculina que se encuentra solo en los mamíferos. Está compuesta de tejido muscular, fibroso, elástico, conectivo glandular, nervioso, vascular linfático y una pequeña cantidad de musculo no liso. A semeja un cono trunco en forma, su base rodea el cuello de la vejiga, su ápice termina en la uretra, de la cual está separada por la capa posterior del ligamento triangular (Wilson, 2014).

Actualmente, se utiliza una nomenclatura establecida por John McNeal para describir la estructura de la próstata humana. McNeal dividió a la próstata en 4 zonas que son histológicamente distintas y separadas anatómicamente (Aaron, 2016). Se eligió el termino zona debido a que no hay lobulación externa en la próstata humana (Selman, 2011).

Estas áreas son: el estroma no glandular fibromuscular que rodea el órgano y las 3 regiones glandulares denominadas zonas periférica, zona central, y zona de transición, las cuales contienen un sistema ductal histológicamente distinto entre si (Aaron, 2016).

## **2.1. Estructura de la próstata**

### **La zona central**

Descrita como una porción de tejido glandular que constituye la mayor parte de la base de la próstata y rodea los ductos eyaculatorios (Fig 1 (A-D letra C) (E letra CZ)) (Aaron et al., 2016). Se conforma de aquellos ductos que emergen proximalmente en el tejido mesenquimal rodeando a los ductos eyaculatorios. Sus orificios se originan separadamente de aquellos de la zona periférica y están agrupados en un pequeño círculo en la convexidad del verumontanum, inmediatamente rodeando los orificios de los ductos eyaculatorios. Se ramifican principalmente de manera proximal, siguiendo el curso de los ductos eyaculatorios, pero también se extienden lateralmente de manera que sus ramificaciones más laterales corren paralelamente a las ramas más proximales de la zona periférica y se encuentran casi en contacto con ellas (McNeal, 1981).

El tejido acinar de la zona central consiste en largos espacios de contorno irregular, desde cuyas paredes se proyectan numerosas crestas intraluminales o tabiques. (McNeal, 1981).

### **La zona periférica**

Constituye casi el 75% del tejido glandular de la próstata adulta y se extiende lateralmente en el mesénquima, posterior al segmento distal de la uretra (Fig 1 (A- D letra P) (E letra PZ)) (McNeal, 1981). Está conformada por estructuras acinares pequeñas simples y redondas u ovaladas rodeadas por un estroma de tejido muscular (Aaron et al., 2016).

El epitelio de esta zona es simple y columnar y compuesto de células pálidas con distintos bordes y núcleos pequeños oscuros y localizados en la base (McNeal, 1981).

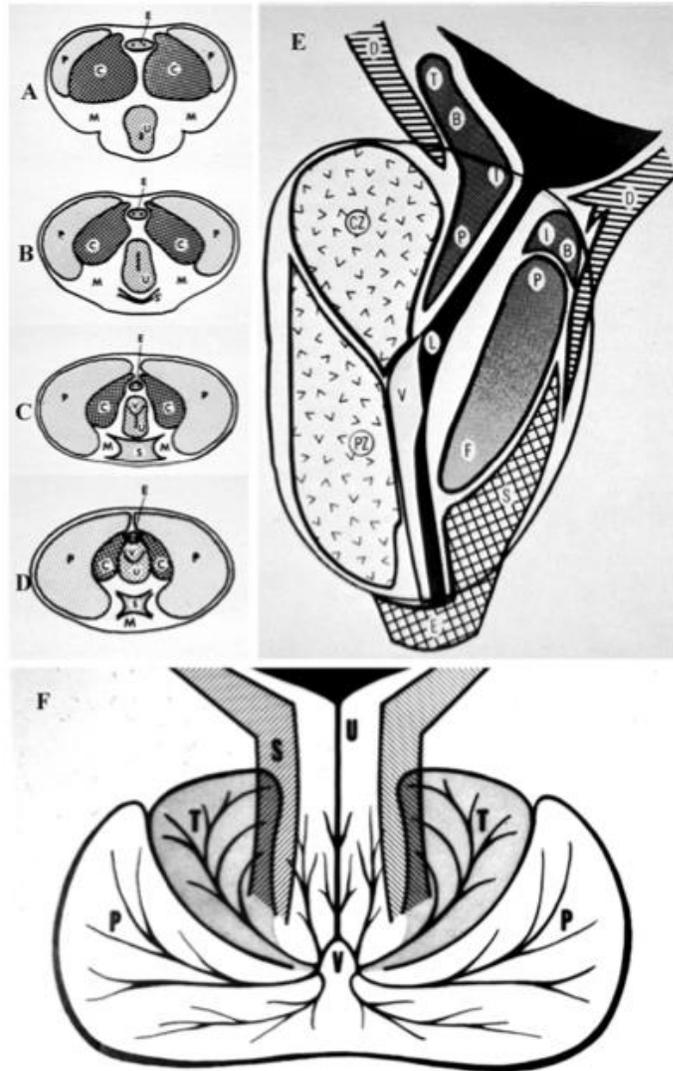
A pesar de la fusión de las dos zonas en sus bordes, un límite anatómico permanece visible entre ellos en la glándula normal adulta. Más importante que la delineación anatómica, existen diferencias histológicas muy marcadas entre estos tejidos, lo cual representa una diferencia en la función biológica (McNeal, 1981).

### **Zona de transición**

Basado en su estudio de hiperplasia prostática benigna realizada en pacientes, McNeal describió una nueva zona, la de transición. Esta zona se localiza en la convexidad de la zona periférica rodeando la uretra y representa del 5% al 10% de del volumen total de la próstata (Selman, 2011; Aaron et al., 2016). El estroma de esta zona difiere del de la zona periférica principalmente en la naturaleza y orientación de sus fibras musculares; en la zona periférica son finas y tejidas de manera holgada, mientras que en la zona de transición son gruesas y compactas (Selman, 2011)

## Estroma anterior fibromuscular

Esta zona es completamente no glandular y hasta la fecha no se le ha descrito alguna función, sin embargo, representa un tercio del volumen del tejido dentro de la capsula prostática. Consiste en una gruesa capa de tejido y constituye toda la superficie anterior de la próstata y se encuentra fuertemente adherida a las otras 3 regiones en su parte interna (McNeal 1981).



**Figura. 1. Anatomía de la próstata (A-D)** Zonas centrales y periféricas de la próstata. C zona central, P zona periférica, E ductos eyaculatorios, M musculo liso, S musculo estriado U estroma periuretral V veromontanum **(E)** Diagrama de la sección sagital de la próstata que muestra las subdivisiones anatómicas CZ zona central, PZ zona periférica V veromontanum L lumen uretral, U estroma uretral D detrusor, T surco interuretral, I esfínter interno, P esfínter preprostático, F esfínter preprostático fibroso, S esfínter prostático, E esfínter externo. **(F)** Zona de transición, diagrama de apariencias generales de una próstata típica seccionada a lo largo del plano oblicuo coronal, P porción principal de la próstata, S esfínter alrededor de la parte superior de la uretra, T zona de transición de la próstata, U uretra y estroma periuretral, V veromontanum. Tomado y modificado de Selman et al 2011.

## **Composición celular de la próstata**

Los ductos prostáticos maduros contienen 3 tipos celulares principales: epiteliales lumbinales secretoras, epiteliales basales y estromales de musculo liso. Otros tipos celulares menos comunes incluyen células neuroendócrinas, así como también células epiteliales basales con perfiles de expresión únicos, candidatas de ser células troncales.

Se distribuyen de manera que el lumen ductal esta delineado por células epiteliales secretorias columnares. Estas células están terminalmente diferenciadas y poseen una polaridad apical-basal y secretan proteínas, como el PSA y la fosfatasa prostática alcalina, al igual que fluidos de sus superficies apicales en el lumen prostático (Berry et al., 2008; Marker et al., 2003.)

Las células basales epiteliales, por otro lado, están relativamente indiferenciadas y carecen de actividad secretora. Tienen una morfología que va desde formas cuboidales hasta formas aplanadas (Berry et al 2008) y forman una capa continua entre las células secretoras y la membrana basal (Marker et al., 2003).

## **2.2. Función de la próstata**

La función primaria de la próstata es producir secreciones ricas en proteínas, lípidos y colesterol, que son los componentes primarios del líquido seminal y son de apoyo para la fertilidad masculina y para la protección del tracto urinario inferior. Tanto la síntesis como la secreción de estos componentes están reguladas directamente por los andrógenos, los cuales actúan sobre las células epiteliales de la próstata en las cuales se llevan a cabo los procesos de la lipogénesis y la producción de proteínas (Dehm y Tindall, 2006). Estas hormonas adicionalmente regulan el mantenimiento continuo del epitelio prostático manteniendo un equilibrio entre la apoptosis y la proliferación celular (Heinlein y Chang, 2004)

La proteína mejor documentada que es secretada por la próstata es el PSA. Es sintetizada por las células epiteliales dentro de la glándula y secretada en el lumen ductal. Su papel fisiológico consiste en realizar cortes proteolíticos en proteínas contenidas en la eyaculación con el fin de solubilizar el líquido seminal, también realiza cortes en el factor IGFBP-3 promoviendo la proliferación celular. (Lilja 1985, Hayward y Cunha, 2000). La expresión de PSA depende casi exclusivamente de la actividad androgénica ya que, en su ausencia, los niveles de PSA son nulos (Hayward y Cunha, 2000).

## **3. Andrógenos**

Los andrógenos son hormonas esteroides pertenecientes a la clase C-19 y son requeridas para el desarrollo sexual masculino y para el mantenimiento del fenotipo. La testosterona y su derivado, la 5 $\alpha$  dihidrotestosterona (DHT), son las dos formas predominantes de andrógenos fisiológicos. Juntos con estas dos hormonas también se agrupan otras formas de andrógenos como la dehidroepiandrosterona y la androstendiona, que son precursores hormonales (Kokontis y Liao, 1999).

La síntesis de andrógenos es controlada por el eje hipotálamo-pituitaria- gónada. El hipotálamo libera a la hormona liberadora de gonadotrofinas de manera pulsátil. Esta estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH) de la glándula pituitaria. A su vez la LH actúa sobre las células de Leydig en los testículos promoviendo la síntesis y secreción de testosterona (Dai et al., 2017). Las células de Leydig están dispersas afuera de los túbulos seminíferos. Las glándulas adrenales también producen una pequeña cantidad de testosterona. (Roy et al., 1999).

La producción de esteroides, tanto en las glándulas adrenales como en los testículos, empieza con el corte de la cadena lateral del colesterol por la CYP11A1 para generar pregnenolona. Esta a su vez es convertida en 17-OH-pregnenolona por la CYP17A1 y posteriormente en dehidroepiandrosterona, la cual es finalmente convertida en testosterona. Después de su síntesis, la testosterona es secretada al suero (Roy et al., 1999). La 5 $\alpha$  DHT también es producida por los testículos, pero la mayor parte de la DHT circulante proviene de la conversión metabólica de la testosterona por la 5 $\alpha$  o 5 $\beta$  reductasa en órganos y tejidos blanco. Solo un pequeño porcentaje de la testosterona y DHT localizadas en el suero se encuentra disponible debido a la presencia de las proteínas de unión, como la globulina de unión a hormonas sexuales (Roy et al., 1999).

Cerca del total de las acciones biológicas de los andrógenos endógenos y compuestos sintéticos relacionados son mediados a través de su unión con el receptor de andrógenos. Tanto la Testosterona como la DHT son capaces de unirse al AR, sin embargo, la DHT se une con una afinidad 10 veces mayor a la testosterona (Mastumoto et al., 2013), esto debido a su carácter hidrofóbico el cual estabiliza el estado de unión entre el ligando y el receptor, reduciendo la tasa de disociación (Dai et al., 2017).

### **3.1. Función de los andrógenos**

La principal función de los andrógenos en los machos es la diferenciación y el mantenimiento de las características sexuales masculinas. Se ha observado que la insensibilidad a androgenos o un AR ausente los organos sexuales masculinos no tienen un desarrollo normal (Matsumoto et al., 2013).

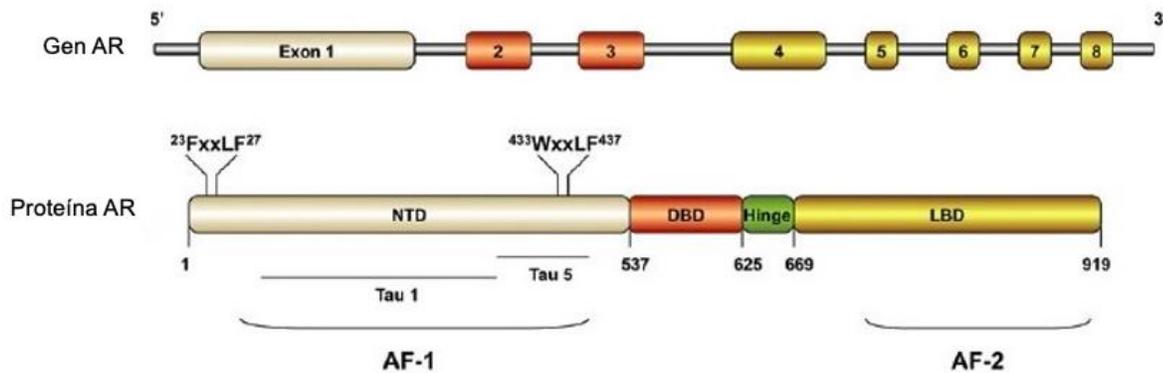
Los andrógenos también son responsables de la espermatogénesis. Esto se lleva a cabo a través de la activación y posterior acción del AR en las células de Sertoli de los testículos. En estudios realizados en ratones ARKO se ha observado que los espermatozoides quedan bloqueados en la meiosis y, asimismo, que genes regulados por el AR participan en la función de las células de Sertoli y de las células de Leydig, las cuales a su vez producen y secretan testosterona (Matsumoto et al., 2013).

Durante la embriogénesis, los andrógenos inducen la formación de la próstata, participan en la morfogénesis de los ductos y en la diferenciación epitelial. De manera interesante se ha observado que la proliferación de las células epiteliales durante este proceso es resultado de la actividad del mesénquima urogenital, el cual expresa AR y al ser estimulado por andrógenos actúa a través de una vía paracrina, por lo que el AR en las células epiteliales no tiene participación directa (Jordan y DonCarlos, 2008; Hayward y Cunha, 2000).

## 4. Receptor de andrógenos

El receptor de andrógenos es una proteína de 919 aminoácidos codificada por un gen de aproximadamente 80 kb localizado en el cromosoma X en la posición q11-q12 y posee 8 exones (Lubahn et al., 1988). El promotor del AR posee elementos de respuesta a AMPc y a diferentes factores de transcripción entre los que se encuentran SRY, SF1, ER, NFKB y el mismo AR, sin embargo, no posee las secuencias consenso TATA y CAAT (Gobinet et al., 2002).

El AR es un factor de transcripción activado por ligando. Es miembro de la subfamilia de receptores de hormonas esteroideas, de la superfamilia de receptores nucleares (NR). Similar a otros receptores esteroideos, consta de 4 principales dominios funcionales: El primer exón codifica para el dominio amino terminal (NTD), los exones 2 y 3 codifican para las secuencias que contienen los dos dedos de zinc en el dominio de unión a DNA (DBD). Parte del exón 4 contiene la región de bisagra y los exones 4 al 8 codifican para el dominio de unión a ligando (LBD) (Fig. 1) (Lindzey, 1994).



**Figura. 2. Estructura del gen y proteína del AR.** En el gen se observa la localización de los 8 exones y el color correspondiente con el dominio de la proteína al que codifican (blanco: exón 1-dominio amino terminal, rojo: exón 2 y 3-dominio de unión a DNA y amarillo: exón 4, 5, 6, 7 y 8-dominio de unión a ligando). La proteína muestra los dominios de los que se conforman y el número de aminoácidos que los conforman, adicionalmente se observa la localización de los dominios de interacción con correguladores AF-1 y AF-2. modificado de Lonergan et al., 2011

### 4.1. Dominio de unión a ligando

Está conformado por 11 alfa hélices y 2 láminas  $\beta$  antiparalelas. La estructura consiste en un doblez de 3 capas de alfa hélices, en la cual las hélices 1 y 3 forman la primera capa. La capa de en medio está formada por la hélice 4, 5, 8 y 9 y la primera lamina beta. La tercera capa está formada por la hélice 10 y 11. Las regiones amino terminales de las hélices 3, 5 y 11 están dispuestas de manera contigua y forman una cavidad en la cual se posicionan los ligandos al unirse al AR. Las primeras 11 hélices contienen los aminoácidos responsables de las interacciones directas con el ligando, que dependiendo del autor pueden ser 18 o 20 aminoácidos. (Estebañez-Perpiña et al., 2021; Dehm, 2007). La mayoría de dichos aminoácidos son de tipo hidrofóbico y están involucrados en la

interacción con el andamiaje esteroideo de los ligandos agonistas. Los residuos restantes son polares y forman puentes de hidrogeno con los átomos polares del ligando (Estebañez-Perpiña et al., 2021).

Al unirse un ligando agonista al AR, induce un cambio conformacional en el LBD en donde la hélice 12 del extremo carboxilo terminal cambia para formar una tapa sobre el pocket de unión a ligando, estabilizando así la interacción AR-ligando. Este cambio conformacional da como resultado la formación de una superficie llamada AF-2 (Dehm y Tindall 2007).

AF-2 es una hendidura hidrofóbica flanqueada por regiones concentradas de cargas positivas y negativas (Dehm y Tindall, 2007). Originalmente se describió como sitio de unión para motivos LxxLL presentes en proteínas coactivadoras que promueven la actividad transcripcional de AR, sin embargo, posteriormente se descubrió que también participa en una interacción entre el dominio amino terminal y el dominio carboxilo del AR, la cual es andrógeno dependiente y esta mediada por la unión directa de los motivos FxxLF y/o WxxLF en el dominio NTD del AR con el dominio AF-2 (He et al., 2000).

La interacción entre dominios promueve la estabilización de la hélice 12 y de la unión del ligando con el AR (He et al 1999). Adicionalmente, se descubrió que es necesaria para que el AR se una a la cromatina y pueda ejercer su actividad transcripcional (Li et al., 2006). Sin embargo, una vez unido al DNA esta interacción se pierde y se unen proteínas correguladoras al AF-2 (van Royen et al., 2007).

El LBD no solo es capaz de interactuar con testosterona y DHT, sino también con un diverso número de agonistas y antagonistas esteroideos y no esteroideos. En particular, la unión de antagonistas bloquea la actividad de AF-2 y promueve el reclutamiento de moléculas correpresoras a los promotores de los genes regulados por AR, inhibiendo la expresión de dichos genes (Dehm y Tindall, 2007).

## **4.2. Dominio de unión a DNA**

Es el dominio más conservado entre la familia de receptores nucleares, está involucrado en la dimerización y en la unión a DNA. Consta de 2 dedos de zinc (Dehm y Tindall, 2007) que son codificados de manera separada por los exones 2 y 3 (Shen y Coetzee, 2005). Cada dedo de zinc consta de 25 aminoácidos y están configurados de manera que un ion de zinc está unido a 4 residuos de cisteína en la base de cada asa (Shen y Coetzee, 2005). El primer dedo contiene la caja P, conformada por 3 residuos de aminoácidos (Gli578, Ser579, Val582) los cuales son los encargados del reconocimiento y unión con el giro mayor del DNA. El segundo dedo contiene la caja D, compuesta por 5 aminoácidos (Ala597 Ser-Arg-Asn-Asp601) y es la interfaz de dimerización del AR (Dehm y Tindall, 2007).

El receptor se une a secuencias cortas de DNA altamente conservadas comúnmente conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE), que consisten en un par de secuencias hexaméricas palindrómicas separadas por un espaciador de 3 pares de bases. (Luisi et al., 1997).

### 4.3. Región de bisagra

Entre el dominio de unión a DNA y el LBD se encuentra la región de bisagra, la cual contiene la señal de localización nuclear del receptor (NLS) que consiste en la secuencia RKcyeagmtlgaRKLKK la cual va de los aminoácidos 618-636. Los residuos 629-634 de este motivo median la importación nuclear del receptor a través de la interacción con el complejo importina a-importina b. La actividad de la NLS es dependiente de la unión de ligando, por lo que se cree que un cambio conformacional tiene lugar posterior al que ocurre al unirse el ligando con el LBD (Clinckemalie et al., 2012).

