

Rol de las células madre en Cáncer de Próstata



(*) Por orden alfabético

GRUPO 70^(*):

Acosta Agustín

Braga María

Brandón Emiliano

Medina Giuliano

Melamed Felipe

Palermo Lucía

TUTOR:

Dra. Mercedes Rodríguez-Teja
Departamento de Genética
Facultad de Medicina
UDELAR

Monografía
Ciclo de Metodología Científica II
Octubre 2019

CONTENIDO

Resumen	2
Abstract	3
Metodología.....	4
Epidemiología del Cáncer de Próstata	4
Origen del Cáncer: células madre tumorales.....	5
Plasticidad de las células madre tumorales	6
Rol de las células madre en el proceso de metástasis.....	8
Células madre de tumores prostáticos	12
Factores moleculares que median la Transición epitelio-mesenquimal	13
Terapias actuales y desarrollo de tumores resistentes	18
Terapias Emergentes	19
Conclusiones	20
Agradecimientos	20
Referencias.....	21

Imagen carátula: Inmunofluorescencia, Cáncer de Próstata,
Dr. Aamir Ahmed
Centre for Stem Cells and Regenerative Medicine
King's College London

RESUMEN

En Uruguay el cáncer de próstata es el cáncer de mayor incidencia en hombres y la tercera causa de muerte por esta patología. Actualmente se conoce que el tumor primario se compone de un grupo heterogéneo de células de las cuales se destacan las células madre de tumor. No todas las células cancerígenas poseen la capacidad de iniciar un tumor o de generar una metástasis en un tejido distante. Las células madre son un pequeño grupo de células en la masa tumoral con características especiales que les permiten desarrollar con éxito las diferentes etapas involucradas en la progresión del cáncer. Es la plasticidad fenotípica observada en las células madre de tumor, y la capacidad de auto-renovarse, quien le confiere una ventaja selectiva a la hora de adaptarse a diferentes microambientes, cambiando de paradigma en el modelo actual sobre la génesis y naturaleza del cáncer. La plasticidad fenotípica de las células madre de tumores les permite a las células avanzar exitosamente todas las etapas del proceso de metástasis (invasión local, intravasación, circulación en el torrente, extravasación y colonización de un nuevo nicho), proceso que es sumamente ineficiente debido al estrés que sufre la célula. Entre los cambios fenotípicos más importantes se destaca la transición epitelio mesenquimal (TEM), caracterizada por la modificación en la expresión de marcadores moleculares y señales extrínsecas. Hoy en día existen diferentes planes terapéuticos, tanto para el cáncer de próstata localizado, como para el estadio metastásico del mismo. Los diferentes tratamientos están enfocados en la mayor población de células cancerígenas que conforman el tumor y poseen un mayor índice mitótico, dejando por fuera como blanco terapéutico a las células madres tumorales. Las mismas adquieren resistencia a los tratamientos tradicionales logrando perpetuar la existencia del tumor, conformando así un blanco complejo pero fundamental en las directivas terapéuticas del futuro.

Palabras clave: Cáncer de próstata, Metástasis, Plasticidad celular, Célula madre tumoral, Células tumorales circulantes, Transición epitelio mesenquimal.

ABSTRACT

In Uruguay, prostate cancer is the cancer with the highest incidence in men and the third cause of death due to this disease. It is currently known that the primary tumor is composed of a heterogeneous group of cells from which the tumor stem cells stand out. Not all cancer cells have the ability to start a tumor or generate a metastasis in distant tissue. Stem cells are a small group of cells in the tumor mass with special characteristics that allow them to successfully develop the different stages involved in cancer progression. It is the phenotypic plasticity observed in the tumor stem cells, and the ability to renew themselves, which gives them a selective advantage when adapting to different microenvironments, changing the paradigm in the current model on the genesis and nature of cancer. The phenotypic plasticity of tumor stem cells allows cells to successfully pass all stages of the metastasis process (local invasion, intravasation, circulation in the torrent, extravasation and colonization of a new niche), a process that is extremely inefficient due to stress suffered by the cell. Among the most important phenotypic changes is the epithelial mesenchymal transition (EMT), characterized by the modification in the expression of molecular markers and extrinsic signals. Today there are different therapeutic plans, both for localized prostate cancer, and for its metastatic stage. The different treatments are focused on the largest population of cancer cells that make up the tumor and have a higher mitotic index, leaving tumor stem cells out as a therapeutic target. They acquire resistance to traditional treatments, managing to perpetuate the existence of the tumor, thus forming a complex but fundamental target in the therapeutic directives of the future.

Key words: Prostate Cancer, Metastasis, Cellular plasticity, Tumor stem cells, Circulating tumor cells, Epithelial-Mesenchymal transition.

METODOLOGÍA

El trabajo consiste en una revisión bibliográfica sobre el “*Rol de las células madre en el cáncer prostático*”. Para ello nos dividimos en tres grupos de dos estudiantes cada uno; cada subgrupo profundizó en una temática (Tabla 1). Durante el mes de mayo realizamos una sesión por semana para familiarizarnos con conocimientos básicos de cada subtema. A partir del mes de junio hasta setiembre realizamos sesiones de discusión de artículos científicos seleccionados (una vez por semana). Cada grupo de expertos realizó búsquedas de artículos científicos en las bibliotecas médicas Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y/o Timbo (<https://foco.timbo.org.uy/home>), que fueron presentados al resto de los compañeros en las reuniones semanales (presentación de 15-20 minutos).

Tabla 1- Expertos de cada subtema.

Estudiantes	Subtema
María Braga, Lucía Palermo	Características generales de células madre tumorales Terapias para la eliminación de células madre tumorales resistentes
Emiliano Brandón, Giuliano Medina	Capacidad pro-migratoria y pro-invasiva de las células madre tumorales
Agustín Acosta, Felipe Melamed	Células madre tumorales circulantes

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata es la enfermedad oncológica más frecuente en el hombre uruguayo (Figura 1) con una incidencia de 1413 casos por año (57.98 casos cada 100.000 habitantes)(1). Afortunadamente, a partir del 2004 se ha observado un descenso en la mortalidad debido a éste cáncer en nuestra población, registrándose 585 casos por año(1). Este descenso en la mortalidad se debe, en parte, a un aumento en la detección precoz y, por ende, al tratamiento temprano de pacientes afectados. Las pruebas de tamizaje disponibles para detectar el cáncer de próstata tienen bajo costo y pueden realizarse de rutina en la clínica; las mismas consisten en el examen tacto rectal y la detección de antígeno prostático específico (PSA) en sangre. Sin embargo, en EEUU ha disminuido el uso rutinario de estas pruebas debido al sobrediagnóstico y sobretratamiento de pacientes no afectados con resultados positivos (periodo 2008 a 2013) (2,3). En Uruguay el Servicio de Oncología Clínica (Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina) sostiene que no hay evidencias disponibles para la recomendación de un programa de tamizaje a nivel poblacional y recomiendan que la decisión de realizarlo o no sea individualizada considerando el riesgo del paciente(4).

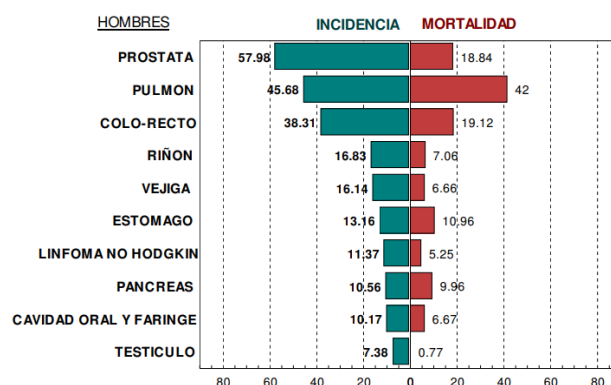


Figura 1- Incidencia y mortalidad de los principales sitios en Hombres. Período 2011-2015. Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos por 100.000 habitantes. Tomado de página web de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el cáncer (<http://www.comisioncancer.org.uy>) (1).

