

Tesis Doctoral

# Inflamación en la progresión del cancer de prostata. Hemo oxigenasa 1: regulación y significado funcional

Gueron, Geraldine

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gueron, Geraldine. (2009). Inflamación en la progresión del cancer de prostata. Hemo oxigenasa 1: regulación y significado funcional. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gueron, Geraldine. "Inflamación en la progresión del cancer de prostata. Hemo oxigenasa 1: regulación y significado funcional". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA

**INFLAMACION EN LA PROGRESION DEL CANCER DE  
PROSTATA. HEMO OXIGENASA 1: REGULACION Y  
SIGNIFICADO FUNCIONAL**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD  
DE BUENOS AIRES EN EL AREA DE QUIMICA BIOLOGICA

**GERALDINE GUERON**

DIRECTOR DE TESIS: **DRA. ELBA SUSANA VAZQUEZ**  
CONSEJERO DE ESTUDIOS: **DRA. ELBA SUSANA VAZQUEZ**

LABORATORIO DE CANCER Y APOPTOSIS, DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA,  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES, UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

BUENOS AIRES, 2009

---

**RESUMEN****INFLAMACION EN LA PROGRESION DEL CANCER DE PROSTATA. HEMO OXIGENASA 1: REGULACION Y SIGNIFICADO FUNCIONAL**

El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres. La inflamación es un factor de riesgo para esta enfermedad. La Hemo oxigenasa 1 (HO-1), es la isoforma inducible de la enzima limitante en la degradación del hemo y actúa contrarrestando el estrés oxidativo e inflamatorio. En este trabajo investigamos la expresión de HO-1 y sus consecuencias funcionales en líneas tumorales de próstata sensibles (MDA PCa 2b y LNCaP) e insensibles (PC3) a andrógenos. Comprobamos que los niveles basales de HO-1 son menores en PC3 respecto a MDA PCa 2b y LNCaP. El tratamiento con hemina aumentó la expresión de HO-1 tanto a nivel proteico como del mRNA en todas las líneas tumorales y disminuyó significativamente la proliferación e invasión en PC3 y MDA PCa 2b. Por fotografía 'time-lapse' comprobamos que el tratamiento de PC3 con hemina disminuyó marcadamente la motilidad celular. Se generó la línea estable PC3HO-1, en la cual la sobre-expresión de HO-1 redujo significativamente la proliferación y migración celular respecto a la línea transfectada con el vector vacío. El silenciamiento de HO-1 mediado por siRNA en la línea con altos niveles endógenos de esta proteína (MDA PCa 2b) incrementó significativamente la proliferación y la invasión respecto a las células tratadas con un siRNA control. Mediante array de genes involucrados en inflamación y angiogénesis, identificamos a MMP9 como un nuevo blanco, cuya actividad y expresión fue modulada por manipulación genética y farmacológica de HO-1 en las líneas de PCa. Más aún, células de la línea PC3HO-1 y su respectivo control fueron inyectadas *s.c.* en ratones atímicos *nu/nu* para el análisis *in vivo* de tumores creciendo como xenógrafos. El crecimiento tumoral y la expresión de MMP9 se redujeron significativamente en los tumores PC3HO-1 comparado con los xenógrafos controles. Estos resultados implican por primera vez a HO-1 en la proliferación, migración e invasión celular de cáncer de próstata sugiriendo su rol potencial como blanco terapéutico en ensayos clínicos.

Palabras claves: Hemo oxigenasa 1 (HO-1), cáncer de próstata, inflamación, metaloproteasa 9 (MMP9).

---

**ABSTRACT****PROSTATE CANCER PROGRESSION AND INFLAMMATORY RESPONSE.  
REGULATION AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF HEME-OXYGENASE 1.**

Prostate cancer is the second leading cause of cancer-associated death in men. Inflammation has been recognized as a risk factor for this disease. Heme Oxygenase 1 (HO-1), the inducible isoform of the rate-limiting enzyme in heme degradation, counteracts oxidative and inflammatory damage. Here we investigated the regulated expression of HO-1 and its functional consequences in PCa. We studied the impact of genetic and pharmacological disruption of HO-1 in the growth, invasion and migration in androgen sensitive (MDA PCa 2b and LNCaP) and insensitive (PC3) PCa cell lines. Our results show that HO-1 levels are markedly decreased in PC3 compared to MDA PCa 2b and LNCaP). Hemin treatment increased HO-1 at both protein and mRNA levels in all cell lines and decreased cell proliferation and invasion. Furthermore, overexpression of HO-1 in PC3 resulted in markedly reduced cell proliferation and migration. Accordingly, siRNA-mediated silencing of HO-1 expression in MDA PCa 2b cells resulted in increased proliferation and invasion. Using RT-qPCR-generated gene array, a set of inflammatory and angiogenic genes were up- or down-regulated in response to HO-1 overexpression identifying MMP9 as a novel downstream target of HO-1. MMP9 production and activity was down-regulated by HO-1 overexpression. Furthermore, PC3 cells stable transfected with HO-1 (PC3HO-1) and controls were injected into *nu/nu* mice for analysis of *in vivo* tumor xenograft phenotype. Tumor growth and MMP9 expression was significantly reduced in PC3HO-1 tumors compared to control xenografts. Taken together, these results implicate HO-1 in PCa cell migration and proliferation suggesting its potential role as a therapeutic target in clinical settings.

Keywords: Heme-oxygenase 1 (HO-1), prostate cancer, inflammation, metalloprotease 9 (MMP9)

---

**AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la FCEN-UBA por darme la oportunidad de poder desarrollar esta tesis de Doctorado y al CONICET por aceptarme como becaria doctoral.

Me gustaría agradecer a todos los ex-integrantes e integrantes actuales del Laboratorio de Apoptosis y Cáncer por acompañarme y participar en este proyecto: Paola De Luca, Mercedes Ferrando, Belén Elguero, Cristian Moiola, Cynthia Castronuovo, Paula Sacca, Federico Aranda, Florencia Zalazar, Javier Cotignola y la reciente Angeles Salles. Todos ellos han contribuido de diferentes formas en este trabajo. Gracias por su buena voluntad, predisposición y por la calidad humana.

Agradezco a Paola de Luca por ser una excelente compañera, extremadamente generosa con su tiempo y servicial. Por estar siempre disponible sin importar el día y la hora, por ser un ejemplo de becaria, trabajando los siete días de la semana y haciéndonos quedar mal a todo el resto que pensamos que trabajamos por demás. Por levantarse con la frente en alto después de cada caída, por acompañarme en mis fracasos con una frase alentadora y en mis éxitos como si fuesen propios. Por tener un alma pura y por ser mi amiga.

Agradezco a Javier Cotignola, por dejarme gritar a los cuatro vientos: JAVI!!!!!!!!!!!! cada vez que tuve un problema entre la MAC y la PC, un lío con el Endnote, unos primers que eran imposibles de diseñar y demás problemas técnicos. Gracias!!

Gracias a mi eterno amigo Marcelo Salierno, por ayudarme con los experimentos de migración y por hacerle frente a mis incesantes pedidos.

Agradezco a la Dra. Mónica Kotler. Gracias por tu generosidad y hospitalidad, gracias por haberme abierto las puertas de tu laboratorio cuando no teníamos ni una mesada para trabajar y haber confiado en mí. En fin, gracias por tu apoyo constante y tus aportes valiosísimos a lo largo de esta tesis.

Agradezco a la Dra. Adriana De Siervi por participar activamente de esta tesis, preocupándose como si fuese propia. Gracias por sus sugerencias, comentarios, ideas, opiniones, diseños experimentales y propuestas. Gracias por estar presente, un lujo.

Agradezco al Prof. Anthony Turner y al Prof. E.J.Wood por haberme abierto las puertas de sus laboratorios y haberme permitido tener una experiencia única en Inglaterra.

Agradezco a la Dra. Nora Navone por su constante participación en este trabajo, por facilitarme la línea celular MDA PCa 2b, y brindarme todo su apoyo y su conocimiento. Gracias Nora por tu generosidad, por tu paciencia, por confiar en mí, por ayudarme incontables veces, por abrirme tus puertas, por enseñarme a hacer ciencia, gracias por tu invaluable participación en esta tesis.

Agradezco al Dr. Omar Cosso por ser un ejemplo de docente y por sus consejos útiles y valiosos a lo largo de toda mi carrera.

Agradezco al Dr. Eduardo Cánepa por abrirme reiteradas veces las puertas de su laboratorio y también a sus miembros, Pablo, Nico, Juli, Marie y Abel por acompañarme en este proyecto.

Agradezco a las Dras. Adali Pecci y Edith Kordon y a los miembros de sus laboratorios por su generosidad permanente.

Agradezco a los Dres. Alejandro Curino , Ma. Marta Facchinetti y a Ariel Gandini por su ayuda con las técnicas de inmunofluorescencia.

Un afectuoso agradecimiento al Dr. Gabriel Rabinovich por su generosidad, su sabiduría, por haberme regalado su tiempo para leer el paper, por hacernos de apoyo incondicional cuando creíamos que nada era posible, por estar presente y por ayudarnos a salir adelante con la frente en alto. Un sincero agradecimiento lleno de admiración y respeto.

Agradezco al Dr. Roberto Meiss por su gran aporte e interés en este trabajo, por la minuciosa observación de los preparados patológicos, por su paciencia, su sabiduría y su vocación de docencia.

Un gran agradecimiento a la Dra. María Pía Vallaco por sus consejos, aportes y ayuda a lo largo de esta tesis.

Agradezco a las Dras. Mariana Bermudez y Susana Correa y a los miembros de su laboratorio por su apoyo constante.

Agradezco a la Dra. Norma D'Accorso y a la Dra. Miriam Martins Alho por iniciarme en el trabajo científico aún siendo estudiante y enseñarme a trabajar en un laboratorio.

Agradezco a mis amigas, Popi Zimberlin, Mery Binagui, Sol Degresse y Natalia Bercovich, por ser eternas confidentes de las vicisitudes de la mesada.

Agradezco a mis grandes amigas Florencia Malamud, Michelle Hines y Nuria Kehayoglu por acompañarme a lo largo de este proyecto.

Agradezco a la Familia Labanca, Leo, Flor, Estefi, Ricardo, Juan y ahora Preta, por permitir que les invada la casa incontables veces, sin importar horarios ni días, llamados a cualquier hora, por hacerme sentir parte de la familia en todo momento, y porque los siento como hermanos y parte de esta tesis.

Gracias a Rodrigo Herrera Vegas por ayudarme a sortear los problemas técnicos de ultimo momento.

Gracias a las Dras. Alicia Palant, Alicia Lapidus y Alicia Dobner por acompañarme este año y traer a la vida a Olympia.

Agradezco a la familia Lóizaga por su apoyo constante a lo largo de todos estos años.

Agradezco a mi hermana Lucila Gueron y a Daniel Nofal por su apoyo permanente, por permitirme irme a Leeds, UK; por ser mis eternos confidentes. Gracias Lulu por tu reiterada ayuda con el PhotoShop y gracias Dani por todo lo demás relacionado con la tecnología en general.. o sea todo!

Agradezco a mis padres por impulsarme a hacer una carrera científica, por su generosidad desmedida, por enseñarme que la voluntad y la perseverancia son la clave para el éxito. Por enseñarme a enfocarme en cualquier proyecto que uno emprenda. En fin, gracias por su amor incondicional.

Agradezco a mi marido Matías Lóizaga, por su apoyo incondicional. Por creer en la carrera académica. Por acompañarme hasta el fin del mundo con tal de que hiciera los experimentos que tanto quería. Gracias por tu amor sin límites ni fronteras.

Gracias Olympia por llegar a este mundo en este momento tan importante y por acompañarme en la etapa final de la escritura de la tesis.

Finalmente agradezco a la Dra. Elba Vázquez. Cualquier frase o palabra sería escasa para expresar el sentimiento de agradecimiento y admiración. Igualmente trataré de expresarlo: gracias por haberme aceptado como becaria, por enseñarme a pensar y a hacer ciencia (aún en las condiciones mas “extremas”), por haber confiado ciegamente en mí, por darle cabida a cualquiera de mis ideas aunque fueran disparatadas, por reírse de mi ignorancia, por permitir que creciera personal y profesionalmente, por dejarme ocupar roles mas allá de ser becaria, por permitirme viajar y abrirme puertas constantemente, por obligarme a estudiar cotidianamente, por impulsarme hacia la excelencia, por acompañarme en las derrotas y los triunfos, por no permitir que mis frustraciones me cegaran y no me dejaran seguir adelante. Finalmente, gracias por ser una increíble directora de tesis, consejera de estudios, un ejemplo de docente y una excelente persona. Por esto y por mucho más va todo mi eterno agradecimiento.

*Al Prof. Edward J. Wood,  
a Luis Nofal y a Olympia Lóizaga.*



---

**PUBLICACIONES Y PREMIOS**

Los contenidos de este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones y premios:

**Publicación:**

**Gueron G**, De Siervi A, Ferrando M, Salierno M, De Luca P, Elguero B, Meiss R, Navone N, Vazquez E. “*Critical role of endogenous heme oxygenase 1 (HO-1) as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells,*”. Mol Cancer Res (2009) 7 (11):1745-55.

**Premios:**

2009 Premio “AACR-Prostate Cancer Recognition Award” otorgado por el Prostate Cancer Foundation “presented to young cancer researchers who are the first authors and presenters of highly rated proffered papers focused on advanced/late stage prostate cancer research”. Reunion Annual AACR Annual meeting 2009, Denver, Colorado, USA (18-22 Abril).

2008 Premio “FARYNA” otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) al “mejor trabajo presentado por un doctorando en el área de oncología”, Mar del Plata, Argentina (19-23 Noviembre).

2007 Premio otorgado por el “Heme Oxygenase International Conference”, Cracovia, Polonia (3-10 Septiembre).

## ABREVIATURAS

a-Casp3	caspasa-3 activada
AMACR	alfa-metilacil coenzima A racemasa
AP-1	proteína activadora 1
APC	poliposis adenomatosa coli
AR	receptor de andrógenos
ARE	elemento de respuesta a ógeno
ARE	elemento de respuesta anti-oxidante
BCA	ácido bicinconínico
Bcl-2	proteína 2 de linfoma de células B
BPH	hiperplasia benigna de la próstata
BSA	suero albumino bovino
BVR	biliverdina reductasa
CCL4	proteína inflamatoria de macrófago 1 $\beta$
CDKs	quinasas dependientes de ciclinas
cDNA	DNA copia
CHEK2	quinasa 2 del punto de chequeo del ciclo celular
CMV	citomegalovirus
CO	monóxido de carbono
COX2	ciclo-oxigenasa 2
CRPC	cáncer de próstata resistente a la castración
CSF	factor estimulador de colonias
DAB	p-dimetilaminoazobenceno
DHT	dihidrotestosterona
DMSO	dimetil sulfóxido
DNase	deoxiribonucleasa
dNTP	deoxinucleótido trifosfato
ECL	quimioluminiscencia aumentada
ECM	matriz extracelular
EDTA	etilen-diaminetra-acido acético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERG	gen relacionado con ETS y ETV1
ER	receptor de estrógenos
EST	expressed sequence tag
FACS	fluorescence-activated cell sorter analysis
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
FITC	fluorescina isotiocianato
GM-SCF	factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos
GST	glutación-s-transferasa
HCA	aminas heterocíclicas
HCC	hepatocarcinogénesis
HDAC	deacetilasas de histonas
HHV8	virus humano herpes simple tipo 8
HIF-1	factor inducible por hipoxia 1
HO-1	hemo oxigenasa 1
HPIN	atrofia proliferativa con neoplasia intraepitelial prostática de alto grado
HPV	papilomavirus
HRPC	cáncer de próstata refractario a hormona
HSF	factores de shock térmico
HSV2	virus humano herpes simple tipo 2
IFN- $\gamma$	interferón gama
IGF	factor de crecimiento tipo insulina
IGFBPs	proteínas de unión a IGFs
IL	interleuquina
iNOS	óxido nítrico sintetasa inducible
IP	ioduro de propidio
kDA	kilodalton
KLF6	factor de transcripción tipo Krupper
KLK3	calicreina K3
LDS	lauril duodecil sulfato
LPS	lipopolisacárido
MAPK	proteína quinasa activada por mitogenos
Mcm-2	proteína 2 minicromosomal de mantenimiento

<b>MDR1</b>	genes de resistencia a múltiples drogas
<b>miRNAs</b>	microRNAs
<b>MMP</b>	metaloproteasas
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>MTS</b>	(3-[4,5-dimetiltiazol)-2-il)-5-(carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
<b>ncRNAs</b>	RNAs no-codificantes
<b>NE</b>	células neuroendócrinas
<b>NF-E2</b>	factor nuclear eritroide 2
<b>NF-κB</b>	factor nuclear kappa B
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>NOS</b>	óxido nítrico sintetasa
<b>NSAIDs</b>	drogas anti-inflamatorias no-esteroides
<b>PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino
<b>PCa</b>	cáncer de próstata
<b>PCR</b>	reacción en cadena polimérica
<b>PDGF</b>	factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PhIP</b>	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina
<b>PIA</b>	atrofia inflamatoria proliferativa
<b>PIN</b>	neoplasia prostática intra-epitelial,
<b>PKA</b>	proteína quinasa A
<b>PKC</b>	proteína quinasa C
<b>PSA</b>	antígeno prostático específico
<b>PTC</b>	carcinoma papilar de tiroides
<b>RNase</b>	ribonucleasa
<b>RNF6</b>	proteína E3 ubiquitina ligasa RING finger
<b>RNS</b>	especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	especies reactivas del oxígeno
<b>RT</b>	transcriptasa reversa
<b>SCF</b>	factor de transcripción de células madre
<b>SD</b>	desviación estándar
<b>SDF-1</b>	factor 1 derivado de estroma
<b>SDS</b>	duodecil sulfato de sodio
<b>shRNA</b>	short hairpin RNA
<b>SMC</b>	células musculares lisas
<b>SnPP</b>	diclururo de estaño (IV) protoporfirina IX
<b>SRE</b>	elemento de respuesta a estrés
<b>TAE</b>	tris acetato EDTA
<b>TAM</b>	macrófagos asociados al tumor
<b>TBS</b>	tris bufer salino
<b>TBS-T</b>	tris bufer salino Tween-20
<b>TCRs</b>	receptores de células T
<b>TGFβ</b>	factor de crecimiento transformante beta
<b>TLR</b>	receptor tipo "toll"
<b>TMPRSS2</b>	proteasa serina de transmembrana
<b>TNFα</b>	factor de necrosis tisular alfa
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
<b>Tris</b>	tris (hydroximetil) aminoetano
<b>TritonX-100</b>	octil fenoxi polietoxietanol
<b>Tween-20</b>	polioxietileno (20) sorbitan monolaurato
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>VCAM-1</b>	molécula de adhesión celular vascular 1
<b>VEGF</b>	factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VEGFR3</b>	receptor del factor de crecimiento endotelial vascular flt-4

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	<b>16</b>
<b>CAPITULO I</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>17</b>
<b>I.I CANCER DE PROSTATA</b>	<b>17</b>
<b>I.I.1 GENERALIDADES</b>	<b>17</b>
I.I.1.1 ORGANIZACION ESTRUCTURAL Y CELULAR DE LA PROSTATA	17
I.I.1.2 LOS ANDROGENOS Y LA PROSTATA	20
I.I.1.3 ENFERMEDADES PROLIFERATIVAS DE LA PROSTATA	21
I.I.1.4 ETIOLOGIA DEL CANCER DE PROSTATA	23
I.I.1.6 GRADUACIÓN DEL CARCINOMA DE PRÓSTATA	26
I.I.1.7 HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES LOCALES Y SISTEMICAS EN LA ENFERMEDAD PROSTATICA	28
I.I.1.8 INTERACCIONES ESTROMALES-EPITELIALES ALTERADAS EN LA INICIACION Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD	29
I.I.1.9 INTERACCIONES LUMINALES–EPITELIALES/ SISTEMA NEURO-ENDOCRINO LOCAL	31
I.I.1.10 INVASION: METALOPROTEASAS	31
I.I.1.11 ASPECTOS CLÍNICOS Y DIRECCIONES FUTURAS	33
<b>I.I.2 ALTERACIONES MOLECULARES EN CANCER DE PROSTATA</b>	<b>35</b>
I.I.2.1 PERFILES DE EXPRESION GENICA	36
I.I.2.2 MUTACIONES SOMATICAS	37
I.I.2.3 MODULACION EPIGENETICA	38
I.I.2.4 SPLICING ALTERNATIVO	40
I.I.2.5 OTROS MODULADORES POST-TRANSCRIPCIONALES	40
<b>I.II INFLAMACION</b>	<b>41</b>
<b>I.II.1 LA INFLAMACION: EL SEPTIMO “HALLMARK” DEL CANCER</b>	<b>41</b>
I.II.1.1 CONECTANDO A LOS ONCOGENES CON LA INFLAMACION	42
I.II.1.2 FACTORES DE TRANSCRIPCION Y CITOQUINAS	43
I.II.1.3 INFLAMACION Y MICROAMBIENTE TUMORAL	44
<b>I.II.2 INFLAMACION EN LA CARCINOGENESIS PROSTATICA</b>	<b>45</b>
I.II.2.1 ENIGMAS EN LA ETIOLOGIA DEL CANCER DE PROSTATA	46
I.II.2.2 EL ROL DE LA ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA	49
I.II.2.3 FUENTES DE INFLAMACION PROSTATICA	50

<b>Gueron</b>	<b>Indice</b>
I.II.2.4 RUPTURA DE LA TOLERANCIA INMUNOGENICA A LOS ANTIGENOS PROSTATICOS	54
I.II.2.5 IMMUNOBIOLOGIA DE LA INFLAMACION PROSTATICA	55
I.II.2.6 HIPOTESIS DE “INJURIA Y REGENERACION”	56
<b>I.III HEMO OXIGENESA 1 (HO-1)</b>	<b>57</b>
I.III.1 GENERALIDADES	57
I.III.2 LOCALIZACION CELULAR	59
I.III.3 REGULACION DE LA EXPRESION	62
I.III.4 ROL FISIOLÓGICO	66
I.III.5 HO-1 Y PROLIFERACION	68
I.III.6 HO-1 Y CICLO CELULAR	70
I.III.7 HO-1 Y APOPTOSIS	72
I.III.8 HO-1/CO “CONDICIONANDO” LA APOPTOSIS Y PROLIFERACION CELULAR	73
I.III.9 HO-1 Y ANGIOGENESIS	74
I.III.10 ROL DUAL DE HO-1 EN LA ANGIOGENESIS	75
I.III.11 HO-1: ROL EN OTROS PROCESOS FISIOLÓGICOS DIFERENTES A LA DEGRADACION DEL HEMO	76
I.III.12 HO-1 Y CANCER	76
I.III.13 HO-1 E INFLAMACION	79
I.III.14 SEÑALIZACION MEDIADA POR MENSAJEROS GASEOSOS	83
I.III.14.1 CO VIA ROS	83
I.III.14.2 CO - NO	84
<b><u>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	<b><u>86</u></b>
CAPITULO II	87
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	87
II.1 HIPOTESIS GENERAL	87
II.2 OBJETIVO GENERAL	87
II.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS	88
ESTUDIOS IN VITRO	88
ESTUDIOS IN VIVO	88
<b><u>MATERIALES Y METODOS</u></b>	<b><u>89</u></b>
CAPITULO III	90
MATERIALES Y METODOS	90

<b>III.I MATERIALES</b>	<b>90</b>
III.I.1 REACTIVOS Y DROGAS	90
III.I.2 REACTIVOS PARA CULTIVO	90
III.I.3 ANTICUERPOS	90
III.I.4 PROTEINAS RECOMBINANTES	91
III.I.5 OLIGONUCLEOTIDOS	91
III.I.6 LINEAS CELULARES	91
III.I.7 PLASMIDOS	92
<b>III.II METODOS</b>	<b>93</b>
<b>III.II.1 CULTIVO CELULAR</b>	<b>93</b>
III.II.1.1 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES	93
III.II.1.2 PRESERVACION CRIOGENICA	94
III.II.1.3 TRATAMIENTOS CON HEMINA Y SNPP	94
III.II.1.3.1 PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE HEMINA	94
III.II.1.3.1 PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE SNPP	94
III.II.2 PREPARACION DE VECTORES DE EXPRESION	95
III.II.2.1 PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES	95
III.II.2.2 TRANSFORMACION DE BACTERIAS COMPETENTES	95
III.II.2.3 AISLAMIENTO DEL DNA PLASMIDICO	95
III.II.2.4 TRANSFECCIONES DE CELULAS DE MAMIFEROS CON FOSFATO DE CALCIO	96
III.II.2.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA LUCIFERASA	96
III.II.2.6 TRANSFECCION CON SIRNA	97
III.II.3 ANALISIS MOLECULAR	98
III.II.3.1 AISLAMIENTO DEL RNA	98
III.II.3.2 CUANTIFICACION Y PUREZA DEL RNA	98
III.II.3.3 RT-PCR	98
III.II.3.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	99
III.II.3.5 PREPARACION DEL CDNA	99
III.II.3.6 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-QPCR)	99
III.II.4 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD, LA PROLIFERACION CELULAR Y LA APOPTOSIS	101
III.II.4.1 MEDICION DE LA VIABILIDAD CELULAR/ ENSAYO MTS	101
III.II.4.2 INCORPORACION DE 3H-TIMIDINA	101