El motivo comprendido de los residuos 628 a 646 se cree tiene actividad inhibitoria sobre el receptor ya que al ser eliminado de la secuencia se observa un receptor con mucha más potencia. Esto se cree es debido a una secuencia en esta región denominada como secuencia PEST (región de 10 a 60 aminoácidos rica en (Pro) prolina, (Glu) ácido glutámico, (Ser) serina y (Thr) treonina) putativa la cual funciona como una señal que promueve la degradación del receptor (Clinckemalie et al., 2012).

### 4.4. Dominio amino terminal

Representa el 60% de la proteína del receptor, su principal componente es el dominio AF-1 en el cual reside la actividad transcripcional del NTD y cuyas funciones son independientes de ligando. AF-1 a su vez está conformado de dos unidades: la unidad dependiente de ligando TAU-1 (aminoácidos 101-307) y la unidad independiente de ligando TAU-5. La unidad TAU-1 se ha dividido en 2 regiones de activación denominadas AF-1a y AF-1b, dependiendo del contexto celular ambas regiones se ha observado pueden ser tanto indispensables como no necesarias para la actividad transcripcional del receptor al eliminarlas de su secuencia (Dehm y Tindall, 2007).

Por su parte, TAU-5, que abarca los aminoácidos 360 al 528, es un dominio cuya activación es autónoma e independiente de la presencia del LBD, mientras que TAU-1 si depende de la presencia de este dominio. TAU-5 actúa como un modulador, siendo blanco de proteínas correguladoras entre las que se encuentran PRK1 y SRC/p160 (Dehm y Tindall, 2007). También se ha observado que este dominio es blanco de SUMOilaciones en los residuos 385 y 511; esta modificación post traduccional se cree está ligada a la represión de la activación transcripcional (Claessens et al., 2008).

Además de interactuar con el dominio LBD, el motivo FxxFL (aa 23 a 27) en el NTD funciona como un sitio de unión para la proteína MAGE-A11 la cual interactúa con proteínas como CBP p300 y p160, representando un coactivador transcripcional (Bai et al., 2005). La secuencia del NTD se caracteriza además por poseer regiones de repetidos de glutamina, glicina y prolina. En particular hay 3 repetidos de poli glutaminas, los cuales pueden estar conformados por 9 a 36 residuos, que influyen directamente en la conformación tridimensional del receptor; un dominio amino terminal con repetidos más extensos en residuos Gln formara un mayor número de alfa hélices y un menor número de estructuras b. Por el contrario, al eliminar los repetidos de poli glutaminas el número de estructuras b en el NTD aumenta significativamente y el de alfa hélices disminuye (Davies et al., 2008). A su vez, la longitud del tramo de poliglutaminas también es inversamente relacionado con la capacidad de transactivación del receptor (Buchanan et al., 2004). El incremento en poliglutaminas mayor a 35 puede causar atrofia muscular espino bulbular,

mientras que una reducción en glutaminas se ha relacionado con un incremento en cáncer de próstata (Buchanan et al., 2001)

El repetido de glicinas (GGC), en promedio, posee de 16 a 18 residuos, a diferencia del repetido de glutaminas la longitud de este repetido no afecta la actividad transcripcional del AR, aunque si existe una ligera correlación entre un repetido de glicinas corto y un mayor riesgo de desarrollar cáncer de próstata (Ding et al., 2004).

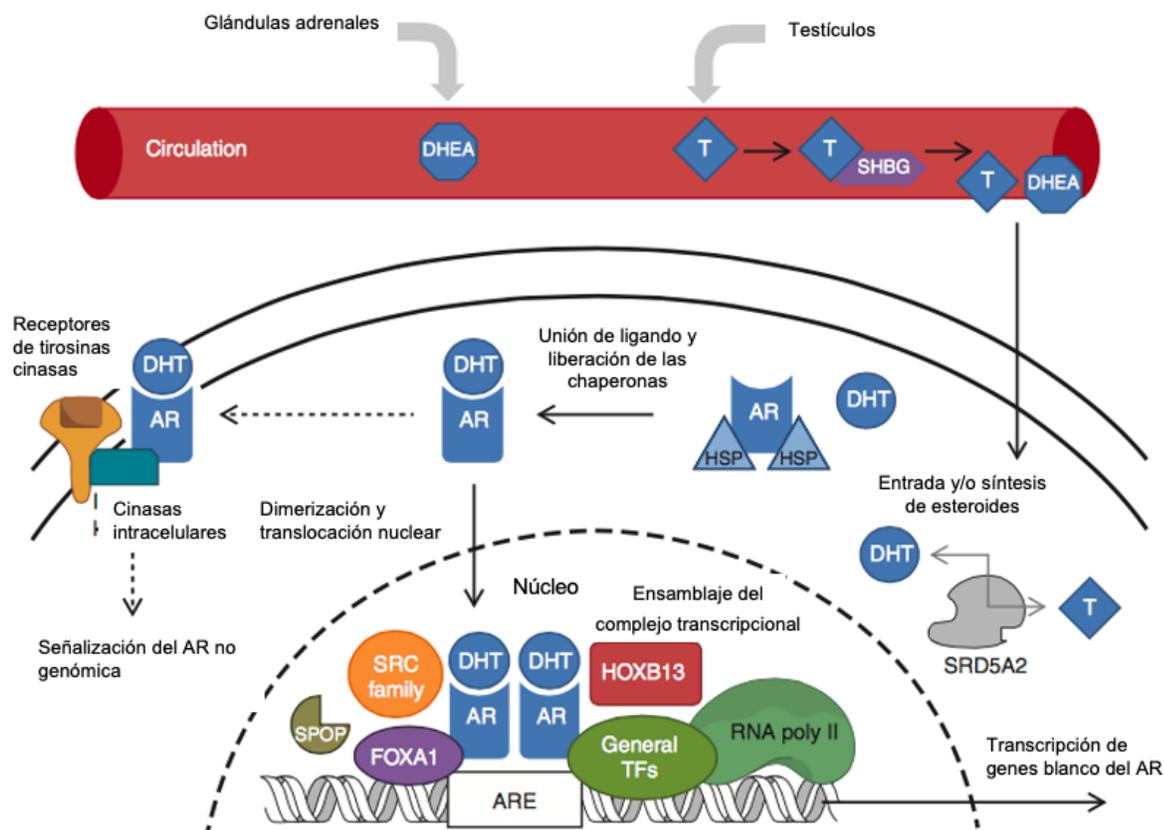
#### **4.5. Mecanismo de acción del AR**

Cuando no está unido a un ligando, el AR se encuentra predominantemente en el citoplasma en un estado no plegado unido a proteínas chaperonas de la familia de las proteínas de choque térmico (HSP), entre las que se encuentran la HSP90 y HSP70, esto con el fin de evitar la degradación del receptor.

HSP90 se une directamente al receptor manteniéndolo en un estado óptimo para su interacción con hormonas. Por su parte HSP70 participa en el ensamblaje de proteínas y se une a las mismas cuando están recién sintetizadas (Gobinet et al., 2002).

La unión del ligando al LBD del receptor provoca un cambio conformacional en el AR con el cual se disocia de las HSP y adquiere una estructura más compacta que le permite unirse al DNA. Adicionalmente este cambio desenmascara los motivos de dimerización y la señal de localización nuclear del receptor, promoviendo la formación de homodímeros y su posterior translocación al núcleo en donde se une a los AREs (Wang y Sadar, 2006; Gobinet, 2002) localizados en las regiones promotoras y enhancers de genes blanco (Claessens et al., 2001).

Posterior a su unión con los AREs, el receptor recluta a los componentes de la maquinaria de transcripción incluyendo a la RNA polimerasa II, al igual que a otros factores de transcripción y proteínas correguladoras las cuales poseen actividades enzimáticas capaces de descompactar la cromatina. (Gobinet et al., 2002) (Fig. 2).



**Figura. 3. Mecanismo de acción del AR.** Modulación de la acción del receptor de andrógenos por la dihidrotestosterona dentro de una célula de cáncer de próstata. Se muestran ejemplos de correguladores transcripcionales siendo una representación limitada de todas las proteínas que participan en el proceso. (AR receptor de andrógenos, T testosterona, DHT dihidrotestosterona, DHEA dehidroepiandrosterona, SHBG globulina de unión a hormonas sexuales, HSP proteína de choque térmico, TFs factores de transcripción, ARE elemento de respuesta a andrógenos) tomado y modificado de Dai et al., 2017

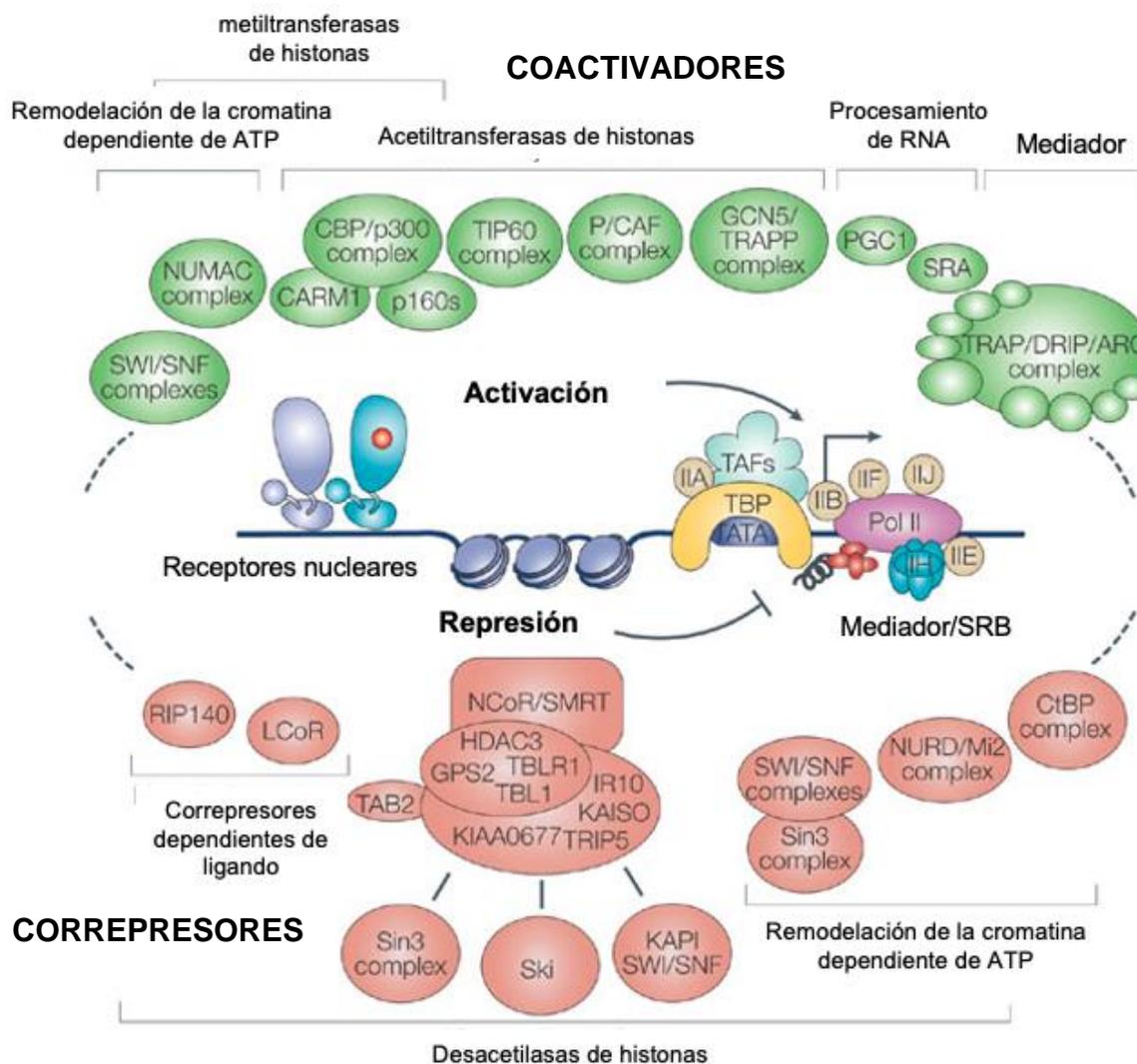
## 5. Correguladores

Al ser un factor de transcripción, el AR activado por ligando actúa en cooperación con otras proteínas regulatorias denominadas correguladores, con el fin de amplificar la señalización mediada por el receptor. En general, los correguladores no se unen directamente al DNA y son más bien reclutados a la cromatina por factores de transcripción, o como parte de complejos regulatorios de múltiples subunidades (Matsumoto *et al.*, 2013). Se dividen en 2 clases generales: coactivadores y correpresores.

Los coactivadores están caracterizados por su habilidad para potenciar la transactivación de los receptores nucleares al interactuar con diferentes dominios de los receptores activados por un ligando agonista (Hsia *et al.*, 2010). Algunos coactivadores de los receptores hormonales esteroideos incluyen a la familia p160 (SRC-1, SRC-2, SRC-3), CBP y p300 (Fig. 4, proteínas en color verde). Estos coactivadores poseen actividad intrínseca de acetiltransferasa de histonas (HAT). Sumado a los coactivadores con

actividad HAT, se ha demostrado que el receptor de andrógenos recluta a los llamados coactivadores asociados al AR (ARA): ARA70, ARA55 y ARA54 (Grossmann *et al.*, 2001). Adicional a la actividad de acetil transferasa de histonas, los corre reguladores pueden actuar por otros mecanismos bioquímicos entre los que se encuentran la modificación de histonas, la degradación proteosomal, fungir como chaperonas celulares, proteínas de andamiaje, la sumoilacion, la remodelación de la cromatina y el citoesqueleto (Culig y Santer 2011).

Estudios de función y estructura han revelado que muchos coactivadores interactúan directamente con el AR unido a ligando mediante motivos LXXLL, conocidos como cajas NR. Estos motivos promueven la interacción de coactivadores con la región AF-2 en el dominio LBD (Heery *et al.*, 1997).



**Fig. 4. Clasificación de los corre reguladores.** En la parte superior se observan las familias de coactivadores en color verde y clasificadas de acuerdo a su función, mientras que en la parte inferior se muestran en rojo las familias de corre presores clasificadas de acuerdo a su función. Tomado y modificado de Perissi y Rosenfeld, 2005

## Correpresores

Los correpresores fueron identificados como mediadores que reprimen selectivamente la transcripción de genes dependientes de receptores nucleares a través de la interacción con receptores no unidos a su ligando o unidos a antagonistas (Hsia *et al.*, 2010), ejerciendo su efecto negativo sobre la transcripción mediante el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs) (Fig. 4, proteínas en color rojo). Sin embargo, cada vez se conocen más correpresores que se unen en presencia de ligandos agonistas para reprimir la transcripción.

## 6. Papel del AR en la próstata

Como se mencionó previamente, los andrógenos a través del AR son los encargados del mantenimiento del epitelio prostático. En la próstata normal la tasa de muerte celular es del 1-2% por día, lo cual está balanceado por una tasa de 1-2% de proliferación, particularmente de células epiteliales secretoras (Dehm y Tindall, 2006). Este balance se logra a través de la inducción, andrógeno dependiente, de la expresión de las CDK2 (cinasa dependientes de ciclina 2) y 4 y de la inhibición del inhibidor del ciclo celular p16, mientras que, por otro lado, en presencia de andrógenos, el AR induce la expresión del inhibidor p21. En cuanto a supervivencia y muerte celular, el AR inhibe la expresión de la proteína de supervivencia bcl-2 (Culig *et al.*, 2000).

### 6.1. Papel del AR en cáncer de próstata

El desarrollo del cáncer de próstata también es dependiente de la actividad de los andrógenos y el AR (Matsumoto *et al.*, 2013). Sin embargo, el papel preciso que juega el AR al inicio del desarrollo del cáncer permanece sin ser esclarecido. A pesar de esto, se ha descrito que hay un cambio en el patrón de unión del AR a los promotores de sus genes blanco, dando como resultado cambios en la expresión de un grupo diferente de genes entre una fase benigna y las distintas fases del cáncer, lo que a su vez origina cambios en la proliferación y en la supervivencia de células del carcinoma (Copeland *et al.*, 2018).

Existen posibles mecanismos a través de los cuales los patrones de unión del AR con el DNA son alterados, entre los que se encuentran: cambios en la estructura de la proteína del AR o en su expresión, alteraciones en las asociaciones con proteínas correguladoras del AR, cambios en la estructura de la cromatina que indirectamente impactan en el reclutamiento del AR y aumento en los niveles de andrógenos (Copeland *et al.*, 2018, Culig *et al.*, 2014).

Por otro lado, se cree que durante los inicios de la enfermedad, la transición maligna de la actividad del AR también se debe a que un grupo de células epiteliales prostáticas dejan de ser dependientes de señales estromales paracrinas y se vuelven dependientes a señales androgénicas autónomas de la misma célula, sin embargo, aún no es claro cuál es el papel exacto del receptor durante el inicio de la enfermedad (Culig *et al.*, 2014).

## **7. Cáncer de próstata resistente a la castración**

Cuando el cáncer de próstata se localiza sólo en la próstata, el tratamiento de elección es la prostatectomía o la radiación. Sin embargo, se ha observado que en más del 50% de los casos el tumor resurge en aproximadamente 5 años, cuando esto sucede o cuando se encuentra en un estado de metástasis a la hora de diagnóstico, la terapia de ablación androgénica es la primera opción. (Kirby et al., 2011, Debes y Tindal, 2004, Ichikawa et al., 2005). La terapia consiste en el uso de 2 tipos de fármacos; aquellos que tienen como blanco inhibir la vía de biosíntesis esteroidea a través de efectos en las glándulas adrenales, las gónadas, el hipotálamo o la glándula pituitaria incluyendo la abiraterona, el leuprolide y el finasteride. El otro tipo de fármacos son aquellos que actúan directamente sobre el AR directamente, por ejemplo, la bicalutamida, la flutamida y la enzalutamida (Estebañez-Perpiña et al., 2021). A pesar de que esta estrategia se utiliza desde hace más de 50 años, la mayoría de los tumores eventualmente se vuelven independientes a los andrógenos y progresan a pesar de la falta de estas hormonas. Esta etapa es conocida como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC) y los tratamientos son escasos y únicamente paliativos, la supervivencia media a partir del inicio de esta etapa es de solo 14 meses (Kirby et al., 2011, Debes y Tindal, 2004, Ichikawa et al., 2005).

En esta etapa se ha observado que el AR continúa expresándose y permanece activo a pesar de la falta de andrógenos. Los mecanismos a través de los cuales se desarrolla el CPRC se dividen en 2 grupos: aquellos en los que está involucrado el AR y aquellos independientes de este receptor (Debes y Tindal, 2004, Ichikawa et al., 2005).

### **7.1. Mecanismos dependientes de AR**

#### **7.1.1. Amplificación y sobreexpresión del AR**

Se ha observado que en alrededor de un 30% de los casos de CPRC el gen del AR se encuentra amplificado (Debes y Tindall et al., 2004, Edwards y Barlett 2005), lo cual no es común en tumores primarios dependientes a andrógenos. Esta amplificación a su vez se traduce en una mayor expresión de mRNA del AR, aunque también se han observado casos de sobreexpresión del receptor sin que el gen se encuentre amplificado (Holzbeierlein et al 2004). El aumento en los niveles del AR promueve la amplificación de la señal en presencia de los bajos niveles de andrógenos que permanecen posterior al tratamiento de ablación (Ichikawa et al., 2005)

#### **7.1.2. Mutaciones en el gen del AR**

Se ha observado que en alrededor de 10 a 20% de los casos de cáncer de próstata avanzado, el gen del AR se encuentra mutado, adicionalmente, la frecuencia de mutaciones es mayor en casos de CPRC que en casos de cáncer dependiente de andrógenos (Marcelli et al., 2000, Agoulnik y Weigel 2006). En particular, muchas de las mutaciones que promueven el desarrollo del CPRC se encuentran en el LBD y le confieren la capacidad al AR de ser activado por otro tipo de ligandos como estrógenos, progesterona o por los mismos anti andrógenos utilizados como tratamiento (Debes y Tindall, 2004).

