



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Validación de EIF3H como potencial diana terapéutica
contra el cáncer de próstata.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Illescas Verdú, Marta

Tutor/a: Bañuls Polo, María José

Cotutor/a externo: PUCHADES CARRASCO, LEONOR

Director/a Experimental: GOMEZ CEBRIAN, NURIA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



IIS La Fe



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Validación de EIF3H como potencial diana terapéutica contra el cáncer de próstata

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Curso académico: 2022-2023

Autor/a: Marta Illescas Verdú

Tutor/a académico: M^a José Bañuls Polo

Tutor/a externo: Leonor Puchades Carrasco

Director/a experimental: Nuria Gómez Cebrián

Valencia, septiembre 2023

Título: Validación de EIF3H como potencial diana terapéutica contra el cáncer de próstata.

Resumen: El cáncer de próstata (CaP) consiste en el desarrollo de células cancerosas en los tejidos de la glándula prostática, órgano reproductor masculino accesorio responsable de la producción del líquido seminal. Esta enfermedad es el segundo cáncer con más incidencia en los hombres después del de pulmón. Representa el 7% de los nuevos cánceres diagnosticados mundialmente y supone una de las principales causas de muerte asociada al cáncer en los hombres. Se caracteriza por un curso clínico extremadamente heterogéneo, que abarca desde un estado indolente a una rápida progresión hacia un fenotipo agresivo que se disemina y metastatiza a los ganglios linfáticos y los huesos. El CaP localizado suele tratarse inicialmente mediante una prostatectomía radical o radioterapia. Sin embargo, las estadísticas muestran que entre el 27 y el 53% de los pacientes desarrollan recurrencia bioquímica. Los receptores de andrógenos desempeñan un papel crucial en la patogénesis del CaP y siguen siendo la diana terapéutica clave, por lo que la terapia de privación de andrógenos (ADT) ha sido el tratamiento base en las últimas décadas. Sin embargo, es recurrente el desarrollo de resistencia a castración química y frente a este diagnóstico aún se carece de estrategias terapéuticas eficaces. La medicina y los tratamientos de precisión se consideran uno de los enfoques más prometedores para tratar el cáncer en la actualidad; basándose en la búsqueda de dianas terapéuticas específicas. Estudios previos apuntan a que existe una sobreexpresión del gen *EIF3H* tanto *in vitro* como *in vivo* en CaP respecto al fenotipo sano. Asimismo, también se demostró en las líneas celulares de CaP LnCaP y PC3 que el silenciamiento de *EIF3H* supone un impacto sobre la curva de crecimiento celular; reduciendo significativamente la proliferación celular. En consecuencia, el objetivo principal de este trabajo consiste en la validación, *in vitro*, del gen *EIF3H* como potencial diana terapéutica en CaP. *EIF3H* codifica para la subunidad H del complejo de iniciación traduccional EIF3 cuya función es clave para la síntesis proteica. En primer lugar, se observó expresión génica diferencial en las líneas celulares de CaP PC3, LnCaP y 22rv1 respecto al fenotipo sano. Posteriormente, se lleva a cabo el silenciamiento génico, *in vitro* de *EIF3H* mediante el uso de shRNA (RNA de hebilla corta) a través de vectores lentivirales en la línea celular epitelial de carcinoma de próstata humano 22Rv1. En los modelos generados de silenciamiento se evalúa el papel de *EIF3H* en la capacidad de proliferación celular y formación de colonias; observándose diferencias significativas entre los modelos celulares sometidos a silenciamiento génico y el control. Así pues, los resultados obtenidos y los datos aportados por investigaciones previas discutidos en el presente trabajo validarían el potencial biológico de *EIF3H* como diana terapéutica; por lo que se requiere una investigación más exhaustiva en esta dirección en aras de desarrollar un nuevo tratamiento contra el CaP. Así pues, el presente TFG está altamente relacionado con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) número 3 de la Agenda 2030, relacionado con la Salud y Bienestar.

Palabras clave: Cáncer de próstata; gen *EIF3H*; diana terapéutica; silenciamiento génico; proliferación celular; clonogenicidad.

Alumno/a: Marta Illescas Verdú

Valencia, septiembre 2023

Tutor/a académico: Prof. Dña. M^a José Bañuls Polo

Cotutor/a: Dña. Leonor Puchades Carrasco

Title: Validation of EIF3H as a potential therapeutic target against prostate cancer.

Abstract: Prostate cancer (PCa) is the development of cancerous cells in the tissues of the prostate gland, an accessory male reproductive organ responsible for producing seminal fluid. The disease is the second most common cancer in men after lung cancer. It accounts for 7% of new cancers diagnosed worldwide and is one of the leading causes of cancer-related death in men. It is characterized by a highly heterogeneous clinical course, ranging from an indolent state to rapid progression to an aggressive phenotype that spreads and metastasizes to lymph nodes and bone. Localized PCa is usually treated initially by radical prostatectomy or radiotherapy. However, statistics show that 27-53% of patients develop biochemical recurrence. Androgen receptors play a crucial role in the pathogenesis of PCa and remain the key therapeutic target; androgen deprivation therapy (ADT) has been the mainstay treatment for decades. However, the development of chemical castration resistance is recurrent and effective therapeutic strategies for this diagnosis are still lacking. Precision medicine and treatments are considered one of the most promising approaches to treating cancer today, based on the search for specific therapeutic targets. Previous studies suggest overexpression of the *EIF3H* gene in vitro and in vivo in CaP compared to the healthy phenotype. Likewise, it was also demonstrated in the CaP cell lines LnCaP and PC3 that silencing EIF3H impacts the cell growth curve, significantly reducing cell proliferation. Consequently, the main objective of this work is to validate, in vitro, *EIF3H* gene as a potential therapeutic target in CaP. *EIF3H* encodes for the H subunit of the EIF3 translational initiation complex, whose function is critical for protein synthesis. First, differential gene expression was observed in CaP cell lines PC3, LnCaP and 22rv1 compared to the healthy phenotype. Subsequently, in vitro gene silencing of EIF3H is carried out using shRNA (short hairpin RNA) through lentiviral vectors in the human prostate carcinoma epithelial cell line 22Rv1. The role of EIF3H in cell proliferation capacity and colony formation is evaluated in the generated models of EIF3H silencing; significant differences are observed between the cell models subjected to gene silencing and the control. Thus, the results obtained and the data provided by previous research discussed in this paper would validate the biological potential of EIF3H as a therapeutic target; further research in this direction is required to develop a new treatment for PCa. Hence, this TFG is highly related to the Sustainable Development Goal (SDG) number 3 of the 2030 Agenda, related to Good Health and Well-being.

Keywords: Prostate cancer; *EIF3H* gene; therapeutic target; gene silencing; cell proliferation; clonogenicity.

Student: Marta Illescas Verdú

Valencia, September 2023

Academic tutor: Prof. Ms. M^a José Bañuls Polo

Co-tutor: Ms. Leonor Puchades Carrasco

AGRADECIMIENTOS

Por haber hecho estos años más fáciles pero, sobre todo, más bonitos. Aún en medio de una pandemia o incluso a 1500 o 2600 km. A Alberto e Irene.

El destino quiso mantenernos muy cerca a pesar de haber emprendido nuestros propios caminos. Aunque ahora nos separe, sé que nos seguiremos teniendo tan cerca como siempre. A Marta y Toni.

Por hacer siempre todo lo que está en vuestras manos para brindarme todas aquellas oportunidades que vosotros no tuvisteis y por creer en mi incluso cuando ni yo misma lo hago, gracias.

Mamá y papá, esto es por y gracias a vosotros.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Cáncer de próstata	1
1.1. La próstata: anatomía y fisiología	1
1.2. Etiopatogenia y fisiopatología del CaP	3
1.2.1. Papel de los andrógenos en el desarrollo y progresión de CaP	4
1.2.2. Alteraciones genéticas en CaP	5
1.3. Diagnóstico.....	6
1.4. Estadificación del CaP	7
2. Tratamiento y terapias actuales contra el CaP.....	9
3. Identificación de dianas terapéuticas en medicina de precisión.....	9
3.1. Análisis de esencialidad	10
3.2. Características de las dianas terapéuticas para ser abordadas farmacológicamente.....	11
3.3. Subunidad H del complejo de iniciación traduccional eucariota EIF3	13
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Cultivos celulares	14
1.2. Línea celular de CaP 22Rv1	14
1.3. Línea celular HEK 293T	14
2. Real-Time qPCR (RT-qPCR)	15
3. Western Blot	16
4. Generación de modelos de silenciamiento	17
4.1. Transformación bacteriana	17
4.2. Purificación DNA	17
4.3. Infección lentiviral	18
4.3.1. Transfección celular	18
4.3.2. Infección celular	19
5. Ensayo de proliferación celular.....	19
6. Ensayo de formación de colonias	19
7. Softwares empleados y análisis estadístico	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20

1. Sobreexpresión de EIF3H en las líneas celulares de CaP, incluida 22Rv1	20
2. Generación de un modelo de silenciamiento para EIF3H	23
2.1. Producción de vectores lentivirales en HEK 293TPS	24
2.2. Infección de 22Rv1 por vectores lentivirales recombinantes.....	25
3. Eficiencia del silenciamiento de Eif3H en 22Rv1	25
4. Efecto del silenciamiento de EIF3H sobre la proliferación celular.....	27
5. Efecto del silenciamiento de EIF3H sobre la clonogenicidad.....	28
V. CONCLUSIÓN Y LÍNEAS FUTURAS	31
VI. BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos empleados en la retrotranscripción del RNA para cada muestra.....	15
Tabla 2. Reactivos empleados para la RT-qPCR para cada muestra.....	15
Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados para llevar a cabo la qPCR	16
Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en el análisis proteico por Western Blot	16
Tabla 5. Construcciones de vectores de expresión lentiviral recombinantes utilizados en la infección lentiviral	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía e histología de la próstata	2
Figura 2. Progresión del cáncer de próstata	4
Figura 3. Dependencia de andrógenos y progresión del cáncer de próstata	5
Figura 4. Estadificación del CaP mediante puntuación de Gleason y grado ISUP	8
Figura 5. Abordaje para llevar a cabo la identificación de genes esenciales y candidatos a diana terapéutica mediante “The Project Score”	12
Figura 6. Expresión del gen <i>EIF3H</i> en RWPE-1, 22Rv1, LnCaP y PC3	21
Figura 7. Expresión de GFP en HEK 293T	24
Figura 8. Expresión de GFP en 22Rv1	25
Figura 9. Expresión del gen <i>EIF3H</i> en 22Rv1 shEIF3H-C,2 y 4	26
Figura 10. Análisis del efecto del silenciamiento de EIF3H sobre el crecimiento celular	28
Figura 11. Análisis del efecto del silenciamiento de EIF3H sobre la clonogenicidad	29

ABREVIATURAS

- ADT – Terapia de privación de andrógenos
- AR – Receptor de andrógenos
- BSA – Albúmina de suero bovino
- CaP – Cáncer de próstata
- CPRC – Cáncer de próstata resistente a castración
- CPSC – cáncer de próstata sensible a castración
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DRE – Examen rectal digital
- FISH – Hibridación de fluorescencia *in situ*
- HBP – Hiperplasia prostática benigna
- HRP – Peroxidasa de rábano
- ISUP - Sociedad Internacional de Patologías Urológicas
- KLK – Calicreína
- MRI – Imagen por Resonancia Magnética
- mRNA – Ácido ribonucleico mensajero
- P/S – Penicilina/Estreptomicina
- PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
- PIN – Neoplasia intraepitelial prostática
- PSA – Antígeno prostático específico
- SD – Error estándar (*standard error*)
- TBS-T – *Tris-Buffer Saline Tween*
- TRUS – Ecografía transrectal

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de próstata.

El cáncer de próstata (CaP) es definido por la Asociación Española contra el Cáncer (AECC) como un tumor, es decir, una masa de tejido cuyas células sufren una proliferación descontrolada y carecen de función fisiológica; que se forma en las células de la glándula prostática. Esta enfermedad afecta exclusivamente a los hombres y se ha convertido en un importante problema de salud a nivel mundial (Rebello et al., 2021).

Una de las características que marca tanto el curso clínico, caracterizado por su gran heterogeneidad, como el desarrollo de los principales tratamientos para la enfermedad es que la próstata es un órgano andrógeno-dependiente y, consecuentemente, el cáncer de próstata es un cáncer dependiente de andrógenos u hormonas sexuales masculinas (Shafi et al., 2013).

El cáncer de próstata afecta a millones de hombres alrededor del mundo (Siegel et al., 2018), es el segundo tipo de cáncer con más incidencia en los hombres después del de pulmón. Representa el 7,3% de los nuevos cánceres diagnosticados mundialmente y supone una de las principales causas de morbilidad y mortalidad asociadas al cáncer en los hombres. Se estima que sólo en 2020, se diagnosticaron 1,4 millones de casos y murieron 375 mil pacientes; habiendo aumentado las cifras respecto a 2018 (Bray et al., 2018; Sung et al., 2021). El riesgo de padecer la enfermedad aumenta con la edad. En efecto, más del 85% de los casos diagnosticados son en personas cuyas edades son superiores a los 60 años por lo que la incidencia de este cáncer afecta especialmente a las regiones en las que la esperanza de vida es mayor (Crawford, 2003; Sung et al., 2021).

1.1. La próstata: anatomía y fisiología.

La glándula prostática es el mayor órgano accesorio que forma parte del aparato reproductor masculino (Kumar & Magder, 1995). Esta cubierta por una cápsula fibrosa y localizada bajo la vejiga, delante del recto y atravesada por los conductos eyaculatorios hasta la uretra, a la que se encuentra rodeando (Mcneal, 1981) (Figura 1ª).

La próstata en un humano adulto presenta anatómicamente una gran heterogeneidad y se divide en las zonas central, de transición y periférica (Figura 1ª), también contiene las regiones fibromusculares y periuretrales (McNeal, 1981; Timms, 2008). Todas ellas se encuentran delimitadas, difieren considerablemente en la composición de sus tejidos y, con ello, en su susceptibilidad a diferentes procesos patológicos como el cáncer. La zona periférica, además de suponer alrededor de un 70% de la superficie de la próstata glandular, despierta gran interés debido a que el 75% de los carcinomas se desarrollan en la misma. Por otro lado, la región central es la más pequeña y debido a su diferente composición glandular presenta relativa inmunidad al desarrollo de cáncer ya que tan solo un 5% se desarrollan en esta región, mientras que, la zona transicional se caracteriza por ser la zona donde suelen producirse las hiperplasias benignas de próstata (HBP) y un 20% de los cánceres en este órgano. (Mcneal, 1981; Sathianathen et al., 2018)

Histológicamente, el ducto prostático se divide principalmente en dos capas (Figura 1B): el epitelio glandular de la próstata y el estroma fibromuscular, en el que se encuentra embebido el

primero. El epitelio se compone de distintas capas celulares. La capa luminal secretora está formada por células columnares y la capa basal por células epiteliales cuboidales y células neuroendocrinas. Esta capa, a su vez, está revestida por una membrana basal como matriz extracelular, que forma una división entre las células basales y el estroma (Verze et al., 2016). En el estroma destaca la presencia de fibroblastos y células endoteliales. (Timms, 2008)

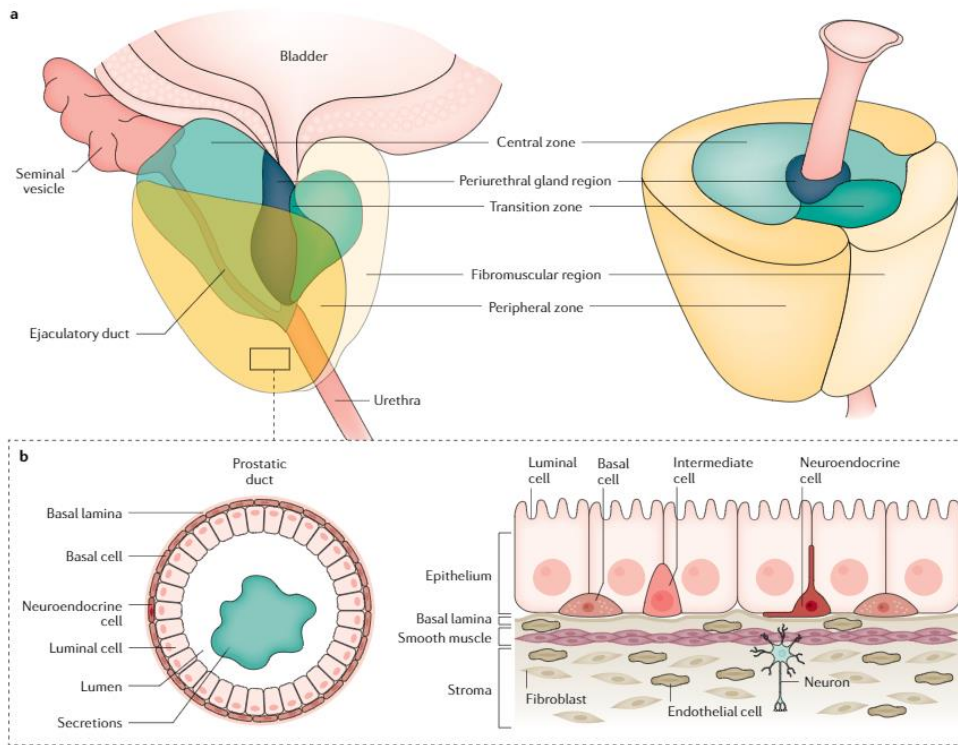


Figura 1. Anatomía e histología de la próstata. (A) Esquema representativo de la anatomía de la próstata en el que se observa su localización respecto a la vejiga y la uretra y la subdivisión de esta en 5 regiones: la zona central, la región periuretral, la zona de transición, la zona periférica y la región fibromuscular **(B)** Esquema representativo de las capas celulares que constituyen el ducto prostático: estroma, músculo liso, lámina basal y epitelio en contacto con el lumen al que se secreta el fluido prostático. Figura obtenida de Rebello et al. (2021)

Fisiológicamente, la próstata es la principal glándula del aparato reproductor masculino involucrada en la fertilidad (Verze et al., 2016) debido a su contribución en la producción del plasma seminal humano, que junto con los espermatozoides o células germinales masculinas componen el semen (Gilany et al., 2015). La composición del plasma seminal humano, incluido el fluido prostático, es muy compleja y se encuentra estrictamente regulada por el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal a través del eje gonadotrófico o hipotálamo-pituitario-gonadal (Verze et al., 2016).