Actualmente existe gran cantidad de terapias (terapia de deprivación androgénica, quimioterapia, cirugía radical, etc) para pacientes con cáncer de próstata de bajo grado (low-risk: PSA < 10 ng/ml, Gleason < 7 y cT1–cT2a), observándose luego del tratamiento remisiones completas o parciales. Sin embargo, pacientes con metástasis se ven limitados a terapia de privación de andrógenos y presentan una menor respuesta al tratamiento y pronóstico desfavorable. En la mayoría de los casos los tumores se vuelven resistentes a las terapias convencionales, resultando en la selección de células madre tumorales resistentes y al desarrollo de tumores diseminados más agresivos y baja tasa de supervivencia del paciente afectado.

ORIGEN DEL CÁNCER: CÉLULAS MADRE TUMORALES

No cualquier célula cancerígena es capaz de iniciar un tumor. Las células madre capaces de iniciar tumores son una pequeña población que presenta la capacidad de auto-renovarse (generar más de sí mismas) y de diferenciarse (dividirse de manera asimétrica y generar células más diferenciadas). Operacionalmente, se define a una población de células madre de tumor como aquellas capaces de generar una masa tumoral cuando son implantadas en pequeñas cantidades (aprox. 500-1000 células) en un huésped ratón inmunocomprometido (5). Estas células son muy plásticas, lo que les confiere gran potencial, no solo en el inicio del crecimiento tumoral, sino también en el desarrollo de una metástasis, donde la célula tumoral debe moverse a través de diferentes tejidos y adaptarse a un nuevo microambiente tisular. Es por esta plasticidad fenotípica que la célula madre tumoral es tan exitosa y la comunidad científica se ha volcado a diseñar planes terapéuticos que tengan como blanco a las células madre tumorales.

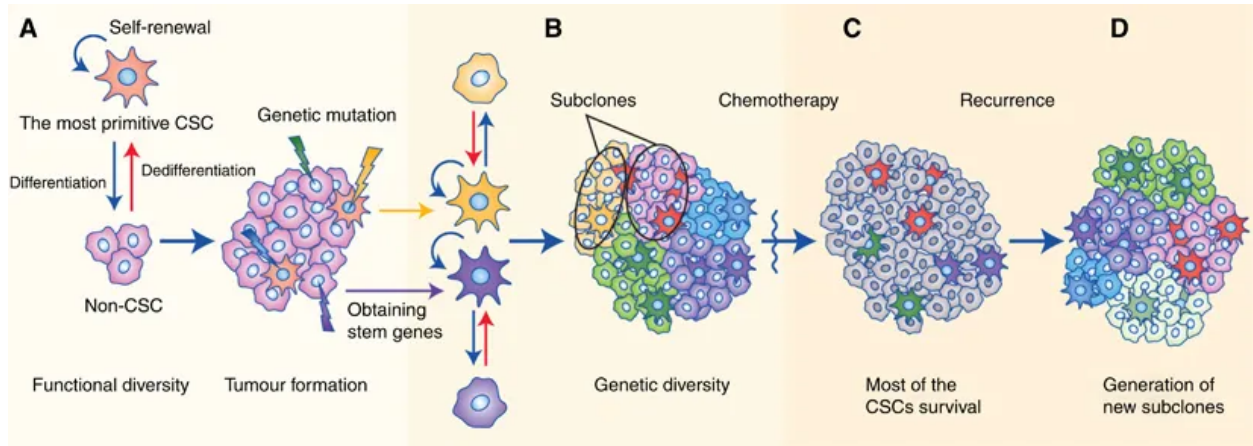


Figura 2- Combinación del modelo estocástico y jerárquico. **A.** Las células madre se dividen continuamente, se auto-renuevan y se diferencian en distintos tipos celulares. Además, durante el proceso de carcinogénesis podrían ocurrir mutaciones no sólo en el genoma de las células madre, sino también en el genoma de las células tumorales para dotarlas con características de maternidad. **B.** Aumenta la heterogenicidad celular en el tumor mientras se acumulan mutaciones a lo largo del proceso de carcinogénesis. **C.** Existen subpoblaciones de células madre de tumor resistentes a la quimioterapia o radioterapia. **D.** Las células madre tumorales residuales causan el relapso del tumor y surgen más nuevos clones con características más agresivas. CSC, célula madre de tumor. Tomado de Song et al. 2017(7).

Originalmente se sostenía que el cáncer era un conjunto de células de origen clonal que sufrieron múltiples mutaciones las cuales les confirieron el fenotipo inmortal (Modelo de evolución clonal o estocástico); posteriormente con la identificación de células madre iniciadoras de tumores se postuló un modelo de mayor complejidad el cual propone que el cáncer es un conjunto heterogéneo de células entre las que se encuentran células madre tumorales (Modelo jerárquico de células madre de tumor). Si bien ambos modelos explican la heterogenicidad de células en la masa tumoral, ningún modelo por sí solo es capaz de explicar la gran diversidad que se encuentra dentro de un tumor(6). En este sentido Kreso y Dick(6) han propuesto un tercer modelo que integra el modelo estocástico con el jerárquico (Figura 2). El mismo combina la acumulación de mutaciones en el genoma de células madre iniciadoras de tumores con la plasticidad fenotípica de las mismas, dando origen a distintos subclones de células madre tumorales diferentes genéticamente. A su vez, este modelo dinámico es modulado por determinantes como la epigenética, el ambiente del nicho donde se localizan las subpoblaciones de células madre y el microambiente tumoral(6).

PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES

La plasticidad fenotípica es una característica de las células madre, y en particular de las células madre tumorales, esencial para el proceso de carcinogénesis. Se define por la capacidad de la célula de cambiar su fenotipo, teniendo la posibilidad de generar distintos tipos celulares o retornar a un estado de célula madre pluripotente (menos diferenciada). La plasticidad está dada, por un lado, por el proceso de dediferenciación (Figura 3), el cual consiste en la capacidad de una célula diferenciada de retornar a un

fenotipo menos diferenciado con propiedades de célula madre y, por otro lado, por la transdiferenciación (Figura 3) que hace referencia al potencial de una célula diferenciada de convertirse en otra célula diferenciada con distinto fenotipo.

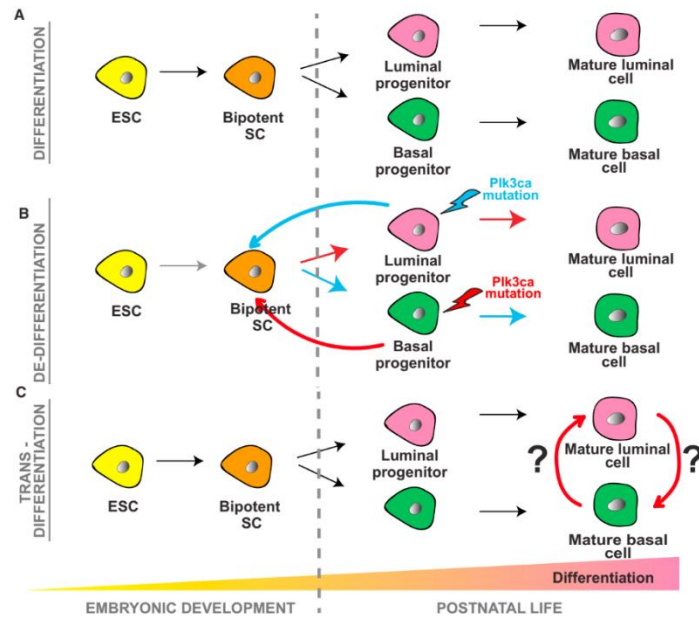


Figura 3- Tipos de diferenciación inducidos durante la plasticidad celular A. Diferenciación: Proceso por el cual una célula pobremente diferenciada se convierte en una célula diferenciada. B. Dediferenciación: capacidad de una célula diferenciada de retornar a un fenotipo menos diferenciado. C. Transdiferenciación: capacidad de una célula diferenciada de convertirse en otra célula diferenciada, pero con distinto fenotipo. ESC: Célula madre embrionaria. Bipotent SC: Célula madre bipotente. Luminal progenitor: Progenitor luminal. Basal progenitor: Progenitor basal. Mature basal cell: Célula basal madura. Mature luminal cell: Célula luminal madura. Modificado de Gupta PB y colaboradores, 2018(15).