<b>Gueron</b>	<b>Indice</b>
<b>III.II.4.3 ANALISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO</b>	<b>102</b>
<b>III.II.4.4 CITOMETRIA DE FLUJO PARA ANÁLISIS DE CELULAS APOPTOTICAS</b>	<b>102</b>
<b>III.II.5 ANALISIS DE PROTEINAS</b>	<b>103</b>
<b>III.II.5.1 PREPARACION DE LISADOS CELULARES</b>	<b>103</b>
<b>III.II.5.2 MEDICION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS</b>	<b>103</b>
<b>III.II.6 SDS-PAGE Y WESTERN BLOT</b>	<b>103</b>
<b>III.II.6.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS</b>	<b>103</b>
<b>III.II.6.2 ELECTROFORESIS</b>	<b>104</b>
<b>III.II.6.3 TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE NITROCELULOSA</b>	<b>104</b>
<b>III.II.6.4 INMUNODETECCION DE PROTEINAS</b>	<b>104</b>
<b>III.II.7 INMUNOFLUORESCENCIA</b>	<b>105</b>
<b>III.II.7.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS</b>	<b>105</b>
<b>III.II.7.2 MICROSCOPIA CONFOCAL</b>	<b>106</b>
<b>III.II.8 ZIMOGRAFIA</b>	<b>106</b>
<b>III.II.9 ENSAYOS CELULARES</b>	<b>107</b>
<b>III.II.9.1 INVASION CELULAR</b>	<b>107</b>
<b>III.II.9.2 MIGRACION CELULAR</b>	<b>109</b>
<b>III.II.10 RT-QPCR MICROARRAYS DE EXPRESION</b>	<b>109</b>
<b>III.II.10.1 RT-QPCR OLIGO GEARRAY® HUMAN ANGIOGENESIS MICROARRAY ANALYSIS</b>	<b>109</b>
<b>III.II.11 TUMORES DE CANCER DE PROSTATA HUMANO CRECIENDO COMO XENOGRAFOS EN RATONES NUDE.</b>	<b>110</b>
<b>III.II.12 PROCESAMIENTO DE LOS TUMORES PARA EXTRACCION DE RNA</b>	<b>111</b>
<b>III.II.13 HISTOLOGIA E INMUNOHISTOQUIMICA</b>	<b>111</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>113</b>
<b>CAPITULO IV</b>	<b>114</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>114</b>
<b>1RA PARTE</b>	<b>115</b>
<b>IV.I EFECTOS IN VITRO DE LA MODULACION FARMACOLOGICA DE LA EXPRESION DE HO-1 SOBRE DISTINTOS PROCESOS CELULARES</b>	<b>115</b>
<b>IV.I.1 HO-1 SE SOBRE-EXPRESA EN LAS LINEAS TUMORALES DE PROSTATA SENSIBLES A ANDROGENOS</b>	<b>115</b>
<b>IV.I.2 EL TRATAMIENTO CON HEMINA INDUCE LA EXPRESION DE HO-1 EN LAS LINEAS TUMORALES DE PROSTATA</b>	<b>116</b>
<b>IV.I.3 EFECTO CELULAR DE LA INDUCCION FARMACOLÓGICA DE HO-1 SOBRE LAS LINEAS TUMORALES DE PROSTATA.</b>	<b>121</b>
<b>IV.I.3.1 TRATAMIENTO CON HEMINA</b>	<b>122</b>
	<b>14</b>

<b>Gueron</b>	<b>Indice</b>
<b>I. PROLIFERACION CELULAR</b>	<b>122</b>
<b>II. CICLO CELULAR</b>	<b>123</b>
<b>III. INVASION CELULAR</b>	<b>126</b>
<b>IV. MIGRACION CELULAR</b>	<b>127</b>
<b>IV.I.3.2 TRATAMIENTO CON ESTAÑO PROTOPORFIRINA</b>	<b>132</b>
<b>2DA PARTE</b>	<b>137</b>
<b>IV.II EFECTOS IN VITRO DE LA MODULACION GENETICA DE LA EXPRESION DE HO-1 SOBRE DISTINTOS PROCESOS CELULARES</b>	<b>137</b>
<b>IV.II.1 MODULACION GENETICA DE LA EXPRESION DE HO-1</b>	<b>137</b>
<b>IV.II.2 EFECTO CELULAR DE LA SOBRE-EXPRESION Y SILENCIAMIENTO DE HO-1 SOBRE LAS LINEAS TUMORALES DE PROSTATA</b>	<b>138</b>
<b>IV.II.3 IDENTIFICACION DE GENES Y GRUPO DE GENES REGULADOS POR HO-1</b>	<b>141</b>
<b>IV.II.4 HO-1 DISMINUYE LA EXPRESION Y ACTIVIDAD DE MMP9 EN CELULAS DE PCA</b>	<b>145</b>
<b>3RA PARTE</b>	<b>148</b>
<b>IV.III EFECTOS IN VIVO DE LA MODULACION GENETICA DE LA EXPRESION DE HO-1</b>	<b>148</b>
<b>IV.III.1 INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE LOS TUMORES DE PCA QUE SOBRE-EXPRESAN HO-1 CRECIDOS COMO XENOGRAFOS</b>	<b>148</b>
<b>IV.III.2 PERFIL HISTOLOGICO DE LOS TUMORES DE PCA CRECIDOS COMO XENOGRAFOS</b>	<b>151</b>
<b><u>DISCUSION</u></b>	<b><u>162</u></b>
<b>CAPITULO V</b>	<b>163</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>163</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b><u>179</u></b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>180</b>



# INTRODUCCION

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

#### I.I CANCER DE PROSTATA

##### I.I.1 GENERALIDADES

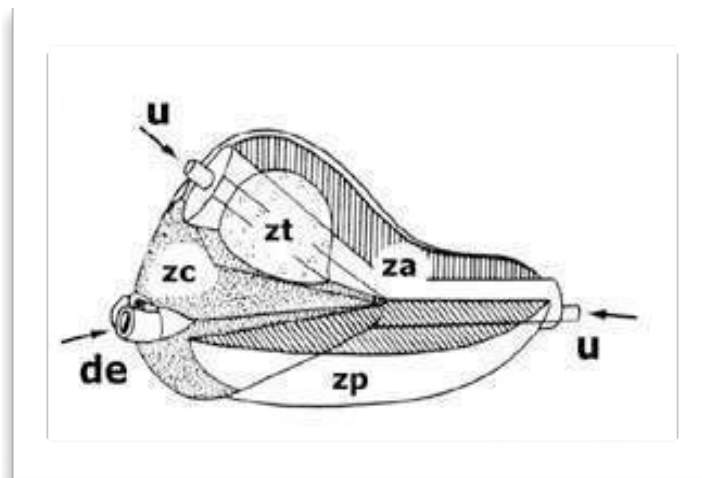
##### I.I.1.1 ORGANIZACION ESTRUCTURAL Y CELULAR DE LA PROSTATA

La próstata es una glándula sexual accesoria del tamaño de una nuez que rodea la uretra en la base de la vejiga y produce secreciones que comprenden una fracción mayor al 30% del plasma seminal. La próstata humana puede dividirse en 4 zonas anatómicas distintivas: la zona periférica, la zona de transición, la zona central y el estroma fibromuscular anterior. Distintos tipos celulares están comprendidos en la capa epitelial estratificada, que se cree que está en continua diferenciación (Long et al., 2005; Peehl, 2005; Tokar et al., 2005). Subyacente al epitelio, se encuentra el estroma prostático que consiste de células musculares lisas (SMC), fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales y componentes de la matriz extracelular (ECM). Las hormonas esteroides y los factores de crecimiento regulan el crecimiento de la próstata. Las células epiteliales secretorias diferenciadas expresan el receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos beta (ER $\beta$ ), que promueven la expresión de genes respondedores a hormonas esteroides sexuales. Los factores de crecimiento derivados del epitelio, como el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) actúan de manera parácrina sobre el estroma. Los fibroblastos estromales responden a las hormonas sexuales vía la expresión del AR y el ER $\alpha$ , que promueven la proliferación celular y estimulan la producción de factores derivados del estroma que actúan de manera autócrina y parácrina. Más aún, las células estromales pueden expresar enzimas como la aromatasa y la 5- $\alpha$ -reductasa que catalizan la síntesis local de hormonas esteroides bioactivas.

Una próstata sana tiene aproximadamente 3 cm de longitud. Consta de una porción glandular (2/3) y una fibromuscular (1/3).

Según su morfología y función se distinguen las siguientes zonas (Fig. 1):

- Zona anterior (za): se ubica delante de la uretra, es fibromuscular y no presenta elementos glandulares.
- Zona central (zc): Se ubica detrás de la uretra y es atravesada por los conductos eyaculadores. Es una zona glandular.
- Zona periférica (zp): es la subdivisión anatómica más grande de la próstata glandular.
- Zona transicional (zt): es un pequeño grupo de conductos que están relacionados con la uretra proximal.



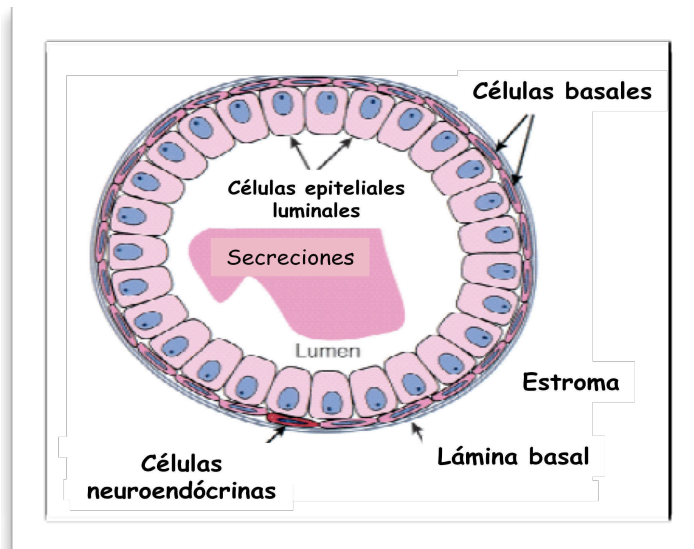
**FIGURA 1: Morfología de la próstata.**  
u: uretra; de: ducto eyaculador

La próstata secreta varias proteínas como: fosfatasa ácida, seminina, activador de plasminógeno y antígeno prostático específico (PSA). El PSA es una serino-proteasa (Wang et al., 1979) cuya función fisiológica es disolver el semen coagulado, que se forma por acción de las proteínas de las vesículas seminales, a los pocos minutos de la eyaculación. Un aumento de su tenor en la sangre acompaña frecuentemente a un crecimiento anormal de la glándula, por lo cual el PSA es el marcador más importante, hasta la fecha, para la detección del cáncer de próstata (PCa). Existe en el suero en una forma libre (PSA libre) o unido a inhibidores de proteasas.

Hay pocos temas tan debatidos en lo que concierne a la salud humana masculina como la efectividad del PSA como un marcador serológico del PCa. Esto se debe a que valores altos

de PSA pueden llevar a emprender tratamientos innecesarios afectando la calidad de vida del paciente, cuando el cáncer no representa una verdadera amenaza. Altos niveles de PSA pueden deberse a condiciones benignas, como la prostatitis y la hiperplasia benigna de la próstata (BPH). El dilema surge porque a medida que los hombres envejecen, tanto el PCa como estas otras condiciones se vuelven más comunes. Los investigadores necesitan entonces identificar parámetros que ayuden a discernir entre los pacientes, aquellos que verdaderamente requieren tratamiento. Por ende, hay una gran necesidad de encontrar marcadores moleculares acordes. La alfa-metilacil coenzima A racemasa (AMACR), una enzima recientemente descubierta, suele aumentar tanto a nivel de mRNA como de proteína en los adenocarcinomas prostáticos en comparación con los tejidos normales (Adley y Yang, 2006; Jiang et al., 2004). Otros marcadores como el Ki67, la proteína 2 minicromosomal de mantenimiento, la caspasa-3 activada y la proteína 2 de linfoma de células B (Bcl-2), fueron considerados porque mostraban expresión diferencial, a través de grados progresivos de la neoplasia intraepitelial prostática y podrían ser útiles en la caracterización de tejidos preneoplásicos (Ananthanarayanan et al., 2006).

En el epitelio prostático se pueden distinguir tres tipos celulares según sus características morfológicas, su función y su relevancia para la carcinogénesis (Fig. 2). El tipo celular epitelial luminal, andrógeno dependiente, produce proteínas secretorias como PSA y expresa el AR (Liu et al., 1997). El segundo tipo corresponde a las células basales, que forman una capa continua y no producen proteínas secretorias prostáticas (Bui y Reiter, 1998; Liu et al., 1997) pero expresan factores que protegen del daño al DNA, tales como la proteína de defensa antioxidante glutatión-S-transferasa (GST) y el gen anti apoptótico Bcl-2 (Bui y Reiter, 1998; De Marzo et al., 1998).



**FIGURA 2.** Esquema de los tipos celulares dentro del ducto prostático humano (adaptado de Abate-Shen & Shen, 2000).

El tercer tipo celular es el neuroendócrino (NE), es independiente de andrógenos y su acumulación en la capa basal es una característica del PCa agresivo (Abrahamsson et al., 1998). A pesar de que el PCa frecuentemente expresa marcadores de células basales, la pérdida de la capa basal es un sello paradójico de la existencia de focos neoplásicos (Bostwick, 1996).

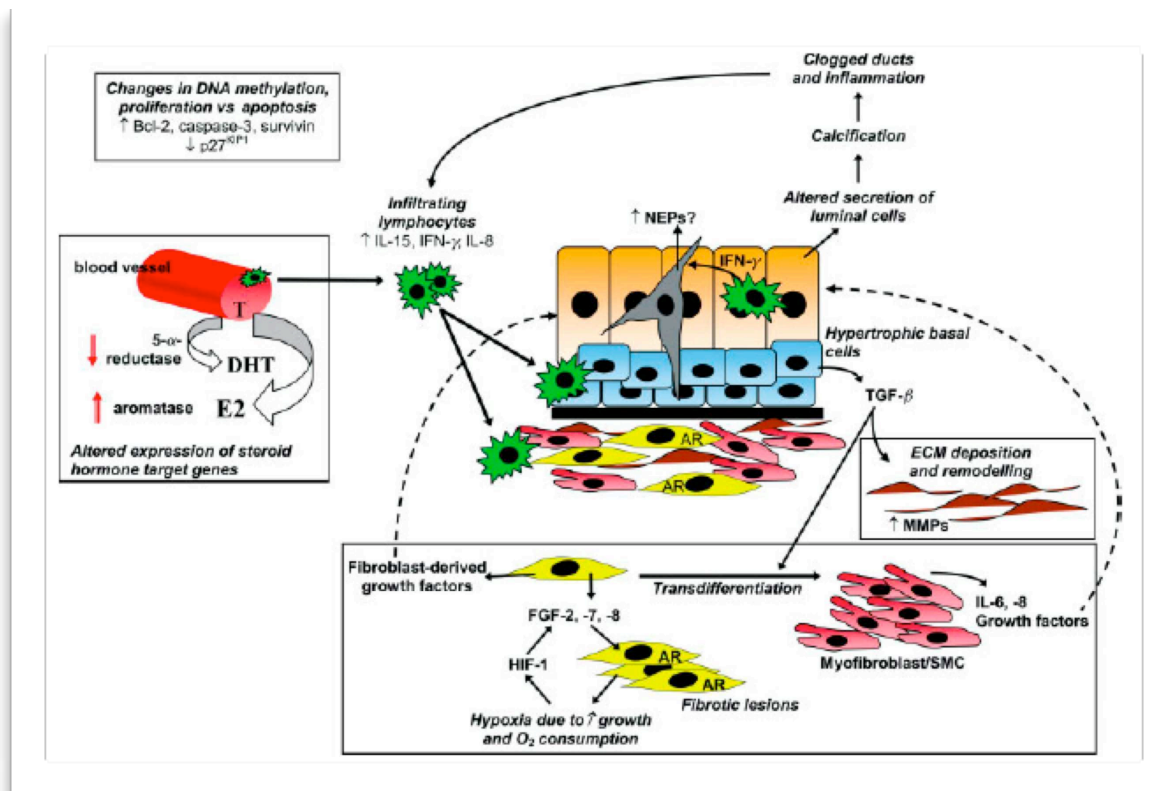
### **I.I.1.2 LOS ANDROGENOS Y LA PROSTATA**

Los andrógenos regulan el crecimiento de la próstata y la producción de la secreción prostática. Ellos ejercen sus efectos vía el AR, el cual es un activador transcripcional dependiente del ligando. La testosterona, producida por las células de Leydig del testículo bajo la estimulación de la hormona luteinizante, es secretada a la circulación donde es transportada unida a una globulina ligadora de esteroides hasta la próstata. La fracción libre de la testosterona, en equilibrio con la fracción unida, difunde a través de las membranas y entra a la célula prostática. Allí la testosterona es metabolizada a una sustancia más activa llamada 5- $\alpha$  dihidrotestosterona (DHT), que es el principal andrógeno que media el crecimiento de la próstata, producida por la acción de la enzima 5  $\alpha$ -reductasa. Esta reacción requiere NADPH. La inactivación de la DHT involucra la reducción reversible a 5- $\alpha$ -

androstano-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol mediada por la 3 $\beta$  hidroxisteroide oxidoreductasa, y seguida por 6 $\alpha$ -, 7 $\alpha$ - o 7 $\beta$ -hidroxilación. La hidroxilación del 5- $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol representa el último paso de inactivación de la DHT y está catalizada por la enzima citocromo P450. La DHT se une al AR, induciendo un cambio conformacional y la disociación de varias proteínas accesorias, entre ellas las proteínas de shock térmico. La unión de dicho complejo a secuencias de respuesta a andrógenos induce factores transcripcionales y la expresión de genes, tales como el PSA. La DHT también induce la síntesis de factores de crecimiento y de sus receptores, estableciéndose una activa comunicación entre las células epiteliales y las del tejido conectivo (estroma) que las rodea.

### **I.I.1.3 ENFERMEDADES PROLIFERATIVAS DE LA PROSTATA**

La hiperplasia benigna de la próstata es una enfermedad clásica presente en el 20% de los hombres a la edad de 40 años y en el 70% a la edad de 60 años (Hermann et al., 2000; Isaacs, 1994). Entre las diversas especies animales con glándulas prostáticas, solo el hombre, el chimpancé y el perro desarrollan BPH (De Marzo et al., 1999a; Steiner et al., 1999). BPH ocurre en la zona de transición de la próstata y se caracteriza por cambios histológicos progresivos que surgen inicialmente en el compartimento estromal, con agrandamiento y alteración de la composición celular de la glándula (Untergasser et al., 2005a). La proliferación focal de las células musculares lisas lleva a un arreglo característico nodular causado por la brotación y la ramificación del tejido glandular; este proceso es acompañado luego por una hiperplasia basal celular del epitelio (Bonkohoff y Remberger, 1998). BPH es una enfermedad multifactorial que involucra factores ambientales, endócrinos y genéticos. Aparentemente ninguna mutación genética específica pareciera estar asociada con BPH. Sin embargo, la expresión de un número significativo de genes se detectó alterada, en particular aquellos que codifican para factores de crecimiento epiteliales/estromales (Fig. 3) (Prakash et al., 2002) .



(Sampson et al., 2007)

FIGURA 3. Remodelación del tejido en la hiperplasia benigna de próstata.

La reducción global en la metilación de la cromatina puede llevar a una expresión génica alterada. En particular la sobre-expresión de genes que regulan la proliferación celular y la represión de genes que codifican para mediadores de la apoptosis. Los cambios en las hormonas sexuales sistémicas relacionados con la edad, junto con una actividad alterada de las enzimas metabolizadoras de hormonas llevan a un aumento de la relación estrógeno intraprostático/andrógenos, que puede subsiguientemente alterar la expresión de genes respondedores a hormonas. Adicionalmente se puede observar, el aumento de la expresión del AR. La remodelación del compartimento estromal ocurre con la proliferación de los fibroblastos, que secretan factores de crecimiento que actúan en el compartimento epitelial, induciendo proliferación celular. El aumento del consumo de oxígeno por parte del tejido en crecimiento puede resultar en hipoxia local con activación del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) y genes que se activan en respuesta a la hipoxia, incluyendo los factores de crecimiento fibroblástico, FGF-2 y FGF-7. Las células basales hipertróficas secretan activamente TGFβ, que induce al transdiferenciación de los fibroblastos estromales a SMC y miofibroblastos, que a su vez producen factores de crecimiento mitogénicos. El aumento de TGFβ puede también inducir el remodelamiento de la ECM, en particular por una de las metaloproteasas de matriz (MMP). Las alteraciones en las secreciones de las células luminales pueden producir calcificación, ductos tapados e inflamación. Los linfocitos infiltrantes producen citoquinas inflamatorias, que promueven más aún la proliferación y la diferenciación celular.

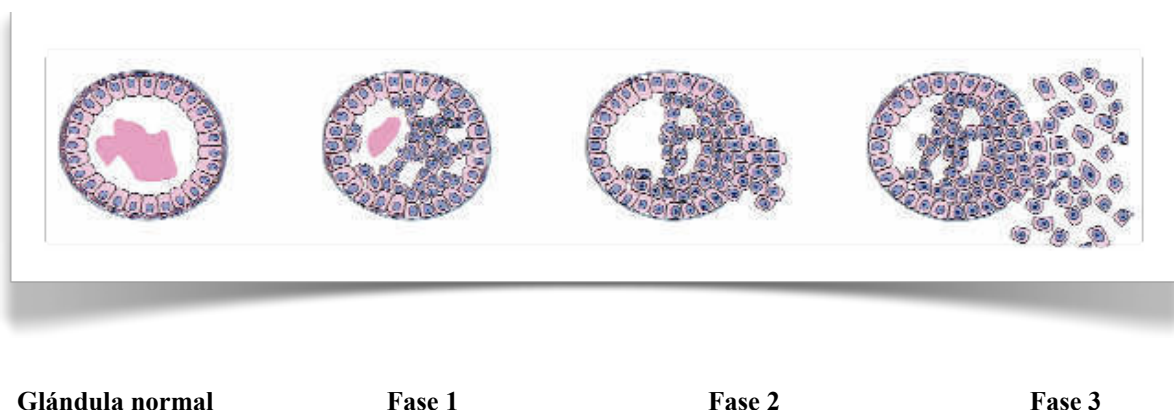
El PCa es la malignidad no cutánea más común en los hombres occidentales (Howe et al., 2001; Parkin et al., 2001) y está muy ligada a la edad. Las lesiones displásicas pre-malignas (entre ellas, la neoplasia prostática intra-epitelial, PIN) se caracterizan por presentar núcleos agrandados, atenuación de la capa epitelial basal, proliferación de células secretoras y diferenciación aberrante. El PIN se considera el estadio pre-invasivo más probable del

adenocarcinoma de próstata (Bostwick y Qian, 2004; Nelson et al., 2003) .

#### I.I.1.4 ETIOLOGIA DEL CANCER DE PROSTATA

El PCa se presenta principalmente en la zona periférica de la glándula y tiene distintas fases de progresión (Fig. 4, TABLA I):

- (1) Enfermedad localizada, en la cual el PCa está confinado dentro de la cápsula de la próstata y no se ha dispersado hacia otras partes del cuerpo. El PCa primario es dependiente de andrógenos para crecer y sobrevivir. Entre las fases 1 y 2 surge la enfermedad recurrente donde, después de la terapia localizada, hay signos, típicamente un aumento de PSA, indicando que el cáncer ha reincidentado. Este evento no suele ser detectado por los ensayos utilizados corrientemente en la clínica.
- (2) Enfermedad metastásica, en la cual el PCa está creciendo fuera de la próstata y en las áreas que la rodean.
- (3) Enfermedad refractaria a hormonas, en la cual el PCa continúa creciendo a pesar del tratamiento con drogas que producen la ablación hormonal (andrógenos/testosterona necesarias para el crecimiento de las células del PCa) en el suero y frecuentemente en combinación con antagonistas competitivos del AR. La cirugía radical del PCa localizado en estadio avanzado es raramente curativa. La radiación tampoco es efectiva y es solo paliativa y la quimioterapia no representa un pronóstico de sobrevida muy prolongada en la mayoría de los protocolos de uso habitual. En este estadio la sobrevida es de entre 12 y 18 meses.



**FIGURA 4. Fases de la progresión del cáncer de próstata**



No todos los hombres con PCa progresarán a través de estas fases. De hecho, el cáncer de próstata puede permanecer confinado dentro de la glándula indefinidamente y nunca crecer suficientemente rápido para convertirse en un problema en el tiempo de vida de un hombre.