El estroma prostático proporciona homeostasis a la glándula, mientras que sobre el epitelio recae la principal función glandular. El fluido prostático es secretado por las células secretoras del epitelio, constituyendo hasta 1/3 parte del volumen del eyaculado (Gilany et al., 2015; Verze et al., 2016). Sin embargo, su importancia no reside exclusivamente en la contribución a nivel de volumen sino en su papel como desencadenante de cada una de las vías moleculares implicadas en la fertilidad mediante su contribución con proteínas (como las calicreínas (KLKs), incluyendo el antígeno prostático específico (PSA)), intermediarios del ciclo de Krebs (Medrano et al., 2006) u oligoelementos (Zn^{2+}) (Franz et al., 2013) entre otros factores que controlan y regulan cada una

de las vías moleculares implicadas en el proceso de eyaculación y la activación y capacitación del esperma (Tena-Sempere, 2013).

Así como la glándula prostática desempeña un papel esencial en la fertilidad, también es objeto de enfermedades benignas y malignas prevalentes como HPB y el CaP, que están potencialmente relacionados con las vías de regulación y el deterioro de la fertilidad. (Verze et al., 2016)

1.2. Etiopatogenia y fisiopatología del CaP.

Se considera que el desarrollo de CaP está impulsado por la acumulación de mutaciones somáticas en el genoma de las células epiteliales de la próstata. A lo largo de la vida del paciente se acumulan mutaciones que afectan a genes involucrados en la regulación del crecimiento celular, reparación de la cadena de DNA (favoreciendo reordenamientos cromosómicos), muerte celular, etc. de tal forma que la homeostasis se ve alterada. Estas mutaciones tienen consecuencias fenotípicas, alterando el metabolismo celular y rutas de señalización. La regulación de la proliferación se ve afectada y este suceso desencadena en la aparición de neoplasias. Lo que inicialmente supondría la aparición una HPB debido a alteraciones en la proliferación, evoluciona a un tumor maligno, caracterizado por su capacidad de invadir la lámina basal y, posteriormente, incluso migrar a otros tejidos generando metástasis (Figura 2). (Cancer Genome Atlas Research Network, 2015; Rebello et al., 2021)

Cuando la enfermedad evoluciona al estadio avanzado o metástasis, el tumor ya no se encuentra confinado en la próstata, sino que se propaga principalmente a los ganglios linfáticos locorreregionales y/o al estroma de la médula ósea, predominantemente en el esqueleto axial. (Clarke et al., 2009). Para que se de este proceso, se produce previamente la invasión local y tiene lugar una reprogramación metabólica, gran proliferación, neovascularización y extravasación de las células tumorales en el lugar primario. A través de la inhibición de proteínas implicadas en la unión célula-célula y célula-matriz, las células tumorales malignas adquieren motilidad y se desplazan por el torrente sanguíneo. Muchas de estas células son destruidas por el sistema inmune o sufren apoptosis, sin embargo, otras sobreviven y alcanzan zonas endoteliales secundarias donde se adhieren a nivel epitelial-endotelial. Finalmente, transmigran a través del endotelio hasta el intersticio, en el que pueden permanecer en estado “latente” o formar nuevas colonias metastásicas. Este proceso perturba la función fisiológica local, lo que lleva a una disfunción fisiológica y alteración anatómica, siendo la causa de la mortalidad en el cáncer de próstata. (Berish et al., 2018; Clarke et al., 2009).

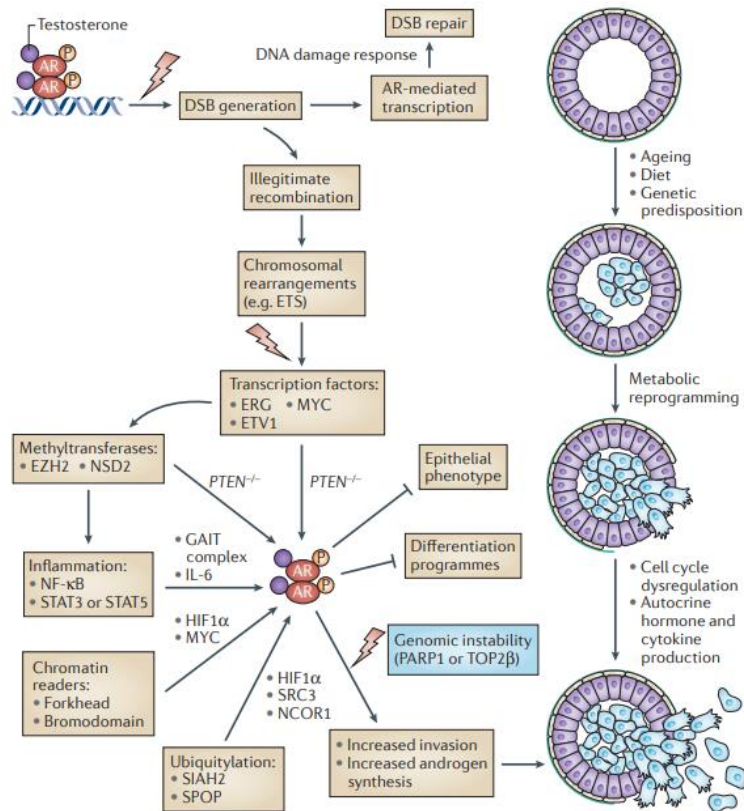


Figura 2. Progresión del cáncer de próstata. La exposición a factores generadores de estrés celular como el envejecimiento, la dieta u otros factores ambientales junto con la predisposición genética de los pacientes pueden generar daños en el DNA y reorganizaciones cromosómicas que conducen a la expresión irregular de factores transcripcionales y a una reprogramación metabólica; responsables de la desregulación del ciclo celular, proliferación anómala e invasión de tejidos por las células tumorales. Figura obtenida de Mills (2014)

1.2.1. Papel de los andrógenos en el desarrollo y progresión de CaP.

Los andrógenos desempeñan un papel crucial en la progresión de la enfermedad. En el estroma, el receptor de andrógenos (AR) que actúa como mediador de actividad, funciona como un modulador clave de la proliferación, supervivencia y diferenciación de células epiteliales en la próstata en desarrollo que son dependientes de factores de crecimiento inducidos por andrógenos secretados por las células estromales. Desempeña una función tanto estimuladora como inhibidora del crecimiento como factor de supervivencia de las células luminales y como supresor de la proliferación de las células basales para regular estrictamente el crecimiento normal de la próstata (Cunha et al., 2004; Niu et al., 2008; Shafi et al., 2013). Andrógenos como la dihidrotestosterona (DHT) interactúan con AR, estimulando su traslocación al núcleo donde interactúa con factores de iniciación de la transcripción (Koochekpour, 2010) y promueve la síntesis de proteínas implicadas en rutas relacionadas con la homeostasis celular o proteasas con funciones prostáticas fundamentales como KLK3 (Verze et al., 2016). Sin embargo, en estadios primarios de cáncer los andrógenos promueven la transcripción de proteínas implicadas en rutas alteradas por la acumulación de mutaciones, como las implicadas en el crecimiento y proliferación y, con ello, la tumorigénesis (Lamb et al., 2014). Por este motivo, los andrógenos mediados por AR desempeñan un papel clave en la enfermedad. (Rebello et al., 2021)

Debido al papel clave en la progresión del CaP que desempeña AR, la terapia contra el CaP más extendida es la terapia de deprivación de andrógenos (ADT) dirigida contra el mismo. Sin

embargo, la mayoría de los tumores se vuelven resistentes a la ADT y pasan a denominarse cánceres de próstata resistentes a castración (CPRC). En un número significativo de estos tumores independientes de andrógenos, AR se observa amplificado, mutado y/o sobreexpresado. Así pues, estas alteraciones en AR ocasionan una alta presencia de AR altamente reactivo tanto a la interacción con andrógenos, como antiandrógenos de la propia ADT, e incluso, a hormonas no androgénicas (Figura 3). En este sentido, se confiere a las células del CaP una ventaja selectiva de crecimiento. (Koochekpour, 2010)

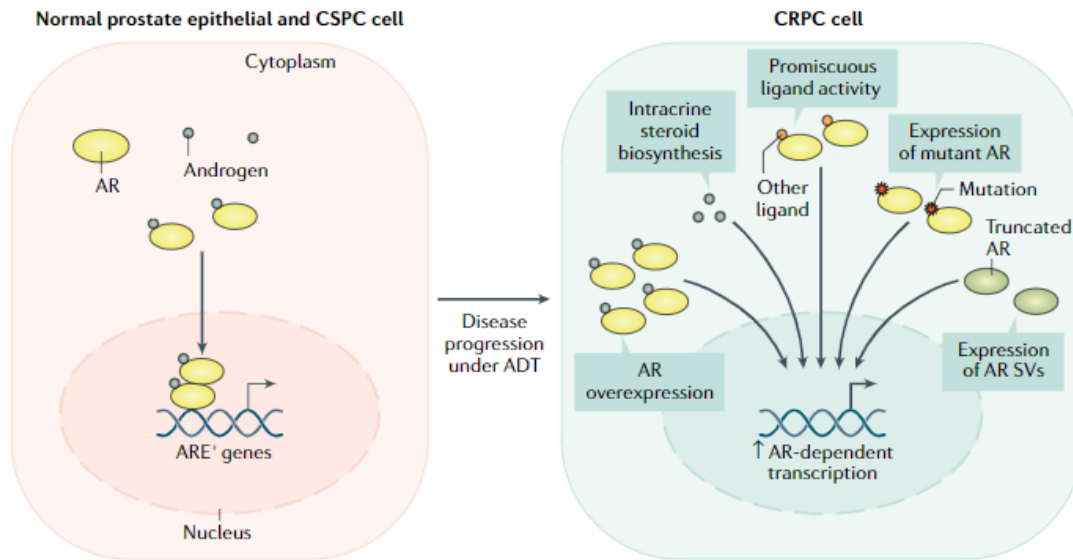


Figura 3. Dependencia de andrógenos y progresión del cáncer de próstata. La progresión de algunos carcinomas prostáticos sensibles a castración a tumores independientes de andrógenos está estrechamente asociada con la alteración y/o mutación del eje de señalización del receptor del AR y usualmente desencadenada tras la terapia de privación de andrógenos. En el epitelio prostático normal o CSPC, los AR activados por andrógenos forman dímeros en el núcleo que se unen a elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en los genes regulados por AR y aumentan su transcripción. Cuando las células cancerígenas progresan a CRPC, se producen cambios anómalos en la señalización celular del AR. Estos cambios pueden deberse a la amplificación del gen *AR*, a su sobreexpresión, a mutaciones específicas que generan variantes del AR, a AR mutantes con actividad constitutiva o la señalización continua de AR por la sensibilidad a ligandos no específicos que activan el receptor de manera indiscriminada debido a la pérdida de especificidad de este. Además, las células cancerosas de próstata adquieren la capacidad de sintetizar andrógenos a partir de esteroides precursores, en un proceso conocido como producción intracrina. Esto lleva a una activación sostenida del AR, lo que puede contribuir al desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Imagen obtenida de (Rebello et al., 2021)

1.2.2. Alteraciones genéticas en CaP.

Las alteraciones moleculares más comunes en CaP localizado son las fusiones de promotores regulados por andrógenos y AR, que interactúan con ERG y otros miembros de la familia de factores de transcripción ETS, en particular la fusión *TMPRSS2-ERG* (Carver et al., 2009). Asimismo, la vía de señalización PI3K/AKT que desempeña un papel fundamental en la promoción del crecimiento y el bloqueo de la apoptosis presenta alteraciones genómicas entre las que destaca la alteración de *PTEN* en un 40% de los CaP primarios, ascendiendo a un 70% en los metastásicos. (Taylor et al., 2010)

Por otro lado, el cáncer metastásico presenta una carga mutacional y frecuencia de ácidos nucleicos circulantes (CNAs) más elevada que el CaP localizado. Se han llevado a cabo estudios específicos en muestras emparejadas de pacientes que inicialmente presentaban CSPC y, posteriormente, experimentaron una recaída y el tumor progresó a CRPC. Los resultados

indicaron que AR tan solo está alterado en un 2-6% de las muestras con CSPC, lo que sugiere un papel adquirido para las amplificaciones y mutaciones de AR en CRPC metastásico. Por otro lado, llevando a cabo el perfil mutacional de CRPC metastásico se ha definido que las mutaciones más comunes son la amplificación y las mutaciones con ganancia de función en el receptor de AR, o la amplificación de reguladores de la transcripción de AR como *FOXA1*, así como mutaciones o deleciones de genes que reprimen la señalización pro-tumorigénica de AR como los supresores de tumores *ZBTB16* y *NCOR1*, que colectivamente están presentes en más del 70% de los pacientes. (Mateo et al., 2020; Robinson et al., 2015; Stopsack et al., 2020)

Respecto al pronóstico de la enfermedad, presenta una gran heterogeneidad en función de factores como la edad, raza, características genéticas y el estado de progresión del tumor al ser diagnosticado (Bray et al., 2018; Siegel et al., 2018). La progresión del cáncer puede anticiparse mediante un estudio de las características histopatológicas, anatómicas y moleculares del tumor, así como teniendo en cuenta el estado de salud del paciente y su historial clínico familiar (Rebello et al., 2021).

1.3. Diagnóstico.

La detección temprana del cáncer de próstata supone un factor clave para la esperanza de vida y opciones de tratamiento del paciente. La supervivencia en un periodo de 10 años en los tumores localizados que son detectados en estadio temprano es de hasta el 99%, frente al 30% de supervivencia en un periodo de 5 años en aquellos casos en los que se detectan en estadios avanzados (Siegel et al., 2018). Asimismo, la detección temprana permite prevenir la aparición de metástasis (Sammon et al., 2015). Consecuentemente, las técnicas de diagnóstico empleadas son foco de estudio y presentan constante evolución.

Actualmente se utilizan varios métodos de diagnóstico, siendo las técnicas de diagnóstico estándar, debido a su naturaleza no invasiva, el análisis en sangre del antígeno prostático específico (PSA), la examinación rectal digital (DRE) y el análisis de imagen por resonancia magnética (MRI) (Mottet et al., 2020). Existen evidencias de que estas pruebas pueden detectar falsos positivos y negativos, por lo que ante resultados anómalos en DRE o del valor de PSA, se recurre a las biopsias, en las que se extrae tejido prostático y es examinado bajo el microscopio, para corroborar los resultados. (Lilja et al., 2008). Las biopsias guiadas por ecografía transrectal (TRUS) son las más empleadas, toman muestras sistemáticamente de 10-12 puntos de la zona periférica bilateralmente, desde el ápice hasta la base del órgano, sobre todo en áreas críticas. Sin embargo, presentan problemas respecto a detección de falsos negativos y estratificación errónea del tumor (sobre todo tras ser sometido el paciente a prostatectomía radical) (Skouteris et al., 2018a), así como riesgo de infecciones y sepsis posteriores al procedimiento (Loeb et al., 2013). Ante esta problemática, las biopsias de mapeo transperineal (TPMB) están en auge. Las muestras son obtenidas mediante una aguja a través del perineo en lugar de a través del recto, presentan una estratificación más precisa y se reduce el riesgo de infección severa febril del tracto urinario (UTI) aunque aumentando el riesgo de retención urinaria (Huang et al., 2016; Skouteris et al., 2018b). Adicionalmente, las biopsias guiadas por resonancia magnética multiparamétrica (mpMRI) son utilizadas para dirigir específicamente las biopsias a áreas susceptibles, mejoran la detección temprana y presentan un mayor rendimiento en el diagnóstico del cáncer de próstata clínicamente significativo. De esta forma se evita el sobrediagnóstico de tumores indolentes o de bajo riesgo que no requieren terapia activa, como ocurre, en ocasiones, mediante la realización de

otro tipo de biopsias (Mottet et al., 2020). En la actualidad, es la que se recomienda a nivel mundial. (Fütterer et al., 2015).

Para concluir un diagnóstico completo se requiere información, por tanto, de la localización, grado de diferenciación y tamaño del tumor.

1.4. Estadificación del CaP.

Los tipos de cáncer de próstata pueden clasificarse en función al nivel de progresión que presentan y a si las células cancerígenas han invadido tejidos externos a la próstata como: localizados de bajo riesgo de progresar a metástasis, localizados de alto riesgo y metastásicos. Asimismo, otra clasificación muy útil es en función a su respuesta al principal tratamiento, el de privación de andrógenos (ADT), como sensibles a castración (CSPC) o resistentes a castración (CRPC). Sin embargo, experimentalmente esta diferenciación no es tan sencilla.