La plasticidad fenotípica (transdiferenciación o dediferenciación) puede ser inducida por factores moleculares expresados en la célula madre (plasticidad intrínseca) o por cambios en el microambiente celular (plasticidad extrínseca) (8,9). Entre los factores de transcripción de mayor relevancia involucrados en la plasticidad fenotípica se encuentran: Oct 3/4, BMI1, β -catenina, SOX2, c-Myc, y Klf4 (10–12). Takahashi y Yamanaka demostraron que células de fibroblastos de ratón adulto pueden dediferenciarse a un estado tipo-embriogénico (célula madre) y ser mantenidas en este estado mediante la introducción de cuatro factores de transcripción: Oct3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4(13). Factores ambientales como la interacción de la célula tumoral con células del estroma, la hipoxia y el proceso de inflamación también pueden modular la plasticidad de la célula madre tumoral. En 2008, Booth y colaboradores(14) demostraron cómo células madre neuronales adoptaban funciones similares a las células mamarias cuando eran introducidas en la glándula mamaria, apoyando la hipótesis que señales específicas provenientes del estroma tisular favorecen y modulan la plasticidad fenotípica.

La plasticidad fenotípica les permite a las células madre de tumores pasar dinámicamente de un estado a otro en respuesta al microambiente, en este sentido las transiciones fenotípicas que sufre una célula madre

tumoral están estrechamente asociadas a la adquisición de su capacidad migratoria e invasiva y al proceso de metástasis.

ROL DE LAS CÉLULAS MADRE EN EL PROCESO DE METÁSTASIS

Se define metástasis como la manifestación tumoral en un sitio distinto y distante al ocupado por el tumor primario. En base a este concepto Chaffer y Weinberg lo describen como un proceso que ocurre en dos etapas, la primera consiste en la diseminación de células cancerígenas al sitio distante, y la segunda en la capacidad de desarrollar una lesión maligna en el mismo (16). La metástasis es el estadio avanzado de un cáncer, asociado a mal pronóstico, mayor morbimortalidad, menor respuesta al tratamiento y recidiva de la enfermedad. Cabe mencionar que no todas las células madre tumorales tienen la capacidad de generar metástasis. Las células que migran y tienen la capacidad de quedarse en otros tejidos se las denomina células tumorales diseminadas o células tumorales circulantes (CTC), estas células pueden dar origen a la metástasis, pero no significa que todas las células tumorales diseminadas tengan la capacidad de hacerlo. Las células madre metastásicas son aquellas células tumorales diseminadas que tienen la capacidad de reiniciar un tumor macroscópico en un tejido distante.

Para comenzar, en el proceso de metástasis la célula tumoral debe adquirir el fenotipo migratorio y comenzar la invasión del tejido adyacente. Como se verá en detalle más adelante, el fenotipo migratorio de una célula tumoral de origen epitelial es adquirido mediante una transición epitelio-mesenquimal (TEM) en etapas tempranas del desarrollo del cáncer primario. Si bien las células tumorales pueden poseer la capacidad de invadir el tejido circundante en un cáncer localizado, la misma se hace evidente ante condiciones de estrés ambiental (por ejemplo: hipoxia y privación de factores de crecimiento). A esta primera etapa de invasión local le sigue una sucesión de etapas en donde la célula tumoral debe entrar en la circulación (intravasación), sobrevivir en el vaso sanguíneo o linfático (Figura 4A), salir de la circulación para llegar al nicho metastásico (extravasación), sobrevivir en el nuevo microambiente para finalmente proliferar y conseguir la colonización metastásica (micro y macro metástasis) (Figura 4B). Si bien la invasión local suele incluir al lecho linfático, los tumores más agresivos son aquellos que se diseminan por vía hematológica(16,17).

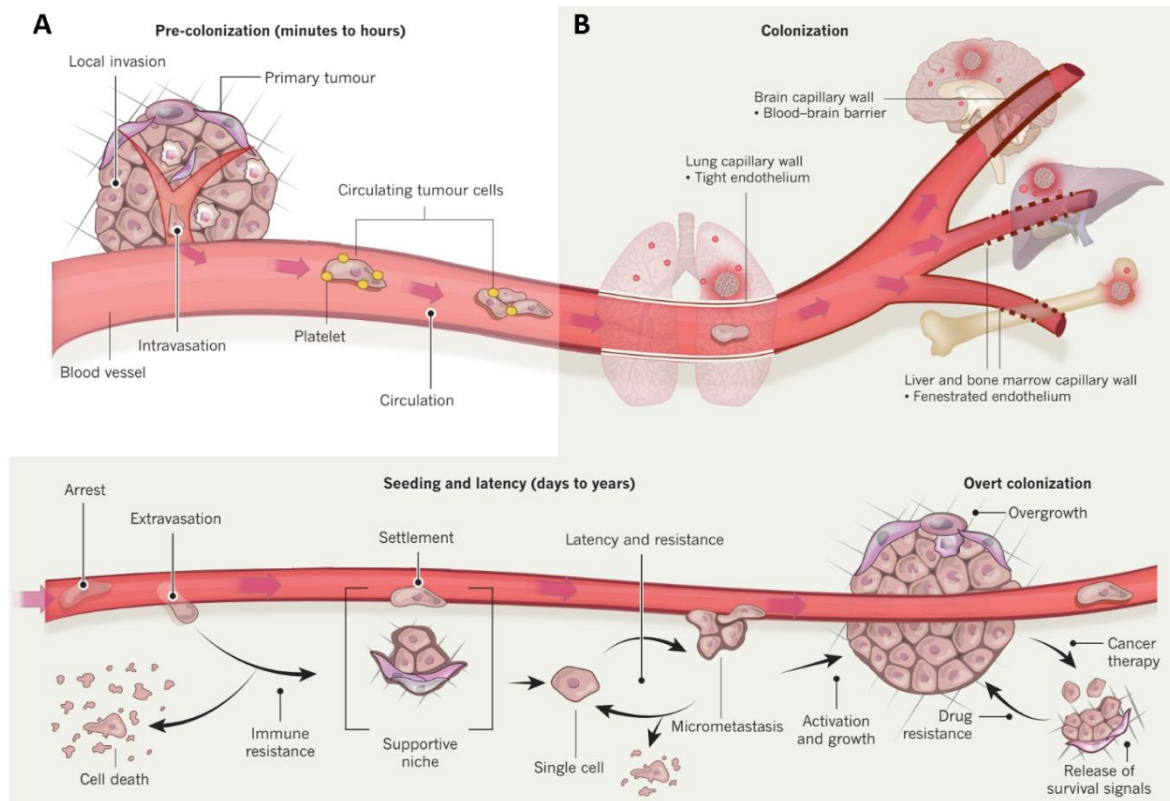


Figura 4- Cascada metastásica. **A.** Proceso de pre-colonización, ocurre en minutos a horas. Conformada por los siguientes pasos: invasión celular en el sitio tumoral primario, intravasación en la vasculatura tumoral, circulación celular recubiertas de plaquetas por los vasos sanguíneos (pudiendo hacerlo aisladas o en grupos), detención en capilares de sitios distantes y comienzo de extravasación hacia el tejido diana. **B.** Proceso de colonización metastásica, puede ocurrir en años. Conformada por: la extravasación total en el tejido diana, la resistencia a la inmunidad presente en el tejido, el asentamiento en nichos de apoyo, el estado de quiescencia o latencia y adquisición de propiedades de resistencia contra el sistema inmune. Estos estados pueden presentarse tanto de forma individual como en cúmulos celulares conocidos como micrometástasis. Posteriormente ocurre: la reiniciación del crecimiento de la metástasis, consolidación de metástasis manifiesta, conocida también como macrometástasis, punto donde el tratamiento es menos efectivo. Esto se debe a la interacción tumor-huésped que genera células tumorales resistentes a las drogas una vez que el tejido se ve expuesto al estrés del tratamiento. Tomado de Massagué et al. 2016(21).