La privación de andrógenos ha sido clave en el tratamiento del PCa. Sin embargo, en más del 80% de los casos que mostraron evidencias bioquímicas de respuesta favorable a la ablación hormonal (disminución del PSA y regresión del tumor) el efecto del tratamiento continuo duró entre 2-3 años. Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que la expresión del AR está presente en el 80% de las lesiones metastásicas, sugiriendo que continúa siendo funcional, aún en ausencia de andrógenos. El AR surge entonces como un proto-oncogen. Hay varios modelos para explicar la resistencia a hormonas. El tumor puede tomar varias rutas para sobrevivir a un ambiente deficiente en andrógenos: no reconociendo al AR, perdiendo su expresión o sensibilizando este camino metabólico. Para continuar activando esta ruta las células pueden: 1) mutar el AR o volverlo promiscuamente activo por diferentes esteroides, 2) amplificar la expresión del AR, 3) activar el AR de manera independiente del ligando o 4) amplificar co-activadores del AR. El análisis de la expresión de genes por micro-arrays de DNA demostró que la sobre-expresión del receptor es suficiente para disparar el proceso de resistencia (Chen et al., 2004). Sin embargo, en células que sobre expresan este receptor habría cambios en la cantidad y composición de co-activadores y co-represores de los promotores de genes que responden al mismo. Por lo tanto, una modesta alteración en el nivel de la proteína AR podría provocar un desbalance de los cofactores que regulan la transcripción de genes blanco (Chen et al., 2004). El conocimiento de los mecanismos que están activos en los distintos estadios de progresión del PCa y como ellos interactúan con otros marcadores moleculares, es claramente importante.

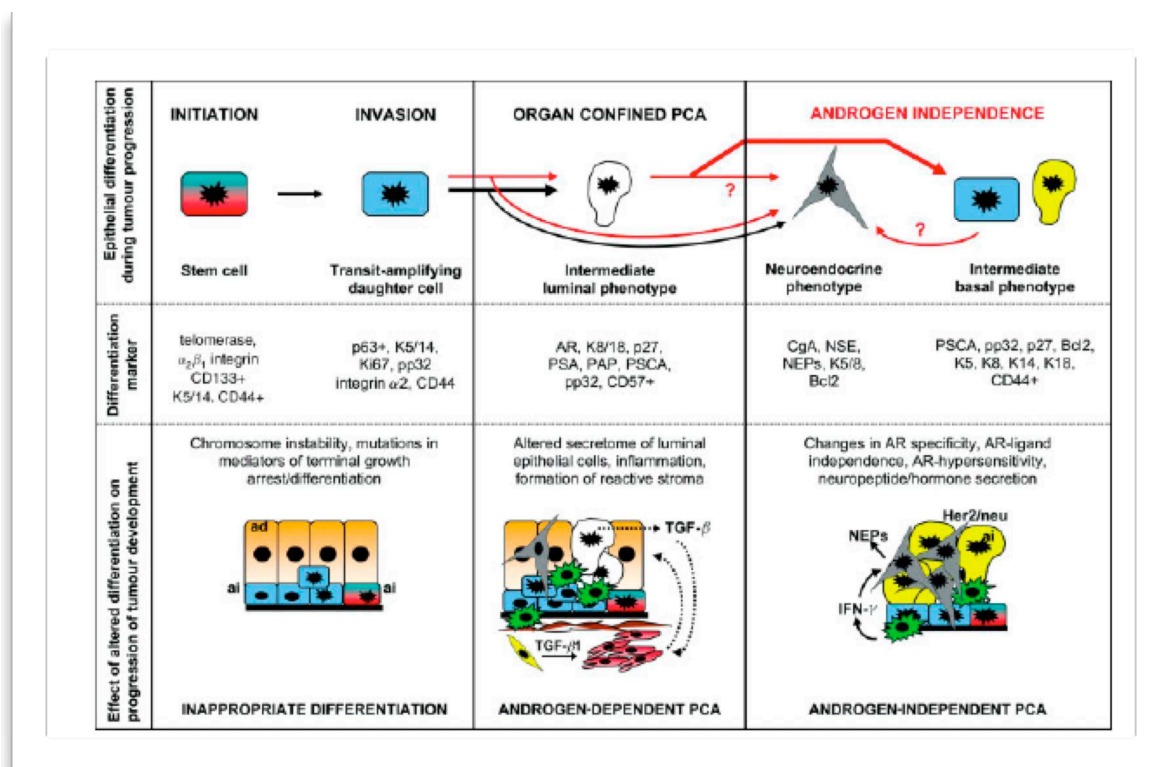
El tratamiento de la enfermedad por utilización de estrategias de ablación de andrógenos es exitoso inicialmente, sin embargo, los tumores altamente agresivos y andrógeno independientes pueden recurrir, en cuyo caso el tratamiento pasa a ser paliativo. Actualmente se acepta la existencia de células madre prostáticas localizadas en el epitelio basal (Schalken y van Leenders, 2003; van Leenders et al., 2003; van Leenders y Schalken, 2001). Trabajos recientes aportaron evidencias sobre los cambios genéticos y/o epigenéticos

que se acumulan en las células hematopoyéticas prostáticas en envejecimiento y en sus factores asociados, promoviendo el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular aberrantes desencadenando así la tumorigénesis (Fig. 5) (Hill, 2006; Rizzo et al., 2005; Wicha et al., 2006).

**TABLA I. Distribución y frecuencia del cáncer en diferentes zonas anatómicas de la próstata**

Zona	Porcentaje total del tejido glandular (%)	Frecuencia de PCa (%)
Transición	5-10	20
Central	25	1-5
Periférica	70	70

Adaptado de (Sampson et al., 2007)



(Sampson et al., 2007)

**FIGURA 5. Representación esquemática de los procesos de diferenciación en el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata.**

Las células madre independientes de andrógenos (AI) que se encuentran en la capa basal del epitelio acumulan mutaciones en los mediadores del arresto del crecimiento celular y la diferenciación durante el envejecimiento (rojo/verde) llevando a la proliferación y diferenciación inadecuadas de las células hijas progenitoras (transit-amplifying daughter cells) (azul) hacia células del lumen intermedias (blancas; con borde negro). Las células hijas progenitoras pueden también diferenciarse a células NE

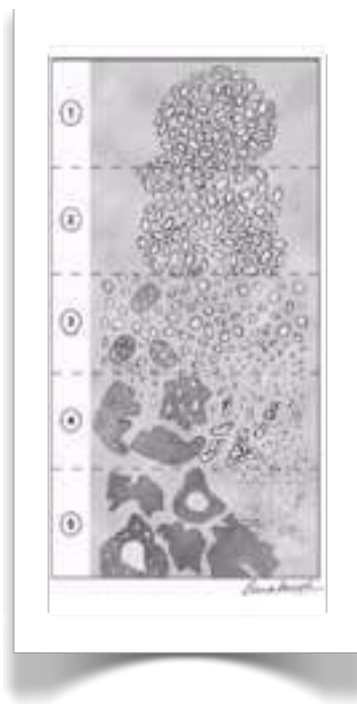
(grises). Los cambios en las proteínas epiteliales secretadas (ejemplo: células tumorales secretan activamente TGF $\beta$ ) que actúan sobre el estroma circundante inducen la formación del estroma reactivo. Este estroma está asociado con la transdiferenciación de fibroblastos (amarillo) en SMC y miofibroblastos (rosa), que a su vez secretan factores de crecimiento que estimulan más aún la proliferación epitelial y estromal (línea punteada). La remodelación de la ECM por un aumento en la producción de MMP y componentes estructurales también es evidente. Los linfocitos infiltrantes (estrellas verdes) estimulan la producción de citoquinas inflamatorias como (IL-6 e IL-8), que promueven la proliferación, la angiogénesis y la metástasis. La ablación de andrógenos y el adquirencia de la independencia de andrógenos resulta en la apoptosis de las células epiteliales secretoras dependientes de andrógenos, dejando a las células madre y basales AI intactas. La pérdida de las células diferenciadas (AD) que secretan TGF $\beta$ , libera a las células madre/basales de los efectos inhibitorios del TGF $\beta$ , promoviendo la alteración de la proliferación y diferenciación (flechas rojas), llevando a la generación de un tumor andrógeno independiente (Craft et al., 1999; Tokar et al., 2005) comprometiendo predominantemente a las células de un fenotipo basal intermedio y también a las NE, que secretan neuropéptidos (NEPs) que pueden contribuir a su vez a la progresión de la enfermedad. La diferenciación aumentada de los clusters de células NE puede estar mediado por IFN- $\gamma$  secretado por los linfocitos. Los marcadores de diferenciación que clasifican cada uno de los diversos tipos de células epiteliales están indicados. La lista de posibles marcadores se muestra en letra *itálica* (Collins et al., 2005).

Apoyando este modelo se ha reportado la identificación de una población de células madre de PCa que forma tumores *in vivo* (Collins et al., 2005). El evento genético asociado al tumor más frecuentemente identificado hasta la fecha, es la fusión de la región 5' no codificante del gen de una proteasa serina de transmembrana (TMPRSS2) (regulado por andrógeno) con los miembros ERG (gen relacionado con ETS) y ETV1, miembros de la familia de factores de transcripción oncogénicos ETS y comúnmente sobre-expresados en PCa (Tomlins et al., 2005). A pesar de haberse identificado varios genes asociados a PCa, se piensa que múltiples alteraciones genéticas actuando en conjunto son las que llevan al desarrollo del tumor (Hughes et al., 2005; Ribero et al., 2006; Schulz y Hatina, 2006; Zhang et al., 2006). Aunque el PCa y la BPH son patologías distintas, los perfiles de expresión génica de los distintos estadios de PCa (Dhanasekaran et al., 2001; Lapointe et al., 2004; Nelson et al., 2002) y BPH (Prakash et al., 2002) revelan algunas similitudes, sugiriendo algún nivel de solapamiento (Shah y Getzenberg, 2004).

### **I.I.1.6 GRADUACIÓN DEL CARCINOMA DE PRÓSTATA**

Gleason creó en 1966 un sistema de graduación para los carcinomas de próstata (Bailar et al., 1966; Gleason, 1966), basado en el patrón arquitectural del tumor llamado "Grado de Gleason". Este sistema clasifica microscópicamente a las células desde bien diferenciadas (grado 1) hasta muy indiferenciadas (grado 5) (Fig. 6).

Mediante observación microscópica del tejido se determinan los dos patrones estructurales (primario y secundario) de mayor área, sumando un mínimo de 2 puntos y un máximo de 10 puntos. Los grados 1 y 2 son normales. El grado 3 (células moderadamente diferenciadas) es el más común y considerado aún normal. El grado 4 corresponde a cáncer y es el más importante y a veces difícil de diferenciar del grado 3. El grado 5 es indiferenciado y las células parecen propagarse muy desordenadamente. Para su evaluación clara, se debe reportar como la suma de los dos patrones mayoritarios, por ejemplo 7 (3+4). Así, un Gleason 10 será, en términos simples, el más grave de todos, y un Gleason 2 totalmente normal.



**FIGURA 6. Diagrama esquemático de la graduación de Gleason.**

Según la modificación del 2005 de la International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma, el sistema de Gleason se modificó de manera que se definieron los siguientes patrones o grados (Epstein et al., 2005).

Grado 1: nódulos circunscriptos por acinos empacados, uniformes, redondeados u ovoides, de medida regular (glándulas más grandes que el grado 3).

Grado 2: es semejante al patrón 1, con nódulos más circunscriptos, sin embargo en el borde del nódulo puede haber mínima infiltración. Las glándulas están más dispersas y no como un patrón de Gleason 1 con morfología uniforme.

Grado 3: se observan unidades glandulares discretas, con glándulas más pequeñas que las del Gleason 1 y 2. Hay infiltrados en y entre los acinos no neoplásicos de la próstata. Con marcada variación en la medida y la forma. Presenta patrón nodular cribiforme.

Grado 4: masas de acinos irregulares y epitelio fusionado, con células claras. Presenta glándulas cribiformes grandes y con borde irregular.

Grado 5: esencialmente no hay diferenciación glandular, compuesta de capas sólidas, cordones, o células simples. Carcinoma anaplásico con necrosis central rodeado por masas de papilas, cribiformes o sólidas.

#### **II.1.1.7 HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES LOCALES Y SISTEMICAS EN LA ENFERMEDAD PROSTATICA**

El control del crecimiento y el funcionamiento de la próstata es mantenido por un balance muy fino entre concentraciones celulares de hormonas sexuales esteroideas y factores de crecimiento autócrinos/parácrinos. Los niveles intraprostáticos de hormonas esteroideas se modifican con la edad, modificándose la proporción de estrógenos/andrógenos incrementándose vía aumento de la aromatización de andrógenos y disminución de la conversión de testosterona a DHT (Bonnet et al., 1993; Hiramatsu et al., 1997; Zhang et al., 1997).

No hay evidencias concluyentes que avalen la correlación entre niveles elevados de estrógenos o niveles bajos de andrógenos y un aumento de la incidencia de BPH o PCa. Cambios en las enzimas que metabolizan los estrógenos también han sido implicados en próstatas hiperplásicas y malignas (Ellen et al., 2004; Fung et al., 2006; Soronen et al., 2004; Tang y Norlin, 2006) pudiendo contribuir a la progresión del PCa (Harkonen et al., 2003; Harkonen y Makela, 2004; Stanbrough et al., 2006) .

Las hormonas sexuales esteroideas actúan vía receptores nucleares que reconocen motivos de unión al DNA en los promotores de genes blanco y a través de vías de señalización genómicas y no genómicas alternativas, poco comprendidas todavía (Freeman et al., 2005;

Hatzoglou et al., 2005; Taylor et al., 2006). Los receptores de estrógeno ER  $\alpha$  y  $\beta$  se encuentran predominantemente en el estroma y en el epitelio, respectivamente (Harkonen and Makela, 2004). Se reportó que el ER $\alpha$  se puede expresar aberrantemente en el epitelio prostático en algunos PCa (Ellem et al., 2004). El ER $\beta$  se activa inicialmente en los primeros estadios del PCa, para ser fuertemente reprimido en estadios más avanzados (Leav et al., 2001; Tsurusaki et al., 2003).

El AR se detecta tanto en células epiteliales como estromales en la próstata adulta. Se encuentra generalmente aumentado tanto en el PCa independiente de andrógenos como luego de la ablación de andrógenos *in vitro* y con constante expresión de los genes respondedores a andrógenos (Stanbrough et al., 2006). Además de los cambios observados en la expresión y función de los receptores de hormonas sexuales esteroides, también se han reportado alteraciones en la señalización intracelular hormonal mediadas por cambios en los co-reguladores (Culig et al., 2004; Li et al., 2005b; Stanbrough et al., 2006) y/o por la modulación de la expresión de genes blanco de dichos receptores (Hendriksen et al., 2006).

#### **II.1.8 INTERACCIONES ESTROMALES-EPITELIALES ALTERADAS EN LA INICIACION Y LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD**

La homeostasis de las células madre prostáticas es mantenida por un balance controlado por andrógenos, TGF $\beta$  y factores mitogénicos como el EGF, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de transcripción de células madre (SCF) (Salm et al., 2005). La cascada de señalización por TGF $\beta$  podría estar inhibida por el AR, posiblemente mediante interacciones directas (Carey et al., 2004; Kang et al., 2002; van der Poel, 2005). La disminución de los niveles de andrógenos, asociados con la edad, produciría un aumento de TGF $\beta$ . La expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 se encuentra habitualmente aumentada en BPH y PCa (Bruckheimer and Kyprianou, 2002) y puede proveer un mecanismo por el cual las células contrarrestan los efectos apoptóticos de TGF $\beta$  en la enfermedad prostática. Por lo tanto un desbalance en la tasa de proliferación y apoptosis puede significar un aumento de la supervivencia y acumulación celular, que quizás contribuye al agrandamiento de la glándula en BPH (Royuela et al., 2002; Shariat et al., 2005).

Se propone que la disrupción del equilibrio de andrógenos y estrógenos estimula cambios en los factores derivados del estroma que actúan en el epitelio prostático, llevando a la reactivación del crecimiento, la hiperplasia y la transformación maligna. Este llamado “estroma reactivo” exhibe numerosos cambios, incluyendo deposición de la ECM y transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, que son altamente abundantes en BPH y PCa y pueden ser inducidos por estrógenos y TGF $\beta$  derivado del epitelio (Tuxhorn et al., 2002; Untergasser et al., 2005a; Zhang et al., 1997). Más aún, el incremento subsiguiente de la proliferación de fibroblastos sirve para regenerar el “pool” fibroblástico, que sin embargo, también sufre transdiferenciación, generando un círculo vicioso cuya consecuencia se manifiesta como la expansión estromal y el agrandamiento de la próstata asociada a BPH. Significativamente, la transdiferenciación continua e irreversible a miofibroblastos se vuelve histológicamente conservada y se piensa que es uno de los mecanismos claves del agrandamiento de la próstata en esta enfermedad (Rumpold et al., 2002b). La pérdida de la supresión del crecimiento dependiente de la edad recientemente se asoció al aumento de la expresión del factor 1 derivado de estroma (SDF-1) (Orimo et al., 2005).

Varios estudios involucran al gen pro-apoptótico p53 en el desarrollo del “estroma reactivo”. La activación inicial de p53 en los fibroblastos estromales por células tumorales, puede subsiguientemente seleccionar una subpoblación de fibroblastos resistente a la apoptosis que carecen de p53, que luego inducen la progresión tumoral en poblaciones de células epiteliales adyacentes (Hill et al., 2005b; Kiaris et al., 2005).

El eje estroma/IGF, que actúa de forma parácrina sobre las células del epitelio prostático, es modulado por andrógenos (Le et al., 2006; Pandini et al., 2005; Wu et al., 2006), por IGFs proliferativos producidos localmente y por las proteínas de unión a IGFs (IGFBP) anti-proliferativas, ejerciendo funciones claves en numerosos aspectos del desarrollo prostático normal y neoplásico (Gennigens et al., 2006). Experimentos de co-cultivo demostraron que IGF-1 media interacciones celulares del estroma con el tumor en PCa a fin de acelerar el crecimiento tumoral (Kawada et al., 2006).

La senescencia celular es un proceso asociado al envejecimiento, con células senescentes acumulándose en los tejidos (Castro et al., 2003; Dimri et al., 1995). Los fibroblastos senescentes secretan factores que estimulan en forma directa o indirecta la proliferación, la

diferenciación y la invasividad de las células epiteliales pre-malignas (Bavik et al., 2006; Krtolica et al., 2001; Parrinello et al., 2005). Sin embargo, todavía permanece debatible si la senescencia juega un rol en la próstata *in vivo*.

#### **I.I.1.9 INTERACCIONES LUMINALES–EPITELIALES/ SISTEMA NEURO-ENDOCRINO LOCAL**

Las células NE se diferencian a partir de las células epiteliales progenitoras prostáticas (Rumpold et al., 2002a). Secretan numerosos péptidos, neuropéptidos y hormonas. No se encuentran como células aisladas, sino que aparecen formando redes de células que se comunican a través de extensiones tipo neuritas, que pueden alcanzar el lumen de los acinos prostáticos (Berger et al., 2007). El aumento de la diferenciación a NE está asociado con el PCa y puede contribuir a la progresión de la enfermedad vía la secreción de neuropéptidos (Jongsma et al., 2000; Uchida et al., 2006). En contraste, se encuentran pocas células NE en los nódulos grandes de BPH a pesar de que están presentes en nódulos pequeños en desarrollo, que pueden representar focos en crecimiento (Xue et al., 2000). La diferenciación a células NE puede ser inducida en cultivo bajo una variedad de condiciones, incluyendo privación de suero y depleción de andrógenos, sugiriendo que varias vías de señalización están involucradas. El interferón gama (IFN- $\gamma$ ) induce la transdiferenciación de las células epiteliales basales primarias de próstata a células NE, posibilitando a las células infiltrantes inflamatorias como los linfocitos T a contribuir con la diferenciación a NE (Untergasser et al., 2005b). Estudios recientes relacionan a la protocadherina-PC específica del hombre y al EGF en la diferenciación a NE (Humez et al., 2006; Yang et al., 2005). El fenotipo NE aumenta durante la terapia de ablación de andrógenos (Mosca et al., 2005).

#### **I.I.1.10 INVASION: METALOPROTEASAS**

Las metástasis son la causa más importante de mortalidad por cáncer y ocurren por la degradación de la membrana basal y esparcimiento de las células a órganos distantes para formar tumores secundarios. La degradación proteolítica de la ECM mediada por las proteasas secretadas por las células tumorales incluye activadores de plasminógeno, serina proteasas y metaloproteasas (MMP). Dicha degradación es importante para desencadenar la cascada metastásica, incluyendo la promoción de la angiogénesis y la invasión tumoral (He



et al., 2007; Pulukuri y Rao, 2007). Los miembros de la familia de MMP comparten un dominio catalítico que contiene zinc en una unión coordinada. Su función catalítica es la degradación de los componentes proteicos en la ECM, en el microambiente inmediato a la célula tumoral, como también la activación de factores de crecimiento latentes, de receptores de la superficie celular y de moléculas de adhesión (Chakraborti et al., 2003). Las interacciones células-ECM disparan señales celulares que promueven la diferenciación, la migración y la movilización celular, procesos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis. La degradación regulada y balanceada de las proteínas de la ECM por MMP está involucrada en muchos procesos fisiológicos incluyendo la cicatrización, la remodelación tisular, la angiogénesis y el desarrollo embrionario (Sternlicht y Werb, 2001). Contrariamente, el exceso de la actividad de MMP juega un rol crítico en varios procesos patológicos incluyendo la artritis reumatoidea, la osteoartritis, las enfermedades autoinmunes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Por lo tanto, una mejor comprensión de la regulación de la actividad de MMP, bajo condiciones fisiológicas y patológicas podría llevar a una intervención terapéutica novel en estas enfermedades.

Las MMP se sintetizan como pro-zimógenos. Pueden ser secretadas o pueden permanecer unidas a membrana y luego procesadas y activadas, permitiendo así la degradación localizada de sus sustratos. La regulación de las actividades de las MMP puede alcanzarse en múltiples niveles. Las proteínas de la superficie celular juegan un rol clave en la activación de estas proteasas (Brooks et al., 1996; Yu y Stamenkovic, 2000), mientras que los inhibidores fisiológicos de las MMP (TIMP) limitan su actividad (Olson et al., 1997). Sin embargo, una expresión elevada aberrante de MMP predomina en varias patologías relacionadas a la remodelación de la ECM. La expresión aumentada de las MMP, particularmente MMP2 (gelatinasa A; colagenasa tipo IV 72-kDa) y MMP9 (gelatinasa B; colagenasa tipo IV 92-kDa), se ha correlacionado claramente con la malignidad de los tumores y una supervivencia menor en pacientes, especialmente en cáncer de mama (Hanemaaijer et al., 2000; Pellikainen et al., 2004). Comúnmente, MMP2 se expresa constitutivamente en los tejidos, mientras que MMP9 es estimulada por factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias y ésteres de forbol (Moon et al., 2004; Shin et al., 2007; Stuelten et al., 2005). La inducción de MMP9 por anfirregulina y herregulina contribuye a la invasividad del cáncer de mama (Kondapaka et al., 1997; Yao et al., 2001).

En células de PCa y colon, se detectaron incrementos en la secreción de MMP9 por CXCR4 y CXCL12 concomitantes con aumentos en la migración y en la invasión celular (Brand et al., 2005; Chinni et al., 2006). Por lo tanto, los agentes con la habilidad de bloquear la activación de MMP9 podrían ser blancos terapéuticos útiles para tratar los cánceres humanos.

MMP9 cumple un rol en la inducción de múltiples pasos a través de la progresión tumoral (Hjertner et al., 2005; Van den Steen et al., 2002). La regulación de los niveles proteicos de MMP9 se debe a una activación transcripcional del gen, a través de los sitios de unión para los factores de transcripción: la proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), localizados en la región promotora de 2,2 Kb (Yan y Boyd, 2007). Pequeñas moléculas que inhiben la actividad enzimática de MMP9 presentan eficacia preclínica en el bloqueo parcial del crecimiento y de la progresión de varios cánceres en modelos experimentales, impactando tanto en eventos tempranos como tardíos de la enfermedad (Hjertner et al., 2005; Nair et al., 2008; Van den Steen et al., 2002). Estudios recientes han implicado a MMP9 en las primeras fases de la colonización pulmonar (Acuff et al., 2006), sugiriendo que las drogas que interfieren con la expresión de MMP9 podrían beneficiar a pacientes con alto riesgo de diseminación tumoral. Más aún estas drogas podrían ser alternativas al uso de los inhibidores enzimáticos de MMP9, los cuales exhiben severos efectos secundarios en ensayos clínicos debido a que afectan a otras MMP (Coussens et al., 2002). Hay una gran evidencia que sugiere que la destrucción ósea derivada del tumor en cánceres osteolíticos depende de MMP9 (Brown et al., 2005; Dong et al., 2005). Nair y colaboradores identificaron una pequeña molécula que inhibe la expresión de MMP9 sin afectar la expresión de otras dos MMP relacionadas (Nair et al., 2008). Esta molécula bloquea varios eventos biológicos en el cáncer dependientes de MMP9 como la invasión, la migración y la actividad osteoclástica y por lo tanto representa una nueva clase de antagonistas de MMP9 que podría ser beneficiosa para el tratamiento de esta enfermedad.