Para establecer un diagnóstico completo y facilitar el proceso de elección del tratamiento idóneo se han desarrollado diferentes escalas clasificatorias. La escala Gleason junto con la clasificación del cáncer de próstata de la Sociedad Internacional de Patologías Urológicas (ISUP), son las más utilizadas e indican el estadio y posible pronóstico de la enfermedad. (Epstein et al., 2016; Humphrey, 2004)

La escala Gleason establece un sistema de puntuación que se basa en la apariencia histológica y disposición de las células del cáncer mediante la tinción de muestras de tejido en secciones con hematoxilina y eosina. Se utilizan cinco patrones de células para generar la puntuación que puede variar de 2 a 10. Se asignan puntuaciones del 1-5 a dos áreas distintas y se suman los valores asignados, teniendo en cuenta que cuanto menor es la puntuación más similar son las células a las del tejido prostático sano. El grado de Gleason está directamente relacionado con el del tamaño del tumor, el grado de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento en el estroma, etapa patológica y probabilidad de diseminación. (Humphrey, 2004)

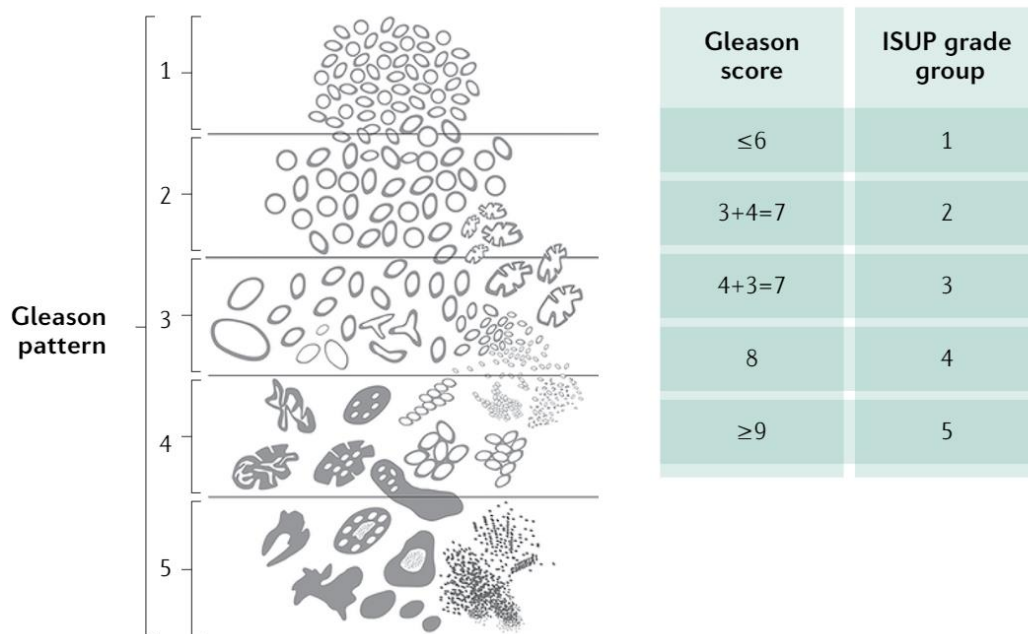


Figura 4. Estadificación del CaP mediante puntuación de Gleason y grado ISUP. El patrón de Gleason asocia una puntuación ascendente en función de lo diferentes que son las células morfológicamente respecto a las células del tejido sano. Las agrupaciones en 5 grados de ISUP clasifican el tumor en función del patrón de Gleason que presentan las células predominantemente. Figura obtenida de Rebello et al. (2021)

Posteriormente, se desarrolló el sistema de puntuación de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP). Este sistema presenta ligeras modificaciones respecto al de Gleason, sin embargo, la base histológica es la misma. Los tejidos que exclusivamente presentan patrón Gleason 3 se clasifican como grupo 1; los tejidos con predominio de patrón 3 pero con un patrón secundario 4 se clasifican como grupo 2; aquellos en los que el patrón 4 predomina sobre el patrón 3 se clasifican como grupo 3; la enfermedad con una puntuación Gleason 8 se clasifica como grupo 4; y, por último, a enfermedad con puntuación Gleason ≥ 9 se clasifica como grupo 5. De tal forma que cuanto mayor grado presenta, más avanzada está la enfermedad. (Epstein et al., 2016; Sathianathen et al., 2018)

Adicionalmente, existen sistemas de clasificación que permiten estratificar el riesgo de los pacientes de experimentar recurrencia de la enfermedad. La clasificación de grupos de riesgo de D'Amico se basa en el grado tumoral, la etapa de la enfermedad y los niveles séricos de PSA. Esta clasificación permite dividir a los pacientes en grupos de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo, lo que proporciona información sobre la probabilidad de recurrencia de la enfermedad después del tratamiento curativo. Es comúnmente utilizada en entornos clínicos para determinar la necesidad de terapia adicional o complementaria para lograr un control efectivo del cáncer. (Boorjian et al., 2008)

Ambos sistemas de clasificación son valiosos en la práctica clínica y en la investigación, ya que permiten una estratificación precisa. Esto facilita la toma de decisiones en cuanto al seguimiento y tratamiento de la enfermedad, asegurando un enfoque adecuado y personalizado para cada paciente.

2. Tratamiento y terapias actuales contra el CaP.

La radioterapia o prostatectomía radical suelen ser los tratamientos iniciales para abordar el cáncer de próstata localizado de bajo riesgo. Cuando las características clínicas indican un alto riesgo de progresión de la enfermedad, en ocasiones se combina la radioterapia con terapia de privación de andrógenos (ADT) transitoria o prostatectomía con disección de ganglios linfáticos pélvicos (PLND) en función de las características del paciente. En ambos casos se realiza el seguimiento de la progresión de la enfermedad (Rebello et al., 2021). Lamentablemente, entre el 27% y el 53% de los pacientes desarrollan recurrencia bioquímica tras el primer tratamiento, observándose de nuevo elevados niveles de PSA (Mottet et al., 2017), por lo que se debe recurrir a una nueva estrategia. Los receptores de andrógenos (AR) desempeñan un papel crucial en la patogénesis del cáncer de próstata y siguen siendo el objetivo terapéutico clave (Hu et al., 2009). El tratamiento principal hasta el momento ha sido la ADT, ya sea quirúrgica o química. Tras la recurrencia, se opta por ADT permanente tanto en cáncer localizado como metastásico en combinación con otras terapias. Sin embargo, existen casos en los que tras recibir la ADT, los pacientes presentan niveles de PSA elevados. Teniendo en cuenta que los niveles de expresión de PSA reflejan la actividad del AR y su respuesta a los andrógenos, son diagnosticados con cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) (Shafi et al., 2013).

Durante la progresión de la enfermedad el objetivo es evitar o, al menos, retrasar la aparición de metástasis. Tras su aparición, el tratamiento consiste en la combinación de ADT permanente junto con, principalmente, quimioterapia destacando el uso del agente quimioterapéutico Docetaxel (Tannock et al., 2004). También se combinan otros fármacos como Cabazitaxel, Abiraterona o Enzalutamida con radioterapia. Aunque la quimioterapia es efectiva en el cáncer de próstata avanzado, la supervivencia durante un periodo de 5 años es inferior a la mitad (Lowrance et al., 2018). Por ello, es indispensable el desarrollo de nuevas terapias.

Los avances tecnológicos y en investigación de los últimos años están contribuyendo a una mayor comprensión biológica de enfermedades como el cáncer, allanando el terreno a la medicina de precisión (Rebello et al., 2021). Junto con las terapias combinadas, que muestran gran potencial para los estadios de la enfermedad que presentan resistencias (Zarrabi et al., 2019), este nuevo enfoque está revolucionando el campo del tratamiento de los pacientes con cáncer mediante la traducción de estos conocimientos en mejores resultados clínicos, no solo reduciendo los efectos adversos respecto a los tratamientos tradicionales, sino también mediante la mejora de la calidad de vida del paciente y las tasas generales de supervivencia (Dwane et al., 2021). Esta estrategia se ha puesto en práctica y destacado por su efectividad en algunos tipos de cáncer como el de mama, en el que se ha desarrollado un fármaco, el Trastuzumab, dirigido hacia el gen diana *HER2* (Incorvati et al., 2013), o como el melanoma, para el que se emplea el compuesto Vemurafenib dirigido al gen mutado *BRAF* (Chapman et al., 2011). Para el cáncer de próstata también existen terapias dirigidas contra AR, sin embargo, con la independencia a andrógenos que desarrollan algunos tipos de cáncer tras la ADT, pierde su efectividad.

3. Identificación de dianas terapéuticas en medicina de precisión.

Frente a la falta de terapias completamente efectivas para los diferentes tipos de tumores en CaP y teniendo en cuenta que sigue siendo un problema complejo de salud global, se requiere mayor

investigación de las características genéticas y moleculares de este tipo de tumores en aras de poder entender los mecanismos oncogénicos tras los mismos e identificar nuevas dianas terapéuticas hacia las que enfocar los tratamientos obteniendo una mayor eficacia.

Una potencial diana terapéutica es aquella proteína con la capacidad de interactuar con un modulador de actividad farmacológica traduciéndose en consecuencias terapéuticas con un grado significativo de afinidad, eficacia y seguridad. Es decir, deben tenerse en cuenta la “calidad” de la diana y su capacidad de ser abordada. El primer concepto hace referencia al nivel de confianza de que la modulación de la actividad de esa diana se traducirá en efectos modificadores de la enfermedad o en la reducción de los síntomas producidos por la misma. Su caracterización se basa en evidencias genéticas y análisis de esencialidad teniendo en cuenta niveles de expresión, estudios de silenciamiento y el análisis de rutas metabólicas entre otros. El segundo concepto hace referencia a la capacidad de interacción de la molécula, es decir, la probabilidad de identificar otra molécula moduladora con la que interactúe de forma efectiva. En este caso, la molécula moduladora sería el principio activo del fármaco que se pretendería desarrollar. (Brown et al., 2018)

3.1. Análisis de esencialidad.

Un gen esencial es aquel indispensable para el crecimiento y replicación celular, es decir, la pérdida de su función comprometería la viabilidad celular (Bartha et al., 2018). La esencialidad de un gen no está determinada exclusivamente por su naturaleza molecular o propiedades estructurales, sino que depende del escenario biológico o condiciones bajo las que se encuentra la célula, por lo que se trata de una propiedad contextual (R. Zhang & Lin, 2009). Es precisamente la importancia de estos genes para la viabilidad celular lo que les conferiría la categoría de buenos candidatos como dianas terapéuticas en enfermedades como el cáncer, teniendo en cuenta que la modificación/inhibición de su función resultaría en la muerte inducida de las células tumorales o la paralización de su proliferación (Tsherniak et al., 2017a), sin embargo, también podría comprometerse la viabilidad de las células de tejidos sanos. Por este motivo, es imprescindible realizar una distinción entre los genes esenciales exclusivamente en un contexto molecular o histológico concreto, codificando potenciales dianas farmacológicas debido a la baja probabilidad de afectar considerablemente a la actividad o viabilidad de tejidos sanos; de aquellos genes esenciales comunes a muchos tejidos, cuya actividad estaría relacionada con procesos esenciales comunes y presentarían gran toxicidad para el resto de tejidos (Behan et al., 2019). En el caso concreto del cáncer, sería interesante identificar aquellos genes que sean esenciales en el tejido tumoral cuya función no sea fundamental en el tejido sano, presentando diferencias de expresión que indiquen esa esencialidad contextual.

Así como la propiedad contextual de ciertos genes supone una ventaja en cuanto a la posibilidad de desarrollar fármacos dirigidos con baja toxicidad para el resto de los tejidos, supone adicionalmente un reto en cuanto a su identificación de forma experimental. (Fernald et al., 2011)

Para llevar a cabo la identificación de estos genes esenciales se hace uso de herramientas como cribados de silenciamiento de genoma completo mediante CRISPR-Cas9 en cientos de líneas celulares de cáncer para identificar genes candidatos (Dwane et al., 2021). Se dispone de recursos como el Project Score Database, Project Achilles del Instituto Broad, el Proyecto DRIVE de Novartis y el Mapa de Dependencias del Instituto Sanger (Cowley et al., 2014; Dwane et al., 2021; Ghandi et al., 2019; Tsherniak et al., 2017) en los que se definen librerías o mapas genéticos. A partir de estas bases de datos, y teniendo en cuenta que los posibles métodos experimentales

resultan muy costosos tanto en tiempo como en recursos, se llevan a cabo métodos computacionales mediante algoritmos y modelados para determinar genes esenciales según redes de interacción y rutas metabólicas en contextos específicos (Li et al., 2020). Algunos abordajes *in silico* consisten en la utilización de métodos como el método estadístico ADaM, mediante el que se diferencian genes esenciales *core* o comunes de aquellos específicos de un contexto determinado (Behan et al., 2019) o como el método de modelado de restricción (CBM), mediante el que se identifican genes esenciales basándose en su indispensabilidad para que se den artificialmente reacciones de una ruta metabólica necesaria para la viabilidad celular, calculando el número mínimo de genes con baja expresión que deben ser activados por la célula para mantener la viabilidad según un conjunto de requisitos definidos y realizando posteriormente el silenciamiento de genes *in silico* para encontrar aquellos que requieren la activación de genes adicionales (Antoranz et al., 2022). Tal como se ha expuesto, existen diferentes aproximaciones que integran conjuntos de datos ómicos con redes biológicas utilizando modelos matemáticos eficientes para abordar la identificación de genes esenciales e investigación respecto a las bases del cáncer.

Sin embargo, para que estos genes candidatos sean dianas prometedoras deben reunir una serie de características para poder ser abordadas farmacológicamente.

3.2. Características de las dianas terapéuticas para ser abordadas farmacológicamente.

El concepto del "*druggable genome*" o genoma como objetivo farmacológico se refiere a un subconjunto de genes en el genoma humano que codifican proteínas capaces de interactuar con moléculas pequeñas o anticuerpos. La evaluación de la capacidad farmacológica de una diana implica considerar su capacidad para interactuar eficazmente con moduladores de su actividad, es decir, valorar su idoneidad para el desarrollo de fármacos dirigidos viables comercialmente (Hopkins & Groom, 2002).

Se han empleado diversos enfoques computacionales y experimentales para predecir objetivos abordables, teniendo en cuenta factores como la estructura de la proteína, los sitios de unión y su accesibilidad en función de su localización, etc. Para llevar a cabo procesos de cribado se usan métodos biofísicos como la espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o Resonancia de Plasmón Superficial (RPS) para realizar el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real y caracterización de estructuras moleculares (De Luca et al., 2020). Asimismo, la disponibilidad de información estructural y funcional en bases de datos como el Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank) facilita el análisis de posibles objetivos terapéuticos *in silico*.

A partir de esta información se asigna a las proteínas diferentes niveles o puntuaciones en consonancia a su idoneidad para ser abordadas. Para llevar a cabo esta clasificación se tienen en cuenta factores a nivel genómico, funcional y estructural. Algunos de los principales factores objeto de evaluación son los siguientes (Brown et al., 2018):

1. La ubicación y naturaleza de los sitios capaces de unirse a pequeñas moléculas o anticuerpos.
2. La función de la diana y su integración en las vías de señalización o metabólicas.
3. Los mecanismos de regulación endógena.
4. La ubicación espacial y temporal.

5. La tratabilidad de objetivos homólogos.
6. Las propiedades de los moduladores conocidos.
7. El estado de progresión de los moduladores conocidos.

Existen bases de datos y algoritmos previamente desarrollados, como SiteMap o Fpocket entre otros (Halgren, 2007; Le Guilloux et al., 2009), para realizar la evaluación *in silico* del potencial farmacológico de la proteína objeto de análisis y tener la posibilidad de identificar de potenciales zonas de unión con un modulador concreto.

Como conclusión, una diana terapéutica ideal contaría con las siguientes propiedades (Gashaw et al., 2011):

1. La diana modifica la enfermedad y/o tiene una función comprobada en la fisiopatología de una enfermedad.
2. La modulación de la diana es menos importante en condiciones fisiológicas o en otras enfermedades.
3. Si su capacidad para ser abordada farmacológicamente no es evidente, se debería disponer de una estructura en 3D de la proteína objetivo o de un homólogo cercano para evaluar su capacidad de interacción.
4. La expresión de la diana no está uniformemente distribuida en todo el cuerpo.
5. Existe un biomarcador específico de la diana/enfermedad para monitorear la eficacia terapéutica.
6. Predicción favorable de posibles efectos secundarios según datos.

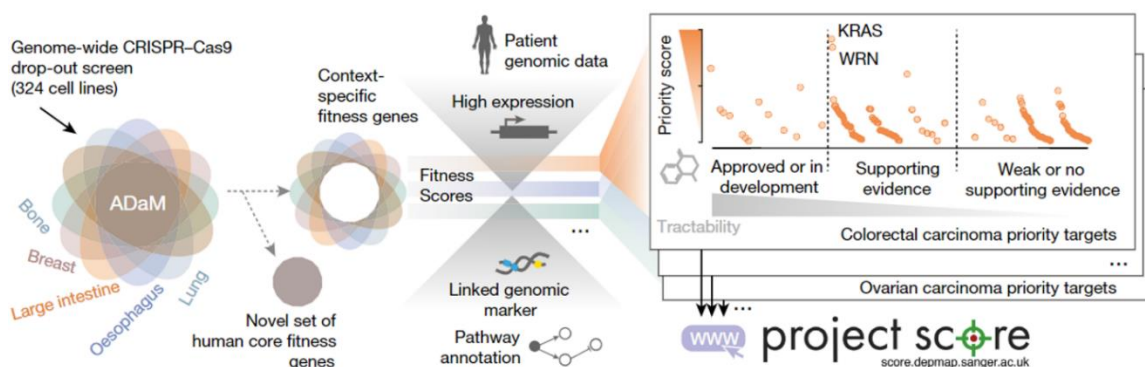


Figura 5. Abordaje para llevar a cabo la identificación de genes esenciales y candidatos a diana terapéutica mediante “The Project Score”. Se lleva a cabo un cribado de genoma completo de pérdida de función mediante CRISPR-Cas9 en 324 líneas celulares, mediante el método estadístico ADaM se determinan los genes esenciales específicos de contexto y, a partir del análisis de esencialidad, para elegir genes candidatos a diana terapéutica se tienen en cuenta factores como que presente alta expresión, este anotado, ligado a un biomarcador y las características genómicas del paciente. Finalmente, se les asigna una puntuación en función de su “abordabilidad” y son clasificadas y almacenadas en la base de datos. Figura editada de Behan et al. (2019)

Teniendo en cuenta los procedimientos preestablecidos en el desarrollo de fármacos, tras la identificación *in silico* de potenciales dianas terapéuticas, debe realizarse la validación de estas experimentalmente. Para ello se realiza la caracterización de la diana en modelos celulares, animales y, en última instancia en humanos.

