

Universidade de São Paulo – USP
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP
Pós-Graduação em Genética

Luiz Paulo Chaves de Souza

A expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal SNAI1 e o ZEB1 resulta em alterações transcricionais para promover progressão tumoral e evasão imune no câncer de próstata

Ribeirão Preto
2023

Luiz Paulo Chaves de Souza

A expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal SNAI1 e o ZEB1 resulta em alterações transcricionais para promover progressão tumoral e evasão imune no câncer de próstata

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Área de concentração: Ciências Biológicas I (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

Ribeirão Preto
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Souza, Luiz Paulo Chaves de

A expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal SNAI1 e o ZEB1 resulta em alterações transcricionais para promover progressão tumoral e evasão imune no câncer de próstata.

Ribeirão Preto, 2023

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) – Área de concentração: Ciências Biológicas (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

1. Transcriptômica; 2. Exclusão Imunológica; 3. Microambiente Tumoral; 4. Imunoterapia.

Apoio financeiro:

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do projeto concedido ao aluno com processo número 2020/12816-9 e do projeto regular 2019/22912-8 concedido ao orientador. O projeto também contou com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Ontario Institute for Cancer Research (OICR).

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Luiz Paulo Chaves de Souza

A expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal SNAI1 e o ZEB1 resulta em alterações transcricionais para promover progressão tumoral e evasão imune no câncer de próstata.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Área de concentração: Ciências Biológicas I (Genética)

Orientador: Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

Parecer: _____, ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico aos meus antepassados e à todas as pessoas negras que,
injustamente, não puderam chegar aonde cheguei, mas que,
corajosamente, sonharam com a minha existência

Dedico às minhas avós, às minhas tias e aos meus pais,
que me nutriram com um amor imensurável

Dedico à Deus e à Exu, que estiveram
à frente em todos os momentos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire, que tão generosamente me aceitou em seu grupo de pesquisa e se dispôs a me orientar, a compartilhar o seu conhecimento e a abrir os meus olhos para a ciência. Agradeço por confiar a mim o desenvolvimento desse projeto, por me estimular a continuar admirando o método científico e, acima de tudo, por ser um modelo tão humano do que é ser um educador, mesmo fora das salas de aula. Agradeço pela prontidão em nos atender, por me apresentar ao cachorrinho Mano Brown e pelo apoio que me deu em buscar na minha vocação profissional.

Agradeço a Dr^a Camila Morais Melo, que foi uma fonte de afeto num ambiente que pode ser tão hostil. Agradeço por me lembrar que não estou sozinho, por ouvir minhas infundáveis confissões e por me confiar a honestidade dos seus desabafos. Agradeço pelos muitos vídeos da Cookie, da Panqueca e do Hero, pelas orientações de como cuidar do Mano e por compartilhar comigo os comentários sobre o Não Inviabilize. Acima de tudo, contudo, agradeço pela orientação científica sempre tão generosa, por estar sempre por perto nos momentos mais difíceis, por nos lembrar dos nossos esforços nos momentos de quase insanidade e por ser um exemplo tão claro e luminoso do que é perseverança, resiliência e bondade.

Agradeço aos colegas do meu grupo de pesquisa por todo o conhecimento compartilhado, pelo trabalho que realizamos juntos, pelas ligações nos momentos mais aleatório e pelo apoio nos momentos mais difíceis. Agradeço aos pacientes que concordaram que ceder parte dos seus medos para a ciência e que confiaram suas esperanças na nossa honestidade e no nosso trabalho.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe, Cristiane dos Santos Chaves, ao meu pai, Paulo Luiz de Souza e ao meu irmão, Luiz Henrique Chaves de Souza, as minhas Avós Benedita de Souza e Josenice dos Santos Galvão e as minhas Tias Leonice, Cleonice e Marilice que me apoiaram mesmo sem que a minha trajetória fizesse sentido para eles. Agradeço pela confiança irrestrita e pelo amor incondicional que me fizeram chegar até aqui e que criaram raízes que permanecerão para além dessa breve existência.

Agradeço aos meus amigos, Thais Barros Pereira da Silva, Amanda Rodrigues Nogueira, Victor Costa, Christian Cavalini Benedicto e Gabriel Oliveira Jasinevicius por

me lembrarem da vida infinita que existe além dos nossos infindáveis deveres. Agradeço pelas conversas, pelos momentos e comidinhas compartilhados, mas acima de tudo pela companhia e pelo tempo que multiplicaram para me fazer caber em suas vidas.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha formação, em especial a professora Ana, que me apresentou às palavras, a professora Iria, que me olhou com esperança, o Professor Anderson e o professor Wilson, que me mostraram que o mundo era enorme, e, finalmente, a Professora Célia que se tornou uma grande amiga.

Agradeço o Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial a Susie Nalon e o Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder, pela assistência e por fornecer a estrutura necessária para o desenvolvimento desse projeto. Agradeço aos professores e aos colegas por perseverarem em seus trabalhos mesmo num momento tão delicado e difícil do nosso país, da nossa ciência e da nossa saúde. Agradeço os técnicos que garantem o funcionamento de uma estrutura tão colossal. Agradeço os antepassados que ocuparam as terras onde hoje se faz ciência por sonharem com um futuro em que a minha existência é possível. Agradeço a Universidade de São Paulo por continuar acreditando na ciência e no futuro dos jovens que forma.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (FAEPA) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo arcabouço científico e financeiro que permitiram o desenvolvimento desse projeto. Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela crença nesse projeto e bolsa de estudos que permitiu a minha manutenção tão longe de casa. Agradeço a cidade de Ribeirão Preto pela experiência e pelo crescimento.

Se quer ir rápido, vá sozinho
Se quer ir longe, vá acompanhado
(Proverbio africano)

RESUMO

SOUZA, Luiz Paulo Chaves de. **A expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal SNAI1 e o ZEB1 resulta em alterações transcricionais para promover progressão tumoral e evasão imune no câncer de próstata.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências, Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O Câncer de Próstata (PCa) é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens. O curso da doença costuma ser positivo, mas uma parcela dos pacientes desenvolve a forma mais agressiva da doença, com uma taxa de recorrência que pode chegar a 30% dos pacientes tratados com prostatectomia radical. A irresponsividade a terapia de deprivação androgênica e a quimioterapia é uma causa significativa de morbidade e mortalidade entre esses pacientes. Apesar da efetividade da imunoterapia em outros tipos tumorais, a resposta dessa abordagem em pacientes com a forma avançada do PCa foi aquém do esperado, com taxas de resposta de apenas 15%. Atualmente o mecanismo de evasão imune desse tipo tumoral ainda não é bem compreendido e não existem biomarcadores definitivos para estratificar pacientes que desenvolverão a forma agressiva da doença ou que responderão a imunoterapia. O PCa tem a capacidade de reativar um programa embriogênico chamado de Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT), capaz de contribuir com o aumento da invasão, da migração, da resistência terapêutica e da metástase. Esse processo já foi previamente associado a evasão imune em outros tipos de tumores sólidos, mas no PCa a relação entre esses dois processos ainda não foi estudada. Nesse projeto nós investigamos o impacto da expressão do SNAI1 e do ZEB1, conhecidos marcadores de EMT, no perfil transcricional do PCa, em especial em genes e vias relacionados a resposta imune. Uma coorte de 51 pacientes de PCa submetidos a prostatectomia radical foi utilizada. As amostras do tumor fixadas em formalina e embebidas em parafina foram coletadas retrospectivamente. As regiões de interesse foram marcadas e cortes adjacentes foram enviados para o Ontario Institute of Cancer Research para extração de RNA e análise transcriptômica utilizando os painéis NanoString BC360, PanCancer Pathway, Immune profiling e Human V3 miRNA. As análises de expressão diferencial e enriquecimento de vias comparando os pacientes com maior expressão dos genes de interesse foi feita utilizando o painel Immune Profiling. A validação foi feita utilizando o painel PanCancer Pathway e uma coorte pública do TCGA. Os miRNAs enriquecidos e seus alvos foram investigados. A coorte do TCGA também foi utilizada para fazer a análise de citometria digital utilizando o algoritmo do CIBERSORT. O SNAI1 foi associado a um estadiamento patológico elevado e o ZEB1 a uma menor probabilidade de sobrevivência livre de recorrência. Ambos os marcadores foram associados a expressão de genes relacionados a uma maior agressividade como ETS1, COL3A1 e RUNX1, e a genes relacionados a evasão imune como CTLA4 e PD-L1. Complementarmente, vias pró-inflamatórias e pró-tumorigênicas se mostraram enriquecidas no grupo SNAI1 high. A análise utilizando o TCGA confirmou esses resultados. O grupo ZEB1 high se mostrou associados a um maior número de miRNA enriquecidos, dentre eles seis tem como alvo a própria via de EMT, o que sugere um mecanismo de feedback negativo eliciado pela expressão desse gene. Dados do TCGA ainda mostraram que ambos os genes estão associados a maior expressão de checkpoints imunológicos e a análise de citometria digital mostrou que a expressão de ambos os marcadores está associada a um enriquecimento de células quiescentes no microambiente tumoral. Além disso, a alta expressão de ZEB1 também se mostrou associada a uma depleção de células efectoras e a uma polarização M0-M2 de macrófagos associados ao tumor. Coletivamente esses dados sugerem que a EMT está associada não somente a uma maior agressividade do tumor, mas também a mecanismos de evasão imune, o que poderia explicar parcialmente a exclusão imunológica desse tumor e sugerir o uso desses genes como biomarcadores de resposta a imunoterapia.

Palavras-chaves: transcriptômica, exclusão imunológica, microambiente tumoral, imunoterapia

ABSTRACT

SOUZA, Luiz Paulo Chaves de. **Expression of epithelial-mesenchymal transition markers SNAI1 and ZEB1 results in transcriptional alterations that promote tumor progression and immune evasion in prostate cancer.** 2023. Dissertation (Master of Science, Genetics) – Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Prostate Cancer (PCa) is the second most common type of cancer among men. The course of the disease is usually favorable. However, some patients develop the most aggressive form of the disease, with a recurrence rate of 30% for patients treated with radical prostatectomy. These patients are unresponsive to androgen deprivation therapy and chemotherapy, which is a significant cause of morbidity and mortality. Despite the effectiveness of immunotherapy in other tumor types, the response rate in patients with the advanced form of PCa has been disappointing, approaching only 15%. Currently, the immune evasion mechanisms of PCa are not well understood, and there are no definitive biomarkers to stratify patients who will develop an aggressive form of the disease or to predict who will respond to immunotherapy. Recently it has been shown that PCa can reactivate an embryogenic program called Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), which is capable of contributing to increased invasion, migration, therapeutic resistance, and metastasis. The EMT process has previously been associated with immune evasion in other types of solid tumors, but in PCa, a definitive relationship between immune response and EMT has yet to be studied. In this project, we investigated the impact of SNAI1 and ZEB1 expression, known EMT markers, on the PCa transcriptional profile, especially on genes and pathways related to the immune response. A cohort of 51 PCa patients undergoing radical prostatectomy were used. Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples were collected retrospectively. Regions of interest were marked, and adjacent sections were sent to the Ontario Institute of Cancer Research for RNA extraction and transcriptomic analysis using BC360, PanCancer Pathway, Immune profiling and Human V3 miRNA NanoString Panels. Differential expression and pathway enrichment analyses comparing patients with higher expression of the genes of interest were performed using the Immune Profiling panel. Validation was performed using the PanCancer panel Pathway and public domain TCGA data. The enriched miRNAs and their targets were investigated. TCGA data was also used to perform digital cytometry analysis using the CIBERSORT algorithm. SNAI1 was associated with elevated pathological staging and ZEB1 with a lower probability of recurrence-free survival. Both markers were associated with the expression of genes related to greater aggressiveness, such as ETS1, COL3A1 and RUNX1, and to immune evasion such as CTLA4 and PD-L1. Complementarily, pro-inflammatory and pro-tumorigenic pathways, such as inflammatory response and TNF signaling via NF- κ B were enriched in the SNAI1 high group. Analysis using TCGA data also showed enrichment of complement, interferon-gamma and IL6/JAK/STAT3 signaling pathways. The ZEB1 high expression group was associated with a greater number of enriched miRNAs, among which six target the EMT pathway itself, which suggests a negative feedback mechanism elicited by the expression of this gene. TCGA data also showed that both genes are associated with greater expression of immunological checkpoints, and the analysis of digital cytometry showed that the expression of both markers is associated with an enrichment of quiescent cells, such as naïve B lymphocytes, in the tumor microenvironment. It was also found that high expression of ZEB1 was associated with a depletion of effector cells, such as CD8 lymphocytes, and a M0-M2 polarization of tumor-associated macrophages. Collectively, these data suggest that EMT is associated not only with greater tumor aggressiveness but also with mechanisms of immune evasion, which could partially explain the poor response of PCa to immunotherapy. It is suggested that the genes identified as being involved in immune pathways in this project may be promising expression biomarkers for the future use of checkpoint inhibitor drugs in PCa.

Keywords: transcriptomics, immune exclusion, tumor microenvironment, immunotherapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processos e eventos moleculares envolvidos na EMT no PCa. Células tumorais epiteliais são internamente e externamente estimuladas para começar o processo de EMT. O estado quase-mesenquimal, em que a maioria das células se encontram, está no centro e já é capaz de conferir agressividade. O estado mesenquimal tem potencial semelhante ao de células tronco e, geralmente, é completamente independente do andrógeno. Na parte superior são ilustrados os processos moleculares associados a esse estado e no inferior é ilustrado o processo reverso. Adaptado de CHAVES et al, 2021..24

Figura 2. Estrutura da proteína do SNAI1. A esquerda a região N-terminal é composta pelos domínios SNAG, domínio rico em serina (SRD) e domínio de exportação nuclear (NES); A direita a região C-terminal é composta por quatro domínios zinc-finger. Adaptado de BAULIDA; DÍAZ; GERCIA DE HERREROS, 2019.....26

Figura 3. Estrutura da proteína do ZEB1. À esquerda a região N-terminal é composta pelos domínios CBD, zinc-finger, e SID. A direita a região C-terminal é composta pelos domínios CID e zinc-finger. A região homeodomínio fica na região central da proteína. Adaptado de PEREZ-OQUENDO; GIBBONS, 2022.....27

Figura 4 – Amostras de tecido de Câncer de Prostata. O RNA foi isolado de áreas ricas em tumor previamente marcadas por um patologista. As áreas circuladas em preto representam as regiões ricas em tumor de cada paciente.....33

Figura 5 – Análise de qualidade. RNA das 53 amostras incluídas na coorte foram extraídos e sequenciados utilizando o painel NanoString BC360. A análise de qualidade proprietária nSolver apontou duas amostras com contagem de genes housekeeping menor do que o mínimo exigido para a confiabilidade da análise e por isso essas amostras foram removidas.....35

Figura 6. Gráfico de vulcão dos genes diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high. Plotting Plot da expressão diferencial utilizando o painel NanoString Immune Profiling comparando o grupo SNAI1 high com o SNAI1 low na coorte HC-FMRP. Adjusted p-value <0.05; Log2 fold change >0.5.....39

Figura 7. Gráfico de vulcão dos genes diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high. Plotting Plot da expressão diferencial utilizando o painel NanoString Immune Profiling comparando o grupo ZEB1 high com o ZEB1 low na coorte HC-FMRP. Adjusted p-value <0.05; Log2 fold change >0.5.....41

Figura 8. Efeito da alta e da baixa expressão do SNAI1 na expressão relativa de genes codificadores de checkpoints imunológicos e supressores imunes – Análise da expressão dos marcadores imunomodulatórios conhecidos mostra um aumento da expressão relativa de CTLA-4, PD-L1, TIM-3, DCR3, IL10 e IL10RA no grupo SNAI1 high na coorte do TCGA. *P<0.05, Mann-Whitney test.....50

Figura 9. Efeito da alta e da baixa expressão do ZEB1 na expressão relativa de genes codificadores de checkpoints imunológicos e supressores imunes – Análise da expressão dos marcadores imunomodulatórios conhecidos mostra um aumento da expressão relativa de CTLA-4, PD-L1, TIM-3, DCR3, IL10 e IL10RA no grupo ZEB1 high na coorte do TCGA. *P<0.05, Mann-Whitney test.....50

Figura 10. Efeito da alta e da baixa expressão de SNAI1 na abundancia relativa de células immune na coorte do TCGA – Citometria digital baseada no método de deconvolução mostra um aumento da abundancia relativa de naïve B cells, resting dentritic cells e activated mast cells e uma diminuição da abundancia de resting mast cells no grupo SNAI1 high. *p<0.05, multiple t tests.....**51**

Figura 11. Efeito da alta e da baixa expressão de ZEB1 na abundancia relativa de células immune na coorte do TCGA – Citometria digital baseado em deconvolução mostra um aumento da abundancia de naïve B cells, resting memory CD4+ T cells e M2 macrophages e uma diminuição na abundancia de memory B cells, CD8 T cells, follicular T helper cells, monocytes e M0 macrophages. *p<0.05, multiple t tests.....**51**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Informação clínica da coorte.** BCR = Recorrência bioquímica, TNM = Classificação de tumores malignos.....32
- Tabela 2. Análise de enriquecimento de vias para comparação de risco utilizando a coorte HC-FMRP.** Resultado de enriquecimento utilizando as vias MSigDB para os genes diferencialmente expressos para comparação entre pacientes com alto risco e pacientes com baixo risco.....37
- Tabela 3. Análise de enriquecimento de vias para comparação de recorrência bioquímica utilizando a coorte HC-FMRP.** Resultado de enriquecimento utilizando as vias MSigDB para os genes diferencialmente expressos para comparação entre pacientes com e sem recorrência bioquímica.....37
- Tabela 4. Características clínicas da coorte HC-FMRP.** Comparação das características clínicas da coorte HC-FMRP entre pacientes com alta e baixa expressão dos genes SNAI1 e ZEB1. * $p < 0.05$, Fisher's exact test.....38
- Tabela 5. Genes diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high utilizando o painel NanoString PanCancer Immune Profiling na coorte HC-FMRP.** Lista de genes down e upregulados no grupo SNAI1 high. Adjusted p-value < 0.05 ; Log2 fold change > 0.540
- Tabela 6. Genes diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high utilizando o painel NanoString PanCancer Immune Profiling na coorte HC-FMRP.** Lista de genes down e upregulados no grupo ZEB1 high. Adjusted p-value < 0.05 ; Log2 fold change > 0.541
- Tabela 7. Análise de enriquecimento para as comparações do SNAI1 na coorte HC-FMRP utilizando o painel NanoString Immune Profiling.** Lista de vias que foram enriquecidas no grupo SNAI1 high baseado na análise do painel NanoString Immune Profiling. Adjusted p-value < 0.1 ; Log2 fold change > 0.05 . ES – Pontuação de enriquecimento; NES – Pontuação de enriquecimento normalizada; NOM p-val – p-value nominal; FDR q-val – Taxa de falsa descoberta q-value.....44
- Tabela 8. Análise de enriquecimento para as comparações do SNAI1 na coorte HC-FMRP utilizando o painel NanoString PanCancer Pathway.** Lista de vias que foram enriquecidas no grupo SNAI1 high baseado na análise do painel NanoString PanCancer Pathway. Adjusted p-value < 0.1 ; Log2 fold change > 0.05 . ES – Pontuação de enriquecimento; NES – Pontuação de enriquecimento normalizada; NOM p-val – p-value nominal; FDR q-val – Taxa de falsa descoberta q-value.....44
- Tabela 9. Análise de enriquecimento para as comparações do SNAI1 na coorte do TCGA.** Lista de vias que foram enriquecidas no grupo SNAI1 high baseado na análise da coorte do TCGA. Destacadas estão as vias que foram diferencialmente expressas em comum com a coorte HC-FMRP. Adjusted p-value < 0.1 ; FDR < 0.25 ; Log2 fold change > 0.05 . ES – Pontuação de enriquecimento; NES – Pontuação de enriquecimento normalizada; NOM p-val – p-value nominal; FDR q-val – Taxa de falsa descoberta q-value.....44

Tabela 10. Análise de enriquecimento para as comparações do ZEB1 na coorte do TCGA. Lista de vias que foram enriquecidas no grupo ZEB1 high baseado na análise da coorte do TCGA. Destacadas estão as vias que foram diferencialmente expressas em comum com a coorte HC-FMRP. Adjusted p-value <0.1; FDR <0.25; Log2 fold change >0.05. ES – Pontuação de enriquecimento; NES – Pontuação de enriquecimento normalizada; NOM p-val – p-value nominal; FDR q-val – Taxa de falsa descoberta q-value.....45

Tabela 11. Micro-RNAs diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high da coorte HC-FMRP. Lista de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high de acordo com análise do painel NanoString Human V3 miRNA. As colunas dois e três mostram os genes e vias alvo dos miRNAs enriquecidos.....45

Tabela 12. Micro-RNAs diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high da coorte HC-FMRP. Lista de miRNAs diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high de acordo com análise do painel NanoString Human V3 miRNA. As colunas dois e três mostram os genes e vias alvo dos miRNAs enriquecidos.....47

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------|---|
| PCa | Câncer de Próstata |
| PSA | Antígeno prostático específico |
| IDO1 | Indoleamina 2,3-dioxigenase 1 |
| MDSCs | Células Supressoras Derivadas Mielóides |
| Tregs | Linfócitos T reguladores |
| TAMs | Macrófagos associados ao tumor |
| MHC | Complexo Principal de Histocompatibilidade |
| PTEN | Fosfatase Homóloga à Tensina |
| AIRE | Autoimmune Regulator |
| EMT | Transição Epitélio Mesenquimal |
| miRNAs | Micro-RNAs |
| mRNAs | RNA mensageiro |
| MET | Transição Mesenquimal Epitelial |
| AR | Receptor Andrógeno |
| SRD | Domínio rico em serina |
| NES | Domínio de exportação nuclear |
| CBD | Domínio de interação p300-p/CAF |
| SID | Domínio de interação SMAD |
| CID | Domínio de interação da região C terminal |
| TCGA | The Cancer Genome Atlas |
| NCCN | National Comprehensive Cancer Network |
| OICR | Ontario Institute of Cancer Research |
| FFPE | Fixado em formalina e embebido em formalina |
| GSEA | Gene Set Enrichment Analysis |
| ISUP | International Society of Urological Pathology |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução..... | 18 |
| 1.1. Câncer de próstata | 18 |
| 1.2. Microambiente tumoral | 20 |
| 1.3. Transição Epitélio-mesenquimal..... | 23 |
| 1.3.1. SNAI1..... | 25 |
| 1.3.2. ZEB1..... | 26 |
| Justificativa e hipótese | 28 |
| 2. Objetivos | 30 |
| 2.1. Objetivo geral | 30 |
| 2.2. Objetivos específicos | 30 |
| 3. Material e método..... | 32 |
| 3.1. Coorte..... | 32 |
| 3.2. Isolamento de RNA | 33 |
| 3.3. Análise transcriptômica..... | 34 |
| 3.4. Dicotomização | 35 |
| 3.5. Validação e análise de citometria digital..... | 35 |
| 4. Resultados..... | 37 |
| 4.1. Investigação transcriptômica preliminar | 37 |
| 4.2. Avaliação clínica | 37 |
| 4.3. Análise transcriptômica e enriquecimento de vias | 39 |
| 4.4. Análise de miRNAs..... | 46 |
| 4.5. Análise de marcadores de evasão imune e citometria digital utilizando uma coorte do TCGA | 49 |
| 5. Discussão e conclusão | 53 |
| Referências | 58 |
| ANEXOS | 69 |

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Câncer de próstata

Entre os homens, o Câncer de Próstata (PCa) é o segundo tipo de câncer mais comum e a quinta causa de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. Estima-se que, no Brasil, 72 mil novos casos sejam diagnosticados em 2023. Nos Estados Unidos, esse número pode chegar a 288 mil. (SANTOS et al., 2023; SIEGEL et al., 2023; SUNG et al., 2021). O PCa resulta de múltiplos fatores genéticos e ambientais que ainda não são completamente compreendidos. O fator de risco mais bem estabelecido é a idade – no Brasil, a cada dez homens diagnosticados com essa condição, nove tem mais de 55 anos. Recentemente, características como histórico familiar, massa corporal e etnia tem sido estudadas como possíveis fatores preditores (REBELLO et al., 2021; SANTOS et al., 2023).

O curso do PCa costuma ser positivo. Pacientes com a doença em estágio inicial ou intermediário podem desenvolver um tumor indolente e facilmente tratável. Até 99% dos pacientes vivem por mais de 10 anos se a doença for detectada e tratada precocemente. Dentre os pacientes diagnosticados no estágio mais avançado, entretanto, apenas 30% conseguem sobreviver mais que 5 anos (REBELLO et al., 2021). A deprivação androgênica é o tratamento de primeira linha para o PCa, mas quando a doença progride para a forma resistente a essa terapêutica, existe um número muito limitado de medicamentos quimioterápicos que funcionam e, por isso, o interesse pelo uso da imunoterapia para o tratamento de pacientes com PCa avançado tem aumentado (BACIARELLO; GIZZI; FIZAZI, 2018).

A recorrência costuma ocorrer em cerca de 30% dos paciente que passam por prostatectomia radical (KUPELIAN et al., 2006). A resistência a quimioterapia e a deprivação androgênica em pacientes com a forma metastática dessa doença ainda são uma causa significativa de morbidade e mortalidade. Acreditava-se que a imunoterapia em pacientes que não responderam a outros tipos de tratamento os beneficiaria, mas, infelizmente, a taxa de resposta ao bloqueio de checkpoint nesses indivíduos é de apenas 15% (YU et al., 2023).

O uso dessa terapia em diversos tipos de tumores sólidos tem se mostrado altamente efetivo, aumentando as chances de sobrevivência de pacientes em estágios avançados

dessas doenças. Todavia, no PCa o uso da imunoterapia tem sido frustrante, com resultados muito aquém do esperado. Atualmente existem alguns estudos que investigam biomarcadores para melhorar a estratificação clínica ou molecular e aprimorar o manejo terapêutico desses pacientes (EGGENER et al., 2020). Contudo, os mecanismos de modulação da ação imune antitumoral que impedem uma melhor resposta a esse tipo de terapia no PCa ainda são desconhecidos e não há biomarcadores preditivos para resposta a imunoterapia disponíveis para esses pacientes.

A próstata é uma glândula que faz parte do sistema reprodutivo masculino. Ela se localiza abaixo da bexiga e em frente ao reto. Por dentro dessa glândula passam a uretra e o ducto seminal. A próstata é composta por um parênquima com ductos e ácinos de células luminiais, células epiteliais e células neuroendócrinas, por um estroma com fibroblastos, células imunes, nervos e vasos e por uma cápsula fibromuscular. As células luminiais são responsáveis pela produção das secreções que compõem o fluido seminal, o que inclui o antígeno prostático específico (PSA) (NTALA, 2020).

O PCa costuma se originar nas células acinares, mas qualquer componente prostático pode dar origem ao tumor. Essa doença costuma se iniciar com uma neoplasia prostática intraepitelial (PIN), caracterizada pela anormalidade fenotípica e proliferativa. São quatro os estágios para os quais a doença pode evoluir, sendo os dois primeiros restritos a glândula prostática, o terceiro com alcance aos tecidos adjacentes e o quarto, a outros órgãos (REBELLO et al., 2021).

O diagnóstico é feito através de exames radiológicos, nível de PSA sérico e análise histológica por biópsia, além do exame de toque (NTALA, 2020). O PSA é o principal marcador para fazer o rastreamento dessa doença, para avaliar a progressão e para diagnosticar a recorrência pós tratamento. Isso acontece porque esse antígeno costuma estar presente apenas dentro da próstata e no líquido seminal, entretanto, quando há qualquer tipo de lesão benigna ou maligna neste órgão, o PSA entra em contato com os vasos presentes no estroma e passa a ser detectado na circulação (DEJOURS; KRISHNAN, 2021; PEZARO; WOO; DAVIS, 2014). A principal ferramenta de análise histológica é o score de Gleason, um sistema de pontuação composto por dois números que variam de 1 a 5 a depender de quão bem diferenciadas estão as estruturas glandulares. O primeiro número é relativo ao padrão histológico mais prevalente no tecido, e o segundo, ao padrão menos prevalente, de maneira que a somatória pode variar de 2 a 10 (STARK et al., 2009).

O uso de variáveis clínicas, como estadiamento patológico, concentração sérica de PSA e adaptações do score de Gleason tem melhorado a identificação dos pacientes com menor ou maior risco (EPSTEIN et al., 2005, 2016; PIERORAZIO et al., 2013). Homens diagnosticados com uma doença de menor risco tem 97% de probabilidade de sobreviver num período de cinco anos após o diagnóstico e 88% de sobreviver em um período de 10 anos. Aqueles com um maior risco tem um desfecho consideravelmente pior e a eles são rapidamente atribuídos tratamentos mais agressivos. Contudo, os pacientes diagnosticados com a doença em seu estágio intermediário de risco (cerca de 40% dos casos de câncer de próstata identificados) ainda representam um desafio clínico, com poucas ferramentas para indicar se esses pacientes devem ficar em vigilância ativa ou se devem ser submetidos a um tratamento mais agressivo (STARK et al., 2009). Por isso, existe uma necessidade urgente de determinar biomarcadores que permitam uma avaliação clínica mais precisa do curso da doença em pacientes diagnosticados como de risco intermediário.

1.2. Microambiente tumoral

A comunicação entre as células tumorais e as células do sistema imune é um processo dinâmico que envolve um balanço entre ativação da inflamação e imunossupressão. Uma resposta imune robusta pode ativar uma série de vias que visam contrabalancear essa atividade, como a ativação de vias inibitórias de células T efetoras, cuja função é prevenir o dano tecidual e manter a homeostase. Esse processo de evasão da imunidade adaptativa pode ser estratégico para que o tumor consiga evadir o sistema imune através da expressão de checkpoints imunológicos que suprimem a capacidade citotóxica das células T e facilitam o escape a vigilância imunológica (ANDERSEN et al., 2021; RIBAS, 2015; TUMEH et al., 2014).

A inibição das células T também pode ocorrer através da secreção de moléculas como TGF- β , IL-10, and indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1). A secreção dessas moléculas no microambiente tumoral pode diminuir a atividade de Linfócitos T citotóxicos e promover o recrutamento de células anti-inflamatórias, como os linfócitos T regulatórios (Tregs) e as células supressoras derivadas mieloides (MDSCs) (VITKIN et al., 2019; YUAN et al., 2016). Os macrófagos associados ao tumor (TAMs), em especial os macrófagos de polarização M2, também tem a capacidade de suprimir a atividade antitumoral das células do sistema imune (ERLANDSSON et al., 2019; TIAN et al., 2022). Outra ferramenta de evasão do sistema imune é a diminuição da expressão do

Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C). O MHC-I é essencial para a apresentação de antígenos tumorais e, conseqüentemente, para uma melhor resposta imunológica dependente de células T (GARRIDO et al., 2016; MOVASSAGHI et al., 2021; VITKIN et al., 2019).

A exaustão das células T é um outro fator que pode ser influente. Células T exaustas tem um menor potencial proliferativo e de regeneração, uma menor produção de citocinas, uma menor expressão de marcadores de memória (CD44, CD62L, CD127 ou CXCR3) e uma maior expressão de receptores inibitórios (PD1, PDL1, LAG3, CD160 ou 2B4). A exaustão ocorre através da exposição crônica a antígenos tumorais concomitante a ativação contínua de receptores inibitórios. Exposição contínua a citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β também podem induzir esse fenótipo (JIANG; LI; ZHU, 2015; WHERRY; KURACHI, 2015).

Abordagens imunoterapêuticas buscam aumentar a imunidade antitumoral através da modulação desse balanço. Apesar da efetividade desse tipo de terapia em diversos tumores sólidos, o efeito do bloqueio de checkpoints no PCa tem sido desapontador. Apenas 5-10% dos pacientes respondem a esse tratamento, que é o tipo mais comum de imunoterapia (ABIDA et al., 2019; WU et al., 2018). Acredita-se que esses resultados sejam devido ao fato de o PCa ser considerado um tumor frio ou excluído imunologicamente (MELO et al., 2021; STULTZ; FONG, 2021).

Tumores frios são aqueles com um baixo número de linfócitos infiltrados, o que está relacionado a uma menor carga mutacional, a uma menor resposta a imunoterapia e a uma maior tolerância a autoantígenos. Um tumor quente, por outro lado, tem uma maior variedade de linfócitos infiltrados e, portanto, uma maior chance de resposta a imunoterapia (MALEKI VAREKI, 2018).