#### **1.1.1.11 ASPECTOS CLÍNICOS Y DIRECCIONES FUTURAS**

Los anti-andrógenos, como la bicalutamida, son utilizados para el tratamiento del PCa avanzado, pero eventualmente los tumores se vuelven andrógeno independientes (conocido

como cáncer de próstata resistente a la castración, CRPC). Tres trabajos recientes han identificado caminos nuevos direccionados hacia el AR para superar la resistencia. Una causa de la falta de efecto de los anti-andrógenos se debe al aumento de la expresión del receptor. Se investigó si los compuestos que mantienen el antagonismo al AR, en presencia de una alta expresión de AR, pueden ser válidos como anti-andrógenos de segunda generación. Se identificaron dos compuestos nuevos, RD162 y MDV3100, con mayor afinidad por el AR que la bicalutamida (Tran et al., 2009). En células de cáncer de próstata humano, ambos agentes redujeron la translocación nuclear del receptor y su asociación al DNA. Además indujeron la regresión tumoral en modelos murinos de xenotransplantes (Tran et al., 2009). Por otro lado, se identificó a la proteína E3 ubiquitina ligasa RING finger (RNF6) que se une al AR e induce poliubiquitinación del mismo sin promover su degradación (Xu et al., 2009). La ubiquitinación parecería afectar la activación transcripcional del AR influenciando el reclutamiento de cofactores de transcripción. Utilizando arrays de tejido prostático humano, además se demostró que la expresión de RNF6 es mayor en CRPCs comparado con muestras de BHP y de tumores de pacientes "naive". Otros miembros de la maquinaria de ubiquitinación podrían ser válidos como blancos terapéuticos en esta enfermedad (Xu et al., 2009). Los anti-andrógenos actualmente disponibles en la clínica, como la bicalutamida, son antagonistas que compiten por la unión del ligando; en cambio los inhibidores no-competitivos del AR podrían representar una mejor opción terapéutica. Se identificaron dos antagonistas, el pamoato de pirvinio y el producto natural hidrocloreuro de harmol. Estos agentes sinergizan con la bicalutamida, para inhibir la transcripción de la calicreína K3 (KLK3) que codifica para PSA, indicando que diferentes mecanismos de acción están involucrados. La bicalutamida y el hidrocloreuro de harmol, bloquearon la unión del AR al DNA (Jones et al., 2009) mientras que el pamoato de pirvinio inhibió la actividad transcripcional de AR, bloqueando el reclutamiento de la RNA polimerasa II. Esta droga además, en combinación con la bicalutamida, indujo niveles de atrofia similares a la castración (Jones et al., 2009). A pesar de que los datos son preliminares, sugieren estrategias promisorias para combatir el CRPC.

En las últimas décadas se han realizado grandes progresos en el tratamiento de BPH usando una terapia combinada con agentes bloqueantes  $\alpha$ -adrenérgicos e inhibidores de la 5- $\alpha$ -reductasa (Tarter y Vaughan, 2006). Sin embargo, debido a los efectos secundarios del tratamiento y la aparición de resistencia a estas terapias, la intervención quirúrgica permanece como el único tratamiento efectivo pero invasivo y costoso. Nuevos compuestos están atravesando los correspondientes ensayos clínicos para PCa y BPH (Armstrong y Carducci, 2006; Bullock y Andriole, 2006). Un extensivo diálogo entre numerosos caminos de señalización y los cambios moleculares dinámicos durante la progresión de la enfermedad, sugieren que el “targeting” secuencial o combinado de diversas vías puede ser beneficioso. Hay una necesidad urgente de desarrollar nuevos marcadores moleculares para utilizar como herramientas de diagnóstico temprano, marcadores pronósticos y/o blancos terapéuticos específicos para BPH y PCa. Los biomarcadores, como los “autoantibody signatures” pueden mejorar la detección temprana del PCa y mostrar una especificidad y sensibilidad mayores que el PSA (Bradford et al., 2006), que permanece el método de diagnóstico y pronóstico más común y limitado para esta enfermedad (Small y Roach, 2002). Adicionalmente, se necesitan marcadores que puedan distinguir entre tumores de próstata indolentes y aquellos con un alto potencial de recurrencia. Comparaciones de perfiles génicos a gran escala son los medios más útiles para identificar componentes moleculares involucrados en la progresión del PCa (Nanni et al., 2006; True et al., 2006).

### **1.1.2 ALTERACIONES MOLECULARES EN CANCER DE PROSTATA**

Los tumores de próstata exhiben un rango de fenotipos clínicos, desde indolentes hasta agresivamente metastásicos. Numerosos estudios de perfiles de expresión génica se han llevado a cabo para evaluar el potencial molecular de estas patologías, sin embargo la identificación de marcadores genéticos que predicen la enfermedad no se pudieron demostrar en la clínica.

Un sondeo de la literatura actual muestra que las alteraciones moleculares en los carcinomas de próstata pueden ocurrir a través de una variedad de mecanismos, desde cambios epigenéticos y polimorfismos genéticos hasta modulaciones del splicing alternativo y de otros procesos post-transcripcionales, algunos de los cuales podrían involucrar a los RNA

no-codificantes.

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones sobre los orígenes genéticos del PCa, en parte gracias a la ayuda brindada por la tecnología de secuenciación y a la disponibilidad de "microarrays". Con el objetivo de caracterizar las etapas de iniciación y progresión del PCa, estudios de expresión génica se llevaron a cabo y muchos de ellos lograron mostrar cierta correlación con la clínica. Sin embargo, las asociaciones moleculares con los fenotipos de PCa continúan siendo fragmentarias, y en algunos casos están pobremente respaldadas por el seguimiento (Gelman y Semmes, 2004). Estudios recientes comparando tejidos tumorales *versus* benignos, complementados por procedimientos de micro-dissección, revelaron diferencias en los patrones de expresión génica a través de focos aislados de tumores individuales del mismo espécimen (Cooper et al., 2007). Guiados por estas observaciones, los investigadores están actualmente dirigiendo su atención hacia el entendimiento de las características moleculares que acompañan a los diferentes estadios de la enfermedad.

### **I.I.2.1 PERFILES DE EXPRESION GENICA**

Estudios de perfiles genéticos utilizando tejidos y líneas tumorales de PCa (Luo et al., 2001; Ross et al., 2000; Scherf et al., 2000; Xu et al., 2000) identificaron genes claves que están ampliamente asociados con los distintos fenotipos cancerígenos, por ejemplo genes involucrados en el ciclo celular, en la replicación del DNA y en su reparación (LaTulippe et al., 2002). Singh y colaboradores fueron los primeros en mostrar una correlación entre las "firmas de expresión génica" y los resultados clínicos luego de la prostatectomía (Singh et al., 2002). Crearon un algoritmo de 5-genes que medía la recurrencia del cáncer con un 90% de precisión, sin embargo el tamaño de la muestra fue relativamente pequeño (52 especímenes tumorales con 21 pacientes evaluables respecto a los resultados clínicos). A pesar de los resultados promisorios citados, los estudios de perfiles de expresión génica publicados en el área de PCa muestran resultados variables entre laboratorios, en parte debido a la heterogeneidad de los tejidos y diferencias en la performance analítica de las plataformas de microarray utilizadas (Gelman y Semmes, 2004). Por tal motivo, los investigadores recurrieron a otros ensayos para validar los genes candidatos, incluyendo

PCR en tiempo real (cuantitativa) e inmunohistoquímica. Utilizando estas técnicas Bubendorf y colaboradores demostraron por ejemplo, que IGFBP2 exhibía alta expresión en el 100% de tumores clínicos refractarios a hormonas y en el 36% de tumores primarios; sin detectar expresión alguna en las BHP (Bubendorf et al., 1999). Similares patrones de expresión se observaron con la proteína de shock térmico (HSP27). La verificación de la activación de genes candidatos por inmunohistoquímica se ha extendido a una variedad de proteínas para identificar biomarcadores de los distintos fenotipos de PCa. Estos incluyen STK11, STK15, PTTG1, MYBL2, PIM1, IGFBP- 5, DAN1, FAT, RAG5A, y HEVIN (LaTulippe et al., 2002; Nelson, 2004). También se hicieron intentos de asociar dichos marcadores con características patológicas de PCa con la ayuda de los microarrays de tejido para la validación histológica. Por ejemplo, se encontró que MUC1 estaba asociada con características agresivas y un alto grado de recurrencia luego de la prostatectomía, mientras que ASGP1 se asociaba con una disminución de riesgo de recurrencia de la enfermedad (Lapointe et al., 2004). A pesar de que estos resultados son prometedores, no se identificaron todavía marcadores histológicos o moleculares que puedan predecir con certeza la agresividad de los distintos fenotipos de PCa con utilidad en la clínica. Una gran crítica a los experimentos detallados anteriormente es su incapacidad para discriminar la heterogeneidad tumoral dentro y entre especímenes tisulares.

### **I.I.2.2 MUTACIONES SOMATICAS**

La heterogeneidad de la expresión génica en PCa no es sorprendente considerando los numerosos tipos de anormalidades cromosómicas que se han descrito, incluyendo inserciones, deleciones, amplificaciones y translocaciones (Dong et al., 1997; Isaacs, 1995; Nupponen y Visakorpi, 2000; Visakorpi, 2003). La inestabilidad genómica es una característica típica de la carcinogénesis prostática. Casi todos los tumores son genéticamente inestables y hoy en día se acepta ampliamente que el cáncer resulta de la acumulación de polimorfismos genéticos que controlan directamente la proliferación y/o la muerte celular (Lengauer et al., 1998).

Los análisis por hibridización genómica comparativa (CGH) han demostrado que las alteraciones cromosómicas más comunes en PCa incluyen pérdidas en 1p, 6q, 8p, 10q, 13q,

16q y 18q, y ganancias en 1q, 2p, 7, 8q, 18q y Xq (Nupponen y Visakorpi, 2000). El análisis por hibridización *in situ* por fluorescencia (FISH) ha proporcionado una resolución más fina de genes blanco, como por ejemplo amplificaciones de AR, identificadas en la enfermedad refractaria a hormonas. Deleciones cromosómicas comunes también han llevado a la identificación de genes supresores tumorales que podrían ser biomarcadores potenciales o blancos terapéuticos para PCa. Estos incluyen NKX3.1 (8p21), PTEN (10q23), P27/ Kip1 (12p13) y KLF5 (13q21) (Dong, 2001). Tomlins y colaboradores utilizaron un enfoque bioinformático para descubrir aberraciones cromosómicas oncogénicas en PCa (Tomlins et al., 2005). Este abordaje denominado “Cancer Outlier Profiler Analysis”, busca genes que estén sobre-expresados en un subgrupo de cánceres. Los autores hipotetizaron que estos patrones de expresión podrían ser causados por fusiones de genes resultando en translocaciones cromosómicas (cromosomas separados) o deleciones (mismo cromosoma). Descubrieron que las regiones codificantes de la proteína ERG1 y ETV1, dos miembros de la familia de factores de transcripción oncogénicos ETS, estaban fusionados a la región promotora del gen TMPRSS2 que responde a andrógenos. Más aún, demostraron en una línea tumoral de próstata que contenía el gen fusionado TMPRSS2:ERG que la expresión de ERG era activada por andrógenos, sugiriendo un mecanismo potencial para la transformación del PCa. Aplicando el análisis por FISH a los microarrays de tejido derivados de las prostatectomías, demostraron que el gen de fusión de TMPRSS2:ERG está presente en alrededor del 50% de los PCa primarios y en un 41% de las metástasis a nódulo linfático (Perner *et al*, 2006). Siguiendo este abordaje, Tomlins y colaboradores reportaron genes de fusión ETS recurrentes adicionales, incluyendo TMPRSS2:ETV4 (Tomlins et al., 2006), y 50-fusiones de otros genes con ETV1 (Tomlins et al., 2007).

### **I.I.2.3 MODULACION EPIGENETICA**

Las modulaciones epigenéticas permiten la transmisión de rasgos celulares sin modificaciones en la secuencia génica. Son sensibles a una variedad de factores ambientales asociados con la progresión del PCa, tales como el estrés oxidativo y la dieta (Thompson et al., 2001). El principal estudio de las alteraciones epigenéticas en cáncer incluye modificaciones de las histonas y metilación del DNA (Jones y Baylin, 2007). Su potencial aplicación para el diagnóstico, el tratamiento y la progresión de la enfermedad ha sido

ampliamente estudiado (Dobosy et al., 2007; Li et al., 2005).

Las modificaciones de las histonas regulan la expresión génica alterando la accesibilidad de los factores de transcripción. Estas alteraciones incluyen la acetilación y la metilación de los residuos lisina y arginina de las histonas. La acetilación de las histonas facilita la activación transcripcional, mientras que la metilación puede tener efectos activadores o represores dependiendo de la localización dentro de la cola de histonas. Las deacetilasas de histonas (HDAC) se encuentran frecuentemente activadas en el PCa (Patra et al., 2001), con sus mayores niveles hallados en pacientes con la enfermedad refractaria a hormonas (Halkidou et al., 2004). La hipoacetilación de histonas también está altamente asociada con la metilación del DNA. Actualmente se están realizando investigaciones pre-clínicas para utilizar los inhibidores de las HDAC para el tratamiento de una amplia variedad de tumores (Yoo y Jones, 2006). Las metiltransferasas de histonas también están activadas en PCa, como por ejemplo la EZH2 (Varambally et al., 2002). Las regiones genómicas que están proximales a los sitios de iniciación de la transcripción, están habitualmente enriquecidas en islas CpG. El silenciamiento de genes a través de la hipermetilación se ha propuesto como un evento temprano en la génesis y la propagación de caminos de transducción de señales oncogénicas (Baylin y Ohm, 2006). Los patrones de metilación del DNA pueden ser detectados por una variedad de metodologías, como por PCR luego del tratamiento con bisulfito que convierte las citosinas no metiladas en uracilos. Los perfiles de hipermetilación del DNA en el PCa primario y metastásico se reportaron con anterioridad (Dobosy et al., 2007; Li et al., 2005). Genes, comúnmente hipermetilados, se encuentran frecuentemente deletados o mutados en pacientes con PCa, demostrando que la heterogeneidad de la expresión génica puede ocurrir a través de múltiples mecanismos. La hipermetilación de la GSTP1, es una de las modificaciones más comunes observadas en PCa, ocurriendo en el 72-100% de los pacientes testeados (Bastian et al., 2005; Lodygin et al., 2005; Yegnasubramanian et al., 2004). También se ha reportado hipermetilación en regiones promotoras del gen de resistencia a múltiples drogas (MDR1), adenomatosis poliposis coli (APC) (Bastian et al., 2005; Lodygin et al., 2005; Yegnasubramanian et al., 2004) y en otros marcadores de PCa incluyendo NKX3.1 (Asatiani et al., 2005). Más recientemente, se han descrito patrones globales de hipometilación en PCa metastásico (Nelson et al., 2007). Esta y otras observaciones indican que la metilación del DNA es un mecanismo importante en la



transformación del PCa.

#### **I.I.2.4 SPLICING ALTERNATIVO**

El splicing alternativo, es un proceso por el cual los intrones y exones de los precursores de los mRNAs son cortados y unidos en distintos arreglos. Este proceso juega un rol importante en la diversidad funcional de los transcritos de los genes expresados. El estudio de los eventos de splicing aberrante se está convirtiendo en una fuente potencial de futuros marcadores diagnóstico y blancos terapéuticos en oncología (Brinkman, 2004; Buratti et al., 2006; Pajares et al., 2007). Actualmente se están desarrollando nuevos ensayos diseñados para detectar isoformas de PSA (Jung et al., 2004). Todos los miembros de la familia de genes de la calicreína, incluyendo el PSA, tienen por lo menos una variante de splicing, algunas de las cuales podrían ser utilizadas como potenciales marcadores diagnóstico (Michael et al., 2005). Estas incluyen KLK2 y KLK3 (David et al., 2002), KLK11 (Brinkman, 2004) y KLK15 (Michael et al., 2005) y todas se encuentran activadas en PCa. Los ensayos de RT-PCR de variantes de splicing específicos para KLK2 mostraron cierta utilidad tipo pronóstico en especímenes de nódulo linfático (Shariat et al., 2003). La especificidad de los receptores de FGF (FGFR) es regulada principalmente a través del splicing alternativo (Yeh et al., 2003) y ciertas isoformas del receptor FGFR2 se asocian con el PCa refractario a hormonas (Carstens et al., 1997). Otros genes que sufren splicing alternativo relacionados con un mayor riesgo de PCa incluyen al factor de transcripción tipo Krupper (KLF6) (Narla et al., 2005) y al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular flt-4 (VEGFR3) (Stearns et al., 2004). También se han caracterizado catorce variantes de splicing diferentes para el gen de fusión TMPRSS2:ERG que tiene alta recurrencia en PCa (Clark et al., 2007; Wang et al., 2006).

#### **I.I.2.5 OTROS MODULADORES POST-TRANSCRIPCIONALES**

Estadísticas recientes indican que los genes que codifican para proteínas comprenden solo el 2% del genoma humano, sin embargo ensayos de microarray han demostrado que alrededor del 50% del genoma es transcrito a RNA (Kapranov et al., 2007). La mayoría de estos transcritos se los denomina RNA no-codificante (ncRNAs) (Mattick y Makunin, 2006). Este tipo de RNA pareciera jugar un rol importante regulatorio en los procesos celulares, a

pesar de que muchos de los mecanismos no han sido elucidados todavía. Se identificaron 39 ncRNAs intrónicos que son activados cuando células de PCa hormono-dependientes fueron tratadas con hormona sintética, demostrando que los ncRNAs podrían estar involucrados en la diferenciación y el mantenimiento de la próstata (Louro et al., 2007). La expresión aberrante de ncRNAs podría potencialmente llevar a fenotipos patológicos. PCA3 (conocido como DD3) es un ncRNA, fuertemente activado en PCa (Bussemakers et al., 1999), que surge como un marcador útil para la detección de esta enfermedad en hombres con altos niveles de PSA en la orina (Marks et al., 2007).

Los microRNAs (miRNAs) inhiben la traducción del mRNA a través de un mecanismo de clivaje (conocido como RNA de interferencia o RNAi) o a través de otros mecanismos que todavía están siendo dilucidados (Carthew, 2006). Se sabe que los miRNAs reconocen y se asocian directamente a secuencias de mRNA y por lo tanto modificaciones en la expresión de los miRNAs pueden tener un impacto en la expresión de los mRNA. Mutaciones en las secuencias de los mRNA también afectarían su propia regulación a través de los miRNAs. Actualmente se estudia el rol de los miRNAs asociados con la progresión del cáncer (Calin y Croce, 2006a, b; Garzon et al., 2006; Zhang et al., 2007) y específicamente del PCa (Lu et al., 2005; Mattie et al., 2006; Porkka et al., 2007; Volinia et al., 2006).

## **I.II INFLAMACION**

### **I.II.1 LA INFLAMACION: EL SEPTIMO “HALLMARK” DEL CANCER**

Estudios epidemiológicos han revelado que la inflamación crónica predispone a diferentes formas de cáncer. El uso de agentes anti-inflamatorios no esteroideos está asociado con la protección contra varios tumores. Componentes inflamatorios están presentes en el microambiente de la mayoría de los tejidos neoplásicos, incluyendo aquellos que no están relacionados causalmente a un proceso inflamatorio obvio. Los rasgos claves de la inflamación relacionada con el cáncer incluyen la infiltración de células del sistema inmune, prominentemente macrófagos asociados al tumor (TAM), la presencia de mensajeros polipeptídicos de la inflamación (citoquinas como TNF $\alpha$  o IL-1, y quimioquinas como CCL2), la ocurrencia de la remodelación del tejido y de la angiogénesis (Mantovani, 2009).

### I.II.1.1 CONECTANDO A LOS ONCOGENES CON LA INFLAMACION

La ocurrencia de componentes inflamatorios en el microambiente de los tumores, que no están epidemiológicamente relacionados a la inflamación, cuestionó si los eventos genéticos que causan la neoplasia son responsables de la construcción de este ambiente inflamatorio. Para contestar esta pregunta, en un estudio clínico de carcinoma papilar de tiroides (PTC), un tumor caracterizado por la presencia de macrófagos guiados por citoquinas e infiltración de células dendríticas (Borrello et al., 2005; Russell et al., 2004; Russell et al., 2003), se observaron que los rearrreglos de los genes que codifican para tirosina quinasas están involucrados en la patogénesis del tumor. En particular, el rearrreglo RET/PTC representa un evento genético frecuente, temprano, causativo y suficiente en la patogénesis del PTC. En un contexto celular apropiado proveído por células tiroideas humanas primarias, el RET/PTC activa un programa genético relacionado con la inflamación (Borrello et al., 2005), que incluye factores estimuladores de colonias que promueven el reclutamiento y la supervivencia de leucocitos; IL-1; la ciclo-oxigenasa 2 (COX2), frecuentemente expresada en cáncer; monocitos y células dendríticas atraídos por quimioquinas CCL2 y CCL20; quimioquinas angiogénicas, que coordinan la inducción y la inhibición de las enzimas que degradan matriz y la expresión del receptor de quimioquina CXCR4 en las células iniciadoras (Cerutti et al., 2007). Estos resultados muestran que un evento genético temprano y causativo como RET/PTC involucrado en la patogénesis de un tumor humano, promueve directamente la construcción de un microambiente inflamatorio brindando una ventaja directa (Borrello et al., 2005).

Los oncogenes representativos de distintas clases moleculares y modos de acción (tirosina quinasas, ras-raf, oncogenes nucleares, supresores tumorales) comparten la capacidad de orquestar programas pro-inflamatorios. Mientras los oncogenes pueden compartir elementos comunes como aquellos relacionados con la angiogénesis y el reclutamiento de células de origen mielo-monocítico, la diversidad de componentes celulares inflamatorios lleva a un análisis detallado de los mediadores de dicha inflamación tejido específica. En la vía extrínseca, no se sabe todavía si la inflamación crónica *per se* es suficiente para la carcinogénesis (Mantovani et al., 2008).

### I.II.1.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y CITOQUINAS

NF- $\kappa$ B es un orquestador clave de la inmunidad innata (Karin, 2006) y es crítico tanto en el contexto del tumor como en el de las células inflamatorias. En ambos contextos celulares, NF- $\kappa$ B puede encontrarse río-abajo del censo de microbios o daño tisular vía el camino de señalización mediado por el receptor tipo “toll” (TLR)-MyD88, por las citoquinas inflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y también por el daño tisular que resulta en la liberación de señales de alarma. Adicionalmente, la activación de NF- $\kappa$ B puede producirse como consecuencia de alteraciones genéticas autónomas (amplificaciones, mutaciones o deleciones) en las células tumorales. El NF- $\kappa$ B puede actuar sobre los leucocitos infiltrantes. En tumores avanzados establecidos, los TAM exhiben una defectuosa y retrasada activación de NF- $\kappa$ B (Biswas et al., 2006). Este factor de transcripción parecería actuar como un reóstato activado en condiciones inflamatorias predisponiendo al cáncer (ejemplo: enfermedad inflamatoria del intestino) mientras que en los TAM aparece como el sostenedor de la inflamación de la neoplasia metastásica establecida.

Se demostró que TNF $\alpha$  aumentaba la capacidad invasiva de las células tumorales, proveyendo evidencias de la función pro-tumoral de las citoquinas inflamatorias. Adicionalmente, el descubrimiento de que los ratones deficientes en TNF $\alpha$  estaban protegidos contra la carcinogénesis de piel ofreció sustento genético relacionando la inflamación y el cáncer (Balkwill y Mantovani, 2001).

La promoción tumoral mediada por TNF $\alpha$  puede involucrar caminos diferentes (Popivanova et al., 2008): un efecto directo sobre las células tumorales a bajas concentraciones de esta citoquina, una interrelación con el sistema de quimioquinas con la consiguiente inducción de CXCR4 y la estimulación de la transición epitelial - mesenquimal (Kulbe et al., 2007). Además, los TAM promueven su señalización a través de TNF $\alpha$  en cáncer gástrico (Oguma et al., 2008). Estos descubrimientos proveen sustento para el desarrollo de protocolos clínicos utilizando antagonistas de TNF $\alpha$  en terapias para el cáncer (Harrison et al., 2007). El receptor “decoy” 3 es un miembro de la superfamilia de receptores TNF $\alpha$  y ha sido involucrado en el control de los complejos mayores de histocompatibilidad tipo II en los TAM (Chang et al., 2008).