Una de las mutaciones mejor descritas es la T877A, un cambio de treonina por alanina que originalmente se describió en la línea LNCaP, pero también se ha observado en muestras clínicas (Susuki et al., 1993). La sustitución por alanina, debido a que su cadena lateral es menor, causa que la cavidad de unión a ligando se vuelva más amplia y dando más espacio para que otros ligandos se unan al AR y logren activarlo (Steketee et al., 2002).

### **7.1.3. Desregulación de factores de crecimiento y citocinas**

Se ha descrito que la actividad del AR es regulada por vías de señalización de diferentes factores de crecimiento como EGFR, IGF y KGF y citocinas entre las que se encuentran la vía de la IL-6 (Gioeli, 2005, Ueda et al., 2002). Cinasas tales como JAK y MAPK fosforilan diversos residuos del NTD del receptor promoviendo su activación, aún en ausencia de ligando (Ichikawa et al., 2005). En cáncer de próstata avanzado, el nivel de estos factores se encuentra incrementado, lo que se traduce en un aumento en la señalización autocrina de factores de crecimiento y a su vez del AR (Gioeli, 2005).

### **7.1.4. Desregulación de correguladores**

Estas proteínas modulan la actividad del AR a través de un rango amplio de actividades enzimáticas. Cuando se encuentran desreguladas, algunas pueden potenciar la actividad del AR en presencia de bajas concentraciones de hormona, permitir que el AR utilice otras hormonas, agonistas débiles o antagonistas como agonistas, o potenciar la acción independiente de ligando del AR (Agoulnik y Weigel, 2006). Todo esto es doblemente impactado porque la mutación del AR también actúa a este nivel.

En general, cuando se comparan los niveles de expresión de correguladores en tumores primarios contra tejido normal no se observan diferencias significativas, sin embargo, al comparar los niveles de expresión con el tiempo a la recurrencia o con marcadores de una enfermedad agresiva, si se revelan correlaciones significativas, incrementándose la expresión del coactivador en estadios más tardíos y reduciéndose la expresión de correpresores (Linja et al., 2004).

Entre los coactivadores mejor descritos cuya expresión suele estar incrementada en cáncer de próstata primario y avanzado son los miembros de la familia de p160 (conformada por SRC-1, SRC-2 y SRC-3) (Agoulnik et al., 2005, Gregory et al., 2001, Zhou et al., 2005). Los miembros de esta familia actúan promoviendo la proliferación celular, la supervivencia y la actividad del AR de manera independiente de ligando (Ueda et al., 2002, Zhou et al., 2005).

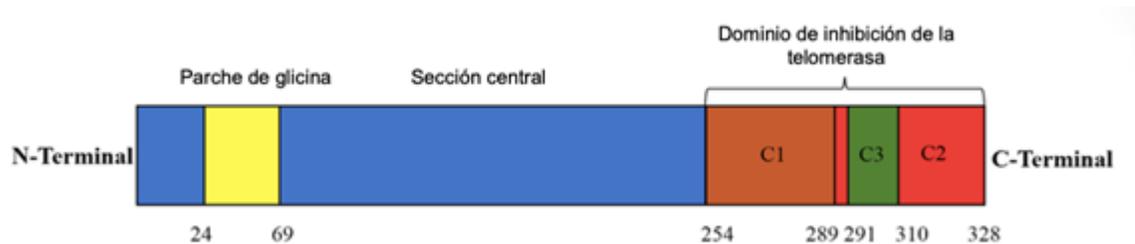
Por su parte, se ha comprobado que los correguladores CBP/p300 se sobreexpresan en modelos in vitro de privación androgénica y clínicamente, su sobreexpresión se correlaciona con características agresivas en tumores prostáticos (Debes et al., 2003). Adicionalmente, participan en la activación del AR independiente de ligando mediada por interleucinas (Lee et al., 2009) y también promueve efectos agonistas del antagonista flutamida unida al AR (Comuzzi et al., 2003).

## 8. PinX1

En nuestro laboratorio se han caracterizado varios correguladores de receptores de hormonas esteroides. Utilizando el ensayo de doble híbrido en levaduras, se detectó a PinX1 como una proteína que se une al ER $\alpha$ , interactuando con su dominio amino terminal (Noriega-Reyes *et al.*, 2015). Posteriormente, se observó que, en líneas celulares de cáncer de mama, PinX1 inhibe la actividad transcripcional de este receptor en presencia de estradiol, así como la proliferación celular. Esto llevó a proponer a PinX1 como un correpresor del ER $\alpha$  en células de cáncer de mama. Adicionalmente, un ensayo de luciferasa en una línea celular de cáncer de próstata demostró que PinX1 era capaz de incrementar la actividad transcripcional del AR en presencia de DHT (Noriega-Reyes *et al.*, 2015).

PinX1 se describió originalmente como una proteína de 328 aminoácidos y peso molecular de 45 kD que posee actividad inhibitoria de la telomerasa. PinX1, en asociación con TRF1 (telomeric repeat binding factor 1) y otras proteínas, regulan la habilidad de la telomerasa para elongar telómeros. PinX1 también es capaz de unirse directamente a la telomerasa e inhibir su actividad.

El dominio de inhibición a la telomerasa en PinX1 se encuentra en el extremo C terminal y va de los aminoácidos 254-328 (Zhou y Lu, 2001). La región de 254-289 específicamente se une a Pin2/TRF1, esta interacción juega un papel en la estabilización de los telómeros. La región de 290-328 contiene una señal de localización nuclear y puede asociarse con TERT, siendo esencial para la actividad de la inhibición de la telomerasa (Chen *et al.*, 2010). Por su parte, en el extremo amino terminal de PinX1 existe un dominio de parche de glicinas (aa 24-69), el cual está involucrado en el procesamiento de la maduración de RNA ribosomal y snoRNAs y el metabolismo de telómeros (Li *et al.*, 2016).



**Figura 5. Estructura de PinX1.** El dominio de parche de glicina se encuentra en el extremo N terminal (24-69 aa), el dominio de inhibición de la telomerasa (TID) se encuentra en el extremo C terminal. La región C1 del TID se une específicamente a Pin2/TRF1, la región C2 contiene la señal de localización nucleolar y se asocia con TERT, la región C3 es reconocida de manera específica por TRF1. Tomado y modificado de Li *et al.*, 2015.

Recientemente, se ha descrito que a partir del gen de PinX1 se pueden generar al menos 2 productos proteicos (Baichuan *et al.*, 2015, Chan *et al.*, 2020). Sin embargo, aún no se ha establecido una nomenclatura oficial para las variantes de PinX1; Chan *et al.*, reportaron una variante en ratón nombrada como PinX1t, debido a su forma trunca en el extremo carboxilo, dicha proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 16 kDa. (Liao C. *et al.*, 2000) inicialmente habían clonado la forma pequeña de PinX1 en tumores hepáticos, la cual nombraron LPTS (Liver Putative Tumor Suppressor), y posteriormente

estudiaron ambas isoformas denominándolas LPTS-L y S (Park et al., 2022, Liao C et al., 2002). En este proyecto, hemos estudiado los efectos de ambas variantes de PinX1 en líneas celulares de cáncer de próstata a las cuales denominamos como PinX1L (long), que corresponde a la proteína de 45kDa originalmente reportada, y PinX1s (short) una isoforma de 37 kDa la cual carece del dominio de inhibición de la telomerasa (Flores-Ramírez et al., 2021).

### **8.1. Corregulador PinX1 en cáncer**

El gen de PinX1 se encuentra localizado en el cromosoma humano 8p23, la cual es una de las regiones más frecuentes con pérdida de heterocigocidad en carcinomas epiteliales. Se ha demostrado que la expresión de PinX1 se encuentra reducida en cáncer de mama, incrementando la actividad de la telomerasa y conduciendo a una inestabilidad cromosómica (Zhou, 2011). Adicionalmente, se descubrió que PinX1 inhibe la migración y la invasión de células de cáncer de mama (Shi *et al.*, 2015) así como la proliferación y clonogenicidad (Noriega-Reyes et al., 2015). Se ha visto que la sobreexpresión de PinX1 inhibe significativamente el crecimiento de células de carcinoma hepatocelular (Liao et al., 2000, 2002). En ratones desnudos se observó que la depleción de PinX1 incrementa la tumorigenicidad. Por ello, se ha considerado a PinX1 como un posible supresor de tumores.

En muestras de cáncer de próstata que la expresión de mRNA y proteína de PinX1 se encuentra inhibida con respecto a tejido prostático normal adyacente (Shi *et al.*, 2014), sin embargo, también se han realizado estudios que muestran patrones de expresión opuestos de PinX1 en otros tipos de cánceres incluido el carcinoma esofágico de células escamosas y el carcinoma cervical de células escamosas.

Sumado a su papel como inhibidor de la telomerasa se ha visto que PinX1 puede unirse a microtúbulos, participando en la estabilidad y segregación cromosomal (Yuan et al., 2009). Sin embargo, el papel de PinX1 en células de cáncer humano aún necesita ser dilucidado con totalidad.

Recientemente se observó que PinX1 se encuentra sobre expresado en muestras de pacientes y líneas celulares de cáncer tiroideo, con respecto a tejido y células benignas, asimismo se observó que PinX1 promueve la proliferación celular, la capacidad de migración y la expresión de marcadores de EMT en líneas celulares de cáncer tiroideo, así como el crecimiento de tumores en un modelo murino (Kang *et al.*, 2021).

## **Planteamiento del problema:**

Debido al importante papel que juega el AR en el cáncer de próstata, estudiar la regulación de su actividad por correguladores puede contribuir a una explicación de la progresión del cáncer, así como arrojar nuevos posibles blancos terapéuticos para su tratamiento. Así mismo, al saber que el corregulador PinX1 es capaz de incrementar la actividad transcripcional del AR es importante determinar sus efectos sobre las células de cáncer de próstata.

## **Hipótesis:**

El corregulador PinX1 actúa como coactivador del receptor de andrógenos, incrementando su actividad transcripcional e induciendo proliferación celular en un modelo celular de cáncer de próstata.

## **Objetivos:**

1. Evaluar la interacción entre PinX1 y diferentes dominios de AR.
2. Analizar el efecto de la sobreexpresión de PinX1 sobre la actividad transcripcional del receptor de andrógenos.
3. Examinar la interacción de PinX1 sobre promotores que contengan AREs de genes regulados por el AR.
4. Evaluar el efecto de la sobreexpresión y silenciamiento de PinX1 sobre la proliferación, la clonogenicidad y la migración celular
5. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de PinX1 sobre la expresión de genes blanco del AR.
6. Estudiar la especificidad, receptor dependiente, de Pinx1 como corregulador en células de cáncer de próstata.

## **Metodología**

### **Cultivo celular y ensayos de transfección**

Todas las líneas fueron obtenidas de ATCC y analizadas para descartar micoplasma, utilizando el kit de Detección de Micoplasma (EP33100, Norgen, Biotek). Las células fueron sembradas únicamente durante 30 pasajes, posteriormente fueron reemplazadas con stocks nuevos. Las líneas celulares humanas de cáncer de próstata LNCaP, 22Rv1 y la línea de próstata normal hPrEC (todas positivas para la expresión de AR) fueron cultivadas en medio RPMI-1640, la línea de CaP, PC3 (AR negativa), fue cultivada en medio DMEM-F12-K, y la línea DU-145 (AR negativa) fue cultivada en medio DMEM. El medio fue suplementado con 8 % de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina y las células fueron cultivadas en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las transfecciones, tanto estables como transitorias, fueron llevadas a cabo en medio libre de rojo fenol con suero fetal bovino tratado con carbón activado (sSFB) en un porcentaje entre 0.5 a 2, dependiendo la línea celular. utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para las transfecciones estables, las células transfectadas fueron cultivadas en medio libre de rojo fenol suplementado con 8% de suero fetal bovino y tratadas con Geneticina a concentraciones previamente determinadas dependiendo la línea celular, con el fin de seleccionar las que fueron transfectadas establemente durante al menos 4 semanas.

### **Plásmidos**

pcDNA-PinX1s fue construido a partir de un plásmido obtenido previamente de un ensayo de doble híbrido (Noriega-Reyes et al., 2015). Se utilizaron los sitios de restricción EcoRI y XhoI para clonar en un vector pcDNA3.1-His (Invitrogen). Los vectores de expresión en procariontes usados para los ensayos de GST Pull-down fueron construidos utilizando el vector pDEST17 del sistema Gateway (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación. pCMV-Sport6 PinX1L fue obtenido de OriGene Technologies (Rockville). Las construcciones del AR fueron provistas por la Dra. Elizabeth Wilson (Universidad de Carolina del Norte, USA), el plásmido reportero de andrógenos MMTV-Luc fue provisto por el Dr. Ron M. Evans (Salk Institute, USA). Los plásmidos de PinX1 shRNA fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. PinX1. El shRNA #1 corresponde a TRCN0000128607 y el shRNA # 2 corresponde a TRCN0000129771.

### **Ensayos de inmunofluorescencia**

70,000 células 22rv1 fueron sembradas por pozo en laminillas de cultivo y crecidas con medio RPMI 1640 sin rojo fenol y suplementado con 1.5% sSFB por 48 horas, posteriormente fueron tratadas con vehículo (EtOH absoluto), DHT 5 nM o 4-hidroxi-flutamida (Flu) 250 nM y fijadas con paraformaldehído al 2% por 5 minutos y lavadas con PBS. Las células se bloquearon con suero fetal de caballo al 5% en PBS por 40 minutos, lavadas y después incubadas con anticuerpos anti AR (sc-7305, Santa Cruz Biotechnology) o anti PinX1 (ab190252 Abcam, Cambridge, UK) (1:100 y 1:250, respectivamente) diluidos en solución de bloqueo en una cámara húmeda a 4°C durante toda la noche. Las laminillas fueron lavadas con PBS e incubadas con anticuerpos secundarios (Alexa fluor 647 donkey antimouse, Invitrogen y Alexa fluor 488 goat antirabbit, Invitrogen) (1:400) durante 2 horas y lavadas nuevamente. Para estudiar la colocalización de AR y PinX1, las laminillas fueron incubadas con un segundo anticuerpo

primario (AR o PinX1) seguido de su propio anticuerpo secundario usando las mismas condiciones que para la primera detección. Se realizaron lavados con PBS antes y después de añadir cada anticuerpo y las laminillas fueron montadas con Vectashield H-1200 el cual contenía DAPI (Vector Laboratories). Las imágenes fueron adquiridas con un aumento de 100X utilizando microscopia confocal en un microscopio invertido Elyra PS.1 de súper resolución (Carl Zeiss). Los análisis de fluorescencia se llevaron a cabo a partir de 3 o 4 campos por pozo a partir de 2 experimentos independientes utilizando ZEN Blue (Carl Zeiss)

### **Ensayo de Co-Immunoprecipitación**

Se sembraron  $4.2 \times 10^6$  células 22Rv1 en medio RPMI sin rojo fenol adicionado con 2% de SFB tratado con carbón activado (sSFB) durante 24 horas y posteriormente se dieron tratamientos durante 8 hrs de DHT (5 nM) o Flu (250 nM). Las células fueron cosechadas y lisadas con buffer de lisis para CO-IP (25 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 y 2.0% glicerol). Los restos celulares se precipitaron por centrifugación a 14,000 rpm a 4 °C durante 30 min y el sobrenadante fue incubado con proteína A/G-sefarosa (Sigma) a 4 °C durante 30 min para eliminar la interacción inespecífica. Posteriormente, se cuantificó la proteína mediante el método de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 1 5000201, BioRad). Se utilizaron 500 ug de proteína por inmunoprecipitación, llevada a cabo con anticuerpos monoclonales anti-AR (Santa Cruz Biotechnology) o PinX1 (Abcam) (1 ug de anticuerpo por 300 ug de proteína) a 4 °C durante 1 hora seguida de incubación con proteína A/G-sefarosa durante toda la noche a 4 °C. Después de lavar con buffer de lisis para CO-IP 5 veces, en presencia o ausencia de ligando, los inmunoprecipitados se eluyeron hirviendo durante 8 min en buffer de carga de muestra (Laemmli 1x), después se llevó a cabo el SDS-PAGE, y se transfirió a una membrana de nylon. El western blot se realizó con los anticuerpos anti-AR y anti-PX1 y se detectaron con el kit de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific).

El mismo procedimiento se realizó utilizando  $4 \times 10^6$  células LNCaP en presencia de DHT (5nM) o flu (250nM) y posteriormente cosechadas para realizar la coimmunoprecipitación.

### **Ensayos de GST pull-down**

Se utilizaron plásmidos que expresaran diferentes fragmentos del AR fusionados con glutatión-S-transferasa (GST) en el plásmido de expresión en bacterias pGEX-JDK. Las proteínas de fusión con GST fueron: GST-AR-A1 (aa 1-503), GST-AR-ABC (aa 1-660), GST-AR LBD (aa 624-919). Adicionalmente, se utilizó el plásmido pDest17-PinX1 para expresar PinX1 con una etiqueta de histidinas. Los plásmidos fueron expresados en la cepa BL21 de *Escherichia coli*, inducidas con arabinosa al 2% durante 2 horas y purificadas por afinidad a perlas de glutatión-sefarosa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Adicionalmente, PinX1 fue expresado *in vitro* usando lisado de reticulocitos de conejo (TNT T7 sistema de transcripción/traducción de Promega) y marcado con lisil-tRNA (biotina). 30  $\mu$ l de perlas con proteína fusionada a GST se incubaron con 100  $\mu$ l de PinX1 obtenida de lisados bacterianos totales o 10  $\mu$ l de proteína expresada *in vitro* y se incubaron a 4°C por 24h en 500  $\mu$ l de buffer de sonicación (20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0.7 mM EDTA, 0.05% Nonidet P-40, más inhibidores de proteasas) en presencia del ligando de AR, DHT (5nM) o de su antagonista, flu (200 nM). Las perlas se lavaron cinco veces con buffer de sonicación y posteriormente se eluyeron las proteínas hirviendo durante 5 minutos en 50  $\mu$ l de buffer de carga de proteínas

(Laemmli 1x). Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE, seguido de la detección por western blot utilizando anticuerpos contra GST (Santa Cruz Biotechnology) y contra PinX1 (Abcam) para finalmente ser detectados mediante quimioluminiscencia (Kit ECL, Thermo Scientific).

### **Ensayos de luciferasa**

Para estudiar la actividad transcripcional del AR se realizaron ensayos de luciferasa mediante el uso de transfecciones transitorias en las líneas celulares de carcinoma prostático PC3 (AR negativa) usando 29,000 células, DU145 (AR negativa) usando 60,000 células y 22Rv1 (AR positiva) usando 80,000 células. Se sembraron en placas de 24 pozos y se incubaron 24 hrs previas a la transfección en medio DMEM F12, para el caso de las PC3, RPM1 para las 22Rv1 y DMEM para las DU145, sin rojo fenol con 1.5 - 3% de sSFB dependiendo la línea celular. Las células fueron transfectadas usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 200 ng de DNA del plásmido que expresa el reportero de luciferasa (MMTV-Luc), 50 ng de plásmido que expresa el AR (en el caso de las PC3 y DU145), y 100, 150 o 200 ng del plásmido de expresión de PinX1 así como 3 ng de vector de expresión  $\beta$ -galactosidasa como control de transfección. Las células se incubaron durante 48 hrs en presencia o ausencia de DHT (1nM) o Flu (100nM). Se midieron las actividades de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa en el mismo pozo, por luminiscencia en un luminómetro GloMax de Promega.

Por otro lado, para estudiar la actividad transcripcional del ER se realizaron ensayos de luciferasa en las líneas celulares PC3 y 22Rv1 usando 80,000 células. Se sembraron en placas de 24 pozos y se incubaron 24 hrs previas a la transfección en medio DMEM F12, para el caso de las PC3 y RPM1 para las 22Rv1 con suero con 1.5 - 3% de sSFB dependiendo la línea celular. Las células fueron transfectadas usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 200 ng del vector reportero 3x ERE Luc, 50 ng de plásmido que expresa el ER $\alpha$  o el ER $\beta$  (en caso de aplicar), y 100, 150 o 200 ng del plásmido de expresión de PinX1 así como 3 ng de vector de expresión  $\beta$ -galactosidasa como control de transfección. Las células se incubaron durante 48 hrs en presencia o ausencia de E2 (30nM), 2,3-bis(4-hidroxifenil) propionitrilo (DPN) (40nM) o Tamoxifeno (300 nM). Se midieron las actividades de luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa en el mismo pozo, por luminiscencia en un luminómetro GloMax de Promega.