Em vários tipos de tumores sólidos o maior grau de infiltração imunológica no microambiente tumoral tem sido associado a um melhor prognóstico (FRIDMAN et al., 2017). Entretanto, estudos sobre o microambiente imune do PCa tem apontado resultados contraditórios, com maiores níveis de células T no microambiente estando associado a um melhor prognóstico em alguns estudos (NARDONE et al., 2016) e a um pior prognóstico em outros (ZHAO et al., 2019b). A variação na infiltração imune pode influenciar na resposta imunológica antitumoral e esse é um fator que depende da heterogeneidade molecular intrínseca que caracteriza as doenças avançadas e metastáticas

(GE; WANG; CHENG, 2022; HAFFNER et al., 2021). Uma hipótese emergente é a de que mutações somáticas que induzem o PCa e que são adquiridas durante o curso da doença podem alterar, não somente as células tumorais, como também as outras células do microambiente tumoral para promover a evasão imune (WANG et al., 2018). Portanto, um fator essencial para a efetividade da imunoterapia é a compreensão de como a genética do tumor pode influenciar o balanço entre imunogenicidade e imunossupressão no microambiente tumoral (MELO et al., 2021; THORSSON et al., 2018).

O PCa é um tumor com uma alta instabilidade genômica (amplificações, deleções e rearranjos cromossômicos), mas com uma baixa carga mutacional (GRASSO et al., 2012). Apenas quatro mutações (fusões ETS, *PTEN*, *TP53* e *SPOP*) estão presentes em mais de 10% dos tumores de próstata (FRANK; NELSON; VASIOUKHIN, 2018; REBELLO et al., 2021) e três delas se mostraram capazes de promover alterações na resposta imune.

A Fosfatase Homóloga à Tensina (*PTEN*) é um gene descrito como supressor tumoral pois a proteína codificada por ele regula, entre outras, a via PI3K/AKT/mTOR, responsável pelo crescimento e pela sobrevivência celular. A perda desse gene está presente em diversos tipos tumorais e está envolvida na tumorigenese, no crescimento, na proliferação, no reparo de DNA e na motilidade celular de células tumorais (JAMASPISHVILI et al., 2018; LUONGO et al., 2019). Um estudo recente do nosso laboratório mostrou que a inativação do gene *PTEN* é um possível marcador de resposta a imunoterapia, pois essa perda modula a ação imune contra o PCa através da expressão aumentada de *IDO1* e da maior infiltração de células Tregs no microambiente tumoral (VIDOTTO et al., 2019, 2020).

A fusão *TMPRSS2-ERG* é um tipo de fusão ETS. O *TMPRSS2* tem o AR como fator de transcrição e, por isso, ao se fundir com o gene *ERG*, quando não gera uma proteína quimérica, pode levar a superexpressão desse gene. A superexpressão ocorre quando o promotor do *TMPRSS2* é translocado para a região imediatamente anterior ao gene *ERG*. O *ERG* faz parte da super família de genes ETS e está envolvido em diversos processos celulares, desde a diferenciação e manutenção de células tronco até o crescimento de células diferenciadas. Essa fusão está relacionada a tumorigenese, ao crescimento e a um aumento dos potenciais invasivo e metastático dos tumores de próstata (FANG et al., 2022). Estudos recentes mostraram que essa fusão é capaz de promover o recrutamento

de células Tregs para o microambiente tumoral e de modular o nível de infiltração de linfócitos nesse microambiente (MELO et al., 2021).

O *TP53* também é um supressor tumoral envolvido, entre outros, no controle de ciclo celular, no processo de reparo de DNA e na senescência. A perda desse gene, seja por uma deleção que cause a falta da proteína ou por uma mutação que gere uma proteína disfuncional, está associada a progressão, a instabilidade genômica, a resistência terapêutica e um mau prognóstico (VELEZ et al., 2022). Estudos recentes também mostram que essa mutação promove uma maior expressão do checkpoint imunológico PD1 e do seu ligante PD-L1. Alterações menos frequentes, mas que emergem como biomarcadores potenciais como a mutação do gene *CDK12* e a expressão aumentada do gene Autoimune *AIRE* (Autoimune Regulator) também podem promover um desbalanço que favorecem a imunossupressão e a evasão imune desse tipo de tumor (MELO et al., 2021).

1.3. Transição Epitélio-mesenquimal

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um processo biológico caracterizado pela transformação de células epiteliais polarizadas em células de fenótipo mesenquimal, o que é importante durante a embriogênese e em processos de regeneração tecidual. Fatores de transcrição que induzem a EMT, como *TWIST*, *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1* e *ZEB2*, promovem uma mudança fenotípica através da repressão da e-caderina e da promoção de expressão de fatores de diferenciação mesenquimal como a n-caderina, a r-caderina e a vimentina, assim como a expressão de marcadores de matriz extracelular e proteínas de adesão focal (CHAVES et al., 2021; STEMMLER et al., 2019). Na próstata, o *SNAI1* é o principal promotor desse processo, enquanto os outros genes funcionam como efetores da EMT (STYLIANOU et al., 2019). Genes envolvidos na reprogramação epigenética, como o *EZH2* e o *SOX2*, também têm um papel crucial na promoção da EMT (KU et al., 2017).

Micro-RNAs (miRNAs) específicos do tumor também tem um papel na regulação da EMT e na resposta ao tratamento (PAN et al., 2021). Essas RNAs não codificantes são sequências de até 25 nucleotídeos que, quando expressos, tem a capacidade de impedir a tradução ou promover a degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) com sequências complementares. Por se tratarem de moléculas de pequeno comprimento, cada miRNA tem a capacidade de se ligar a diversos mRNA diferentes, o que faz com que uma única

sequencia tenha o potencial de interferir em diversas vias moleculares diferentes. No PCa o interesse no uso de miRNAs como biomarcadores prognósticos de progressão e resposta a terapia é crescente (RANA et al., 2022). Estudos de miRNAs relacionados a EMT tem sublinhado o importante papel desses componentes genômicos não codificadores na regulação da expressão de *TGF-β*, *ZEB1* e *SNAIL1*, importantes promotores desse processo molecular (BURK et al., 2008; KUMARSWAMY et al., 2012).

Em tecidos tumorais, o processo de EMT está fortemente relacionado a uma maior agressividade (JOLLY; CELIÀ-TERRASSA, 2019; LAMBERT; WEINBERG, 2021). As células mesenquimais, ou quasi-mesenquimais (quando estão no estado intermediário entre epitelial e mesenquimal), possuem maior plasticidade, maior capacidade migratória, maior capacidade de invasão, maior capacidade de metástase e uma resistência elevada a apoptose (Fig.1) (DERYNCK; WEINBERG, 2019). Curiosamente, o processo reverso, denominado transição mesenquimal-epitelial (MET), também garante uma vantagem evolutiva para o tumor. Um trabalho recente mostrou a MET é um processo importante para o estabelecimento do tumor no tecido metastático (STYLIANOU et al., 2019). Essa descoberta sugere que não somente a EMT, mas plasticidade epitélio-mesenquimal como um todo, é importante para a tumorigenese e para a progressão tumoral.

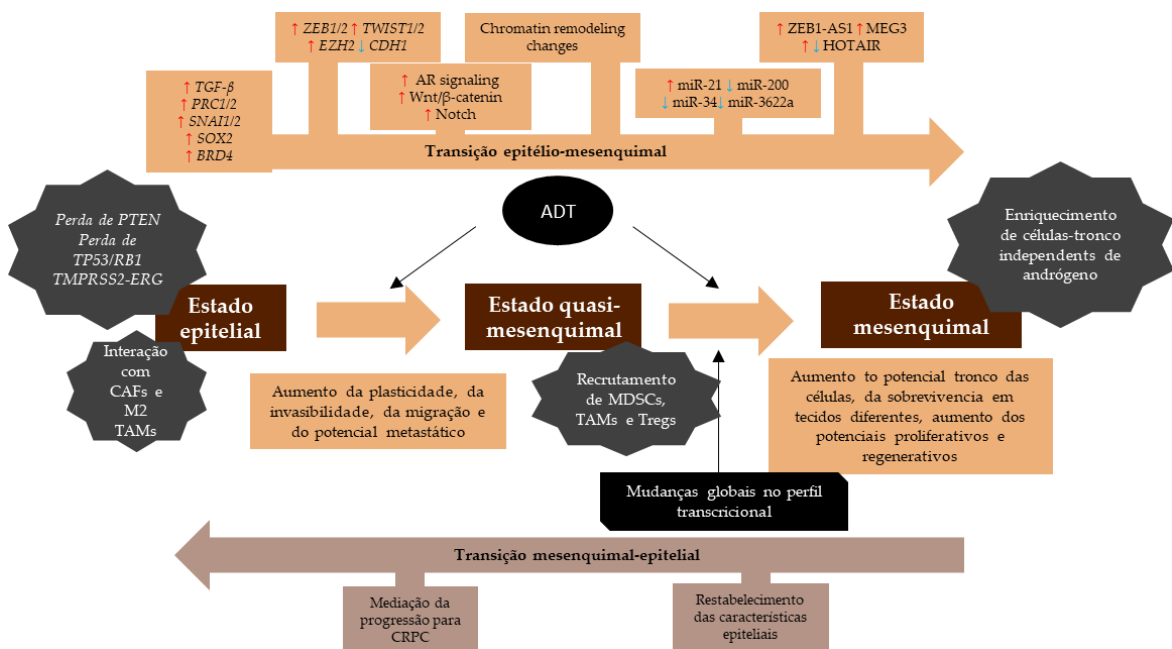


Figura 1. Processos e eventos moleculares envolvidos na EMT no PCa. Células tumorais epiteliais são interna e externamente estimuladas para começar o processo de EMT. O estado quase-mesenquimal, em que a maioria das células se encontram, está no centro e já é capaz de conferir agressividade. O estado mesenquimal tem potencial semelhante ao de células tronco e, geralmente, é completamente independente do andrógeno. Na parte superior são ilustrados os processos moleculares associados a esse estado e no inferior é ilustrado o processo reverso. Adaptado de CHAVES et al, 2021.

A plasticidade mediada pela EMT é um dos processos responsáveis pela heterogeneidade intratumoral, estado em que as células desse tecido exibem características moleculares e fenotípicas diferentes umas das outras (TAKI et al., 2021; TANG, 2022). Em diferentes tipos tumorais, o que inclui o PCa, a plasticidade e a consequente heterogeneidade tumoral conferem uma vantagem adaptativa ao tumor e está envolvida na progressão e, especialmente, na resistência terapêutica (GE; WANG; CHENG, 2022). Tumores com uma maior plasticidade tendem a perder a expressão do receptor androgênico (AR) e a se tornarem independentes desse hormônio, o que os faz resistentes a primeira linha de tratamento. Outros mecanismos associados a plasticidade também podem estar envolvidos na aquisição de resistência, como a progressão para o fenótipo neuroendócrino e a aquisição de características de células tronco (QUINTANAL-VILLALONGA et al., 2020).

Recentemente, pesquisas translacionais têm começado a investigar a relação entre a EMT, as células tronco e a evasão imune (MULLINS et al., 2022; TAKI et al., 2021). A sinalização de TGF- β integra os fenótipos de EMT e promove mudanças em cascata para alterar o estroma do tecido e facilitar a progressão tumoral (PICKUP; NOVITSKIY; MOSES, 2013). O TGF- β ainda interage intimamente com as proteínas SNAI1 e ZEB1 para influenciar o microambiente tumoral e promover a evasão imune (SUZUKI, 2018; ZHANG et al., 2014). Além disso, células mesenquimais e células-tronco se comunicam umas com as outras através da expressão que citocinas, como IL6, IL8, CCL2, CCL12 e CCL7, que podem modificar a resposta imune do microambiente tumoral (LIU et al., 2011; WANG et al., 2022).

1.3.1. SNAI1

O *SNAI1* é um fator de transcrição da família zinc finger. Esse gene está localizado no cromossomo 20, região 20q13.13. A proteína codificada por esse gene possui em sua região N-terminal os domínios regulatórios SNAG, domínio rico em serina (SRD) e domínio de exportação nuclear (NES), onde ocorrem a ligação de co-repressores, fosforilações e ancoragem para movimentação intracelular. Em sua região C-terminal estão presentes quatro domínios zinc-fingers, responsáveis por se ligarem a regiões E-box

presentes nos promotores de alguns genes (Fig. 2) (BAULIDA; DÍAZ; GARCÍA DE HERREROS, 2019; HOLLAND; BOOTH; BRUFORD, 2007).

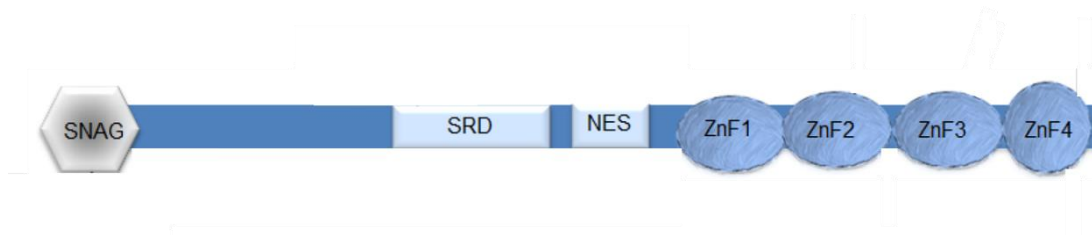


Figura 2. Estrutura da proteína do SNAI1. A esquerda a região N-terminal é composta pelos domínios SNAG, domínio rico em serina (SRD) e domínio de exportação nuclear (NES); A direita a região C-terminal é composta por quatro domínios zinc-finger. Adaptado de BAULIDA; DÍAZ; GARCIA DE HERREROS, 2019.

Esse é o principal promotor da EMT no PCa, sendo considerado um orquestrador desse processo em vários tipos tumorais (USOVA et al., 2015). Nesse tecido ele parece estar no início da cadeia, como o principal gatilho para a EMT, enquanto os outros fatores de transcrição funcionam como efetores do processo (STYLIANOU et al., 2019). A principal consequência da expressão do *SNAI1* é a repressão do *CDH1*, que codifica a e-caderina. O *SNAI1* ainda interage direta e indiretamente com diversos reguladores epigenéticos, como *DNMT3A*, *DNMT1*, *PRMT5*, *SOX2* e *HDAC1/2* para promover outras alterações envolvidas na EMT (DONG; WU, 2021).

Por estar tão intimamente relacionada a EMT, as consequências da expressão desse gene são muito semelhantes à do processo como um todo. O *SNAI1* já se mostrou associado a diversas características relacionadas a progressão tumoral, como aumento de invasão e sobrevivência, regulação metabólica e aquisição de características de células tronco (DONG; WU, 2021). No PCa a sua expressão está associada a uma maior pontuação de Gleason e a uma capacidade migratória elevada. Ele ainda se mostrou altamente expresso nas formas metastáticas dessa doença (NAKAZAWA; KYPRIANOU, 2017; NEAL et al., 2012; POBLETE et al., 2014).

Apesar das investigações a respeito do papel do *SNAI1* no PCa e em outros tumores não serem recentes (NAUSEEF; HENRY, 2011; SMITH; ODERO-MARAH, 2012), estudos investigando o envolvimento desse gene na evasão imune e seu potencial preditivo para resposta a imunoterapia ainda não muito incipientes (TERRY et al., 2020) e precisam ser melhor investigados.

1.3.2. ZEB1

O *ZEB1* (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1) é um dos efetores da transição epitélio-mesenquimal mais amplamente descritos. Esse gene está localizado no

cromossomo 10, região 10p11.22. A proteína do ZEB1 é flanqueada por duas regiões zinc-fingers e antecedida por uma região de domínio de interação p300-p/CAF (CBD). A região homeodominio é flanqueada pelo domínio de interação SMAD (SID) e pelo domínio de interação da região C terminal (CID) (Fig.3) (HOLLAND; BOOTH; BRUFORD, 2007; PEREZ-OQUENDO; GIBBONS, 2022).

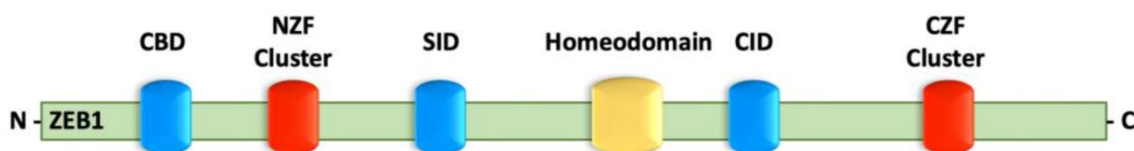


Figura 3. Estrutura da proteína do ZEB1. À esquerda a região N-terminal é composta pelos domínios CBD, zinc-finger, e SID. A direita a região C-terminal é composta pelos domínios CID e zinc-finger. A região homeodominio fica na região central da proteína. Adaptado de PEREZ-OQUENDO; GIBBONS, 2022.

O gene codifica um fator de transcrição e regulador epigenético capaz de controlar mais de 2000 outros genes. Na próstata o *ZEB1* é modulado pelo receptor andrógeno e sua expressão é essencial para uma subpopulação de células tronco basais (MATUSZAK; KYPRIANOU, 2011; WANG et al., 2020).

A expressão do *ZEB1* é conhecidamente associada a progressão, a agressividade, a metástase e, conseqüentemente, a um pior prognóstico (PEREZ-OQUENDO; GIBBONS, 2022; ZHANG et al., 2019). Evidências recentes também mostram o seu papel na evasão imune em diversos tipos de tumores sólidos (LU et al., 2022; MULLINS et al., 2022). Em tumores pulmonares de células não pequenas esse marcador está inversamente correlacionado a infiltração de células T (ZHAO et al., 2019a). No câncer de mama a expressão de *ZEB1* no microambiente tumoral está associada a uma menor atividade imune antitumoral e a maior presença de células supressoras derivadas mieloides (BLOCK et al., 2019; KATSURA et al., 2017). Em melanoma, câncer colorretal e em carcinoma oral a expressão de *ZEB1* está envolvida na upregulação de *PD-1* e *PD-L1* no microambiente tumoral (PLASCHKA et al., 2022; TAKAMARU et al., 2022; XU et al., 2022).

No PCa a expressão do *ZEB1* foi previamente associada a um fenótipo celular mais agressivo, a quimioresistência e a migração aumentada (ORELLANA-SERRADELL et al., 2018; PÉREZ et al., 2021). Um estudo recente também apontou um papel crucial desse gene na progressão para o fenótipo metastático em tumores resistentes a castração (CRPC) (POMERANTZ et al., 2020). Apesar da forte associação entre a *ZEB1* e a evasão imune em outros tipos tumorais, os trabalhos investigando o impacto da

expressão desse gene no microambiente tumoral do PCa são escassos e, portanto, seu papel prognóstico e preditivo nesse tumor ainda precisa ser melhor elucidado.

Justificativa e hipótese

As vias relacionadas a EMT, representada pelos marcadores *SNAIL* e *ZEB1*, se mostraram aumentadas tanto em casos primários de PCa quanto em casos metastáticos. Nesse tipo de tumor a expressão desses marcadores já foi associada a um pior prognóstico, a um maior estadiamento patológico e a um maior risco de recorrência e metástase. Estudos *in vivo* associaram a expressão desses marcadores a resistência terapêutica e estudos *in vitro* mostraram que induzir esse fenótipo pode promover aquisição de características de células-tronco e elevar as capacidades de invasão e migração, sugerindo que esse processo está associado a uma maior agressividade das células tumorais. Estudos em outros tipos tumorais mostraram, além dessa relação com a progressão tumoral, uma associação entre a ativação da EMT e a evasão imune.

Apesar desses achados, a expressão de *SNAIL* e *ZEB1* ainda não foi investigada como um possível biomarcador de resposta imune no PCa. Nesse trabalho nós investigamos a influência dos níveis de expressão do *ZEB1* e do *SNAIL* no transcriptoma de uma coorte retrospectiva de 51 pacientes de PCa submetidos a prostatectomia radical para mostrar como os dois marcadores alteraram genes e vias de transcrição para promover alterações relacionadas a progressão tumoral e a evasão imune.

Nossa hipótese é de que os marcadores de EMT estão associados a genes e vias relacionados a embriogênese, a progressão tumoral e a uma maior agressividade do PCa, mas também a marcadores de modulação da resposta imune antitumoral, como os checkpoints imunológico *CTLA4*, *PD-1* e *PD-L1* e a citocina *IL10*. Se isso se confirmar, esses marcadores poderão explicar parcialmente a exclusão imunológica observada nesse tipo tumoral, visto a grande frequência de vezes em que esse programa se mostrou presente nos processos de tumorigenese e progressão tumoral. Potencialmente, também poderão funcionar como marcadores preditivos de resposta a imunoterapia e como ferramenta para estratificação de pacientes diagnosticados com diferentes níveis de gravidade.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Investigar o impacto da expressão de *SNAI1* e *ZEB1* no perfil transcricional do câncer de próstata, com foco em genes e vias relacionados a evasão imune para uma melhor compreensão do impacto desse processo celular na evasão imune do PCa e seu potencial de influência na resposta a imunoterapia.

2.2. Objetivos específicos

- Utilizar o painel NanoString Immune profiling e para investigar a expressão diferencial de genes relacionados a resposta imune antitumoral em pacientes com câncer de próstata com alta expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal *SNAI1* e *ZEB1*.
- Utilizar os painéis NanoString PanCancer Pathway e NanoString Immune profiling para investigar as vias relacionados a progressão tumoral e a resposta imune antitumoral em pacientes com câncer de próstata com alta expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal *SNAI1* e *ZEB1*.
- Utilizar o painel NanoString Human V3 miRNA para investigar a expressão diferencial de miRNAs em pacientes de câncer de próstata com alta expressão dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal *SNAI1* e *ZEB1*.
- Validar os dados encontrados utilizando uma coorte pública e amplamente investigada do TCGA.

MATERIAL E MÉTODO

3. Material e método

3.1. Coorte

Todas as 51 amostras incluídas nessa coorte (HC-FMRP) são de tumores primários de PCa coletados por prostatectomia radical de acordo com as recomendações clínicas do National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (MOHLER et al., 2019) no departamento de Cirurgia e Anatomia, divisão de Urologia, do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto entre 2007 e 2015 (Tabela 1). O risco foi calculado de acordo com a presença de recorrência bioquímica (PSA>0.2 ng/ml no sexto mês após a cirurgia) e com o risco prognóstico da calculadora “Post-treatment Freedom from Recurrence and Cancer-Specific Mortality” da Cleveland Clinic (<https://riskcalc.org/ProstateCancerPredictingPostRadicalProstatectomy/>). Essa calculadora online se passa no nível de PSA, no estadiamento clínico, na pontuação de gleason e na positividade para invasão capsular, seminal e linfonodal para estabelecer uma probabilidade de recorrência em 7, 9 e 10 anos. Pacientes foram classificados como alto risco quando a chance de recorrência era maior que 15%, de risco intermediário quando a probabilidade era maior que 13% e de baixo risco quando a probabilidade de recorrência era menor que 13%. Esse estudo retrospectivo foi aprovado pelo comitê de ética do hospital das clínicas de Ribeirão Preto sob os CAAEs 43277221.0.0000.5440 e 60032122.8.0000.5440 e pelo comitê de ética da Universidade de Toronto, sob o protocolo 00043323.

| Case number | SNAI1 Status | ZEB1 Status | Risk factor | Primary Gleason | Secondary Gleason | Total Score | Patient age (at surgery) | BCR | Gland Weight (g) | Perineural Invasion | TNM |
|-------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|-------------------|-------------|--------------------------|-----|------------------|---------------------|------|
| 1 | SNAI1_high | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 68 | no | 44 | Absent | pT3a |
| 2 | SNAI1_low | ZEB1_low | high | 3 | 4 | 7 | 63 | no | 39 | Present | pT2c |
| 3 | SNAI1_high | ZEB1_low | low | 4 | 3 | 7 | 59 | no | 45 | Present | pT2c |
| 7 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 69 | no | 34 | Present | pT2c |
| 9 | SNAI1_low | ZEB1_high | low | 4 | 3 | 7 | 58 | no | 90 | Present | pT3b |
| 10 | SNAI1_low | ZEB1_high | high | 3 | 5 | 8 | 66 | no | 29 | Present | pT3b |
| 12 | SNAI1_low | ZEB1_high | low | 3 | 4 | 7 | 73 | no | 98 | Present | pT2c |
| 13 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 62 | no | 51 | Present | pT3a |
| 14 | SNAI1_low | ZEB1_high | low | 3 | 4 | 7 | 52 | no | 32 | Present | pT3a |
| 15 | SNAI1_high | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 70 | no | 51 | Absent | pT2c |
| 16 | SNAI1_low | ZEB1_high | low | 3 | 4 | 7 | 73 | no | 41 | Absent | pT2c |
| 21 | SNAI1_low | ZEB1_high | low | 3 | 4 | 7 | 73 | no | 77 | Present | pT2c |
| 23 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 4 | 3 | 7 | 64 | no | 30 | Present | pT3b |
| 24 | SNAI1_high | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 61 | no | 34 | Present | pT2c |
| 25 | SNAI1_high | ZEB1_high | low | 3 | 4 | 7 | 67 | no | 45 | Present | pT2c |
| 26 | SNAI1_high | ZEB1_high | low | 3 | 4 | 7 | 77 | no | 35 | Present | NA |
| 28 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 65 | no | 43 | Absent | pT2c |
| 29 | SNAI1_high | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 70 | no | 29 | Absent | pT2c |
| 30 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 3 | 3 | 6 | 72 | no | 72 | Present | pT2c |
| 31 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 3 | 3 | 6 | 68 | no | 38 | Absent | pT2c |
| 32 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 4 | 3 | 7 | 65 | no | 30 | Present | pT2a |
| 33 | SNAI1_high | ZEB1_high | low | 4 | 3 | 7 | 60 | no | 114 | Absent | NA |
| 35 | SNAI1_low | ZEB1_high | low | 4 | 3 | 7 | 73 | no | 40 | Present | pT2c |
| 36 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 3 | 3 | 6 | 74 | no | 60 | Present | pT2c |
| 39 | SNAI1_low | ZEB1_low | low | 3 | 3 | 6 | 56 | no | 40 | Absent | pT2a |

| | | | | | | | | | | | |
|----|------------|-----------|--------------|---|---|---|----|-----|-----|---------|------|
| 44 | SNAIL_low | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 60 | no | 41 | Absent | pT2c |
| 45 | SNAIL_high | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 73 | no | 63 | Absent | pT2c |
| 47 | SNAIL_low | ZEB1_high | low | 4 | 3 | 7 | 64 | no | 39 | Absent | pT2b |
| 50 | SNAIL_low | ZEB1_low | low | 3 | 4 | 7 | 56 | no | 40 | Present | pT2b |
| 51 | SNAIL_low | ZEB1_high | low | 3 | 3 | 6 | 52 | no | 36 | Present | pT2c |
| 53 | SNAIL_low | ZEB1_low | low | 4 | 3 | 7 | 73 | no | 85 | Present | pT2 |
| 55 | SNAIL_low | ZEB1_low | low | 3 | 3 | 6 | 58 | no | 33 | Absent | pT2c |
| 4 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 3 | 4 | 7 | 64 | yes | 413 | Absent | pT2c |
| 5 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 3 | 4 | 7 | 61 | yes | 50 | Present | pT3b |
| 6 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 4 | 4 | 8 | 70 | yes | 50 | Present | pT3b |
| 8 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 4 | 3 | 7 | 69 | yes | 30 | Present | pT2c |
| 11 | SNAIL_low | ZEB1_low | high | 5 | 4 | 9 | 55 | yes | 41 | Present | pT3a |
| 17 | SNAIL_high | ZEB1_low | high | 4 | 4 | 8 | 70 | yes | 45 | Absent | pT3b |
| 18 | SNAIL_low | ZEB1_low | high | 4 | 5 | 9 | 74 | yes | 40 | Present | pT2c |
| 19 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 3 | 4 | 7 | 67 | yes | 47 | Present | pT3a |
| 20 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 4 | 3 | 7 | 68 | yes | 47 | Present | pT3a |
| 22 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 5 | 3 | 8 | 48 | yes | 55 | Present | pT2c |
| 27 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 3 | 4 | 7 | 58 | yes | 35 | Absent | pT2c |
| 34 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 4 | 3 | 7 | 73 | yes | 42 | Absent | pT2c |
| 37 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 3 | 4 | 7 | 49 | yes | 35 | Present | pT2c |
| 38 | SNAIL_high | ZEB1_low | intermediate | 3 | 4 | 7 | 59 | yes | 46 | Present | pT2c |
| 40 | SNAIL_high | ZEB1_high | intermediate | 3 | 3 | 6 | 67 | yes | 50 | Present | pT2c |
| 41 | SNAIL_low | ZEB1_low | high | 3 | 4 | 7 | 66 | yes | 31 | Present | pT3b |
| 46 | SNAIL_high | ZEB1_low | intermediate | 4 | 3 | 7 | 63 | yes | 40 | Present | pT2b |
| 49 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 4 | 3 | 7 | 62 | yes | 27 | Present | pT2c |
| 54 | SNAIL_low | ZEB1_low | intermediate | 3 | 3 | 6 | 67 | yes | 45 | Present | pT2c |

Tabela 1. Informação clínica da coorte. BCR = Recorrência bioquímica, TNM = Classificação de tumores malignos.

3.2. Isolamento de RNA

O RNA foi isolado de áreas ricas em tumor previamente selecionadas por um patologista. As amostras marcadas foram enviadas para o Ontario Institute for Cancer Research (OICR), onde foram macrodissecadas e tiveram seu RNA extraído como descrito previamente (BAYANI et al., 2017). Brevemente, os tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) foram cortados e marcados com hematoxilina e eosina. Todos os cortes passaram por análise histológica e as áreas ricas em tumor foram cuidadosamente circunscritas (Figura 4). Cortes adjacentes foram preparados e enviados para o OICR. As áreas de interesse foram macrodissecadas para extração ribonucleica utilizando o kit high-pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, USA) de acordo com as normas do fabricante.

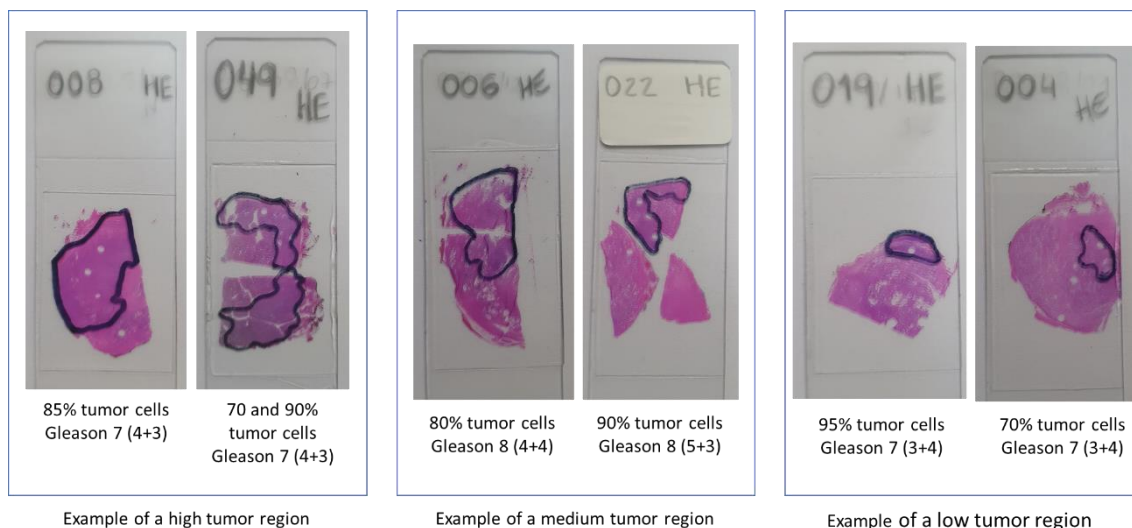


Figura 4 – Amostras de tecido de Câncer de Prostata. O RNA foi isolado de áreas ricas em tumor previamente marcadas por um patologista. As áreas circuladas em preto representam as regiões ricas em tumor de cada paciente.

3.3. Análise transcriptômica

A análise de expressão de RNA foi feita utilizando os painéis NanoString Immune Profiling e NanoString nCounter Pancancer Pathway (NanoString Technologies Inc, Seattle, Washington, USA) de acordo com as instruções do fabricante (GOYTAIN; NG, 2020; OLKHOV-MITSEL et al., 2021). A análise de expressão de miRNA foi feita utilizando o painel NanoString Human V3 miRNA (NanoString Technologies Inc, Seattle, Washington, USA).

Originalmente o estudo foi desenhado para investigar prospectivamente uma coorte coletada no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto utilizando tecnologia da Illumina. Entretanto, devido a pandemia, nós optamos por fazer um estudo retrospectivo com amostras previamente estudadas pelo nosso grupo (VIDOTTO, 2019). As amostras dos pacientes eram do tipo FFPE, coletadas pelo menos cinco anos antes da realização desse estudo e, portanto, sujeita a degradação ribonucleica. A tecnologia NanoString foi otimizada para esse tipo de material e consegue extrair bons resultados mesmo em amostras com RNA parcialmente degradado e, por isso, ela foi preferida em detrimento da investigação utilizando os painéis Illumina.

O painel Immune Profiling investiga 770 genes relacionados ao perfil de células imunes, a expressão de checkpoints e a ativação de vias relacionadas a resposta imunológica ao tumor. O painel PanCancer Pathway investiga 730 genes e foi desenhado para caracterizar a biologia do tumor, o microambiente tumoral e a resposta imune de tumores em geral. O painel Human V3 miRNAs investiga 827 miRNAs de importância oncológica.