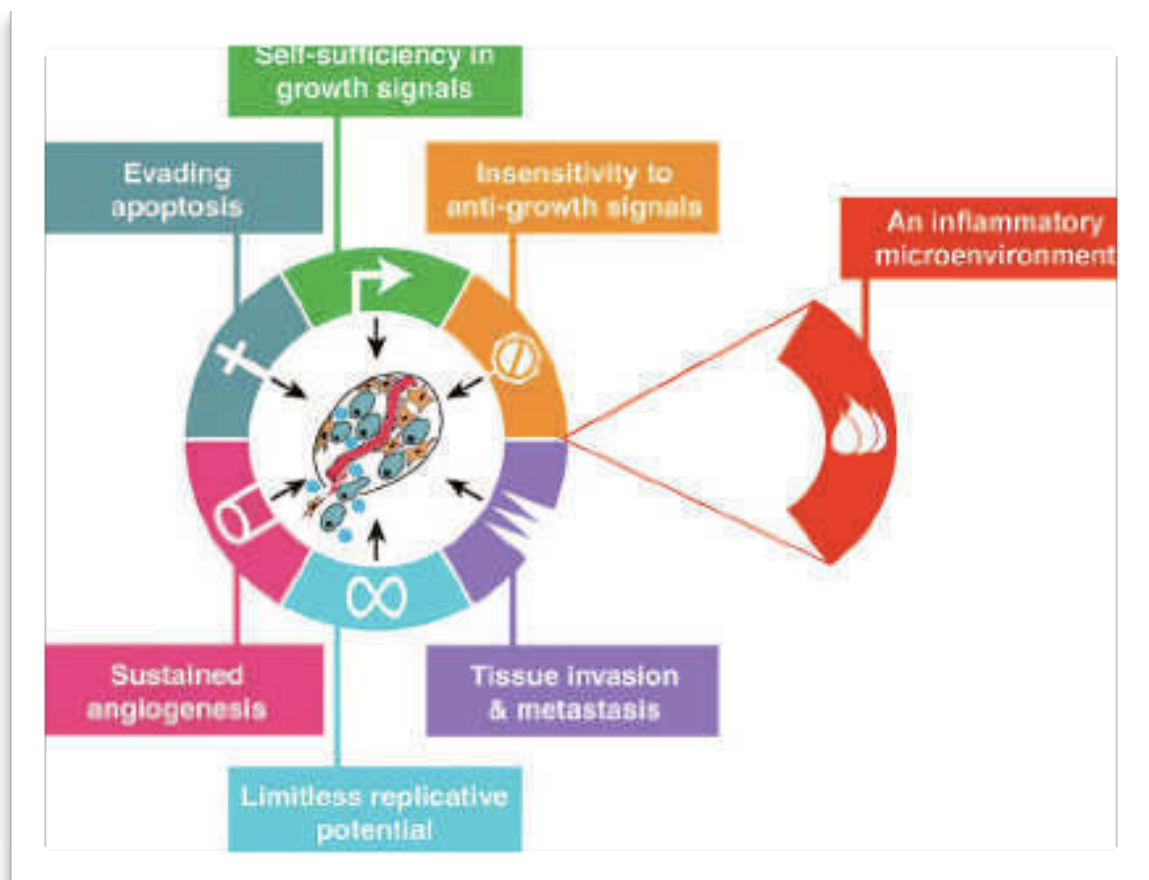
La señalización por el receptor de IL-1 y los TLRs está bajo control por mecanismos de regulación negativos (Mantovani et al., 2008). Existen evidencias que TIR8, un miembro huérfano de la familia IL-1R (conocida también como SIGIRR), inhibe la señalización de los complejos IL-1R/TLR, posiblemente atrapando IRAK-1 y TRAF-6. En un modelo de carcinogénesis intestinal en respuesta a la administración de sulfato sódico de dextrano y azoximetano, los ratones deficientes en TIR8 exhibían una gran susceptibilidad a la inflamación en términos de pérdida de peso, sangrado y muerte; y mostraban aumento en la susceptibilidad a la carcinogénesis de colon, asociada con un aumento de la permeabilidad y producción local de prostaglandina E2, citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6) y quimioquinas (KC/CXC, J/CCL2 y CCL3) (Garlanda et al., 2007; Xiao et al., 2007). Estos mediadores se encuentran río-debajo de NF- $\kappa$ B y promueven la inflamación activada por la neoplasia (Karin, 2006). Por lo tanto, la pérdida del punto de chequeo (TIR8) de la activación de NF- $\kappa$ B lleva a un aumento de la carcinogénesis en el tracto gastrointestinal, subrayando una vez mas la conexión entre la inflamación crónica y la promoción del cáncer.

### **I.II.1.3 INFLAMACION Y MICROAMBIENTE TUMORAL**

Varios estudios se han enfocado en dilucidar los mecanismos celulares y moleculares que relacionan la inflamación con el cáncer (Mantovani et al., 2008). Hay dos caminos que vinculan la inflamación con el cáncer; la vía intrínseca y extrínseca. En la intrínseca, la activación de diferentes clases de oncogenes lleva a la expresión de programas relacionados con la inflamación que guían la construcción de un microambiente inflamatorio. En esta vía, las condiciones inflamatorias promueven el desarrollo del cáncer. Orquestadores clave en la intersección de la vía intrínseca y extrínseca incluyen factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (Karin, 2006), citoquinas como TNF $\alpha$  y quimioquinas. Por lo tanto, la inflamación es un componente clave del microambiente tumoral. Se debería enfatizar que la reacción inflamatoria también podría tener actividad antitumoral (Allavena et al., 2008; Apetoh et al., 2007; Mantovani et al., 2008). Esta función dual de las células y mediadores inflamatorios está reflejada por estudios de correlación entre parámetros de cáncer relacionados con la inflamación y el comportamiento clínico en diferentes contextos (Seike et al., 2007; Shabo et al., 2008).

Las citoquinas son un componente clave del microambiente inflamatorio tumoral. Como tal, representan un blanco primario en los esfuerzos terapéuticos para tratar a la inflamación relacionada con el cáncer. Durante muchos años los esfuerzos para tratar el cáncer se han concentrado en la destrucción/inhibición de las células tumorales. Las estrategias para modular el microambiente hospedador ofrecen una perspectiva complementaria (Harrison et al., 2007).

Hanahan y Weinberg (2000) identificaron seis “sellos” (hallmarks) del cancer. La inflamación relacionada con el cáncer representa el 7<sup>mo</sup> sello” (Fig. 7) (Mantovani, 2009).



(Mantovani, 2009)

**FIGURA 7. Inflamación relacionada con el cáncer (CRI) en la progresión tumoral y la metástasis.**

CRI aparece como el séptimo “sello” del cáncer. Seis sellos caracterizan al cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000). Existen evidencias que sugieren que la CRI es un componente clave en el microambiente tumoral, representando el 7<sup>mo</sup> sello del cáncer.

### I.II.2 INFLAMACION EN LA CARCINOGENESIS PROSTATICA

El PCa es el neoplasma maligno más frecuente en los hombres occidentales. Debido a que muchos hombres provenientes del sudeste asiático tienen una baja incidencia de PCa que

aumenta rápidamente luego de la inmigración hacia el Occidente, esta enfermedad se considera que no es solo una característica intrínseca de la edad. La patogénesis del PCa refleja tanto componentes hereditarios como ambientales. Aún queda por revelar cuales son los factores ambientales y las variaciones genéticas que han producido semejante epidemia del PCa. Aproximadamente el 20% de todos los cánceres humanos en el adulto resultan de estados de inflamación crónica (Ames et al., 1995; Coussens y Werb, 2002) que es disparada por agentes infecciosos o por exposición a factores ambientales, o por una combinación de ambos. También hay evidencia emergente que la inflamación es crucial para la etiología del PCa. Esta evidencia surge de estudios epidemiológicos, histopatológicos y moleculares.

### **I.II.2.1 ENIGMAS EN LA ETIOLOGIA DEL CANCER DE PROSTATA**

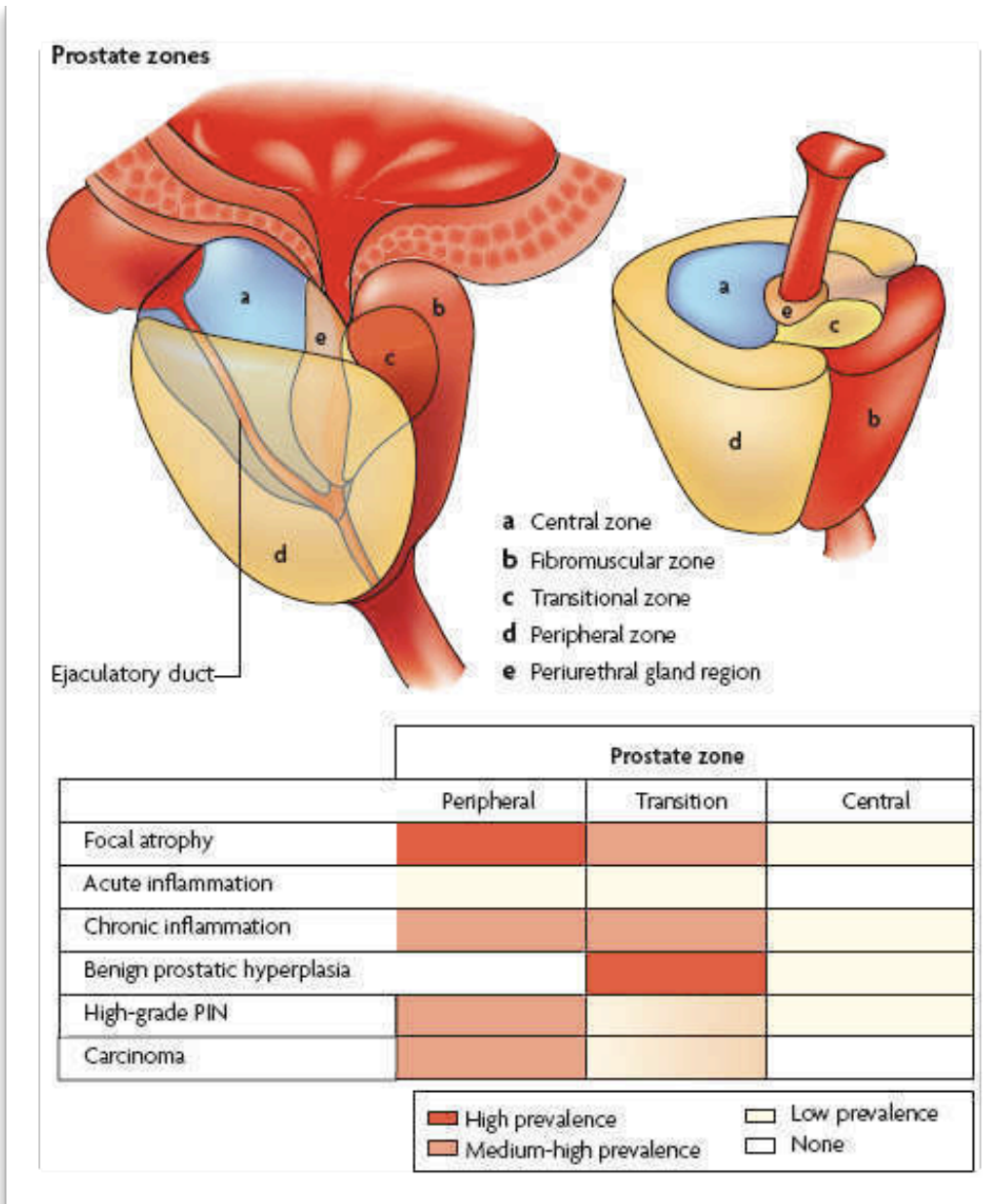
Como en otros cánceres, el PCa se desarrolla por la acumulación de mutaciones genéticas y epigenéticas, resultando en la inactivación de genes supresores tumorales y de genes guardianes y en la activación de oncogenes (TABLA II) (Gonzalvo e Isaacs, 2003; Shand y Gelmann, 2006). También hay evidencias que indican la presencia de una inestabilidad genética subyacente, que podría facilitar la progresión del tumor (Meeker, 2006; Pihan et al., 2003). A pesar de que estos cambios genéticos y epigenéticos son cruciales para comprender “cómo” surge el PCa, otra de las preguntas claves es “porqué” el PCa es tan común. Los factores de riesgo más consistentes para el desarrollo del PCa son: la edad avanzada, el historial familiar, la raza y la dieta. Un enigma sorprendente es la selectividad del órgano dentro del sistema genitourinario. Mientras hay aproximadamente 280.000 nuevos casos de PCa en los Estados Unidos por año, hay menos de 50 casos reportados de carcinoma primario de la vesícula seminal (Bostwick, 1997). La segunda pregunta intrigante es la variación geográfica en la incidencia del PCa: la población china y japonesa que migra a Occidente adquiere un mayor riesgo de contraer la enfermedad dentro de una misma generación (Peto, 2001). Estos datos avalarían el efecto del ambiente en el desarrollo del PCa. Una tercera incógnita es la predilección del PCa por una zona específica. La mayoría de las lesiones carcinogénicas ocurren en la zona periférica de la glándula, con menor frecuencia en la zona de transición, y casi no se observan lesiones en la zona central (Fig. 8) (De Marzo et al., 2007).

TABLA II. Cambios somáticos genéticos y epigenéticos en cáncer de próstata

Gene and gene type	Location	Notes
<i>Tumour-suppressor genes</i>		
CDKN1B	12p13.1-p12	Encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. One allele is frequently deleted in primary tumours
NKX3.1	8p21.2	Encodes prostate-restricted homeobox protein that can suppress the growth of prostate epithelial cells. One allele is frequently deleted in primary tumours
PTEN	10q23.31	Encodes phosphatase and tensin homologue, which suppresses cell proliferation and increases apoptosis. One allele is frequently lost in primary tumours. Some mutations are found in primary tumours and more in metastatic lesions
TP53	17p13.1	Has many tumour-suppressor functions, including cell-cycle arrest in response to DNA damage, senescence in response to telomere dysfunction, and the induction of apoptosis. Mutations are uncommon early, but occur in about 50% of advanced or hormone-refractory prostate cancers
<i>Oncogenes</i>		
MYC	8q24	A transcription factor that regulates many target genes involved in cell proliferation, senescence, apoptosis and cell metabolism. Overexpression can directly transform cells. mRNA levels are commonly increased in all disease stages through unknown mechanism(s). Low-level amplification of the MYC locus is common in advanced disease
ERG	21q22.3	Proposed new oncogene for prostate cancer. Fusion transcripts with the 5' portion of androgen-regulated gene ( <i>TMPRSS2</i> ) arise from deletion or chromosomal rearrangements commonly found in all disease stages
ETV1-4	7p21.3, 19q13.12, 1q21-q23, 17q21.31	Encodes ETS-like transcription factors 1-4, which are proposed to be new oncogenes for prostate cancer. Fusion transcripts with the 5' portion of androgen-regulated gene ( <i>TMPRSS2</i> ) arise from chromosomal rearrangements commonly found in all disease stages
AR	Xq11-12	Encodes the androgen receptor. Protein is expressed in most prostate cancers, and the locus is amplified or mutated in advanced disease and hormone-refractory cancers
Activation of the enzyme telomerase		Maintains telomere function and contributes to cell immortalization. Activated in most prostate cancers, mechanism of activation may be through MYC activation
<i>Caretaker genes</i>		
GSTP1	11q13	Encodes the enzyme that catalyses the conjugation of reduced glutathione to electrophilic substrates. Functions to detoxify carcinogens. It is inactivated in more than 90% of cancers by somatic hypermethylation of the CpG island within the upstream regulatory region
Telomere dysfunction	Chromosome termini	Contributes to chromosomal instability. Shortened telomeres are found in more than 90% of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) lesions and prostate cancer lesions
Centrosome abnormalities	N/A	Contributes to chromosomal instability. Centrosomes are structurally and numerically abnormal in most prostate carcinomas.
<i>Other somatic changes</i>		
PTGS2, APC, MDR1, EDNRB, RASSF1 $\alpha$ , RAR $\beta$ 2	Various	The hypermethylation of CpG islands within upstream regulatory regions occurs in most primary tumours and metastatic lesions. The functional significance of these changes is not yet known

(De Marzo et al., 2007)





(De Marzo et al., 2007)

**FIGURA 8. Predisposición al cáncer de próstata según la zona glandular.**

La mayoría de las lesiones cancerosas ocurren en la zona periférica de la glándula, algunas ocurren en la zona de transición y casi ninguna ocurre en la zona central. La mayoría de las hiperplasias benignas de próstata (BPH) se desarrollan en la zona de transición y pueden aumentar su tamaño considerablemente. La inflamación encontrada en la zona de transición está asociada con los nódulos de BPH y la atrofia, y esta última está presente frecuentemente dentro y alrededor de los nódulos de BPH. La inflamación aguda puede ser prominente tanto en la zona periférica como en la de transición, pero es muy variable. La inflamación en la zona periférica ocurre en asociación con la atrofia en la mayoría de los casos. Los carcinomas en la zona periférica se encuentran frecuentemente en asociación con el PIN de alto grado, mientras que el carcinoma en la zona de transición tiende a ser de menor grado y está más frecuentemente asociado con hiperplasias adenomatosas atípicas o adenosis, y menos asociado con el PIN de alto grado. Los diversos patrones de atrofia prostática, algunos de los cuales se mezclan directamente con el PIN y a veces con pequeñas lesiones de carcinoma, son a su vez más prevalentes en la zona periférica, con menor ocurrencia en la zona de transición y muy pocos en la zona central.

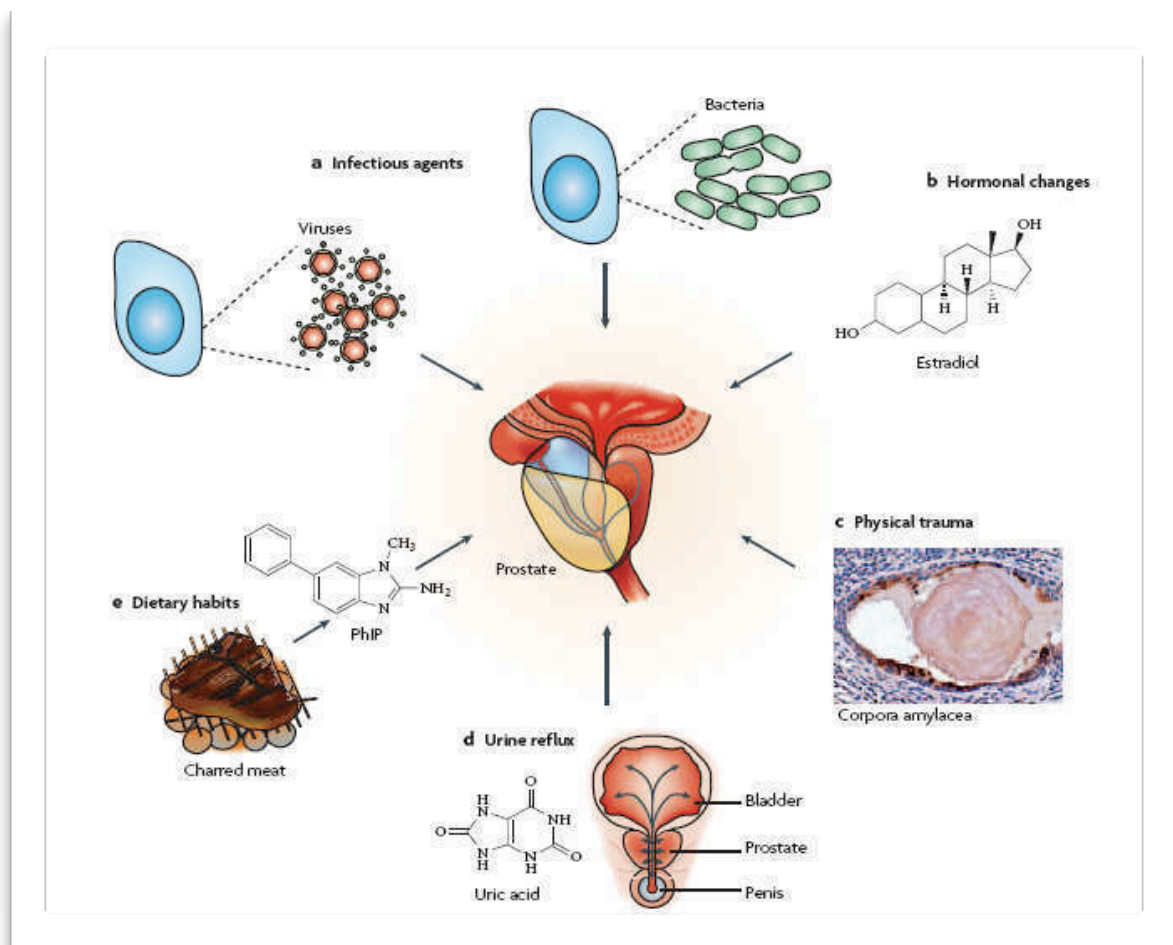
### I.II.2.2 EL ROL DE LA ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA

Histológicamente, la mayoría de las lesiones que contienen tanto infiltrados inflamatorios agudos o crónicos en la próstata, están asociados con un epitelio atrófico o con una atrofia epitelial focal (De Marzo et al., 1999; Franks, 1954a). Áreas focales de atrofia epitelial son comunes en la próstata envejecida (De Marzo et al., 1999; Franks, 1954a; Rich, 1934), y frecuentemente abarcan una gran fracción de la zona periférica, donde la atrofia ocurre con mayor frecuencia (McNeal, 1988; Rich, 1934). Al comparar con el epitelio normal, hay una fracción aumentada de células epiteliales que proliferan en las lesiones focales atróficas (De Marzo et al., 1999; Feneley et al., 1996; Ruska et al., 1998) y se ha propuesto el nombre de atrofia inflamatoria prostática (PIA) para la mayoría de dichas lesiones atróficas (De Marzo et al., 1999; van Leenders et al., 2003). No todas las atrofia prostáticas focales muestran un aumento de células inflamatorias, y por eso, estas lesiones reciben el nombre de atrofia proliferativa. Estudios morfológicos han demostrado transiciones entre el epitelio atrófico y el adenocarcinoma (Franks, 1954b; Montironi et al., 2002; Nakayama et al., 2003), y transiciones frecuentes entre áreas de PIA y/o atrofia proliferativa con neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HPIN) (De Marzo et al., 1999; Putzi y De Marzo, 2000). A pesar de que hay evidencias de cambios genéticos en PIA y en la atrofia proliferativa, surge a partir de todos los estudios publicados que tanto PIA como la atrofia proliferativa no ocultan alteraciones genéticas clonales. Muestras de tejido de pacientes con BPH, que como ya especificamos ocurre en la zona de transición de la glándula (Fig. 8), presentan áreas con un marcado incremento en el número de células inflamatorias crónicas. En estas áreas, pareciera que el epitelio se encuentra atrófico, indicando que estas regiones pueden considerarse como PIA de la zona de transición.

Varios caminos moleculares de señalización claves involucrados en PCa también se han encontrado alterados en las lesiones PIA. Por ejemplo, la expresión proteica de genes supresores tumorales como *NKX3.1* (Bethel et al., 2006) y *CDKN1B*, que codifica para p27 (De Marzo et al., 1999; van Leenders et al., 2003), están reprimidos en las lesiones atróficas focales. Estos genes están altamente expresados en el epitelio prostático normal, y frecuentemente reprimidos o ausentes en PIN y PCa.

### I.II.2.3 FUENTES DE INFLAMACION PROSTATICA

En la mayoría de los casos, la causa de la inflamación prostática se desconoce. Varias fuentes potenciales existen para el incidente inicial, como la infección directa, el reflujo urinario que induce el trauma físico y químico, factores dietarios, estrógenos, o una combinación de dos o más de estos factores (Fig. 9). Más aún, cualquiera de estos factores podría llevar a una ruptura de la tolerancia inmunogénica y al desarrollo de una reacción autoinmune en la próstata.



(De Marzo et al., 2007)

FIGURA 9. Causas posibles de la inflamación prostática.

**Agentes infecciosos.** Se han observado varios organismos patogénicos que pueden infectar e inducir una respuesta inflamatoria en la próstata. Estos incluyen los organismos de transmisión sexual como la *Neisseria gonorrhoeae* (Pelouze, 1935), *Chlamydia trachomatis*

(Poletti et al., 1985), *Trichomonas vaginalis* (Gardner et al., 1986) y *Treponema pallidum* (Thomson, 1920), y otras bacterias de transmisión no-sexual como *Propionibacterium acnes* (Cohen et al., 2005). También están aquellas bacterias que se sabe causan prostatitis crónica o aguda, principalmente las Gram negativas como *Escherichia coli* (Bushman, 2000). A pesar de que estos patógenos han sido identificados en la próstata, el grado de infección que causan en la misma varía.

Los virus también pueden infectar la próstata. El papillomavirus (HPV), el virus humano herpes simple tipo 2 (HSV2), el citomegalovirus (CMV) y el virus humano herpes simple tipo 8 (HHV8) se detectaron en la próstata (Samanta et al., 2003; Strickler y Goedert, 2001; Zambrano et al., 2002). Se desconoce la frecuencia con que estos agentes infectan la próstata y si producen una respuesta inflamatoria. En conclusión, muchos patógenos diversos pueden infectar esta glándula. Mientras algunos de ellos están asociados a la inflamación, otros se han encontrado no asociados a la misma.

Varios estudios avalan el argumento de una relación entre la inflamación y el PCa. Entre ellos se puede observar experimentos que muestran que personas que consumen agentes anti-inflamatorios tienen un menor riesgo de contraer PCa (Jacobs et al., 2005). Estudios caso-control y estudios prospectivos, sugieren una reducción del ~15–20% en el riesgo de contraer PCa en personas que consumen aspirina regularmente o drogas antiinflamatorias no-esteroides (NSAIDs) comparado con aquellas que no consumen regularmente estas drogas (Chan et al., 2006; Mahmud et al., 2004). Sin embargo, en un estudio mayor el efecto solo se observó en los consumidores a largo término (Jacobs et al., 2005).