### **Ensayos de proliferación**

La proliferación celular se estudió utilizando el kit colorimétrico de proliferación WST, reactivo que sirve como indicador de viabilidad celular al reducir NADH en presencia de PMS y producir colorante que absorbe a 438 nM (BioVision) en la línea 22Rv1 a lo largo de 10 días. Se sembraron 4 millones de células 22Rv1 en placas de 10 cm en medio RPMI con rojo fenol suplementadas con 8% de SFB. 24 horas después, se cambió el medio por RPMI sin rojo fenol y con 2% de sSFB y las células fueron transfectadas con 4 $\mu$ g de plásmido vacío (pcDNA) o 4 $\mu$ g del plásmido pcDNA-PINX1. 24 horas después las células fueron tripsinizadas y 5000 células fueron sembradas por pozo en placas de 96 pozos. Se dieron estímulos con vehículo, 5nM de DHT o 250 nM de Flu cada 48 horas. 24 horas después del estímulo, las células eran incubadas con el reactivo WST al 10% durante 1.5 horas y finalmente se midió la absorbancia en un lector de placas a 480 nm.

### Ensayos de cierre de herida

Se sembraron 4 millones de células 22Rv1 en placas de 10 cm en medio RPMI con rojo fenol suplementadas con 8% de SFB. 24 horas después, se cambió el medio por RPMI sin rojo fenol y con 2% de sSFB y las células fueron transfectadas con 5 µg de plásmido vacío o 5 µg del plásmido pcDNA-PINX1. 24 horas después, las células fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 6 pozos (900 000 células por pozo), y 24 horas después, habiendo alcanzado una confluencia del 90-100%, se realizó una herida a lo largo del pozo utilizando una punta para micropipeta de 200 µl. Se realizaron 4 lavados con PBS para remover las células flotantes y posteriormente se añadió medio RPMI sin rojo fenol con 3% de sSFB y 50 µM del inhibidor de proliferación AraC (Sigma). Las células se observaron en un microscopio óptico y mediante el método de contraste de fases y utilizando el objetivo 10x se tomaron fotos de cada pozo (tiempo 0). 2 horas después, las células fueron estimuladas con vehículo, DHT (5nM) y Flu (250nM), y se repitió el estímulo cada 24 horas a lo largo de 3 días y cada pozo fue fotografiado. La migración se cuantificó utilizando el programa ImageJ, se midió la herida a las 48 horas en 3 alturas diferentes en cada pozo y se comparó con la misma región del día anterior. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

### Ensayos de qRT-PCR

Se utilizaron  $4.2 \times 10^6$  células de la línea 22Rv1 sembradas en placas de cultivo de 10 cm y crecidas en RPMI sin rojo fenol suplementado con 5% sSFB durante 24 hrs. Posteriormente, se transfectaron pcDNA-PINX1 y pcDNA en placas diferentes, después de 24 hrs las células fueron tripsinizadas y resembradas en placas de 6 pozos con 900,000 células por pozo, por triplicado (3 pozos por condición) en medio RPMI sin rojo fenol con 5% de sSFB. Se trataron las células con DHT y Flu durante 24 hrs. El RNA total fue extraído utilizando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. 1.5 µg de RNA fueron tratados con DNAsa, y posteriormente fueron retrotranscritos a cDNA. 100ng de cDNA fueron amplificados en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems) utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) con oligos específicos para los genes blanco, PSA y Nkx3.1.

Previamente se estandarizaron las condiciones para los oligos utilizados con el fin de encontrar la temperatura ideal y determinar su eficiencia de amplificación.

Se utilizó la amplificación del mRNA de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH) para normalizar los ensayos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

Gen	Secuencia
GAPDH	Forward 5'-CCT CAA CGA CCA CTT TGT CA- 3' Reverse 5'-CCC TGT TGC TGT AGC CAA AT- 3'
PSA	Forward 5'-CCA AGT TCA TGC TGT GTG CT- 3' Reverse 5'-GCA CAC CAT TAC AGA CAA GTG G- 3'
Nkx3.1	Forward 5'-GAG ACG CTG GCA GAG ACC- 3' Reverse 5'-TCC AAC AGA TAA GAC CCC AAG- 3'

**Tabla 1.** Secuencias de oligos usados en el RT-PCR, creación propia

### **Inmunoprecipitación de cromatina**

Se sembraron células LNCaP en medio RPMI sin rojo fenol con sSFB al 4% por 3 días. Antes de ser cosechadas se dieron estímulos con 5 nM de DHT durante 0.5, 1 y 3 horas. Al momento de ser cosechadas se añadió formaldehído al 1% directamente en la placa de cultivo y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió glicina a 0.125M para detener la reacción.

Las células se rasparon en PBS con inhibidores de proteasas, posteriormente se centrifugaron por 4 min a 1000xg a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y los restos se resuspendieron en 0.4 ml de buffer de lisis SDS (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl pH 8.1) y se incubaron en hielo durante 10 min. Las muestras volvieron a centrifugarse 4 min a 2000 rpm, se les descarto el sobrenadante y se les añadió buffer ChIP (150mM NaCl, 25mM Tris-Cl pH 7.5, 5mM EDTA, 1% SDS, 0.5% NaDoc), posteriormente se sonicaron 3 veces durante 15 segundos, se centrifugaron a 14k durante 10 min a 4 °C, la mitad del sobrenadante fue descartado y se añadió buffer ChIP.

Con el fin de reducir la inespecificidad, el sobrenadante se incubó en agitación con suspensión de Proteína A-agarosa/ espermatozoos de salmón durante 30 minutos a 4°C. Finalmente se centrifugaron las muestras y el sobrenadante se dividió en diferentes tubos de acuerdo con el número de inmunoprecipitaciones y se añadieron los anticuerpos, la mezcla se incubó durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente se añadió de nuevo proteína-A-agarosa/ espermatozoos de salmón durante una hora a 4°C. Se precipitó la agarosa por centrifugación y se desechó el sobrenadante y se hicieron lavados durante 30 min con los siguientes buffers:

- Buffer de lavado bajo en sales (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA)
- Buffer de lavado alto en sales (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA)
- Buffer de lavado LiCl (0.25 M LiCl, 20 mM Tris-Cl pH 8.1, 500 mM NaCl, 1% NP40, 1% NaDoc, 2 mM EDTA)
- Buffer Tris-EDTA (TE)

El complejo se eluyó con buffer de elusión (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en rotación. Se añadieron NaCl 5 M y RNasa y posteriormente se revirtió el entrecruzamiento histona-DNA calentando las muestras a 65°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se añadieron EDTA 0.5M, Tris 1M pH 6.5, y proteinasa K 10 mg/ml a los eluidos y se incubó durante una hora a 45 °C.

El DNA se recuperó mediante una extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, finalmente el precipitado se resuspendió en agua estéril y se utilizó 1 µl para ser amplificado mediante PCR en punto final y tiempo real.

<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>
pr Nkx3.1 AREI	Forward 5´- GAT GGG TGG GAG GAG ATG A -3´ Reverse 5´- TGT CTT GGA CAA GCG GAG -3´
pr PSA g/h (AREIII)	Forward 5´- CCT CCC AGG TTC AAG TGA TT -3 Reverse 5´- GCC TGA TAA TCC CAG CAC TTT -3´
pr PSA c/d (ARE II)	Forward 5´- GGT TCT GCT GTT ACG TTT G -3´ Reverse 5´- CTT GCT TGC TCA GTG GAC -3

**Tabla 2.** Secuencias de oligos para amplificar promotores de genes blanco utilizados en la inmunoprecipitación de cromatina, creación propia.

### **Ensayos de formación de colonias**

500, 1000 o 2000 células HPrEC, 22Rv1 y DU-145 fueron transfectadas establemente con pcDNA-PinX1 o con un vector vacío y sembradas en placas de 6 pozos y cultivadas en medio libre de rojo fenol suplementado con 2% SFB. Las células fueron tratadas durante 12 a 14 días con vehículo, DHT 1 nM o Flu 100 nM. En el último día, los pozos fueron lavados dos veces con PBS, fijados con EtOH 96% durante 10 min y finalmente teñidos con cristal violeta al 0.1% durante 30 min. Las colonias se contaron digitalmente considerando únicamente aquellas que incluyeran por lo menos 50 células. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital. El número de colonias se reporta como un porcentaje (PE) donde PE= (núm. de colonias formadas/ núm. de células sembradas) X 100. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### **Análisis estadísticos**

Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado. Para el caso de los ensayos de luciferasa cada experimento independiente incluía 4 replicados internos de los cuales se analizó la media por condición y se determinó la significancia estadística por cada ensayo por separado. Se utilizó la prueba t de Student no pareada.

Para los ensayos de expresión de PinX1 mediante western blot, cierre de herida, expresión de marcadores de EMT, formación de colonias y ensayos de qRT-PCR, se determinó la media por condición de 3 ensayos independientes y la significancia estadística total se obtuvo mediante la prueba t de Student no pareada.

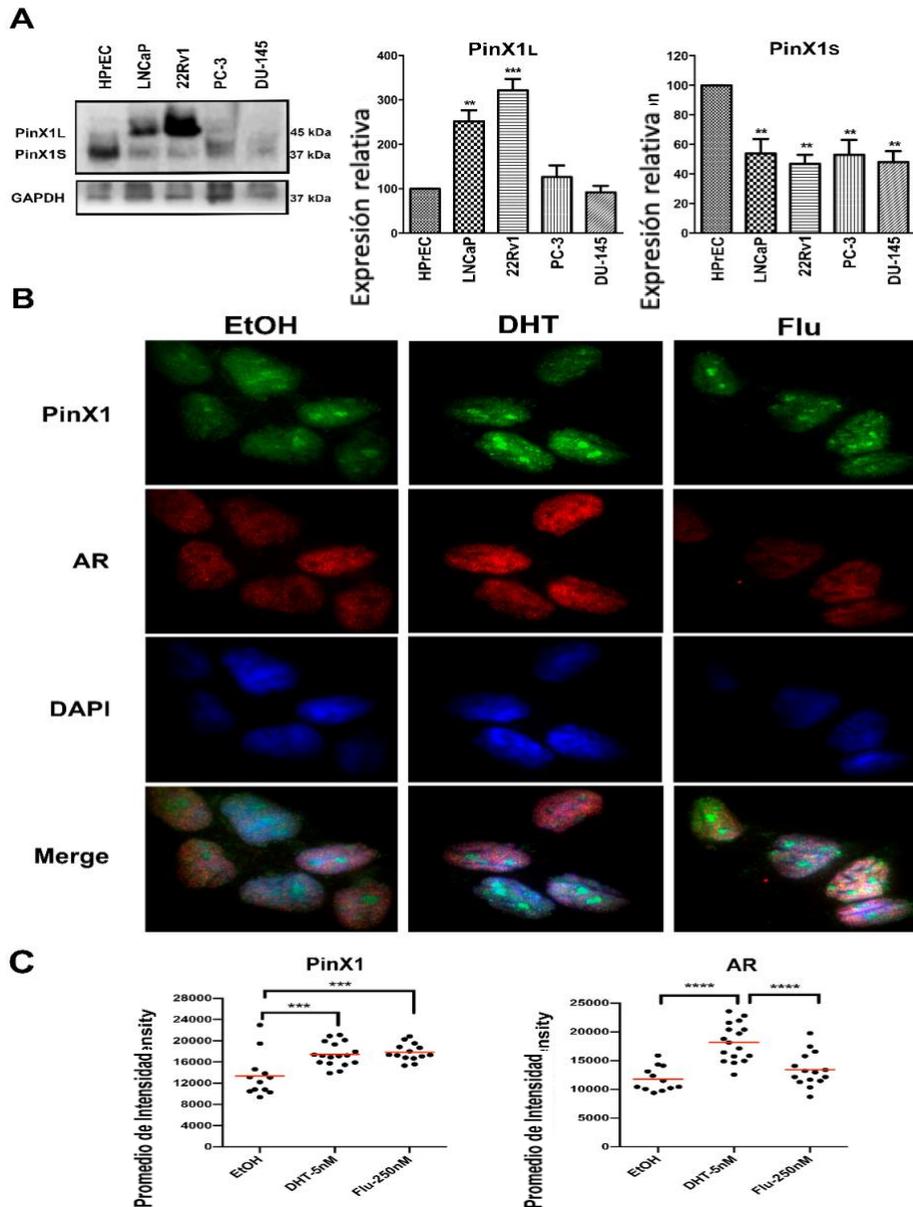
Para los ensayos de inmunofluorescencia y proliferación celular cada experimento independiente incluía 4 replicados internos de los cuales se analizó la media por condición y se determinó la significancia estadística por cada ensayo por separado utilizando la prueba de ANOVA + post prueba de Tukey.

## Resultados

### 1. PinX1 se encuentra elevado en células de cáncer de próstata AR positivas

Como se mencionó, la expresión de PinX1 en cáncer de próstata permanece controversial, por lo que quisimos comparar la expresión de esta proteína en líneas celulares de cáncer de próstata contra una línea de hiperplasia prostática benigna. Los resultados del western blot muestran (Fig. 6A) la presencia de las 2 isoformas de PinX1 de 37 y 45 kDa. De manera interesante la isoforma pequeña (PinX1s) se encuentra mayormente expresada en la línea no cancerosa, HPrEC, y por el otro lado PinX1L (isoforma completa) parece estar mayormente expresada en las líneas LNCaP y 22Rv1, ambas positivas al receptor de andrógenos, pero no en DU-145 ni PC3. El posterior análisis por densitometría de los ensayos de western blot confirmó diferencias significativas en la abundancia de proteína.

Adicionalmente, se estudió la posible colocalización de PinX1 y AR dentro de las células de CaP en presencia y ausencia de un antagonista y un agonista del receptor, utilizando ensayos de inmunofluorescencia en la línea 22Rv1. Como era de esperarse, PinX1 se encuentra en el núcleo (Fig. 6B), por su parte, AR muestra significativamente mayor señal nuclear en presencia de DHT, lo que fue confirmado al cuantificar y analizar la señal de la fluorescencia. A pesar de que ambas proteínas se presentan en el núcleo, confirmado por la tinción con DAPI, no se observan zonas notorias de colocalización, sin embargo, las imágenes y la posterior cuantificación (Fig. 6C) mostraron que la señal nuclear de PinX1 si incrementa significativamente en presencia de DHT y Flu.

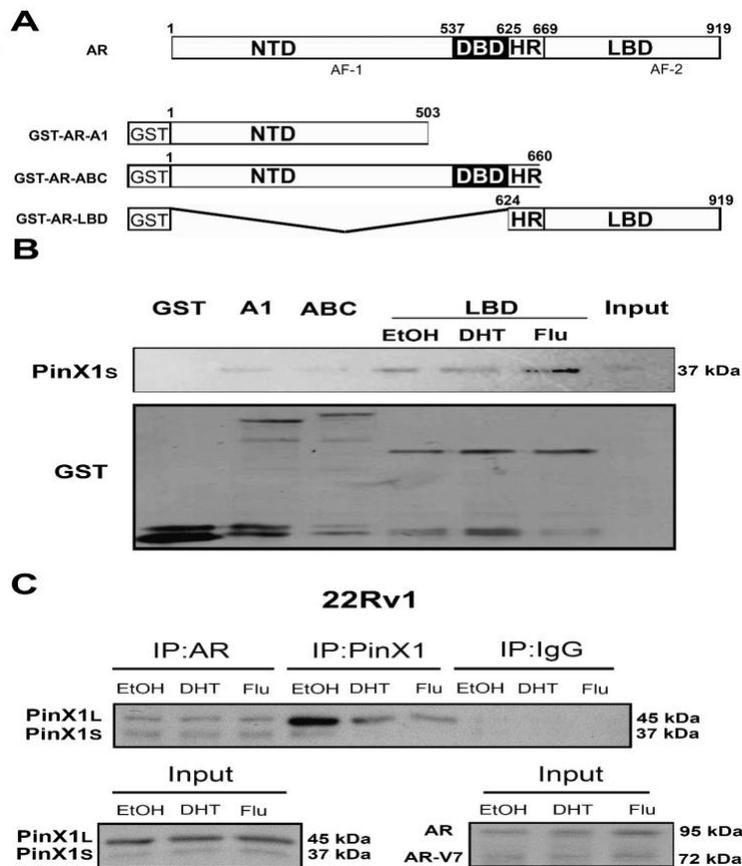


**Figura 6. Localización y niveles de abundancia relativa de proteína de PinX1 en líneas celulares de CaP (LNCaP, 22Rv1, PC3 y DU-145)** (A) Western blot muestra los niveles de proteína de PinX1L y PinX1s en una línea celular de próstata benigna (HPrEC) y en 4 líneas de CaP (LNCaP, 22Rv1, PC3 y DU-145). Se utilizó GAPDH como control de carga. La expresión relativa de PinX1 representa el promedio de 3 ensayos independientes \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. HPrEC. (B) Ensayo de inmunofluorescencia que muestra la localización de PinX1 (verde) y AR (rojo) en células 22Rv1 estimuladas con vehículo, DHT 5 nM o Flu 250 nM durante 2 horas. Los núcleos fueron teñidos con DAPI, las células fueron observadas usando microscopía confocal a un aumento de 100x. El anticuerpo de PinX1 detecta ambas isoformas (PinX1L y PinX1s) (C) La intensidad de fluorescencia fue determinada utilizando el software Zen blue (Zeiss), utilizando 3 diferentes campos por condición a partir de 2 ensayos biológicos independientes. Cada punto representa una sola célula \*\*\*  $p < 0.001$  EtOH vs DHT o Flu y \*\*\*\*  $p < 0.0001$  EtOH vs DHT y DHT vs Flu (prueba de ANOVA de 1 vía + post prueba de Tukey). 3 campos/ ensayo= 6 puntos.

## 2. PinX1 interactúa con el AR *in vivo* e *in vitro*.

Con el objetivo de estudiar la interacción de PinX1 y AR *in vivo* se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación de proteínas endógenas obtenidas de células 22Rv1 en presencia de DHT y flutamida. Se precipitaron AR y PinX1, y posteriormente se realizaron ensayos de western blot. Utilizando el anticuerpo contra AR observamos que es posible precipitar ambas isoformas de PinX1. Esto comprueba que existe una interacción *in vivo* entre ambas proteínas (Fig. 7C) la cual parece no ser modificada en presencia de DHT o Flutamida. Adicionalmente, esto sugiere que la región C-terminal de PinX1, que contiene el dominio de unión a telomerasa, no se encuentra involucrado en esta interacción.