O controle de qualidade (QC) e a construção da matrix de expressão foram feitas utilizando o software nSolver v4.0. A análise proprietária utilizando o painel BC360 também foi levada em consideração. Das 53 amostras enviadas para o OICR, duas foram removidas após análise de QC (Figura 5). A análise de expressão diferencial foi feita utilizando o pacote DESeq v1.34.0 do Bioconductor. A análise de enriquecimento de vias foi feita utilizando o software The Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). O software ROSALIND foi utilizado para analisar expressão diferencial de miRNAs e o

enriquecimento de alvos foi feito utilizando o pacote multiMiR (RU et al., 2014) e o algoritmo do Enrichr (XIE et al., 2021).

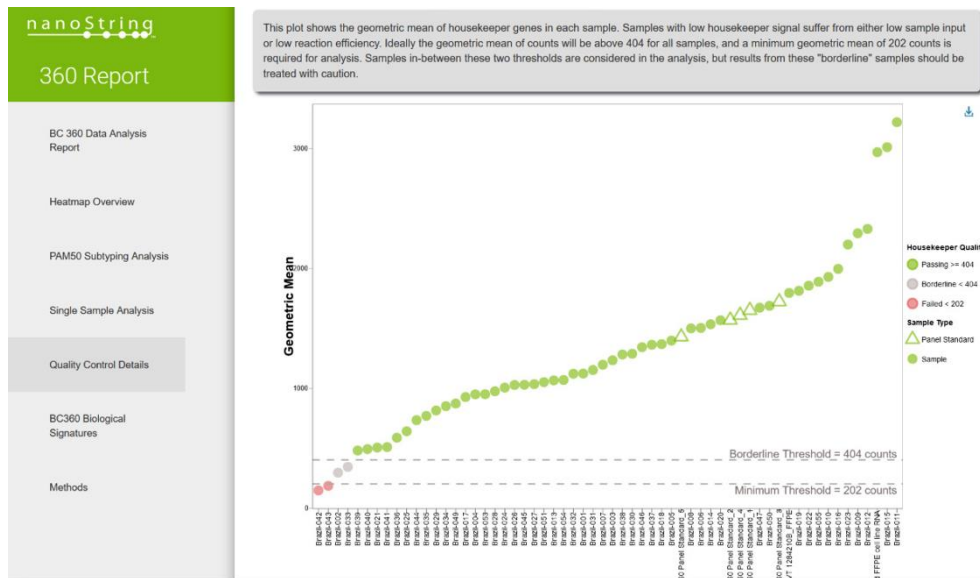


Figura 5 – Análise de qualidade. RNA das 53 amostras incluídas na coorte foram extraídos e sequenciados utilizando o painel NanoString BC360. A análise de qualidade proprietária nSolver apontou duas amostras com contagem de genes housekeeping menor do que o mínimo exigido para a confiabilidade da análise e por isso essas amostras foram removidas.

3.4. Dicotomização

Para esse estudo, nós caracterizamos o impacto da expressão dos marcadores de EMT *ZEB1* e *SNAI1* com base nos dados do painel BC360 da NanoString. A dicotomização da coorte foi feita de acordo com os quantis de expressão desses marcadores como descrito previamente (VIDOTTO, 2019), comparando os 25% de tumores com maior expressão de *SNAI1* (*SNAI1* high) ou *ZEB1* (*ZEB1* high) com os 75% de tumores com menor expressão desses marcadores (*SNAI1* low; *ZEB1* low).

3.5. Validação e análise de citometria digital

A validação dos dados foi feita utilizando uma coorte pública de adenocarcinoma de próstata do TCGA (n = 488), utilizando a mesma metodologia. O algoritmo do CIBERSORT foi utilizado para estimar, à partir dos dados normalizados de transcriptômica, o nível de infiltração de células imunes no microambiente tumoral desses tumores. Resultados do CIBERSORT para a análise pancancer do TCGA foi obtida de um estudo anterior (THORSSON et al., 2018) e a infiltração imune relativa foi analisada de acordo com os níveis de expressão de *SNAI1* e *ZEB1*. A análise estatística foi feita utilizando a ferramenta de múltiplos testes t não pareados do software GraphPad Prism 9.3.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Investigação transcriptômica preliminar

Análise transcriptômica realizada previamente pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando a mesma coorte e os mesmos painéis, investigou as diferenças transcricionais entre pacientes de alto e baixo risco ou entre pacientes que tiveram ou não recorrência bioquímica. Essa análise mostrou que genes relacionados a EMT, como *CXCL14*, *COL3A1* e *TGFB1*, bem como a própria via de EMT, estão enriquecidos nos pacientes de alto risco (Tabela 2) e naqueles que passaram por recorrência bioquímica (Tabela 3).

PanImmune Panel – Cleveland Risk factor “High”

| Term | Adjusted P-value | Genes |
|-----------------------------------|------------------|--------------------------------|
| p53 Pathway | 8,36E+11 | <i>TGFB1;NOTCH1;SOCS1;HRAS</i> |
| Angiogenesis | 0.0035 | <i>NRP1;COL3A1</i> |
| IL-2/STAT5 Signaling | 0.0035 | <i>NRP1;SOCS1;BCL2</i> |
| Myogenesis | 0.0035 | <i>COL3A1;TGFB1;NOTCH1</i> |
| Apical Junction | 0.0035 | <i>MAP4K2;SYK;HRAS</i> |
| Allograft Rejection | 0.0035 | <i>IKBKB;TGFB1;SOCS1</i> |
| TGF-beta Signaling | 0.0042 | <i>TGFB1;ENG</i> |
| IL-6/JAK/STAT3 Signaling | 0.0095 | <i>TGFB1;SOCS1</i> |
| UV Response Dn | 0.0225 | <i>NRP1;COL3A1</i> |
| Interferon Gamma Response | 0.0316 | <i>SOCS1;IRF5</i> |
| Epithelial Mesenchymal Transition | 0.0316 | <i>COL3A1;TGFB1</i> |
| KRAS Signaling Up | 0.0316 | <i>NRP1;ENG</i> |

Tabela 2. Análise de enriquecimento de vias para comparação de risco utilizando a coorte HC-FMRP. Resultado de enriquecimento utilizando as vias MSigDB para os genes diferencialmente expressos para comparação entre pacientes com alto risco e pacientes com baixo risco.

PanImmune Panel – Biochemical Recurrence

| Term | Adjusted P-value | Genes |
|-----------------------------------|------------------|---------------|
| Angiogenesis | 0.0679 | <i>COL3A1</i> |
| TGF-beta Signaling | 0.0679 | <i>ENG</i> |
| UV Response Dn | 0.0679 | <i>COL3A1</i> |
| IL-2/STAT5 Signaling | 0.0679 | <i>ICOS</i> |
| Myogenesis | 0.0679 | <i>COL3A1</i> |
| KRAS Signaling Up | 0.0679 | <i>ENG</i> |
| Interferon Gamma Response | 0.0679 | <i>IRF5</i> |
| Apical Junction | 0.0679 | <i>SYK</i> |
| Estrogen Response Late | 0.0679 | <i>CXCL14</i> |
| Epithelial Mesenchymal Transition | 0.0679 | <i>COL3A1</i> |

Tabela 3. Análise de enriquecimento de vias para comparação de recorrência bioquímica utilizando a coorte HC-FMRP. Resultado de enriquecimento utilizando as vias MSigDB para os genes diferencialmente expressos para comparação entre pacientes com e sem recorrência bioquímica.

4.2. Avaliação clínica

A investigação da associação entre a expressão dos genes de interesse e as características clínicas da coorte mostrou que a alta expressão de ambos os marcadores

está associada a características clínicas desfavoráveis para o paciente. O grupo ZEB1 high se mostrou associado a uma menor probabilidade de sobrevivência livre de recorrência, enquanto o SNAI1 high a uma maior pontuação no índice da International Society of Urological Pathology (ISUP), que reflete um estadiamento patológico elevado (Tabela 4).

| | Variable | Group 1 | Group 2 | P | Group 1 | Group 2 | P |
|------------------------------------|--|----------|-----------|---------|-----------|------------|---------|
| | | ZEB1 low | ZEB1 high | | SNAI1 low | SNAI1 high | |
| | <i>n</i> | 38 | 13 | | 38 | 13 | |
| Cleveland clinic prediction | 7-year Probability of freedom From Recurrence | 95 | 92 | 0.0349* | 94 | 93 | 0.4311 |
| | 10-year Probability of freedom From Recurrence | 95 | 94 | 0.3995 | 95 | 95 | 0.8821 |
| | 10-Year Prostate Cancer Specific Mortality | 1 | 0 | 0.6976 | 0 | 1 | 0.9906 |
| | 15-Year Prostate Cancer Specific Mortality | 1 | 1 | 0.1547 | 1 | 1 | 0.444 |
| Biochemical Recurrence | Yes | 15 | 4 | 0.7432 | 14 | 5 | >0.9999 |
| | No | 23 | 9 | | 24 | 8 | |
| Preoperative PSA (median) | < 0.04 | 0 | 0 | 0.3361 | 0 | 0 | 0.5204 |
| | 0.1 - 1.0 | 0 | 0 | | 0 | 0 | |
| | 1.0 - 10.0 | 23 | 5 | | 22 | 6 | |
| | >10.0 | 16 | 7 | | 15 | 7 | |
| PSA at last followup | < 0.04 | 23 | 8 | 0.8086 | 24 | 7 | 0.3193 |
| | 0.1 - 1.0 | 12 | 3 | | 9 | 6 | |
| | 1.0 - 10.0 | 1 | 1 | | 2 | 0 | |
| | >10.0 | 2 | 1 | | 3 | 0 | |
| Gleason score | 3+3=6 | 4 | 0 | 0.1317 | 4 | 0 | 0.6422 |
| | 3+4=7 | 9 | 5 | | 11 | 3 | |
| | 4+3=7 | 15 | 1 | | 13 | 3 | |
| | 3+5=8 | 4 | 3 | | 4 | 3 | |
| | 4+4=8 | 2 | 0 | | 1 | 1 | |
| | 5+3=8 | 0 | 1 | | 1 | 0 | |
| | 4+5=9 | 3 | 2 | | 3 | 2 | |
| | 5+4=9 | 1 | 1 | | 1 | 1 | |
| ISUP classification | 1 | 7 | 1 | 0.4812 | 8 | 0 | 0.0665* |
| | 2 | 17 | 7 | | 17 | 7 | |
| | 3 | 11 | 2 | | 10 | 3 | |
| | 4 | 1 | 1 | | 2 | 0 | |
| | 5 | 2 | 2 | | 1 | 3 | |
| TNM classification | T2a | 3 | 0 | 0.2897 | 2 | 1 | 0.9353 |
| | T2b | 2 | 1 | | 2 | 1 | |

| | | | | | | | |
|----------------|----------------|----|----|--------|----|---|--------|
| | T2c | 23 | 7 | | 22 | 8 | |
| | T3a | 5 | 1 | | 4 | 2 | |
| | T3b | 3 | 4 | | 6 | 1 | |
| Tumor invasion | Angiolymphatic | 2 | 1 | 0.6286 | 2 | 1 | 0.7925 |
| | capsular | 4 | 1 | | 5 | 0 | |
| | extraprostatic | 5 | 4 | | 8 | 1 | |
| | perineural | 25 | 10 | | 26 | 9 | |
| | lymph node | 0 | 1 | | 1 | 0 | |
| | vesicular | 3 | 2 | | 4 | 1 | |
| | ductal | 1 | 2 | | 2 | 1 | |
| | urethral | 4 | 1 | | 3 | 2 | |

Tabela 4. Características clínicas da coorte HC-FMRP. Comparação das características clínicas da coorte HC-FMRP entre pacientes com alta e baixa expressão dos genes SNAI1 e ZEB1. * $p < 0.05$, Fisher's exact test.

4.3. Análise transcriptômica e enriquecimento de vias

A investigação dos genes diferencialmente expressos utilizando o painel Immune Profiling revelou 61 genes diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high (Figura 6, Tabela 5) e 95 genes diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high (Figura 7, Tabela 6), em relação aos respectivos controles. Entre os genes encontrados upregulados nesses grupos, alguns são conhecidamente relacionados a tumorigenese e a progressão tumoral, como *ETS1*, *COL3A1* e *RUNX1*, e outras a resposta imune, como *CTLA4*, *CD274* (PD-L1), genes relacionados a apresentação de antígeno e genes da família NF- κ B.

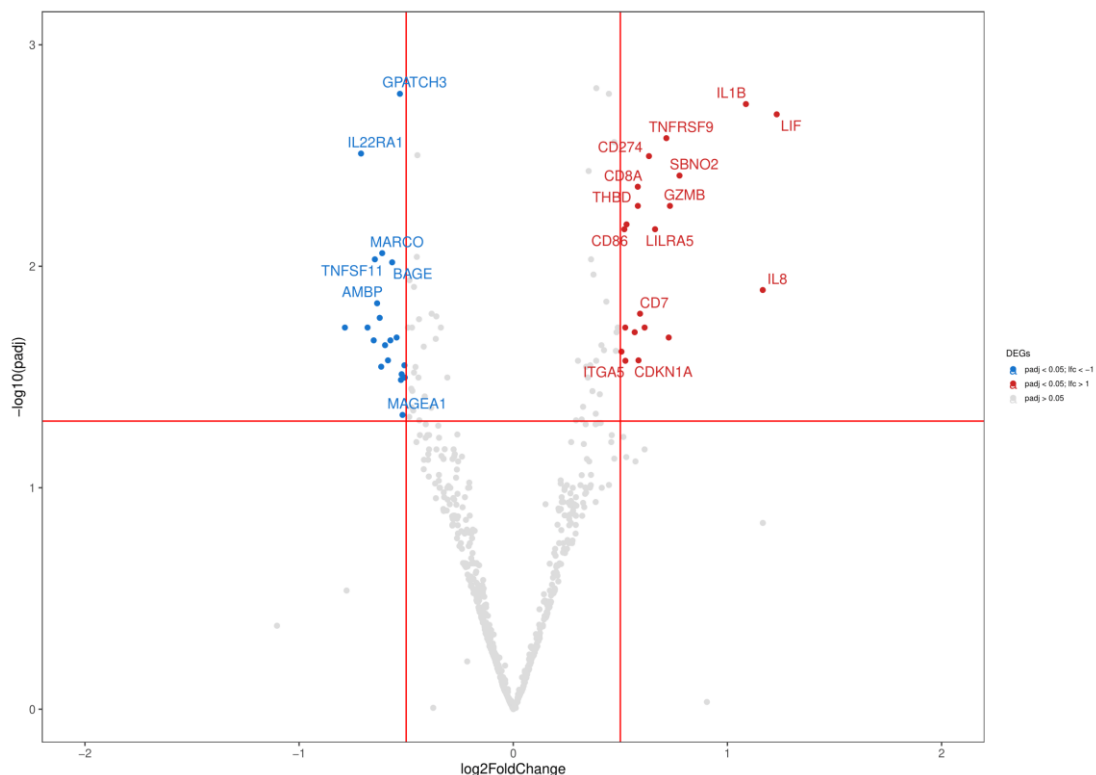


Figura 6. Gráfico de vulcão dos genes diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high. Plotting Plot da expressão diferencial utilizando o painel NanoString Immune Profiling comparando o grupo SNAI1 high com o SNAI1 low na coorte HC-FMRP. Adjusted p-value <0.05; Log2 fold change >0.5.

| Genes | log2 Fold Change | padj |
|-----------|------------------|-------------|
| SEMG1 | -5.690269993 | 0.030902773 |
| MAGEA3 | -0.786114777 | 0.018909478 |
| IL22RA1 | -0.710804223 | 0.003097284 |
| C4BPA | -0.680467246 | 0.018909478 |
| C8A | -0.651630366 | 0.021603141 |
| TNFSF11 | -0.646196121 | 0.009302828 |
| AMBP | -0.635771367 | 0.014694258 |
| TPTE | -0.62362376 | 0.017090758 |
| IL9 | -0.616732286 | 0.028411712 |
| MARCO | -0.612066136 | 0.008724503 |
| CRP | -0.598699866 | 0.02271632 |
| MAGEC1 | -0.58512851 | 0.026599265 |
| KIR3DL3 | -0.573851094 | 0.021603141 |
| BAGE | -0.565495685 | 0.009598744 |
| CTAGE1 | -0.54472972 | 0.020974095 |
| GPATCH3 | -0.529296123 | 0.001664389 |
| CCL16 | -0.524552026 | 0.032596869 |
| CCL25 | -0.521214466 | 0.030722298 |
| MAGEA1 | -0.517050627 | 0.04690076 |
| CLEC6A | -0.508280716 | 0.027996409 |
| S100A7 | -0.506367224 | 0.031796099 |
| ITGA2 | 0.505333993 | 0.024291331 |
| CD86 | 0.518660599 | 0.00680467 |
| CD80 | 0.522866706 | 0.018909478 |
| ITGA5 | 0.523483169 | 0.026712045 |
| ETS1 | 0.528847485 | 0.006469397 |
| EGR2 | 0.5669385 | 0.019852729 |
| NFKB2 | 0.571161831 | 9.05E-05 |
| CD8A | 0.581357555 | 0.004373771 |
| THBD | 0.58164587 | 0.005337877 |
| CDKN1A | 0.584617681 | 0.026599265 |
| CD7 | 0.591906097 | 0.016374788 |
| CTLA4 | 0.613343992 | 0.018909478 |
| ICOSLG | 0.615203558 | 9.45E-04 |
| CD274 | 0.633648259 | 0.003181821 |
| NFATC1 | 0.653300325 | 3.77E-05 |
| LILRA5 | 0.662064488 | 0.00680467 |
| CSF1 | 0.69539728 | 3.05E-04 |
| TNFRSF9 | 0.714792221 | 0.002639224 |
| ICAM4 | 0.725827902 | 0.020974095 |
| TNFAIP3 | 0.73084927 | 1.13E-04 |
| GZMB | 0.731510758 | 0.005337877 |
| ITGAX | 0.753376692 | 1.39E-04 |
| SBNO2 | 0.77621766 | 0.00389456 |
| RELB | 0.798303876 | 7.90E-06 |
| IL6R | 0.853274263 | 5.90E-04 |
| RUNX1 | 0.868002497 | 5.90E-04 |
| PLAU | 0.958573736 | 3.05E-04 |
| NFATC2 | 0.988017751 | 1.19E-04 |
| TREM1 | 1.023053373 | 9.05E-05 |
| ICOS | 1.048579406 | 4.06E-04 |
| THBS1 | 1.080157472 | 8.12E-05 |
| IL1B | 1.086327675 | 0.001851856 |
| IL8 | 1.164922627 | 0.012799752 |
| TNFRSF12A | 1.194897845 | 4.40E-05 |
| ICAM1 | 1.211492169 | 7.90E-06 |
| LIF | 1.230068993 | 0.002060424 |
| CCL2 | 1.242133322 | 2.81E-04 |
| PLAUR | 1.295102908 | 7.90E-06 |
| IL1RN | 1.345592849 | 3.79E-05 |

IL11

1.370503261

5.63E-04

Tabela 5. Genes diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high utilizando o painel NanoString PanCancer Immune Profiling na coorte HC-FMRP. Lista de genes down e upregulados no grupo SNAI1 high. Destacadas estão os genes que foram diferencialmente expressos em comum com a coorte TCGA. Adjusted p-value <0.05; Log2 fold change >0.5.

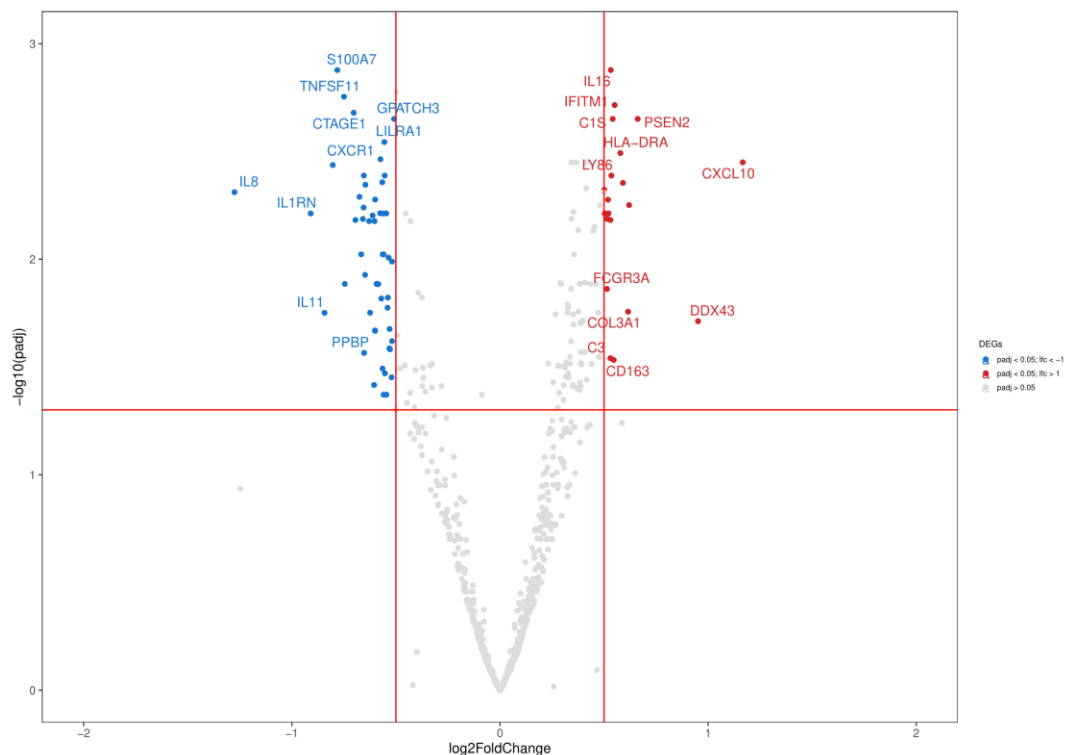


Figura 7. Gráfico de vulcão dos genes diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high. Plotting Plot da expressão diferencial utilizando o painel NanoString Immune Profiling comparando o grupo ZEB1 high com o ZEB1 low na coorte HC-FMRP. Adjusted p-value <0.05; Log2 fold change >0.5.

| Genes | log2 Fold Change | padj |
|---------|------------------|----------|
| SEMG1 | -57.153 | 0.0121 |
| IL8 | -12.757 | 0.0049 |
| MAGEC1 | -11.301 | 4.28E-05 |
| IL13 | -11.134 | 0.0001 |
| IL3 | -10.764 | 1.91E-05 |
| FCER2 | -0.9509 | 0.0001 |
| IL1RN | -0.9095 | 0.0061 |
| IL26 | -0.8699 | 0.0002 |
| TPTE | -0.8651 | 0.0007 |
| IL11 | -0.8428 | 0.0177 |
| MAGEC2 | -0.8032 | 0.0037 |
| IL4 | -0.7917 | 0.0005 |
| S100A7 | -0.7815 | 0.0013 |
| IL22RA2 | -0.7702 | 0.0003 |
| IFNA7 | -0.7524 | 0.0008 |
| TNFSF11 | -0.7495 | 0.0018 |
| IFNL1 | -0.7482 | 0.0006 |

| | | |
|---------------------------|---------|--------|
| ICAM4 | -0.7457 | 0.0130 |
| PLA2G1B | -0.7346 | 0.0005 |
| CTAG1B | -0.7161 | 0.0007 |
| CTAGE1 | -0.7027 | 0.0021 |
| SYCP1 | -0.7021 | 0.0009 |
| IRF1 | -0.6944 | 0.0066 |
| CCR3 | -0.6752 | 0.0051 |
| IL17F | -0.6666 | 0.0095 |
| AMBP | -0.6584 | 0.0065 |
| CCL7 | -0.6553 | 0.0058 |
| IL24 | -0.6540 | 0.0041 |
| PPBP | -0.6527 | 0.0272 |
| KIR_Activating_Subgroup_1 | -0.6480 | 0.0118 |
| CTCFL | -0.6466 | 0.0045 |
| IIGLL1 | -0.6288 | 0.0067 |
| SSX4 | -0.6242 | 0.0177 |
| DMBT1 | -0.6118 | 0.0063 |
| LIF | -0.6049 | 0.0383 |
| NCR1 | -0.6027 | 0.0067 |
| IL5 | -0.6005 | 0.0214 |
| CD1B | -0.5998 | 0.0215 |
| LILRA4 | -0.5998 | 0.0053 |
| PASD1 | -0.5929 | 0.0130 |
| CRP | -0.5846 | 0.0130 |
| IL12A | -0.5759 | 0.0061 |
| CXCR1 | -0.5742 | 0.0034 |
| CCL8 | -0.5700 | 0.0152 |
| CR2 | -0.5653 | 0.0044 |
| MME | -0.5642 | 0.0321 |
| GAGE1 | -0.5632 | 0.0095 |
| BAGE | -0.5610 | 0.0061 |
| IL22RA1 | -0.5592 | 0.0095 |
| CXCL3 | -0.5590 | 0.0425 |
| LILRA1 | -0.5553 | 0.0029 |
| IL23A | -0.5539 | 0.0041 |
| PLAUR | -0.5526 | 0.0338 |
| C6 | -0.5464 | 0.0061 |
| IL1B | -0.5456 | 0.0425 |
| CCL25 | -0.5399 | 0.0168 |
| CEACAM8 | -0.5384 | 0.0151 |
| ELANE | -0.5351 | 0.0098 |
| KIR_Activating_Subgroup_2 | -0.5315 | 0.0259 |
| KIR3DL3 | -0.5301 | 0.0211 |
| CSF2 | -0.5283 | 0.0262 |
| ICAM1 | -0.5207 | 0.0353 |
| IL19 | -0.5185 | 0.0240 |
| SERPIN2 | -0.5183 | 0.0103 |
| GPATCH3 | -0.5089 | 0.0022 |

| | | |
|----------|---------|----------|
| CC2D1B | -0.5049 | 0.0003 |
| SERPING1 | 0.5016 | 0.0048 |
| CTSS | 0.5035 | 0.0061 |
| NOL7 | 0.5144 | 0.0065 |
| FCGR3A | 0.5145 | 0.0137 |
| C1R | 0.5192 | 0.0053 |
| FN1 | 0.5215 | 0.0061 |
| C3 | 0.5307 | 0.0288 |
| MRC1 | 0.5309 | 0.0066 |
| IL16 | 0.5324 | 0.0013 |
| LY86 | 0.5351 | 0.0041 |
| C1S | 0.5417 | 0.0022 |
| CD163 | 0.5464 | 0.0293 |
| IFITM1 | 0.5510 | 0.0019 |
| LY96 | 0.5657 | 0.0003 |
| CD84 | 0.5710 | 0.0002 |
| HLA-DRA | 0.5787 | 0.0032 |
| MEFV | 0.5839 | 0.0001 |
| CCR2 | 0.5909 | 0.0044 |
| COL3A1 | 0.6155 | 0.0175 |
| HLA-G | 0.6203 | 0.0056 |
| LRP1 | 0.6450 | 0.0002 |
| PSEN2 | 0.6619 | 0.0022 |
| SPACA3 | 0.6899 | 0.0001 |
| FUT7 | 0.7051 | 0.0001 |
| HLA-DPB1 | 0.7586 | 0.0005 |
| HLA-DPA1 | 0.7748 | 0.0001 |
| PDGFRB | 0.7887 | 1.91E-05 |
| DDX43 | 0.9518 | 0.0194 |
| CXCL10 | 11.664 | 0.0036 |

Tabela 6. Genes diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high utilizando o painel NanoString PanCancer Immune Profiling na coorte HC-FMRP. Lista de genes down e upregulados no grupo ZEB1 high. Destacadas estão os genes que foram diferencialmente expressos em comum com a coorte TCGA. Adjusted p-value <0.05; Log2 fold change >0.5.

A análise posterior de enriquecimento de vias mostrou que as vias de resposta inflamatória e TNF de sinalização via NF-kB estavam enriquecidas no grupo SNAI1 high (Tabela 7), o que foi validado utilizando o painel PanCancer Pathway e a coorte do TCGA. A análise deste último painel (Tabela 8) e do TCGA (Tabela 9) também mostraram que outras vias de importância oncológica e imunológica também estão enriquecidas nesse grupo, como as vias de complemento, a de interferon gama e a de sinalização IL6/JAK/STAT3. Curiosamente, nenhuma via se mostrou enriquecida no grupo ZEB1 high, o que também foi observado utilizando o painel PanCancer Pathway, mas não foi observado na coorte do TCGA (Tabela 10).

SNAI1 high vs. SNAI1 low enriched pathways

HC-FMRP Cohort | Immune Profiling

| NAME | ES | NES | NOM p-val | FDR q-val |
|----------------------------------|----------|----------|-------------|-----------|
| HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE | 0.503603 | 1.669465 | 0.021645023 | 0.159407 |
| HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB | 0.576061 | 1.676952 | 0.07534247 | 0.302081 |

Tabela 7. Análise de enriquecimento para as comparações do SNAI1 na coorte HC-FMRP utilizando o painel NanoString Immune Profiling. Lista de vias que foram enriquecidas no grupo SNAI1 high baseado na análise do painel NanoString Immune Profiling. Adjusted p-value <0.1; Log2 fold change >0.05. ES – Pontuação de enriquecimento; NES – Pontuação de enriquecimento normalizada; NOM p-val – p-value nominal; FDR q-val – Taxa de falsa descoberta q-value.

SNAI1 high vs. SNAI1 low enriched pathway

HC-FMRP Cohort | PanCancer Pathway

| NAME | ES | NES | NOM p-val | FDR q-val |
|--|----------|----------|-----------|-----------|
| HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING | 0.442456 | 1.471205 | 0.028926 | 0.113425 |
| HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION | 0.529657 | 1.658555 | 0.041379 | 0.056496 |
| HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP | 0.542547 | 1.632273 | 0.049261 | 0.060688 |
| HALLMARK_P53_PATHWAY | 0.546263 | 1.732394 | 0.002165 | 0.041486 |
| HALLMARK_APOPTOSIS | 0.579474 | 1.806554 | 0.010707 | 0.029782 |
| HALLMARK_COMPLEMENT | 0.625901 | 1.727965 | 0.015453 | 0.037439 |
| HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION | 0.631449 | 1.813747 | 0.009456 | 0.033628 |
| HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING | 0.658436 | 1.855087 | 0.00232 | 0.041937 |
| HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE | 0.69512 | 1.831718 | 0.011628 | 0.033912 |
| HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB | 0.728122 | 1.857797 | 0.009732 | 0.079355 |
| HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE | 0.744928 | 1.802009 | 0.00905 | 0.026359 |

Tabela 8. Análise de enriquecimento para as comparações do SNAI1 na coorte HC-FMRP utilizando o painel NanoString PanCancer Pathway. Lista de vias que foram enriquecidas no grupo SNAI1 high baseado na análise do painel NanoString PanCancer Pathway. Adjusted p-value <0.1; Log2 fold change >0.05. ES – Pontuação de enriquecimento; NES – Pontuação de enriquecimento normalizada; NOM p-val – p-value nominal; FDR q-val – Taxa de falsa descoberta q-value.

SNAI1 high vs. SNAI1 low enriched pathway

TCGA Cohort

| NAME | ES | NES | NOM p-val | FDR q-val |
|--|----------|----------|-----------|-----------|
| HALLMARK_XENOBIOTIC_METABOLISM | 0.312204 | 1.397325 | 0.072261 | 0.136601 |
| HALLMARK_KRAS_SIGNALING_DN | 0.344153 | 1.537534 | 0.007833 | 0.084549 |
| HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE | 0.353516 | 1.508914 | 0.030973 | 0.09341 |
| HALLMARK_REACTIVE_OXYGEN_SPECIES_PATHWAY | 0.390601 | 1.428106 | 0.089069 | 0.124486 |
| HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_EARLY | 0.392693 | 1.675385 | 0.010638 | 0.043249 |

| | | | | |
|--|----------|----------|----------|----------|
| HALLMARK_WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING | 0.403115 | 1.463696 | 0.0625 | 0.109895 |
| HALLMARK_UV_RESPONSE_UP | 0.416472 | 1.813322 | 0.002146 | 0.021575 |
| HALLMARK_APICAL_SURFACE | 0.492982 | 1.748452 | 0.010917 | 0.029798 |
| HALLMARK_P53_PATHWAY | 0.502587 | 2.220581 | 0 | 2.50E-04 |
| HALLMARK_UV_RESPONSE_DN | 0.504094 | 1.807919 | 0.011952 | 0.021413 |
| HALLMARK_NOTCH_SIGNALING | 0.510058 | 1.801862 | 0.002114 | 0.021187 |
| HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING | 0.534665 | 1.741811 | 0.022822 | 0.029438 |
| HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING | 0.561177 | 1.9506 | 0.001988 | 0.00673 |
| HALLMARK_HYPOXIA | 0.570104 | 2.458724 | 0 | 0 |
| HALLMARK_COAGULATION | 0.573189 | 2.264283 | 0 | 8.85E-05 |
| HALLMARK_MYOGENESIS | 0.576823 | 1.76408 | 0.046256 | 0.026971 |
| HALLMARK_APICAL_JUNCTION | 0.584497 | 2.203878 | 0 | 3.38E-04 |
| HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE | 0.585365 | 1.655948 | 0.063116 | 0.04673 |
| HALLMARK_APOPTOSIS | 0.589809 | 2.495886 | 0 | 0 |
| HALLMARK_COMPLEMENT | 0.591718 | 2.35115 | 0 | 0 |
| HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP | 0.595936 | 2.387524 | 0 | 0 |
| HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING | 0.613843 | 2.526611 | 0 | 0 |
| HALLMARK_ANGIOGENESIS | 0.649836 | 2.030433 | 0 | 0.002961 |
| HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE | 0.656195 | 2.143684 | 0.004057 | 6.55E-04 |
| HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING | 0.690886 | 2.344896 | 0 | 0 |
| HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE | 0.697297 | 2.440873 | 0 | 0 |
| HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION | 0.709801 | 2.362082 | 0 | 0 |
| HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION | 0.755709 | 2.379858 | 0 | 0 |
| HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB | 0.75941 | 2.531021 | 0 | 0 |

Tabela 9. Análise de enriquecimento para as comparações do SNAI1 na coorte do TCGA. Lista de vias que foram enriquecidas no grupo SNAI1 high baseado na análise da coorte do TCGA. Destacadas estão as vias que foram diferencialmente expressas em comum com a coorte HC-FMRP. Adjusted p-value <0.1; FDR <0.25; Log2 fold change >0.05. ES – Pontuação de enriquecimento; NES – Pontuação de enriquecimento normalizada; NOM p-val – p-value nominal; FDR q-val – Taxa de falsa descoberta q-value.