A pesar de que diversos trabajos reportan una asociación positiva entre la prostatitis clínica y el PCa (Dennis et al., 2002; Jacobs et al., 2005), otros estudios no han encontrado dicha asociación, excepto en aquellos hombres diagnosticados con cáncer a una edad temprana (Sutcliffe et al., 2006). Aunque no queda claro porque el efecto fue solamente observado en estadios tempranos del PCa, es posible que la prostatitis clínica esté asociada con una subpoblación de pacientes con PCa que se manifiesta a una edad relativamente temprana.

Para determinar si la inflamación está relacionada al PCa independiente de los síntomas clínicos, será crucial comparar los patrones de inflamación en las biopsias de próstata de hombres con o sin carcinoma. Como la inflamación es muy común en los especímenes de

esta glándula, estas mediciones deberán ser cuantitativas y requerirán de un tamaño de muestra mayor.

**Reflujo urinario, trauma químico y físico.** La irritación química, producto del reflujo urinario ha sido propuesta como un agente etiológico del desarrollo de la inflamación crónica en la próstata (Mahmud et al., 2004). A pesar de que la orina contiene diversos componentes químicos que podrían ser tóxicos para el epitelio prostático, el ácido úrico en particular parecería ser muy dañino (Persson y Ronquist, 1996). Trabajos recientes han implicado al ácido úrico cristalino como una “señal de peligro” disparada por células en proceso de muerte, y se ha demostrado que este proceso involucra una crioporina (caspase-1-activating NALP3) presente en las células del sistema inmune innato (primariamente macrófagos), resultando en la producción de citoquinas inflamatorias que pueden aumentar el influjo de otras células inflamatorias (Martinon et al., 2006). Adicionalmente, el reflujo urinario de agentes químicos que producen injuria puede funcionar en conjunto con agentes infecciosos para aumentar la inflamación de la próstata. Otra forma por la cual la inflamación podría ocurrir es a través el desarrollo de cuerpos amiláceos (Fig. 9). Se cree que los cuerpos amiláceos podrían contribuir en el proceso inflamatorio de la próstata, con la infección persistente y con la carcinogénesis prostática porque se observa frecuentemente de forma adyacente al epitelio dañado y a los infiltrados inflamatorios focales (De Marzo et al., 2007). Diversos estudios han encontrado que la eyaculación frecuente, que podría determinar la tasa de formación de los cuerpos amiláceos intraluminales y el tiempo de contacto entre los agentes químicos como el ácido úrico u otros carcinógenos urinarios y el epitelio prostático, se relaciona con una disminución en la incidencia del PCa (Leitzmann et al., 2004). También se han localizado espermatozoos en tejidos prostáticos, y se ha encontrado una asociación entre el movimiento retrógrado de las células del esperma hacia la próstata y la inflamación (De Marzo et al., 2007) o PIA (Chen et al., 2006a).

**Factores Dietarios.** Estudios epidemiológicos han revelado una relación entre la incidencia y la mortalidad de PCa con el consumo de carnes rojas y grasa animal (Michaud et al., 2001). Un mecanismo por el cual las carnes pueden estimular el desarrollo del cáncer podría estar relacionado con la formación de aminas heterocíclicas (HCAs) (Sugimura et al., 2004).

La exposición de ratas al compuesto 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina (PhIP) induce la aparición de carcinomas en intestino en ambos sexos, en la glándula mamaria en las hembras y en la próstata en los machos (Knize y Felton, 2005). En las próstatas de los roedores se distinguen cuatro lóbulos que no se corresponden anatómicamente con las zonas prostáticas humanas, y el PhIP induce cáncer únicamente en los lóbulos ventrales de las ratas (Inaguma et al., 2003). El PhIP funciona tanto como un clásico iniciador lóbulo-específico así como un promotor tumoral. Se ha encontrado que únicamente el lóbulo ventral muestra un aumento en las células estromales y en la cantidad de macrófagos intra-epiteliales y estromales (Nakai et al., 2007). Se observó que luego de 12 semanas de exposición al PhIP, el lóbulo ventral desarrolló atrofia epitelial, para luego observar PIN y carcinomas intraductales desarrollándose directamente a partir del epitelio atrófico. Otros han reportado resultados similares, en los cuales el tratamiento con PhIP indujo la inflamación y la atrofia previos a la inducción de PIN y de cánceres intraductales (Borowsky et al., 2006). A pesar de que todavía no se sabe si el aumento de células estromales y de macrófagos lóbulo-específicos tiene un rol en el proceso neoplásico, los mastocitos estromales estimulan la formación del cáncer en varios modelos animales, probablemente como resultado de la liberación de factores como el TNF $\alpha$  y de varias proteasas, que podrían tener un rol importante en la tumorigénesis (Choo-Kang et al., 2005).

***Estrógenos.*** Otra línea de investigación para descifrar las causas de la inflamación prostática y el PCa es el estudio de la exposición a estrógenos. Los estrógenos están altamente relacionados con los procesos autoinmunológicos en la mujer, las cuales a su vez están más predisuestas a las enfermedades autoinmunes en comparación con los hombres. Los aumentos en los niveles estrogénicos, debido a la exposición como consecuencia del desarrollo en la pubertad o del ambiente, se han relacionado al desarrollo del PCa (Coffey, 2001; Harkonen y Makela, 2004). Los estrógenos afectan el crecimiento y el desarrollo de la próstata, y esto ocurre por rutas indirectas en el eje hipotalámico-pituitario-gonadal, a través de la prolactina y también por efectos directos mediados por los ER $\alpha$  (que se expresan principalmente en el estroma) y los ER $\beta$  (que se expresan principalmente en el epitelio) (Gillera et al., 2003; Harkonen y Makela, 2004; Huang et al., 2004). Los estrógenos suministrados a roedores recién nacidos resultan en la inducción de un estado de “imprinting” o de “estrogenización del desarrollo” en los cuales se observan defectos del

desarrollo tisular, incluyendo reducción del crecimiento prostático. Este tratamiento también produce inflamación lóbulo-específica, hiperplasia y PIN (Huang et al., 2005). Virtualmente, todos estos efectos están mediados por ER $\alpha$  (Prins et al., 2001). Por lo tanto, es muy posible que la inflamación crónica en la próstata adulta humana pueda reflejar una reacción autoinmune causada, en parte, por los estrógenos.

#### **I.II.2.4 RUPTURA DE LA TOLERANCIA INMUNOGENICA A LOS ANTIGENOS PROSTATICOS**

Otro mecanismo potencial para la inflamación crónica en la próstata que podría estar correlacionado con todas las formas anteriormente mencionadas de injuria prostática, es que las células epiteliales dañadas podrían liberar antígenos que resultasen en la ruptura de la “tolerancia” inmunogénica aparente de la próstata. Por ejemplo, muchos antígenos prostáticos se expresan recién luego de la pubertad, cuando la glándula atraviesa el crecimiento y desarrollo estimulado por hormonas. Esto podría resultar en una falta de tolerancia inmune fisiológica a estos antígenos. Por lo tanto, cuando se liberan durante la injuria prostática, podrían activar una respuesta inmune resultando en una reacción específica a los antígenos restringidos a la próstata. Más aún, se ha reportado una respuesta inmune de los linfocitos T al PSA en pacientes con prostatitis crónica (Ponniah et al., 2000).

Diversos mecanismos no infecciosos podrían llevar al daño de las células epiteliales y estromales prostáticas. Se sabe que las células dañadas disparan una señal de “respuesta al daño” que resulta en una inflamación aguda. El ácido úrico cristalino es particularmente interesante en este contexto, ya que interactúa directamente con un receptor que es parte de una vía de señalización de la respuesta inmune innata que puede estimular potentemente a la inflamación. El hecho de que PhIP induce la inflamación prostática y la atrofia también es de gran interés, ya que esto relacionaría el tipo de dieta con estos procesos en el camino hacia la carcinogénesis prostática. La exposición continua a agentes injuriosos también podría preparar a la próstata para la inflamación crónica que desencadenaría una respuesta inflamatoria sostenida en el tiempo y posteriormente cáncer. Finalmente, todos estos mecanismos de injuria epitelial crónica podrían resultar también en una función de protección disminuida, facilitando el crecimiento de agentes infecciosos que podrían a su vez aumentar más aún la respuesta inflamatoria y permitir la acumulación de metabolitos

urinarios en el intersticio prostático donde podrían estimular y aumentar la reacción inflamatoria (De Marzo et al., 2007).

### **I.II.2.5 IMMUNOBIOLOGIA DE LA INFLAMACION PROSTATICA**

La próstata normal, como todos los demás órganos, contiene células inflamatorias endógenas que consisten en linfocitos T y B estromales y epiteliales (Bostwick et al., 2003), macrófagos y mastocitos. Sin embargo, la mayoría de los tejidos prostáticos adultos contienen un aumento de los diversos infiltrados inflamatorios (De Marzo et al., 2007). En términos de la biología de las células inflamatorias y la naturaleza de la respuesta inmune en la próstata, la mayoría de los trabajos se ha enfocado en comparar tejidos con BPH, con muestras de zonas de transición normal y con carcinomas en esta misma región. Steiner y colaboradores han examinado las propiedades inmuno fenotípicas y biológicas de las células inflamatorias crónicas en BPH y tejidos de próstata normal (Steiner et al., 2003a; Steiner et al., 2003b). Ellos muestran que de las células CD45+ que se encuentran aumentadas (todos los leucocitos expresan CD45 y los no-leucocitos, no lo expresan), 70-80% son linfocitos T CD3+, mientras que 10-15% son linfocitos B CD19+ o CD20+. El número de macrófagos también se encuentra aumentado en estas lesiones inflamatorias. En términos del fenotipo de los linfocitos T, hay una razón revertida CD8:CD4, de tal manera que la mayoría de las células T presentes en las áreas normales expresan CD8, pero la mayoría de las células T en las áreas inflamadas expresan CD4. En términos de los receptores de células T (TCRs), 90% de estas células representan células T $\alpha\beta$  estandar (que expresan TCR $\alpha\beta$ ), con menos del 1% representando células T $\gamma\delta$ . El antígeno mayor de histocompatibilidad clase II (HLADR) que indica si las células T están activadas por señalación vía antígeno, está presente en el 40% de las células T CD3+, y muchas de éstas expresan CD45RO, indicando que estas son células con “experiencia antigénica” (Steiner et al., 2003b). Ninguna de estas células T en el epitelio normal prostático mostró evidencia de su activación o de tener “experiencia antigénica”.

Las respuestas de las células T CD4+ pueden dividirse en diversos tipos que se clasifican según su perfil de citoquinas. Los linfocitos T<sub>H</sub>1 producen interferón  $\gamma$  y TNF $\alpha$ , mientras que los T<sub>H</sub>2 producen IL-4, IL-5 e IL-13.



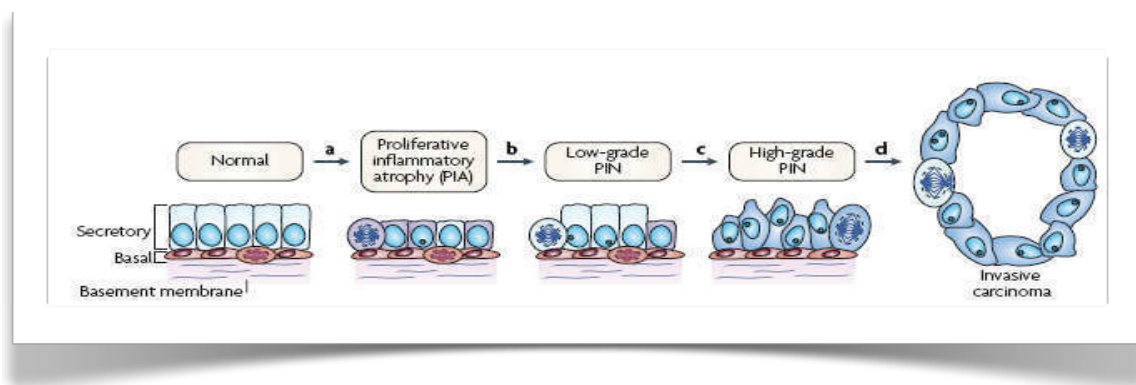
Los linfocitos T regulatorios ( $T_{Reg}$ ) que pueden suprimir la respuesta adaptativa de los linfocitos T y la autoinmunidad, se caracterizan por la expresión de CD25 y el factor de transcripción FOXP3. También secretan TGF $\beta$ . Se reportó que los  $T_{H0}$  (células T que no expresan ninguna de las citoquinas previamente indicadas) y las  $T_{H1}$  eran predominantes en las lesiones inflamatorias de BPH y en carcinomas; también se observaron algunas características de la respuesta  $T_{H2}$ . Todavía no se llevaron a cabo experimentos en las otras zonas prostáticas o en las áreas de la atrofia focal o en la zona periférica donde hay PIN. Recientemente se ha mostrado que los linfocitos T CD4+ y CD25+ con propiedades de linfocitos  $T_{Reg}$  incluyendo la expresión de la proteína FOXP3, están presentes en gran cantidad en el PCa localizado en comparación con tejidos normales prostáticos (Miller et al., 2006).

Otros grupos de investigación también han sugerido la importancia de un subgrupo de linfocitos T CD4 efectoros conocidos como  $T_{H17}$ , que se desarrollan a través de determinadas citoquinas (especialmente IL-23) distintas de las involucradas en las respuestas  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$ , y se caracterizan por la producción de IL-17 (Weaver et al., 2006). Estas células son requeridas en modelos de artritis y encefalitis (Weaver et al., 2006), más aún la IL-23 es requerida para el desarrollo de cáncer de piel en respuesta a la exposición de carcinógenos en ratones (Langowski et al., 2006). Un rol potencial para las  $T_{H17}$  en la inflamación prostática ha sido previamente demostrado antes de que este linaje de células  $T_{H17}$  haya sido reconocido como distintivo. Steiner y colaboradores mostraron que los linfocitos T activados en BPH y en PCa expresan altos niveles de IL-17 (Steiner et al., 2003a). Se requiere una mayor investigación que revele las propiedades biológicas y fenotípicas de todos los subgrupos de linfocitos T en la próstata, previo a comprender el significado de la inmunidad adquirida en la carcinogénesis prostática. Los métodos tales como el análisis de imágenes cuantitativo de los subgrupos de células inflamatorias observados por inmunohistoquímica, como también la citometría de estos subgrupos utilizando tejidos aislados de áreas histológicamente definidas, serán cruciales para obtener esta información.

#### **I.II.2.6 HIPOTESIS DE “INJURIA Y REGENERACION”**

El modelo de De Marzo y colaboradores (Fig. 10) sugiere que reiterados eventos de injuria

(y muerte celular) ocurren en el epitelio prostático, como resultado del daño oxidativo y/o nitrosativo de las células inflamatorias en respuesta a patógenos, a la enfermedad autoinmune o a la injuria directa de los carcinógenos circulantes y/o toxinas derivadas de la dieta o de la orina que han vuelto hacia la próstata por reflujo (De Marzo et al., 2007). La manifestación morfológica de esta injuria es la atrofia focal o PIA, que podría postularse como la señal de la carcinogénesis prostática. Las manifestaciones biológicas son un incremento de la proliferación y un aumento masivo de células epiteliales que poseen un fenotipo intermedio entre las células basales y las células luminales maduras (De Marzo et al., 2004; van Leenders et al., 2003).



(De Marzo et al., 2007)

**FIGURA 10. Modelo celular y molecular de la progresión de la neoplasia temprana prostática.**

**A)** Este estadio se caracteriza por la infiltración de linfocitos, macrófagos y neutrófilos (causada tanto por infecciones repetidas, factores dietarios y/o la activación de la autoinmunidad). Los fagocitos liberan especies reactivas del oxígeno y nitrógeno causando daño en el DNA, injuria y muerte celular, que disparan la regeneración de las células epiteliales. La manifestación morfológica de la injuria celular es la atrofia prostática focal. La represión de las proteínas p27, NKX3.1 y PTEN en las células luminales estimula la progresión del ciclo celular. Los genes de respuesta a estrés como la GSTP1, GSTA1 y COX2 están inducidos. **B)** El subsiguiente silenciamiento de GSTP1 a través de la metilación de su promotor en subgrupos de células facilita más aún el acortamiento de los telómeros. **C)** Las células que contienen los alelos GSTP1 metilados y telómeros acortados tienen telómeros disfuncionales y por ende son más factibles de pasar por alto los puntos de chequeo de la senescencia. Esto favorece la inestabilidad genómica y la acumulación consecuyente de los cambios genéticos. **D)** La continua proliferación de las células luminales que son genéticamente inestables, como los rearrreglos genéticos que llevan a la fusión de genes como TMPRSS2-ETS, resulta en la progresión de carcinomas invasivos y en la aparición de PIN.

### I.III HEMO OXIGENESA 1 (HO-1)

#### I.III.1 GENERALIDADES

La hemo oxigenasa (HO) (EC 1.14.99.3), originalmente descrita como una proteína de membrana microsomal, cataliza el primer paso limitante en la degradación oxidativa del

hemo (Fig. 11) para producir monóxido de carbono (CO), biliverdina IX $\alpha$ , la cual es reducida rápidamente a bilirrubina por la biliverdina reductasa, y hierro ferroso (Tenhunen et al., 1969). Hasta el momento se conocen tres isoformas de esta enzima HO-1, HO-2 y HO-3 derivadas de diferentes genes (McCoubrey et al., 1997; Ryter et al., 2002). Todos los productos de la reacción enzimática de HO ejercen efectos pleiotrópicos incluyendo numerosas respuestas citoprotectoras (Takahashi et al., 2007). La bilirrubina y la biliverdina son los *scavengers* endógenos más potentes de las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Stocker et al., 1987). El CO ejerce efectos anti-apoptóticos y anti-inflamatorios a través de la guanilato ciclasa. Suprime la producción de TNF $\alpha$ , de IL-1 $\beta$  y de la quimioquina CCL4 (proteína 1 $\beta$  inflamatoria de macrófago) y a su vez activa la síntesis de la interleuquina anti-inflamatoria IL-10 (Otterbein et al., 2000). Por otra parte, el hierro a pesar de su participación en la reacción de Fenton que lleva a la formación de radicales hidroxilos altamente reactivos, también activa la ATPasa-Fe, un transportador que remueve el hierro intracelular e induce la expresión de las cadenas pesadas de la ferritina que secuestra al hierro libre, ejerciendo roles citoprotectores específicos (Crichton et al., 2002).

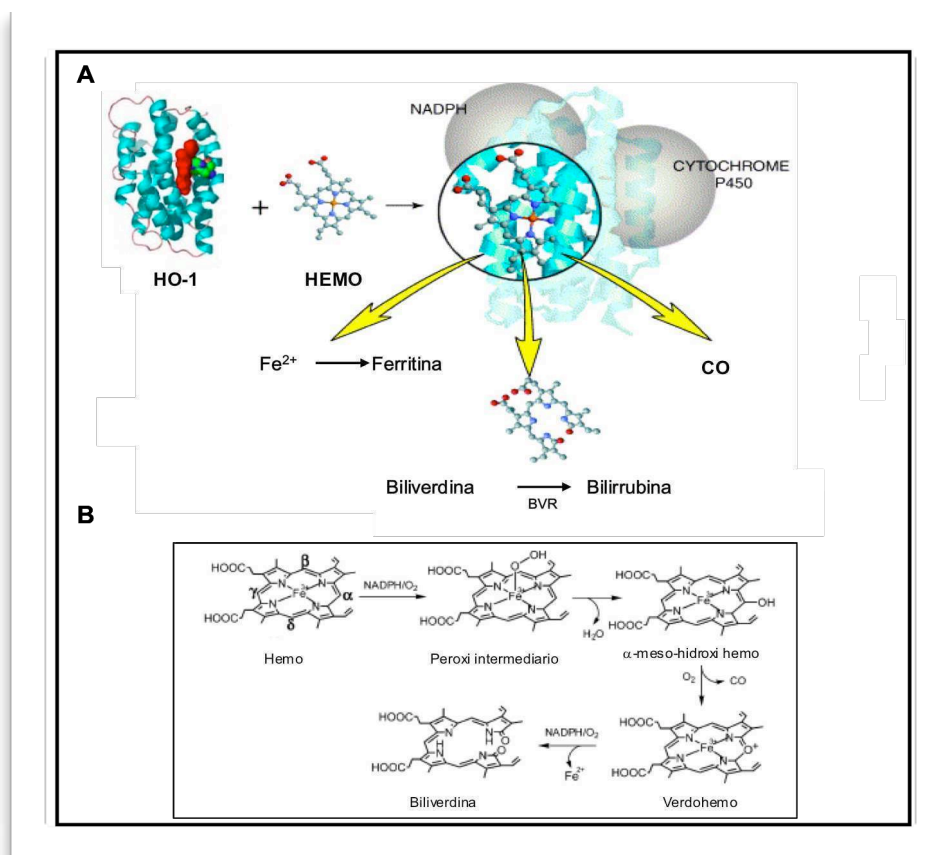


FIGURA 11. Hemo oxigenasa 1: Degradación catalítica del grupo hemo.

Los productos de la reacción enzimática catalizada por HO-1 son el hierro libre, la biliverdina y el CO adaptado de Otterbein et al., 2003. B) Ciclo catalítico de la hemo oxigenasa. El paso clave es la hidroxilación inicial para dar el  $\alpha$ -meso-hidroxiemo. Este paso requiere dos electrones del NADPH, vía NADPH-citocromo P450 reductasa (adaptado de Poulos et al., 2005).

La HO-1 se ha conservado evolutivamente y se ha detectado en bacterias, plantas, hongos y animales, confirmando la importancia de esta isoforma para el funcionamiento apropiado de los diferentes organismos (Loboda et al., 2008).

En la actualidad el efecto protector de HO-1, ejercido por sus productos y por la proteína misma, es ampliamente aceptado (Lin et al., 2007b). Esta isoforma se induce en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo al grupo hemo (Maines, 1999). La isoforma HO-2 es constitutiva y está presente en altas concentraciones en el cerebro y en los testículos. La isoforma HO-3 es estructuralmente similar a la HO-2, pero se diferencia al tener una actividad catalítica muy baja (McCoubrey et al., 1997)

### **I.III.2 LOCALIZACION CELULAR**

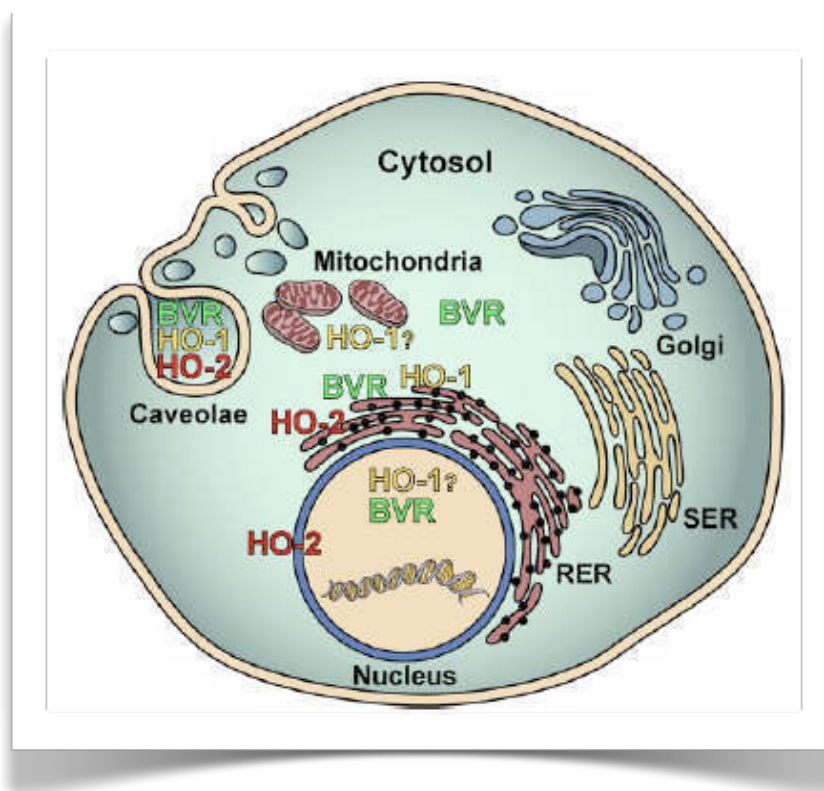
Históricamente HO-1 se caracterizó por su localización en el retículo endoplasmático liso (REL) como una proteína integral de membrana (Tenhunen et al., 1968, 1969). Sin embargo, trabajos de los últimos años han detectado su redistribución en varias fracciones celulares luego de la inducción por estrés (Fig. 12) (Kim et al., 2004).