En el grupo de investigación “Unidad de descubrimiento de fármacos” del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe) se llevaron a cabo cribados y aproximaciones

transcriptómicas *in silico* mediante las que se obtuvieron 16 genes esenciales como potenciales dianas terapéuticas contra el cáncer de próstata, entre los que se encuentra el gen *EIF3H*. Tras este primer análisis es necesario llevar a cabo las validaciones experimentales necesarias para corroborar que determinado gen se trataría de una potencial diana terapéutica a nivel biológico, cuya modulación afectaría a la viabilidad de las células tumorales en cáncer de próstata.

4. Subunidad H del complejo de iniciación traduccional eucariota EIF3.

El factor de iniciación traduccional eucariota 3 (EIF3) es uno de los mayores complejos en las células mamíferas (804 kDa) y está constituido por trece subunidades. (Masutani et al., 2007; Pick et al., 2009). Coordina una amplia red de interacciones entre diversos factores de iniciación que se ensamblan en la subunidad 40S y participan en múltiples reacciones relacionadas con la traducción. EIF3 desempeña la función de soporte estructural al unirse a la subunidad 40S en la superficie expuesta al solvente en lugar de en la interfaz con la subunidad 60S donde se encuentran los sitios responsables de la decodificación del ARNm. Esta localización de EIF3 sería adecuada para otras funciones reguladoras, las cuales incluyen el reinicio de la traducción en ARN mensajero policistrónico y su función como receptor de quinasas proteicas que controlan la síntesis de proteínas. Asimismo, EIF3 se dirige selectivamente e inicia la traducción de un conjunto específico de mRNA implicados en la proliferación celular, abarcando procesos como el ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis. Para llevar a cabo esta regulación, el complejo EIF3 emplea distintos modos de unión a estructuras de tipo tallo presentes en el RNA. Estas interacciones pueden ejercer tanto la activación como la represión de la traducción de los mRNA seleccionados (Lee et al., 2015). Las subunidades que lo conforman desempeñan diferentes funciones, desde actividades reguladoras hasta funciones esenciales para la síntesis proteica. (Hinnebusch, 2006)

Las funciones de las diferentes subunidades de EIF3 son variadas. Algunas cumplen funciones esenciales para la síntesis de proteínas y otras tienen actividades reguladoras (Hinnebusch, 2006). EIF3H es una proteína de 40 kDa y una de las subunidades no conservadas que constituyen EIF3 (Masutani et al., 2007). Se encuentra en el citoplasma y ha despertado gran interés en el campo del cáncer de próstata debido a las evidencias halladas respecto a la sobreexpresión de esta en CaP y los indicios de que su funcionalidad estaría relacionada con la síntesis proteica y la proliferación celular en cáncer de próstata (Nupponen et al., 1999; Saramaki et al., 2001).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante aproximaciones *in silico* respecto a la esencialidad de EIF3H en cáncer de próstata y las evidencias documentadas bibliográficamente respecto a la estrecha relación del gen con la proliferación y viabilidad celular, la siguiente hipótesis es formulada:

El gen *EIF3H* sería una potencial diana terapéutica contra el cáncer de próstata. Se encontraría sobreexpresado en las líneas celulares de cáncer de próstata respecto a aquellas que presentan el

fenotipo sano. Asimismo, la viabilidad celular y clonogenicidad de la línea celular de CaP 22Rv1 estarían estrechamente relacionadas con la expresión de *EIF3H* y se verían afectadas por el silenciamiento de la expresión de este.

En aras de determinar la veracidad de la hipótesis planteada, se establece el objetivo principal de este trabajo, consistente en la evaluación, *in vitro*, de EIF3H como potencial diana terapéutica. Para ello, se plantean los siguientes subobjetivos específicos:

1. Evaluar, *in vitro*, si existe sobreexpresión diferencial significativa del gen *EIF3H* en las líneas celulares de CaP LnCaP, PC3 y 22Rv1 respecto al fenotipo sano.
2. Llevar a cabo la construcción y clonación, *in vitro*, de plásmidos recombinantes shRNA (RNA de horquilla corta).
3. Obtener vectores lentivirales con el plásmido recombinante shRNA.
4. Llevar a cabo el silenciamiento/inhibición de la expresión del gen *EIF3H*, *in vitro*, en un modelo celular de CaP 22Rv1.
5. Evaluar, *in vitro*, el efecto del *knockout* de EIF3H en la viabilidad celular en 22Rv1.
6. Evaluar, *in vitro*, el efecto del *knockout* de EIF3H en la clonogenicidad en 22Rv1.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares.

Como modelo *in vitro* ha sido empleada la línea celular de cáncer de próstata 22Rv1. Asimismo, HEK 293T, línea celular embrionaria de riñón humano, ha sido utilizada para realizar la infección lentiviral. Todas ellas se obtuvieron de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Todas las líneas celulares empleadas fueron incubadas en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ a 37 °C. El medio se cambiaba cada 2 días y se realizaba mínimo un pase a la semana.

1.1. Línea celular de CaP 22Rv1.

La línea celular 22Rv1 es ampliamente utilizada para la investigación del cáncer de próstata, representando el estadio primario de la neoplasia. Son células epiteliales derivadas de un xenógrafo humano. La línea celular es andrógeno-dependiente y expresa antígeno prostático específico (PSA) (Sramkoski et al., 1999). Se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), 100 U/mL de Puromicina/Estreptomina (P/E).

1.2. Línea celular HEK 293T.

Las células 293T de riñón embrionario humano (HEK) son comúnmente utilizadas como línea celular de empaquetamiento lentiviral debido a características específicas de las mismas que favorecen la transfección (Albrecht et al., 2015; Merten et al., 2016). Se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España)

suplementado con 10% de FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), 100 U/mL de P/E.

1. Real-Time qPCR (RT-qPCR).

Se sembraron 2×10^5 células/2 mL por condición en una placa de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 48h. Se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS 1X frío.

La extracción de RNA de la muestra se realizó haciendo uso del RNeasy Mini kit (Quiagen, GmbH, Hilden, Germany), del que se siguieron las instrucciones de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La cuantificación del RNA extraído se llevó a cabo usando el Nanodrop spectrometer (Thermo Scientific). La síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA) se obtuvo utilizando el kit QuantiTect Reverse Transcription (Quiagen GmbH, Hilden, Germany). En primer lugar, 500 ng de RNA/12 µL en agua libre de RNAsas fueron incubados (termociclador nombre lab Geles) con 2 µL de tampón gDNA wipeout durante 2 minutos a 42 °C para eliminar restos de DNA genómico. Para llevar a cabo la síntesis del cDNA se elaboró el Master mix, cuyos reactivos están recogidos y se adicionaron en el orden expresado en la Tabla 1, y se realizó la incubación durante 15 minutos a 42 °C. Se realizaron triplicados de cada muestra.

Tabla 1. Reactivos empleados en la retrotranscripción del RNA para cada muestra.

Reactivos	Volumen (µL)
Quantiscript Transcriptasa Reversa	1
Quantiscript RT Tampón	4
Mix cebadores RT	1

Para llevar a cabo la RT-qPCR se utilizaron para cada muestra 10 ng de cDNA y el kit TB Green® Premix Ex Taq™ (Takara, Shiga, Japan) para realizar el mix. La RT-qPCR se llevó a cabo en el equipo ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con 40 ciclos de amplificación y temperatura de anillado a 60 °C. Se realizaron duplicados de cada muestra. Los reactivos empleados se describen en la Tabla 2 y la secuencia de DNA de los cebadores empleados se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2. Reactivos empleados para la RT-qPCR para cada muestra.

Reactivos	Volumen (µL)
DNA	2
ROX Dye II (50X)	0.2
Cebador directo (10X)	0.3
Cebador reverso (10X)	0.3
SYBR Premix Ex Takara (2X)	5
H ₂ O	2.2

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados para llevar a cabo la qPCR.

Gen	Cebador directo (5'- 3')	Cebador reverso (5'- 3')
<i>EIF3H</i>	CCAGCAGCAATCATTGGGG	ATATTCTCCTGCTGGCGACG
<i>B2M</i>	AAGCAGCATCATGGAGGTTTG	GAGCTACCTGTGGAGCAACC

Los valores de expresión de EIF3H se cuantificaron utilizando en método $2^{-\Delta\Delta C}$ y se normalizaron con los valores de expresión de Beta-2 microglobulina (B2M).

2. Western Blot.

Se sembraron $1,5 \times 10^6$ células/10 mL y se incubaron en CO₂ al 5 %, a 37 °C durante 48 h. Se eliminó el medio y las células se lavaron con PBS frío 1X.

La extracción proteica se produjo añadiendo 150 µL/placa de tampón de lisis (1 mL de tampón RiPA cuyo contenido consta de B-glicerofosfato 0,25 mM, DTT 1 mM, leupeptina 4 µM, PMSF 40 µM, caliculina 100 µM, ortovanadato de sodio 1 µM y pepstatina 0,4 µM). Las células se rasparon y el lisado se transfirió a tubos Eppendorf, fue incubado en hielo durante 30 min y centrifugado a máxima velocidad durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y la concentración de proteína se midió con el Pierce™ BSA Protein Assay kit (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se prepararon alícuotas de proteína a una concentración final de 1 µg/µL. Se cargaron entre 5 y 20 µL de cada muestra para realizar la electroforesis y se llevó a cabo la separación proteica por tamaño en gel de poliacrilamida al 4-15 % (4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel, Bio-Rad Laboratories Inc.). Se transfirió el contenido del gel a una membrana de nitrocelulosa y el bloqueo de los sitios de unión no específicos se realizó utilizando el tampón de solución salina tamponada *Tris-Buffer Saline Tween* 1X (TBS-T) con 5% de leche en polvo desnatada a temperatura ambiente durante 1 hora.

A continuación, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios, cuyas características se definen en la Tabla 4 (dilución 1:1000 en TBS-T 1X con 5% BSA) a 4 °C durante la noche.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en el análisis proteico por Western Blot.

Anticuerpo	Peso molecular (kDa)	Tipo	Referencia fabricante
Anti-EIF3H	40	IgG de conejo	3413 (Cell signaling technology)
Anti-GAPDH	37	IgG de conejo	2118 (Cell signaling technology)

Tras la incubación se procedió al lavado de la membrana, realizada 3 veces sucesivas con TBS-T 1X durante 10 min cada una a temperatura ambiente.

Finalmente se incubó la membrana con anticuerpos secundarios IgG de cabra Anti-IgG de conejo conjugados a *Horseradish peroxidase* (HRP) (Bio-Rad Laboratories Inc.) (dilución 1:10000 en TBS-T 1X con 5% leche en polvo desnatada) a temperatura ambiente durante 1 h. Tras lavar las

membranas tres veces más con TBS-T 1X durante 10 minutos, se utilizó un sistema de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Bio-Rad Laboratories Inc.) para detectar las bandas inmunorreactivas siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se analizó la concentración proteica de las bandas observadas haciendo uso de la extensión de herramientas de volumen del software Image Lab (Bio-Rad), haciendo uso de la proteína *housekeeping* GAPDH como control interno para normalizar los resultados.

3. Generación de modelos de silenciamiento.

3.1. Transformación bacteriana.

Para la clonación de los vectores lentivirales se utilizó *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5a competente. Las células bacterianas se descongelaron en hielo, y se mantuvieron en estas condiciones siempre que no se indicase lo contrario. Durante todo el procedimiento se mantuvieron condiciones de esterilidad.

Para llevar a cabo la replicación del plásmido se sembraron 50 μ L de *E. Coli* utilizando asas de siembra estériles en una placa autoclavada con medio LB agar (0,5% extracto de levadura, 1% triptona, 1% NaCl, 1% agar, 1:1000 de ampicilina). Las placas fueron incubadas de forma estática 37°C durante toda la noche. Se realizó un minicultivo de LB de 3 ml tras picar una colonia aislada con el asa de siembra estéril y se incubó de nuevo a 110 rpm y 37 °C. Cuando el crecimiento bacteriano necesario se evidenció por la turbidez del cultivo, se transfirieron 500 μ L de cultivo a 250 mL de LB y se incubó durante la noche en las mismas condiciones.

3.2. Purificación DNA.

La purificación de los plásmidos se realizó siguiendo un protocolo interno en el que se utilizaron diferentes soluciones y sucesivos ciclos de incubación y centrifugación, expuestos a continuación:

En primer lugar, se centrifugó a 4500 rpm el cultivo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en la solución 1 (EDTA 12 mM, glucosa 50 mM, Tris 25 mM), se incubó 8 minutos a temperatura ambiente con lisozima (2.000 U/mg) (Thermo Fisher Scientific, España). Se añadieron 10 ml de Solución 2 (91% MQ H₂O, 5% SDS 20%, 4% NaOH 5M) y se incubó 10 minutos en hielo con agitación regular manual. Cuando la mezcla adquirió una consistencia viscosa, se realizó una incubación de 10 minutos junto con 7,5 mL de Solución 3 (Acetato potásico 4M, Ácido acético 5M). A continuación, se realizaron varios ciclos de incubaciones y centrifugaciones sucesivos. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una centrifugación a 12000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante resultante fue incubado en 14 mL de isopropanol a temperatura ambiente durante 30 minutos y la muestra se centrifugó a 9000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet al aire durante 10 minutos. El pellet completamente seco se resuspendió suavemente en 4 mL de TE. Con el pellet completamente resuspendido, se añadieron 2 mL de Acetato amónico 7,5M a 4 °C y se incubó en hielo 30 minutos. Tras la incubación, se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Falcon con 12 mL de etanol 100% frío y se incubó durante la noche a -20 °C. El día posterior, la muestra se centrifugó a 10000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se dejó secar el pellet al aire. Se añadieron 500 μ L de TE y se resuspendió

el pellet suavemente. Posteriormente se transfirió la suspensión a un Eppendorf en el que se realizó una incubación con 1 μ L de 10 mg/mL de RNasa (Thermo Fisher Scientific, España) a 37 °C durante 30 min. Tras la incubación se añadió 250 μ L de Fenol a 4°C y 250 μ L de Cloroformo CHCl_3 , se mezcló con vórtex la mezcla y se centrifugó a máxima potencia a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se le añadieron 250 μ L de CHCl_3 , se agitó en vórtex y centrifugó de nuevo según las condiciones expuestas anteriormente. Este último paso fue realizado dos veces consecutivas. Se recuperó la capa superior acuosa y se añadieron 50 μ L 3M de Acetato sódico, tras este paso se adicionó 1 mL de Etanol 100% a -18 °C y se realizó una centrifugación a máxima potencia a 4 °C durante 5 minutos tras la que se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol 70% a -18 °C. Se realizó de nuevo una centrifugación en las condiciones anteriormente expuestas y, finalmente, se dejó secar el pellet durante la noche. El día posterior se resuspendió el pellet en 50 μ L de TE y se utilizó el Nanodrop spectrometer (Thermo Scientific) para medir la concentración de DNA obtenido en las muestras.

3.3. Infección lentiviral.

3.3.1. Transfección celular.

Para llevar a cabo la transfección celular se utilizaron 3 construcciones de vectores de expresión lentivirales recombinantes con la secuencia de shRNA cuya diana se encuentra descrita en la Tabla 5.

Tabla 5. Construcciones de vectores de expresión lentiviral recombinantes utilizados en la infección lentiviral.

Nombre	Vector	Referencia fabricante	Secuencia diana (5'- 3')
ShEIF3H-C	pLV[shRNA]-EGFP:T2A: Puro-U6>Scramble_shRNA	VB010000- 0009mxc	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG
ShEIF3H-2	pLV[shRNA]-EGFP:T2A: Puro-U6>hEIF3H[shRNA#2]	VB900071- 1747qhr	CGCCATGTAAACATTGATCAT
ShEIF3H-4	pLV[shRNA]-EGFP:T2A: Puro-U6>hEIF3H[shRNA#4]	VB211116- 1322fzg	GCTGTTGCAGATAAACATGAA

Se sembraron 1×10^6 células HEK 293T/10 ml por cada vector lentiviral a generar y se incubaron en CO_2 al 5% a 37 °C durante 24 h hasta alcanzar una confluencia del 70%.

Tras 24 h, las construcciones necesarias para transfectar las células: el plásmido de expresión lentiviral recombinante con la secuencia de shRNA, el sistema de empaquetamiento lentiviral dividido en dos plásmidos; uno que codifica para la proteína Rev y otro que codifica las proteínas Gag y Pol, y el plásmido envolvente (VSV-G) se descongelaron en hielo. Para cada partícula lentiviral, se preparó una mezcla de transfección con 544 μ L de DMEM sin suero y 24 μ L de FuGENE® HD Transfection Reagent mix (Promega), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se prepararon 20 μ L del mix de transfección de DNA (0,4 μ g de VSV-G, 3,7 μ g Gag/Pol, 3,7 μ g Rev y 4,2 μ g de plásmido de expresión de vectores lentivirales recombinantes en H_2O estéril) y se añadió después del tiempo de incubación a cada FuGENE Mix. El Mix de transfección de DNA junto con el FuGENE Mix se mezclaron por inversión y se incubaron a temperatura ambiente durante 25-30 min. Se eliminó el medio de

las células HEK 293T y se reemplazó por 6 ml de medio DMEM suplementado al que se añadió la mezcla de transfección gota a gota y se incubaron en CO₂ al 5% a 37 °C. El medio se reemplazó después de 7 h por medio fresco DMEM y las células se incubaron durante 2 días. La expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) se observó en el microscopio de fluorescencia Leica DMI 4000B invertido automatizado (Leica Microsystems GmbH, Alemania) tras 24h de la transfección, indicando la expresión del gen reportero y la eficiencia de la transfección.