**ZEB1 high vs. ZEB1 low enriched pathway
TCGA Cohort**

| NAME | ES | NES | NOM p-val | FDR q-val |
|------------------------------------|----------|----------|-----------|-----------|
| HALLMARK_MYC_TARGETS_V2 | -0.68058 | -1.92506 | 0.002075 | 0.018254 |
| HALLMARK_MYC_TARGETS_V1 | -0.61657 | -1.97229 | 0.002004 | 0.022848 |
| HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE | -0.49049 | -1.91867 | 0.00616 | 0.013458 |
| HALLMARK_DNA_REPAIR | -0.47121 | -1.82858 | 0.002198 | 0.023917 |

| | | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|
| HALLMARK_APOPTOSIS | 0.415065 | 1.71091 | 0.017505 | 0.046653 |
| HALLMARK_HYPOXIA | 0.448481 | 1.880721 | 0.002227 | 0.017619 |
| HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING | 0.468615 | 1.873284 | 0.004577 | 0.016897 |
| HALLMARK_COAGULATION | 0.487827 | 1.88229 | 0 | 0.020136 |
| HALLMARK_APICAL_SURFACE | 0.489335 | 1.770653 | 0.006508 | 0.033564 |
| HALLMARK_COMPLEMENT | 0.508445 | 2.026135 | 0.002193 | 0.006159 |
| HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP | 0.533953 | 2.11159 | 0 | 0.003742 |
| HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE | 0.535708 | 1.844692 | 0.004283 | 0.017369 |
| HALLMARK_ANGIOGENESIS | 0.560702 | 1.742248 | 0.02148 | 0.038645 |
| HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING | 0.562719 | 1.916748 | 0 | 0.016842 |
| HALLMARK_APICAL_JUNCTION | 0.569412 | 2.161496 | 0 | 0.003675 |
| HALLMARK_HEDGEHOG_SIGNALING | 0.57368 | 1.852691 | 0.00641 | 0.017339 |
| HALLMARK_MYOGENESIS | 0.629778 | 1.866281 | 0.009456 | 0.016097 |
| HALLMARK_UV_RESPONSE_DN | 0.638345 | 2.182385 | 0 | 0.004236 |
| HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION | 0.703393 | 2.207968 | 0 | 0.003722 |

Tabela 10. Análise de enriquecimento para as comparações do ZEB1 na coorte do TCGA. Lista de vias que foram enriquecidas no grupo ZEB1 high baseado na análise da coorte do TCGA. Destacadas estão as vias que foram diferencialmente expressas em comum com a coorte HC-FMRP. Adjusted p-value <0.1; FDR <0.25; Log2 fold change >0.05. ES – Pontuação de enriquecimento; NES – Pontuação de enriquecimento normalizada; NOM p-val – p-value nominal; FDR q-val – Taxa de falsa descoberta q-value.

4.4. Análise de miRNAs

A análise dos microRNAs diferencialmente expressos mostrou quatro miRNAs upregulados no grupo SNAI1 high (Tabela 11) e 23 miRNAs upregulados no grupo ZEB1 high (Tabela 12). Entre os miRNAs upregulados, pelo menos dois no grupo SNAI1 high (hsa-miR-1286 e hsa-miR-92a-1-5p) e pelo menos seis no grupo ZEB1 high (hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374a-3p, hsa-miR-494-3p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-523-5p, hsa-miR-548j-3p) tem como alvo outros genes relacionados a EMT.

| Differentially expressed miRNAs - SNAI1 high vs. SNAI1 low | | | | | | |
|--|----------------|-------|-------|--|---|--|
| miRNAs | Targeted Genes | | | | Pathways | |
| <i>up</i> hsa-miR-1286 | CLU | | | | Cholesterol Homeostasis, Coagulation, Apoptosis, Myogenesis, Complement | |
| <i>up</i> hsa-miR-211-3p | CYLD | THBS1 | VCAM1 | Epithelial Mesenchymal Transition, TGF-β Signaling, Coagulation, Apoptosis, Interferon Gamma Response, Apical Junction | | |
| <i>up</i> hsa-miR-642a-5p | RUNX1 | IL2RA | EGR1 | TNFRSF13B | UV Response Dn, IL-2/STAT5 Signaling, TNF-alpha Signaling via NF-kB, IL-6/JAK/STAT3 Signaling | |

| | | | | | | |
|-----------|-------------------------|---|---|---|----------------------|---|
| | MAPK14 DUSP4 | SMAD2 PYCARD | TNFRSF8 CHUK | | | |
| <i>up</i> | <i>hsa-miR-92a-1-5p</i> | FAZ IL1A POU2F2 TP53 CREB5 TNFRSF12A | CD38 CD74 CD59 BIRC5 ICAM1 MAPK1 | IKBKB BCL6 TNFRSF10B CDKN1A ILF3 CD164 | THBS1 APP NEFL | Apoptosis, Interferon Gamma Response, p53 Pathway, IL-6/JAK/STAT3 Signaling, TNF-alpha Signaling via NF-kB, E2F Targets, Epithelial Mesenchymal Transition, Allograft Rejection, Inflammatory Response, PI3K/AKT/mTOR Signaling |

Tabela 11. Micro-RNAs diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high da coorte HC-FMRP. Lista de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SNAI1 high de acordo com análise do painel NanoString Human V3 miRNA. As colunas dois e três mostram os genes e vias alvo dos miRNAs enriquecidos.

| Differentially expressed miRNAs - ZEB1 high vs. ZEB1 low | | | | | | |
|--|--------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|--|
| miRNAs | Targeted Genes | | | | Pathways | |
| <i>Down</i> | <i>hsa-miR-199a-3p</i> | MAPK14 | FAS | ILF3 | FAS | TNF-alpha Signaling via NF-kB, Hypoxia, Epithelial Mesenchymal Transition, p53 Pathway, PI3K/AKT/mTOR Signaling, Interferon Gamma Response, IL-6/JAK/STAT3 Signaling, Apoptosis, TGF-beta Signaling, Allograft Rejection |
| | | VEGFA | RUNX1 | MAP3K1 | RUNX1 | |
| | | CD44 | CCND3 | RORA | PTGS2 | |
| | | PTGS2 | ETS1 | TFRC | ETS1 | |
| | | MAPK1 | CREB1 | TANK | C3 | |
| | | MAPK8 | TGFB1 | MICB | FN1 | |
| | | APOE | FOS | TXNIP | GTF3C1 | |
| | | HLA-B | TBK1 | HLA-B | ILF3 | |
| | | THBS1 | C3 | THBS1 | MAP3K1 | |
| | | CD164 | FN1 | CD164 | | |
| | CDKN1A | GTF3C1 | CD44 | | | |
| | TXNIP | TANK | MAPK8 | | | |
| <i>Down</i> | <i>hsa-miR-199b-5p</i> | AXL | TNFRSF13C | APP | CSF3 | Epithelial Mesenchymal Transition, IL-2/STAT5 Signaling, Inflammatory Response, Coagulation, Apoptosis, TNF-alpha Signaling via NF-kB, p53 Pathway, Complement |
| | | KIT | THBS1 | FN1 | | |
| | | LIF | CD44 | ILF3 | | |
| | | PIN1 | CD59 | IL1RL1 | | |
| <i>Up</i> | <i>hsa-miR-1224-5p</i> | CREB1 | BAX | TNFRSF11B | NEFL | Allograft Rejection, Apical Junction, Inflammatory Response |
| | | HLA-DRA | ICAM1 | AXL | | |
| | | CD207 | IKBKB | LAMP1 | | |
| <i>Up</i> | <i>hsa-miR-1246</i> | RORA | NFATC3 | TP53 | | p53 Pathway, Wnt-beta Catenin Signaling, Apoptosis, IL-2/STAT5 Signaling, Hypoxia, Interferon Gamma Response, Protein Secretion, Interferon Alpha Response |
| | | TAPBP | BAX | BCL2 | | |
| | | LAMP2 | CD164 | TXNIP | | |
| <i>Up</i> | <i>hsa-miR-128-1-5p</i> | BMI1 | IL21R | | | |
| <i>Up</i> | <i>hsa-miR-1305</i> | EP300 | PAX5 | CREBBP | RUNX1 | Apoptosis, TGF-beta Signaling, IL-2/STAT5 Signaling, Allograft Rejection, Interferon Gamma Response, Complement |
| | | FCGR2A | PRKCD | DOCK9 | TXNIP | |
| | | TNFRSF9 | MAP3K7 | MAVS | | |
| | | MAGEA12 | COLEC12 | IRF4 | | |
| <i>Up</i> | <i>hsa-miR-181a-2-3p</i> | MAPK14 | GPI | PSMB7 | TAP1 | IL-2/STAT5 Signaling, UV Response Dn, Apoptosis, Interferon Gamma Response, Allograft Rejection, Coagulation, IL-6/JAK/STAT3 Signaling, Protein Secretion, Interferon Alpha Response, Notch Signaling |
| | | TNFRSF13B | TYK2 | RPS6 | ALCAM | |
| | | REPS1 | OAS3 | IRF4 | CDK1 | |
| | | FYN | FN1 | THBS1 | IGF2R | |
| | | BAX | EGR1 | IGF1R | PSMB8 | |
| | | DOCK9 | PIN1 | BCL10 | HLA-E | |
| | | ITGA6 | IL6ST | NOTCH1 | LTA | |
| | | NRP1 | CD63 | ITGA5 | | |

| | | | | | | |
|----|------------------------|---|---|---|---|---|
| Up | <i>hsa-miR-3151-5p</i> | HLA-C | MAF | PIN1 | | Interferon Alpha Response, Androgen Response, PI3K/AKT/mTOR Signaling |
| Up | <i>hsa-miR-3168</i> | VEGFA | ANP32B | SMAD2 | | Hedgehog Signaling, |
| Up | <i>hsa-miR-369-3p</i> | PRKCD CXCL5 VEGFA LAMP3 LAMP2 | MAP2K4 MEF2C MAPK1 ATF2 IL6ST | CD164 TMEFF2 ITGB1 TNFRSF11B MAP2K1 | CD47 TXNIP | Interferon Alpha Response, Protein Secretion, Epithelial Mesenchymal Transition, Angiogenesis, Hedgehog Signaling, UV Response Up, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Myogenesis, Apical Junction, Complement |
| Up | <i>hsa-miR-374a-3p</i> | ENTPD1 CEBPB TNFRSF9 | SMAD2 AKT3 MAP2K4 | NRP1 SMPD3 VEGFA | FN1 ITGB1 | Angiogenesis, Hedgehog Signaling, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Epithelial Mesenchymal Transition, Unfolded Protein Response, Pancreas Beta Cells, UV Response Dn, IL-2/STAT5 Signaling, Apical Junction, Complement |
| Up | <i>hsa-miR-4443</i> | CLU TXNIP | TICAM1 IFNAR1 | HLA-DQA1 | | Apoptosis, Interferon Gamma Response, Cholesterol Homeostasis, IL-6/JAK/STAT3 Signaling, Interferon Alpha Response, Coagulation, Myogenesis, p53 Pathway, Complement, Allograft Rejection |
| Up | <i>hsa-miR-4448</i> | MRC1 | PRKCD | SLAMF1 | | UV Response Up, Complement, Inflammatory Response |
| Up | <i>hsa-miR-4516</i> | CDKN1A CEBPB | STAT3 TP53 | MAF CCL16 | TRAF6 | Wnt-beta Catenin Signaling, TNF-alpha Signaling via NF-kB, p53 Pathway, Interferon Gamma Response, E2F Targets |
| Up | <i>hsa-miR-489-3p</i> | NFATC2 CYLD NRP1 | EP300 NFKBIA CD81 | MAPK14 NLRC5 BMI1 | | Angiogenesis, Hedgehog Signaling, UV Response Dn, IL-2/STAT5 Signaling, Interferon Gamma Response |
| Up | <i>hsa-miR-494-3p</i> | BIRC5 BCL2 BMI1 IGF1R IL1RAP MAPK1 MAP2K1 CXCR4 TMEFF2 LAMP2 | PLAUR FAS ITCH ATG16L1 ITGA6 ABL1 CD276 CCND3 STAT1 TNFAIP3 | PLAU LRP1 CDKN1A LIF IL6ST ANP32B THBS1 ITGB1 UBC THY1 | MAPKAPK2 CXCL3 AXL COL3A1 STAT3 STAT5B CD55 IGF2R MAGEA3 MIF | Epithelial Mesenchymal Transition, IL-6/JAK/STAT3 Signaling, IL-2/STAT5 Signaling, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Hypoxia, Interferon Gamma Response, Complement, Inflammatory Response, Allograft Rejection, KRAS Signaling Up |
| Up | <i>hsa-miR-510-3p</i> | CCR5 IL1RAP | IL6R SPN | TGFB2 UBC | | Allograft Rejection, Apoptosis |
| Up | <i>hsa-miR-518e-5p</i> | NFATC3 | TNFAIP3 | | | KRAS Signaling Up, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Hypoxia, Interferon Gamma Response, Complement, Epithelial Mesenchymal Transition |
| Up | <i>hsa-miR-519a-5p</i> | NFATC3 TNFAIP3 | AKT3 CDKN1A | NFATC3 TNFAIP3 | NFATC3 TNFAIP3 | Pancreas Beta Cells, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Hypoxia, Interferon Gamma Response, PI3K/AKT/mTOR Signaling, UV Response Dn, Apoptosis, p53 Pathway, Myogenesis, KRAS Signaling Up |
| Up | <i>hsa-miR-522-5p</i> | NFATC3 TNFAIP3 CASP10 LAMP2 CX3CL1 BID CD44 IFNGR1 CDH1 CASP8 TFRC ST6GAL1 GTF3C1 | CCL22 GPI TYK2 ENG GATA3 C1QBP NUP107 MAPK14 VEGFA TTK IFIH1 FN1 CD46 | IL15RA CD164 RPS6 THBS1 IGF1R TP53 IFNAR1 PDGFC ATG12 ATM TIRAP MX1 RUNX1 | STAT2 BCL2L1 CEBPB MYD88 RELA TRAF6 SMAD2 IRAK1 CSF1 LAMP1 HMGB1 IL1RAP MME | IL-6/JAK/STAT3 Signaling, Complement, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Interferon Gamma Response, Apoptosis, Interferon Alpha Response, IL-2/STAT5 Signaling, Inflammatory Response, Allograft Rejection, KRAS Signaling Up |

| | | | | | |
|-------------------------------------|---|---|---|---|--|
| | ITCH CD59 ATG16L1 BAX MAVS MAP3K1 NRP1 EP300 NFATC2 | TNFSF18 DUSP4 IRF1 IRF3 ELK1 ILF3 IL13RA1 ITGB4 IL6ST | MAPKAPK2CD47 CTSS CASP3 C2 FADD BMI1 STAT3 IL7R ALCAM | ADA IGF2R MAP3K5 TAP2 ITGA1 TAPBP TICAM2 CFB | |
| <i>Up</i> <i>hsa-miR-523-5p</i> | NFATC3 | TNFAIP3 | | | KRAS Signaling Up, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Hypoxia, Interferon Gamma Response, Complement, Epithelial Mesenchymal Transition |
| <i>Up</i> <i>hsa-miR-548j-3p</i> | CXCR5 CD1D CD59 | HMGB1 IL6R MEF2C | MAP3K1 TNFAIP3 VCAM1 | TNFSF15 ICOSLG MICA | Epithelial Mesenchymal Transition, KRAS Signaling Up, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Hypoxia, Interferon Gamma Response, Complement, Allograft Rejection, Inflammatory Response |
| <i>Up</i> <i>hsa-miR-575</i> | BCL2L1 | POU2F2 | MAVS | ARG2 | Apoptosis, IL-2/STAT5 Signaling, Xenobiotic Metabolism |
| <i>Up</i> <i>hsa-miR-630</i> | BCL2 IGF1R | IL6R CD200 | SELE TLR4 | BTLA | IL-2/STAT5 Signaling, Estrogen Response Early, UV Response Dn |
| <i>Up</i> <i>hsa-miR-642a-3p</i> | CDKN1A HMGB1 | MAP3K5 SYK | TXNIP | | Apoptosis, Interferon Gamma Response, p53 Pathway, Interferon Alpha Response, PI3K/AKT/mTOR Signaling, Myogenesis, TNF-alpha Signaling via NF-kB, Hypoxia, Apical Junction, mTORC1 Signaling |

Tabela 12. Micro-RNAs diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high da coorte HC-FMRP. Lista de miRNAs diferencialmente expressos no grupo ZEB1 high de acordo com análise do painel NanoString Human V3 miRNA. As colunas dois e três mostram os genes e vias alvo dos miRNAs enriquecidos.

4.5. Análise de marcadores de evasão imune e citometria digital utilizando uma coorte do TCGA

Como forma de validação adicional, nós comparamos os níveis de expressão de checkpoints imunológicos e de genes relacionados a evasão imune entre os nossos grupos de interesse e avaliamos a abundância relativa de células imunes no microambiente tumoral utilizando o algoritmo do CIBERSORT numa coorte de adenocarcinoma de próstata do TCGA.

A análise dos genes relacionados a evasão imune mostrou uma expressão significativamente elevada de *CTLA-4*, *PD-L1*, *TIM3*, *DCR3* e *IL10* nos grupos SNAI1 high e ZEB1 high em relação aos seus respectivos controles (Figuras 8 e 9). Já a análise de citometria digital mostrou que a expressão de ambos os marcadores está associada a um enriquecimento de células quiescentes, como os linfócitos B naïve, no microambiente tumoral (Figura 10, Figura 11). Além disso, a alta expressão de ZEB1 também se mostrou associada a uma depleção de células efetoras, como os linfócitos CD8, e a uma polarização M0-M2 de macrófagos associados ao tumor.

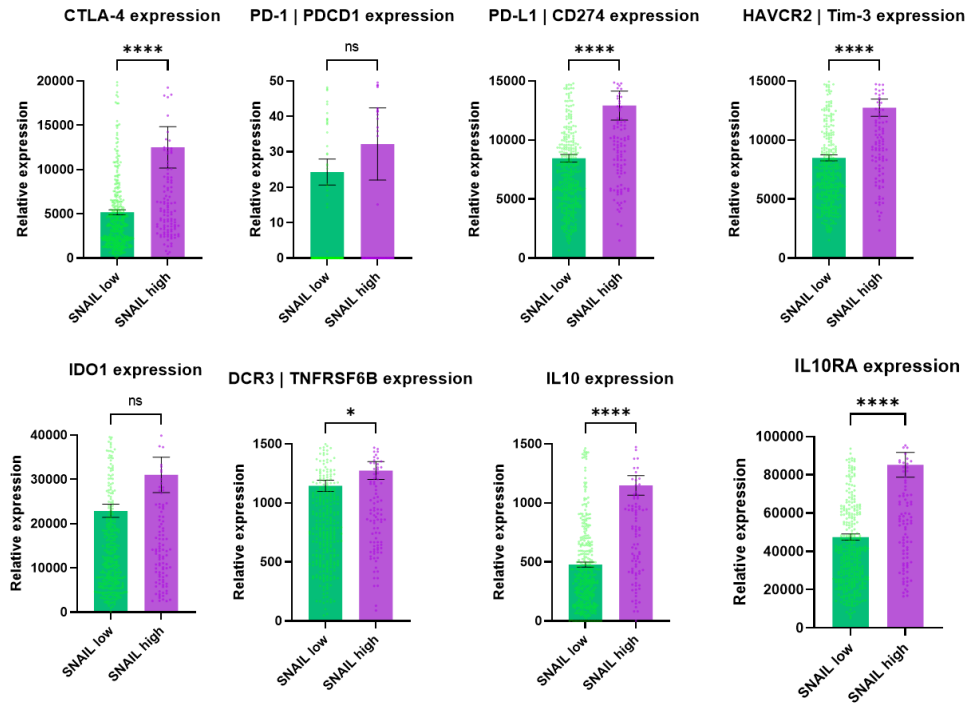


Figura 8. Efeito da alta e da baixa expressão do SNAI1 na expressão relativa de gene codificadores de checkpoints imunológicos e supressores imunes – Análise da expressão da marcadores imunomodulatórios conhecidos mostra um aumento da expressão relativa de CTLA-4, PD-L1, TIM-3, DCR3, IL10 e IL10RA no grupo SNAI1 high na coorte do TCGA. *P<0.05, Mann-Whitney test.

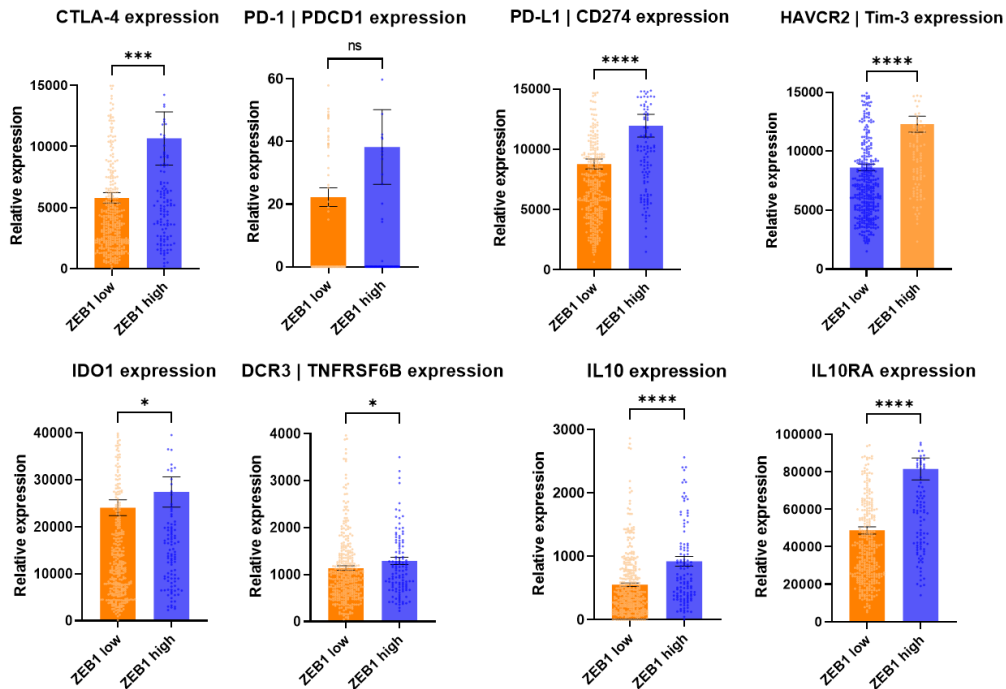


Figura 9. Efeito da alta e da baixa expressão do ZEB1 na expressão relativa de gene codificadores de checkpoints imunológicos e supressores imunes – Análise da expressão da marcadores imunomodulatórios conhecidos mostra um aumento da expressão relativa de CTLA-4, PD-L1, TIM-3, DCR3, IL10 e IL10RA no grupo ZEB1 high na coorte do TCGA. *P<0.05, Mann-Whitney test.

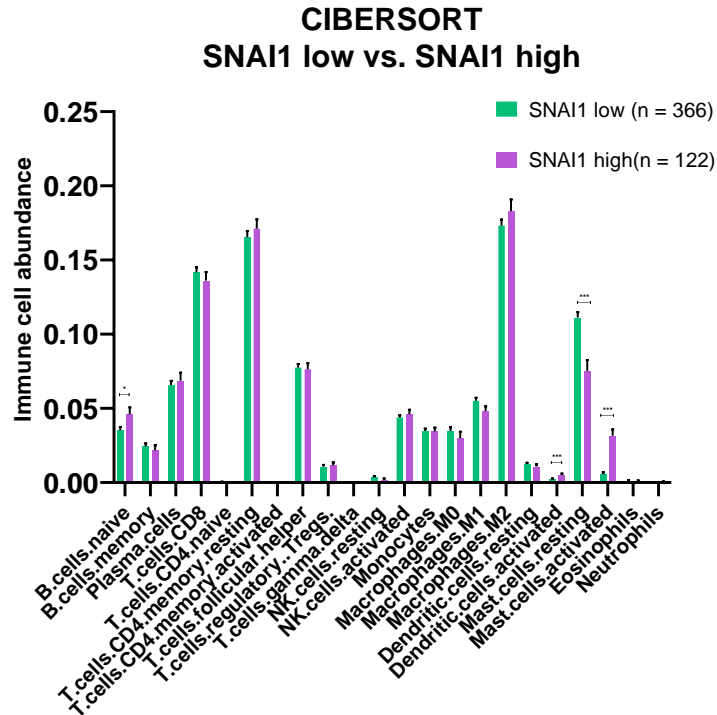


Figura 10. Efeito da alta e da baixa expressão de SNAI1 na abundância relativa de células immune na coorte do TCGA – Citometria digital baseada no método de deconvolução mostra um aumento da abundancia relativa de naïve B cells, resting dendritic cells e activated mast cells e uma diminuição da abundancia de resting mast cells no grupo SNAI1 high. * $p < 0.05$, multiple t tests.

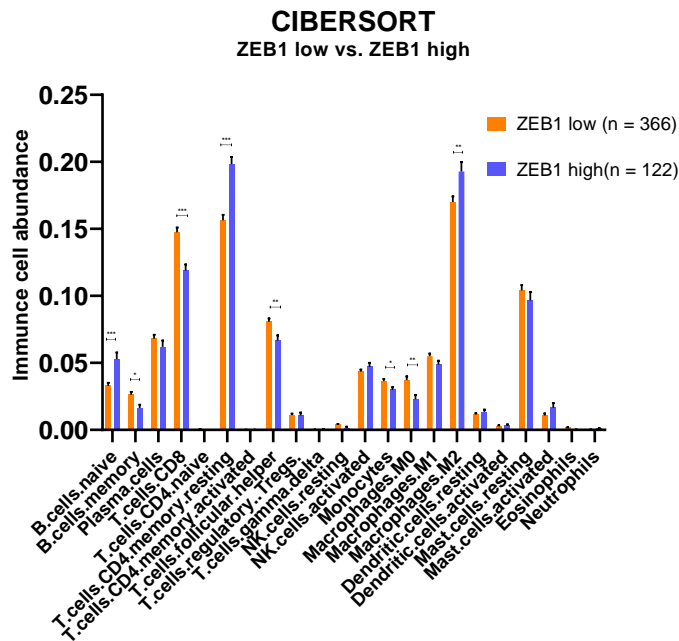


Figura 11. Efeito da alta e da baixa expressão de ZEB1 na abundancia relativa de células immune na coorte do TCGA – Citometria digital baseado em deconvolução mostra um aumento da abundancia de naïve B cells, resting memory CD4+ T cells e M2 macrophages e uma diminuição na abundancia de memory B cells, CD8 T cells, follicular T helper cells, monocytes e M0 macrophages. * $p < 0.05$, multiple t tests.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

5. Discussão e conclusão

Um importante hallmark do câncer é entender como os tumores conseguem evadir o sistema imune do hospedeiro (HANAHAN, 2022; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essa é uma vantagem adaptativa importante para a sobrevivência, para a manutenção e para a evolução do câncer, especialmente após o sucesso emergente dos diferentes tipos de imunoterapia. O PCa é um tumor considerado imunologicamente frio, ou seja, um tipo tumoral que teve sucesso na evasão imune e que, conseqüentemente, não responde bem a imunoterapia.

A EMT é um processo envolvido em diversos aspectos da progressão tumoral e, recentemente, evidências tem apontado para a modulação imune como um desses processos. No PCa, essa via já havia se mostrado fortemente relacionada a caracteres de progressão e agressividade, como migração, invasão e potencial metastático aumentado. De fato, estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que a via de EMT parece estar relacionada a um risco aumentado e uma maior chance de recorrência, o que justifica uma investigação aprofundada do papel desse processo nesse tipo de tumor.

O *SNAI1* e o *ZEB1* são fatores de transcrição intimamente envolvidos na EMT e cuja expressão tem sido associada a evasão imune em diversos tipos tumorais. No PCa, entretanto, o papel desse processo na modulação imune antitumoral ainda não foi bem investigado e é uma das novidades do presente estudo.

A análise dos dados clínicos da nossa coorte mostrou que a expressão do *SNAI1* está relacionada a um perfil patológico mais agressivo e a expressão do *ZEB1*, a uma maior chance de recorrência, achados que estão de acordo com dados da literatura. Trabalhos anteriores já relacionaram diversos marcadores de EMT a recorrência no PCa (CHEAITO et al., 2019; FIGIEL et al., 2017), e um estudo com pacientes dessa doença mostrou que, de fato, a expressão aumentada de *SNAI1* está relacionada a uma maior pontuação de Gleason, score patológico do qual deriva o ISUP (EPSTEIN et al., 2016; POBLETE et al., 2014).

Nossa investigação mostrou que a alta expressão desses marcadores está associada a mudanças transcricionais amplas, capaz de modificar de maneira contundente o comportamento tumoral. Muitos dos genes diferencialmente expressos estão relacionados a progressão e a agressividade, e que pode explicar relação da EMT com os achados clínicos supramencionados. O gene *ETS1*, que apareceu upregulado no grupo *SNAI1*

high, foi previamente associado EMT em células de PCa (RODGERS et al., 2019). Evidências mostram que esse gene da família ETS também está associado a quimioresistência, a invasão, a proliferação, a metástase e a um fenótipo resistente a castração (KATO et al., 2012; SMITH et al., 2012; XU et al., 2017). O gene *RUNX1* também apareceu upregulado nesse grupo. No PCa, o papel dele é ambivalente – em tumores independentes do andrógeno a sua expressão está relacionada a um bom prognóstico, mas em tumores dependentes do AR ela está envolvida no crescimento mediado por esse hormônio (LIN, 2022; TAKAYAMA et al., 2014). Os genes *PDGFRB* e *CXCL10* apareceram upregulados no grupo ZEB1 high. O primeiro foi previamente associado a metástase em cânceres de mama e o segundo, a recorrência e a um pior prognóstico em PCa (GWAK et al., 2020; NAGAYA et al., 2020; SHI et al., 2020). Esses achados estão de acordo com trabalhos anteriores mostrando que a EMT pode induzir uma assinatura transcricional associada a agressividade em diversos tipos tumorais, inclusive no PCa (BHOWMIK et al., 2015; SABBAAH et al., 2008; SANDSMARK et al., 2016).

Como esperado, alguns dos genes diferencialmente expressos estão classicamente envolvidos com processos de evasão imune, o que já havia sido mostrado em outros tipos tumorais (BLOCK et al., 2019; TERRY et al., 2020). O *CTLA-4* e o *CD274*, ambos upregulados no grupo SNAI1 high, são codificadores dos principais checkpoints imunológicos das células T. Quando expresso por essas células, o CTLA-4 se liga aos receptores CD80/86 das células apresentadoras de antígenos, impedindo a ligação deles ao receptor CD28 do linfócito e a consequente proliferação dessas células. O PD-L1, codificado pelo gene *CD274*, pode ser expresso pelas células tumorais e mimetiza a função das células Tregs. Essa molécula se liga ao PD-1 expresso pelos linfócitos T e ativa uma cascata inibitória que impede a ativação e a proliferação dessas células imunes (ZHANG et al., 2021). Sozinhos esses dados poderiam sugerir um possível mecanismo para a exclusão imunológica no microambiente tumoral do PCa através da inativação de células T e, portanto, da incapacidade de reconhecimento de neoantígenos tumorais.