Se observó alta actividad de HO-1 en fracciones microsomales que contenían membranas celulares, y esta proteína pudo aislarse en asociación con NADPH-citocromo P450 reductasa y NADPH-biliverdina reductasa (Yoshinaga et al., 1982). Contiene un dominio carboxi terminal hidrofóbico, el cual le permite anclarse en las membranas celulares (Keyse and Tyrrell, 1989). En células endoteliales quiescentes de la microvasculatura cerebral de cerdos recién nacidos se observó, mediante inmunofluorescencia, que HO-1 se distribuía en la envoltura nuclear y en la zona perinuclear del citoplasma, pero no se observó tinción en el núcleo (Parfenova et al., 2001). Se reportó localización nuclear de HO-1 en cultivos primarios de células astrogiales de rata, y se sugirió que su translocación estaría asociada a procesos involucrados en el desarrollo del cerebro y en enfermedades neurodegenerativas, indicando que esta proteína podría modular los caminos de transducción de señales y funcionar como un mecanismo importante para la regulación de factores de transcripción

nucleares (Li Volti et al., 2004). En células endoteliales arteriales de pulmón de rata (PAEC) ciertos inductores de HO-1 (hemina o LPS) o su sobre-expresión provocada por hipoxia alteró su patrón de distribución celular. Se midió actividad de HO-1 en membrana plasmática, en citosol y en caveolas aisladas y la expresión de HO-1 aumentó en la fracción de membrana plasmática resistente a detergentes que contenía caveolina-1. Además, se detectó actividad de biliverdina reductasa endógena en las caveolas, apoyando las evidencias que demuestran que ambas enzimas se encuentran en el mismo compartimiento celular (Kim et al., 2004). Slebos y colaboradores encontraron acumulación de la proteína activa en la mitocondria de células epiteliales de pulmón, preservando la producción de ATP mitocondrial y previniendo la muerte celular en respuesta a formas discretas de estrés (Slebos et al., 2007). Converso y colaboradores observaron localización mitocondrial de HO-1 en hígado de rata, proponiendo que HO-1 tendría un rol biológico importante en regular la tasa de proteínas hémicas mitocondriales y en la protección contra condiciones oxidantes (Converso et al., 2006). En células de pulmón de fetos de rata (RFL-6), transfectadas con la secuencia completa del cDNA de HO-1 y expuestas a hiperoxia, se observó localización perinuclear seguida por migración hacia el núcleo (Suttner et al., 1999). Este fenómeno no se había reportado previamente y se propuso que HO-1 podría servir como una chaperona o un mensajero nuclear. Además, un hecho interesante para resaltar es que cuando el nivel de la actividad de HO-1 era bajo, la proteína estaba localizada en el núcleo pero aún había aumento de la supervivencia celular bajo hiperoxia. Sin embargo, no es claro si la proteína HO-1 en sí misma puede tener un rol protector en el núcleo (Suttner et al., 1999). Giordano y colaboradores detectaron un aumento en el número de núcleos con tinción positiva para HO-1 en tejido adiposo marrón de ratas expuestas a estrés térmico, y señalaron que los productos secundarios de HO-1 fueron capaces de modular genes involucrados en la adipogénesis (Giordano et al., 2000). En el cerebro de rata se detectó inmunotinción positiva de HO-1 y HO-2 en la zona perinuclear. El nivel de la expresión de HO-1 fue similar entre cerebros de ratas viejas y cerebros humanos con enfermedades neurodegenerativas (Ewing y Maines, 2006). El tratamiento con drogas neuroprotectoras aumentó notoria y selectivamente la expresión de HO-1 en el núcleo de las células de la septa triangular en animales jóvenes (Ewing y Maines, 2006; Wang et al., 2003). La función de HO-1 en el núcleo podría estar relacionada con su fosforilación y con

la transcripción de genes. Sin embargo, hasta la fecha, el conocimiento de la compartimentalización intracelular de HO-1 es limitado y su función nuclear debe ser dilucidada ya que parece ser tejido dependiente.

Evidencias aportadas recientemente documentan la localización nuclear de una forma trunca de la proteína HO-1 como consecuencia del clivaje del extremo C-terminal unido a membrana en células NIH3T3 (Lin et al., 2008b). Extractos nucleares enriquecidos con esta forma de la proteína HO-1 estaban deprivados de la actividad enzimática normal. Esto sugiere un rol diferencial para la proteína HO-1 en las fracciones nucleares (Lin et al., 2007b). Simultáneamente a estos hallazgos, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente la localización nuclear de HO-1 en muestras humanas de carcinoma primario de próstata e hiperplasias benignas por estudios de inmunohistoquímica. Sin embargo, por técnicas de Western Blot y utilizando líneas celulares de PCa, demostramos que la sobreexpresión de HO-1 conduce a su translocación nuclear con conservación de su peso molecular (Sacca et al., 2007).



(Ryter et al., 2006)

**FIGURA 12. Localización subcelular de las enzimas metabólicas del hemo.**

El esquema muestra la posible copartimentalización subcelular de las principales enzimas en la degradación del hemo. La localización de HO-1 en el retículo endoplásmico (RE), y en la caveola. BVR: biliverdina reductasa, RER: retículo endoplásmico rugoso, SER: retículo endoplásmico liso.

### I.III.3 REGULACION DE LA EXPRESION

Bajo condiciones basales, HO-1 (identificada como la proteína de shock térmico 32, HSP32) se expresa predominantemente en tejidos con alto contenido de células retículo endoteliales como el bazo. Su expresión es estimulada por metales pesados, estrés, radiación UV, agentes químicos, hipotermia, citoquinas, hormonas y ciertos agentes terapéuticos como drogas anti-inflamatorias no esteroides (Ryter et al., 2006).

La inducción de HO-1 por varios estresores está regulada principalmente a nivel transcripcional. Múltiples mecanismos y varias vías de señalización están involucradas en la activación transcripcional del gen humano de HO-1 (*hmx1*) incluyendo las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Ryter et al., 2006), la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina, el fosfoinositol y la proteína quinasa A (PKA) (Kinobe et al., 2008; Ryter et al., 2006).

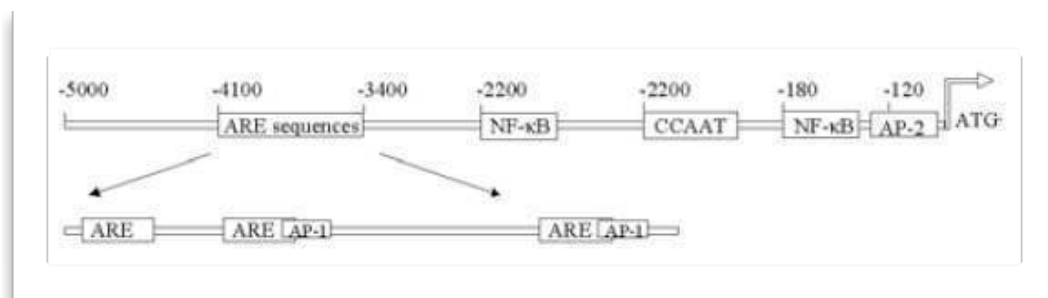
Entre los factores de transcripción responsables de la activación de HO-1 encontramos miembros de las familias de los factores de shock térmico (HSF), de NF- $\kappa$ B, del factor nuclear eritroide 2 (NF-E2) y de AP-1.

El elemento mejor identificado en el promotor del gen *hmx1*, es una secuencia de diez pares de bases denominado elemento de respuesta a estrés (SRE) que está presente en múltiples copias dentro de dos regiones *enhancer*, DE1 y DE2 (Alam, 1994; Alam et al., 1995; Alam et al., 2000) y que media la activación de la transcripción en respuesta a casi todos los inductores hasta ahora estudiados. Los SRE son blancos de múltiples proteínas dimericas generadas por homodimerización intrafamiliar o heterodimerización intra e interfamiliar de miembros individuales de Jun, Fos, CREB, ATF, MAF y Cap 'N' collar-basic leucin zipper. (Alam and Cook, 2003). Estos SRE, también conforman las secuencias de los elementos de reconocimiento a Maf (MAREs). Heterodímeros de factores cierre de leucina básicos incluyendo NF-E2, factores relacionados a NF-E2 (Nrf1, Nrf2 y Nrf3) y proteínas pequeñas Maf (del inglés muscle aponeurotic fibrosarcoma), inducen HO-1 a través de estos MAREs (Alam et al., 1999). Los MAREs son también reconocidos por la familia de proteínas AP-1 (Alam y Cook, 2003). El SRE es funcional y estructuralmente similar a ARE (elementos de respuesta anti-oxidante, cuya secuencia es 5'RTGACnnnGC-3' (R=G o C)) y a MARE y los tres elementos se utilizan indistintamente

cuando se trata de la regulación de HO-1 (Alam y Cook, 2007). Dichos elementos juegan un rol crucial en la transcripción de genes citoprotectores y detoxificantes (Chen y Kunsch, 2004).

La region 5' flanqueante del gen *hmx1* contiene sitios de unión putativos para factores de transcripción que regulan la expresión de genes pro-inflamatorios, entre ellos NF- $\kappa$ B, AP-1/2 y sitios para proteínas de unión al *enhancer* CCAAT (Fig. 13) (Rushworth y O'Connell, 2004).

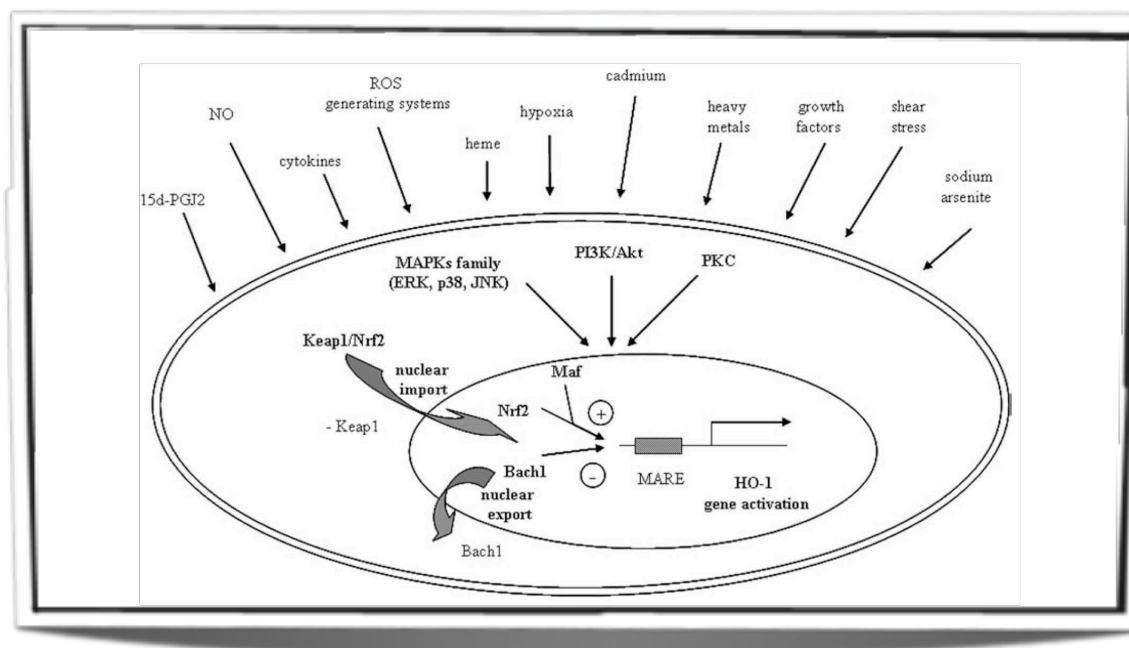
El principal factor de transcripción que regula la expresión de genes dependiente de ARE es Nrf2. En condiciones basales Nrf2 reside en el citosol unido al inhibidor Keap1 (del inglés Kelch-like ECH-associated protein 1. En respuesta a anti-oxidantes y otros estímulos, Nrf2 es liberado de Keap1, se transloca al núcleo donde se dimeriza con miembros de la familia de las pequeñas proteínas Maf (Fig. 14).



(Rushworth y O'Connell, 2004)

**FIGURA 13.** Representación esquemática de la región 5'flanqueante del gen humano *hmx1*



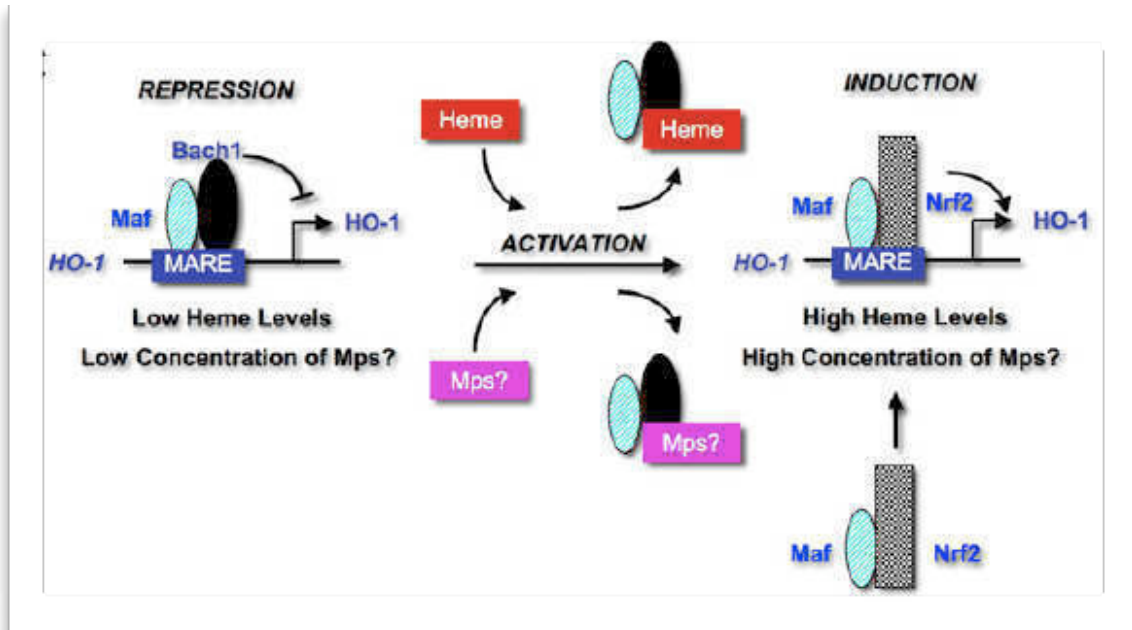


(Loboda et al., 2008)

FIGURA 14. Inducción de HO-1 por Nrf2.

Varios agentes pueden influenciar la transcripción de HO-1 vía la activación de diferentes quinasas y del factor de transcripción Nrf2. Keap1 secuestra a Nrf2 en el citoplasma, sin embargo luego de la estimulación con compuestos modificadores de tioles, los grupos SH de las cisteínas de Keap1 son oxidados. Nrf2 sufre translocación nuclear. Al mismo tiempo ocurre la exportación nuclear del represor transcripcional Bach1. En algunas células humanas (por ejemplo endoteliales), la hipoxia inhibe la expresión de HO-1 por la inducción de Bach1, que al asociarse a los sitios MARE, bloquea la transcripción de HO-1.

Bach1, una proteína cierre de leucina, se ha identificado como un represor del gen *hmox 1* (Alam et al., 2004) el cual se une a regiones MARE del promotor de HO-1 y heterodimeriza con proteínas Maf en ausencia de hemo. En presencia de hemo u otras metaloporfirinas (Mps), Bach 1 se disocia de sus heterodímeros y es exportado del núcleo por un mecanismo dependiente del translocador nuclear Crm1 (Suzuki et al., 2004). El desplazamiento de Bach1 conduce al reclutamiento de Nrf2 (Reichard et al., 2007). El hemo estabiliza a la proteína Nrf2 y conduce a la acumulación de los heterodímeros de Nrf2 y Maf que se unen a MARE activando así la transcripción (Fig 15) (Abate et al., 2007). En conclusión el hemo no solamente es un sustrato de la enzima HO-1, sino también un inductor natural de su expresión.



(Abate et al., 2007)

**FIGURA 15. Mecanismo de acción propuesto para las metaloporfirinas (Mps) y/o hemo sobre la activación de la transcripción de HO-1.**

La actividad de Bach 1 es también regulada por estaño metaloporfirinas (entre ellas estaño mesoporfirina) e hipoxia (Fig. 15) (Abate et al., 2007). El promotor de HO-1 y los *enhancers* están situados en un ambiente de la cromatina permisivo donde la histona H3 se encuentra hiperacetilada independientemente de la actividad del gen (Sun et al., 2004). Por lo tanto bajo condiciones basales, la estructura de la cromatina de HO-1 está en un estado de pre-activación, pero la transcripción está reprimida por Bach1 (Kassovska-Bratinova et al., 2009; Sun et al., 2004; Sun et al., 2002). El efecto de la hipoxia sobre la expresión de HO-1 es también dependiente de la especie y del tipo celular (Loboda et al., 2008). Bach 1 actúa como un regulador inducible por hipoxia que a su vez reprime, como mencionamos anteriormente, la transcripción de HO-1. Aunque secuencias tipo elementos de respuesta a hipoxia (HRE) se encontraron en las regiones promotoras de *hmox* (Deramautd et al., 1998), aún no es claro si ellas corresponden a HRE típicos, por ejemplo secuencias TACGTG, presente en elementos regulatorios de genes fuertemente inducidos en condiciones hipóxicas como VEGF y eritropoyetina (Loboda et al., 2008). Sin embargo, el efecto de la hipoxia sobre la expresión de VEGF puede ser inhibitorio en muchos tipos celulares humanos

investigados en contraste con otras especies animales donde la hipoxia induce la expresión de este gen (Loboda et al., 2006).

Estudios recientes de Lin y colaboradores propusieron que la misma proteína HO-1 podría regular su propia expresión de una forma feedback positiva, importante para la inducción del gen en respuesta al estrés oxidativo (Lin et al., 2008b). En células NIHT3T la transfección con cDNA HO-1 o la administración de la proteína pura resultó en la activación del promotor de HO-1 río arriba del gen reportero de la luciferasa, aumentando los niveles de expresión del mensajero y de la proteína HO-1. Estos efectos eran independientes de su actividad, ya que una mutante enzimáticamente inactiva producía la misma inducción del promotor y la incubación con estaño protoporfirina (SnPP) no afectaba la activación del promotor. Más aún análisis de delección demostraron que los *enhancers* DE1 y DE2 del promotor de HO-1 se requerían para esta autorregulación. Estos experimentos documentaron un ciclo de autorregulación de HO-1 en condiciones de estrés oxidativo y sugieren que la proteína cumple un rol en el proceso de su propia inducción. Los autores proponen que este mecanismo puede ser útil para mantener la expresión de HO-1 cuando el sustrato es limitante o puede servir para inducir otros genes a fin de promover la citoprotección y modular la proliferación celular (Lin et al., 2008b).

#### **I.III.4 ROL FISIOLÓGICO**

Clásicamente se ha considerado que la isoforma HO-1 trabaja como un sistema efectivo contrabalanceando el daño oxidativo (Maines, 1997; Otterbein *et al*, 2003). Sin embargo, también tiene una importante función regulatoria en el metabolismo del hierro (Poss y Tonegawa, 1997a; Yachie et al., 1999), el cual cataliza la formación del radical HO• dañando a las macromoléculas biológicas (McCord, 1998).

La diversidad de los inductores de HO-1 apoya la hipótesis de que HO-1 puede jugar un rol o una función vital en el mantenimiento de la homeostasis celular (Wegiel et al., 2008).

A pesar de que en algunos casos se ha demostrado que las metaloporfirinas inhibidoras de la actividad de HO-1, pueden proteger a las células contra el daño (Wagner et al., 2000), el rol antioxidante de HO-1 se basa en observaciones experimentales cruciales: 1) la expresión del gen es muy sensible a la inducción por estrés oxidativo en varios tejidos de mamíferos

(Maines, 1997), 2) la inducción de la proteína o la transfección con el gen HO-1 protege a los tejidos contra el daño oxidativo (Abraham et al., 2000) y 3) ratones *knock-out* presentan una muy baja defensa al estrés oxidativo (Poss y Tonegawa, 1997a). Además se reportó, que la bilirrubina derivada de la acción de la HO-1 reducía la apoptosis mediada por peroxinitrito en células endoteliales (Clark et al., 2000).

La inducción de HO-1 es de considerable importancia en la iniciación de los mecanismos de protección celular luego de la exposición a hiperoxia (Dennery et al., 1996; Dennery et al., 1997) y a varios estímulos de estrés celular (Vogt et al., 1995).

El hemo, es una molécula esencial para varias funciones biológicas y ejerce múltiples acciones inmuno-regulatorias. Estimula la proliferación y diferenciación celular y promueve la angiogénesis (Deramaudt et al., 1998), un fenómeno estrechamente relacionado a la reacción inflamatoria. Durante la inflamación crónica HO-1 cumple dos roles, en primer lugar ejerce una acción anti-inflamatoria inhibiendo el reclutamiento de leucocitos y en segundo lugar promueve la angiogénesis no inflamatoria dirigida por VEGF para facilitar la reparación tisular (Bussolati et al., 2004). La inducción casi universal de la expresión de HO-1 por pro-oxidantes y la observación de que la biliverdina y la bilirrubina son potentes anti-oxidantes, sugiere que el aumento de la actividad de HO-1 representa una respuesta celular adaptativa y protectora frente al estrés celular. La importancia biológica de la inducibilidad de HO-1 se ha demostrado por las anormalidades fisiológicas, incluyendo retardo del crecimiento, anemia, leucocitosis y deposición de hierro tisular en ratones *knock-out* para HO-1 (Poss y Tonegawa, 1997a; Rushworth y O'Connell, 2004) y en un único caso humano de deficiencia de HO-1 (Yachie et al., 1999). Ratones HO1<sup>-/-</sup> presentan importantes diferencias en el perfil inmunológico respecto a los animales HO1<sup>+/+</sup> y una tendencia pro-inflamatoria asociada a la deficiencia de HO-1 (Kapturczak et al., 2004).

Mediante técnicas de microarray de cDNA se han identificado varios genes involucrados en la regulación de la progresión del ciclo celular que responden a la sobre-expresión de HO-1 humana (Abraham et al., 2003). Los productos de la reacción de HO-1 podrían ser valiosos agentes terapéuticos y se ha especulado sobre las funciones de HO-1 proponiéndola como un posible “embudo terapéutico”, mediador de los efectos beneficiosos atribuidos a otras moléculas, tales como la IL-10, la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y las

prostaglandinas (Otterbein et al., 2003).

En cuanto al rol de la HO-1 en el proceso tumoral, existen opiniones controvertidas: podría contrarrestar el daño peroxidativo desencadenando la apoptosis de las células neoplásicas (Caballero et al., 2004; Sacca et al., 2004; Wagener et al., 2003b) o podría protegerlas jugando un rol antiapoptótico, conduciendo a la proliferación descontrolada (Inguaggiato et al., 2001; Jozkowicz et al., 2007). Es conocido que en estos procesos participan las cascadas de señales de las MAPKs (JNK, p38 y ERK1/2). A pesar de la extensiva caracterización del camino de señales de las MAPKs activado por estrés y la inducción generalizada del HO-1 como respuesta a este mismo proceso, poco se sabe sobre la interrelación entre estas dos vías de señalización y el proceso tumoral.

### **I.III.5 HO-1 Y PROLIFERACION**

HO-1 ejerce efectos diferenciales sobre la proliferación celular dependientes del tipo celular y se postula que dichos efectos están mediados por CO. Este gas inhibe la proliferación de las células de músculo liso vascular (VSMC) y la de los linfocitos T efectores mientras que promueve la capacidad proliferativa de las células endoteliales y las células T<sub>reg</sub> (Pae et al., 2004; Peyton et al., 2002; Song et al., 2002; Song et al., 2004).

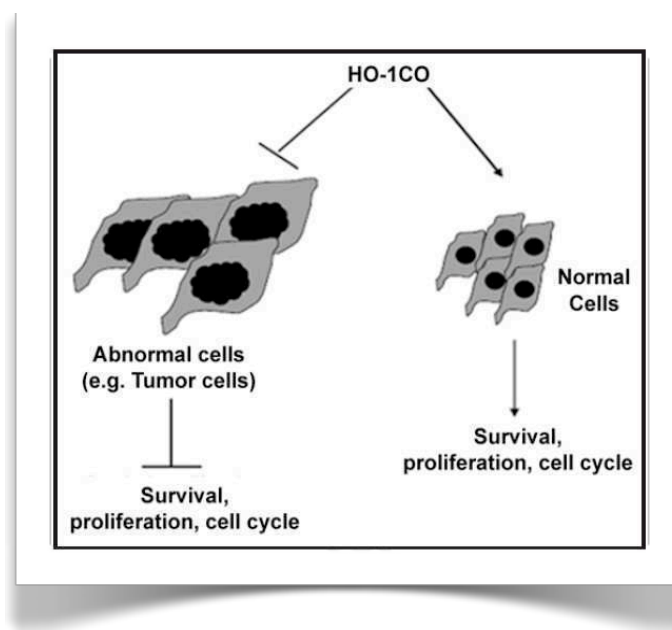
Si bien se ha demostrado que el CO inhibe la progresión del ciclo celular en células que proliferan de manera anormal como las células T efectoras en alografos, Li Volti y colaboradores comprobaron que la molécula liberadora de CO, CORM-1, es un potente inductor de la angiogénesis (Li Volti et al., 2005). En VSMC, CO ejerce sus efectos antiproliferativos a través de p38 y MAPK mientras que en células T, el CO actúa vía inhibición de la activación de ERK (Wegiel et al., 2008). Los mecanismos que subyacen a estos efectos diferenciales son desconocidos pero pueden involucrar la interacción con otros tipos celulares, tales como la inducción de TGFβ en macrófagos, factor de crecimiento necesario para disparar la proliferación de células T<sub>reg</sub> (Chin et al., 2007).