Con el fin de determinar qué dominio de AR interactúa con PinX1, se realizó un ensayo de interacción *in vitro* de PinX1 con diversos dominios de AR fusionados a GST, mediante la técnica de GST-Pull-down. Basado en lo anterior los fragmentos de AR (A1, ABC, LBD) utilizados se muestran a continuación en la Fig 7A:



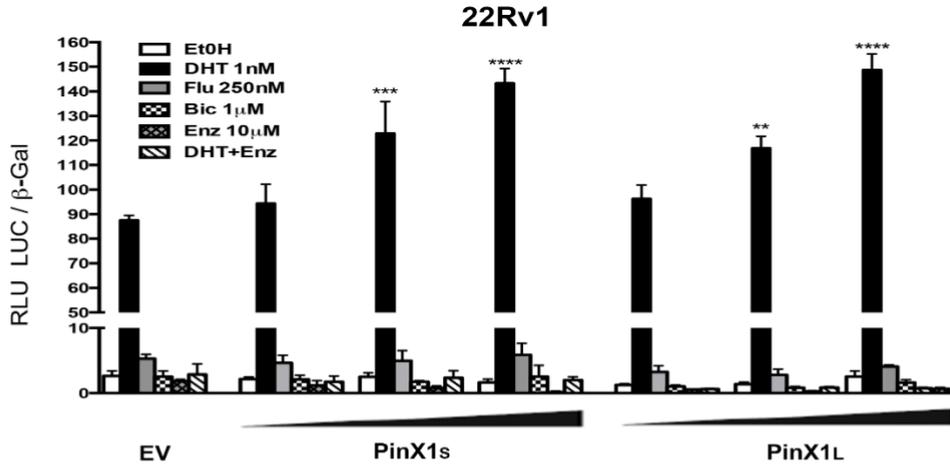
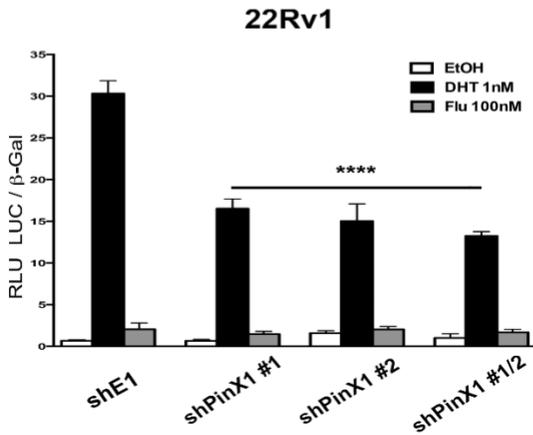
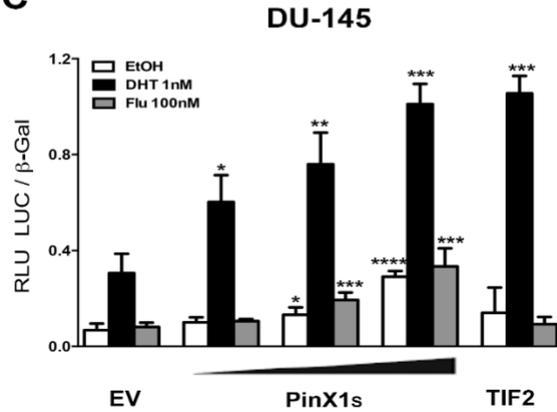
**Figura 7. PinX1 interactúa con AR.** (A) Características estructurales de AR y dominios utilizados para proteínas de fusión GST para ensayos de interacción. NTD, dominio amino terminal; DBD, dominio de unión a DNA; HR, región de bisagra; LBD, dominio de unión a ligando (B) Ensayo de pull-down de GST. Evaluamos la interacción de PinX1s con GST solo, GST-AR-A1 (aa 1-503), GST-AR-ABC (aa 1-660) o GST-AR-LBD (aa 624-919). Proteína total (Input) y precipitada se analizó por western blot usando anticuerpos anti-PinX1 o anti-GST. La unión con el LBD se determinó bajo tratamiento con vehículo (EtOH), DHT 5 nM o Flu 250 nM. (C) Co-IP de PinX1 con AR después del tratamiento con EtOH, DHT 5 nM o Flu 250 nM. Se precipitaron proteínas

endógenas con anticuerpos contra PinX1, AR o IgG (utilizado como control negativo) en células 22Rv1. Se llevó a cabo un western blot contra PinX1. El input corresponde al 10% de los lisados totales recolectados antes de cada inmunoprecipitación (IP). Co-IP muestra que ambas isoformas PinX1 se precipitan con anticuerpo contra AR.

Los resultados muestran (Fig. 7B) que PinX1 interactúa con mayor afinidad con el dominio de unión a ligando y que esta interacción no se ve modificada por la presencia de DHT o Flutamida.

### **3. PinX1 promueve un aumento en la actividad transcripcional del AR**

Con el objetivo de determinar cómo PinX1 afecta la función de AR, por lo que se sobreexpresaron las dos isoformas de PinX1, independientemente, para determinar su efecto sobre la actividad transcripcional de AR en presencia de ligando agonista, DHT, y varios ligandos antagonistas utilizados en la clínica como tratamientos de CaP primario (Flu y Bic) y recurrente (Enz) (Fig. 8A). Los resultados muestran que ambas isoformas incrementan la actividad transcripcional del AR en presencia de DHT. Para confirmar la acción de PinX1 en la activación transcripcional de AR, llevamos a cabo ensayos de inhibición de PinX1 utilizando s contra PinX1 en células 22Rv1, esta línea tiene la ventaja de expresar endogenamente el AR y proviene de un carcinoma prostatico resistente a la castración. Los ensayos de luciferasa muestran una inhibición del 50% de la actividad transcripcional de AR cuando se inhibe PinX1 (Fig. 8B). Esto sugiere que PinX1 actúa como coactivador de AR. A partir de estos datos, decidimos estudiar los efectos de PinX1s en la señalización de AR en células CaP, para separar las funciones de PinX1 como corregulador de su actividad como inhibidor de la telomerasa. Adicionalmente, realizamos estos estudios en una línea celular AR negativa, DU-145, transfectada con AR. Como se esperaba, la sobreexpresión de PinX1s aumentó la actividad transcripcional de AR en presencia de DHT en comparación con las células transfectadas con vector vacío (VV) (Fig. 8C). Adicionalmente, observamos un aumento en ausencia de ligando y en presencia de Flu.

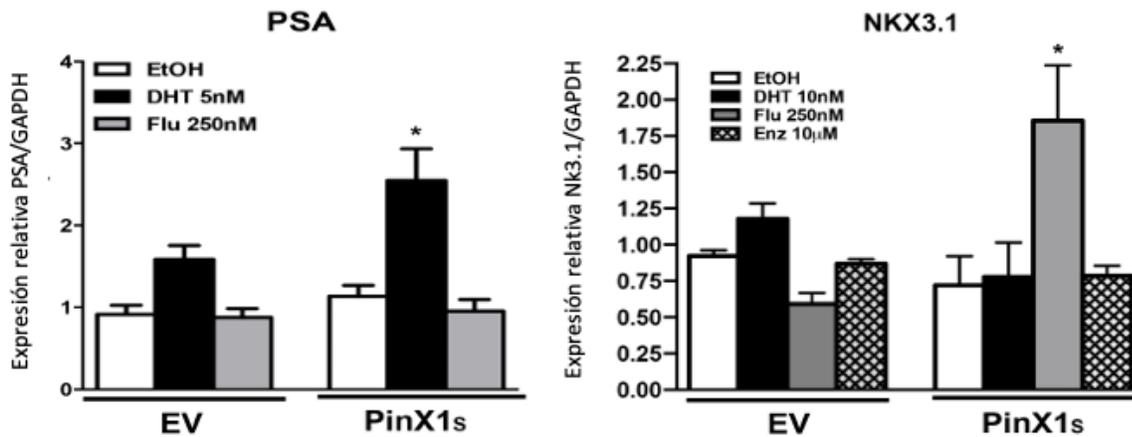
**A****B****C**

**Figura 8. PinX1s incrementa la actividad transcripcional de AR.** (A, C) Se transfectaron transitoriamente células 22Rv1 y DU-145 con un vector reportero de luciferasa MMTV-Luc (200 ng), plásmido  $\beta$ -Gal (10 ng) y cantidades crecientes de PinX1s o PinX1L. Las células DU-145 se transfectaron adicionalmente con 50 ng de vector de expresión de AR (pCMV-AR). Las células se trataron con EtOH, DHT 1 nM, Flu 250 o 100 nM, Bic 1  $\mu$ M, Enz 10  $\mu$ M o DHT 1 nM + Enz 10  $\mu$ M durante 48 horas. Se usó EV (100 ng) como control negativo y se transfectó el vector de expresión del coactivador TIF2, (pSG-TIF2, 100 ng) como control positivo. (B) Los ensayos de inhibición de PinX1 se llevaron a cabo transfectando 100 ng del plásmido #1 o #2 de shRNA PinX1 o una mezcla de ambos #1/2, o shRNA control (shE1). Se midió la actividad de luciferasa y se usó la actividad de  $\beta$ -Gal como control de transfección para normalizar los ensayos, graficando unidades relativas de luz de Luc/  $\beta$ -Gal. Se muestra una figura representativa de al menos 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la prueba t de Student; \*p <0.05, \*\*p <0.002, \*\*\*p <0.0008, \*\*\*\*p <0.0001 frente a EV o shE1 frente a contrapartes transfectadas con shPinX1.

Nuestros resultados muestran que AR interactúa con ambas isoformas, y que ambas isoformas poseen la capacidad de promover un incremento en la activación transcripcional mediada por AR. Lo cual sugiere que el dominio de unión a telomerasa de PinX1 no está involucrado en su actividad como coregulador de AR.

#### 4. PinX1 induce la sobre expresión de los genes blancos del AR

Al observar el efecto positivo de PinX1 sobre la actividad transcripcional del AR, nos propusimos analizar su efecto sobre la expresión de sus genes blanco, por lo que mediante ensayos de RT-qPCR en tiempo real detectamos la expresión de los genes PSA y Nkx3.1 en células de CaP 22Rv1 transfectadas con un vector que contiene el transgén PinX1s y posteriormente tratadas con DHT o Flutamida. En la Fig 9 observamos que PinX1 incrementa de manera significativa la expresión del gen PSA en presencia de DHT con respecto a las células transfectadas con el vector vacío usadas como control negativo. Por otro lado, detectamos que PinX1 inhibe el efecto positivo de DHT sobre la expresión de mRNA de Nkx3.1. De manera interesante detectamos que en presencia de flutamida, el corregulador PinX1 incrementa significativamente el mRNA de Nkx3.1, sin embargo, este efecto no se observa en presencia de Enzalutamida, un anti andrógeno de nueva generación que inhibe la translocación del AR al núcleo y su unión al DNA, sugiriendo ser un efecto ligando específico.



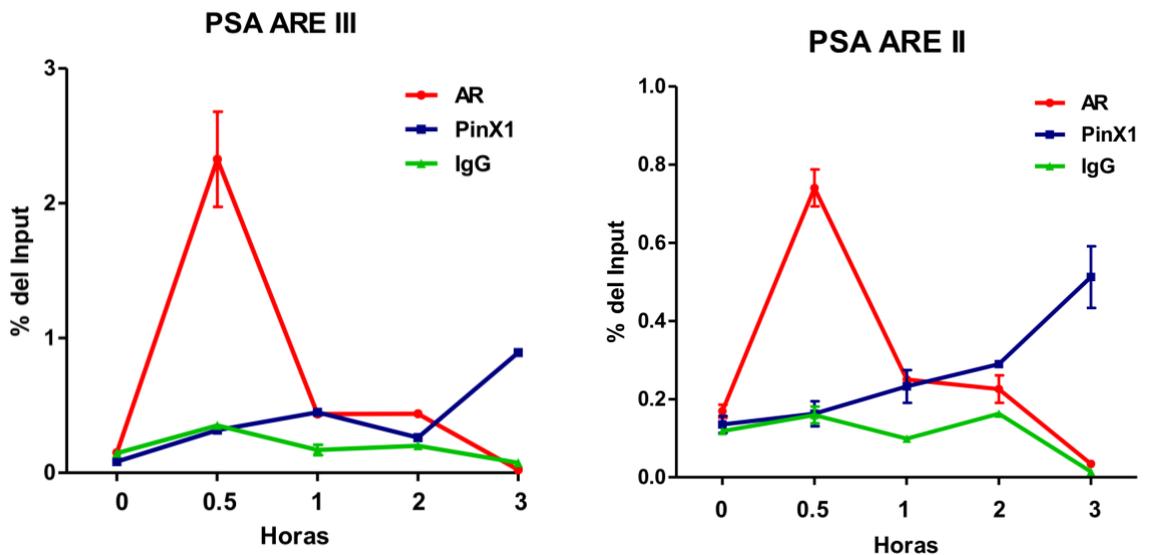
**Figura. 9. Expresión de mRNA de genes blanco del AR en presencia de PinX1.** Se transfectaron células 22Rv1 con pcDNA (EV) o pcDNA-PinX1 y se trataron con vehículo, DHT (5nM), Flutamida (250 nM) o Enzalutamida (100 µM) durante 24 hrs, se determinó la expresión de mRNA de los genes PSA y Nkx3.1 por RT-qPCR tiempo real. Se utilizó el mRNA de GAPDH para normalizar los resultados. Se muestra la expresión relativa como el promedio  $\pm$  error estándar de un triplicado interno de 3 ensayos independientes. La significancia se determinó comparando condiciones similares entre PinX1 y vector vacío. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo de EV en presencia de DHT o Flu (distribución t de Student no apareado).

#### 5. PinX1 es reclutado a secuencias dentro del promotor de genes blanco del AR.

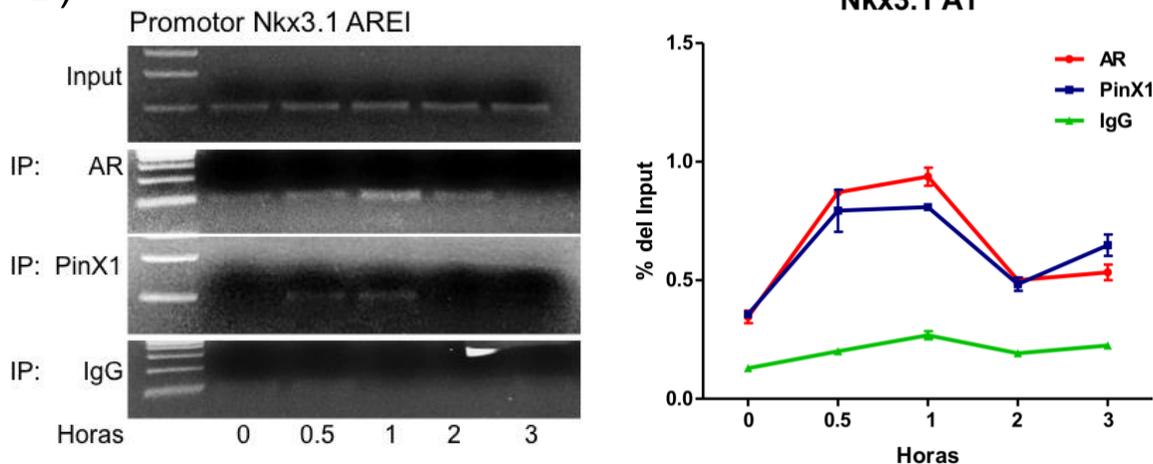
Con el fin de estudiar si PinX1 regula la actividad del AR y la expresión de sus genes blanco (PSA y Nkx3.1) reclutándose a sus promotores, se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina en las líneas 22Rv1 y LNCaP estimuladas con DHT a lo largo de 3 horas. En LNCaP observamos (Fig. 10 A) que el AR es reclutado tanto al promotor (AREII) como al enhancer (AREIII) de PSA a los 30 min y a partir de ahí su

reclutamiento regresa a niveles basales. Por otro lado, el reclutamiento de PinX1 muestra un incremento gradual alcanzando un punto máximo a las 3 horas y, al igual que para el AR, la misma tendencia se observa tanto en el promotor como en el enhancer. En el caso de Nkx3.1 (Fig. 10 A) se observa que PinX1 se recluta al promotor a partir de los 30 min, mostrando mayor intensidad a la hora. La misma dinámica muestra el receptor de andrógenos, colocándose en el promotor a partir de los 30 min y con mayor intensidad a 1 hora después del tratamiento con DHT.

A)

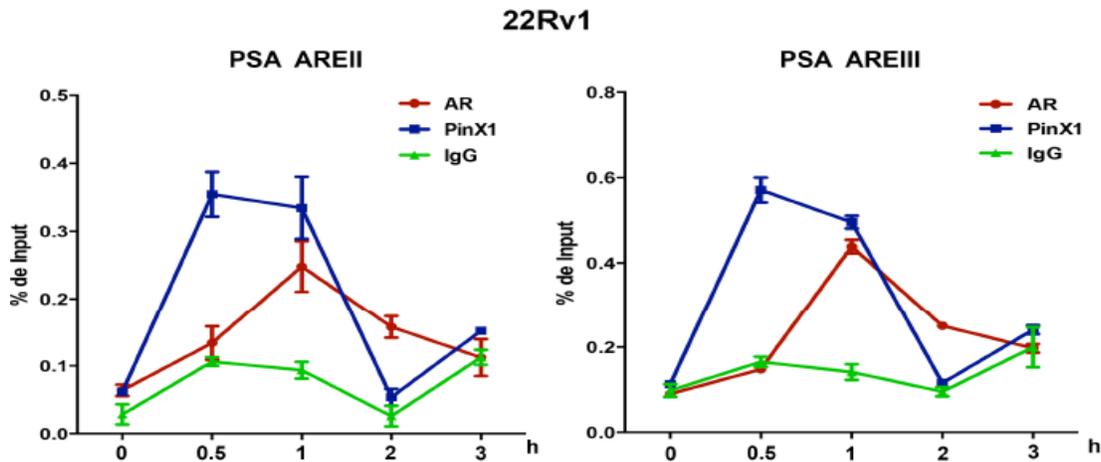


B)



**Figura. 10. PinX1 es reclutado a secuencias dentro del promotor y enhancer de PSA y al promotor de Nkx3.1 en células LNCaP.** A) Inmunoprecipitación de cromatina en la línea LNCaP, se observa el reclutamiento de PinX1, AR e IgG (control negativo) al AREIII y ARE II de PSA a lo largo de 3 horas en presencia de 5 nM DHT, las muestras se amplificaron por triplicado mediante PCR en tiempo real. B) Inmunoprecipitación de cromatina en la línea LNCaP, se observa el reclutamiento de PinX1, AR e IgG (control negativo) al A1 de Nkx3.1 a lo largo de 3 horas en presencia de 5 nM DHT, las muestras se amplificaron por triplicado mediante PCR en punto final (izquierda) y en tiempo real (derecha). Los datos se analizaron utilizando el método de porcentaje de input. Se muestra el reclutamiento como el promedio  $\pm$  error estándar de un triplicado interno de un ensayo representativo de 2 experimentos independientes.

Por otro lado, en la línea 22Rv1 (**Fig. 11**) observamos que PinX1 y AR se colocan tanto en el promotor como en el enhancer de PSA a 1 hora, sin embargo, el mayor reclutamiento de PinX1 se observa a los 30 min, previo al del AR.



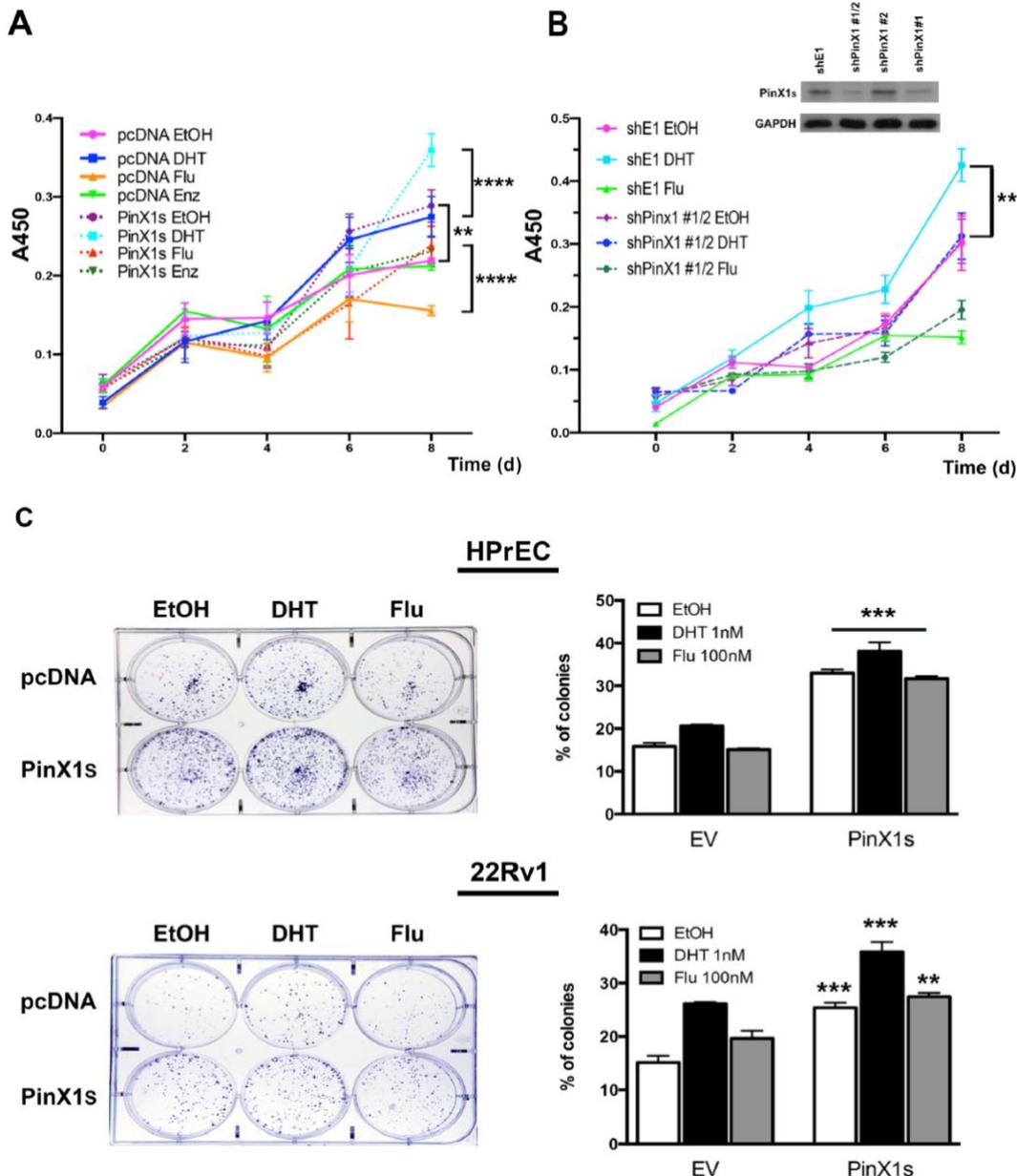
**Figura. 11. PinX1 es reclutado al enhancer y promotor de PSA en células 22Rv1.** (A) Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células 22Rv1 incubadas por 0.5, 1 2 y 3 horas con DHT 5 nM. El anticuerpo IgG se utilizó como control negativo. Se amplificaron las regiones del ARE II y III en PSA vía PCR con oligos específicos. Los datos se analizaron utilizando el método de porcentaje de input. Se muestra el reclutamiento como el promedio  $\pm$  error estándar de un triplicado interno de un ensayo representativo de 2 experimentos independientes.