3.3.2. Infección celular.

Se sembraron 4×10^5 células 22Rv1/2 mL por condición en una placa de 6 pocillos para obtener una confluencia del 80-90% tras 48 h.

Transcurridas 48 h de la transfección, los lentivirus recombinantes empaquetados se recolectaron del medio de cultivo de las células HEK 293T. El medio fue filtrado con un filtro de jeringa de 0,45 µm y se centrifugó a 100 g durante 3 minutos. Se recuperó el sobrenadante en el que se encontraban los vectores lentivirales y se añadieron 2 mL de medio de infección con polibreno (4 µg/mL) en cada pocillo. El medio de infección se reemplazó por medio de cultivo RPMI suplementado después de 7-8 h de incubación.

Los vectores codifican para un gen de resistencia a puromicina, gracias al que se llevó a cabo la selección de células transformadas. Así pues, 24h tras la infección las células se seleccionaron en medio de cultivo que contenía 1,5 µg/mL de Puromicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Madrid, España) y se mantuvieron esas condiciones para llevar a cabo los experimentos posteriores.

Asimismo, los vectores lentivirales recombinantes codifican para la proteína fluorescente GFP mediante la que se pudo determinar la eficiencia de la transformación con el microscopio de fluorescencia. La expresión de GFP se observó 72 h después de la selección en el microscopio de fluorescencia Leica DMI 4000B invertido automatizado (Leica Microsystems GmbH, Alemania).

4. Ensayo de proliferación celular.

Se sembraron 500 células/100 µL por pocillo en placas de 96 pocillos. Para cada condición se sembraron 12 réplicas en 4 placas, una por cada día en el que se realizó la medición del ensayo (días 0, 1, 3 y 5) y fueron incubadas hasta 5 días a 37°C en CO₂ al 5%. La proliferación celular fue cuantificada por colorimetría mediante el ensayo *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)* (Promega, USA). Se adicionaron 20 µL de reactivo MTS por pocillo y se dejó incubar durante 4 horas a 37°C. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando el lector de microplacas (Synergy HI, BioTek Instruments).

5. Ensayo de formación de colonias.

Se sembraron 1000 células/2 mL por pocillo por triplicado para cada condición en placas de 6 pocillos y fueron incubadas a 37 °C en CO₂ al 5%. Tras 15 días, se retiró el medio y las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con 5 ml de agua MiliQ y se dejaron secar las placas a temperatura ambiente. Las

colonias se tiñeron con 1 mL de sulforodamina B durante 20 minutos, se realizaron cinco lavados de 3-5 mL con ácido acético glacial al 1% y se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente. Finalmente, se homogeneizó el contenido del pocillo con 500 μ L Tris-base 10 mM y se midió la absorbancia utilizando el lector de microplacas (Synergy HI, BioTek Instruments) a 570 m.

6. Softwares empleados y análisis estadístico.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos y su representación gráfica se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 9.3.0, GraphPad Software Inc., USA). Se realizaron análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la posterior prueba de comparaciones múltiples Dunnett, así como el análisis de varianza de dos factores (ANOVA) y el post-test de múltiples comparaciones Sidak. El valor de significancia establecido para todos los análisis fue de $p < 0,05$.

Para llevar a cabo el análisis de los resultados obtenidos mediante la realización de Western Blot se utilizó el software Image Lab (Bio-Rad).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Sobreexpresión de *EIF3H* en las líneas celulares de CaP, incluida 22Rv1.

En primer lugar, con el fin de evaluar la esencialidad contextual determinada por la expresión génica diferencial del gen *EIF3H* en el fenotipo cancerígeno de líneas celulares de próstata respecto al fenotipo sano, se llevó a cabo el análisis de la expresión del gen *EIF3H* en diferentes líneas celulares de próstata.

Los niveles de expresión del gen *EIF3H* fueron evaluados, *in vitro*, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico en la línea celular de fenotipo sano RWPE-1 y en las líneas celulares de CaP 22Rv1, LnCaP y PC3. Para determinar los niveles relativos de expresión de mRNA de *EIF3H* se llevó a cabo una RT-qPCR. Los resultados fueron normalizados con los niveles de expresión del gen *housekeeping B2M*, como control interno (Figura 6A). Asimismo, mediante el análisis Western Blot se analizaron los niveles relativos a nivel proteico de EIF3H. Los resultados fueron normalizados con los niveles de expresión de la proteína *housekeeping GAPDH* como control de carga (Figura 6B).

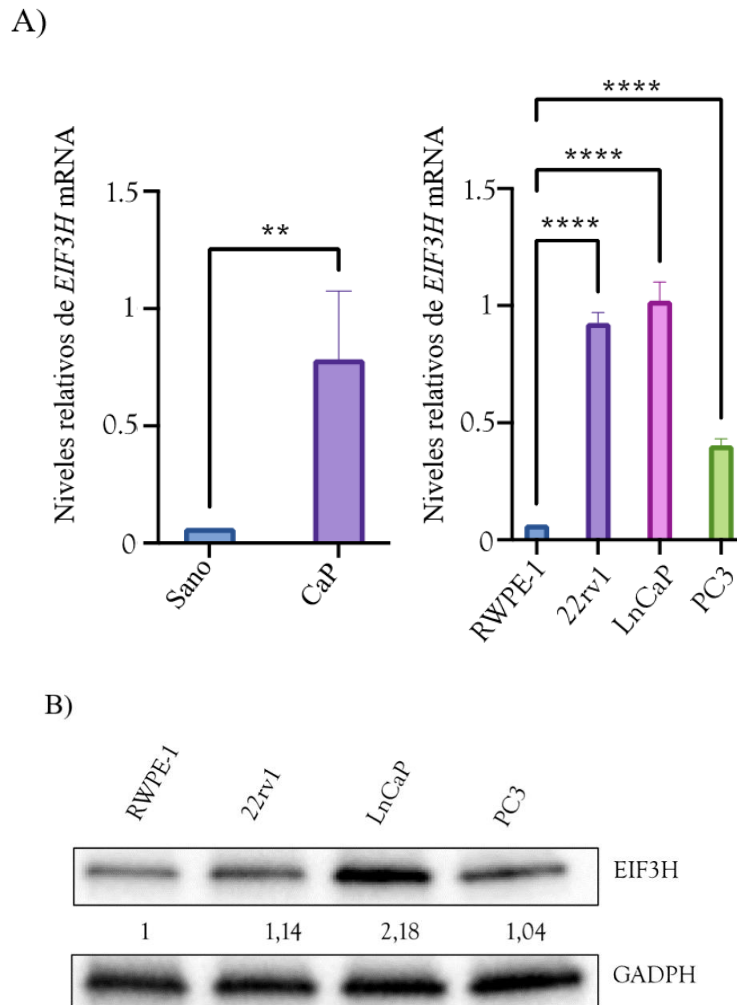


Figura 6. Expresión del gen *EIF3H* en RWPE-1, 22Rv1, LnCaP y PC3. (A) Análisis de la de la expresión de mRNA del gen *EIF3H* detectada mediante RT-qPCR en RWPE-1 y las líneas celulares de CaP 22Rv1, LnCaP y PC3. Los datos aparecen como media \pm SD. Las diferencias estadísticas entre grupos se representaron como (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) usando el análisis de varianza de un factor (ANOVA) ($p < 0,05$) y la prueba de comparaciones múltiples Dunnett. (B) Análisis de la de la expresión proteica del gen *EIF3H* detectada mediante el ensayo Western Blot en RWPE-1 y las líneas celulares de CaP 22Rv1, LnCaP y PC3.

Los niveles relativos de *EIF3H* mRNA son superiores en CaP respecto al fenotipo sano (RWPE-1) (Figura 6), los resultados reflejan que el gen *EIF3H* se encuentra sobreexpresado significativamente (** $p < 0,001$) a nivel de mRNA en las células tumorales de cáncer de próstata. Al realizar el análisis para determinar la diferencia de expresión de *EIF3H* en cada una de las líneas celulares de CaP evaluadas (22rv1, LnCaP y PC3) respecto al fenotipo sano, se observa una sobreexpresión significativa (**** $p < 0,0001$) en todos los grupos respecto a RWPE-1.

Por otro lado, los niveles relativos de la proteína EIF3H también son superiores en todas las líneas celulares de CaP evaluadas (22Rv1, LnCaP y PC3) respecto al fenotipo sano (RWPE-1), observándose una sobreexpresión del 14%, 118% y 4% en 22Rv1, LnCaP y PC3 respectivamente.

Los resultados obtenidos parecen indicar que existe expresión diferencial del gen *EIF3H* al comparar líneas celulares de próstata sana y tumoral en diferentes estadios de la enfermedad, puesto que la línea celular 22Rv1 representa el estadio primario de la neoplasia siendo una línea celular andrógeno-dependiente, PC3 es aislada de un adenocarcinoma de grado IV de cáncer de

próstata que ha metastatizado al hueso y es andrógeno-independiente y LnCaP es representativa de tumores metastásicos en el nodo linfático y andrógeno-dependientes. Sin embargo, existen variaciones de expresión de *EIF3H* entre las líneas celulares representativas de diferentes estadios de CaP. La mayor sobreexpresión se observa al comparar la línea celular LnCap y RWPE-1 tanto a nivel de mRNA como proteico, seguida de 22Rv1 en la que las diferencias de expresión a nivel de mRNA son más aparentes que las que se observan a nivel proteico respecto al fenotipo sano. Por último, las diferencias entre la línea PC3 y RWPE-1 son menores, aunque también significativas.

El gen cuya expresión es objeto de análisis, *EIF3H*, constituye una de las subunidades del factor de inicio de traducción en la síntesis proteica EIF3. Este factor está implicado en la formación del complejo pre-inicial 43S ribosomal, complejo imprescindible para que se dé la traducción (Hinnebusch, 2006). Precisamente en las últimas décadas, el proceso traduccional de la síntesis proteica ha ganado especial atención debido su posible relación con la proliferación descontrolada y el aumento significativo de la síntesis proteica que presentan las células cancerígenas (Robichaud et al., 2019); por lo que desempeñaría un papel clave en el desarrollo molecular de diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de próstata (Savinainen et al., 2006). La traducción es un proceso sofisticado y estrictamente controlado debido a su importancia y trascendencia en la expresión génica. El proceso se divide en tres etapas principales: iniciación, elongación y terminación. A pesar de que es fundamental para la correcta síntesis proteica que todas las etapas transcurran correctamente, la de iniciación está controlada especialmente por un complejo proceso de regulación en el que están implicadas fundamentalmente dos cascadas de señalización (mTOR y MAPK). La alteración de cualquiera de estas cascadas o las proteínas implicadas en ellas supone una desregulación de la iniciación traduccional y, consecuentemente, del proceso traduccional completo (Gamberi et al., 2019). Numerosos estudios señalan a los fallos en la expresión de factores de iniciación, así como a la desregulación de las cascadas de señalización del inicio de la traducción, como los principales responsables detrás de la perturbación de la síntesis proteica en el cáncer; resaltando el papel clave de la etapa de iniciación en la tumorigénesis (Robichaud et al., 2019). Consecuentemente, el inicio de la traducción es diana de algunas de las principales terapias contra el cáncer emergentes (Gamberi et al., 2019).

La acumulación de mutaciones somáticas en el genoma es considerada uno de los factores que impulsa el desarrollo del cáncer de próstata. Una de las principales anomalías a nivel cromosómico presentes en el CaP son las duplicaciones del brazo largo del cromosoma 8 (8q). Diferentes autores han corroborado mediante técnicas como la hibridación genómica comparativa (CGH) la duplicación de esta región tanto en tumorigénesis primaria como avanzada (Bova & Isaacs, 1996; Strohmeyer et al., 2004), incluso evidenciándose en neoplasia intraepitelial prostática (PIN) indicando el origen temprano de la mutación y apoyando la suposición de que representan lesiones premalignas de cáncer de próstata (Zitzelsberger et al., 2001). Por otro lado, también han sido identificadas regiones de amplificación independiente dentro del brazo como 8q23, donde se ha localizado el gen *EIF3H* mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) (Nupponen et al., 1999). Consecuentemente, amplificaciones del gen han sido detectadas en algunos tipos de cáncer, entre ellos el de próstata (Savinainen et al., 2004). El gen se encontró amplificado en hasta un tercio de los cánceres de próstata resistentes a castración, en los que un estudio realizado muestra que un tercio de las 36 muestras empleadas presentaban más de 5 copias y la mitad presentan mínimo 3-4 copias (Savinainen et al., 2004), y hasta un 20% en carcinomas dependientes de andrógenos (Nupponen et al., 1999). En este sentido, una mayor tasa de amplificación del gen *EIF3H* en cáncer de próstata se asocia un estadio avanzado de la enfermedad y un pronóstico desfavorable (Saramäki et al., 2001).

Estudios previos reflejan tanto la amplificación a nivel genómico como la sobreexpresión de *EIF3H* en algunos tipos de cáncer como el de mama o el cáncer hepatocelular (Nupponen et al., 1999; Zhu et al., 2016). La expresión relativa de *EIF3H* en cáncer de próstata también ha sido objeto de estudio y, análisis anteriores, parecen evidenciar su sobreexpresión en cáncer de próstata (Nupponen et al., 1999; Saramäki et al., 2001; Savinainen et al., 2006; L. Zhang et al., 2008). *EIF3H* se encontraría sobreexpresado en cáncer de próstata respecto a tejidos de hiperplasia prostática benigna tanto en carcinomas prostáticos resistentes a castración (Nupponen et al., 1999) como en aquellos que no han sido sometidos a terapia de privación de andrógenos (Savinainen et al., 2004). Los resultados obtenidos en el presente proyecto muestran concordancia con los hallazgos llevados a cabo por L. Zhang et al. (2008) quienes estudiaron la expresión de *EIF3H* en LnCaP, PC3, 22Rv1 y en la línea celular epitelial prostática normal (PrEC), así como en diferentes líneas celulares de cáncer de mama; hallando sobreexpresión proteica de *EIF3H* mediante *immunoblotting* en las líneas celulares de cáncer de próstata y de mama respecto a la línea del epitelio prostático normal, mientras que otras subunidades de *EIF3* no se mostraron sobreexpresadas; indicando que en las líneas celulares cancerígenas se impulsa el aumento del ratio de *EIF3* con respecto al complejo *EIF3*. Adicionalmente, observaron sobreexpresión a nivel de RNA mediante hibridación *in situ* de RNA que posteriormente fue corroborada mediante el uso de modelos *xenografts* de CaP en los que además se apreció sobreexpresión significativa mediante hibridación *in situ* en CWR22R (andrógeno-independiente) respecto a CWR22 (andrógeno-dependiente) sugiriendo que la sobreexpresión de *EIF3H* está asociada con el potencial maligno más agresivo de los cánceres de próstata humanos; sin embargo este último punto muestra cierta contrariedad respecto algunas de los resultados obtenidos en este trabajo en los que las líneas de estadios más agresivos y avanzados no muestran sobreexpresión relativa respecto a las otras. Las tres líneas celulares estudiadas, 22Rv1, LnCaP y PC3, cada una representativa de un estadio diferente y presentando distintas características han mostrado sobreexpresión significativa del gen respecto al fenotipo sano tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico (Figura 6). Esta sobreexpresión estaría parcialmente relacionada con la amplificación del gen a nivel cromosómico, aunque no sería consecuencia directa de este factor, sino que alteraciones en la regulación de este también estarían implicadas (Nupponen et al., 1999). Esta idea explicaría que la expresión de *EIF3H* no se haya mostrado más elevada en tumores andrógeno-independientes frente a aquellos dependientes de andrógenos a pesar de que presentarían mayor tasa de amplificación en 8q (Savinainen et al., 2004) según indicios de los estudios realizados hasta el momento. Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroborarían esta idea ya que si existiese una relación directa entre el número de amplificaciones y la expresión relativa se esperaría que en la línea celular PC3, que es la única andrógeno-independiente utilizada en este proyecto, fuese la que presentase una mayor sobreexpresión de *EIF3H*. Sin embargo, en LnCaP y 22Rv1, ambas andrógeno-dependientes, son en las que mayor sobreexpresión relativa ha sido observada (Figura 6). Finalmente, puede considerarse que *EIF3H* se encuentra sobreexpresado en CaP.

2. Generación de un modelo de silenciamiento para *EIF3H*.

Mediante la modulación de la función de *EIF3H* en modelos celulares se lleva a cabo la determinación de su esencialidad biológica. En aras de analizar el efecto o la relación de la función del gen *EIF3H* en la proliferación y clonogenicidad celular en CaP se produjeron modelos celulares de la línea celular de CaP primario 22Rv1 en los que se inhibió la actividad biológica

del gen diana EIF3H mediante silenciamiento génico con shRNA utilizando vectores de expresión lentivirales recombinantes con la secuencia del RNA de horquilla corta. Se utilizaron 3 vectores de expresión lentiviral codificando diferentes secuencias de shRNA. Dos de los shRNA estaban dirigidos a diferentes secuencias del gen diana EIF3H (ShEIF3H-2 y ShEIF3H-4) mientras que el tercero contenía una secuencia aleatoria no complementaria a ningún gen esencial ni a EIF3H (ShEIF3H-C), utilizado como control. Las características de los vectores lentivirales recombinantes están descritas en Materiales y métodos (Tabla 5) y detalladas en el Anexo I.