O grupo ZEB1 high, por outro lado, mostrou resultados ambivalentes. Ao mesmo tempo que apresentou uma upregulação de genes relacionados aos complexos apresentadores de antígeno, o que poderia provocar uma melhor resposta imune antitumoral (GARRIDO et al., 2016), também teve enriquecidos genes como o *HLA-G* e o *CD84*, que tem sido estudados como possíveis imunossupressores e checkpoints

imunológicos em potencial em outros tipos tumorais (CUENCA et al., 2019; KRIJGSMAN et al., 2020; LEWINSKY et al., 2021; MORANDI; AIROLDI, 2022).

Curiosamente, alguns dos genes com potencial clínico investigados no painel tem comportamentos diferentes entre os grupos SNAI1 high e ZEB1 high na comparação com os respectivos controles. O *IL8* e o *LIF*, por exemplo, ambos associados a um pior prognóstico, aparecem upregulados no grupo SNAI1 high, mas downregulados no grupo ZEB1 low (LOPEZ-BUJANDA et al., 2021; VISWANADHAPALLI et al., 2022).

A análise de enriquecimento de vias mostrou que a via de resposta inflamatória e a via de sinalização TNF-alfa via NF-kB estão enriquecidas no grupo SNAI1 high, o que também foi observado na validação utilizando o painel PanCancer Pathway e a coorte do TCGA. Apesar de se tratarem de vias pró-inflamatórias, o que pode induzir a ativação de células imunes, a promoção de inflamação no microambiente tumoral do PCa também pode ser pró-tumorigênica (DE BONO et al., 2020).

Ao encontro dessa interpretação, as análises utilizando o painel PanCancer Pathway e a coorte do TCGA, mostraram que outras vias pró-tumorigênicas também apareceram enriquecidas nesse grupo. A via PI3K/AKT/MTOR é amplamente associada a proliferação celular descontrolada e a perda do supressor tumoral *PTEN*; vias relacionadas a citocina IL6 estão relacionadas a atividade androgênica aumentada; e as vias relacionadas ao orquestrador de inflamação NK-kB, bem como as vias do complemento e STAT3, foram previamente associadas a progressão tumoral (HANDLE et al., 2018; JAMASPISHVILI et al., 2018; STAAL; BEYAERT, 2018; STALLONE et al., 2020).

Curiosamente, nenhuma via apareceu enriquecida no grupo ZEB1 high, apesar do grande número de genes diferencialmente expressos. Uma possível explicação está relacionada aos miRNAs upregulados nesse grupo. Apesar dos resultados de miRNAs downregulados estimularem a EMT e as vias pro-tumorigênicas associados a esse processo, seis dos miRNAs upregulados controlam, entre outros, genes relacionados a EMT, o que sugere que a expressão do *ZEB1* elicia um mecanismo de contrabalanço desse processo e a consequente diminuição do seu impacto transcricional. No SNAI1, por outro lado, o número de miRNAs capazes de controlar a EMT e as outras vias pró-tumorigênicas foi menor, o que justifica a atividade mais claramente associada a progressão tumoral e a evasão imune. De fato, trabalhos anteriores mostraram que tanto

a EMT quando a expressão do ZEB1 são fortemente controlados por esses componentes gênicos não codificantes (DING, 2014; ZARAVINOS, 2015; ZHANG et al., 2019). O fato de o *ZEB1* ser um efetor da EMT e estar abaixo do *SNAI1* na cascata de ativação dessa via poderia justificar um estágio mais avançado do processo e uma consequente necessidade fisiológica de contrabalanço da EMT.

Investigações adicionais utilizando a coorte pública do TCGA mostraram que ambos os genes investigados estão associados a expressão dos marcadores de evasão imunológica *CTLA-4*, *PD-L1*, *TIM3*, *DCR3* e *IL10* (KHALIL et al., 2016; MORANDI; AIROLDI, 2022). A expressão desses marcadores justifica, não só uma inativação das células T, mas uma supressão imune generalizada no microambiente tumoral. Uma outra possibilidade é que, associado a expressão de vias e marcadores pró-inflamatórios, esse microambiente possa estar induzindo uma exaustão das células T, o que poderia justificar a falta de resposta aos bloqueadores de checkpoints mesmo mediante a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4.

Complementarmente, a análise de citometria digital mostrou que esses genes estão relacionados ao aumento de células imunes quiescentes e, portanto, não efectoras no microambiente tumoral; e a depleção de células efectoras antitumorais, como linfócitos T CD8 e linfócitos T foliculares (RENAUDE et al., 2021; TANOUE et al., 2019). O ZEB1 ainda se mostrou associado a um aumento de macrófagos de polarização M2, conhecidamente envolvidos na supressão da atividade imunológica (ERLANDSSON et al., 2019). Esses dados sugerem que o processo de EMT possa influenciar não só as células tumorais, mas o microambiente tumoral como um todo. A depleção de células imunes efectoras e o aumento de células quiescentes poderia justificar a dificuldade do sistema imune hospedeiro em reconhecer esse tecido estranho e, portanto, em responder a imunoterapia.

Coletivamente, nossos resultados corroboram a extensa literatura que atribui a EMT caracteres de progressão e agressividade quando expresso em microambientes tumorais. No PCa, a relação entre a EMT e os processos oncogênicos são bem estabelecidos, mas esse é o primeiro trabalho investigando, de maneira específica, a associação entre marcadores moleculares da EMT e marcadores bem estabelecidos de evasão imune. Nós sugerimos que a ativação desse processo no microambiente tumoral ativa genes e vias com a capacidade de promover inflamação nesse microambiente, mas

também de inibir uma resposta celular efetiva, o que favorece o crescimento tumoral, garante uma maior agressividade e impede tanto a resposta imune natural como a resposta imune estimulada pela imunoterapia.

O *SNAI1* é o principal marcador de EMT no PCa. Nesse estudo ele se mostrou consistentemente associado a uma maior agressividade. Esse é o primeiro trabalho que mostra que, nesse tipo de tumor, a expressão desse gene pode modular o microambiente tumoral imune e está diretamente associada a expressão de CTLA-4 e PD-L1, o que sugere seu papel na evasão imune, mas também aponta para o potencial de utilização desse gene como um biomarcador de resposta a imunoterapia.

Os resultados associados a expressão do *ZEB1*, efector da EMT mais amplamente estudado, precisam ser melhor investigados nesse tipo tumoral. Apesar dos resultados clínicos concordantes com os achados de literatura e da correlação com genes de importância clínica bem descrita, a expressão desse marcador da EMT pareceu estar associada a uma atividade molecular diferente daquela estimulada pela expressão do *SNAI1*. Como explicado anteriormente, esses dois genes possuem papéis diferentes na EMT. Enquanto o *SNAI1* induz o processo e parece estar no início da cadeia molecular, o *ZEB1* é um efector, e pode representar um estágio mais avançado desse processo. A presença desses genes em estágios diferentes da EMT pode explicar a diferença entre elas observadas nesse trabalho. Entretanto, mesmo que associados a mecanismos diferentes, ambos os genes parecem ter o potencial de influenciar a progressão tumoral e a resposta imune no PCa.

Apesar dos nossos esforços, esse estudo apresentou algumas limitações, sendo as principais delas a falta de dados de expressão proteica para validar os achados de transcriptômica e a falta de estudos celulares. Nós acreditamos, entretanto, que os resultados encontrados aqui darão o suporte necessários para que estudos futuros utilizando técnicas mais direcionadas, como single-cell RNA sequencing, ELISA e citometria de fluxo, que poderão contornar as lacunas desse trabalho e fortalecer o arcabouço teórico e empírico a respeito do potencial da EMT em modular a resposta imune antitumoral nessa e em outras doenças.

Referências

- ABIDA, Wassim et al. Analysis of the Prevalence of Microsatellite Instability in Prostate Cancer and Response to Immune Checkpoint Blockade. **JAMA Oncology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 471–478, 2019. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.5801.
- ANDERSEN, Line B.; NØRGAARD, Maibritt; RASMUSSEN, Martin; FREDSSØE, Jacob; BORRE, Michael; ULHØI, Benedicte P.; SØRENSEN, Karina D. Immune cell analyses of the tumor microenvironment in prostate cancer highlight infiltrating regulatory T cells and macrophages as adverse prognostic factors. **The Journal of Pathology**, [S. l.], v. 255, n. 2, p. 155–165, 2021. DOI: 10.1002/path.5757.
- BACIARELLO, Giulia; GIZZI, Marco; FIZAZI, Karim. Advancing therapies in metastatic castration-resistant prostate cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 19, n. 16, p. 1797–1804, 2018. DOI: 10.1080/14656566.2018.1527312.
- BAULIDA, Josep; DÍAZ, Víctor M.; GARCÍA DE HERREROS, Antonio. Snail1: A Transcriptional Factor Controlled at Multiple Levels. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 757, 2019. DOI: 10.3390/jcm8060757.
- BAYANI, Jane et al. Molecular stratification of early breast cancer identifies drug targets to drive stratified medicine. **npj Breast Cancer**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1038/s41523-016-0003-5.
- BHOWMIK, Salil Kumar et al. EMT-induced metabolite signature identifies poor clinical outcome. **Oncotarget**, [S. l.], v. 6, n. 40, p. 42651–42660, 2015.
- BLOCK, C. James; DYSON, Gregory; CAMPEANU, Ion John; WATZA, Donovan; RATNAM, Manohar; WU, Guojun. A stroma-corrected ZEB1 transcriptional signature is inversely associated with antitumor immune activity in breast cancer. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 17807, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-54282-z.
- BURK, Ulrike; SCHUBERT, Jörg; WELLNER, Ulrich; SCHMALHOFER, Otto; VINCAN, Elizabeth; SPADERNA, Simone; BRABLETZ, Thomas. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. **EMBO reports**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 582–589, 2008. DOI: 10.1038/embor.2008.74.
- CHAVES, Luiz Paulo; MELO, Camila Morais; SAGGIORO, Fabiano Pinto; REIS, Rodolfo Borges Dos; SQUIRE, Jeremy Andrew. Epithelial–Mesenchymal Transition Signaling and Prostate Cancer Stem Cells: Emerging Biomarkers and Opportunities for Precision Therapeutics. **Genes**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 1900, 2021. DOI: 10.3390/genes12121900.
- CHEAITO, Katia A. et al. EMT Markers in Locally-Advanced Prostate Cancer: Predicting Recurrence? **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 9, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00131>. Acesso em: 25 jan. 2023.
- CUENCA, Marta; SINTES, Jordi; LÁNYI, Árpád; ENGEL, Pablo. CD84 cell surface signaling molecule: An emerging biomarker and target for cancer and autoimmune disorders. **Clinical Immunology**, Special issue: SLAM family receptors and disease. [S. l.], v. 204, Special issue: SLAM family receptors and disease, p. 43–49, 2019. DOI: 10.1016/j.clim.2018.10.017.
- DE BONO, Johann S.; GUO, Christina; GUREL, Bora; DE MARZO, Angelo M.; SFANOS, Karen S.; MANI, Ram S.; GIL, Jesús; DRAKE, Charles G.; ALIMONTI, Andrea. Prostate carcinogenesis: inflammatory storms. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 455–469, 2020. DOI: 10.1038/s41568-020-0267-9.

DEJOURS, Corinne; KRISHNAN, Uma Maheswari. Sensors for diagnosis of prostate cancer: Looking beyond the prostate specific antigen. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 173, p. 112790, 2021. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112790.

DERYNCK, Rik; WEINBERG, Robert A. EMT and Cancer: More Than Meets the Eye. **Developmental Cell**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 313–316, 2019. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.04.026.

DING, Xiang-Ming. MicroRNAs: regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Chinese Journal of Cancer**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 140–147, 2014. DOI: 10.5732/cjc.013.10094.

DONG, Bo; WU, Yadi. Epigenetic Regulation and Post-Translational Modifications of SNAI1 in Cancer Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 20, p. 11062, 2021. DOI: 10.3390/ijms222011062.

EGGENER, Scott E. et al. Molecular Biomarkers in Localized Prostate Cancer: ASCO Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 38, n. 13, p. 1474–1494, 2020. DOI: 10.1200/JCO.19.02768.

EPSTEIN, Jonathan I.; ALLSBROOK, William C.; AMIN, Mahul B.; EGEVAD, Lars L.; ISUP GRADING COMMITTEE. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, [S. l.], v. 29, n. 9, p. 1228–1242, 2005. DOI: 10.1097/01.pas.0000173646.99337.b1.

EPSTEIN, Jonathan I.; EGEVAD, Lars; AMIN, Mahul B.; DELAHUNT, Brett; SRIGLEY, John R.; HUMPHREY, Peter A. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 244–252, 2016. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000530.

ERLANDSSON, Ann; CARLSSON, Jessica; LUNDHOLM, Marie; FÄLT, Anna; ANDERSSON, Sven-Olof; ANDRÉN, Ove; DAVIDSSON, Sabina. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. **The Prostate**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 363–369, 2019. DOI: 10.1002/pros.23742.

FANG, Lei; LI, Dongmei; YIN, JuanJuan; PAN, Hong; YE, Huihui; BOWMAN, Joel; CAPALDO, Brian; KELLY, Kathleen. TMPRSS2-ERG promotes the initiation of prostate cancer by suppressing oncogene-induced senescence. **Cancer Gene Therapy**, [S. l.], v. 29, n. 10, p. 1463–1476, 2022. DOI: 10.1038/s41417-022-00454-5.

FIGIEL, Sandy; VASSEUR, Caroline; BRUYERE, Franck; ROZET, Francois; MAHEO, Karine; FROMONT, Gaelle. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. **Human Pathology**, [S. l.], v. 61, p. 26–32, 2017. DOI: 10.1016/j.humpath.2016.10.013.

FRANK, Sander; NELSON, Peter; VASIOUKHIN, Valeri. **Recent advances in prostate cancer research: large-scale genomic analyses reveal novel driver mutations and DNA repair defects**. F1000Research, , 2018. DOI: 10.12688/f1000research.14499.1. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/7-1173>. Acesso em: 4 jan. 2023.

FRIDMAN, Wolf H.; ZITVOGEL, Laurence; SAUTÈS-FRIDMAN, Catherine; KROEMER, Guido. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 717–734, 2017. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.101.

- GARRIDO, Federico; ROMERO, Irene; APTSIAURI, Natalia; GARCIA-LORA, Angel M. Generation of MHC class I diversity in primary tumors and selection of the malignant phenotype. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 138, n. 2, p. 271–280, 2016. DOI: 10.1002/ijc.29375.
- GE, Rongbin; WANG, Zongwei; CHENG, Liang. Tumor microenvironment heterogeneity an important mediator of prostate cancer progression and therapeutic resistance. **npj Precision Oncology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–8, 2022. DOI: 10.1038/s41698-022-00272-w.
- GOYTAIN, Angela; NG, Tony. NanoString nCounter Technology: High-Throughput RNA Validation. *Em*: LI, Hui; ELFMAN, Justin (org.). **Chimeric RNA: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology New York, NY: Springer US, 2020. p. 125–139. DOI: 10.1007/978-1-4939-9904-0_10. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9904-0_10. Acesso em: 30 nov. 2022.
- GRASSO, Catherine S. et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. **Nature**, [S. l.], v. 487, n. 7406, p. 239–243, 2012. DOI: 10.1038/nature11125.
- GWAK, Jungsug; JEONG, Hayan; LEE, Kwanghyun; SHIN, Jee Yoon; SIM, Taejun; NA, Jungtae; KIM, Jongchan; JU, Bong-Gun. SFMBT2-Mediated Infiltration of Preadipocytes and TAMs in Prostate Cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 2718, 2020. DOI: 10.3390/cancers12092718.
- HAFFNER, Michael C.; ZWART, Wilbert; ROUDIER, Martine P.; TRUE, Lawrence D.; NELSON, William G.; EPSTEIN, Jonathan I.; DE MARZO, Angelo M.; NELSON, Peter S.; YEGNASUBRAMANIAN, Srinivasan. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 79–92, 2021. DOI: 10.1038/s41585-020-00400-w.
- HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [S. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- HANDLE, Florian et al. The STAT3 Inhibitor Galiellalactone Reduces IL6-Mediated AR Activity in Benign and Malignant Prostate Models. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S. l.], v. 17, n. 12, p. 2722–2731, 2018. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0508.
- HOLLAND, Peter WH; BOOTH, H. Anne F.; BRUFORD, Elspeth A. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. **BMC Biology**, [S. l.], v. 5, p. 47, 2007. DOI: 10.1186/1741-7007-5-47.
- JAMASPISHVILI, Tamara; BERMAN, David M.; ROSS, Ashley E.; SCHER, Howard I.; DE MARZO, Angelo M.; SQUIRE, Jeremy A.; LOTAN, Tamara L. Clinical implications of PTEN loss in prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 222–234, 2018.
- JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. e1792–e1792, 2015. DOI: 10.1038/cddis.2015.162.
- JOLLY, Mohit Kumar; CELIÀ-TERRASSA, Toni. Dynamics of Phenotypic Heterogeneity Associated with EMT and Stemness during Cancer Progression. **Journal of Clinical Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 1542, 2019. DOI: 10.3390/jcm8101542.

- KATO, Taku; FUJITA, Yasunori; NAKANE, Keita; KOJIMA, Toshio; NOZAWA, Yoshinori; DEGUCHI, Takashi; ITO, Masafumi. ETS1 promotes chemoresistance and invasion of paclitaxel-resistant, hormone-refractory PC3 prostate cancer cells by up-regulating MDR1 and MMP9 expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 417, n. 3, p. 966–971, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.047.
- KATSURA, Akihiro et al. ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells. **Molecular Oncology**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 1241–1262, 2017. DOI: 10.1002/1878-0261.12098.
- KHALIL, Danny N.; SMITH, Eric L.; BRENTJENS, Renier J.; WOLCHOK, Jedd D. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 273–290, 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.25.
- KRIJGSMAN, Daniëlle; ROELANDS, Jessica; HENDRICKX, Wouter; BEDOGNETTI, Davide; KUPPEN, Peter J. K. HLA-G: A New Immune Checkpoint in Cancer? **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 12, p. 4528, 2020. DOI: 10.3390/ijms21124528.
- KU, Sheng Yu et al. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 355, n. 6320, p. 78–83, 2017. DOI: 10.1126/science.aah4199.
- KUMARSWAMY, Regalla; MUDDLURU, Giridhar; CEPPI, Paolo; MUPPALA, Santoshi; KOZLOWSKI, Mirosław; NIKLINSKI, Jacek; PAPOTTI, Mauro; ALLGAYER, Heike. MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snai1 and is downregulated in non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 130, n. 9, p. 2044–2053, 2012. DOI: 10.1002/ijc.26218.
- KUPELIAN, Patrick A.; MAHADEVAN, Arul; REDDY, Chandana A.; REUTHER, Alwyn M.; KLEIN, Eric A. Use of different definitions of biochemical failure after external beam radiotherapy changes conclusions about relative treatment efficacy for localized prostate cancer. **Urology**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 593–598, 2006. DOI: 10.1016/j.urology.2006.03.075.
- LAMBERT, Arthur W.; WEINBERG, Robert A. Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 325–338, 2021. DOI: 10.1038/s41568-021-00332-6.
- LEWINSKY, Hadas et al. CD84 is a regulator of the immunosuppressive microenvironment in multiple myeloma. **JCI Insight**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. e141683, [s.d.]. DOI: 10.1172/jci.insight.141683.
- LIN, Tsung-Chieh. RUNX1 and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1877, n. 3, p. 188715, 2022. DOI: 10.1016/j.bbcan.2022.188715.
- LIU, Suling et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. **Cancer Research**, [S. l.], v. 71, n. 2, p. 614–624, 2011. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0538.
- LOPEZ-BUJANDA, Zoila A. et al. Castration-mediated IL-8 promotes myeloid infiltration and prostate cancer progression. **Nature Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 8, p. 803–818, 2021. DOI: 10.1038/s43018-021-00227-3.

- LU, Jiahui; FEI, Fei; WU, Chenxi; MEI, Jie; XU, Junying; LU, Peihua. ZEB1: Catalyst of immune escape during tumor metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 153, p. 113490, 2022. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113490.
- LUONGO, Francesca; COLONNA, Francesca; CALAPÀ, Federica; VITALE, Sara; FIORI, Micol E.; DE MARIA, Ruggero. PTEN Tumor-Suppressor: The Dam of Stemness in Cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 1076, 2019. DOI: 10.3390/cancers11081076.
- MALEKI VAREKI, Saman. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 157, 2018. DOI: 10.1186/s40425-018-0479-7.
- MATUSZAK, Emily A.; KYPRIANOU, Natasha. Androgen regulation of epithelial–mesenchymal transition in prostate tumorigenesis. **Expert review of endocrinology & metabolism**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 469–482, 2011. DOI: 10.1586/eem.11.32.
- MELO, Camila Morais; VIDOTTO, Thiago; CHAVES, Luiz Paulo; LAUTERT-DUTRA, William; REIS, Rodolfo Borges Dos; SQUIRE, Jeremy Andrew. The Role of Somatic Mutations on the Immune Response of the Tumor Microenvironment in Prostate Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 17, p. 9550, 2021. DOI: 10.3390/ijms22179550.
- MOHLER, James L. et al. Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 479–505, 2019. DOI: 10.6004/jnccn.2019.0023.
- MORANDI, Fabio; AIROLDI, Irma. HLA-G and Other Immune Checkpoint Molecules as Targets for Novel Combined Immunotherapies. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 2925, 2022. DOI: 10.3390/ijms23062925.
- MOVASSAGHI, Miyad; CHUNG, Rainjade; ANDERSON, Christopher B.; STEIN, Mark; SAENGER, Yvonne; FAIENA, Izak. Overcoming Immune Resistance in Prostate Cancer: Challenges and Advances. **Cancers**, [S. l.], v. 13, n. 19, p. 4757, 2021. DOI: 10.3390/cancers13194757.
- MULLINS, Riley D. Z.; PAL, Ananya; BARRETT, Thomas F.; HEFT NEAL, Molly E.; PURAM, Sidharth V. Epithelial–Mesenchymal Plasticity in Tumor Immune Evasion. **Cancer Research**, [S. l.], v. 82, n. 13, p. 2329–2343, 2022. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-4370.
- NAGAYA, Naoya; LEE, Geun Taek; HORIE, Shigeo; KIM, Isaac Yi. CXC Chemokine/Receptor Axis Profile and Metastasis in Prostate Cancer. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S. l.], v. 7, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.579874>. Acesso em: 24 jan. 2023.
- NAKAZAWA, Mary; KYPRIANOU, Natasha. Epithelial-mesenchymal-transition regulators in prostate cancer: Androgens and beyond. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Special Issue on Prostate Cancer. [S. l.], v. 166, Special Issue on Prostate Cancer, p. 84–90, 2017. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.007.
- NARDONE, Valerio et al. Tumor infiltrating T lymphocytes expressing FoxP3, CCR7 or PD-1 predict the outcome of prostate cancer patients subjected to salvage radiotherapy after biochemical relapse. **Cancer Biology & Therapy**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 1213–1220, 2016. DOI: 10.1080/15384047.2016.1235666.

- NAUSEEF, Jones T.; HENRY, Michael D. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? **Nature Reviews Urology**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 428–439, 2011. DOI: 10.1038/nrurol.2011.85.
- NEAL, Corey L.; HENDERSON, Veronica; SMITH, Bethany N.; MCKEITHEN, Danielle; GRAHAM, Tisheeka; VO, Baohan T.; ODERO-MARAH, Valerie A. Snail transcription factor negatively regulates maspin tumor suppressor in human prostate cancer cells. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 336, 2012. DOI: 10.1186/1471-2407-12-336.
- NTALA, Chara. **Immune profiling of the tumour microenvironment in prostate cancer**. 2020. PhD - University of Glasgow, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://theses.gla.ac.uk/81660/>. Acesso em: 2 fev. 2023.
- OLKHOV-MITSEL, Ekaterina; HODGSON, Anjelica; LIU, Stanley K.; VESPRINI, Danny; BAYANI, Jane; BARTLETT, John; XU, Bin; DOWNES, Michelle R. Immune gene expression profiles in high-grade urothelial carcinoma of the bladder: a NanoString study. **Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 53–57, 2021. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-206631.
- ORELLANA-SERRADELL, Octavio; HERRERA, Daniela; CASTELLON, Enrique A.; CONTRERAS, Hector R. The transcription factor ZEB1 promotes an aggressive phenotype in prostate cancer cell lines. **Asian Journal of Andrology**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 294–299, 2018. DOI: 10.4103/aja.aja_61_17.
- PAN, Guangtao; LIU, Yuhan; SHANG, Luorui; ZHOU, Fangyuan; YANG, Shenglan. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance. **Cancer Communications**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 199–217, 2021. DOI: 10.1002/cac2.12138.
- PÉREZ, Gisella; LÓPEZ-MONCADA, Fernanda; INDO, Sebastián; TORRES, María José; CASTELLÓN, Enrique A.; CONTRERAS, Héctor R. Knockdown of ZEB1 reverses cancer stem cell properties in prostate cancer cells. **Oncology Reports**, [S. l.], v. 45, n. 5, p. 1–12, 2021. DOI: 10.3892/or.2021.8009.
- PEREZ-OQUENDO, Mabel; GIBBONS, Don L. Regulation of ZEB1 Function and Molecular Associations in Tumor Progression and Metastasis. **Cancers**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 1864, 2022. DOI: 10.3390/cancers14081864.
- PEZARO, C.; WOO, H. H.; DAVIS, I. D. Prostate cancer: measuring PSA. **Internal Medicine Journal**, [S. l.], v. 44, n. 5, p. 433–440, 2014. DOI: 10.1111/imj.12407.
- PICKUP, Michael; NOVITSKIY, Sergey; MOSES, Harold L. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 788–799, 2013. DOI: 10.1038/nrc3603.
- PIERORAZIO, Phillip M.; WALSH, Patrick C.; PARTIN, Alan W.; EPSTEIN, Jonathan I. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. **BJU international**, [S. l.], v. 111, n. 5, p. 753–760, 2013. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2012.11611.x.
- PLASCHKA, Maud et al. ZEB1 transcription factor promotes immune escape in melanoma. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. e003484, 2022. DOI: 10.1136/jitc-2021-003484.
- POBLETE, Cristian E.; FULLA, Juan; GALLARDO, Marcela; MUÑOZ, Valentina; CASTELLÓN, Enrique A.; GALLEGOS, Ivan; CONTRERAS, Hector R. Increased SNAIL expression and low syndecan levels are associated with high Gleason grade in prostate cancer.

International Journal of Oncology, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 647–654, 2014. DOI: 10.3892/ijo.2014.2254.

POMERANTZ, Mark M. et al. Prostate cancer reactivates developmental epigenomic programs during metastatic progression. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 52, n. 8, p. 790–799, 2020. DOI: 10.1038/s41588-020-0664-8.

QUINTANAL-VILLALONGA, Álvaro; CHAN, Joseph M.; YU, Helena A.; PE'ER, Dana; SAWYERS, Charles L.; SEN, Triparna; RUDIN, Charles M. Lineage plasticity in cancer: a shared pathway of therapeutic resistance. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 360–371, 2020. DOI: 10.1038/s41571-020-0340-z.

RANA, Sharmila; VALBUENA, Gabriel N.; CURRY, Ed; BEVAN, Charlotte L.; KEUN, Hector C. MicroRNAs as biomarkers for prostate cancer prognosis: a systematic review and a systematic reanalysis of public data. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 126, n. 3, p. 502–513, 2022. DOI: 10.1038/s41416-021-01677-3.

REBELLO, Richard J.; OING, Christoph; KNUDSEN, Karen E.; LOEB, Stacy; JOHNSON, David C.; REITER, Robert E.; GILLESSEN, Silke; VAN DER KWAST, Theodorus; BRISTOW, Robert G. Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–27, 2021. DOI: 10.1038/s41572-020-00243-0.

RENAUDE, Elodie; KROEMER, Marie; BORG, Christophe; PEIXOTO, Paul; HERVOUET, Eric; LOYON, Romain; ADOTÉVI, Olivier. Epigenetic Reprogramming of CD4+ Helper T Cells as a Strategy to Improve Anticancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, p. 669992, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.669992.

RIBAS, Antoni. Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 373, n. 16, p. 1490–1492, 2015. DOI: 10.1056/NEJMp1510079.

RODGERS, Jamie J.; MCCLURE, Robert; EPIS, Michael R.; COHEN, Ronald J.; LEEDMAN, Peter J.; HARVEY, Jennet M.; BIORRESOURCE, Australian Prostate Cancer; THOMAS, Marc A.; BENTEL, Jacqueline M. ETS1 induces transforming growth factor β signaling and promotes epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 120, n. 1, p. 848–860, 2019. DOI: 10.1002/jcb.27446.

RU, Yuanbin et al. The multiMiR R package and database: integration of microRNA–target interactions along with their disease and drug associations. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 42, n. 17, p. e133, 2014. DOI: 10.1093/nar/gku631.

SABBAH, Michèle et al. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. **Drug Resistance Updates**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 123–151, 2008. DOI: 10.1016/j.drug.2008.07.001.

SANDSMARK, Elise et al. A novel non-canonical Wnt signature for prostate cancer aggressiveness. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 9572–9586, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.14161.

SANTOS, Marceli de Oliveira; LIMA, Fernanda Cristina da Silva De; MARTINS, Luís Felipe Leite; OLIVEIRA, Julio Fernando Pinto; ALMEIDA, Liz Maria De; CANCELA, Marianna de Camargo. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 69, n. 1, 2023. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>. Acesso em: 16 fev. 2023.

SHI, Yu et al. Reduced Expression of METTL3 Promotes Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer by m6A Methylation-Mediated COL3A1 Up-Regulation. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 10, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01126>. Acesso em: 24 jan. 2023.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; WAGLE, Nikita Sandeep; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2023. **CA: a cancer journal for clinicians**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 17–48, 2023. DOI: 10.3322/caac.21763.

SMITH, A. M.; FINDLAY, V. J.; BANDURRAGA, S. G.; KISTNER-GRIFFIN, E.; SPRUILL, L. S.; LIU, A.; GOLSHAYAN, A. R.; TURNER, D. P. ETS1 transcriptional activity is increased in advanced prostate cancer and promotes the castrate-resistant phenotype. **Carcinogenesis**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 572–580, 2012. DOI: 10.1093/carcin/bgs007.

SMITH, Bethany N.; ODERO-MARAH, Valerie A. The role of Snail in prostate cancer. **Cell Adhesion & Migration**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 433–441, 2012. DOI: 10.4161/cam.21687.

STAAL, Jens; BEYAERT, Rudi. Inflammation and NF-κB Signaling in Prostate Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. **Cells**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 122, 2018. DOI: 10.3390/cells7090122.

STALLONE, Giovanni et al. Modulation of complement activation by pentraxin-3 in prostate cancer. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 18400, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-75376-z.

STARK, Jennifer R. et al. Gleason Score and Lethal Prostate Cancer: Does $3 + 4 = 4 + 3$? **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 27, n. 21, p. 3459–3464, 2009. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.4669.

STEMMLER, Marc P.; ECCLES, Rebecca L.; BRABLETZ, Simone; BRABLETZ, Thomas. Non-redundant functions of EMT transcription factors. **Nature Cell Biology**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 102–112, 2019. DOI: 10.1038/s41556-018-0196-y.

STULTZ, Jacob; FONG, Lawrence. How to turn up the heat on the cold immune microenvironment of metastatic prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 697–717, 2021. DOI: 10.1038/s41391-021-00340-5.

STYLIANOU, Nataly et al. A molecular portrait of epithelial-mesenchymal plasticity in prostate cancer associated with clinical outcome. **Oncogene**, [S. l.], v. 38, n. 7, p. 913–934, 2019. DOI: 10.1038/s41388-018-0488-5.

SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; LAVERSANNE, Mathieu; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin; BRAY, Freddie. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.

SUZUKI, Hiroshi I. MicroRNA Control of TGF-β Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 7, p. 1901, 2018. DOI: 10.3390/ijms19071901.

TAKAMARU, Natsumi; FUKUDA, Naoyuki; AKITA, Kazuya; KUDOH, Keiko; MIYAMOTO, Youji. Association of PD-L1 and ZEB-1 expression patterns with clinicopathological characteristics and prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 1–8, 2022. DOI: 10.3892/ol.2022.13195.

TAKAYAMA, Ken-ichi; SUZUKI, Takashi; TSUTSUMI, Shuichi; FUJIMURA, Tetsuya; URANO, Tomohiko; TAKAHASHI, Satoru; HOMMA, Yukio; ABURATANI, Hiroyuki; INOUE, Satoshi. RUNX1, an androgen- and EZH2-regulated gene, has differential roles in AR-dependent and -independent prostate cancer. **Oncotarget**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 2263–2276, 2014.

TAKI, Mana et al. Tumor Immune Microenvironment during Epithelial-Mesenchymal Transition. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, [S. l.], v. 27, n. 17, p. 4669–4679, 2021. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4459.

TANG, Dean G. Understanding and targeting prostate cancer cell heterogeneity and plasticity. **Seminars in Cancer Biology**, Cancer Cell Heterogeneity and Plasticity: From Molecular Understanding to Therapeutic Targeting. [S. l.], v. 82, Cancer Cell Heterogeneity and Plasticity: From Molecular Understanding to Therapeutic Targeting, p. 68–93, 2022. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.11.001.