La metástasis comienza con el crecimiento del tumor primario llamado invasión local (Figura 4). Una vez logrado esto, las células se encuentran en la periferia de lechos vasculares y desde este punto adquieren capacidad de movimiento y migración gracias a los cambios morfológicos observados durante la TEM. Existe evidencia que adjudica dichos cambios morfológicos a la expresión de diversos factores del estroma, entre los que se destaca la presencia del factor de crecimiento tumoral TGF- β (18). Una vez en la vasculatura tumoral (intravasación), las células deben recorrer el torrente sanguíneo superando varios obstáculos como el sistema inmune del huésped y el estrés oxidativo. Un ejemplo de cómo estas células logran superar el sistema inmune es viajar recubiertas de plaquetas para no ser detectadas. Se han identificado en CTC de melanoma, mecanismos basados en la producción de NADPH por la vía del folato para lograr superar el estrés oxidativo al que se ven expuestas en el torrente sanguíneo. Experimentos han demostrado reducir el tamaño de las metástasis en base a la inhibición de esta vía. (19). Luego de viajar por el torrente sanguíneo

sin ser eliminadas, las CTC deben detenerse en los capilares del sitio donde se generará la metástasis y por último extravasar al estroma de dicho órgano. Todo este proceso previo a la colonización es un proceso muy rápido que puede llevarse a cabo en cuestión de horas o días. No obstante, constantemente existen CTC en el torrente sanguíneo de los individuos que han sido aisladas y utilizadas como valor pronóstico de la progresión de la enfermedad (20). Luego del proceso de pre colonización, la célula comienza el periodo de colonización, que inicia con la extravasación desde el capilar hacia el tejido donde se generará la metástasis. La célula ingresa, tanto individualmente como en grupos (micrometástasis indolentes), en los nichos de apoyo en el sitio blanco para poder evadir al sistema inmune y resguardarse, entrando así en una etapa de latencia. Durante este período las CTC indolentes pueden adquirir rasgos morfológicos de las células nativas del tejido, mientras conviven en un ambiente de simbiosis con el huésped y el sistema inmune. Cabe destacar que esta es una de las interacciones donde el sistema inmune favorece y protege a las CTC contribuyendo al proceso de metástasis. Luego de este período de latencia de las CTC, las mismas se reactivan reiniciando así la cascada metastásica. Con frecuencia las metástasis son resistentes a los tratamientos convencionales, esto se explica porque al recibir el estrés de los tratamientos específicos las CTC se benefician de señales de supervivencia generadas por el tejido huésped. Como producto de esta interacción resultan células metastásicas resistentes a los tratamientos.

Esta secuencia compleja de pasos hace al proceso de metástasis un fenómeno altamente ineficiente, donde la célula tumoral debe pasar múltiples obstáculos para lograr su cometido. Desde sus etapas tempranas el tumor primario libera a la sangre cientos de CTC, sin embargo, un porcentaje pequeño de las mismas es capaz de colonizar un nuevo órgano o tejido y generar una metástasis (21); por ejemplo en melanoma tan solo un 0,02% de células inyectadas por vía venosa son capaces de generar macrometástasis a nivel hepático(22). La inyección de células tumorales directamente en el lecho venoso demostró que las primeras etapas eran llevadas a cabo con éxito y rápidamente (aproximadamente el 80% de las células inyectadas eran capaces de sobrevivir en la circulación y realizar la extravasación), sin embargo, la eficiencia metastásica caía drásticamente en la etapa final de la metástasis, donde un 0,1% de las células inyectadas eran capaces de generar la lesión metastásica en el nuevo microambiente (23).

La plasticidad fenotípica de las células madre tumorales les proporcionan una ventaja frente a la adaptación a los diferentes ambientes por donde transita, desde la salida del tumor primario hasta la conquista del nuevo nicho metastásico. En términos generales, las células madre conforman una población celular que reside en un nicho, el cual les otorga un microambiente propicio para mantener el balance entre quiescencia y auto-renovación. Esto implica la coexistencia en un paciente de metástasis que ha desarrollado tumores en órganos distantes, conjuntamente con metástasis conformadas por células madre tumorales diseminadas en estado quiescentes (metástasis latentes)(21). Las células madre tumorales pueden mantenerse en estado

quiescente hasta que experimenten estrés ambiental y desarrollen una réplica macroscópica del tumor en el nuevo tejido diana; de modo que, la interacción de las células madre tumorales con el microambiente de los distintos órganos determina el desarrollo de una metástasis y los patrones de distribución de metástasis característicos de cada tumor primario (por ejemplo: el cáncer de próstata suele generar metástasis en el hígado, hueso, pulmón, glándula suprarrenal). De la observación clínica que los distintos tipos de tumores primarios prefieren lugares específicos donde desarrollar sus metástasis, surge la teoría de “semilla y suelo” (*seed and soil*). Para las células madre tumorales circulantes muy pocos tejidos son ambientes propicios para proliferar, y de todos los ambientes posibles el mejor es el estroma generado en el tumor primario, ocurriendo a lo largo de la progresión de la patología una resiembra de las células tumorales circulantes en los lugares primarios y metástasis ya establecidas(21).

Los nichos les proveen a las células tumorales que se encuentran circulando, un microambiente propicio para su resguardo, rico en señales para su supervivencia, proliferativas y anti-apoptóticas, y protegidos de posibles ataques del sistema inmune del paciente. Se ha clasificado en cuatro grupos de nichos de células tumorales: Nichos pre-metastásicos, perivasculares, Ad Hoc y de células madre de tejido (Tabla 2 y Figura 5). Estos cuatro tipos de nichos estudiados y detectados hasta el momento se comportan de forma que no poseen un orden exacto, si no que pueden superponer entre sí y compartir características.

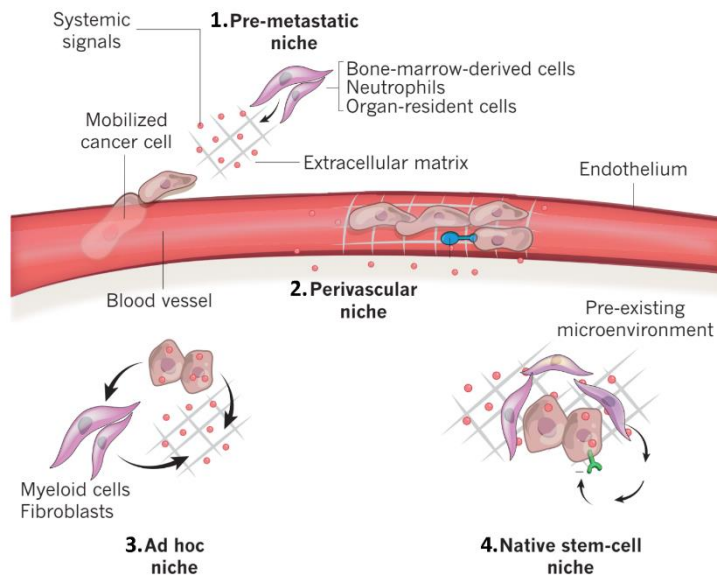


Figura 5- Nichos metastásicos. 1.Nicho pre-metastático: Es el nicho creado en base a la reestructuración estromal mediante la liberación de señales sistémicas generadas por el tumor primario para reclutar y resguardar CTC. 2. Nicho perivascular: Son los nichos generados por las CTC alrededor de los vasos sanguíneos donde ocasionalmente se generan metástasis, las células recubren el capilar en forma de láminas con múltiples capas y allí albergan a las células que logran la extravasación al tejido diana. 3.Nichos Ad hoc: Son los nichos generados por las CTC aleatoriamente en el estroma de los tejidos mediante mecanismos autocrinos basados en la liberación de mediadores que favorecen su resguardo y mecanismos paracrinos que comprometen células del estroma como los fibroblastos generando así una relación de cooperación. 4. Nichos de células madre del tejido: Son los nichos previamente existentes en los tejidos diana para las células madre nativas que las CTC ocupan y se favorecen de la interacción con los mismos. Los nichos de células madre nativas de la médula ósea son los preferidos de las CTC en el cáncer de próstata (24). Modificado de Massagué et al. 2016 (21,25)

Tabla 2- listado de los diferentes nichos caracterizados

Nicho	Características
Pre-metastásicos	Generados por el tumor primario antes de la llegada de la célula tumoral mediante la producción de un ambiente propicio para el arribo de las células cancerosas
Perivasculares	Utilizados por las células que logran atravesar la membrana basal, donde las células endoteliales generan un ambiente propicio para las mismas luego de la extravasación
Ad hoc	Establecidos por los productos secretados por células tumorales que actúan reclutando componentes del estroma y señales necesarias para su supervivencia
Células madre del tejido	Utilizados por las células madre de los tejidos hospedero donde se infiltran las células tumorales circulantes

CÉLULAS MADRE DE TUMORES PROSTÁTICOS

La glándula prostática está constituida por dos capas con propiedades diferentes, una conformada por células epiteliales lumbales y la otra por células epiteliales basales. La mayoría de las células epiteliales lumbales expresan el receptor de andrógenos y requieren de la señal androgénica para garantizar su supervivencia; por otro lado, las células epiteliales basales no poseen este receptor siendo menos sensibles a la castración (terapia de deprivación androgénica)(9). Como se mencionó anteriormente, así como sucede en el resto de los tumores, el cáncer de próstata también presenta heterogenicidad celular. Un pequeño grupo celular correspondiente a las células madre prostáticas, es el encargado de iniciar el tumor. Este grupo celular puede encontrarse tanto en el compartimiento basal como en el luminal, lo que explica que el tumor puede originarse a partir de cualquiera de las dos capas(9).