## 6. PinX1 incrementa la tasa de proliferación celular y la clonogenicidad

Para observar el papel de PinX1 sobre procesos oncogénicos regulados por el AR, primero se observó el efecto de la sobreexpresión de PinX1 sobre la proliferación celular en la línea 22Rv1 a lo largo de 10 días. Para intentar separar un efecto proliferativo dependiente de andrógenos de un efecto dependiente de la función de PinX1 como inhibidor de la telomerasa, se utilizó la isoforma corta de PinX1 que no tiene el dominio TID. Como se esperaba, el tratamiento con DHT indujo un crecimiento significativo con respecto al EtOH y la flutamida. Adicionalmente, la sobreexpresión de PinX1s incrementó de manera significativa la proliferación en presencia de EtOH, flutamida y DHT con respecto al vector vacío, sin embargo, en presencia de Enzalutamida la sobreexpresión de PinX1 no tuvo efecto en la proliferación comparado con el vector vacío (Fig. 12A). Se realizó el mismo ensayo inhibiendo la expresión de PinX1 utilizando una mezcla de shRNAs. Observamos que en presencia de DHT, se inhibe la proliferación cuando se reduce la expresión de PinX1 (Fig. 12B). Esto sugiere que PinX1 es capaz de afectar positivamente la proliferación mediada por andrógenos en estas células.

Posteriormente, utilizando células 22Rv1 y HPrEC transfectadas establemente con PinX1 o un vector vacío, se realizaron ensayos de formación de colonias en presencia de

vehículo, DHT y Flutamida durante 14 días, con el fin de observar el efecto de PinX1 sobre la formación de colonias en estas células lo que indica la capacidad de clonogenicidad de las mismas. Como se observa en la figura 12C, en presencia de DHT el número de colonias aumenta significativamente tanto en 22Rv1 como en HPrEC, por otro lado, la sobreexpresión de PinX1s aumenta significativamente el número de colonias en ambas líneas celulares y bajo todas las condiciones (Fig. 12C).

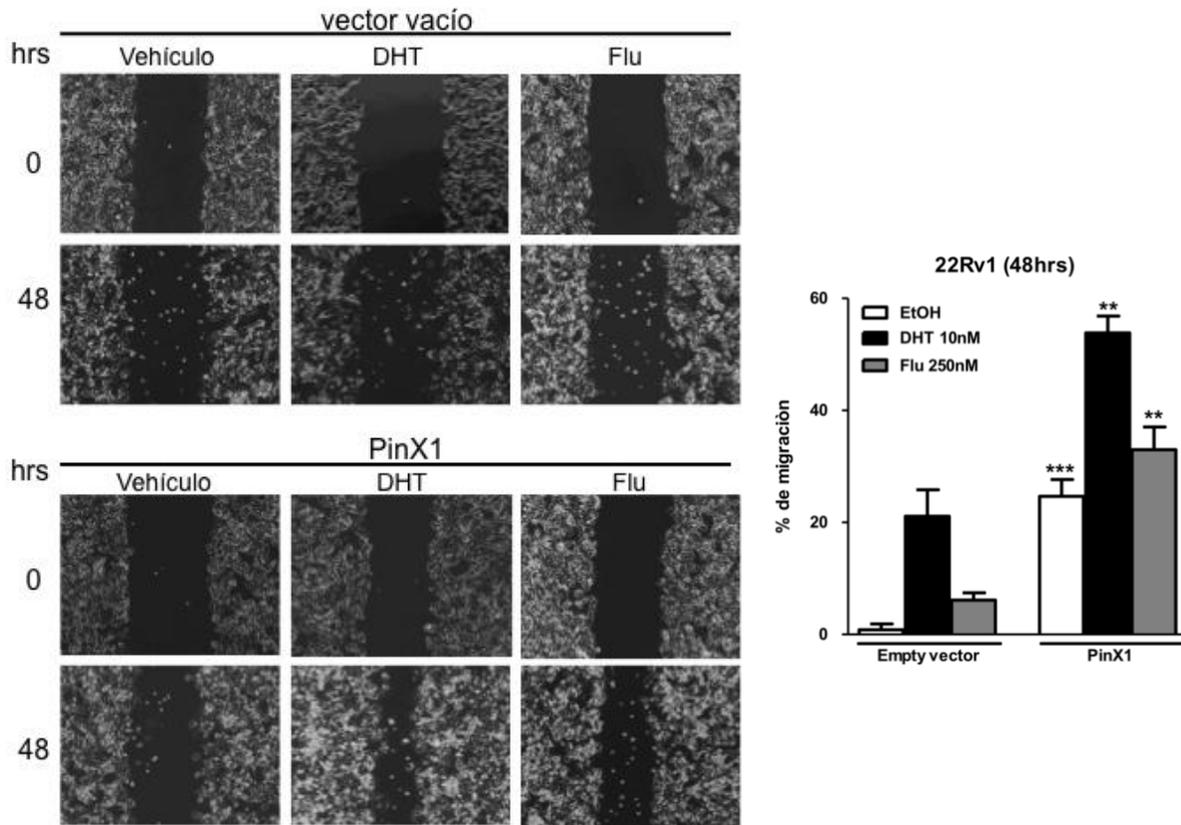


**Figura. 12. Pinx1 promueve la proliferación y la clonogenicidad celular en presencia y ausencia de andrógenos.** Ensayos de viabilidad en células de CaP 22Rv1 (A) las células fueron transfectadas con vector vacío (EV) o PinX1 y estimuladas durante 8 días con vehículo (EtOH), 5 nM DHT, 250 nM Flu o 100  $\mu$ M Enz, se muestra una figura representativa de 3 experimentos independientes con 5 pozos por condición. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : VV DHT vs PinX1s DHT, VV Flu vs PinX1s Flu y \*\* $p < 0.001$  VV EtOH vs PinX1s EtOH (prueba de ANOVA de 2 vías + post prueba Tukey). (B) células 22Rv1 fueron transfectadas con un shRNA control (shE1) o una mezcla de shRNAs #1/2 contra PinX1 y tratadas durante 8 días con vehículo (EtOH), 5 nM DHT, 250 nM Flu

o 100  $\mu$ M Enz, se muestra una figura representativa de 2 diferentes experimentos con 5 pozos por condición \*\*  $p < 0.001$  shE1 DHT vs. shPinX1 DHT. Se muestra el western blot de la expresión de PinX1 posterior a la infección con shPinX1 #1/2, #1 o #2 y shE1. Se usó GAPDH como control de carga. (C) ensayo de formación de colonias en HPrEC y 22Rv1, las células fueron transfectadas establemente con PinX1 o VV, 1000 o 2000 células fueron sembradas por pozo y estimuladas con EtOH, 1 nM DHT o 100 nM Flu. Después de 14 días, las colonias fueron teñidas y contadas \*\*\*  $p < 0.0008$  comparado con el grupo VV en presencia de EtOH DHT o Flu como se indica en la figura y \*\*  $p < 0.001$  comparado con el grupo VV en presencia de Flu (prueba de t de Student no pareada).

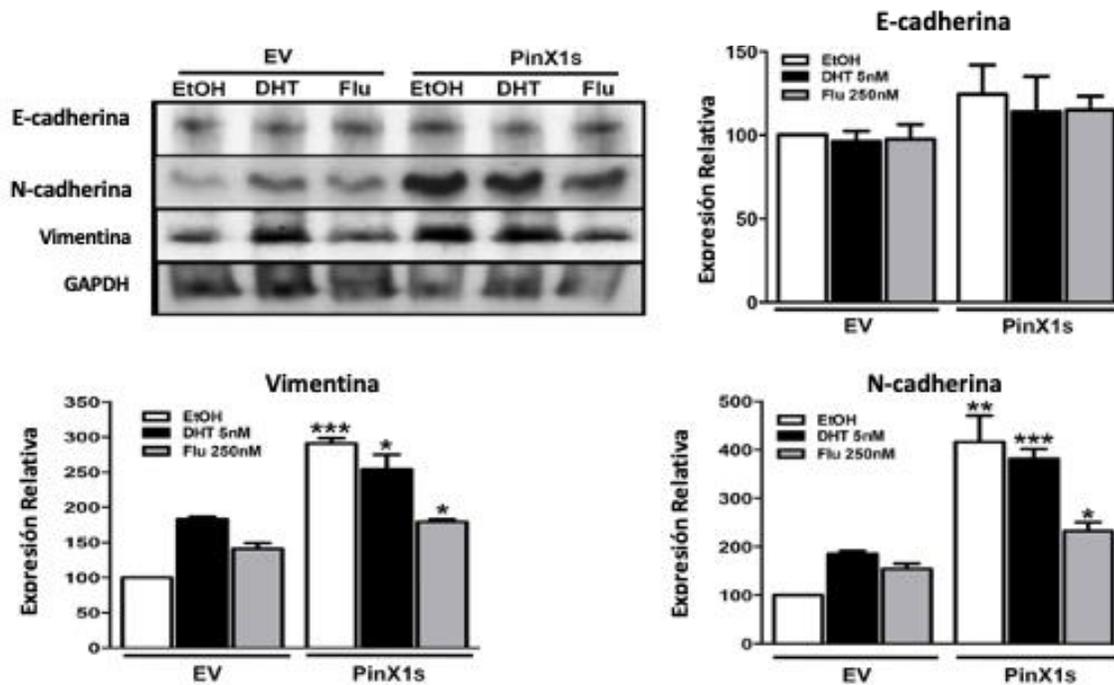
## **7. PinX1 incrementa la migración celular y la transición epitelio mesénquima en células de CaP**

Sumado a su papel en el inicio y progresión del cáncer de próstata, se ha observado que el AR también participa en la transición epitelio mesénquima (EMT). Estudios han demostrado que los andrógenos inducen invasividad en líneas de cáncer de próstata así como la expresión de marcadores de la EMT como la N-Cadherina (Zhu y Kiprianou 2010, Hara *et al.*, 2008). Asimismo, como se mencionó previamente, PinX1 también se ha involucrado en procesos invasivos en cáncer de mama. Debido a esto, quisimos observar el efecto de PinX1s en la migración celular inducida por andrógenos en cáncer de próstata, por lo que se realizó un ensayo de cierre de herida utilizando la línea 22Rv1 en presencia de DHT y flutamida a lo largo de 48 horas. Como se muestra en la **Fig. 13**, el tratamiento con DHT incrementa la migración en células transfectadas con un vector vacío. Al transfectar las células con PinX1s se observa un aumento significativo en la migración celular en presencia de vehículo, DHT y flutamida con respecto a las células transfectadas con el vector vacío.



**Figura. 13. Efecto de PinX1 sobre la capacidad de migración celular.** Se emplearon células de CaP 22Rv1 transfectada con un vector con el transgén PinX1 o con un vector vacío y se analizó la migración celular a las 0 y 48 horas en presencia de vehículo, DHT (5 nM) y flutamida (250 nM). Para inhibir la proliferación, las células fueron tratadas con el inhibidor AraC (50  $\mu$ M). La migración celular se estimó midiendo el ancho de la herida. La grafica representa el valor de la media y su error estándar (n=6), la significancia estadística se determinó comparando condiciones similares entre vector-PinX1 vs vector vacío. (\*\* P < 0.005) (\*\*\*) P < 0.0001) (Prueba t de Student).

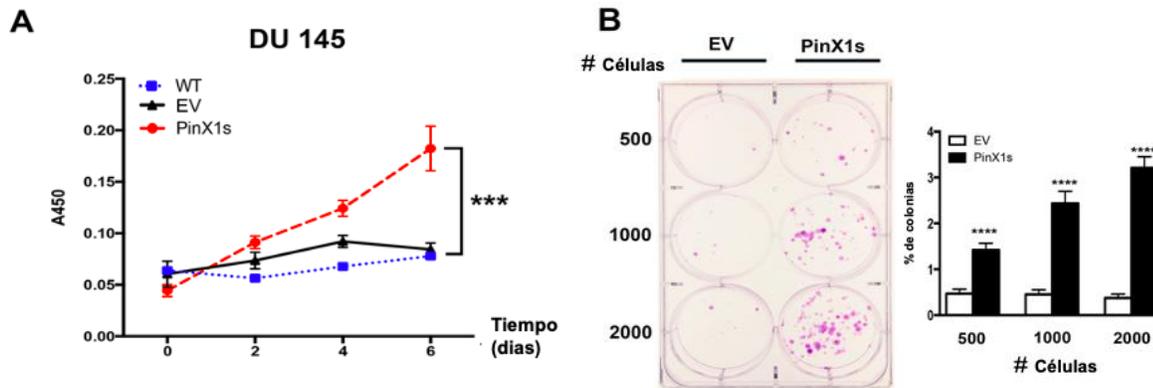
Previamente se ha descrito que la transición epitelio mesénquima es un paso clave en la metástasis del cáncer, por lo que estudiamos si PinX1 tiene efecto sobre la expresión de marcadores de este proceso en la línea 22Rv1. Observamos (Fig. 14) que el tratamiento con DHT incrementa la expresión de Vimentina y N-Cadherina, marcadores mesenquimales, en células transfectadas con un vector vacío. Al transfectar las células con PinX1 observamos que la expresión de estos dos marcadores aumenta en presencia y ausencia de DHT y Flu. Por su parte, no vimos cambios significativos en la expresión de E-Cadherina, marcador epitelial, al estimular las células con DHT ni al sobreexpresar PinX1 mediante transfección.



**Figura. 14. PinX1 induce la expresión de N-Cadherina y Vimentina.** Expresión de N-Cadherina, E-Cadherina y Vimentina mediante Western Blot. Se transfectaron células 22Rv1 con PinX1s o un vector vacío (EV) y se trataron durante 48 con vehículo, 5 nM DHT o 250 nM Flu. Se muestra GAPDH como control de carga. Se muestra la expresión relativa como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes \*\*\* $p < 0.0008$ , \*\*  $p < 0.004$ , \*  $p < 0.02$  vs vector vacío, (prueba t de Student no pareada).

## 8. El corregulador PinX1 actúa a través de una vía independiente de andrógenos

Los resultados obtenidos en proliferación, migración y expresión de marcadores EMT demuestran que PinX1 promueve procesos oncogénicos en presencia y ausencia de ligandos agonistas del AR, sugiriendo una vía independiente de andrógenos o incluso del AR, por lo que quisimos dilucidar esta posibilidad. Utilizando la línea celular DU-145 negativa para AR estudiamos el efecto de PinX1s sobre proliferación y clonogenicidad. Como se muestra en la figura 15 A, PinX1 promueve de manera significativa la proliferación en ausencia de AR, con respecto a células transfectadas con un vector vacío. Adicionalmente, encontramos un incremento en el número y tamaño de colonias a lo largo de 13 días (Fig. 15 B), confirmando la existencia de una vía de señalización en la que PinX1 actúa independiente de AR en células insensibles a andrógenos.



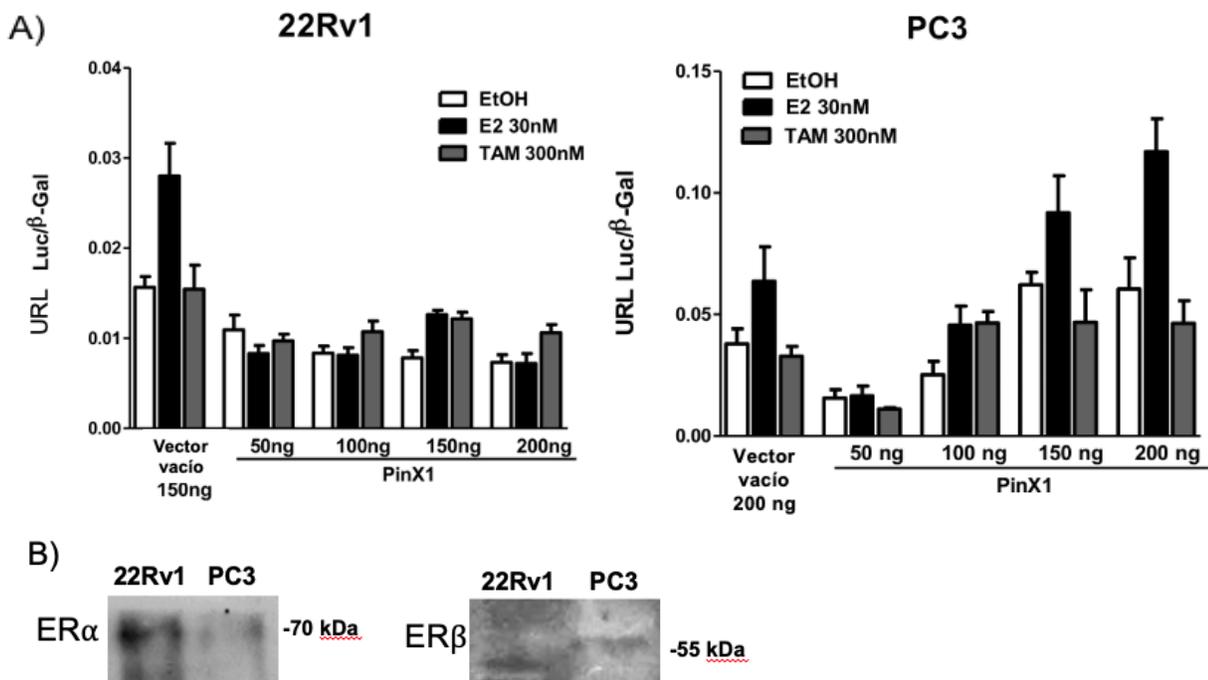
**Figura. 15. PinX1 promueve la proliferación y la formación de colonias en células AR negativas** (A) Ensayo de viabilidad celular empleando células DU-145. Las células fueron transfectadas establemente con vector vacío (EV) o vector-PinX1s, mediante cultivos in vitro durante 6 días. Se muestra un ensayo representativo de 3 experimentos independientes con 5 pozos por condición \*\*\*\* p<0.0001 PinX1s vs VV (Prueba ANOVA de 2 vías + post prueba de Tukey) (B) Ensayos de formación de colonias. Células DU-145 fueron transfectadas establemente con PinX1 o VV, 500, 1000 o 2000 células fueron sembradas por pozo y cultivadas durante 14 días. A la derecha se muestra la representación gráfica del porcentaje de colonias contadas con respecto al número de células sembradas \*\*\*\*p<0.0001 comparado con el grupo VV.