TANOUE, Takeshi et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. **Nature**, [S. l.], v. 565, n. 7741, p. 600–605, 2019. DOI: 10.1038/s41586-019-0878-z.

TERRY, Stéphane; ENGELSEN, Agnete S. T.; BUART, Stéphanie; ELSAYED, Walid Shaaban; VENKATESH, Goutham Hassan; CHOUAIB, Salem. Hypoxia-driven intratumor heterogeneity and immune evasion. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 492, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.07.004.

THORSSON, Vésteinn et al. The Immune Landscape of Cancer. **Immunity**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 812–830.e14, 2018. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.023.

TIAN, Hong-Yang; LIANG, Qi; SHI, Zhen; ZHAO, Hang. Exosomal CXCL14 Contributes to M2 Macrophage Polarization through NF- κ B Signaling in Prostate Cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S. l.], v. 2022, p. e7616696, 2022. DOI: 10.1155/2022/7616696.

TUMEH, Paul C. et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. **Nature**, [S. l.], v. 515, n. 7528, p. 568–571, 2014. DOI: 10.1038/nature13954.

USOVA, E. V.; KOPANTSEVA, M. R.; EGOROV, V. I.; KOPANTZEV, E. P.; SVERDLOV, E. D. [SNAI1 and SNAI2 - transcriptional master-regulators of epithelial-mesenchymal transition]. **Patologicheskaiia fiziologiia i eksperimental'naia terapiia**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 76–87, 2015.

VELEZ, Miguel Gonzalez et al. Differential impact of tumor suppressor gene (TP53, PTEN, RB1) alterations and treatment outcomes in metastatic, hormone-sensitive prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 479–483, 2022. DOI: 10.1038/s41391-021-00430-4.

VIDOTTO, Thiago et al. PTEN-deficient prostate cancer is associated with an immunosuppressive tumor microenvironment mediated by increased expression of IDO1 and infiltrating FoxP3+ T regulatory cells. **The Prostate**, [S. l.], v. 79, n. 9, p. 969–979, 2019. DOI: 10.1002/pros.23808.

VIDOTTO, Thiago. **Caracterização do genoma e da resposta imune no microambiente tumoral de neoplasias PTEN-deficientes**. 2019. Doutorado em Genética - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. DOI: 10.11606/T.17.2019.tde-29072019-142549. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-29072019-142549/>. Acesso em: 18 jan. 2023.

- VIDOTTO, Thiago; MELO, Camila Morais; CASTELLI, Erick; KOTI, Madhuri; DOS REIS, Rodolfo Borges; SQUIRE, Jeremy A. Emerging role of PTEN loss in evasion of the immune response to tumours. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 122, n. 12, p. 1732–1743, 2020. DOI: 10.1038/s41416-020-0834-6.
- VISWANADHAPALLI, Suryavathi; DILEEP, Kalarickal V.; ZHANG, Kam Y. J.; NAIR, Hareesh B.; VADLAMUDI, Ratna K. Targeting LIF/LIFR signaling in cancer. **Genes & Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 973–980, 2022. DOI: 10.1016/j.gendis.2021.04.003.
- VITKIN, Natasha; NERSESIAN, Sarah; SIEMENS, David Robert; KOTI, Madhuri. The Tumor Immune Contexture of Prostate Cancer. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00603>. Acesso em: 11 jan. 2023.
- WANG, Guocan; ZHAO, Di; SPRING, Denise J.; DEPINHO, Ronald A. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & Development**, [S. l.], v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 2018. DOI: 10.1101/gad.315739.118.
- WANG, Xue et al. Identification of a Zeb1 expressing basal stem cell subpopulation in the prostate. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 706, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-14296-y.
- WANG, Ying; FANG, Jiankai; LIU, Benming; SHAO, Changshun; SHI, Yufang. Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses. **Cell Stem Cell**, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 1515–1530, 2022. DOI: 10.1016/j.stem.2022.10.001.
- WHERRY, E. John; KURACHI, Makoto. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 486–499, 2015. DOI: 10.1038/nri3862.
- WU, Yi-Mi et al. Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer. **Cell**, [S. l.], v. 173, n. 7, p. 1770–1782.e14, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.04.034.
- XIE, Zhuorui et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. **Current Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. e90, 2021. DOI: 10.1002/cpz1.90.
- XU, Junying; YANG, Xuejing; PAN, Jiadong; FAN, Honghong; MEI, Jie; HUA, Dong. Biochanin A Suppresses Tumor Progression and PD-L1 Expression via Inhibiting ZEB1 Expression in Colorectal Cancer. **Journal of Oncology**, [S. l.], v. 2022, p. e3224373, 2022. DOI: 10.1155/2022/3224373.
- XU, Song; GE, Jingping; ZHANG, Zhengyu; ZHOU, Wenquan. MiR-129 inhibits cell proliferation and metastasis by targeting ETS1 via PI3K/AKT/mTOR pathway in prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 96, p. 634–641, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.037.
- YU, Evan Y. et al. Pembrolizumab plus Olaparib in Patients with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer: Long-term Results from the Phase 1b/2 KEYNOTE-365 Cohort A Study. **European Urology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 15–26, 2023. DOI: 10.1016/j.eururo.2022.08.005.
- YUAN, Yao; JIANG, Yu-Chen; SUN, Chong-Kui; CHEN, Qian-Ming. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications (Review). **Oncology Reports**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 2499–2515, 2016. DOI: 10.3892/or.2016.4660.

ZARAVINOS, Apostolos. The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. **Journal of Oncology**, [S. l.], v. 2015, p. e865816, 2015. DOI: 10.1155/2015/865816.

ZHANG, Hao; DAI, Ziyu; WU, Wantao; WANG, Zeyu; ZHANG, Nan; ZHANG, Liyang; ZENG, Wen-Jing; LIU, Zhixiong; CHENG, Quan. Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 184, 2021. DOI: 10.1186/s13046-021-01987-7.

ZHANG, Jingyu; TIAN, Xiao-Jun; ZHANG, Hang; TENG, Yue; LI, Ruoyan; BAI, Fan; ELANKUMARAN, Subbiah; XING, Jianhua. TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. **Science Signaling**, [S. l.], v. 7, n. 345, p. ra91–ra91, 2014. DOI: 10.1126/scisignal.2005304.

ZHANG, Yu; XU, Lei; LI, Anqi; HAN, Xiuzhen. The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 110, p. 400–408, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.112.

ZHAO, Lina; LIU, Ye; ZHANG, Jingbo; LIU, Yan; QI, Qi. LncRNA SNHG14/miR-5590-3p/ZEB1 positive feedback loop promoted diffuse large B cell lymphoma progression and immune evasion through regulating PD-1/PD-L1 checkpoint. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 1–15, 2019. a. DOI: 10.1038/s41419-019-1886-5.

ZHAO, Shuang G. et al. The Immune Landscape of Prostate Cancer and Nomination of PD-L2 as a Potential Therapeutic Target. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 111, n. 3, p. 301–310, 2019. b. DOI: 10.1093/jnci/djy141.

ANEXOS



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O ZEB1 colabora com a perda de PTEN e a fusão TMPRSS2-ERG na evasão tumoral do câncer de próstata?

Pesquisador: LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 43277221.0.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.275.741

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de mestrado de Luiz Paulo Chaves de Souza, supervisionado pelo Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire, da Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética, Grupo de Pesquisa em Uro-Oncologia.

Introdução:

Os pesquisadores argumentam que o status genético do câncer de próstata pode determinar a infiltração e a composição celular imune no microambiente tumoral.

Mutações específicas do tumor podem afetar vias e levar a alterações pró ou anti-inflamatórias que podem resultar num microambiente tumoral imunologicamente frio. Estudos recentes do nosso grupo mostraram uma associação entre a perda do PTEN e um microambiente tumoral imunossuprimido. Camundongos knock out para PTEN mostraram que superexpressão de genes ETS induziram progressão tumoral e a uma assinatura pró-inflamatória. O supressor tumoral PTEN (Fosfatase homóloga a tensina) é uma dupla fosfatase que regula a via AKT/PI3K convertendo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfatase (PIP3) em PIP2. A ativação transcricional dependente de ZEB1 promove mudanças em vias de reparo do DNA semelhante aMDSCs, ativar receptores inibitórios de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.275.741

células T e induzir a exaustão de células T para promover um fenótipo de evasão imune no câncer de próstata. Assim, os pesquisadores têm por hipótese que alterações de expressão induzidas por ZEB1 nos tumores facilita a evasão tumoral induzida pela perda de PTEN e pela fusão TMPRSS2-ERG no câncer de próstata.

Hipótese:

Coletivamente, nós sugerimos que a perda de PTEN, a fusão TMPRSS2-ERG e a expressão de ZEB1 vão cooperar para induzir alterações de vias de expressão genética que levam a expressão de citocinas que podem alterar a interação tumor-microambiente tumoral para facilitar a evasão tumoral. Além disso, evidências apontam que a expressão de ZEB1 pode estar relacionada a perda de PTEN e a fusão TMPRSS2-ERG. Foi mostrado que a transição epitélio-mesenquimal induzida pela fusão TMPRSS2-ERG é mediada pelo eixo ZEB1/ZEB2 em câncer de próstata (LESHEM et al., 2011). Ainda, o eixo Ras/ZEB1 foi capaz de inibir a expressão de PTEN selvagem para ativar a via PI3K/AKT (LIU, Yongqing et al., 2014). O nosso modelo de trabalho é que mutações somáticas (ZEB1, PTEN loss and TMPRSS2-ERG fusion) no tumor, não apenas promovem a progressão, como também induzem a expressão de citocinas que recrutam Tregs e MDSCs para suprimir a atividade de células T efetoras e promover um fenótipo tumoral de evasão imune.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar o impacto da expressão da ZEB1, da perda de PTEN e da fusão TMPRSS2-ERG em genes e citocinas associados a evasão imune, a resposta a dano ao DNA, a exaustão de células T e a alteração de expressão de MHC usando o painel de resposta imune da Nanostring para análise transcriptômica.

Objetivo Secundário:

Usar dados públicos do banco de transcriptômica do TCGA e do MSKCC, bioinformática e aprendizado de máquina para analisar alterações de vias relacionadas a perda de PTEN e a fusão TMPRSS2-ERG que podem ser afetadas pela expressão de ZEB1. Determinar como alteração da expressão de genes relacionados a perda de PTEN, a fusão TMPRSS2-ERG e a expressão aumentada de ZEB1 podem estar ligadas a vias que podem influenciar o microambiente tumoral imune do câncer de próstata. Integrar achados de citometria celular com os dados de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.275.741

transcriptômica para determinar os impactos da perda de PTEN e da presença da fusão TMPRSS2-ERG no conteúdo imune celular do microambiente tumoral. Nós vamos analisar a influência do ZEB1 nos componentes imunes do microambiente tumoral do câncer de próstata independentemente e em sinergia com a perda de PTEN e a fusão TMPRSS2-ERG usando o algoritmo do xCELL associado aos resultados de citometria de fluxo, ELISA, imunohistoquímica e imunofluorescência obtidos no contexto do projeto da FAPESP já em andamento no nosso laboratório.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os pesquisadores alegam que as análises serão baseadas em amostras de prostatectomia radical que já seriam realizadas, e por este motivo o estudo não oferece nenhum risco adicional ao paciente. No caso remoto de um número suficiente de amostras frescas não poderem ser coletadas e avaliadas até o término deste estudo devido a problemas operacionais causados desde o início da COVID-19, as análises de transcriptômica poderão ser realizadas em amostras fixadas em formalina e armazenadas em parafina, disponíveis em biobanco no arquivo de patologia do HCFMRP.

Benefícios:

Não há benefícios diretos aos participantes do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desenho do estudo:

O presente trabalho será realizado utilizando amostras de tumores fixados em parafina derivado do Arquivo do Serviço de Patologia do HCFMRP com prévia autorização do responsável. Os dados clínicos serão adquiridos através de revisão de prontuários.

Os 30 casos obtidos serão de risco intermediário de acordo com os critérios do NCCN em estágio T2b ou T2c, score de gleason de 7 ou antígeno prostático

específico de 10-20 ng/ml sem caracteres de alto risco. O sequenciamento será feito utilizando o painel nCounter PanCancer IO 360 (NanoString

Technologies Inc., Seattle, WA, USA), que avalia 770 genes envolvidos em progressão tumoral, resposta imune e caracterização do microambiente tumoral. Análises de bioinformática serão feitas para estimar o landscape celular usando o xCELL e determinar a relação entre alteração de alvos genômicos utilizando aprendizado de máquina. Com isso, caracterizaremos as alterações da

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.275.741

resposta imune no TME do PCa por meio de análises in silico e análise de RNAseq utilizando um painel genes associados a resposta imune em amostras PTEN +/-, TMPRSS2-ERG +/- e ZEB1 +/-

Os 30 casos obtidos serão de risco intermediário de acordo com os critérios do NCCN em estágio T2b ou T2c, score de Gleason de 7 ou antígeno prostático específico de 10-20 ng/ml sem caracteres de alto risco (estágio clínico igual ou superior a T3a, score de Gleason 8-10 ou PSA>20 ng/ml). Amostras de sangue serão coletadas antes da cirurgia para medir os níveis de testosterona (teste ECLIA). Os pacientes serão hormônio naíve e submetidos a 3 meses de ADT com a droga goserelina (Zoladex®). Essa droga é um agonista de LH-RH - ela estimula a via hipotálamo-hipofise-gonadal levando a uma diminuição dos níveis de testosterona. Amostras de sangue serão coletadas antes do início do tratamento e após 3 e 6 meses de tratamento para medição dos níveis de testosterona (teste ECLIA). No caso remoto de um número suficiente de amostras frescas não poderem ser coletadas e avaliadas até o término deste estudo devido a problemas operacionais causados desde o início da COVID-19, as análises de transcriptômica poderão ser realizadas em amostras fixadas em formalina e armazenadas em parafina, disponíveis no arquivo de patologia do HCFMRP. As amostras incluídas nessa análise serão de homens adultos, de risco intermediário de acordo com os critérios do NCCN em estágio T2b ou T2c, score de Gleason de 7 ou antígeno prostático específico de 10-20 ng/ml sem caracteres de alto risco (estágio clínico igual ou superior a T3a, score de Gleason 8-10 ou PSA>20 ng/ml).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A Folha de Rosto e o Orçamento do estudo foram devidamente apresentados.

Foi anexada a anuência da instituição para a realização da pesquisa, bem como foi anexada a concordância do Departamento de Patologia para cessão de amostras de câncer de próstata coletadas por ocasião de procedimento cirúrgico com fins diagnósticos/terapêuticos e que estão armazenadas no Serviço de Patologia.

O pesquisador menciona BIOBANCO do Serviço de Patologia. Informa-se que o serviço de Patologia não constitui BIOBANCO na acepção do termo à luz da Resolução 441/11 do Conselho Nacional de Saúde que trata do armazenamento de amostras biológicas em Pesquisas com Seres Humanos. O Serviço de Patologia arquiva amostras biológicas que foram coletadas para fins diagnósticos. Tem

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.275.741

a guarda desse material para fins diagnósticos e não de pesquisa propriamente dita. Biorrespositório e Biobanco em Pesquisa com Seres Humanos têm outras definições.

A equipe da pesquisa foi devidamente identificada.

Entretanto, para que o presente projeto de pesquisa possa ser aprovado por esse comitê, várias questões precisam ser mais bem explicadas ou definidas:

1) A casuística e os meios de obtenção das amostras biológicas a serem utilizadas no estudo precisam ser adequadamente caracterizados. Inicialmente, a impressão é que o material seria coletado a fresco, em estudo prospectivo. De acordo com a carta enviada ao CEP pelo investigador, a pandemia por COVID 19 causou impacto na realização da pesquisa, o que motivou mudanças em relação à casuística e material biológico a ser estudado.

Diante disso, o investigador precisa reavaliar o texto do projeto de pesquisa e do documento informações básicas do projeto para as devidas adequações. Será realizado estudo a partir de amostras previamente coletadas, tanto amostras de cancer de próstata quanto amostras de sangue? **PENDÊNCIA ATENDIDA. FOI MODIFICADA A METODOLOGIA DO ESTUDO DE ACORDO COM O INVESTIGADOR DEVIDO ÀS DIFICULDADES DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO NA VIGÊNCIA DA PANDEMIA POR COVID 19. SERÁ UTILIZADO MATERIAL ARMAZENADO NO SERVIÇO DE PATOLOGIA PREVIAMENTE COLETADO PARA FINS DIAGNÓSTICOS/TERAPÊUTICOS.**

2) Caso seja utilizado material já previamente coletado por força de procedimentos diagnósticos e terapêuticos, o pesquisador poderá sim solicitar a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido, com as devidas justificativas e garantias de sigilo e confidencialidade dos dados. **PENDÊNCIA ATENDIDA. FOI SOLICITADA A DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, COM AS DEVIDAS JUSTIFICATIVAS E GARANTIA DE ANONIMATO.**

3) Caso esteja previsto a utilização de amostras de sangue que foram coletadas para pesquisa previamente aprovada pelo CEP, favor mencionar o número do parecer de aprovação do estudo prévio; nesse caso essas amostras constituem biorrespositório de estudo anterior que poderá ser transferido, passando a constituir biorrespositório do presente estudo. Nesse caso, há necessidade de se solicitar a criação do biorrespositório do presente estudo, informando-se o(s) pesquisador(es) responsável(is) do presente estudo.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.275.741

Neste caso, favor obter informações junto à secretaria do CEP sobre os documentos necessários. PENDÊNCIA ATENDIDA. A NOVA VERSÃO DO PROJETO NÃO MENCIONA AMOSTRAS DE SANGUE.

4) Fica confuso no texto se haverá solicitação ou não da dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido. Em alguns documentos menciona-se que não há necessidade de termo de consentimento, mas por outro lado, o pesquisador anexa termo de consentimento.

Há necessidade de adequar o texto dos documentos em relação a essa questão. Esclarece-se que a decisão de aprovar ou não a dispensa do termo de consentimento é prerrogativa do CEP, desde que o pesquisador solicite a possibilidade de apreciação quanto a dispensa do termo de consentimento, com as devidas justificativas e garantias de preservação do sigilo. PENDÊNCIA ATENDIDA.

5) Caso o investigador principal opte pela utilização de termo de consentimento livre e esclarecido, várias modificações são necessárias:

a) Explicar ao paciente os procedimentos que serão utilizados na pesquisa (o que acontecerá com ele caso deseje participar). Explicar os possíveis danos decorrentes da participação na pesquisa. Ao mencionar riscos deve-se levar em conta riscos inerentes à quebra de sigilo e que medidas se pretende adotar para minimizá-los.

- Caso não haja previsão de benefício direto ao participante, isso deve estar claramente informado no texto do termo de consentimento.

- Quanto ao armazenamento de material biológico em biorrepositório, é necessária atenção à Resolução Nº 441 de 12 de maio de 2011 do Conselho Nacional de Saúde, que estabelece:

a) O TCLE deve conter referência aos tipos de informação que poderão ser obtidos nas pesquisas futuras, a partir da utilização do material biológico humano armazenado, para fins de conhecimento e decisão autônoma do participante da pesquisa.

b) O TCLE deve conter a garantia expressa da possibilidade de acesso pelo participante da pesquisa, inclusive a(s) forma(s) de contato para tal, ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando aplicável, a qualquer tempo.

Uma sugestão, no presente estudo, é propor um biorrepositório para essa pesquisa, e não um biobanco.

Para isso, é necessário enviar ao CEP uma solicitação de criação de biorrepositório conforme a Resolução Nº 441/11 e incluir no TCLE a devida solicitação ao voluntário quanto à guarda do

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.275.741

material biológico. Favor entrar em contato com a secretaria do CEP para obter modelos desses documentos. PENDÊNCIA ATENDIDA. FOI SOLICITADA A DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO COM AS DEVIDAS JUSTIFICATIVAS. SERÃO UTILIZADAS AMOSTRAS DE TUMORES DE PRÓSTATA PREVIAMENTE COLETADAS PARA FINS DIAGNÓSTICOS/TERAPÊUTICOS ARMAZENADAS NO SERVIÇO DE PATOLOGIA DO HCRP-USP.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 3. 20 de dezembro de 2021, assim como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|-------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1664140.pdf | 08/02/2022 13:35:41 | | Aceito |
| Outros | Carta_ao_CEP.pdf | 08/02/2022 13:34:09 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |
| Cronograma | CRONOGRAMA.docx | 08/02/2022 13:33:06 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_solicitacao_dispensa.pdf | 08/02/2022 13:32:55 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_departamento_e_etica_Luiz_v_3.docx | 08/02/2022 12:08:28 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |
| Orçamento | aprovacao_upc_com_carimbo_genetica.pdf | 17/02/2021 10:38:34 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |
| Outros | ANUENCIA_LUIZ.pdf | 08/02/2021 16:05:28 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.275.741

| | | | | |
|--|---|------------------------|-------------------------------|--------|
| Folha de Rosto | PB_LuizPCdeSouza.pdf | 22/01/2021 16:40:41 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |
| Orçamento | Orcamento_departamento_e_etica_Luiz.xlsx | 19/11/2020 16:24:16 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Infraestrutura_institucional_ASSINADO_USP.pdf | 19/11/2020 16:14:45 | LUIZ PAULO CHAVES DE SOUZA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 07 de Março de 2022

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Review

Epithelial–Mesenchymal Transition Signaling and Prostate Cancer Stem Cells: Emerging Biomarkers and Opportunities for Precision Therapeutics

Luiz Paulo Chaves ¹, Camila Morais Melo ¹, Fabiano Pinto Saggioro ², Rodolfo Borges dos Reis ³ and Jeremy Andrew Squire ^{1,4,*}

- ¹ Department of Genetics, Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14048-900, SP, Brazil; luizpaulocds@usp.br (L.P.C.); camila.morais.melo@gmail.com (C.M.M.)
- ² Pathology Department, Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14048-900, SP, Brazil; fsaggioro@terra.com.br
- ³ Division of Urology, Department of Surgery and Anatomy, Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14048-900, SP, Brazil; rodolforeis@fmrp.usp.br
- ⁴ Department of Pathology and Molecular Medicine, Queen's University, Kingston, ON K7L 3N6, Canada
- * Correspondence: squirej@fmrp.usp.br

Abstract: Prostate cancers may reactivate a latent embryonic program called the epithelial–mesenchymal transition (EMT) during the development of metastatic disease. Through EMT, tumors can develop a mesenchymal phenotype similar to cancer stem cell traits that contributes to metastasis and variation in therapeutic responses. Some of the recurrent somatic mutations of prostate cancer affect EMT driver genes and effector transcription factors that induce the chromatin- and androgen-dependent epigenetic alterations that characterize castrate-resistant prostate cancer (CRPC). EMT regulators in prostate cancer comprise transcription factors (*SNAIL2*, *ZEB1*, *TWIST1*, and *ETS*), tumor suppressor genes (*RB1*, *PTEN*, and *TP53*), and post-transcriptional regulators (miRNAs) that under the selective pressures of antiandrogen therapy can develop an androgen-independent metastatic phenotype. In prostate cancer mouse models of EMT, Slug expression, as well as WNT/ β -Catenin and notch signaling pathways, have been shown to increase stemness potential. Recent single-cell transcriptomic studies also suggest that the stemness phenotype of advanced prostate cancer may be related to EMT. Other evidence correlates EMT and stemness with immune evasion, for example, activation of the polycomb repressor complex I, promoting EMT and stemness and cytokine secretion through *RB1*, *TP53*, and *PRC1*. These findings are helping clinical trials in CRPC that seek to understand how drugs and biomarkers related to the acquisition of EMT can improve drug response.

Keywords: castrate-resistant prostate cancer; immunotherapy; immune evasion; tumor microenvironment; oncogenes; tumor suppressor genes; mouse models of cancer; epigenomics; plasticity; chromatin modification



Citation: Chaves, L.P.; Melo, C.M.; Saggioro, F.P.; Reis, R.B.d.; Squire, J.A. Epithelial–Mesenchymal Transition Signaling and Prostate Cancer Stem Cells: Emerging Biomarkers and Opportunities for Precision Therapeutics. *Genes* **2021**, *12*, 1900. <https://doi.org/10.3390/genes12121900>

Academic Editor: Hiroyuki Tsuchiya

Received: 10 October 2021

Accepted: 18 November 2021

Published: 27 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Prostate Cancer Progression

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer in men and the fifth cause of cancer-related deaths worldwide [1,2]. It is expected that this disease will account for 1 in 5 new cases of cancer in American men in 2020 [2]. For men diagnosed with advanced and metastatic PCa, the 5-year survival rate is 30% [3]. Androgen deprivation monotherapy (ADT) is no longer the standard of care for men with metastatic hormone-sensitive PCa (mHSPC); today, ADT should be combined with second-generation antiandrogens (enzalutamide, apalutamide, darolutamide, or abiraterone acetate) or chemotherapy (docetaxel), although ADT is a unique therapy that should indefinitely continue in all stages of metastatic disease [4]. Resistance to chemotherapy and hormonal therapy in the metastatic setting remains a significant cause of morbidity and mortality [5].

There have been great improvements in understanding the landscape of genomic alterations and somatic mutations in PCa in recent years. Key somatic mutations in PCa include fusions of *TMPRSS2* with *ETS* family genes, amplification of the *MYC* oncogene, deletion and/or mutation of *PTEN*, *RB1*, and *TP53* in advanced disease, together with amplification and/or mutation of the androgen receptor (AR) [3]. At the pathway level, PI3K, DNA repair, WNT/ β -catenin, and epigenetic regulators are more frequently altered in metastatic samples [6–8].

The most common somatic rearrangements in PCa are gene fusions that involve members of the *ETS* family of transcription factors such as *ERG*, *ETV1*, and *ETV4*, which have important roles in embryonic development and cell proliferation. The most frequent of these fusions is between the AR-dependent promoter of the *TMPRSS2* gene onto the coding region of the *ERG* gene. This gene fusion has been found in fifty percent of primary PCa, leading to AR-dependent overexpression of *ERG* in these tumors [9].

Second-generation antiandrogens such as abiraterone and enzalutamide have been highly effective in controlling AR signaling activity, but unfortunately, most metastatic PCa develop antiandrogen resistance [10]. In many cases, CRPCs exhibit “androgen-indifferent” phenotypes, containing regions of tumor that lack AR expression. These histologically AR-negative tumors may also display lineage plasticity (see Table 1), as in the case of neuroendocrine prostate cancer (NEPC) (see Table 1). Other tumors lack both AR expression and neuroendocrine differentiation, and they are called “double-negative” PCa (DNPC), identified in approximately 25% of metastatic CRPC patients [11]. AR deregulation in more advanced PCa is associated with chromatin reprogramming of AR cistrome and epigenetic alterations, which can trigger neuroendocrine differentiation. As we discuss below, it is thought that the various acquired genomic rearrangements and chromatin changes that characterize CRPC overcome the effects of hormonal therapy by reactivation of prostate developmental stem-cell-like gene expression [12].

Table 1. Concept definitions.

| |
|--|
| Castration-resistant prostate cancer (CRPC) |
| CRPC is an incurable advanced prostate cancer that underwent genomic and phenotypical changes that promoted resistance to androgen deprivation therapy. CRPC overcomes the standard of care therapy and, therefore, its progression is independent of androgen signaling. It is believed that CRPC became resistant to hormonal therapy by reactivation of prostate developmental stem-cell-like gene expression. |
| Neuroendocrine differentiation |
| Neuroendocrine differentiation in prostate cancer is a well-recognized phenotypic change by which prostate cancer cells transdifferentiate into neuroendocrine-like cells. NE-like cells lack the expression of AR and prostate-specific antigen (PSA), and are resistant to androgen deprivation therapy. |
| Double-negative prostate cancer (DNPC) |
| DNPC are tumors that lack both AR expression and neuroendocrine differentiation. |
| Epithelial–mesenchymal transition (EMT) |
| EMT is a latent embryonic programming whereby epithelial cells change from cuboidal- to spindle-shaped morphology, losing their epithelial phenotype to acquire mesenchymal features. It is a pivotal process during homeostasis, but in the context of cancer, EMT programming can be reactivated to promote tumor initiation, invasion, migration, metastasis, and stemness. In this context, EMT drivers are responsible to start the EMT process that promotes expression of downstream EMT effectors. |
| Mesenchymal–epithelial transition (MET) |
| MET is the reverse of EMT programming, by which the cells undergo changes to lose the mesenchymal phenotype and acquire epithelial features. MET and EMT work together to promote lineage plasticity. |
| Lineage plasticity |
| Plasticity endows cancer cells with the capacity to shift dynamically between a differentiated state, with limited tumorigenic potential, and an undifferentiated or cancer stem-cell-like (CSC) state, which is responsible for long-term tumor growth. During lineage plasticity, cells constantly shift between EMT and MET to acquire therapy resistance and enhance stemness and metastatic potential. |
| Stemness |
| Stemness is a state of pluripotency that combines the ability of a cell to perpetuate its lineage, to give rise to differentiated cells, and to interact with its environment to maintain a balance between quiescence, proliferation, and regeneration. |

Table 1. Cont.

| |
|---|
| Cancer stem cells (CSCs) |
| The cells in human tumors, such as PCa, are organized hierarchically, and CSCs comprise a tiny subset of cancer cells that are endowed with tumor-initiating and long-term tumor-propagating capabilities. These tumor-initiating cells display phenotypic and functional features characteristic of normal prostate stem cells and are involved in tumor initiation, metastasis, and drug resistance. |
| Chromatin remodeling |
| Chromatin remodeling is the main form of epigenetic control of expression. Through processes such as DNA methylation and histone modification, the chromatin can be opened or closed. A more opened euchromatin is less condensed and favors gene transcription, while a closer and more condensed heterochromatin suppresses gene expression. |
| Histone modification |
| Histone modification is a complex epigenetic process by which histone tails are acetylated, methylated, phosphorylated, ubiquitinated, or sumoylated to directly or indirectly alter their affinity to DNA. Histones structure the chromatin, and therefore, the more affinity they have to DNA, the more condensed the chromatin is. |
| DNA methylation |
| DNA methylation is a reversible but stable epigenetic process by which a methyl group is attached to the 5-carbon of a cytosine in a CpG dinucleotide, catalyzed by DNA methyltransferase (DNMT). This process allows ligation of methyl-CpG binding-domain proteins (MBDs) that recruit histone-modifying enzymes to promote heterochromatinization. CpG islands, regions rich in CpG dinucleotides, are mostly found in regulatory gene loci, especially promoters and enhancers, and are essential to normal development and cell differentiation. |
| Noncoding RNA |
| Noncoding RNAs are single-stranded molecules of RNA that do not encode proteins. The main noncoding RNAs involved in epigenetic processes are micro-RNAs and long noncoding RNAs. Micro-RNAs are small molecules of RNA (19–25 nucleotides) that bind to complementary regions of messenger RNAs (mRNAs) to post-transcriptionally regulate gene expression. Long noncoding RNAs (lncRNAs) comprise RNA species with more than 200 nucleotides that regulate genes expression by controlling nuclear architecture, nuclear transcription, and mRNA stability. |

In this review, we summarize our current understanding regarding the role of EMT in PCa with a specific focus on the relationship of somatic mutations of PCa on CSC biology and the immune microenvironment. These findings will be related to PCa translational research that implicates the function of *TGF- β* , *ZEB1*, *TMPRSS2-ERG* fusion, and *PTEN* in driving EMT and activating pathways associated with therapeutic resistance.

Accumulating evidence suggests that some of the common somatic mutations of PCa not only impact classical hallmarks of cancer pathways [13], but also elicit cellular changes in the tumor microenvironment (TME), allowing cancer cells to avoid immunosurveillance [14]. One of the molecular processes associated with aggressive cancers that is also known to impact the TME is EMT [15].

2. Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) and Cancer Progression

When a cancer undergoes EMT, tumor cells lose their epithelial characteristics and acquire mesenchymal features (Figure 1). EMT is often followed by the reverse process of MET [16]. EMT has been associated with various tumor functions, including tumor initiation, malignant progression, tumor stemness, tumor cell migration, intravasation to the blood, metastasis, and resistance to therapy. The cellular changes that accompany EMT include enhanced motility and loss of cell–cell adhesion that are associated with a more aggressive cellular phenotype [17]. EMT has been classically characterized by loss of the epithelial markers E-cadherin and β -catenin, accompanied by an increase in cell migration and invasiveness due to activation of a specific transcriptional program. The hallmark mechanism of EMT in tumor progression is loss of cell–cell adhesion [18]. Transcriptional regulators, such as *TWIST*, *SNAI1*, *SNAI2*, *ZEB1*, and *ZEB2*, repress E-cadherin expression, while others promote the expression of mesenchymal differentiation markers, such as N- and/or R-cadherin and vimentin, as well as the expression of cellular matrix and focal adhesion proteins [19]. Some of these EMT transcription factors also function as biomarkers of less favorable disease course [20]. EMT alterations of cadherin also contribute to changes in the stroma-oriented cellular adhesion profile, with increased tumor cell motility and invasive properties associated with metastatic disease. Progression of PCa to mCRPC

may be associated with the expression of cellular adhesion molecules, which mediate aberrant interactions between glandular epithelial cells and the extracellular matrix in the TME. There is a strong association between reduced expression of E-cadherin and membranous β -catenin and progression in various types of carcinomas, including PCa, which could be used as a prognostic biomarker [21]. Prostate tumors are also able to interact with supporting extracellular matrix and stromal elements to establish a pro-tumorigenic immunosuppressive TME [14,22].