2.1. Producción de vectores lentivirales en HEK 293T.

La producción de los lentivirus recombinantes se llevó a cabo en cultivos de líneas celulares HEK 293T. La eficiencia de la transfección se determinó mediante microscopía de fluorescencia 48h tras la cotransfección de las células. La detección de emisión de fluorescencia es consecuencia de la expresión del gen reportero GFP, que codifica para una proteína que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible (Figura 7).

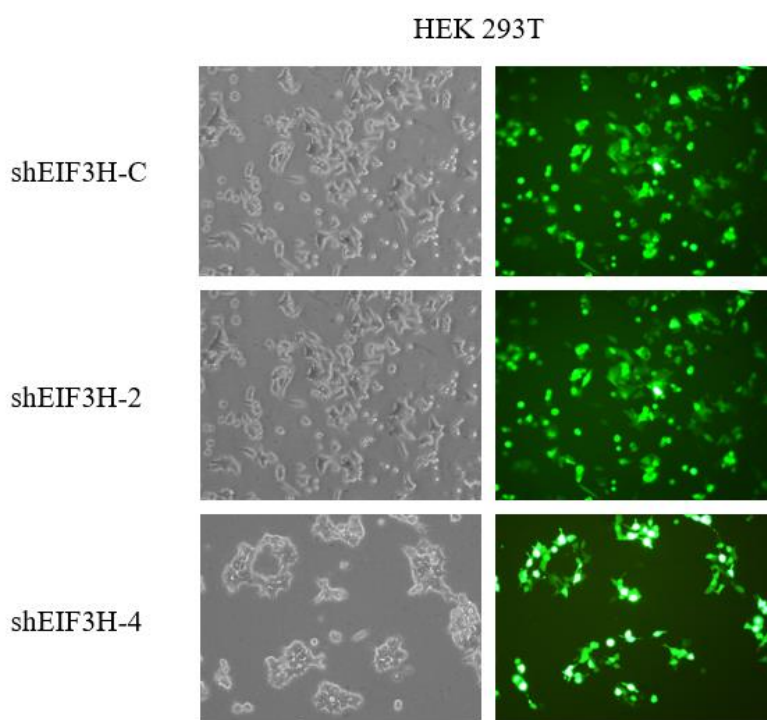


Figura 7. Expresión de GFP en HEK 293T. Imágenes capturadas mediante el microscopio de fluorescencia (x100) en las que se observa la expresión de la proteína fluorescente GFP en las líneas celulares HEK 293T transfectadas con los vectores lentivirales recombinantes ShEIF3H-C,2 y 4.

La detección de fluorescencia en las líneas celulares de HEK 293T indica la expresión del gen reportero GFP codificado por los plásmidos de expresión lentiviral recombinantes. La expresión del gen es posible exclusivamente si se da el empaquetamiento y producción de lentivirus que insertan su información génica en el huésped y, por tanto, las proteínas que codifican son sintetizadas por la maquinaria celular. Consecuentemente, la observación de fluorescencia indica que los vectores lentivirales recombinantes se han producido eficazmente.

2.2. Infección de 22Rv1 por vectores lentivirales recombinantes.

La generación de tres modelos celulares de CaP que incorporasen en su genoma las secuencias codificantes de ShEIF3H-C, 2 y 4 se llevó a cabo mediante la infección de la línea celular 22Rv1 con los vectores lentivirales recombinantes generados previamente.

Tras la infección se llevó a cabo la selección de las células transformadas con puromicina. Asimismo, la eficiencia de la infección se corroboró tras 72 h mediante la observación bajo el microscopio de fluorescencia de las líneas celulares de 22Rv1 (Figura 8).

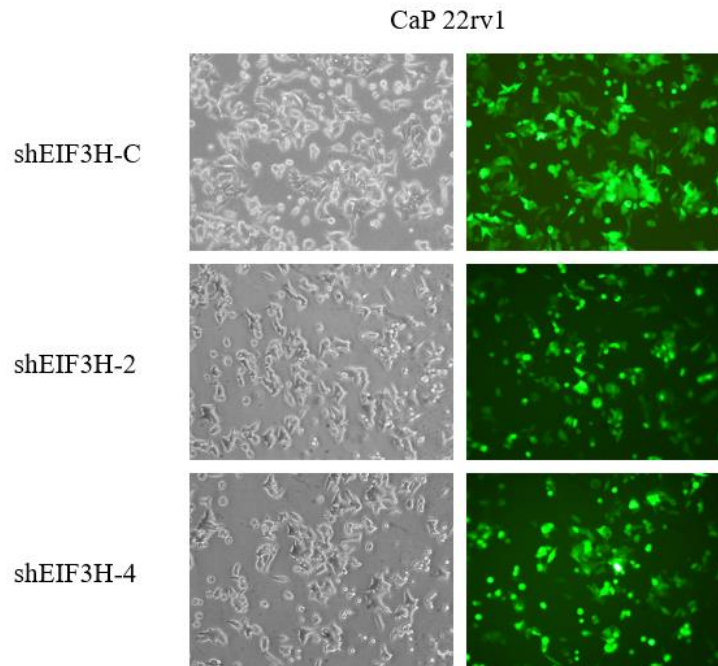


Figura 8. Expresión de GFP en 22Rv1. Imágenes capturadas mediante el microscopio de fluorescencia (x100) en las que se observa la expresión de la proteína fluorescente GFP en los modelos celulares de 22Rv1 transfectados con los vectores lentivirales recombinantes ShEIF3H-C, 2 y 4.

La supervivencia de las células 22Rv1 al medio celular con puromicina 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ así como la fluorescencia observada (Figura 8), indican la expresión del gen de resistencia a puromicina y el gen reportero GFP en 22Rv1. La expresión de estos genes indica la incorporación del inserto contenido en el vector lentiviral al material genético de las células y la síntesis de las proteínas que codifica mediante la maquinaria celular, por lo que la secuencia que codifica para los diferentes shRNAs también habría sido insertada y estarían siendo transcritos.

Por lo tanto, las células han sido transformadas, generando 3 modelos celulares de 22Rv1 que han incorporado en su material genético los insertos recombinantes que contienen la secuencia que codifica para el shRNA-C, 2 o 4.

3. Eficiencia del silenciamiento de Eif3H en 22Rv1.

Los shRNA son moléculas de RNA que adoptan forma de horquilla utilizadas para silenciar la expresión de un gen diana con cuyo transcrito presentan complementariedad. Como se ha

expuesto previamente, en el presente trabajo se utilizan tres shRNAs (shEIF3H-C, shEIF3H-2 y shEIF3H-4) codificados en vectores lentivirales recombinantes, mediante los que se infectó la línea celular 22Rv1, dando lugar a 3 modelos celulares de 22Rv1: 22Rv1 shEIF3H-C, 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4.

La eficiencia de los shRNAs llevando a cabo el silenciamiento de la expresión de EIF3H se determinó mediante el análisis de la expresión del gen diana.

Los niveles de expresión del gen *EIF3H* fueron evaluados, *in vitro*, tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico en las líneas celulares de CaP 22Rv1 shEIF3H-C, shEIF3H-2 y shEIF3H-4 (Figura 9). Para determinar los niveles relativos de expresión de mRNA de EIF3H se llevó a cabo una RT-qPCR. Los resultados fueron normalizados con los niveles de expresión del gen *housekeeping B2M*, como control interno (Figura 9A). Por otro lado, los niveles proteicos de EIF3H se analizaron mediante Western Blot, normalizando los resultados con los niveles de expresión de la proteína *housekeeping* GAPDH como control de carga (Figura 9B).

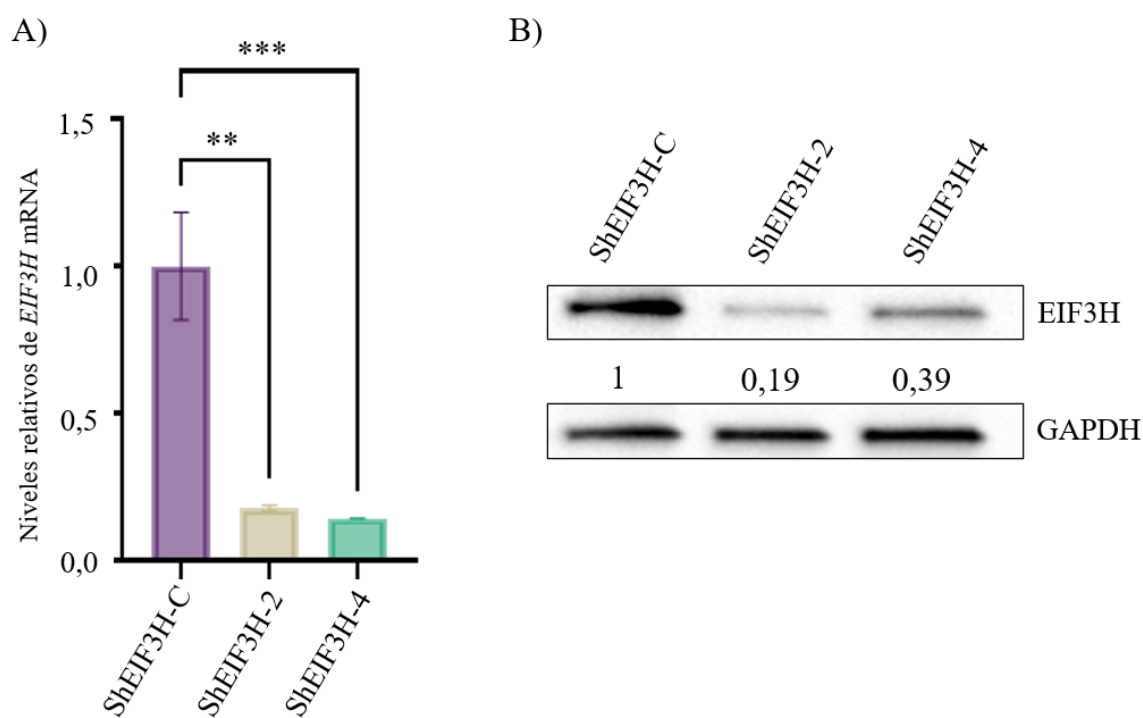


Figura 9. Expresión del gen EIF3H en 22Rv1 shEIF3H-C,2 y 4. (A) Análisis de la de la expresión de mRNA del gen *EIF3H* detectada mediante RT-qPCR en 22Rv1 shEIF3H-C, 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4. Los datos aparecen como media \pm SD. Las diferencias estadísticas entre grupos se representaron como (**p < 0,001, ***p < 0,0005) usando el análisis de varianza con un factor (ANOVA) (p < 0,05) y la prueba de comparaciones múltiples Dunnett. **(B)** Análisis de la de la expresión proteica del gen *EIF3H* detectada mediante el ensayo Western Blot en 22Rv1 shEIF3H-C, 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4.

Los niveles relativos de EIF3H mRNA son inferiores en los modelos celulares 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 EIF3H-4 respecto a la línea celular modelo de inhibición 22Rv1 shEIF3H-C cuyo shRNA no está dirigido al gen *EIF3H*, utilizada como control. Se observó una expresión significativamente inferior en 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4 (**p < 0.01 y ***p < 0.005 respectivamente) respecto a 22Rv1 EIF3H-shC, indicando que el silenciamiento de la expresión de EIF3H a nivel de mRNA ha sido efectivo (Figura 9A). Como se observa en la Figura 9B,

también los niveles relativos de la proteína EIF3H son inferiores en 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4 respecto a 22Rv1 EIF3H-shC.

Los resultados de expresión obtenidos indican, por un lado, que el silenciamiento de EIF3H ha sido efectivo en estos modelos de silenciamiento con una ratio de inhibición a nivel proteico del 81% y 61% en 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4 respectivamente y, por otro lado, que la inhibición de la expresión se debe a la interacción del shRNA dirigido a EIF3H con el RNA mensajero del mismo ya que la incorporación de un shRNA aleatorio no interfiere en la expresión génica de EIF3H como indican los datos obtenidos del modelo de silenciamiento control.

Los resultados obtenidos son los esperados debido a que se ha empleado la tecnología de silenciamiento mediada por shRNAs y abordajes experimentales similares se han llevado a cabo anteriormente para la generación de modelos de silenciamiento mediante el uso de shRNAs de manera efectiva (Chen et al., 2017; Yu et al., 2014; Zhao et al., 2017).

Por tanto, el silenciamiento de la expresión del gen *EIF3H* mediante vectores lentivirales recombinantes que codifican para shEIF3H-2 y shEIF3H-4 se ha producido de manera exitosa en la línea celular 22Rv1, generando dos modelos de silenciamiento del gen *EIF3H*. Asimismo, la construcción shEIF3H-4 presenta aparentemente una mayor efectividad llevando a cabo el silenciamiento de EIF3H tanto a nivel de mRNA como a nivel proteico.

4. Efecto del silenciamiento de EIF3H sobre la proliferación celular.

Partiendo de la inhibición eficiente de la expresión de EIF3H en los modelos de silenciamiento generados, se examinó el efecto biológico de la inhibición de EIF3H en el fenotipo de las células tumorales 22Rv1 con el objetivo de esclarecer su posible papel en el cáncer de próstata.

En primer lugar, su influencia en la proliferación celular fue objeto de análisis mediante el ensayo colorimétrico MTS en el que se analizó y comparó la proliferación celular que presentaban los modelos de silenciamiento y el modelo control en el transcurso de 5 días (Figura 10).

El ensayo se basa en la reducción del compuesto MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) en presencia del reactivo metosulfato de fenazina (PMS) a formazan por enzimas deshidrogenasas presentes en células metabólicamente activas. La cantidad de producto de formazan generado es medido mediante absorbancia a 490 nm y es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. A partir de este análisis, se desarrollaron las curvas de crecimiento para cada cultivo.

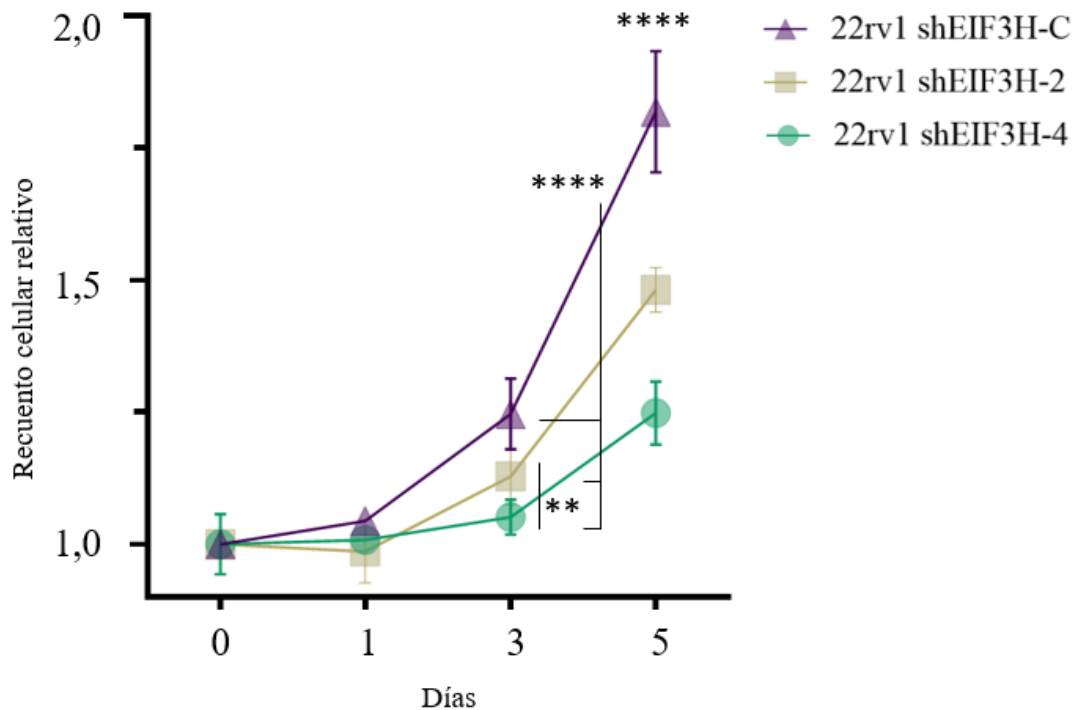


Figura 10. Análisis del efecto del silenciamiento de EIF3H sobre el crecimiento celular. El crecimiento celular fue examinado mediante el ensayo de proliferación celular MTS los días 0, 1, 3 y 5 en 22Rv1 shEIF3H-C, 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4 y se elaboró una curva de crecimiento. Los valores están normalizados respecto al día 0 de cada grupo y los datos aparecen como media \pm SD de los experimentos, cada uno realizado en doce duplicados. Las diferencias estadísticas entre grupos se representaron como (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) haciendo uso del análisis de varianza de dos factores (ANOVA) ($p < 0,5$) y el test de comparaciones múltiples Sidak.

Tal y como se muestra en la Figura 10, la tasa de proliferación celular tras 24 h entre las diferentes líneas celulares modelo no mostraba diferencias significativas, sin embargo, transcurridas 72 h se observa que la tasa de proliferación celular de las líneas 22Rv1 shEIF3H-2 y shEIF3H-4 es significativamente (**** $p < 0,0001$) inferior respecto la línea control 22Rv1 shEIF3H-C en la que la expresión de EIF3H no ha sido parcialmente silenciada. Asimismo, se mantiene esta diferencia en la tasa de proliferación tras 96 h. También se observan diferencias significativas en la curva de crecimiento celular entre 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 EIF3H-4 a las 72 h (** $p = 0,0083$) y 96 h (**** $p < 0,0001$).