La presencia de poblaciones heterogéneas de células madre de tumores prostáticos ha sido demostrada por una gran cantidad de trabajos (26–30). Si bien no se ha identificado un grupo de marcadores moleculares que distingan específicamente las células madre de tumores prostáticos, se han identificado marcadores de “maternidad” (*stemness*) compartidos entre las células madre de tejido y las células madre de tumores prostáticos. Incluso, las células madre de tumores prostáticos comparten características fenotípicas con las células madre del tejido prostático, por ejemplo, expresan muy bajos niveles del receptor de andrógeno, siendo insensibles al tratamiento hormonal. La insensibilidad a la terapia de privación de andrógenos observada en las células madre de tumores prostáticos, es un rasgo que no es adquirido durante el desarrollo del cáncer de próstata sino heredado de las células madre del tejido(27,31). Collins y colaboradores(27) han demostrado que las células con elevada capacidad auto-renovación provenientes de tumores primarios de cáncer de próstata presentan bajos niveles del receptor de andrógeno. Esta población celular se caracteriza

por expresar en su superficie los marcadores de “maternidad” $CD44^+/\alpha_2\beta_1$ integrina^{elevado}/ $CD133^+$, además del fenotipo poco diferenciado de célula epitelial basal prostática(27). A partir de este tipo celular fue posible regenerar una población de células tumorales no clonal con mezcla de distintos fenotipos; entre ellos el fenotipo secretor andrógeno dependientes propio de las células diferenciadas(27). Patrawala y colaboradores(28) mostraron que las células cancerosas prostáticas $CD44^+$ son más tumorigénicas y más metastásicas que la población $CD44^-$, estableciendo un orden jerárquico en el potencial tumorigénico dependiendo de su origen celular: los tipos celulares más tumorigénicos y mestastásicos son $CD44^+/\alpha_2\beta_1$ integrina^{elevado} y $CD44^+/\alpha_2\beta_1$ integrina^{bajo}, mientras que los menos tumorigénicos y menos metastásicos son $CD44^-/\alpha_2\beta_1$ integrina^{elevado} y $CD44^-/\alpha_2\beta_1$ integrina^{bajo}.

En parte, la malignidad que caracteriza a las células madre de tumores se debe a su plasticidad fenotípica que les permite adquirir un fenotipo invasivo y adaptarse a diferentes microambientes. En modelos experimentales de cáncer de próstata en ratones (*TRAMP mouse*), se ha demostrado que la terapia de privación de andrógenos induce la transición epitelio-mesenquimal y aumenta la población de células madre $CD44^+$ en los tumores resistentes(32).

FACTORES MOLECULARES QUE MEDIAN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL

La transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un proceso celular caracterizado por la pérdida de las uniones entre célula-célula y entre célula-matriz extracelular, así como una nueva organización del citoesqueleto con pérdida de la polaridad celular, que lleva, en su conjunto, a la adquisición de la capacidad de migración e invasión de la célula tumoral y el desarrollo de metástasis (Figura 6). La TEM está caracterizada por la expresión de marcadores moleculares (moléculas de adhesión celular, factores de transcripción, receptores de superficie, etc) y de señales extracelulares presentes en cada etapa de la transición. Estos marcadores moleculares son empleados para identificar los estímulos que inducen a la sucesión de cambios fenotípicos observados durante la TEM.

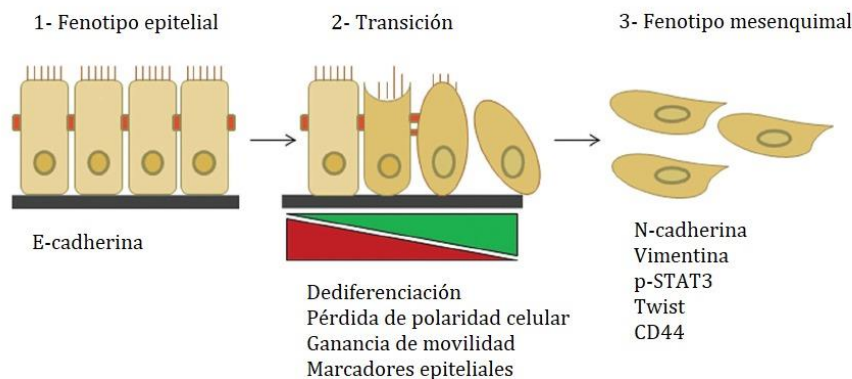


Figura 6 - Esquema de la TEM. 1. Se muestra fenotipo epitelial, caracterizado por uniones célula-célula mediadas por la participación de E-cadherina resultando en la polaridad y poca movilidad celular. 2. Proceso de dediferenciación, se pierden uniones célula-célula, disminuyendo la expresión de E-cadherina aumentando de forma contraria N-cadherina y otros marcadores mesenquimales como Vimentina. 3. Características de células madre, a partir de la dediferenciación se muestran marcadores típicos como CD44, Twist y p-STAT3, se pierden las uniones célula-célula y se produce un cambio fenotípico con mayor capacidad de migración e invasión. Tomado y modificado de Smith et al. 2012 (37).

Moléculas de adhesión celular: E- y N-caderina

Entre los marcadores más característicos que se observan en la TEM se encuentran las E y N caderinas, moléculas de adhesión célula-célula dependientes de calcio. La disminución en la expresión de E-caderina está estrechamente asociada a la pérdida del fenotipo epitelial de la célula. E-cadherina es una molécula que se encuentra en las uniones adherentes que mantienen unidas las células epiteliales; la disminución de E-cadherina de la superficie celular lleva a la pérdida de la unión célula-célula en el tejido epitelial. En un tumor sólido de origen epitelial las células que expresan bajos niveles del gen de E-caderina (*CDH1*), representan una población de células con mayor capacidad migratoria e invasiva(33,34). Utilizando células metastásicas de cáncer de próstata PC3 knock-out para el gen *CDH1*, se demostró que la pérdida de E-cadherina aumenta la proliferación celular tanto *in vitro* como *in vivo* y que este aumento va acompañado de un incremento en células madre de tumor capaces de formar protastoferas (cultivos en suspensión específicos para células madres indiferenciadas)(33). Más aún, la disminución en la expresión de E-cadherina lleva a un aumento en la expresión de CXCR4, moléculas que cumplen un papel fundamental en direccionar la migración (quimiotaxis) de las células madre de carcinomas prostáticos hacia la conquista de nichos en tejido óseo(24,33).

A diferencia de E-cadherina, N-cadherina representa un marcador del fenotipo mesenquimal y su expresión en la superficie celular se asocia a la capacidad invasiva y migratoria de la célula tumoral; a mayor expresión de N-cadherina más agresivo es el tumor y peor pronóstico para el paciente(35). N-cadherina media la interacción entre las células tumorales y las células del estroma, modulando la interacción-célula ambiente.

En cultivos de protastoferas un incremento en la expresión de N-cadherina, aumenta la cantidad de protastoferas ricas en células madre de tumor conjuntamente con células que han sufrido la TEM(35).