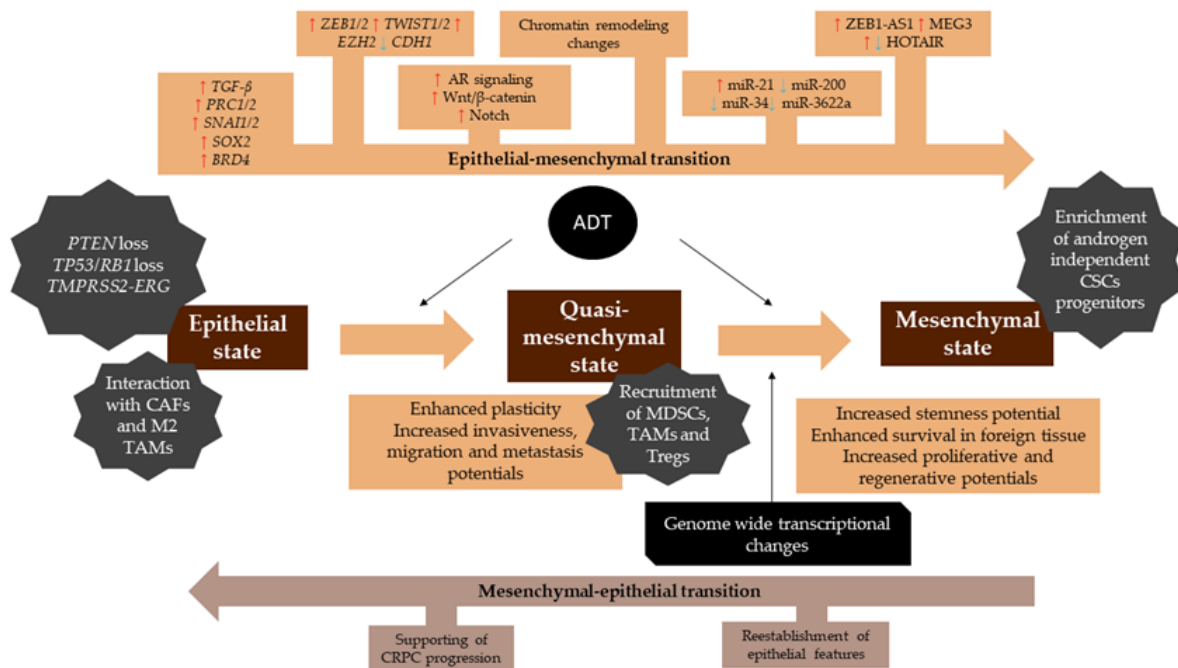


Figure 1. Processes and molecular events involved in EMT in prostate cancer. Tumor cells in an epithelial state gain internal and external stimuli to restore the EMT programming. EMT promotes wide transcriptional changes, illustrated at the top. Red arrows indicate upregulated genes, pathways and noncoding RNAs during EMT, blue arrows indicate the ones that are downregulated during this process. The quasi-mesenchymal state is the state of most of the cells affected by EMT, as shown in the center of the figure. At this stage, cells have enhanced plasticity and increased progression features. Quasi-mesenchymal cells modulate the tumor microenvironment, expressing immune evasion-related cytokines and recruiting immunosuppressive cells, which enhances an immunological evasion phenotype. Cells undergoing EMT confer a selective advantage when patients undergo antiandrogen therapy, enriching androgen-independent CSC progenitors. In the mesenchymal state, cells are usually resistant to therapy and have increased stemness and survival potentials. The mesenchymal–epithelial transition is established to restore epithelial features and support castrate-resistant prostate cancer (CRPC) growth. CAFs—cancer-associated fibroblasts, TAMs—tumor-associated macrophages, MDSCs—myeloid-derived suppressor cells, CSCs—cancer stem cells.

Tumors undergoing EMT may express intermediate morphological, transcriptional, and epigenetic features, that range across the spectrum of epithelial and mesenchymal markers [23]. These different phenotypic states, often referred to as quasi-mesenchymal intermediates, that vary between epithelial and a complete mesenchymal expression, have been referred to in the literature as partial, incomplete, or hybrid EMT states [24]. It is thought that the plasticity associated with EMT is likely a reflection of these intermediate expression states [25].

Cellular plasticity (discussed in Section 5) is not only a characteristic of EMT but is also strongly associated with the cancer stem cell (CSC) behavior [26]. Both normal stem cells and CSCs have shown associations with EMT in various tissue types [27], and evidence favors an important role for CSCs in cancer metastasis [24]. The CSC hypothesis is an emerging model that helps explain many of the molecular characteristics of malignancy as well as the propensity of human tumors to relapse, metastasize, and acquire resistance

to conventional therapies. CSCs have been identified in murine PCa model systems [28], PCa cell lines [29], and isolated from patient tumors [30] using stem cell-specific surface markers and various in vitro enrichment assays, such as PCa organoid culture [31].

These two important cellular programs of PCa progression—the CSC phenotype and EMT—are strongly interconnected [32].

3. Mouse Model and In Vitro Studies of EMT in PCa

Diverse mouse and in vitro studies using various experimental EMT treatments of carcinoma cells can induce expression of mesenchymal markers, leading to acquisition of a mesenchymal phenotype [33,34]. In vivo metastasis models have been particularly helpful for investigating interactions between tumor cells with tumor-associated stromal components and the TME [35]. Organoid culturing methods have also provided insights about induction of differentiation in vitro and have provided excellent model systems to show how signals inducing EMT may also influence immune anti-tumor responses and therapy resistance [24].

Ruscetti et al. used mouse models to characterize the in vivo role of EMT and investigate how mesenchymal plasticity (see Table 1) might influence metastatic potential in PCa [36]. The authors developed an elegant in vivo tracking system that allowed them to investigate the capacity for tumor initiation of mesenchymal-like EMT intermediate tumor cells compared to mesenchymal cells that have fully completed EMT. They showed that both the intermediate mesenchymal and the fully expressing EMT mesenchymal tumor cells were able to initiate primary tumors. However, only the mesenchymal-like intermediate tumor cells could persist in circulation and survive in the lung following intravenous injection. The mesenchymal-like intermediate tumor cells appear to exhibit characteristics of quiescent stem cells, whereas the fully expressing EMT tumor cells exhibit characteristics of proliferating progenitor cells that have lost stemness features. The authors point out that since mesenchymal-like intermediate tumors usually localize to the stem cell niche in the proximal region of the prostate gland, it is likely that they are able to maintain their dormant quiescent state by growth factors provided by the surrounding microenvironment at metastatic sites [37].

A study using xenograft growth of the PC3 prostate cancer cell line showed that PCa expression of IL6 activates a specific type of cancer-associated fibroblast which induces EMT, invasiveness, and stemness [38]. FGF signals appear to be important in PCa progression since this growth factor is usually overexpressed in advanced PCa, such as DNPCs [11]. Expression of the growth factor receptor (*Fgfr1*) also seems to have EMT as an effector of PCa progression via *Sox9* and Wnt signaling [39]. This suggests the potential role of IL6 and FGF as prognostic biomarkers.

Prostate tumors interact closely with the TME and stromal elements adjacent to tumor cells, which creates an immunosuppressive TME [14,22]. An early study on this topic highlights the role of cancer-associated fibroblast (CAFs) in the TME of PCa. These TME cells interacted with polarized M2 macrophages to stimulate the CAFs toward cooperative cellular activities with stemness traits and an EMT phenotype that increased PCa tumor cell motility and metastatic spread [40].

Research using a *PBCre4:Pten^{fl/fl}* mice, a *Pten* loss-induced prostate adenocarcinoma model, showed that *Rb1* loss is an important driver of lineage plasticity, which is characterized by enhanced EMT and stemness potentials (see Section 5). Transcriptomic profiling suggests that this phenotype, in both humans and mice, has the epigenetic reprogramming factors *Sox2* and *Ezh2* as effectors [41]. About 50% of NEPCs inactivate both the *Rb1* and *Tp53* tumor suppressor genes. Two studies have shown that loss of *Tp53* and *Rb1* is strongly associated with acquisition of lineage plasticity and epigenetic alterations, leading to resistance to androgen deprivation therapy [41,42]. Mu et al. showed that loss of both *Rb1* and *Tp53* induces a *Sox2*-mediated cellular plasticity, as indicated by decreased expression of luminal epithelial cell markers and increased expression of basal and neuroendocrine markers [42].

Contactin1 (*Cntn-1*) is a cell adhesion neuronal membrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. The protein has been shown to utilize EMT-dependent promotion for enhanced cell invasion, migration, and metastasis in several different types of carcinoma [43]. Downregulation of *Cntn-1* resulted in decreased activity of the PI3K/Akt signaling and docetaxel resistance in PCa cells lines and xenografts [44]. Since *Pten* loss and PI3K/AKT dysregulation are strongly associated with advanced PCa and CRPC, this preclinical finding draws attention to the potential collaborative role between EMT and common PCa driver mutations.

Pten loss has also been shown to promote EMT, and recent work suggests that *Pten* restoration in breast cancer models inhibits EMT and stemness CSCs activity via Abi1 (Abelson interactor 1) downregulation [45]. Abi1 is an adapter protein that has been implicated in actin cytoskeletal remodeling and intercellular adhesion. Recently, Abi1 was shown to control progression and epithelial plasticity in PCa through regulation of the EMT-WNT pathway [45]. Abi1 was found to control EMT downstream of the non-canonical WNT receptor *Fzd2* and upstream of the active *FYN-STAT3* axis [45]. TGF- β 1, another known EMT driver, was shown to do so via alternative splicing of CD44 to an isoform that promotes progression through migration, invasion, and tumor initiation [46]. The NOTCH signaling is a critical pathway involved in EMT and metastasis, and a recent investigation has indicated that it is an important player in stem-like basal cells through activation of the estrogen receptor [47].

Lineage plasticity in metastatic CRPC is likely to be mediated by epigenetic reprogramming, at least in part through histone modifications performed by polycomb repression. The polycomb repressive complex is an important player in EMT regulation. Previous work has shown that extracellular Hsp90 has the epigenetic function of reversing the polycomb function to drive tumor growth and invasion through EZH2, the enzymatic subunit of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) [48]. As discussed above, *EZH2* is believed to play a key role in promoting epigenetic changes, leading to neuroendocrine differentiation. This is affected by methylating histone H3 lysine 27 at the promoter of target genes [38]. Interestingly, polycomb regulation is also involved in mediating stem cell functions. The canonical PRC1 subunit Bmi1 has been implicated as a cellular marker of castrate-resistant luminal stem cells in PCa [49]. This finding is consistent with other studies implicating a regulatory role for PRC1 in CRPC. Inactivation of PRC1 in the normal prostatic epithelium causes cell-autonomous expression of Ccl2 and other inflammatory cytokines [50]. Su et al. found that PRC1 drives metastasis of DNPC tumor subtypes by regulating Ccl2 expression. Ccl2 in the TME of PCa signals self-renewal and recruitment of tumor-associated macrophages (TAMs), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), and T-regulatory cells (Tregs), which lead to immunosuppression and increased angiogenesis. Importantly, PRC1 inhibition combined with immune checkpoint blockade reversed these processes and suppressed metastasis in PCa mouse models [51]. Along with further investigations, these findings could support the use of CCL2 expression in precision medicine as a predictive biomarker for immunotherapy response.

The genomic background is an important player in defining the TME and immunological landscape. A study from Bezzi et al. showed that different genetically engineered mouse models (GEMMs) carrying homozygous *Pten* loss led to marked differences in the immune composition of the TME in induced tumors. Loss of the *Zbtb7a* gene in addition to *Pten* loss induced higher expression of Cxcl5, while loss of *Tp53* in addition to *Pten* loss induced higher expression of Ccl17, which correlates to myeloid cells' attraction through different mechanisms [52].

Classical studies of the normal prostatic epithelium in rodents show that the gland comprises basal cells, secretory luminal cells, and rare neuroendocrine cells surrounded by stroma and vasculature [53]. Using various types of in vitro organoid-forming assays [31], combined with stem cell enrichment assays, the existence of prostate stem/progenitor cells has been demonstrated in both basal and luminal prostate epithelial lineages [28–30,54–56].

One of the first studies of murine PCa suggested that tumors may arise from CSCs that undergo *Pten/Akt* signaling dysregulation and produce a heterogeneous population of cells, expressing luminal, basal, and intermediate cells [57]. Wang et al. identified a CSC-like subpopulation expressing ZEB1 in prostatic basal stem cells [58]. Emerging evidence suggests that ZEB1 drives the induction of EMT with activation of a subpopulation that have stem cell traits, immune evasion, and epigenomic reprogramming (see Section 5) [59]. The authors used single-cell RNA-seq analysis to show that the Zeb1 subpopulation had mesenchymal cellular features and higher expression levels of EMT inducers such as *Snai1*, *Zeb2*, *Prrx1*, and *Prrx2* [58]. Another study showed that basal cells preferentially express genes that confer intrinsic stem-like and neurogenic properties. Of clinical relevance, the basal cell gene expression profile was found to be enriched in advanced, anaplastic, castration-resistant and metastatic PCa [60]. Similarly, Alumkal et al. demonstrated that a basal lineage, neurogenic/stemness program was activated in ADT non-responders to AR inhibition therapy, while a luminal lineage program was more active in responders (discussed in Section 5) [61].

Collectively, these analyses suggest that rare subpopulations of basal cells have the potential to function as ADT-resistant CSCs in PCa. However, the precise origin of CSCs in advanced PCa remains inconclusive as another single-cell RNA-seq study indicated that rare luminal cell types also had stem-like regenerative properties [54]. The increasing use of single-cell RNA-seq analysis of CSCs from tumors at different stages of the EMT spectrum will provide more detailed transcriptomic signatures that will help to elucidate which lineages contribute to CSCs and are associated with PCa progression, drug resistance, and metastatic disease.

4. Transcriptional Signatures and EMT Pathways of Progression

The development of high-throughput omics technologies allowed a better understanding of how different mechanisms and processes work at the molecular level. While phenotypic evaluation of EMT has more general definitions [15] (see definitions in Table 1), transcriptomics and genomics analysis is providing specific gene signatures associated with the various intermediate-mesenchymal states (discussed in this section). EMT transcriptional 'drivers' and 'effector' genes may both function as biomarkers along the spectrum of EMT [16] (see Figure 2). Since these genetic signatures may be related to cancer stem cell biology, and clinical outcomes in PCa (as discussed in the previous section [36]), this area of EMT research is particularly important.

Byers et al. developed an EMT signature for non-small-cell lung cancer, integrating transcriptomics, genomics, and drug response analysis *in vitro* and *in vivo*. This pre-clinical study showed that this EMT signature could classify tumors as epithelial-like or mesenchymal-like, and that the mesenchymal-like intermediate states were associated with poor outcomes, such as drug resistance. Their analysis also identified the receptor tyrosine kinase *Axl* as a novel biomarker of EMT in this type of cancer and as a potential therapeutic target, along with EGFR inhibition [63]. Computational modeling has been used to investigate the interconnection between EMT, stemness, and Notch signaling. The authors analyzed CSC gene expression profiles from different types of cancer and showed that stemness properties can be found in any of the different phenotypes along the EMT spectrum. Their data suggest that Notch-jagged signaling could underlie gene expression relationships between stemness and EMT [64]. Their model also draws attention to the potential anti-cancer role of the diabetes drug metformin, which shows promise for therapeutic inhibition through the Notch-Jagged pathway in tumors with EMT (discussed in Section 7).

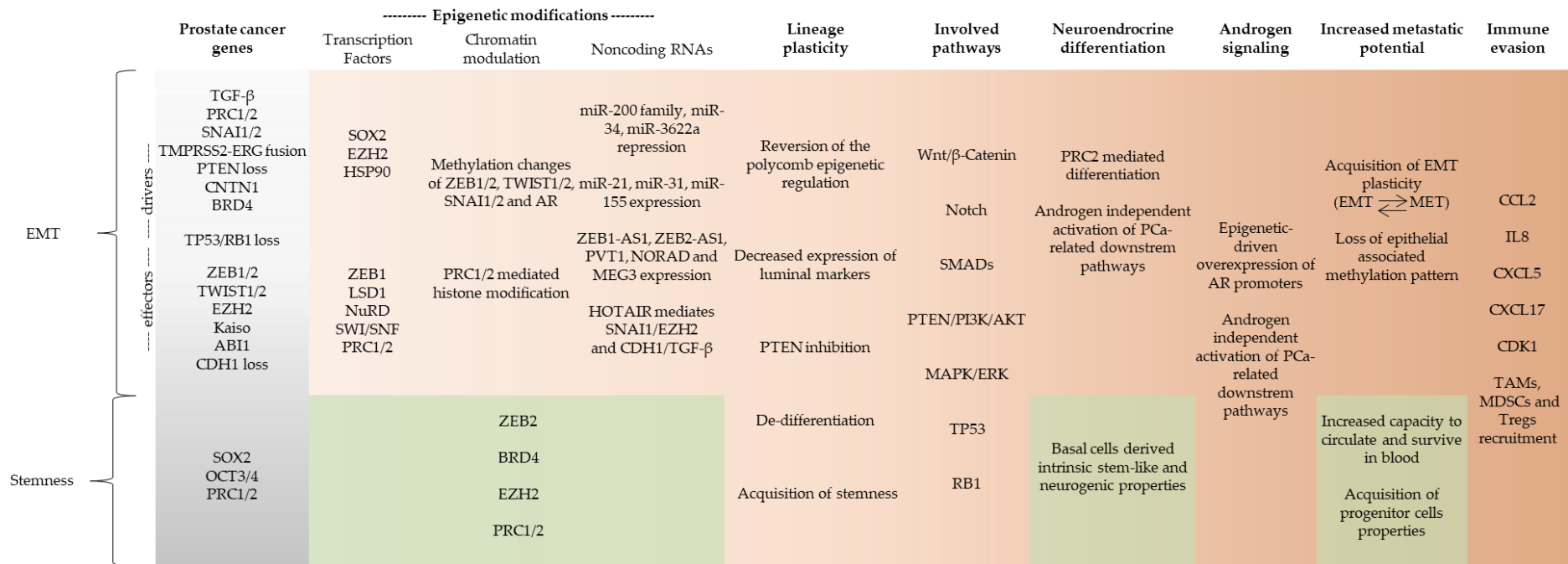


Figure 2. Schematic depiction of regulation of EMT and stemness related to PCa progression. Somatic mutations of prostate cancer are thought to lead to molecular changes in transcription factors, chromatin modifiers, and noncoding RNA involved in EMT and stemness. The consequences of the epigenetic changes initiated by EMT driver transcription factors reprograms chromatin, conferring epigenetic and transcriptional changes to downstream EMT effector genes [16]. These alterations can contribute to plasticity and alterations to other genes and pathways that promote the phenotypic and molecular changes of EMT and stemness during PCa progression [18,62]. The horizontal left to right axis shows the various genetic and epigenetic processes activating pathways of progression (with increasing orange intensity) to mCRPC. Stemness and EMT have closely related prostate cancer somatic genetics (shown as a grey gradient, left side), and specific stemness features during progression are depicted in pale green (lower panels).

Other groups have used similar mathematical models of gene expression data to devise diverse classification metrics of EMT activities. George et al. developed a predictive model to score the degree to which different cancer cell lines exhibit intermediate EMT features. They showed that EMT status based on their model was associated with survival in a tissue- and subtype-specific manner [65]. Another group developed a molecular signature for non-small-cell lung cancer (NSCLC) with 16 genes and showed that EMT was associated with immune cell exclusion and expression of immunosuppressive cytokines [66]. In head and neck squamous cell carcinoma, an 82-gene molecular signature for EMT was functionally validated in vitro and could predict for poor outcome and immune evasion [67].

The increasing interest in cancer immunotherapy has meant that analysis of correlations between EMT, stemness, and immune response has become an area for investigation. A study using genetically engineered mouse models of PCa showed that the immunological landscape of the TME can be genetically driven [52]. Thorsson et al. molecularly characterized six distinct immune subtypes (called C1–C6) across 33 cancer types in TCGA [68]. The immune subtypes were characterized by dominance of either macrophage or lymphocyte signatures, T-helper phenotype, the extent of intra-tumoral heterogeneity, and by proliferative activity. Another deconvolution study of bulk RNA-seq public domain cancer data established scoring metrics across the EMT plasticity spectrum. They compared their metrics to the C1–C6 immune subtypes of Thorsson et al. Their predictive analysis showed that different EMT scores were associated with specific immune subtypes. According to the authors, a more epithelial-like score is related to wound healing and IFN- γ subtypes (C1 and C2, respectively), while the most mesenchymal-like score was related to the quiescence subtype (C5), which would be consistent with an increased mesenchymal score also having stemness features [69]. This was the first step toward a prolific use of molecular signatures associated with EMT in precision therapy, since different molecular subtypes could be efficient prognostic and predictive biomarkers to stratify patient populations.

Transcriptional investigation of PCa showed that epithelial plasticity is related to poor clinical outcome, but that the MET reverting transition signature also has important properties [70,71]. Stylianou et al. showed that the EMT molecular profile was enriched in patients recently subjected to ADT. Treatment of hormone-sensitive PCa with antiandrogen therapies imposes a strong negative selection pressure on tumors. Thus, ADT may select for chromatin remodeling, epigenetic plasticity, and widescale transcriptional changes in surviving ADT-resistant tumor cells (discussed in Section 5). The authors also showed that the epithelial–mesenchymal plasticity signature, which incorporates both EMT and MET, was associated with metastasis and predicted a poor patient prognosis. Additionally, they showed that in their PCa model, EMT was mainly driven by SNAI1. Snail proteins are zinc finger transcriptional repressors controlling EMT that are also involved in the acquisition of migratory properties to epithelial cells. Inhibition of Snail alone decreased the expression of mesenchymal markers such as the effectors *ZEB1* and vimentin and restored expression of epithelial markers such as *CDH1* [72]. *SNAIL* gene deregulation appears to be involved in AR signaling since loss of *SNAI2*, another Snail protein, was associated with a better response to androgen deprivation therapy [73]. *BRD4* is a chromatin regulatory protein that promotes expression of the EMT-related transcription drivers *SNAI1* and *SNAI2*, and its ablation represses TGF- β -mediated EMT. Decreased expression of *BRD4* was associated with reduced survival in PCa based on TCGA data [74]. The Wnt pathway is also related to EMT. Recently, the non-canonical Wnt pathway *Wnt5a/Fzd2* was discovered to increase EMT markers in PCa, and a signature associated with this pathway was developed to predict PCa aggressiveness [75]. This finding was also consistent with the EMT study (discussed in Section 3) in which *Abi1* controlled epithelial plasticity downstream of the non-canonical WNT receptor *FZD2* [45].

5. Epigenomic Regulation of EMT and Lineage Plasticity in Prostate Cancer

The concept of epigenetic plasticity has been used to describe how chromatin structure and altered chromatin states are associated with epigenetic changes that confer downstream

transcriptional alterations to cancer hallmark pathways [76]. Lineage plasticity is of particular clinical relevance in advanced PCa since it is a common mechanism of resistance to ADT (Table 1). These increasingly powerful combinations of antiandrogen drugs impose a strong negative selection pressure on tumors so that altered chromatin states accompanied by epigenetic-driven changes to the transcriptome characterize the surviving ADT-resistant tumor cells. Many of the transcriptionally important genes that drive normal prostatic development and differentiation also function as oncogenes (*ETS*, *MYC*, *FOXA1*) or tumor suppressor genes (*RB1*, *PTEN*, *TP53*) in primary and/or CRPC [77,78]. There is increasing awareness of the importance of finding connections between epigenetic and chromatin changes in ADT-resistant CRPC and the role played by the common PCa recurrent somatic mutation [79]. In Figure 2, we highlight how the frequently mutated genes of PCa, such as *PTEN*, *TP53*, *CDH1*, *TMPRSS2-ERG*, and *RB1*, interact with EMT effectors and drivers involved in epigenetic pathways leading to mCRPC.

Emerging epigenomic data show that prostate-specific genes that are normally responsible for cell motility and invasion during fetal organogenesis are targets for re-expression in mCRPC. These fetal developmental genes are usually inactive in adult prostate and primary tumors. They all appear to be AR-dependent genes that become activated by the transcription factors *FOXA1* and *HOXB13* at loci, and have a DNA binding motif for the EMT effector *ZEB1* [78]. These data are consistent with earlier correlative studies indicating that the expression of *ZEB1* is associated with tumor grade and outcome in PCa, highlighting the importance of EMT biomarkers such as *ZEB1* in predicting aggressive disease [80] (see Figure 2).

During EMT, the DNA methylation landscape pattern is steadily altered. Expression of the EMT effector and driver transcription factor families such as *SNAI*, *ZEB*, and *TWIST* seem to be autoregulated by DNA methylation [81]. Activation of the signaling pathways SMADs, PI3K/Akt, and MAPK/ERK through EMT drivers, such as TGF- β , are related to epigenetic-remodeling. *ZEB1* is thought to induce EMT by imposing a cellular plasticity phenotype [59]. *ZEB2* expression is also involved in cellular plasticity of embryonic stem cells through controlling cellular methylation [81]. Focal hyper-methylation of *CDH1* is induced by *ZEB1* expression and interactions of EMT transcription factors with methyltransferases [59,81]. In prostate cancer, altering the DNA methylation pattern has been shown to be essential in the fibroblast-induced EMT and stemness [82].

Lysine-specific histone demethylase 1A (*LSD1*) is part of the chromatin remodeling complexes involved in the balance of self-renewal and differentiation. *LSD1* overexpression was observed in different types of cancer and is inversely correlated with *CDH1* expression. Both *SNAI* and *ZEB* protein families have been shown to interact with this histone-modifying enzyme. *SNAI* and *ZEB* families have also been shown to recruit the transcriptional repressor Mi-2/Nucleosome-Remodeling and the Deacetylase (NuRD) Complex to their target promoters. The SWItch/sucrose non-fermentable (SWI/SNF) complex has been shown to interact with *ZEB1* and the Wnt signaling pathway to promote EMT. Lastly, both polycomb repressive complexes 1 and 2 were shown to interact directly and indirectly with EMT transcription factors to promote plasticity and inhibit the tumor suppressor *PTEN* [81].

In a recent single-cell analysis by He et al. based on 14 patients with advanced PCa treated with antiandrogen therapy, the patients were found to co-express multiple AR isoforms, including truncated isoforms. Resistance to therapy was also associated with upregulation of gene signatures for EMT and TGF- β signaling. Additionally, a subset of patient tumors had high expression of dysfunctional cytotoxic CD8+ T cell markers, suggesting that EMT may also impact immune responses in CRPC [83].

6. Noncoding RNA Regulation of EMT and Lineage Plasticity

Micro-RNAs can act as epigenetic modulators of gene expression, modifying RNA stability and translation, and in some cases, promoting transcription without modifying the gene sequences [84]. Additionally, micro-RNAs can themselves be regulated by chromatin

and epigenetic modifications [85]. The best-known micro-RNAs involved in EMT regulation are the miR-200 family and miR-34. MiR-200 works in a double-negative feedback loop with ZEB1/2 and targets the Wnt/ β -catenin pathway. MiR-34 and miR-203 work in an auto-regulated feedback loop with SNAI1 [59,86]. Micro-RNAs can also induce EMT. MiR-21 and miR-31 can suppress TIAM1 to promote *TGF- β* and miR-155 expression, and reduce RhoA to disrupt tight junctions' formation, and their knockdown was shown to suppress *TGF- β* -mediated EMT [81,87]. The transcription factor Kaiso is a TP53-dependent regulator that directly binds to methylated regions of the DNA. Overexpression of the gene has been shown to downregulate miR-200, possibly through an EGFR-Kaiso signaling axis, to promote *ZEB1* expression and induce EMT in PCa [88].

The EMT regulatory miR-3622a maps to chromosome region 8q21. Since this chromosomal region is subject to recurrent deletion in PCa, and loss is associated with poor prognosis, it has been suggested that deregulation of EMT by miR-3622a may be promoting tumor progression in PCa bearing this deletion [89]. However, it is possible that loss of other genes in this deleted region of chromosomes may also be contributing to PCa outcome.

Long noncoding RNAs (lncRNAs) are also known to regulate EMT effector and driver transcription factors (see Figure 2). *ZEB1-AS1* (*ZEB1* antisense 1) and *ZEB2-AS1* are lncRNAs that are transcribed from a shared bi-directional promoter of *ZEB1*. Both lncRNAs can upregulate *ZEB1* and *ZEB2* expression. *HOTAIR*, a *HOX* antisense intergenic RNA with previously described roles in the normal development, seems to be involved in EMT, since it is required for both *SNAI1* and miR-34a repression. *MEG3* is a lncRNA that represses both *CDH1* and the miR-200 family. Repression is achieved by recruitment of *JARID2*, *EZH2*, and histone H3 methylation to the regulatory regions of *CDH1* and miR-200. These alterations lead to increased expression of *TGF- β* [81,90].

Recently, the lncRNAs *PVT1* and *NORAD* have been shown to promote EMT in PCa via mediating miRNA targeting of EMT promoters [91,92]. *NORAD* was shown to endogenously compete with other targets of miR-30a-5p, downregulating its activity, therefore promoting *RAB11A* expression and Wnt/ β -catenin pathway activation [92]. *PVT1* competes with miR-186 targets, which include the EMT effector *Twist1* [91].

Epigenetic regulatory mechanisms involve interaction of transcription factors with protein complexes, and noncoding RNAs offer several new therapeutic approaches that target EMT and CSCs [27,93] (Figure 2). Moreover, the lineage plasticity associated with EMT in mCRPC provides an opportunity to determine which genetic driver pathways are associated with drug resistance and immunotherapy failure in advanced disease.

7. Clinical Trials

Progress in treating metastatic disease is starting to take advantage of improved understanding of the interconnected signaling pathways that control EMT and stemness pathways during tumor progression. Since EMT is implicated in both cancer metastasis and induction of drug resistance, targeting EMT may have enormous therapeutic value [94]. As discussed above, many EMT drivers are epigenetically regulated, so drugs that influence DNA methylation, histone modification, and plasticity are emerging as potential therapeutic targets for overcoming EMT [95]. In PCa, EMT appears to be an important mediator of acquired resistance to both androgen deprivation and docetaxel therapies [44,61,72].

Driver and effector transcription factors such as Snail, Twist, Zeb, or Stat3 are activated early in EMT [19]. Due to their crucial role in regulating the EMT process, inhibiting their expression may be a way of reversing the EMT process and preventing activation of metastatic pathways. In addition, many crucial EMT signaling pathways, such as *TGF- β 1*, *NF- κ B*, Wnt, Akt, PPAR, and Notch, contribute to the EMT cancer phenotype, so inhibitors of these pathways may also be investigated.

A recent clinical trial (NCT02099864) showed that tumors from CRPC patients who failed to respond to Enzalutamide (a non-steroidal androgen-receptor inhibitor) therapy harbored a transcriptional profile associated to stemness and reduced AR activity in basal

lineages [61]. Together, these findings highlight the need to explore the use of novel EMT-targeting agents as adjuvant therapy associated with standard of care therapies in order to retard and inhibit—or maybe even prevent—de novo resistance.

Numerous clinical trials have been developed to target EMT in different types of advanced cancer in an effort to find new biomarkers, minimize progression, and improve therapeutic responses. In advanced PCa, clinical trials have been designed to investigate the use of EMT as new biomarkers for prostate cancer, and some therapeutic agents targeting EMT have reached phase II trials (Table 2).