5. Efecto del silenciamiento de EIF3H sobre la clonogenicidad.

El efecto del silenciamiento de EIF3H sobre la capacidad de las células tumorales para proliferar y formar colonias también fue evaluado *in vitro*. La evaluación de la clonogenicidad respecto al modelo control se llevó a cabo mediante cuantificación por absorbancia tras la tinción con sulforodamina B de las colonias de cada cultivo crecidas durante 15 días (Figura 11).

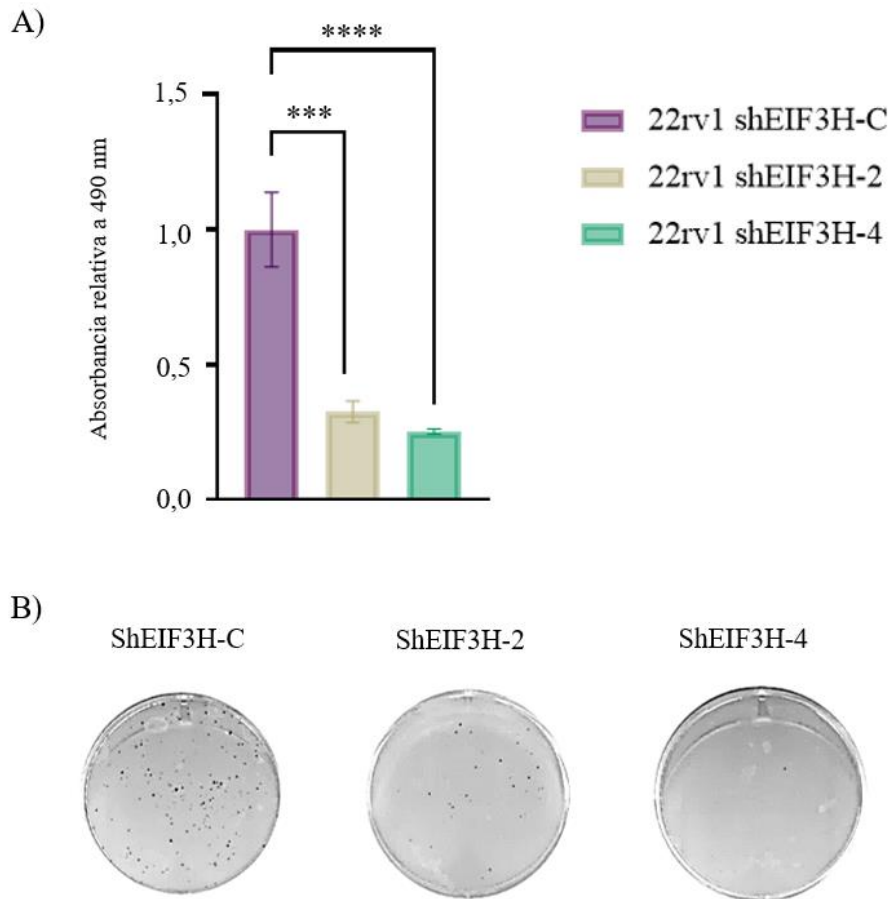


Figura 11. Análisis del efecto del silenciamiento de EIF3H sobre la clonogenicidad. (A) La clonogenicidad fue examinada mediante absorbancia en 22Rv1 shEIF3H-C, 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4. Los datos aparecen como media \pm SD de los experimentos, cada uno realizado en tres duplicados. Las diferencias estadísticas entre grupos se representaron como (***) $p < 0,0005$, (****) $p < 0,0001$ usando el análisis de varianza de un factor (ANOVA) ($p < 0,05$) y la prueba de comparaciones múltiples Dunnett. (B) Las colonias formadas en 22Rv1 shEIF3H-C, 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4 fueron fijadas y teñidas con sulforodamida B de forma que son apreciables visualmente en la placa.

La Figura 11A muestra la absorbancia relativa en los modelos de inhibición 22Rv1 shEIF3H-2 (***) $p < 0,0005$) y 22Rv1 shEIF3H-4 (****) $p < 0,0001$), siendo significativamente inferior respecto al modelo control por lo que el número de colonias formadas se ha reducido debido a la inhibición de EIF3H. Asimismo, gracias a la fijación y tinción de las colonias individuales en los pocillos pueden observarse diferencias en cuanto al número de colonias formadas a simple vista (Figura 11B). Sin embargo, el efecto del silenciamiento de EIF3H en el tamaño de las colonias individuales formadas no pudo ser evaluado debido a desajustes en el ensayo de densidad realizado, por lo que el experimento se encuentra en optimización.

Los resultados discutidos en el subapartado 1 de Resultados y discusión junto con los hallazgos previos, sugieren el potencial de EIF3H como oncogen en CaP. Sin embargo, exclusivamente mediante análisis de expresión diferencial no es posible obtener conclusiones sobre cómo esta subunidad del factor EIF3 podría estar implicada en la tumorigénesis prostática. Por este motivo se requieren estudios funcionales para determinar su papel en la progresión del CaP. En aras de caracterizar EIF3H se ha hecho uso de la herramienta del silenciamiento génico, abordaje ampliamente utilizado para llevar a cabo cribados funcionales (Dwane et al., 2021; Mahmood et al., 2014). Previamente ya se había seguido esta estrategia para determinar la implicación de diversos genes en procesos celulares mediante el uso de RNAs de horquilla corta, moléculas

producidas sintéticamente utilizadas para silenciar la expresión del gen objetivo a través de la interferencia de RNA, mediante la que se generan modelos de silenciamiento en los que se analiza el efecto de la inhibición de la expresión del gen diana (Chen et al., 2017; Zhao et al., 2017).

Llevando a cabo el silenciamiento génico de EIF3H por shRNA mediante un vector lentiviral en diferentes líneas de cáncer colorrectal, G. Yu et al. (2018) observaron una disminución en el crecimiento celular y la formación de colonias, así como la inducción de apoptosis; llegando a la conclusión de que EIF3H desempeña funciones clave en la apoptosis de las células de cáncer colorrectal. Asimismo, en melanoma maligno se observó, *in vitro*, que el silenciamiento de EIF3H suprimía significativamente la proliferación, promovía la apoptosis, inducía la detención del ciclo celular y limitaba la motilidad. Posteriormente, mediante xenógrafos de ratón se evidenció, *in vivo*, los resultados obtenidos pues los modelos de silenciamiento presentaron una disminución en la tasa de crecimiento, el volumen y el peso tumorales. Tras estos hallazgos se consideró EIF3H en un factor crítico en el desarrollo y progresión de melanoma maligno considerándolo una novedosa potencial diana terapéutica para este tipo de cáncer (Zheng et al., 2021). Adicionalmente, también se han documentado evidencias de la relación de EIF3H con la proliferación y viabilidad de células tumorales en cáncer de páncreas (Shan et al., 2022), hepatocelular (Zhu et al., 2016) y de mama (Fan & Guo, 2015) entre otros.

Sin embargo, se consideró necesario abordar en mayor profundidad la función de EIF3H en cáncer de próstata de manera específica. En los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación celular del modelo control 22Rv1 shEIF3H-C y los modelos de silenciamiento 22Rv1 shEIF3H-2 y 22Rv1 shEIF3H-4 (Figura 10) se aprecia una inhibición significativa de la proliferación con el silenciamiento de EIF3H a partir del día 3 de ensayo. En Savinainen et al. (2006), mediante un ensayo de proliferación celular llevado a cabo en las mismas condiciones, pero con un modelo de silenciamiento de EIF3H en las líneas celulares de CaP LnCaP y PC3, se observó una reducción estadísticamente significativa en la curva de crecimiento de LnCaP a partir de los 2 días de ensayo y en PC3 a partir del cuarto. A pesar de que se trate de ensayos realizados con líneas celulares diferentes, todas ellas evidencian que el silenciamiento de EIF3H ha mostrado cierto impacto en la proliferación de líneas celulares en cáncer de próstata. Asimismo, en este mismo estudio mencionado previamente se observó que la línea celular modelo NIH 3T3 en la que se indujo sobreexpresión de EIF3H era capaz de sobrevivir durante un mayor periodo en agar blando. En desarrollo experimental llevado a cabo en proyecto cuyos resultados son objeto de discusión no se analizó la capacidad de supervivencia de las células en agar pero sí fue analizada la clonogenicidad (Figura 11), observándose que el silenciamiento de EIF3H reducía significativamente la capacidad de formar colonias a partir de células aisladas de los modelos de silenciamiento 22Rv1 shEIF3H-2 y 4 respecto al modelo control 22Rv1 shEIF3H-C.

Tanto en el ensayo de proliferación como en el análisis de clonogenicidad realizados (Figuras 10 y 11) se aprecia un mayor impacto del silenciamiento de EIF3H en la curva de crecimiento, presentando menor proliferación, y en el número de colonias formadas en la línea 22Rv1 shEIF3H-4 respecto al otro modelo de silenciamiento 22Rv1 shEIF3H-2. Paralelamente, mediante el uso del shRNA shEIF3H-4 se observa una mayor eficiencia en el silenciamiento génico respecto a 22Rv1 shEIF3H-2, siendo la expresión de EIF3H en el primero menor. Las diferencias observadas en la eficiencia del silenciamiento y, consecuentemente, en la proliferación y clonogenicidad entre ambos modelos de silenciamiento reafirmarían la relación directa entre la expresión de EIF3H y la capacidad de crecimiento celular y formación de colonias.

Por tanto, los resultados obtenidos en el presente proyecto en los que se evidencia que la reducción de los niveles de expresión de EIF3H mediante silenciamiento génico por shRNAs reduce la capacidad de proliferación y clonogenicidad de la línea celular de cáncer de próstata 22Rv1 (Figura 10 y 11), junto con los resultados obtenidos anteriormente por otros autores (Savinainen et al., 2006; L. Zhang et al., 2008) respecto a la implicación de EIF3H en el crecimiento y

viabilidad celular en células cancerígenas; sugieren la implicación de EIF3H en el crecimiento y proliferación celular de las células tumorales prostáticas. Esto pone de manifiesto el papel esencial de la subunidad EIF3H del factor de inicio de traducción EIF3, así como diferentes subunidades de este previamente enumeradas, en el desarrollo y progresión del CaP.

Así pues, haciendo alusión a las características que definen una buena diana terapéutica expuestas en el apartado de la introducción, el estudio llevado a cabo y recogido en el presente documento evidencia que el gen objeto de análisis cumpliría la propiedad primordial: el silenciamiento de EIF3H modifica y tiene función comprobada en la fisiopatología del cáncer de próstata.

V. CONCLUSIÓN Y LÍNEAS FUTURAS

Para llevar a cabo la validación de EIF3H como diana terapéutica ha sido necesario caracterizar su expresión en líneas celulares modelo de CaP y analizar los resultados de la modulación de su expresión.

Con los resultados experimentales obtenidos plasmados en el presente trabajo se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. El gen *EIF3H* está sobreexpresado en las líneas celulares de CaP LnCaP, PC3 y 22Rv1.
2. La inhibición de la expresión del gen *EIF3H* parece afectar, *in vitro*, a la proliferación celular de la línea celular de CaP 22Rv1.
3. La inhibición de la expresión del gen *EIF3H* parece afectar, *in vitro*, a la clonogenicidad celular de la línea celular de CaP 22Rv1.

Por tanto, mediante los análisis de expresión llevados a cabo comparando líneas celulares de fenotipo sano y líneas celulares de cáncer de próstata, así como mediante la generación de modelos de silenciamiento para el gen *EIF3H* en la línea celular 22Rv1 y el análisis del efecto del silenciamiento en la proliferación celular y clonogenicidad en la línea celular de cáncer de próstata primario 22Rv1 para caracterizar su función; se ha validado, *in vitro*, EIF3H como potencial diana biológica en cáncer de próstata.

Así pues, la expresión diferencial que presenta el gen *EIF3H* en las líneas celulares de cáncer de próstata respecto a aquellas que presentan el fenotipo sano indica cierta esencialidad contextual del gen, cuya sobreexpresión estaría relacionada con el relevante papel que desempeña EIF3H en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata; cuyo silenciamiento dirigido provoca la reducción de la capacidad de proliferación y clonogenicidad de las células cancerígenas. Por lo que, la modulación de la actividad de EIF3H se traduciría en efectos modificadores de la enfermedad, impidiendo su progresión. En este sentido, la diana cumpliría los requisitos de “calidad” demandados previamente expuestos.

Sin embargo, tras la validación, *in vitro*, del potencial de EIF3H como diana terapéutica a nivel biológico; sería necesario, en primer lugar, realizar la validación en modelos animales y, finalmente, en humanos. Paralelamente, el potencial farmacológico de la diana también debe ser evaluado. Algunos abordajes implicarían la realización de cribados y modelados estructurales para identificar posibles moléculas moduladoras, estudios de interacción e identificación de sitios activos; mediante tecnologías como, por ejemplo, la resonancia magnética nuclear (RMN).

Como conclusión, aunque hasta ahora se hallan obtenido resultados prometedores respecto al potencial de EIF3H como diana terapéutica, se requiere una exhaustiva investigación en esta dirección en aras de confirmar la efectividad y la posibilidad de modular esta diana en aras de desarrollar una nueva terapia contra el cáncer de próstata.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, C., Hosiner, S., Tichy, B., Aldrian, S., Hajdu, S., & Nürnbergger, S. (2015). Comparison of Lentiviral Packaging Mixes and Producer Cell Lines for RNAi Applications. *Molecular Biotechnology*, *57*(6), 499–505. <https://doi.org/10.1007/S12033-015-9843-8/FIGURES/3>
- Antoranz, A., Ortiz, M., & Pey, J. (2022). ELIMINATOR: essentiality analysis using multisystem networks and integer programming. *BMC Bioinformatics*, *23*(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-022-04855-z>
- Bartha, I., di Iulio, J., Venter, J. C., & Telenti, A. (2018). Human gene essentiality. *Nature Reviews Genetics*, *19*(1), 51–62. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.75>
- Behan, F. M., Iorio, F., Picco, G., Gonçalves, E., Beaver, C. M., Migliardi, G., Santos, R., Rao, Y., Sassi, F., Pinnelli, M., Ansari, R., Harper, S., Jackson, D. A., McRae, R., Pooley, R., Wilkinson, P., van der Meer, D., Dow, D., Buser-Doepner, C., ... Garnett, M. J. (2019). Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR–Cas9 screens. *Nature*, *568*(7753), 511–516. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1103-9>
- Berish, R. B., Ali, A. N., Telmer, P. G., Ronald, J. A., & Leong, H. S. (2018). Translational models of prostate cancer bone metastasis. *Nature Reviews. Urology*, *15*(7), 403–421. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0020-2>
- Boorjian, S. A., Karnes, R. J., Rangel, L. J., Bergstralh, E. J., & Blute, M. L. (2008). Mayo Clinic validation of the D'amico risk group classification for predicting survival following radical prostatectomy. *The Journal of Urology*, *179*(4), 1354–1360; discussion 1360-1. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.11.061>
- Bova, G. S., & Isaacs, W. B. (1996). Review of allelic loss and gain in prostate cancer. *World Journal of Urology*, *14*(5). <https://doi.org/10.1007/BF00184607>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brown, K. K., Hann, M. M., Lakdawala, A. S., Santos, R., Thomas, P. J., & Todd, K. (2018). Approaches to target tractability assessment—a practical perspective. In *MedChemComm* (Vol. 9, Issue 4, pp. 606–613). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7md00633k>
- Cancer Genome Atlas Research Network. (2015). The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*, *163*(4), 1011–1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.025>
- Carver, B. S., Tran, J., Chen, Z., Carracedo-Perez, A., Alimonti, A., Nardella, C., Gopalan, A., Scardino, P. T., Cordon-Cardo, C., Gerald, W., & Pandolfi, P. P. (2009). ETS rearrangements and prostate cancer initiation. *Nature*, *457*(7231), E1; discussion E2-3. <https://doi.org/10.1038/nature07738>
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., ... McArthur, G. A. (2011). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New*

England Journal of Medicine, 364(26), 2507–2516.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>

- Chen, P., Gu, W. L., Gong, M. Z., Wang, J., & Li, D. Q. (2017). ShRNA-mediated silencing of hTERT suppresses proliferation and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. *Cancer Gene Therapy*, 24(8), 325–332. <https://doi.org/10.1038/cgt.2017.22>
- Clarke, N. W., Hart, C. A., & Brown, M. D. (2009). Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 11(1), 57–67. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.29>
- Cowley, G. S., Weir, B. A., Vazquez, F., Tamayo, P., Scott, J. A., Rusin, S., East-Seletsky, A., Ali, L. D., Gerath, W. F., Pantel, S. E., Lizotte, P. H., Jiang, G., Hsiao, J., Tsherniak, A., Dwinell, E., Aoyama, S., Okamoto, M., Harrington, W., Gelfand, E., ... Hahn, W. C. (2014). Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Scientific Data*, 1, 140035. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.35>
- Crawford, E. D. (2003). Epidemiology of prostate cancer. *Urology*, 62(6 Suppl 1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2003.10.013>
- Cunha, G. R., Cooke, P. S., & Kurita, T. (2004). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Archives of Histology and Cytology*, 67(5), 417–434. <https://doi.org/10.1679/aohc.67.417>
- De Luca, S., Verdoliva, V., Saviano, M., Fattorusso, R., & Diana, D. (2020). SPR and NMR characterization of the molecular interaction between A9 peptide and a model system of HER2 receptor: A fragment approach for selecting peptide structures specific for their target. *Journal of Peptide Science*, 26(2). <https://doi.org/10.1002/psc.3231>
- Dwane, L., Behan, F. M., Gonçalves, E., Lightfoot, H., Yang, W., Van Der Meer, D., Shepherd, R., Pignatelli, M., Iorio, F., & Garnett, M. J. (2021). Project Score database: A resource for investigating cancer cell dependencies and prioritizing therapeutic targets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1365–D1372. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa882>
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., Humphrey, P. A., & Grading Committee. (2016). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American Journal of Surgical Pathology*, 40(2), 244–252. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
- Fan, Y., & Guo, Y. (2015). Knockdown of eIF3D inhibits breast cancer cell proliferation and invasion through suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway. In *Int J Clin Exp Pathol* (Vol. 8, Issue 9). www.ijcep.com/
- Fernald, G. H., Capriotti, E., Daneshjou, R., Karczewski, K. J., & Altman, R. B. (2011). Bioinformatics challenges for personalized medicine. *Bioinformatics*, 27(13), 1741–1748. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr295>
- Franz, M.-C., Anderle, P., Bürzle, M., Suzuki, Y., Freeman, M. R., Hediger, M. A., & Kovacs, G. (2013). Zinc transporters in prostate cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 735–741. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.11.007>
- Fütterer, J. J., Briganti, A., De Visschere, P., Emberton, M., Giannarini, G., Kirkham, A., Taneja, S. S., Thoeny, H., Villeirs, G., & Villers, A. (2015). Can Clinically Significant Prostate Cancer Be Detected with Multiparametric Magnetic Resonance Imaging? A Systematic