## 9. PinX1 modula la actividad del ER $\alpha$ y del ER $\beta$ de manera antagónico/diferencial.

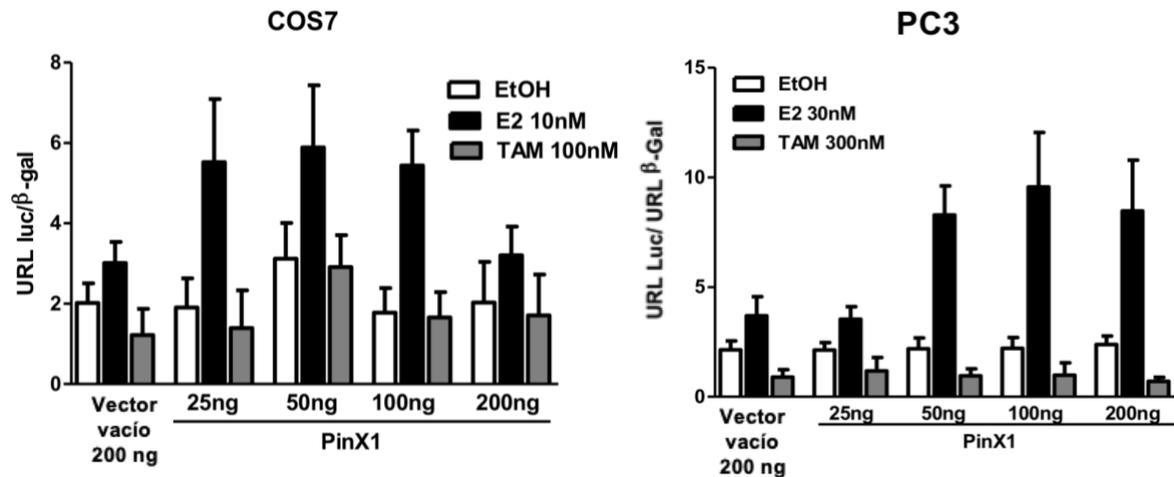
Con el fin de conocer en que otras posibles vías oncogénicas está involucrado PinX1 y tomando en cuenta su papel como corregulador de receptores esteroideos decidimos estudiar su efecto sobre los estrógenos en células de cáncer de próstata. Es importante recordar que, en nuestro laboratorio, se había descrito previamente a PinX1 como un correpresor de ER $\alpha$  en células de cáncer de mama.

En cáncer de próstata, se sabe que los estrógenos y sus receptores juegan un papel importante. Mediante ensayos knockout en ratones y en experimentos realizados en la línea celular PC3, se ha observado que el ER $\alpha$  induce proliferación celular, principalmente a través de las vías de MAPK y PI3K (Takizawa et al., 2015). Por otro lado, diversos estudios han determinado que las isoformas del ER $\beta$  poseen papeles distintos y contradictorios en este carcinoma (Dey et al., 2012), mientras que la isoforma ER $\beta$ 1 (proteína completa) es capaz de inhibir la proliferación de las líneas celulares PC3 y 22Rv1, la isoforma ER $\beta$ 2 incrementa la proliferación, invasión y migración celular promoviendo la transición epitelio mesénquima, además de poseer un mecanismo a través del cual inhibe la transcripción del ER $\beta$ 1, bloqueando así el papel protector de esta isoforma (Christoforou et al., 2014). Debido a esto, quisimos determinar si PinX1 mantiene su papel oncogénico en cáncer de próstata sobre la actividad de los ER, o si al igual que

en cáncer de mama, es capaz de inhibir la actividad de ER $\alpha$ , confiriéndole un papel receptor específico. Para ello se realizaron ensayos de actividad de luciferasa en las líneas celulares 22Rv1 y PC3 para ver el efecto de PinX1 sobre la actividad del ER en presencia de vehículo, estradiol (E2), y tamoxifeno (TAM), ligando antagonista de ER. Los resultados (Fig. 16A) muestran que PinX1 inhibe la actividad transcripcional de ER inducida por E2, así como en presencia de vehículo y tamoxifeno en la línea 22Rv1, al igual que lo observado en líneas celulares de cáncer de mama. Sin embargo, en la línea PC3 el efecto inhibitorio de PinX1 solo se observa a bajas concentraciones de plásmido transfectado, ya que a mayores dosis esta proteína es capaz de incrementar la actividad transcripcional del ER de manera significativa en presencia de E2. Para explicar esto, primero analizamos la expresión de las variantes  $\alpha$  y  $\beta$  del ER. Observamos (Fig. 16B) que la línea 22Rv1 expresa mayoritariamente la variante  $\alpha$  (66 kDa) y la línea PC3 la  $\beta$  (55 kDa). Posteriormente, estudiamos el efecto de PinX1 sobre la actividad transcripcional del ER $\beta$ , transfectando esta variante en las líneas COS7 (línea celular de riñón de mono verde, negativa para la expresión de los ER) y PC3. Descubrimos que PinX1 es capaz de inducir la actividad de esta variante en presencia de E2 (Fig. 17), contrario a lo que habíamos descrito con respecto al ER $\alpha$  (Noriega-Reyes et al., 2015).

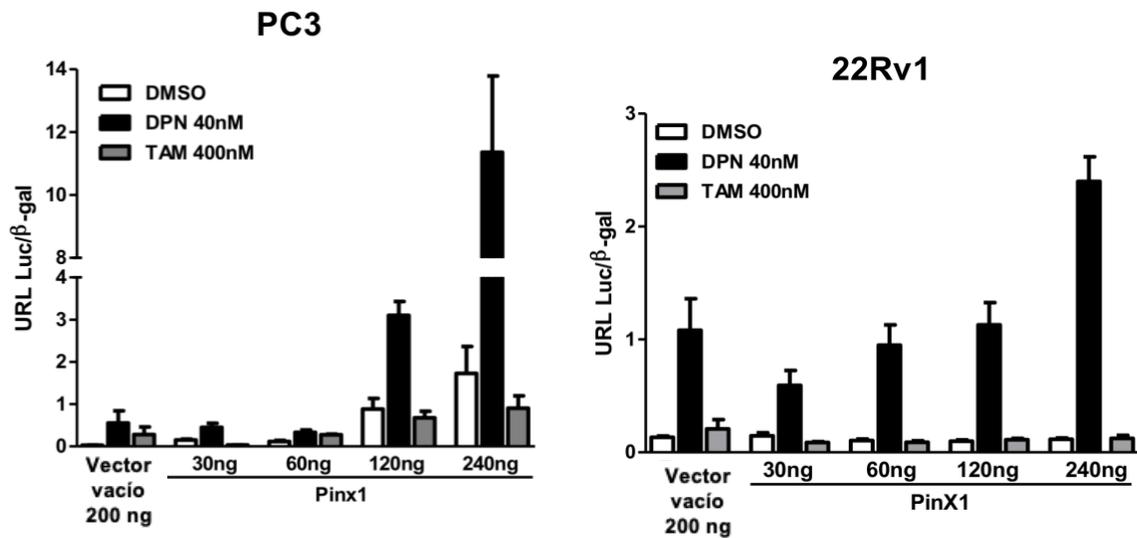


**Figura. 16. Efecto de PinX1 sobre la actividad transcripcional del ER en células de cáncer de próstata.** A) la sobreexpresión de PinX1 a diferentes concentraciones en las líneas PC3 y 22Rv1 afectó la actividad transcripcional del ER. Fueron transfectedos el vector reportero 3x ERE Luc, y PinX1 y posteriormente las células fueron estimuladas con Etanol (vehículo), E2 (30nM) o Tamoxifeno (300 nM). Se utilizó el vector vacío como control negativo. Se muestra la actividad relativa de luciferasa (RLU LUC/β-gal) como el promedio  $\pm$  error estándar de un ensayo representativo llevado a cabo por quintuplicado por condición. B) Ensayos de western Blots que muestran la proteína de ER $\alpha$  y ER $\beta$  en células PC3 y 22Rv1.



**Figura. 17. PinX1 incrementa la actividad transcripcional del ERβ.** Efecto de la sobreexpresión de PinX1 a diferentes concentraciones sobre la actividad del ERβ en las líneas COS7 y PC3. La línea celular COS7 es una línea de riñón de mono verde que no expresa receptores de estrógenos ni de andrógenos. Se transfectaron el vector reportero 3xERE-Luc, ERβ y PinX1 y posteriormente las células fueron estimuladas con Etanol (vehículo), E2 (30 nM) o Tamoxifeno (300 nM). Se utilizó un vector vacío como control negativo. Se muestra la actividad relativa de luciferasa (URL LUC/β-gal) como el promedio ± error estándar de un ensayo representativo llevado a cabo por quintuplicado por condición.

Con el objetivo de comprobar que PinX1 actúa como agonista en presencia de E2 en forma dependiente de ERβ, se llevaron a cabo ensayos de luciferasa con las células de CaP PC3 y 22Rv1 utilizando el agonista específico del ERβ, 2,3-bis(4-hidroxifenil) propionitrilo (DPN) (Meyers *et al.*, 2001). Nuestros resultados demuestran (**Fig.18**) que, como fue observado anteriormente, PinX1 incrementa la actividad del receptor inducida por el DPN en células PC3, con respecto al vector vacío. Sin embargo, al transfectar ERβ en las células 22Rv1 y estimular con un agonista específico, detectamos un efecto agonista sobre el reportero de luciferasa, contrario a lo detectado en presencia de E2 en estas células. Quedando confirmado que PinX1 tiene efectos opuestos sobre los ER, siendo correpressor de ERα y coactivador de ERβ.



**Figura. 18. PinX1 incrementa la actividad transcripcional del ER $\beta$  inducida por DPN.** Efecto de la sobreexpresión de PinX1 a diferentes concentraciones sobre la actividad del ER $\beta$  en las líneas 22Rv1 y PC3. Se transfectó el vector reportero 3xERE-Luc, ER $\beta$  y PinX1 y posteriormente las células fueron estimuladas con Etanol (vehículo), 2,3-bis(4-hidroxifenil) propionitrilo (40nM) o Tamoxifeno (400 nM). Se utilizó un vector vacío como control negativo. Se muestra la actividad relativa de luciferasa (URL LUC/ $\beta$ -gal) como el promedio  $\pm$  error estándar de un ensayo representativo llevado a cabo por quintuplicado por condición.

## Discusión

La actividad transcripcional del receptor de andrógenos es modulada por corre reguladores los cuales pudieran también modular eventos relacionados con el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. En este estudio se describe el papel de PinX1 como coactivador del AR, el cual previamente se caracterizó como un corre presor del receptor de estrógenos  $\alpha$  en células de cáncer de mama (Noriega-Reyes et al., 2015).

A pesar de que la expresión de PinX1 en la mayoría de los tipos de cáncer suele estar inhibida, para cáncer de próstata hay poca información y resultados contradictorios. Nuestros resultados muestran que, en líneas celulares de adenocarcinoma prostático, 22Rv1 y LNCaP, PinX1L se encuentra sobre expresado en comparación con la línea benigna HPrEC. De manera interesante, observamos que la sobreexpresión se da únicamente en las líneas de cáncer de próstata que son responsivas a andrógenos, lo que pudiera sugerir una relación positiva entre la expresión de PinX1L y la expresión y actividad del AR. Sumado a la banda de 45 kDa que corresponde a PinX1L (Zhou y Lu, 2001), observamos otra banda a 37 kDa, la cual representa a la isoforma PinX1s, la cual se expresa de manera contraria a PinX1L pues su expresión es mayor en la línea de próstata benigna que en las cancerígenas. PinX1s carece del dominio de interacción con la telomerasa (TID) en el extremo C-terminal (Liao et al., 2000). Futuros estudios son necesarios para explicar la regulación diferencial de la expresión de ambas isoformas en células de CaP.

Otro fenómeno que pareciera relacionar a PinX1 con la actividad androgénica en cáncer de próstata es su localización celular ya que la estimulación de células 22Rv1 con DHT incrementó de manera significativa la presencia, tanto del AR como de PinX1, en el núcleo. Sin embargo, no se observan zonas de colocalización muy evidentes entre ambas proteínas. Por otro lado, la estimulación con Flutamida también incrementó de manera significativa la señal de PinX1 en el núcleo. PinX1 fue descrita como una proteína nuclear (Zhou y Lu, 2001) por lo que es importante determinar la dinámica de su tráfico dentro del núcleo, así como las causas y los efectos de este proceso.

Se observó que PinX1 es capaz de interactuar con el AR in vivo e in vitro, sumado a eso, se observó que aun cuando esta interacción está mediada por el LBD del AR, no se modifica por la presencia de DHT o Flutamida. Previamente se han descrito coactivadores capaces de interactuar con el AR en presencia de ligandos antagonistas. Tal es el caso de GSN, un coactivador capaz de unirse al AR bajo tratamientos tanto de DHT como de hidroxiflutamida en células COS1 (Nishimura *et al.*, 2003). Por su parte también se ha observado que ARA70 es capaz de inducir una actividad agonista del AR en células de cáncer de próstata en presencia de distintos antiandrógenos incluidos la flutamida y la bicalutamida (Miyamoto *et al.*, 1998).

Al observar la secuencia de aminoácidos de PinX1 (Zhou y Lu, 2001) encontramos un dominio LXXLL invertido, a través del cual pudiera estar uniéndose al receptor, sin embargo, de acuerdo con lo que se conoce, el dominio LXXLL interactúa con el AF-2 del LBD en el AR cuando el receptor esta unido a un ligando agonista. Datos preliminares en nuestro laboratorio sugieren que este dominio no es importante para esta interacción, ya que al mutarlo no hay cambios en el efecto de PinX1 sobre la transactivación mediada por AR. También es posible que esta interacción ocurra entre dominios aun no descritos tanto en PinX1 como en el AR, tal como se ha propuesto para REA, corre regulador del receptor

de estrógenos (Gurevich et al., 2007). De manera interesante, esto difiere con lo que se observó con respecto al receptor de estrógenos, en el cual el NTD es el encargado de la interacción con PinX1 (Noriega-Reyes et al., 2015), esto implica que PinX1 no es capaz de interactuar con variantes del AR que suelen expresarse en cáncer de próstata que carecen del LBD y que tienen actividad constitutiva como el AR-V7 y AR-567es (Zhuo y Luo 2020)

Los ensayos de luciferasa muestran que PinX1 incrementa de manera significativa la actividad transcripcional del AR inducida por DHT en células CV1, PC3, DU-145 y 22Rv1. Adicionalmente, se observa un aumento inducido por PinX1 en presencia de EtOH y Flu que pudiera ir de acuerdo con lo observado en los ensayos de interacción en donde PinX1 es capaz de interactuar con el AR manera independiente de ligando y por lo tanto capaz de inducir su actividad. Observamos además que PinX1 posee una actividad dual como corregulador que depende del tipo de receptor hormonal, en este caso, siendo coactivador de AR y ER $\beta$  mientras que actúa como correpressor de ER $\alpha$ . En este sentido, se han reportado proteínas correguladoras capaces de inhibir la actividad transcripcional del ER $\alpha$  y de aumentar la del AR, tal es el caso de TBLR, el cual incluso tiene efectos contrarios sobre procesos regulados por hormonas tales como la proliferación (Wu et al., 2016, Daniels et al., 2014).

En presencia de DHT el AR muestra un reclutamiento rápido a partir de la media hora a los promotores de PSA y Nkx3.1. Previamente, se ha reportado que el reclutamiento del receptor al enhancer y promotor de PSA es transitorio, mostrando un alto reclutamiento entre las 0.5 y 2 hrs seguido de una disminución considerable en el mismo, por lo que se ha establecido que es un proceso cíclico (Louie et al., 2003, Shang et al., 2002, Kang et al., 2004), lo que concuerda con nuestros resultados. Adicionalmente, en la línea celular LNCaP se ha observado que la RNA Polimerasa 2 y la acetilación de histonas están presentes en el enhancer y promotor de PSA a partir de los 30-45 min (Shang et al., 2002, Kang et al., 2004). Como se sabe, el AR al ser un factor de transcripción pionero, su reclutamiento a los promotores de sus genes blanco sucede antes que el de la RNA polimerasa 2, comprobando así también nuestros resultados.

Por otro lado, observamos que el AREIII y el AREII muestran la misma tendencia de reclutamiento a lo largo de las 3 horas, tanto para el AR como para PinX1. A pesar de que estos elementos se encuentran separados por casi 4 Kb se sabe que para la correcta expresión de PSA es necesaria la participación coordinada de ambos sitios por lo que también se ha observado la presencia de la RNA Pol II en los dos elementos. Esto se ha explicado a través de un modelo que establece que el AR al ser reclutado al DNA promueve los cambios conformacionales en la cromatina que permiten que el enhancer y el promotor de PSA estén en cercana proximidad (Shang et al., 2002).

Notablemente, observamos que PinX1 y el AR se co-localizan de una manera espacio temporal en células 22Rv1 en el promotor/enhancer de PSA y en células LNCaP en el promotor de Nkx3.1 en presencia de DHT, sin embargo, para el caso del promotor y enhancer de PSA en células LNCaP vemos que el reclutamiento de PinX1 ocurre más de 2 horas después que el del AR. En estudios previos se ha visto que PinX1 está involucrado en otras vías de señalización, entre ellos la del factor de transcripción NF- $\kappa$ b, con el cual se cree que pudiera interactuar (Shi et al., 2015). NF- $\kappa$ b se sabe que también participa en la expresión de PSA (Nadiminty et al., 2010) uniéndose de manera directa al DNA, e

incluso se ha observado que sus sitios de unión se traslapan con los del AR (Chen y Sawyers, 2002), por lo que nuestra hipótesis es que a pesar de que el receptor de andrógenos no esté presente en el promotor y enhancer de PSA a las 3 horas, otras proteínas como NF- $\kappa$ b unidas al DNA podrían permitir el reclutamiento de PinX1 mediante su interacción con estas.

El efecto positivo de PinX1 sobre la actividad transcripcional del AR en presencia de DHT a su vez se ve traducido en un aumento en la expresión de mRNA de PSA. Por otro lado, la sobreexpresión de PinX1 disminuye los niveles de mRNA de Nkx3.1 en presencia de DHT. Se sabe que Nkx3.1 forma un ciclo de retroalimentación negativo con el receptor de andrógenos inhibiendo su transcripción y por lo tanto los eventos asociados a su actividad (Lei *et al.*, 2006), por lo que, sumado a sus otros efectos, la sobreexpresión de PinX1 también pudiera promover la actividad del receptor al prevenir su inhibición por Nkx3.1. Asimismo, es posible que en presencia de flutamida, PinX1 promueva una retroalimentación que inhiba la actividad del receptor de andrógenos, al permitir la expresión de Nkx3.1.

En general, se ha observado que Nkx3.1 inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata (Wang *et al.*, 2009), sin embargo, algunos estudios han sugerido un rol más oncogénico para esta proteína en este carcinoma. En células LNCaP se describió un rol positivo de Nkx3.1 en el cual colabora con FoxA1 y AR para promover la expresión de genes blanco del AR involucrados en supervivencia y ciclo celular (Tan *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que la expresión de Nkx3.1 se encuentra altamente elevada en carcinomas prostáticos metastásicos (Gurel *et al.*, 2010), por lo que basándonos en estos estudios proponemos que PinX1 promueve los efectos positivos de Nkx3.1 en el ciclo celular en presencia de flutamida, incrementando su expresión.

El efecto positivo de PinX1 sobre los procesos celulares estudiados (proliferación y migración) no solo se incrementa en presencia de DHT, sino que también es mayor en ausencia de ligando y en presencia de flutamida, lo que pudiera indicar que PinX1 interactúa con vías de señalización independientes del AR. Esta misma tendencia observamos al estudiar la expresión de marcadores de EMT. Previamente se ha observado que la DHT induce la expresión de Vimentina y N-Cadherina en líneas de cáncer de próstata promoviendo un fenotipo mesenquimal el cual posee mayor potencial de invasión y migración (Zhu y Kiprianou 2010), al igual que lo obtenido en nuestros resultados. Sin embargo, en presencia de PinX1 observamos un aumento en la expresión de estas dos proteínas independiente del tratamiento con DHT.