Table 2. EMT-targeting clinical trials in PCa.

| Biomarkers Investigation | | | |
|---|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| Target | Rationale | Clinical Trial Identifier | |
| Circulating biomarkers of epithelial plasticity | Biomarkers of epithelial plasticity and microtubule interacting protein variants may be related to docetaxel resistance and be enriched in patients failing abiraterone. | NCT02269982 | |
| Circulating tumor cells (CTCs) | Determine whether circulating tumor cells in patients with metastatic progressive castration-resistant prostate cancer or metastatic progressive breast cancer can be captured using a novel mesenchymal marker-based ferrofluid (N-cadherin- or O cadherin-based). | NCT02025413 | |
| CTCs, free DNA, and EMT antigens | Identification of biomarkers that may be predictive of outcome of activity of cabazitaxel treatment in castration-resistant prostate cancer. | NCT03381326 | |
| Therapeutical Agents | | | |
| Target | Rationale | Drug | Clinical trials identifier |
| AMP-Kinase | Recent evidence shows that the drug may circumvent tumor growth and resistance to castration therapy. | Metformin | NCT01620593 NCT02176161 |
| WEE 1 Inhibitor | Specifically inhibiting WEE1 may restore CDK1 expression and re-establish immuno-mediated attack of mesenchymal-like cells. | Adavosertib | NCT03385655 NCT02465060 |
| Deacetylase inhibitors | Specifically blocking HDACs may prevent histone modifications implicated in cancer. | Romidepsin | NCT00106418 NCT00106301 |
| | | Panobinostat | NCT00667862 NCT00878436 |
| | | Pracinostat | NCT01075308 |
| | | Vorinostat | NCT00330161 NCT00589472 |
| | | Phenylbutyrate | NCT00006019 |
| EZH2 | Restraining EZH2 may repress PRC2-mediated EMT. | Tazemetostat | NCT04179864 |
| | | CPI-1205 | NCT03480646 |
| DNMTs | Specifically targeting DNMTs may avoid hypermethylation of CDH1 and tumor suppressors. | Azacitidine | NCT03572387 NCT00384839 |
| | | Decitabine | NCT02649790 NCT03572387 |

Clinical trials that target epithelial–mesenchymal transition and their identifiers from [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov). CTCs—circulating tumor cells, WEE1—WEE1 G2 checkpoint kinase, CDK1—cyclin-dependent kinase 1, EZH2—enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit, DNMTs—DNA methyltransferases.

Most of the clinical trials using EMT try to relate well-established findings to clinically relevant biomarkers in the blood, such as circulating cells and tumor antigens. The purpose is either to capture circulating tumor cells using immunoaffinity mesenchymal attractants

or to identify EMT cells and molecules with clinical relevance to predict aggressiveness and therapy response.

Among the therapeutic agents, metformin, a classical anti-diabetic agent, has been studied in cancer prevention and therapy, mainly because of the AMP-kinase activation. In PCa, the antineoplastic effect may be not only through AMPK, but also IGF-1, mTOR, and AR signaling [96,97]. In vitro and observational evidence from preclinical studies also showed a possible action of metformin in preventing stem cells' self-renewal and proliferation, possibly through Notch targeting [96,98,99].

Adavosertib, a specific WEE1 inhibitor, has also been investigated as an EMT-targeting agent. WEE1 is a negative regulator kinase of CDK1. Loss of cell cycle kinase CDK1 seems to facilitate cells undergoing EMT-mediated escape from immunosurveillance. Specifically inhibiting WEE1 may restore CDK1 expression and therefore re-establish immunomediated attack of mesenchymal-like cells [100].

Given the roles of chromatin remodeling as drivers and effectors of cell plasticity, epigenetic-targeting drugs may indirectly regulate EMT and cancer progression. Many specific compounds have been developed that can target the chromatin remodeling effects of EMT. Inhibiting DNA methyltransferases (DNMTs) may avoid hypermethylation of CDH1 and tumor suppressors, while the inhibitory chromatin-modifying effects of EZH2 may repress PRC2 activity. The blocking of histone deacetylases (HDACs) may prevent histone modifications implicated in cancer [101,102]. Targeting epigenetic- and chromatin-related EMT processes in combination with standard therapeutic approaches such as ADT should be a promising strategy for improving disease outcome in PCa. However, a broader understanding of the molecular biology of EMT and its relationship with the established molecular subtypes of advanced PCa is crucial to further implement EMT-targeting strategies of treatment in clinical trials.

8. Future Directions and Conclusions

Contemporary EMT research highlights the importance of understanding the interconnections between cell plasticity, stemness, and therapy response. These processes are tightly involved in tumor initiation, invasiveness, migration, metastasis, and interactions with the TME. EMT can be triggered by different drivers and effectors that may function as prognostic biomarkers of metastatic disease. TWIST, SNAIL, and ZEB families of promoters are closely involved in EMT regulation through alterations to the transcriptional landscape and through epigenetic changes such as chromatin modification and noncoding RNA modulation.

During the last ten years, there has been considerable investigation of the role of EMT in cancer progression and therapy resistance [103,104]. In PCa, further investigations are needed to identify the most promising targets to improve treatment of CRPC. *SNAIL* seems to be a crucial driver of EMT in PCa, while Notch and Wnt signaling are more closely involved in both the EMT and cancer stemness phenotypes. Targeting both these pathways may be effective for some types of cancer. Meanwhile, the development of human transcriptional signatures of EMT could be predictive of progression and therapy response. Epigenetic modifications also offer promise, but the downside is that global changes of methylation and histone modification may lead to unexpected alterations in gene expression, with unfortunate adverse events. Targeting specific epigenetic effectors, known to be involved in EMT, such as LSD1, as have been studied in other types of cancers, may also be of great benefit for PCa [102]. Furthermore, a better understanding of how EMT and stemness modulate the immune tumor microenvironment of PCa may provide new insights for novel therapeutic approaches.

Finally, the recent tragic COVID-19 pandemic required the rapid development of novel mRNA vaccines for targeted therapies against SARS-CoV-2. These new mRNA vaccine platforms could be used to encode specific and personalized synthetic peptides that with an appropriate delivery system could modulate key pathways, such as EMT [105]. Technical

developments in combination with the growing understanding of the different processes involved in EMT and CSC biology improve the prospects for precision cancer therapy.

Author Contributions: L.P.C. and J.A.S. designed the review; L.P.C. and J.A.S. wrote the manuscript; L.P.C. and C.M.M. created the figures and tables; C.M.M., F.P.S. and R.B.d.R. contributed to editing and reviewing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, grant numbers 2019/22912-8 (J.A.S.) and 2020/12816-9 (L.P.C.), and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq grant PQ-1D to J.A.S.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rebello, R.J.; Oing, C.; Knudsen, K.E.; Loeb, S.; Johnson, D.C.; Reiter, R.E.; Gillissen, S.; Van der Kwast, T.; Bristow, R.G. Prostate Cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 9. [[CrossRef](#)]
4. 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.; Gillissen, S.; et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur. Urol.* **2021**, *79*, 243–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Teo, M.Y.; Rathkopf, D.E.; Kantoff, P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annu. Rev. Med.* **2019**, *70*, 479–499. [[CrossRef](#)]
6. Abeshouse, A.; Ahn, J.; Akbani, R.; Ally, A.; Amin, S.; Andry, C.D.; Annala, M.; Aprikian, A.; Armenia, J.; Arora, A.; et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* **2015**, *163*, 1011–1025. [[CrossRef](#)]
7. Armenia, J.; Wankowicz, S.A.M.; Liu, D.; Gao, J.; Kundra, R.; Reznik, E.; Chatila, W.K.; Chakravarty, D.; Han, G.C.; Coleman, I.; et al. The Long Tail of Oncogenic Drivers in Prostate Cancer. *Nat. Genet.* **2018**, *50*, 645–651. [[CrossRef](#)]
8. 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.; et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell* **2015**, *161*, 1215–1228. [[CrossRef](#)]
9. Scaravilli, M.; Koivukoski, S.; Latonen, L. Androgen-Driven Fusion Genes and Chimeric Transcripts in Prostate Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 623809. [[CrossRef](#)]
10. Angelergues, A.; Maillet, D.; Flechon, A.; Ozguroglu, M.; Mercier, F.; Guillot, A.; Le Moulec, S.; Gravis, G.; Beuzebec, P.; Massard, C.; et al. Duration of Response to Androgen-Deprivation Therapy (ADT) and Efficacy of Secondary Hormone Therapy, Docetaxel (D), and Cabazitaxel (C) in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (MCRPC). *JCO* **2014**, *32*, 282. [[CrossRef](#)]
11. Bluemn, E.G.; Coleman, I.M.; Lucas, J.M.; Coleman, R.T.; Hernandez-Lopez, S.; Tharakan, R.; Bianchi-Frias, D.; Dumpit, R.F.; Kaipainen, A.; Corella, A.N.; et al. Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer Is Sustained through FGF Signaling. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 474–489. [[CrossRef](#)]
12. Hankey, W.; Chen, Z.; Wang, Q. Shaping Chromatin States in Prostate Cancer by Pioneer Transcription Factors. *Cancer Res.* **2020**, *80*, 2427–2436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
14. Melo, C.M.; Vidotto, T.; Chaves, L.P.; Lautert-Dutra, W.; Reis, R.B.d.; Squire, J.A. The Role of Somatic Mutations on the Immune Response of the Tumor Microenvironment in Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kalluri, R.; Weinberg, R.A. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 1420–1428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nieto, M.A.; Huang, R.Y.-J.; Jackson, R.A.; Thiery, J.P. EMT: 2016. *Cell* **2016**, *166*, 21–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Craene, B.D.; Berx, G. Regulatory Networks Defining EMT during Cancer Initiation and Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 97–110. [[CrossRef](#)]
18. Thiery, J.P.; Acloque, H.; Huang, R.Y.J.; Nieto, M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* **2009**, *139*, 871–890. [[CrossRef](#)]
19. Stemmler, M.P.; Eccles, R.L.; Brabletz, S.; Brabletz, T. Non-Redundant Functions of EMT Transcription Factors. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 102–112. [[CrossRef](#)]
20. Armstrong, A.J.; Healy, P.; Halabi, S.; Vollmer, R.; Lark, A.; Kemeny, G.; Ware, K.; Freedland, S.J. Evaluation of an Epithelial Plasticity Biomarker Panel in Men with Localized Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2016**, *19*, 40–45. [[CrossRef](#)]
21. Gravdal, K.; Halvorsen, O.J.; Haukaas, S.A.; Akslén, L.A. A Switch from E-Cadherin to N-Cadherin Expression Indicates Epithelial to Mesenchymal Transition and Is of Strong and Independent Importance for the Progress of Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 7003–7011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Kwon, J.T.W.; Bryant, R.J.; Parkes, E.E. The Tumor Microenvironment and Immune Responses in Prostate Cancer Patients. *Endocr. Relat. Cancer* **2021**, *28*, T95–T107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pastushenko, I.; Blanpain, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 212–226. [[CrossRef](#)]
24. Lambert, A.W.; Weinberg, R.A. Linking EMT Programmes to Normal and Neoplastic Epithelial Stem Cells. *Nat. Rev. Cancer* **2021**, *21*, 325–338. [[CrossRef](#)]
25. Williams, E.D.; Gao, D.; Redfern, A.; Thompson, E.W. Controversies around Epithelial–Mesenchymal Plasticity in Cancer Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 716–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Batlle, E.; Clevers, H. Cancer Stem Cells Revisited. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 1124–1134. [[CrossRef](#)]
27. Shibue, T.; Weinberg, R.A. EMT, CSCs, and Drug Resistance: The Mechanistic Link and Clinical Implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2017**, *14*, 611–629. [[CrossRef](#)]
28. Kahounová, Z.; Remšík, J.; Fedr, R.; Bouchal, J.; Mičková, A.; Slabáková, E.; Binó, L.; Hampl, A.; Souček, K. Slug-Expressing Mouse Prostate Epithelial Cells Have Increased Stem Cell Potential. *Stem Cell Res.* **2020**, *46*, 101844. [[CrossRef](#)]
29. Patrawala, L.; Calhoun, T.; Schneider-Broussard, R.; Li, H.; Bhatia, B.; Tang, S.; Reilly, J.G.; Chandra, D.; Zhou, J.; Claypool, K.; et al. Highly Purified CD44+ Prostate Cancer Cells from Xenograft Human Tumors Are Enriched in Tumorigenic and Metastatic Progenitor Cells. *Oncogene* **2006**, *25*, 1696–1708. [[CrossRef](#)]
30. Maitland, N.J.; Frame, F.M.; Polson, E.S.; Lewis, J.L.; Collins, A.T. Prostate Cancer Stem Cells: Do They Have a Basal or Luminal Phenotype? *Horm. Cancer* **2011**, *2*, 47–61. [[CrossRef](#)]
31. Drost, J.; Karthaus, W.R.; Gao, D.; Driehuis, E.; Sawyers, C.L.; Chen, Y.; Clevers, H. Organoid Culture Systems for Prostate Epithelial Tissue and Prostate Cancer Tissue. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 347–358. [[CrossRef](#)]
32. Mei, W.; Lin, X.; Kapoor, A.; Gu, Y.; Zhao, K.; Tang, D. The Contributions of Prostate Cancer Stem Cells in Prostate Cancer Initiation and Metastasis. *Cancers* **2019**, *11*, 434. [[CrossRef](#)]
33. Robinton, D.A.; Daley, G.Q. The Promise of Induced Pluripotent Stem Cells in Research and Therapy. *Nature* **2012**, *481*, 295–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kleiman, R.J.; Engle, S.J. Human Inducible Pluripotent Stem Cells: Realization of Initial Promise in Drug Discovery. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 1507–1515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gómez-Cuadrado, L.; Tracey, N.; Ma, R.; Qian, B.; Brunton, V.G. Mouse Models of Metastasis: Progress and Prospects. *Dis. Model Mech.* **2017**, *10*, 1061–1074. [[CrossRef](#)]
36. Ruscetti, M.; Quach, B.; Dadashian, E.L.; Mulholland, D.J.; Wu, H. Tracking and Functional Characterization of Epithelial–Mesenchymal Transition and Mesenchymal Tumor Cells during Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2749–2759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Salm, S.N.; Burger, P.E.; Coetzee, S.; Goto, K.; Moscatelli, D.; Wilson, E.L. TGF- β Maintains Dormancy of Prostatic Stem Cells in the Proximal Region of Ducts. *J. Cell Biol.* **2005**, *170*, 81–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Giannoni, E.; Bianchini, F.; Masieri, L.; Serni, S.; Torre, E.; Calorini, L.; Chiarugi, P. Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial–Mesenchymal Transition and Cancer Stemness. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 6945–6956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Acevedo, V.D.; Gangula, R.D.; Freeman, K.W.; Li, R.; Zhang, Y.; Wang, F.; Ayala, G.E.; Peterson, L.E.; Ittmann, M.; Spencer, D.M. Inducible FGFR-1 Activation Leads to Irreversible Prostate Adenocarcinoma and an Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 559–571. [[CrossRef](#)]
40. Comito, G.; Giannoni, E.; Segura, C.P.; Barcellos-de-Souza, P.; Raspollini, M.R.; Baroni, G.; Lanciotti, M.; Serni, S.; Chiarugi, P. Cancer-Associated Fibroblasts and M2-Polarized Macrophages Synergize during Prostate Carcinoma Progression. *Oncogene* **2014**, *33*, 2423–2431. [[CrossRef](#)]
41. Ku, S.Y.; Rosario, S.; Wang, Y.; Mu, P.; Seshadri, M.; Goodrich, Z.W.; Goodrich, M.M.; Labbé, D.P.; Gomez, E.C.; Wang, J.; et al. Rb1 and Trp53 Cooperate to Suppress Prostate Cancer Lineage Plasticity, Metastasis, and Antiandrogen Resistance. *Science* **2017**, *355*, 78–83. [[CrossRef](#)]
42. Mu, P.; Zhang, Z.; Benelli, M.; Karthaus, W.R.; Hoover, E.; Chen, C.-C.; Wongvipat, J.; Ku, S.-Y.; Gao, D.; Cao, Z.; et al. SOX2 Promotes Lineage Plasticity and Antiandrogen Resistance in TP53- and RB1-Deficient Prostate Cancer. *Science* **2017**, *355*, 84–88. [[CrossRef](#)]
43. Liang, Y.; Ma, C.; Li, F.; Nie, G.; Zhang, H. The Role of Contactin 1 in Cancers: What We Know So Far. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 2042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chen, B.; Zhang, Y.; Li, C.; Xu, P.; Gao, Y.; Xu, Y. CNTN-1 Promotes Docetaxel Resistance and Epithelial-to-Mesenchymal Transition via the PI3K/Akt Signaling Pathway in Prostate Cancer. *Arch. Med. Sci.* **2021**, *17*, 152–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Nath, D.; Li, X.; Mondragon, C.; Post, D.; Chen, M.; White, J.R.; Hryniewicz-Jankowska, A.; Caza, T.; Kuznetsov, V.A.; Hehnlly, H.; et al. Abi1 Loss Drives Prostate Tumorigenesis through Activation of EMT and Non-Canonical WNT Signaling. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chen, Q.; Gu, M.; Cai, Z.; Zhao, H.; Sun, S.; Liu, C.; Zhan, M.; Chen, Y.; Wang, Z. TGF- β 1 Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stemness of Prostate Cancer Cells by Inducing PCBP1 Degradation and Alternative Splicing of CD44. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 949–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Shen, Y.; Cao, J.; Liang, Z.; Lin, Q.; Wang, J.; Yang, X.; Zhang, R.; Zong, J.; Du, X.; Peng, Y.; et al. Estrogen Receptor α -NOTCH1 Axis Enhances Basal Stem-like Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotypes in Prostate Cancer. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 50. [[CrossRef](#)]
48. Nolan, K.D.; Franco, O.E.; Hance, M.W.; Hayward, S.W.; Isaacs, J.S. Tumor-Secreted Hsp90 Subverts Polycomb Function to Drive Prostate Tumor Growth and Invasion *. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 8271–8282. [[CrossRef](#)]
49. Yoo, Y.A.; Roh, M.; Naseem, A.F.; Lysy, B.; Desouki, M.M.; Unno, K.; Abdulkadir, S.A. Bmi1 Marks Distinct Castration-Resistant Luminal Progenitor Cells Competent for Prostate Regeneration and Tumor Initiation. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zhang, B.; Kwon, O.-J.; Henry, G.; Malewska, A.; Wei, X.; Zhang, L.; Brinkley, W.; Zhang, Y.; Castro, P.D.; Titus, M.; et al. Non-Cell-Autonomous Regulation of Prostate Epithelial Homeostasis by Androgen Receptor. *Mol. Cell* **2016**, *63*, 976–989. [[CrossRef](#)]
51. Su, W.; Han, H.H.; Wang, Y.; Zhang, B.; Zhou, B.; Cheng, Y.; Rumandla, A.; Gurrupu, S.; Chakraborty, G.; Su, J.; et al. The Polycomb Repressor Complex 1 Drives Double-Negative Prostate Cancer Metastasis by Coordinating Stemness and Immune Suppression. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 139–155.e10. [[CrossRef](#)]
52. Bezzi, M.; Seitzer, N.; Ishikawa, T.; Reschke, M.; Chen, M.; Wang, G.; Mitchell, C.; Ng, C.; Katon, J.; Lunardi, A.; et al. Diverse Genetic-Driven Immune Landscapes Dictate Tumor Progression through Distinct Mechanisms. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 165–175. [[CrossRef](#)]
53. Isaacs, J. Control of cell proliferation and cell death in the normal and neoplastic prostate: A stem cell model. In *Benign Prostatic Hyperplasia*; Rodgers, C.H., Coffey, D.S., Cunha, G., Grayhack, J.T., Hinman, F., Jr., Horton, R., Eds.; US Department of Health and Human Services: Bethesda, MD, USA, 1985; pp. 85–94.
54. Karthaus, W.R.; Hofree, M.; Choi, D.; Linton, E.L.; Turkecul, M.; Bejnood, A.; Carver, B.; Gopalan, A.; Abida, W.; Laudone, V.; et al. Regenerative Potential of Prostate Luminal Cells Revealed by Single-Cell Analysis. *Science* **2020**, *368*, 497–505. [[CrossRef](#)]
55. Stoyanova, T.; Cooper, A.R.; Drake, J.M.; Liu, X.; Armstrong, A.J.; Pienta, K.J.; Zhang, H.; Kohn, D.B.; Huang, J.; Witte, O.N.; et al. Prostate Cancer Originating in Basal Cells Progresses to Adenocarcinoma Propagated by Luminal-like Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20111–20116. [[CrossRef](#)]
56. Taylor, R.A.; Toivanen, R.; Frydenberg, M.; Pedersen, J.; Harewood, L.; Bioresource, A.P.C.; Collins, A.T.; Maitland, N.J.; Risbridger, G.P. Human Epithelial Basal Cells Are Cells of Origin of Prostate Cancer, Independent of CD133 Status. *Stem Cells* **2012**, *30*, 1087–1096. [[CrossRef](#)]
57. Xin, L.; Lawson, D.A.; Witte, O.N. The Sca-1 Cell Surface Marker Enriches for a Prostate-Regenerating Cell Subpopulation That Can Initiate Prostate Tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 6942–6947. [[CrossRef](#)]
58. Wang, X.; Xu, H.; Cheng, C.; Ji, Z.; Zhao, H.; Sheng, Y.; Li, X.; Wang, J.; Shu, Y.; He, Y.; et al. Identification of a Zeb1 Expressing Basal Stem Cell Subpopulation in the Prostate. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 706. [[CrossRef](#)]
59. Zhang, Y.; Xu, L.; Li, A.; Han, X. The Roles of ZEB1 in Tumorigenic Progression and Epigenetic Modifications. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *110*, 400–408. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, D.; Park, D.; Zhong, Y.; Lu, Y.; Rycaj, K.; Gong, S.; Chen, X.; Liu, X.; Chao, H.-P.; Whitney, P.; et al. Stem Cell and Neurogenic Gene-Expression Profiles Link Prostate Basal Cells to Aggressive Prostate Cancer. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10798. [[CrossRef](#)]
61. Alumkal, J.J.; Sun, D.; Lu, E.; Beer, T.M.; Thomas, G.V.; Latour, E.; Aggarwal, R.; Cetnar, J.; Ryan, C.J.; Tabatabaei, S.; et al. Transcriptional Profiling Identifies an Androgen Receptor Activity-Low, Stemness Program Associated with Enzalutamide Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 12315–12323. [[CrossRef](#)]
62. Banyard, J.; Bielenberg, D.R. The Role of EMT and MET in Cancer Dissemination. *Connect. Tissue Res.* **2015**, *56*, 403–413. [[CrossRef](#)]
63. Byers, L.A.; Diao, L.; Wang, J.; Saintigny, P.; Girard, L.; Peyton, M.; Shen, L.; Fan, Y.; Giri, U.; Tumula, P.K.; et al. An Epithelial–Mesenchymal Transition Gene Signature Predicts Resistance to EGFR and PI3K Inhibitors and Identifies Axl as a Therapeutic Target for Overcoming EGFR Inhibitor Resistance. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 279–290. [[CrossRef](#)]
64. Bocci, F.; Jolly, M.K.; George, J.T.; Levine, H.; Onuchic, J.N. A Mechanism-Based Computational Model to Capture the Interconnections among Epithelial-Mesenchymal Transition, Cancer Stem Cells and Notch-Jagged Signaling. *Oncotarget* **2018**, *9*, 29906–29920. [[CrossRef](#)]
65. George, J.T.; Jolly, M.K.; Xu, S.; Somarelli, J.A.; Levine, H. Survival Outcomes in Cancer Patients Predicted by a Partial EMT Gene Expression Scoring Metric. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 6415–6428. [[CrossRef](#)]
66. Chae, Y.K.; Chang, S.; Ko, T.; Anker, J.; Agte, S.; Iams, W.; Choi, W.M.; Lee, K.; Cruz, M. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Signature Is Inversely Associated with T-Cell Infiltration in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2918. [[CrossRef](#)]
67. Jung, A.R.; Jung, C.-H.; Noh, J.K.; Lee, Y.C.; Eun, Y.-G. Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Signature Is Associated with Prognosis and Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3652. [[CrossRef](#)]
68. Thorsson, V.; Gibbs, D.L.; Brown, S.D.; Wolf, D.; Bortone, D.S.; Ou Yang, T.-H.; Porta-Pardo, E.; Gao, G.F.; Plaisier, C.L.; Eddy, J.A.; et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* **2018**, *48*, 812–830. [[CrossRef](#)]
69. Chakraborty, P.; Chen, E.L.; McMullen, I.; Armstrong, A.J.; Kumar Jolly, M.; Somarelli, J.A. Analysis of Immune Subtypes across the Epithelial-Mesenchymal Plasticity Spectrum. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 3842–3851. [[CrossRef](#)]

70. Stark, T.W.; Hensley, P.J.; Spear, A.; Pu, H.; Strup, S.S.; Kyprianou, N. Predictive Value of Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT) Signature and PARP-1 in Prostate Cancer Radioresistance. *Prostate* **2017**, *77*, 1583–1591. [[CrossRef](#)]
71. Jiménez, N.; Reig, Ö.; Montalbo, R.; Milà-Guasch, M.; Nadal-Dieste, L.; Castellano, G.; Lozano, J.J.; Victoria, I.; Font, A.; Rodriguez-Vida, A.; et al. Cell Plasticity-Related Phenotypes and Taxanes Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 2358. [[CrossRef](#)]
72. Stylianou, N.; Lehman, M.L.; Wang, C.; Fard, A.T.; Rockstroh, A.; Fazli, L.; Jovanovic, L.; Ward, M.; Sadowski, M.C.; Kashyap, A.S.; et al. A Molecular Portrait of Epithelial–Mesenchymal Plasticity in Prostate Cancer Associated with Clinical Outcome. *Oncogene* **2019**, *38*, 913–934. [[CrossRef](#)]
73. Cmero, M.; Kurganovs, N.J.; Stuchbery, R.; McCoy, P.; Grima, C.; Ngyuen, A.; Chow, K.; Mangiola, S.; Macintyre, G.; Howard, N.; et al. Loss of SNAI2 in Prostate Cancer Correlates with Clinical Response to Androgen Deprivation Therapy. *JCO Precis. Oncol.* **2021**, *5*, 1048–1059. [[CrossRef](#)]
74. Shafran, J.S.; Jafari, N.; Casey, A.N.; Györfy, B.; Denis, G.V. BRD4 Regulates Key Transcription Factors That Drive Epithelial–Mesenchymal Transition in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2021**, *24*, 268–277. [[CrossRef](#)]
75. Sandsmark, E.; Hansen, A.F.; Selnes, K.M.; Bertilsson, H.; Bofin, A.M.; Wright, A.J.; Viset, T.; Richardsen, E.; Drabløs, F.; Bathen, T.F.; et al. A Novel Non-Canonical Wnt Signature for Prostate Cancer Aggressiveness. *Oncotarget* **2016**, *8*, 9572–9586. [[CrossRef](#)]
76. Flavahan, W.A.; Gaskell, E.; Bernstein, B.E. Epigenetic Plasticity and the Hallmarks of Cancer. *Science* **2017**, *357*, eaal2380. [[CrossRef](#)]
77. Ceder, Y.; Bjartell, A.; Culig, Z.; Rubin, M.A.; Tomlins, S.; Visakorpi, T. The Molecular Evolution of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol. Focus* **2016**, *2*, 506–513. [[CrossRef](#)]
78. Pomerantz, M.M.; Qiu, X.; Zhu, Y.; Takeda, D.Y.; Pan, W.; Baca, S.C.; Gusev, A.; Korthauer, K.D.; Severson, T.M.; Ha, G.; et al. Prostate Cancer Reactivates Developmental Epigenomic Programs during Metastatic Progression. *Nat. Genet.* **2020**, *52*, 790–799. [[CrossRef](#)]
79. Labbé, D.P.; Brown, M. Transcriptional Regulation in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2018**, *8*, a030437. [[CrossRef](#)]
80. Figiel, S.; Vasseur, C.; Bruyere, F.; Rozet, F.; Maheo, K.; Fromont, G. Clinical Significance of Epithelial-Mesenchymal Transition Markers in Prostate Cancer. *Hum. Pathol.* **2017**, *61*, 26–32. [[CrossRef](#)]
81. Skrypek, N.; Goossens, S.; De Smedt, E.; Vandamme, N.; Bex, G. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends Genet.* **2017**, *33*, 943–959. [[CrossRef](#)]
82. Pistore, C.; Giannoni, E.; Colangelo, T.; Rizzo, F.; Magnani, E.; Muccillo, L.; Giurato, G.; Mancini, M.; Rizzo, S.; Riccardi, M.; et al. DNA Methylation Variations Are Required for Epithelial-to-Mesenchymal Transition Induced by Cancer-Associated Fibroblasts in Prostate Cancer Cells. *Oncogene* **2017**, *36*, 5551–5566. [[CrossRef](#)]
83. He, M.X.; Cuoco, M.S.; Crowdis, J.; Bosma-Moody, A.; Zhang, Z.; Bi, K.; Kanodia, A.; Su, M.-J.; Ku, S.-Y.; Garcia, M.M.; et al. Transcriptional Mediators of Treatment Resistance in Lethal Prostate Cancer. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 426–433. [[CrossRef](#)]
84. O'Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 402. [[CrossRef](#)]
85. Yao, Q.; Chen, Y.; Zhou, X. The Roles of MicroRNAs in Epigenetic Regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *51*, 11–17. [[CrossRef](#)]
86. Babaei, G.; Raei, N.; Toofani Milani, A.; Gholizadeh-Ghaleh Aziz, S.; Pourjabbar, N.; Geravand, F. The Emerging Role of MiR-200 Family in Metastasis: Focus on EMT, CSCs, Angiogenesis, and Anoikis. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 6935–6947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Zaravinos, A. The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J. Oncol.* **2015**, *2015*, 865816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Abisoye-Ogunniyan, A.; Lin, H.; Ghebremedhin, A.; Salam, A.B.; Karanam, B.; Theodore, S.; Jones-Trich, J.; Davis, M.; Grizzle, W.; Wang, H.; et al. Transcriptional Repressor Kaiso Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition and Metastasis in Prostate Cancer through Direct Regulation of MiR-200c. *Cancer Lett.* **2018**, *431*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Bucay, N.; Bhagirath, D.; Sekhon, K.; Yang, T.; Fukuhara, S.; Majid, S.; Shahryari, V.; Tabatabai, Z.; Greene, K.L.; Hashimoto, Y.; et al. A Novel MicroRNA Regulator of Prostate Cancer Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 1263–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Mozdarani, H.; Ezzatizadeh, V.; Rahbar Parvaneh, R. The Emerging Role of the Long Non-Coding RNA HOTAIR in Breast Cancer Development and Treatment. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 152. [[CrossRef](#)]
91. Chang, Z.; Cui, J.; Song, Y. Long Noncoding RNA PVT1 Promotes EMT via Mediating MicroRNA-186 Targeting of Twist1 in Prostate Cancer. *Gene* **2018**, *654*, 36–42. [[CrossRef](#)]
92. Zhang, Y.; Li, Y. Long Non-Coding RNA NORAD Contributes to the Proliferation, Invasion and EMT Progression of Prostate Cancer via the MiR-30a-5p/RAB11A/WNT/ β -Catenin Pathway. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Dong, B.; Qiu, Z.; Wu, Y. Tackle Epithelial-Mesenchymal Transition with Epigenetic Drugs in Cancer. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. De Las Rivas, J.; Brozovic, A.; Izraely, S.; Casas-Pais, A.; Witz, I.P.; Figueroa, A. Cancer Drug Resistance Induced by EMT: Novel Therapeutic Strategies. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95*, 2279–2297. [[CrossRef](#)]
95. Malek, R.; Wang, H.; Taparra, K.; Tran, P.T. Therapeutic Targeting of Epithelial Plasticity Programs: Focus on the Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cells Tissues Organs* **2017**, *203*, 114–127. [[CrossRef](#)]
96. Mallik, R.; Chowdhury, T.A. Metformin in Cancer. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2018**, *143*, 409–419. [[CrossRef](#)]
97. Zaidi, S.; Gandhi, J.; Joshi, G.; Smith, N.L.; Khan, S.A. The Anticancer Potential of Metformin on Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2019**, *22*, 351–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

98. Chen, M.; Zhang, J.; Hu, F.; Liu, S.; Zhou, Z. Metformin Affects the Features of a Human Hepatocellular Cell Line (HepG2) by Regulating Macrophage Polarization in a Co-Culture Microenvironment. *Diabetes/Metab. Res. Rev.* **2015**, *31*, 781–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Rossini, M.; Martini, F.; Torreggiani, E.; Fortini, F.; Aquila, G.; Sega, F.V.D.; Patergnani, S.; Pinton, P.; Maniscalco, P.; Cavallesco, G.; et al. Metformin Induces Apoptosis and Inhibits Notch1 in Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Front Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 534499. [[CrossRef](#)]
100. Hamilton, D.H.; Huang, B.; Fernando, R.I.; Tsang, K.-Y.; Palena, C. WEE1 Inhibition Alleviates Resistance to Immune Attack of Tumor Cells Undergoing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 2510–2519. [[CrossRef](#)]
101. Cheng, Y.; He, C.; Wang, M.; Ma, X.; Mo, F.; Yang, S.; Han, J.; Wei, X. Targeting Epigenetic Regulators for Cancer Therapy: Mechanisms and Advances in Clinical Trials. *Signal Transduct. Target Ther.* **2019**, *4*, 62. [[CrossRef](#)]
102. Feng, S.; De Carvalho, D.D. Clinical Advances in Targeting Epigenetics for Cancer Therapy. *FEBS J.* **2021**, *29*, 375–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Dzobo, K.; Senthebane, D.A.; Ganz, C.; Thomford, N.E.; Wonkam, A.; Dandara, C. Advances in Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells within the Tumor Microenvironment: An Updated Review. *Cells* **2020**, *9*, 1896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Du, B.; Shim, J.S. Targeting Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* **2016**, *21*, 965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Beck, J.D.; Reidenbach, D.; Salomon, N.; Sahin, U.; Türeci, Ö.; Vormehr, M.; Kranz, L.M. mRNA Therapeutics in Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer* **2021**, *20*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]