- Review of the Literature. *European Urology*, 68(6), 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.01.013>
- Gamberi, C., Koul, H. K., Hernández, G., Ramírez, J. L., Pedroza-Torres, A., Herrera, L. A., & Jiménez-Ríos, M. A. (2019). *The Secret Life of Translation Initiation in Prostate Cancer*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00014>
- Gashaw, I., Ellinghaus, P., Sommer, A., & Asadullah, K. (2011). What makes a good drug target? In *Drug Discovery Today* (Vol. 16, Issues 23–24, pp. 1037–1043). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.09.007>
- Ghandi, M., Huang, F. W., Jané-Valbuena, J., Kryukov, G. V., Lo, C. C., McDonald, E. R., Barretina, J., Gelfand, E. T., Bielski, C. M., Li, H., Hu, K., Andreev-Drakhlin, A. Y., Kim, J., Hess, J. M., Haas, B. J., Aguet, F., Weir, B. A., Rothberg, M. V., Paolella, B. R., ... Sellers, W. R. (2019). Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature*, 569(7757), 503–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1186-3>
- Gilany, K., Minai-Tehrani, A., Savadi-Shiraz, E., Rezaadoost, H., & Lakpour, N. (2015). Exploring the Human Seminal Plasma Proteome: An Unexplored Gold Mine of Biomarker for Male Infertility and Male Reproduction Disorder. In *J Reprod Infertil* (Vol. 16, Issue 2). <http://expasy.org/>
- Halgren, T. (2007). New method for fast and accurate binding-site identification and analysis. *Chemical Biology & Drug Design*, 69(2), 146–148. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2007.00483.x>
- Hinnebusch, A. G. (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(10), 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.08.005>
- Hopkins, A. L., & Groom, C. R. (2002). The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9), 727–730. <https://doi.org/10.1038/nrd892>
- Hu, R., Dunn, T. A., Wei, S., Isharwal, S., Veltri, R. W., Humphreys, E., Han, M., Partin, A. W., Vessella, R. L., Isaacs, W. B., Bova, G. S., & Luo, J. (2009). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 69(1), 16–22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2764>
- Huang, H., Wang, W., Lin, T., Zhang, Q., Zhao, X., Lian, H., & Guo, H. (2016). Comparison of the complications of traditional 12 cores transrectal prostate biopsy with image fusion guided transperineal prostate biopsy. *BMC Urology*, 16(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12894-016-0185-z>
- Humphrey, P. A. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 17(3), 292–306. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800054>
- Incorvati, J. A., Shah, S., Mu, Y., & Lu, J. (2013). Targeted therapy for HER2 positive breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-38>
- Koochekpour, S. (2010). Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 12(5), 639–657. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.89>
- Kumar, V. L., & Ma~gder, P. K. (1995). Prostate Gland: Structure, Functions and Regulation. In *International Urology and Nephrology* (Vol. 27, Issue 3).

- Lamb, A. D., Massie, C. E., & Neal, D. E. (2014). The transcriptional programme of the androgen receptor (AR) in prostate cancer. *BJU International*, *113*(3), 358–366. <https://doi.org/10.1111/bju.12415>
- Le Guilloux, V., Schmidtke, P., & Tuffery, P. (2009). Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics*, *10*, 168. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-168>
- Lee, A. S. Y., Kranzusch, P. J., & Cate, J. H. D. (2015). eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature*, *522*(7554), 111–114. <https://doi.org/10.1038/nature14267>
- Li, X., Li, W., Zeng, M., Zheng, R., & Li, M. (2020). Network-based methods for predicting essential genes or proteins: a survey. *Briefings in Bioinformatics*, *21*(2), 566–583. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz017>
- Lilja, H., Ulmert, D., & Vickers, A. J. (2008). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nature Reviews Cancer*, *8*(4), 268–278. <https://doi.org/10.1038/nrc2351>
- Loeb, S., Vellekoop, A., Ahmed, H. U., Catto, J., Emberton, M., Nam, R., Rosario, D. J., Scattoni, V., & Lotan, Y. (2013). Systematic review of complications of prostate biopsy. *European Urology*, *64*(6), 876–892. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.05.049>
- Lowrance, W. T., Murad, M. H., Oh, W. K., Jarrard, D. F., Resnick, M. J., & Cookson, M. S. (2018). Castration-Resistant Prostate Cancer: AUA Guideline Amendment 2018. *The Journal of Urology*, *200*(6), 1264–1272. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2018.07.090>
- Mahmood, S. F., Gruel, N., Chapeaublanc, E., Lescure, A., Jones, T., Rey, F., Vincent-Salomon, A., Raynal, V., Pierron, G., Perez, F., Camonis, J., Nery, E. Del, Delattre, O., Radvanyi, F., & Bernard-Pierrot, I. (2014). A siRNA screen identifies RAD21, EIF3H, CHRAC1 and TANC2 as driver genes within the 8q23, 8q24.3 and 17q23 amplicons in breast cancer with effects on cell growth, survival and transformation. *Carcinogenesis*, *35*(3), 670–682. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt351>
- Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2007). Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *The EMBO Journal*, *26*(14), 3373–3383. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601765>
- Mateo, J., Seed, G., Bertan, C., Rescigno, P., Dolling, D., Figueiredo, I., Miranda, S., Nava Rodrigues, D., Gurel, B., Clarke, M., Atkin, M., Chandler, R., Messina, C., Sumanasuriya, S., Bianchini, D., Barrero, M., Petermolo, A., Zafeiriou, Z., Fontes, M., ... de Bono, J. S. (2020). Genomics of lethal prostate cancer at diagnosis and castration resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(4), 1743–1751. <https://doi.org/10.1172/JCI132031>
- McNeal, J. E. (1981). Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology*, *17*(Suppl 3), 11–16.
- Mcneal, J. E. (1981). The Zonal Anatomy of the. In *The Prostate* (Vol. 2).
- Medrano, A., Fernández-Novell, J. M., Ramió, L., Alvarez, J., Goldberg, E., Montserrat Rivera, M., Guinovart, J. J., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. E. (2006). Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, *73*(3), 369–378. <https://doi.org/10.1002/mrd.20414>

- Merten, O. W., Hebben, M., & Bovolenta, C. (2016). Production of lentiviral vectors. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 3, 16017. <https://doi.org/10.1038/MTM.2016.17>
- Mills, I. G. (2014). Maintaining and reprogramming genomic androgen receptor activity in prostate cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 14, Issue 3, pp. 187–198). <https://doi.org/10.1038/nrc3678>
- Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., Cumberbatch, M. G., De Santis, M., Fossati, N., Gross, T., Henry, A. M., Joniau, S., Lam, T. B., Mason, M. D., Matveev, V. B., Moldovan, P. C., van den Bergh, R. C. N., Van den Broeck, T., van der Poel, H. G., van der Kwast, T. H., Rouvière, O., ... Cornford, P. (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European Urology*, 71(4), 618–629. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.003>
- Mottet, N., Van Den Bergh, R. C. N., Briers, E., Van Den Broeck, T., Cumberbatch, M. G., De Santis, M., Fanti, S., Fossati, N., Gandaglia, G., Gillessen, S., Grivas, N., Grummet, J., Henry, A. M., Van Der Kwast, T. H., Lam, T. B., Lardas, M., Liew, M., Mason, M. D., Moris, L., ... Catto, J. (2020). *EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent*. <https://doi.org/10.1016/j>
- Niu, Y., Altuwajjri, S., Yeh, S., Lai, K.-P., Yu, S., Chuang, K.-H., Huang, S.-P., Lardy, H., & Chang, C. (2008). Targeting the stromal androgen receptor in primary prostate tumors at earlier stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12188–12193. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804701105>
- Nupponen, N. N., Isola, J., & Visakorpi, T. (2000). Mapping the amplification of EIF3S3 in breast and prostate cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 28(2), 203–210.
- Nupponen, N. N., Porkka, K., Kakkola, L., Tanner, M., Persson, K., Borg, Å., Isola, J., & Visakorpi, T. (1999). Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *American Journal of Pathology*, 154(6), 1777–1783. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65433-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65433-8)
- Pick, E., Hofmann, K., & Glickman, M. H. (2009). PCI Complexes: Beyond the Proteasome, CSN, and eIF3 Troika. *Molecular Cell*, 35(3), 260–264. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.009>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillessen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Robichaud, N., Sonenberg, N., Ruggero, D., & Schneider, R. J. (2019). Translational control in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032896>
- Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y.-M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J.-M., Montgomery, B., Taplin, M.-E., Pritchard, C. C., Attard, G., Beltran, H., Abida, W., Bradley, R. K., Vinson, J., Cao, X., Vats, P., Kunju, L. P., Hussain, M., Feng, F. Y., ... Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5), 1215–1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001>

- Sammon, J. D., Abdollah, F., D'Amico, A., Gettman, M., Haese, A., Suardi, N., Vickers, A., & Trinh, Q.-D. (2015). Predicting Life Expectancy in Men Diagnosed with Prostate Cancer. *European Urology*, *68*(5), 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.03.020>
- Saramäki, O., Willi, N., Bratt, O., Gasser, T. C., Koivisto, P., Nupponen, N. N., Bubendorf, L., & Visakorpi, T. (2001). Amplification of EIF3S3 gene is associated with advanced stage in prostate cancer. *American Journal of Pathology*, *159*(6), 2089–2094. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63060-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63060-X)
- Sathianathen, N. J., Konety, B. R., Crook, J., Saad, F., & Lawrentschuk, N. (2018). Landmarks in prostate cancer. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 15, Issue 10, pp. 627–642). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0060-7>
- Savinainen, K. J., Helenius, M. A., Lehtonen, H. J., & Visakorpi, T. (2006). Overexpression of EIF3S3 promotes cancer cell growth. *The Prostate*, *66*(11), 1144–1150. <https://doi.org/10.1002/pros.20452>
- Savinainen, K. J., Linja, M. J., Tammela, T., Chang, G., Brinkmann, A. O., & Visakorpi, T. (2004). Expression and copy number analysis of TRPS1, EIF3S3 and MYC genes in breast and prostate cancer. *British Journal of Cancer*, *90*, 1041–1046. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601648>
- Shafi, A. A., Yen, A. E., & Weigel, N. L. (2013). Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 140, Issue 3, pp. 223–238). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003>
- Shan, Y., Kong, W., Zhu, A., Li, J., Jin, H., & Zhu, W. (2022). Knockdown of EIF3H inhibits the development and progression of pancreatic cancer by regulating cell proliferation and apoptosis in vitro. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, *67*(4), 83–90. <https://doi.org/10.14715/CMB/2021.67.4.9>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Skouteris, V. M., Crawford, E. D., Mouraviev, V., Arangua, P., Metsinis, M. P., Skouteris, M., Zacharopoulos, G., & Stone, N. N. (2018a). Transrectal Ultrasound-guided Versus Transperineal Mapping Prostate Biopsy: Complication Comparison. *Reviews in Urology*, *20*(1), 19–25. <https://doi.org/10.3909/riu0785>
- Skouteris, V. M., Crawford, E. D., Mouraviev, V., Arangua, P., Metsinis, M. P., Skouteris, M., Zacharopoulos, G., & Stone, N. N. (2018b). Transrectal Ultrasound-guided Versus Transperineal Mapping Prostate Biopsy: Complication Comparison. *Reviews in Urology*, *20*(1), 19–25. <https://doi.org/10.3909/riu0785>
- Sramkoski, R. M., Pretlow, T. G., Giaconia, J. M., Pretlow, T. P., Schwartz, S., Sy, M.-S., Marengo, S. R., Rhim, J. S., Zhang, D., & Jacobberger, J. W. (1999). A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *35*(7), 403–409. <https://doi.org/10.1007/s11626-999-0115-4>
- Stopsack, K. H., Nandakumar, S., Wibmer, A. G., Haywood, S., Weg, E. S., Barnett, E. S., Kim, C. J., Carbone, E. A., Vasselmann, S. E., Nguyen, B., Hullings, M. A., Scher, H. I., Morris, M. J., Solit, D. B., Schultz, N., Kantoff, P. W., & Abida, W. (2020). Oncogenic Genomic Alterations, Clinical Phenotypes, and Outcomes in Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *26*(13), 3230–3238. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0168>

- Strohmeier, D. M., Berger, A. P., Moore, D. H., Bartsch, G., Klocker, H., Carroll, P. R., Loening, S. A., & Jensen, R. H. (2004). Genetic aberrations in prostate carcinoma detected by comparative genomic hybridization and microsatellite analysis: Association with progression and angiogenesis. *The Prostate*, *59*(1), 43–58. <https://doi.org/10.1002/pros.20028>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). 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. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., Oudard, S., Théodore, C., James, N. D., Turesson, I., Rosenthal, M. A., Eisenberger, M. A., & TAX 327 Investigators. (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, *351*(15), 1502–1512. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040720>
- Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B. S., Arora, V. K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., Antipin, Y., Mitsiades, N., Landers, T., Dolgalev, I., Major, J. E., Wilson, M., Socci, N. D., Lash, A. E., Heguy, A., ... Gerald, W. L. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, *18*(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.026>
- Tena-Sempere, M. (2013). *Ghrelin, the Gonadal Axis and the Onset of Puberty* (pp. 69–82). <https://doi.org/10.1159/000346055>
- Timms, B. G. (2008). Prostate development: a historical perspective. *Differentiation*, *76*(6), 565–577. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00278.x>
- Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, P. G., Weir, B. A., Kryukov, G., Cowley, G. S., Gill, S., Harrington, W. F., Pantel, S., Krill-Burger, J. M., Meyers, R. M., Ali, L., Goodale, A., Lee, Y., Jiang, G., Hsiao, J., Gerath, W. F. J., Howell, S., Merkel, E., ... Hahn, W. C. (2017a). Defining a Cancer Dependency Map. *Cell*, *170*(3), 564–576.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.010>
- Tsherniak, A., Vazquez, F., Montgomery, P. G., Weir, B. A., Kryukov, G., Cowley, G. S., Gill, S., Harrington, W. F., Pantel, S., Krill-Burger, J. M., Meyers, R. M., Ali, L., Goodale, A., Lee, Y., Jiang, G., Hsiao, J., Gerath, W. F. J., Howell, S., Merkel, E., ... Hahn, W. C. (2017b). Defining a Cancer Dependency Map. *Cell*, *170*(3), 564–576.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.010>
- Verze, P., Cai, T., & Lorenzetti, S. (2016). The role of the prostate in male fertility, health and disease. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 13, Issue 7, pp. 379–386). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>
- Yu, G., Liao, J., Wu, J., Ding, J., & Zhang, L. (2018). The proliferation of colorectal cancer cells is suppressed by silencing of EIF3H. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *82*(10), 1694–1701. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1484271>
- Yu, X., Zheng, B., & Chai, R. (2014). Lentivirus-mediated knockdown of eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D inhibits proliferation of HCT116 colon cancer cells. *Bioscience Reports*, *34*(6), 823–830. <https://doi.org/10.1042/BSR20140078>
- Zarrabi, K., Paroya, A., & Wu, S. (2019). Emerging therapeutic agents for genitourinary cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0780-z>

- Zhang, L., Smit-McBride, Z., Pan, X., Rheinhardt, J., & Hershey, J. W. B. (2008). An oncogenic role for the phosphorylated h-subunit of human translation initiation factor eIF3. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 24047–24060. <https://doi.org/10.1074/JBC.M800956200>
- Zhang, R., & Lin, Y. (2009). DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D455–D458. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn858>
- Zhao, Z. W., Fan, X. X., Song, J. J., Xu, M., Chen, M. J., Tu, J. F., Wu, F. Z., Zhang, D. K., Liu, L., Chen, L., Ying, X. H., & Ji, J. S. (2017). ShRNA knock-down of CXCR7 inhibits tumour invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(9), 1989–1999. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13119>
- Zheng, W., Li, Y., Su, Z., Zhang, J., Shi, F., & Liang, W. (2021). EIF3H knockdown inhibits malignant melanoma through regulating cell proliferation, apoptosis and cell cycle. *Experimental Cell Research*, 402(1). <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2021.112488>
- Zhu, Q., Qiao, G.-L., Zeng, X.-C., Li, Y., Yan, J.-J., Duan, R., & Du, Z.-Y. (2016). Elevated expression of eukaryotic translation initiation factor 3H is associated with proliferation, invasion and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(31), 49888–49901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10222>
- Zitzelsberger, H., Engert, D., Walch, A., Kulka, U., Aubele, M., Höfler, H., Bauchinger, M., & Werner, M. (2001). Chromosomal changes during development and progression of prostate adenocarcinomas. *British Journal of Cancer*, 84(2), 202–208. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1533>