Mediadores intracelulares

La expresión de la molécula de adhesión celular E-cadherina se encuentra regulada por varios factores de transcripción; entre los más conocidos se encuentra el factor de transcripción SNAI1 que reprime la expresión del gen *CDH1* y se asocia a la TEM, considerándose un marcador de malignidad en tumores(36). Particularmente en cáncer de próstata se ha encontrado una asociación positiva entre la expresión de SNAI1, puntaje en la escala de Gleason y el desarrollo de metástasis en cáncer de próstata(37). No solo se ha descrito su acción represora de E-cadherina, sino también su acción inductora de expresión de otros factores de transcripción marcadores mesenquimales como ser Zeb-1 y Zeb-2 (37). El receptor de andrógeno reconoce un sitio específico en el promotor del gen *SNAI1* y reprime de manera dosis dependiente su expresión(38). De modo que, la disminución de la expresión del receptor de andrógeno (RA) observada en las células tumorales lleva a un aumento en la expresión de SNAI1, conjuntamente con un aumento en la expresión de Twist, Zeb-1, Zeb-2 y disminución de la expresión de E-cadherina, y subsecuente progresión hacia una TEM y fenotipo invasivo(38). *In vitro*, el incremento en la expresión de SNAI1 en células metastásicas de cáncer de próstata puede revertirse mediante la adición de andrógenos en los cultivos(38). Por otro lado, se ha hipotetizado que SNAI1 podría tener implicancias en la selección de nichos metastásicos en cáncer de próstata, debido a su papel en la diferenciación de los condrocitos y en la inducción de la expresión del receptor activador del ligando NFκB (RANKL), un mediador de la diferenciación de los osteoclastos y la reabsorción del hueso durante el desarrollo de los miembros en ratón(37).

El factor de transcripción Twist, pertenece a la familia hélice-vuelta-hélice (*helix-loop-helix*) y cumple un papel fundamental en el proceso de metástasis, no sólo por su capacidad de reprimir al gen *CDH1* y promover la TEM, sino también por su habilidad de inducir el crecimiento tumoral y la angiogénesis en cáncer de próstata(39). En humanos, Twist se sobre-expresa en el 90% de los tumores de próstata. Estudios con ratones TRAMP mostraron un aumento en la expresión de Twist en tumores prostáticos y una asociación positiva de su sobreexpresión con la progresión de la enfermedad y la auto-renovación de la población de las células madre de tumor(40). Además, la inhibición de la expresión de Twist suprime la progresión tumoral en ratones TRAMP(40). Twist promueve la transcripción de receptores de andrógenos y su sobre-expresión podría ser el mecanismo principal para la resistencia al tratamiento de castración en el cáncer de próstata(40).

El transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) estimula la proliferación, media mecanismos anti-apoptóticos y mantiene la pluripotencialidad en varios tipos celulares (41). La forma activada de STAT3 asociada con IL-6 se encuentra presente en varios tumores malignos y la inhibición de su expresión en varios modelos experimentales retrasa el fenotipo maligno, disminuyendo la progresión y metástasis del tumor (42). El tratamiento con Metformina en ratones con tumores prostáticos resistentes a terapia de privación de andrógenos demostró que el fármaco es capaz de inhibir la TEM, mediante la inhibición de la vía oncogénica COX2-Prostaglandina E2-STAT3, apuntando a la Metformina como potencial terapéutico en cáncer de próstata(43).

Skp2 es una protein-quinasa asociada a la fase S del ciclo celular que contribuye con el desarrollo de metástasis en el cáncer de próstata, la auto-renovación de las células madre tumorales y la resistencia de estas a la terapia, disminuyendo la supervivencia del paciente (40). Skp2 estabiliza el factor de transcripción Twist inhibiendo su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S (40), contribuyendo a la TEM de las células madre de tumor(40). Ratones TRAMP que sobre-expresan Skp2 desarrollan espontáneamente cáncer en glándulas prostáticas, mientras que la represión de esta quinasa en el mismo modelo de ratón inhibe el desarrollo de cáncer de próstata (14/15 ratones no desarrollaron cáncer) (40). Sin embargo, las muestras histológicas de tejidos de próstata de ratones TRAMP mostraron lesiones de hiperplasia multifocal (40).

Mediadores en la superficie celular y extracelulares: receptores transmembrana y citoquinas

Notch es una proteína transmembrana que actúa como un receptor de señales extracelulares involucradas en el desarrollo de la mayoría de los tejidos. La activación de la vía Notch está relacionada con la TEM en las células de cáncer de próstata(44). Ensayos con células PC3 (línea celular de PCa) mostraron que la activación de Notch aumentó la migración e invasión celular. En cultivos de líneas celulares de cáncer de próstata se observó una rápida cicatrización de heridas (*wound-healing assay*) en los cultivos donde la vía de Notch se encontraba activa, mostrando una capacidad de migración mayor que en los cultivos controles con la vía reprimida(35). También se pudo observar que la activación de Notch promueve cambios fenotípicos, aumentando la expresión de los marcadores mesenquimales Vimentina, Zeb1, Zeb2 y disminuyendo la expresión de E-cadherina, sugiriendo que esta vía contribuye con la TEM en cáncer de próstata(44).

Los miembros de la familia de factor de crecimiento transformante β (*TGF- β*) son citoquinas que cumplen distintas funciones dependientes del contexto celular en el que se encuentren, desde participar en proliferación y diferenciación celular, hasta participar en la regulación del sistema inmune, de la migración

y supervivencia de las células tumorales, y del proceso de angiogénesis(18). Utilizando modelos experimentales de tejido epitelial mamario y renal se estableció que las vías dependientes de TGF- β median la TEM(18). En el tejido prostático, las vías de señalización de TGF- β mantienen el equilibrio entre la tasa de proliferación y la tasa de apoptosis a través de la modulación del RA(45). En el microambiente tumoral las vías de señalización de TGF- β cumplen un papel fundamental en el mantenimiento en estado quiescente de las células madre tumorales(46). De hecho se ha planteado un modelo en el cual la señalización por TGF- β podría cumplir un rol supresor de tumor en las etapas iniciales del desarrollo del cáncer de próstata, pero en etapas tardías podría cumplir un rol oncogénico(18,45). En tumores prostáticos avanzados sometidos a terapia de privación andrógenos, la vía de señalización de TGF- β activa la dediferenciación de las células tumorales, llevando a un aumento en la población de células madre CD44⁺ e induce la TEM con un incremento en la capacidad invasiva de las células tumorales(32).

Ya en 1863, Rudolf Virchow relacionó por primera vez el proceso de inflamación con la progresión del cáncer, demostrando la presencia de linfocitos dentro de un "infiltrado linforreticular" que rodeaba muchas lesiones cancerosas y sugiriendo que el mismo sirve como combustible para el crecimiento descontrolado del tumor(47,48). Hoy en día se conocen varios factores que intervienen en el proceso inflamatorio asociados a la progresión de TEM y al desarrollo de metástasis; entre ellos se encuentra la Interleucina 6 (IL6), molécula secretada por distintos tipos celulares del sistema inmune, entre ellos macrófagos, monocitos, células T y B, entre otros tipos celulares. La expresión elevada de IL6 está asociada a un pronóstico desfavorable en varios tipos de cáncer (39), cumpliendo un papel dominante de IL6 en la regulación y mantenimiento de diferentes tipos de células madre asociadas al cáncer (42). El análisis inmunohistoquímico de muestras de 167 pacientes con cáncer de próstata mostraron que altos niveles de expresión de IL6 se correlaciona positivamente con un aumento en el número de células CD44⁺ en tumores prostáticos y presencia de tumores más agresivos(42). Además, se observó que un aumento en IL-6 va acompañado con un aumento de marcadores de proliferación celular (KI 67) y de marcadores de la TEM (STAT3, Vimentina, Matrix Metaloproteinasas, etc.)(42). El bloqueo de la vía de señalización IL6-STAT3 disminuye el número de células madre de tumor CD44⁺ y la malignidad de tumores prostáticos *in vivo*(42).

Comprender los factores moleculares que intervienen en el mantenimiento de la población de células madre en tumores prostáticos y que median la TEM necesaria para la adquisición de un fenotipo invasivo, resulta muy importante a la hora de desarrollar terapias alternativas.