Cabe resaltar que nuestros resultados contrastan con lo descrito recientemente por Huang *et al.*, quienes observaron que PinX1 inhibe la proliferación celular de manera independiente de andrógenos en las líneas PC3 y LNCaP (Huang *et al.*, 2017), por lo que será importante corroborar nuestros resultados obtenidos en 22Rv1 en otras líneas de cáncer de próstata.

Se sabe que, casi en su totalidad, los correguladores poseen otras funciones celulares sumadas a su papel como moduladores de la actividad transcripcional, algunas de las cuales están relacionadas con procesos oncológicos en cáncer de próstata y que, al igual que lo observado en nuestro trabajo, son independientes de la actividad del AR. En el caso

de PinX1, mediante ensayos de proliferación y formación de colonias en la línea DU-145, AR negativa, confirmamos una vía independiente de andrógenos en CaP. Las funciones mejor descritas que no involucran a PinX1 como corregulador de receptores nucleares son las que tienen que ver con la inhibición de la telomerasa (Li et al., 2015, Baichuan et al., 2016). Sin embargo, estas lo posicionan más del lado de un supresor de tumores, por lo que creemos que la vía independiente de andrógenos no es a través de la vía de la telomerasa, especialmente porque observamos estos efectos en ausencia del dominio TID de interacción con la telomerasa. Se ha descrito que algunos correguladores representan un puente entre la transcripción y la maduración del RNA promoviendo de una manera más global la expresión de proteínas, entre algunos correguladores de receptores nucleares que se han descrito con esta capacidad se encuentran PERC/PGC-1 $\beta$ , PSF, PGC-1 $\alpha$  y p68, entre otros (Auboeuf et al., 2005). Por lo que es posible que sea a través de su papel en la maduración del RNA que PinX1 contribuye a la promoción del CaP.

## Conclusiones

1. PinX1 actúa como corregulador del AR en células de CaP.
2. PinX1 se encuentra sobreexpresado en líneas celulares de CaP promoviendo la transactivación del AR y la expresión de los genes PSA y NKx3.1
3. PinX1 promueve procesos celulares oncogénicos entre los que se encuentran la proliferación, la migración y la clonogenicidad mediados por andrógenos y también a través de mecanismos independientes del AR.
4. PinX1 actúa como un corregulador de receptores esteroideos con actividad altamente específica y diferencial, siendo correpresor del ER $\alpha$  y coactivador del AR y del ER $\beta$ , teniendo efectos opuestos en cáncer de mama y CaP, por lo que su papel en cáncer depende del tipo de carcinoma dependiente de hormonas, así como del tipo de receptor esteroideo presente en el tumor.

## Perspectivas

1. Estudiar a través de ensayos de ChIP-Seq y RNA-Seq los genes a los cuales PinX1 se une e induce su expresión para conocer las vías a través de las cuales PinX1 induce procesos celulares oncogénicos independientes a la vía del AR.
2. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de Pinx1 en el desarrollo de tumores en modelo murino.

## Referencias

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2020) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 71(3):209-249.
2. Rawla P. (2019) Epidemiology of Prostate Cancer. *World journal of oncology*, 10(2), 63–89.
3. Ferlay J EM, Lam F, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I. et al. Global cancer observatory: cancer tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>, Accesado el 28 de febrero 2022. [Internet]
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 65(2):87-108.
5. Perdana NR, Mochtar CA, Umbas R, Hamid AR. (2016) The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Medica Indonesiana*. 48(3):228-238. Revisión.
6. Bashir MN. (2015) Epidemiology of Prostate Cancer. *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(13):5137-41. Revisión.
7. McNevin CS, Cadoo K, Baird AM, Murchan P, Sheils O, McDermott R, Finn S. (2021) Pathogenic *BRCA* Variants as Biomarkers for Risk in Prostate Cancer. *Cancers*(Basel). 13(22):5697.
8. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B. (2004) Human prostate cancer risk factors. *Cancer*. 101(10 Suppl):2371-490. Revisión.
9. Ferrís-i-Tortajada J, García-i-Castell J, Berbel-Tornero O, Ortega-García JA. (2011) Factores de riesgo constitucionales en el cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*. 35(5), 282–288.
10. Wilson AH. (2014) The prostate gland: a review of its anatomy, pathology, and treatment. *JAMA*. 312(5):562.
11. Aaron L, Franco OE, Hayward SW. (2016) Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*. 43(3):279-88.
12. Selman SH. (2011) The McNeal prostate: a review. *Urology*. 78(6):1224-8.
13. McNeal JE. (1981) The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*. 2(1):35-49.

14. Berry PA, Maitland NJ, Collins AT. (2008) Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 288(1-2), 30–37.
15. Marker PC, Donjacour AA, Dahiya R, Cunha GR. (2003) Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Developmental Biology*. 253(2):165-74.
16. Dehm SM, Tindall DJ. (2006) Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 99(2):333-44.
17. Heinlein CA, Chang C. (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews*. 25(2):276-308.
18. Lilja H. (1985) A Kallikrein-like Serine Protease in Prostatic Fluid Cleaves the Predominant Seminal Vesicle Protein. *The Journal of Clinical Investigation*. 76:1899–1903.
19. Hayward, S. W., & Cunha, G. R. (2000) THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. *Radiologic Clinics of North America*. 38(1), 1–14.
20. Kokontis JM, Liao S. (1999) Molecular action of androgen in the normal and neoplastic prostate. *Vitamins and Hormones*. 55:219-307.
21. Dai C, Heemers H, Sharifi N. (2017) Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 7(9):a030452.
22. Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, Bi BY, Chatterjee B. (1999) Regulation of androgen action. *Vitamins and Hormones*. 55:309-52.
23. Matsumoto, T., Sakari, M., Okada, M., Yokoyama, A., Takahashi, S., Kouzmenko, A., & Kato, S. (2013) The Androgen Receptor in Health and Disease. *Annual Review of Physiology*. 75(1), 201–224.
24. Jordan, C. L., & DonCarlos, L (2008) Androgens in health and disease: an overview. *Hormones and behavior*. 53(5), 589-595.
25. Lubahn, D., Joseph, D., Sullivan, P., Willard, H., French, F., & Wilson, E. (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*. 240(4850), 327–330.
26. Lindzey, J., Vijay Kumar, M., Grossman, M., Young, C., & Tindall, D. J. (1994) Molecular Mechanisms of Androgen Action. *Advances in Research and Applications – Steroids*. 383–432.
27. Estébanez-Perpiñá E, Bevan CL, McEwan IJ. (2021) Eighty Years of Targeting Androgen Receptor Activity in Prostate Cancer: The Fight Goes on. *Cancers (Basel)*.29;13(3):509.
28. He B, Kempainen JA, Wilson EM. (2000) FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 275(30):22986-94.

29. He B, Kempainen JA, Voegel JJ, Gronemeyer H, Wilson EM. (1999) Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*. 274(52):37219-25.
30. Li J, Fu J, Toumazou C, Yoon HG, Wong J. (2006) A role of the amino-terminal (N) and carboxyl-terminal (C) interaction in binding of androgen receptor to chromatin. *Journal of Molecular Endocrinology*. 20(4):776-85.
31. van Royen ME, Cunha SM, Brink MC, Mattern KA, Nigg AL, Dubbink HJ, Verschure PJ, Trapman J, Houtsmuller AB. (2007) Compartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells. *Journal of Cell Biology*. 177(1):63-72.
32. Dehm SM, Tindall DJ. (2007) Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Journal of Molecular Endocrinology*. 21(12):2855-63.
33. Shen HC, Coetzee GA. (2005) The androgen receptor: unlocking the secrets of its unique transactivation domain. *Vitamins and Hormones*. 71:301-19.
34. Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*. 352, 497–505.
35. Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F, Gewirth DT. (2004) Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(14):4758-63.
36. Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., & Haelens, A. (2008) Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nuclear receptor signaling*. 6, e008.
37. Bai S, He B, Wilson EM. (2005) Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction. *Molecular and Cellular Biology*. 25:1238–1257
38. Davies P, Watt K, Kelly SM, Clark C, Price NC, McEwan IJ. (2008) Consequences of poly-glutamine repeat length for the conformation and folding of the androgen receptor amino-terminal domain. *Journal of Molecular Endocrinology*. 41(5):301-14.
39. Buchanan, G. (2004) Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Human Molecular Genetics*. 13(16), 1677–1692.
40. Buchanan, G., Irvine, R.A., Coetzee, G.A. and Tilley, W.D. (2001) Contribution of the androgen receptor to prostate cancer predisposition and progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 20, 207–223.
41. Ding, D., Xu, L., Menon, M., Reddy, G. P. V., & Barrack, E. R. (2004) Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *The Prostate*. 62(2), 133–139.

42. Gobinet, J., Poujol, N., & Sultan, C. (2002). Molecular action of androgens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 198(1-2), 15–24.
43. Wang, G., & Sadar, M. D. (2006). Amino-terminus domain of the androgen receptor as a molecular target to prevent the hormonal progression of prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 98(1), 36–53.
44. Culig, Z., Hobisch, A., Bartsch, G., & Klocker, H. (2000) Androgen receptor - an update of mechanisms of action in prostate cancer. *Urological Research*. 28(4), 211–219.
45. Copeland, B. T., Pal, S. K., Bolton, E. C., & Jones, J. O. (2018) The androgen receptor malignancy shift in prostate cancer. *The Prostate*, 78(7), 521–531.
46. Culig, Z., & Santer, F. R. (2014) Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 33(2-3), 413–427.
47. Debes, J. D., & Tindall, D. J. (2004) Mechanisms of Androgen-Refractory Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 351(15), 1488–1490.
48. Ichikawa, T., Suzuki, H., Ueda, T., Komiya, A., Imamoto, T., & Kojima, S. (2005) Hormone treatment for prostate cancer: current issues and future directions. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 56(S1), 58–63.
49. Kirby M, Hirst C, Crawford ED (2011) Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract* 65:1180–1192.
50. Sundi D, Wang VM, Pierorazio PM, et al. (2014) Very-high-risk localized prostate cancer: definition and outcomes. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 17:57–63
51. Edwards J, Bartlett JMS. (2005). The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor. *BJU International*. 95:1320–1326.
52. Holzbeierlein J, Lal P, LaTulippe E, Smith A, Satagopan J, Zhang L, Ryan C, Smith S, Scher H, Scardino P, Reuter V, Gerald WL. (2004) Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *The American Journal of Pathology*. 164:217–227.
53. Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, Sutherland R, Nigam R, Murthy L, Zhao Y, DiConcini D, Puxeddu E, Esen A, Eastham J, Weigel NL, Lamb DJ. (2000) Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Research*. 60:944–949
54. Agoulnik, I. U., & Weigel, N. L. (2006). Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(2), 362–372.
55. Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Seino S, Shimazaki J (1993) Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 46:759–765
56. Stekettee K, Timmerman L, Ziel-van der Made AC, Doesburg P, Brinkmann AO, Trapman J. (2002) Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer.

*Int J Cancer* 100:309–317

57. Ueda T, Bruchofsky N, Sadar M (2002) Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem* 277:7076–7085
58. GIOELI, D. (2005). Signal transduction in prostate cancer progression. *Clinical Science*, 108(4), 293–308.
59. Linja MJ, Porkka KP, Kang Z, Savinainen KJ, Janne OA, Tammela TL, Vessella RL, Palvimo JJ, Visakorpi T. (2004). Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10:1032–1040.
60. Agoulnik IU, Vaid A, Bingman WE 3rd et al (2005) Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Res* 65:7959–7967
61. Zhou HJ, Yan J, Luo W, Ayala G, Lin SH, Erdem H, Ittmann M, Tsai SY, Tsai M-J. (2005). SRC-3 is required for prostate cancer cell proliferation and survival. *Cancer Res* 65:7976–7983.
62. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, Sawyers CL (2004) Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *NatMed* 10:33–39
63. Debes JD, Sebo TJ, Lohse CM, Murphy LM, Haugen DA, Tindall DJ. (2003) p300 in prostate cancer proliferation and progression. *Cancer Res.* 63(22):7638-40. PMID: 14633682.
64. Comuzzi L, Lambrinidis L, Rogatsch H et al (2003) The transcriptional co-activator cAMP response element-binding protein- binding protein is expressed in prostate cancer and enhances androgen- and anti-androgen-induced androgen receptor function. *Am J Pathol* 162:233–241
65. Hsia EY, Goodson ML, Zou JX, Privalsky ML, Chen HW. (2010). Nuclear receptor coregulators as a new paradigm for therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 62(13):1227-37. Revisión.
66. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. (2001) Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 93(22):1687-97. Revisión.
67. Culig, Z., & Santer, F. R. (2011). *Androgen receptor co-activators in the regulation of cellular events in prostate cancer. World Journal of Urology, 30(3), 297–302.*doi:10.1007/s00345-011-0797-6
68. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387(6634):733-6.
69. Rahman M, Miyamoto H, Chang C. (2004). Androgen receptor coregulators in prostate cancer: mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 10(7):2208-19. Revisión

70. Noriega-Reyes MY, Rivas-Torres MA, Oñate-Ocaña LF, Vallés AJ, Baranda-Avila N, Langley E. 2015. Novel role for PINX1 as a coregulator of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Endocrinol* 414:9-18.
71. Chen G, Da L, Xu Y, Xu M, Song L, Li T, Zhao M. (2010) C-terminal amino acids 290-328 of LPTS/PinX1 confer telomerase inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 398(4):683-9.
72. Li, H. L., Song, J., Yong, H. M., Hou, P. F., Chen, Y. S., Song, W. B., Bai, J., & Zheng, J. N. (2016). PinX1: structure, regulation and its functions incancer. *Oncotarget*, 7(40),66267–66275.
73. Baichuan L, Cao S, Liu Y. (2015) LPTS: A Novel Tumor Suppressor Gene and a Promising Drug Target for Cancer Intervention. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 10(2):170-5.
74. Chan HC, Lau YT, Ding Q, Li CK, Wong CM, Shaw PC, Waye MMY, Tsang SY. (2020) PinX1t, a Novel PinX1 Transcript Variant, Positively Regulates Cardiogenesis of Embryonic Stem Cells. *J Am Heart Assoc.* 9(6):e010240.
75. Flores-Ramírez I, Rivas-Torres MÁ, Rodríguez-Dorantes M, Gutiérrez-Sagal R, Baranda-Avila N, Langley E. (2021) Oncogenic role of PinX1 in prostate cancer cells through androgen receptor dependent and independent mechanisms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 210:105858.
76. Zhou XZ, Lu KP. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell.* 107(3):347-59.
77. Zhou XZ. (2011). PinX1: a sought-after major tumor suppressor at human chromosome 8p23. *Oncotarget* 2(10): 810-9.
78. Shi M, Cao M, Song J, Liu Q, Li H, Meng F, Pan Z, Bai J and Zheng J. 2015. PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer *via* suppressing NF-kappaB/MMP-9 signaling pathway. *Molecular cancer.* 14:66.
79. Yuan K, Li N, Jiang K, Zhu T, Huo Y, Wang C, Lu J, Shaw A, Thomas K, Zhang J, Mann D, Liao J, Jin C and Yao X. (2009) PinX1 is a novel microtubule-binding protein essential for accurate chromosome segregation. *The Journal of biological chemistry.* 284(34):23072-23082.
80. Kang, J., Park, J. H., Kong, J. S., Kim, M. J., Lee, S. S., Park, S., & Myung, J. K. (2021). PINX1 promotes malignant transformation of thyroid cancer through the activation of the AKT/MAPK/β-catenin signaling pathway. *American journal of cancer research*, 11(11), 5485–5495.
81. C. Liao, M. Zhao, H. Song, K. Uchida, K.K. Yokoyama, T. Li, (2000) Identification of the gene for a novel liver-related putative tumor suppressor at a high-frequency loss of heterozygosity region of chromosome 8p23 in human hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 32 721–727.

82. C. Liao, M.J. Zhao, M.J. Zhao, D. Jia, H. Song, Z.P. Li, (2002) Over-expression of LPTS-L in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 induces crisis, *World J. Gastroenterol.* 8 (6) 1050–1052.
83. Park, W. S., Lee, J. H., Park, J. Y., Jeong, S. W., Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, S. K., Lee, S. N., Lee, S. H., Park, C. G., Yoo, N. J., & Lee, J. Y. (2002). Genetic analysis of the liver putative tumor suppressor (LPTS) gene in hepatocellular carcinomas. *Cancer letters*, 178(2), 199–207.
84. Nishimura K, Ting HJ, Harada Y, Tokizane T, Nonomura N, Kang HY, Chang HC, Yeh S, Miyamoto H, Shin M, Aozasa K, Okuyama A, Chang C. (2003). Modulation of androgen receptor transactivation by gelsolin: a newly identified androgen receptor coregulator. *Cancer Res* 15;63(16):4888-94.
85. Miyamoto H, Yeh S, Wilding G, Chang C. (1998) Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 23;95(13):7379-84
86. I. Gurevich, A.M. Flores, B.J. Aneskievich, (2007) Corepressors of agonist-bound nuclear receptors, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223 (3) 288–298, doi:10.1016/j.taap.2007.05.019.
87. Zhu, Y., & Luo, J. (2020). Regulation of androgen receptor variants in prostate cancer. *Asian journal of urology*, 7(3), 251–257.
88. Wu Y, Vadgama JV. (2017) Androgen Receptor as a Potential Target for Treatment of Breast Cancer. *Int J Cancer Res Mol Mech.* 3(1). doi:10.16966/2381-3318.129.
89. G. Daniels, Y. Li, L.L. Gellert, A. Zhou, J. Melamed, X. Wu, et al., (2014) TBLR1 as an androgen receptor (AR) coactivator selectively activates AR target genes to inhibit prostate cancer growth, *Endocr. Relat. Cancer* 21 (1) 127–142, doi:10.1530/ERC-13-0293.
90. Louie MC, Yang HQ, Ma AH, Xu W, Zou JX, Kung HJ, Chen HW. (2003) Androgen-induced recruitment of RNA polymerase II to a nuclear receptor-p160 coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(5):2226-30.
91. Shang Y, Myers M, Brown M. (2002) Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell.* 9(3):601-10.
92. Kang Z, Jänne OA, Palvimo JJ. (2004) Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 18(11):2633-48.
93. Nadiminty N, Lou W, Sun M, Chen J, Yue J, Kung HJ, Evans CP, Zhou Q, Gao AC. (2010). Aberrant activation of the androgen receptor by NF-kappaB2/p52 in prostate cancer cells. *Cancer Research.* 70(8):3309-19
94. Chen, C. D., & Sawyers, C. L. (2002). NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer. *Molecular*

*and cellular biology.* 22(8), 2862-70.

95. Lei Q, Jiao J, Xin L, Chang CJ, Wang S, Gao J, Gleave ME, Witte ON, Liu X, Wu H. (2006). NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer Cell.* 9(5):367-78.
96. P. Wang, Q. Ma, J. Luo, B. Liu, F. Tan, Z. Zhang, et al., (2009) Nkx3.1 and p27(KIP1) cooperate in proliferation inhibition and apoptosis induction in human androgen-independent prostate cancer cells, *Cancer Invest.* 27 (4) 369–375,
97. .Y. Tan, C.W. Chang, K.R. Chng, K.D. Wansa, W.K. Sung, E. Cheung, (2012) Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival, *Mol. Cell. Biol.* 32 (2) 399–414.
98. B. Gurel, T.Z. Ali, E.A. Montgomery, S. Begum, J. Hicks, et al., (2010) NKX3.1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors, *Am. J. Surg. Pathol.* 34 (8) 1097–1105.
99. Zhu ML, Kyprianou N. (2010) Role of androgens and the androgen receptor in epithelial-mesenchymal transition and invasion of prostate cancer cells. *FASEB J* 24(3):769-77.
100. Huang WJ, Li M, Jin XH, Huang XJ, Zhao W, Tian XP. (2017) Genetic profile and biological implication of PIN2/TRF1-interacting telomerase inhibitor 1 (PinX1) in human cancers: an analysis using The Cancer Genome Atlas. *Oncotarget* 21;8(40):67241-67253.
101. Auboeuf D, Dowhan DH, Dutertre M, Martin N, Berget SM, O'Malley BW. (2005) A subset of nuclear receptor coregulators act as coupling proteins during synthesis and maturation of RNA transcripts. *Mol Cell Biol.* 25(13): 5307-5316. doi:10.1128/MCB.25.13.5307-5316.2005