TERAPIAS ACTUALES Y DESARROLLO DE TUMORES RESISTENTES

Entre los tratamientos de tumores prostáticos localizados, se encuentra la prostatectomía radical o la radioterapia(30). En el caso del cáncer de próstata recurrente hormonosensible, el objetivo del tratamiento es disminuir los niveles de testosterona. El tratamiento de primera línea en este caso es la terapia de privación de andrógenos (TDA), la cual puede realizarse de forma química o quirúrgica. La próstata depende de los andrógenos para su crecimiento y funcionamiento, por lo que la castración ocasiona una involución de la misma y disminución del tamaño tumoral(49). Inicialmente los tumores responden favorablemente a este tratamiento, pero por lo general se vuelven resistentes al mismo. Originalmente se denominaba a estos tumores “andrógeno-independientes” pero actualmente se conoce que el tratamiento previo mediante TDA selecciona células madre tumorales capaces de crecer con niveles bajos de andrógenos(49).

Frente a la presencia de metástasis, en general se utiliza la combinación de TDA con Docetaxel. Este fármaco es un quimioterápico que actúa previniendo la traslocación del receptor de andrógenos a nivel nuclear causando la apoptosis de la célula(50). Su implementación demostró que disminuye el tamaño tumoral, mejora el dolor y disminuye los valores de PSA(50). En Uruguay, este agente quimioterápico es otorgado a los pacientes de forma gratuita por el Fondo Nacional de Recursos y es el más utilizado al momento. Actualmente se sabe que el Docetaxel mejora la calidad de vida y la sobrevida, pero los pacientes inevitablemente desarrollan resistencia al mismo debido a la presencia de células madre tumorales responsables de la recaída del paciente. Yiming Zhang y colaboradores (51), estudiaron la acción del Docetaxel sobre células madre tumorales CD133⁺/CD44⁺ y observaron que este quimioterápico no disminuye significativamente el volumen de esta población celular.

Por otro lado, el Acetato de Abiraterona es un fármaco que bloquea la síntesis endógena de andrógenos y está indicado en el cáncer de próstata metastásico. Karim Fizazi y colaboradores(52,53) establecieron un plan terapéutico que consiste en la combinación de Acetato de Abiraterona y Prednisona; el mismo aumentó la sobrevida en hombres con cáncer metastásico recientemente diagnosticado sensible a la castración(52). LatITUDE, un ensayo clínico aleatorizado multicéntrico realizado en 34 países, donde se incluyeron 1199 pacientes demostró que el tratamiento combinado de Acetato de Abiraterona con TDA aumento la sobrevida significativamente respecto a los pacientes tratados únicamente con TDA (54). El mismo resultado fue observado por James ND y colaboradores(55) en una cohorte de 1917 pacientes, mostrando que la combinación de ADT con Abiraterona y Prednisona aumenta el índice de sobrevida en pacientes con cáncer de próstata metastásico en comparación a la TDA por sí sola. En nuestro medio es un fármaco de alto costo que debe ser cubierto por el paciente.

Las terapias mencionadas en esta sección no tienen como blanco terapéutico a las células madre tumorales, sino que fueron diseñadas para actuar sobre las células tumorales que presentan alto índice mitótico, las cuales representan el mayor volumen tumoral. Las células madre tumorales son un blanco terapéutico complejo debido a su capacidad de proteger su integridad genómica activando sensores de daño al ADN y la maquinaria de reparación del ADN, y debido a su plasticidad fenotípica que le otorga una ventaja selectiva en ambientes estresantes (9).

TERAPIAS EMERGENTES

La tendencia actual es buscar nuevos planes terapéuticos que tengan como blanco a las células madre tumorales para evitar el desarrollo de tumores resistentes.

Napabucasin es una molécula que actúa inhibiendo la transcripción del gen STAT3, inhibiendo así a las células madre tumorales e induciendo la apoptosis (51). Para determinar el efecto de Napabucasin en células madre de cáncer de próstata se realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* donde se evaluó la capacidad de auto-renovación mediante la formación de protastoferas. Los resultados mostraron una disminución significativa de protastoferas en el grupo tratado con Napabucasin en comparación con el grupo control (10,51). A su vez, se observó que en el grupo tratado con Napabucasin disminuye de manera dosis dependiente la expresión de factores involucrados en la plasticidad fenotípica, como ser Klf4, c-Myc y β -catenina, en comparación con el grupo control (51). Por otro último, se estudió el efecto de Napabucasin en combinación con Docetaxel en el total de células tumorales, demostrándose que Napabucasin aumenta la sensibilidad al Docetaxel de la masa tumoral y reduce el crecimiento tumoral requiriéndose una dosis menor de Docetaxel para generar el mismo efecto (51).

Los retinoides son derivados de la vitamina A que regulan procesos biológicos como proliferación, apoptosis y diferenciación celular. El uso de retinoides naturales en cánceres como leucemia y algunos tumores sólidos está limitado por la resistencia adquirida de las células madre tumorales y su toxicidad. Con el fin de reducir los efectos tóxicos de los retinoides y aumentar el efecto terapéutico de la droga se han creado retinoides sintéticos. En particular, ST1926 es un retinoide sintético que demostró actuar sobre células madre tumorales. Esta molécula reduce la habilidad de formación de protastoferas incluso a bajas concentraciones, disminuyendo la población de células madre tumorales en los cultivos (56).

Si bien mucho queda por conocer y desarrollar, el diseño de terapias combinadas que tengan como blanco las células tumorales y sus células madre es hacia donde deberán enfocarse las nuevas investigaciones. El desarrollo de nuevas terapias contra este grupo celular parece ser una estrategia clave, que podría generar

un gran impacto en la sobrevida de los pacientes con cáncer y particularmente aquellos con cáncer metastásico.

CONCLUSIONES

Actualmente se reconoce que las células madre tienen un rol importante en la generación de metástasis y resistencia al tratamiento. Identificar las vías por las cuáles se produce la dediferenciación y transdiferenciación puede brindar blancos terapéuticos más específicos relacionados a las células madre. La TEM es el paso clave en el proceso de desarrollo de metástasis por proporcionarle a las células capacidad migratoria, de invasión y proliferación. Hoy en día, a pesar de que las terapias actuales mejoran la sobrevida de los pacientes, eventualmente se genera resistencia a estos tratamientos. Se ha descrito que las responsables de esta resistencia son las células madre tumorales, por lo tanto, dirigir el tratamiento a este grupo celular parecería ser una estrategia prometedora. Si bien la mayoría de las investigaciones aún se encuentran en fases tempranas, la tendencia actual es seguir desarrollando nuevas estrategias terapéuticas que permitan sortear la resistencia tumoral.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos hacer una mención especial al Departamento de Genética de Facultad de Medicina, que ha proporcionado los recursos tanto materiales como humanos para la realización del trabajo, dedicando tiempo, empeño y consejería constante.

Deseamos agradecer también al Departamento de Urología de Facultad de Medicina cuya orientación resultó vital para una mejor comprensión del tratamiento de Cáncer de Próstata en Uruguay.

REFERENCIAS

1. Comisión Honoraria de Lucha contra el cáncer. Comisión contra el Cáncer. 2016.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019 (US statistics). *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 24];69(1):7–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21551>
3. Berg CD, Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, et al. Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*. 2009;360(13):1310–9.
4. Cátedra de Oncología Clínica, Facultad de Medicina U. No Title. *Pautas de Oncología Médica para el diagnóstico, tratamiento sistémico y seguimiento*. 2018.
5. Alison MR, Lim SML, Nicholson LJ. Cancer stem cells: Problems for therapy? Vol. 223, *Journal of Pathology*. John Wiley and Sons Ltd; 2011. p. 147–61.
6. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014 Mar;14(3):275–91.
7. Song Y, Wang Y, Tong C, Xi H, Zhao X, Wang Y, et al. A unified model of the hierarchical and stochastic theories of gastric cancer. Vol. 116, *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group; 2017. p. 973–89.
8. Nassar D, Blanpain C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016 May;11(1):47–76.
9. Mei W, Lin X, Kapoor A, Gu Y, Zhao K, Tang D. The contributions of prostate cancer stem cells in prostate cancer initiation and metastasis. Vol. 11, *Cancers*. MDPI AG; 2019.
10. Li Y, Rogoff HA, Keates S, Gao Y, Murikipudi S, Mikule K, et al. Suppression of cancer relapse and metastasis by inhibiting cancer stemness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb;112(6):1839–44.
11. Rizzino A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: Critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. Vol. 31, *Stem Cells*. 2013. p. 1033–9.
12. Saunders A, Faiola F, Wang J. Concise review: Pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog. *Stem Cells*. 2013 Jul;31(7):1227–36.
13. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug;126(4):663–76.
14. Booth BW, Mack DL, Androutsellis-Theotokis A, McKay RDG, Boulanger CA, Smith GH. The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep;105(39):14891–6.
15. Gupta PB, Pastushenko I, Skibinski A, Blanpain C. Review Phenotypic Plasticity : Driver of Cancer Initiation , Progression , and Therapy Resistance. *Stem Cell* [Internet]. 2019;(2018):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.011>
16. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. Vol. 331, *Science*. 2011. p. 1559–64.
17. Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* [Internet].

- 2007 May;8(5):341–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrg2101>
18. Heldin C-H, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol.* 2009 Apr;21(2):166–76.
 19. Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddlestun SE, Zhao Z, et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells [Internet]. Vol. 527. 2015. Available from: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms
 20. Russo GI, Bier S, Hennenlotter J, Beger G, Pavlenco L, van de Fliert J, et al. Expression of tumour progression-associated genes in circulating tumour cells of patients at different stages of prostate cancer. *BJU Int.* 2018 Jul;122(1):152–9.
 21. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. Vol. 529, *Nature*. Nature Publishing Group; 2016. p. 298–306.
 22. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni K V, Morris VL, Groom AC, et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 2000 May;60(9):2541–6.
 23. KAUFFMAN EC, ROBINSON VL, STADLER WM, SOKOLOFF MH, RINKER-SCHAEFFER CW. Metastasis Suppression: The Evolving Role of Metastasis Suppressor Genes for Regulating Cancer Cell Growth at the Secondary Site. *J Urol* [Internet]. 2003 Mar;169(3):1122–33. Available from: <http://www.jurology.com/doi/10.1097/01.ju.0000051580.89109.4b>
 24. Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM, Jung Y, Mishra A, Joseph J, et al. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest.* 2011 Apr;121(4):1298–312.
 25. Oskarsson T, Battle E, Massagué J. Metastatic stem cells: Sources, niches, and vital pathways. Vol. 14, *Cell Stem Cell*. Cell Press; 2014. p. 306–21.
 26. Leão R, Domingos C, Figueiredo A, Hamilton R, Tabori U, Castelo-Branco P. Cancer Stem Cells in Prostate Cancer: Implications for Targeted Therapy. *Urol Int.* 2017;99(2):125–36.
 27. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005 Dec;65(23):10946–51.
 28. Patrawala L, Calhoun-Davis T, Schneider-Broussard R, Tang DG. Hierarchical organization of prostate cancer cells in xenograft tumors: the CD44+alpha2beta1+ cell population is enriched in tumor-initiating cells. *Cancer Res.* 2007 Jul;67(14):6796–805.
 29. Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Wang Z, Sethi S, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Is Mechanistically Linked with Stem Cell Signatures in Prostate Cancer Cells. Creighton C, editor. *PLoS One.* 2010 Aug;5(8):e12445.
 30. Maitland NJ, Collins AT. Prostate cancer stem cells: a new target for therapy. *J Clin Oncol.* 2008 Jun;26(17):2862–70.
 31. Liao C-P, Adisetiyo H, Liang M, Roy-Burman P. Cancer-Associated Fibroblasts Enhance the Gland-Forming Capability of Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 2010 Sep;70(18):7294–303.
 32. Shang Z, Cai Q, Zhang M, Zhu S, Ma Y, Sun L, et al. A switch from CD44+ cell to EMT cell drives the metastasis of prostate cancer. *Oncotarget.* 2015;6(2):1202–16.
 33. Deep G, Jain AK, Ramteke A, Ting H, Vijendra KC, Gangar SC, et al. SNAI1 is critical for the

- aggressiveness of prostate cancer cells with low E-cadherin. *Mol Cancer*. 2014;13(1):1–15.
34. Putzke AP, Ventura AP, Bailey AM, Akture C, Opoku-Ansah J, Çelikleş M, et al. Metastatic progression of prostate cancer and E-cadherin: Regulation by ZEB1 and Src family kinases. *Am J Pathol*. 2011;179(1):400–10.
 35. Wang M, Ren D, Guo W, Huang S, Wang Z, Li Q, et al. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells. *Int J Oncol*. 2016;48(2):595–606.
 36. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Del Barrio MG, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):76–83.
 37. Smith BN, Odero-Marah VA. The role of Snail in prostate cancer. *Cell Adhes Migr*. 2012;6(5):433–41.
 38. Miao L, Yang L, Li R, Rodrigues DN, Crespo M, Hsieh JT, et al. Disrupting androgen receptor signaling induces Snail-mediated epithelial-mesenchymal plasticity in prostate cancer. *Cancer Res*. 2017;77(11):3101–12.
 39. Abdelrahman AE, Arafa SA, Ahmed RA. Prognostic value of twist-1, E-cadherin and EZH2 in prostate Cancer: An immunohistochemical study. *Turk Patoloji Derg*. 2017;33(3):198–210.
 40. Ruan D, He J, Li CF, Lee HJ, Liu J, Lin HK, et al. Skp2 deficiency restricts the progression and stem cell features of castration-resistant prostate cancer by destabilizing Twist. *Oncogene*. 2017 Jul;36(30):4299–310.
 41. Levy DE, Lee C. What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1143–8.
 42. Wu C-T, Huang Y-C, Chen W-C, Chen M-F. Effect of Tumor Burden on Tumor Aggressiveness and Immune Modulation in Prostate Cancer: Association with IL-6 Signaling. *Cancers (Basel)*. 2019 Jul;11(7):992.
 43. Tong D, Liu Q, Liu G, Xu J, Lan W, Jiang Y, et al. Metformin inhibits castration-induced EMT in prostate cancer by repressing COX2/PGE2/STAT3 axis. *Cancer Lett*. 2017;389:23–32.
 44. Zhang L, Sha J, Yang G, Huang X, Bo J, Huang Y. Activation of Notch pathway is linked with epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells. *Cell Cycle*. 2017 May;16(10):999–1007.
 45. Ahel J. TGF-Beta in the Natural History of Prostate Cancer. *Acta Clin Croat*. 2019;58(1):128–38.
 46. Blum R, Gupta R, Burger PE, Ontiveros CS, Salm SN, Xiong X, et al. Molecular signatures of prostate stem cells reveal novel signaling pathways and provide insights into prostate cancer. *PLoS One*. 2009 May;4(5).
 47. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? Vol. 357, *Lancet*. Elsevier Limited; 2001. p. 539–45.
 48. Browning L, Patel MR, Horvath EB, Tawara K, Jorcyk CL. IL-6 and ovarian cancer: Inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag Res*. 2018;10:6685–93.
 49. Gamat M, McNeel DG. Androgen deprivation and immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(12):T297–310.
 50. Nader R, El Amm J, Aragon-Ching JB. Role of chemotherapy in prostate cancer. *Asian J Androl*.
-

20(3):221–9.

51. Zhang Y, Jin Z, Zhou H, Ou X, Xu Y, Li H, et al. Suppression of prostate cancer progression by cancer cell stemness inhibitor napabucasin. *Cancer Med*. 2016;5(6):1251–8.
52. Fizazi K, Tran NP, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus prednisone in metastatic, castration-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med*. 2017 Jul;377(4):352–60.
53. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2011 May;364(21):1995–2005.
54. Fizazi K, Tran NP, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2019;20(5):686–700. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30082-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30082-8)
55. James ND, De Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, et al. Abiraterone for prostate cancer not previously treated with hormone therapy. *N Engl J Med*. 2017 Jul;377(4):338–51.
56. Bahmad HF, Samman H, Monzer A, Hadadeh O, Cheaito K, Abdel-Samad R, et al. The synthetic retinoid ST1926 attenuates prostate cancer growth and potentially targets prostate cancer stem-like cells. *Mol Carcinog*. 2019;58(7):1208–20.