El rol de HO-1 en cáncer, una enfermedad claramente asociada a la proliferación descontrolada, es aún más enigmático. Por ejemplo, en cáncer colorrectal se comprobó que la proporción de la invasión a nódulo linfático fue más baja en muestras de pacientes con expresión positiva para HO-1 y estos pacientes se caracterizaron por una tasa de sobrevida

mayor (Becker et al., 2007). En contraste, varios estudios demostraron que la depleción de HO-1 o la inhibición de su actividad puede bloquear la progresión del cáncer (Fang et al., 2003; Hirai et al., 2007; Was et al., 2006).

Trabajos recientes han sugerido que el CO bloquea la proliferación celular en líneas tumorales de cáncer de próstata y este efecto es dependiente de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb) durante la entrada al ciclo celular inducida por suero (Wegiel et al., 2008).

Estos datos sugieren que el efecto de HO-1 y CO en la carcinogénesis es dependiente del tipo de cáncer y del estado genético de las células anormales. Mediante sincronización del arresto del ciclo celular por CO y luego liberación para permitir la entrada al ciclo, hace a las células más sensibles a la quimioterapia. Considerando la fuerte especificidad de HO-1/CO en la regulación del ciclo celular/proliferación en las células bajo ciertas condiciones, por ejemplo el arresto del ciclo celular de las VSMC hiperproliferativas en la neointima pero no sobre las VSMC normales dentro del vaso, se propuso que HO-1/CO podría contribuir a la capacidad de las células para discriminar entre células cancerosas y saludables (Fig. 16).



(Wegiel et al., 2008)

**FIGURA 16.** Representación esquemática del eje HO-1/CO

El eje HO-1/CO actúa en la respuesta proliferativa para el beneficio del tipo celular involucrado de manera de reestablecer la homeostasis. El CO bloquea el crecimiento celular tumoral hiperproliferativo y promueve la muerte celular mientras que en simultáneo promueve la supervivencia celular normal (no cancerosa) y la reparación.

### I.III.6 HO-1 Y CICLO CELULAR

La proliferación celular está controlada primariamente por la regulación del ciclo celular, que consiste en cuatro fases:  $G_0/G_1$ , S,  $G_2$ , y M (Hunter, 1994). Este orden temporal estrictamente controlado es impuesto por las ciclinas y las quinasas secuenciales llamadas quinasas dependientes de ciclinas (cdk) (King et al., 1994). La actividad de los complejos ciclinas/cdk es regulado negativamente por un número de inhibidores de cdk, que pueden ser agrupados en dos familias distintivas. El primer grupo comprende a los miembros de la familia INK4 que actúan como inhibidores específicos de cdk-4 y cdk-6 e inducen  $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4b}$ ,  $p18^{INK4c}$  y  $p19^{INK4d}$  (Harper et al., 1993; Hu et al., 1999; Macleod et al., 1995). El segundo grupo comprende a los miembros de la familia  $p21^{WAF1}/p27^{KIP1}$  que bloquean la progresión del ciclo celular inhibiendo a los complejos cdk/ ciclinas D, A y E (Lee et al., 2000). Las señales extracelulares que inhiben el crecimiento o lo promueven son integradas en la fase  $G_1$ .

Hasta la fecha se han publicado resultados contradictorios sobre el rol de HO-1 en la regulación del ciclo celular. Algunos trabajos demostraron que la sobre-expresión de HO-1 induce p21 en SMC (Duckers et al., 2001) y en células epiteliales de riñón (Inguaggiato et al., 2001). En astrogliá, en músculo liso vascular, en epitelio tubular proximal y en carcinoma de mama, la activación de HO-1 resultó en arresto del crecimiento celular y este efecto se asoció a la inducción de p21. Estos eventos provocaron una disminución de la proliferación y confirieron marcada resistencia a la apoptosis contribuyendo de esta manera a un patrón alterado del crecimiento y la muerte celular (Gonzalez-Michaca et al., 2004; Was et al., 2006). Este mismo efecto se observó en células humanas de tumores gástricos. Los autores sugirieron que p21 ejercía protección contra el daño oxidativo y promovía la supervivencia de las células. El tratamiento con hemina provocó un marcado incremento en los niveles de esta proteína, aumentando el porcentaje de células en la fase  $G_0/G_1$  a expensas de la disminución en S/ $G_2$ /M. Esta distribución no fue afectada por el estado de p53 (Liu et al., 2004).

La hipertensión es una condición patológica multifactorial y es considerada el factor de riesgo prevalente para muchas enfermedades cardiovasculares incluyendo el infarto de miocardio, la falla cardíaca, y las enfermedades de las arterias coronarias y periféricas. Entre

las causas etiológicamente conocidas para la hipertensión se encuentra la proliferación anormal de las VSMC (Intengan y Schiffrin, 2001). Se ha comprobado que HO-1 confiere protección vascular contra la proliferación anormal (Durante, 2003). La sobre-expresión de *hmox1* o la administración exógena de un inductor de HO-1 reduce la proliferación excesiva de las VSMC (Juan et al., 2001) y tiene efectos terapéuticos beneficiosos en el estrechamiento de la vasculatura causada por la proliferación de las VSMC (Stocker y Perrella, 2006). Por lo tanto, terapias génicas que apunten a HO-1 como blanco o intervenciones farmacológicas utilizando inductores de esta proteína pueden ofrecer una modalidad terapéuticamente prometedora en el tratamiento de la hipertensión. Las VSMC son normalmente quiescentes, proliferando a un índice muy bajo (Gordon et al., 1990). Luego de una injuria vascular, las VSMC son estimuladas para dividirse en respuesta a mitógenos, con la subsiguiente salida de la fase G<sub>1</sub> y la entrada a la fase S. El complejo ciclina D1-cdk4 y ciclina E-cdk2 actúan predominantemente en secuencia durante la transición G<sub>1</sub>/S y son requeridos para la progresión del ciclo celular a través de este período (Sherr, 1996). La expresión de p21 en VSMC es crucial en la finalización de la lesión vascular (Yang et al., 1996). Okamoto y colaboradores demostraron que la Tricostatina A (TSA) no pudo inhibir la proliferación en las VSMC de ratones *knock-out* para p21 (Okamoto et al., 2006). Consistente con estos resultados otros autores demostraron que p21 se encontraba altamente expresada en VSMC de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) comparadas con las ratas Wistar-Kyoto normotensas (WKY) (Jeon et al., 2009). Una asociación funcional entre HO-1 y p21 en la regulación del crecimiento es apoyada por el descubrimiento de que la acción antiproliferativa de HO-1 está reducida significativamente en VSMC obtenidas de ratones deficientes para p21<sup>-/-</sup> (Duckers et al., 2001). Más aún, el nivel de expresión de p21 por inducción farmacológica de HO-1 fue mayor en VSMC de los SHR que de los WKY. Estos datos sugieren que la prevención de la progresión del ciclo celular de la fase G<sub>1</sub> a la S fue la responsable de la inhibición de la proliferación de las VSMC por la inducción de HO-1 (Jeon et al., 2009). El efecto antiproliferativo sobre las VSMC mediado por la inducción de la HO-1 fue a través del arresto del ciclo celular, inhibiendo la expresión de ciclina D y activando la expresión de p21. Con lo cual HO-1 podría ser un blanco terapéutico para inhibir la proliferación celular de las VSMC en enfermedades proliferativas.



En resumen, la regulación del ciclo celular por inducción de la expresión de HO-1 es dependiente del tipo celular.

### **I.III.7 HO-1 Y APOPTOSIS**

En la mayoría de los modelos estudiados hasta la fecha, HO-1 y su producto CO actúan como moléculas anti-apoptóticas. También se demostró que el CO promueve la supervivencia de los macrófagos expuestos a anoxia-reoxigenación (Chin et al., 2007) y que este efecto se pierde cuando el HIF-1 $\alpha$  se silencia. El mecanismo de inducción de HIF-1 $\alpha$  es a través de la producción de ROS mitocondriales. Este factor también se encuentra directamente involucrado en la regulación de la supervivencia de los neutrófilos en hipoxia (Walmsley et al., 2005). Los efectos antiapoptóticos del CO en la apoptosis inducida por isquemia/reperfusión en las células endoteliales de la arteria pulmonar están mediados por modulación de p38 MAPK, pero también por supresión de la expresión de Fas/FasL, la activación de las caspasas 3, 8 y 9, la liberación de citocromo C mitocondrial y el clivaje de PARP (poli ADP-ribosa polimerasa) (Otterbein et al., 2003; Zhang et al., 2003b). Se comprobó que la sobreexpresión de HO-1 protege a las células endoteliales de la apoptosis (Brouard et al., 2000). En dichas células, un aumento de la actividad de HO-1 con la consecuente generación de CO es capaz de atenuar los efectos pro-apoptóticos causados por agentes estresores (Kushida et al., 2002). Por el contrario, el hecho de que CO aumente la activación de la muerte celular en las células T disparada por Fas/FasL o TRAIL, probablemente está relacionado con la naturaleza cancerígena de las células Jurkat usadas en estos experimentos (Song et al., 2004). Así HO-1 se ha asociado a las respuestas apoptóticas observadas en la tumorigénesis. Se sugirió que HO-1 puede promover la resistencia tumoral a las condiciones de stress en células de cáncer de colon (Busserolles et al., 2006). El silenciamiento de HO-1 por técnicas de *knock-down* rindió tumores pancreáticos más sensibles a la radioquimioterapia (Berberat et al., 2005).

Experimentos realizados utilizando un amplio espectro de líneas celulares endoteliales han resaltado la participación de NF- $\kappa$ B en el efecto anti-apoptótico de CO (Brouard et al., 2002). La inhibición de NF- $\kappa$ B bloqueó la influencia protectora de HO-1/CO. Pero este efecto se manifestó solamente cuando la apoptosis se indujo con TNF $\alpha$ . En el caso de

deprivación de suero CO fue aún capaz de proteger a las células endoteliales de la apoptosis aunque NF- $\kappa$ B se encontraba inactivo (Brouard et al., 2002), sugiriendo que diferentes caminos de señalización están involucrados en los modelos de apoptosis testados hasta la fecha (Loboda et al., 2008).

El efecto anti-apoptótico de CO involucra la regulación de la expresión de proteínas anti y pro-apoptóticas, detectándose la inducción de las proteínas anti-apoptóticas c-IAP2 (Brouard et al., 2002), Bcl-xl/Bag-1 (Ke et al., 2002) o Bcl-2 y la disminución de la proteína pro-apoptótica Bid (Zhang et al., 2003a). Modelos *in vivo* demostraron que los efectos de CO son dependientes de las dosis utilizadas (Zhang et al., 2003a).

La mayoría de los estudios *in vivo* e *in vitro*, han reportado un efecto protector de CO sobre el endotelio vascular. Los mecanismos involucrados están bien caracterizados y se ha identificado a p38 MAPK como el actor principal en este proceso, sin embargo el rol de las isoformas específicas de esta quinasa podría diferir en los distintos lechos vasculares. Así se ha sugerido realizar una cuidadosa evaluación del efecto terapéutico de este gas ya que existen evidencias sobre los efectos tóxicos potenciales del mismo en el endotelio (Loboda et al., 2008).

### **I.III.8 HO-1/CO “CONDICIONANDO” LA APOPTOSIS Y PROLIFERACION CELULAR**

La importancia de HO-1 en la protección celular es enfatizada no solamente por el vasto número de inductores de este gen sino también por el hecho de que HO-1 y los productos de degradación del hemo exhiben un *cross-talk* y cooperan con múltiples caminos de señalización probablemente dirigidos por hemo proteínas específicas y por la generación de ROS. Sin embargo, no puede dejar de considerarse que el CO puede unirse también a muchos componentes celulares, con baja afinidad pero en cantidad suficiente, para provocar alteraciones en el funcionamiento celular. La localización crítica de HO-1 en RE, mitocondria, caveola o núcleo junto con la biliverdina reductasa y/o probablemente otras enzimas formando un “hemosoma” enfatiza aún más la naturaleza pleiotrópica de HO. Incluso el estado de activación sería crítico en la respuesta tisular y del órgano a los niveles elevados de HO-1. Debemos destacar que el principal camino para sensar el oxígeno

involucra a los ROS como segundos mensajeros (Acker et al., 2006). La generación de ROS particularmente  $H_2O_2$  es requerida en parte para estabilizar a la proteína HIF-1 $\alpha$  (Schroedl et al., 2002). HIF-1 $\alpha$  en forma similar a HO-1 juega importantes roles en la regulación de las funciones celulares, incluyendo proliferación, apoptosis, ciclo celular y desencadenamiento del estado inflamatorio general. La proliferación anormal puede ser el resultado de una inflamación crónica. HO-1 y los productos de degradación del hemo se demostró que tienen un fuerte potencial anti-inflamatorio en diversos modelos de enfermedades inflamatorias crónicas y agudas. HO-1 se intercomunica con otros caminos de señalización (MAPK, Akt) y acelera el pre-condicionamiento celular para brindar protección contra el estrés u otros factores. Así, es probable que ambos, HIF-1 $\alpha$  y HO-1 puedan cooperar en la regulación de las respuestas celulares (Pischke et al., 2005). El hallazgo de que CO aumenta la expresión de HIF-1 $\alpha$  puede sugerir la presencia de un *loop* de retroalimentación positivo para regular la expresión de HO-1 durante la respuesta a estrés. HIF-1 $\alpha$  es un potente regulador de la expresión de HO-1 y este *loop* regulatorio va a dictaminar la respuesta celular última (Wegiel et al., 2008).

En conclusión, hasta la fecha hay múltiples reportes en continuo aumento sobre el rol de HO-1 en las enfermedades proliferativas; sin embargo, su función precisa aún no se ha elucidado. Nosotros argumentamos que la inducción de HO-1 no es solo un artefacto en respuesta al contenido de proteínas hémicas aumentadas, sino más bien una respuesta al comportamiento celular anormal, el cual requiere de las moléculas HO-1 para actuar en los diferentes compartimientos celulares en un intento de restaurar la homeostasis celular.

### **I.III.9 HO-1 Y ANGIOGENESIS**

La angiogénesis, formación de nuevos vasos sanguíneos, es un proceso estrictamente regulado. Existen dos mecanismos para la formación de nuevos vasos: la vasculogénesis (a partir de células progenitoras) y la angiogénesis (a partir de capilares preexistentes). Este último proceso está basado en la migración y en la proliferación de células endoteliales diferenciadas y maduras estimuladas por varios factores incluyendo VEGF (Ferrara et al., 2003).

Existen evidencias contundentes que demuestran que HO-1 regula la angiogénesis y la

vasculogénesis, aunque los reportes son contradictorios (Loboda et al., 2008).

Se ha demostrado que HO-1 ejerce un efecto sobre la síntesis de VEGF en VSMC bajo condiciones de hipoxia y normoxia (Dulak et al., 2002). La inhibición de la actividad de HO-1 por SnPP, previno completamente la generación de VEGF inducida por citoquinas e hipoxia (Dulak et al., 2002).

La inhibición de HO-1 impide la angiogénesis inducida por VEGF y la deficiencia de HO-1 en humanos y ratones resulta en injuria oxidativa severa en las células endoteliales (Bussolati et al., 2004; Bussolati y Mason, 2006; Dulak et al., 2004; Durante, 2003). Deramaudt y colaboradores demostraron que la sobre-expresión de HO-1 en células endoteliales causaba un significativo aumento en la angiogénesis (Deramaudt et al., 1998). Se demostró en la membrana corioalantoide en embriones de pollo que VEGF<sub>165</sub> regula positivamente la expresión de HO-1 y que se requiere de la actividad de HO-1 para que VEGF<sub>165</sub> ejerza sus efectos angiogénicos (Feranandez y Bonkovsky, 2003).

La activación de HO-1, seguido por la generación de CO, conduce a la regulación positiva de la síntesis de VEGF en las células del músculo liso y en la microvasculatura del endotelio (Dulak et al., 2002; Dulak et al., 2004; Jozkowicz et al., 2002). Por lo tanto, la activación de HO-1 induce la síntesis de VEGF mientras que su inhibición impide la angiogénesis mediada por VEGF, generando un *loop* auto-regulatorio entre HO-1 y VEGF (Deramaudt et al., 1998; Jozkowicz et al., 2003).

### **I.III.10 ROL DUAL DE HO-1 EN LA ANGIOGENESIS**

La influencia de HO-1 en la angiogénesis indudablemente depende de las condiciones del microambiente celular. Bussolati y colaboradores demostraron que la angiogénesis inducida por VEGF depende de la actividad de HO-1, mientras que la formación de vasos sanguíneos inducidos por inflamación es atenuada por la sobre-expresión de HO-1 (Bussolati et al., 2004; Bussolati y Mason, 2006). Durante la angiogénesis inducida por LPS, la infiltración de leucocitos es seguida por la formación de vasos y la inducción de HO-1 en este modelo previno la invasión leucocitaria y la subsiguiente angiogénesis. Sin embargo, cuando se evaluó la inhibición farmacológica de HO-1 durante la angiogénesis inducida por VEGF en condiciones no inflamatorias, la inducción de la infiltración leucocitaria estimuló dicho

proceso angiogénico. Se propuso que durante la inflamación crónica HO-1 cumple dos posibles roles: en primer lugar inhibe la infiltración de leucocitos y en segundo lugar promueve la angiogénesis no inflamatoria dirigida por VEGF a fin de facilitar la reparación tisular (Bussolati y Mason, 2006). En ratas hipertensas HO-1 simultáneamente disminuyó el estrés y la inflamación e indujo la producción de VEGF. Estos datos sugieren que los productos de la actividad de HO-1 actúan como factores pro-angiogénicos solamente cuando la expresión ocurre en un ambiente libre de reacciones inflamatorias. Cuando la inflamación dispara la formación de vasos sanguíneos, la influencia de HO-1 en este mismo proceso es inhibitoria (Bussolati y Mason, 2006). Queda aún por dilucidar si el efecto de HO-1 es directo sobre la producción de mediadores pro y anti-angiogénicos o es el resultado de la atenuación de la inflamación (Loboda et al., 2008).

#### **I.III.11 HO-1: ROL EN OTROS PROCESOS FISIOLÓGICOS DIFERENTES A LA DEGRADACION DEL HEMO**

HO-1 y los productos de su reacción también pueden jugar un rol no canónico en los procesos fisiológicos de una manera no necesariamente, o por lo menos no directamente, relacionada con la protección contra el estrés oxidativo. Estudios reciente demostraron que HO-1 puede estar ligada a la acción de SDF-1, una quimioquina responsable de la atracción de células progenitoras a los sitios de isquemia (Deshane et al., 2007).

También se demostró que HO-1 está vinculada con la actividad de diversos factores de crecimiento, entre ellos el TGF, factor de crecimiento de hepatocitos/factor de andamiaje, factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) y FGF (Hill-Kapturczak et al., 2007). La inducción de la expresión de HO-1 por estas citoquinas indica que los factores de crecimiento y HO-1 están íntimamente relacionados. Se propuso que la inducción de HO-1 puede ser una respuesta adaptativa que provee un balance para los efectos de los factores de crecimiento, sin embargo estas interacciones no pudieron ser elucidadas completamente todavía.

#### **I.III.12 HO-1 Y CANCER**

Algunos trabajos indican que HO-1 y sus productos también ejercen efectos anti-inflamatorios y participan en el control del crecimiento y la proliferación de las células

tumorales. Se ha observado que HO-1 se expresa constitutivamente en un número de tumores humanos incluyendo glioma, melanoma, próstata, carcinoma de células renales y pancreáticas, linfosarcomas, sarcoma de Kaposi y hepatoma (Jozkowicz et al., 2007).

El rol de HO-1 en el desarrollo tumoral todavía no está completamente dilucidado y reportes recientes demuestran resultados discordantes o completamente opuestos. Sin embargo, hay evidencias que indicarían que HO-1 está sobre-expresada en una gran variedad de tumores humanos y que juega un rol crítico en la progresión de las enfermedades neoplásicas (Berberat et al., 2005; Hirai et al., 2007; Jozkowicz et al., 2007).

La implicancia de HO-1 en cáncer parece depender del tipo celular y de su estado de activación. Por ejemplo, HO-1 ejerce efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos que probablemente involucran mecanismos antioxidantes en líneas celulares de carcinoma mamario (Hill et al., 2005). Se ha sugerido que la expresión aumentada de HO-1 también podría contribuir a la progresión tumoral a través de la promoción de la angiogénesis y la metástasis (Sunamura et al., 2003; Was et al., 2006). En cáncer de páncreas HO-1 potencia la agresividad tumoral (Sunamura et al., 2003). En cambio, en pacientes con cáncer colorrectal la expresión de esta proteína se correlacionó con una menor proporción de invasión tumoral a nódulos linfáticos (Becker et al., 2007).

Estudios *in vivo* propusieron que la sobre-expresión de HO-1 podría ser un marcador útil para identificar pacientes con bajo riesgo de metástasis en carcinoma oral de células escamosas (Tsuji et al., 1999) y en carcinoma de lengua (Yanagawa et al., 2004). En un modelo experimental de hepatocarcinogénesis química murina, la disminución de la expresión de HO-1 se asoció con la progresión maligna (Caballero et al., 2004).

Otros estudios han observado una asociación entre los polimorfismos del gen HO-1 y la incidencia de cáncer. Se identificaron repeticiones (GT)<sub>n</sub> en el promotor de HO-1 y se demostró que estos micro satélites son altamente polimórficos y que (GT)<sub>n</sub> más cortas estaban asociadas con un alta actividad de HO-1 y un riesgo mayor de progresión de melanomas (Okamoto et al., 2006). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los efectos de la activación de HO-1 pueden ser diferentes en los distintos estadios de la tumorigénesis.

El silenciamiento específico de HO-1 por siRNA resultó en la supresión de la proliferación de células tumorales pancreáticas (Berberat et al., 2005) o la inducción de la apoptosis en

células tumorales de pulmón (Kim et al., 2008). Similarmente efectos citotóxicos/citostáticos fueron observados con inhibidores de HO-1 como la zinc protoporfirina IX (ZnPP). Más aún, la sobre-expresión de HO-1 aumentó la viabilidad, la proliferación y el potencial angiogénico de melanomas (Was et al., 2006). Ratones inoculados con melanomas que sobre-expresaban HO-1 progresaron con peor pronóstico que los controles, presentando un número mayor de metástasis y una tasa de supervivencia menor (Was et al., 2006). Los resultados de experimentos recientes realizados con otras líneas tumorales humanas y murinas establecieron que ZnPP es un agente activo capaz de inducir efectos citotóxicos y citostáticos (Nowis et al., 2008).

El desarrollo de regímenes antitumorales efectivos requiere de la administración de una combinación de drogas dirigidas al bloqueo de diferentes caminos de señalización en las células tumorales, a fin de lograr una respuesta antitumoral más robusta (Nowis et al., 2008). Los efectos antitumorales sinérgicos pueden llevar a una disminución en la dosis y hasta la completa eliminación o la atenuación significativa de los efectos secundarios tóxicos de las drogas utilizadas en la monoterapia. Varios reportes demostraron que HO-1 podría proteger al tumor contra una variedad de agentes quimioterapéuticos, la radioterapia y la terapia fotodinámica (Berberat et al., 2005; Nowis et al., 2006). Apuntar contra HO-1 podría ser beneficioso para sensibilizar a las células tumorales contra los efectos citotóxicos de otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, el silenciamiento de HO-1 generó células tumorales de páncreas más sensibles al gemcitabine (Berberat et al., 2005) y células tumorales de pulmón más sensibles al cisplatino (Kim et al., 2008). Sin embargo, la eficacia de combinar quimioterapéuticos con un inhibidor de la actividad de HO-1 *in vivo* no se ha podido evaluar todavía. Al considerar el uso de los inhibidores de HO-1 en combinación con otros agentes antitumorales, hay que tener en cuenta que HO-1 y sus productos afectan múltiples caminos metabólicos y de señalización y juegan un rol importante en la protección de las células normales contra múltiples insultos ambientales. Por ejemplo, HO-1 protege a las células de la retina contra el daño inducido por la luz (Sun et al., 2007), disminuye la injuria por isquemia/reperfusión (Vitek y Schwertner, 2007), inhibe la apoptosis de células endoteliales inducida por estrés del retículo endoplasmático (Kim et al., 2007), protege a los ratones del daño hepático apoptótico (Sass et al., 2004), previene el desarrollo de la aterosclerosis en los ratones *knock-out* para el receptor de LDL (Araujo et al., 2003), mejora

la supervivencia de los órganos transplantados (Soares et al., 1998) y previene el desarrollo de úlceras gástricas en ratas (Guo et al., 2003). Además debe tenerse en cuenta que HO-1 también protege a las células normales y a los tejidos contra los efectos tóxicos de los quimioterapéuticos. Por ejemplo, el tratamiento con hemo impide la cistitis hemorrágica provocada por ciclofosfamida (Matsuoka et al., 2007), atenúa la toxicidad inducida por cisplatino en células tubulares renales (Schaaf et al., 2002) y disminuye la toxicidad inducida por doxorubicina (Suliman et al., 2007). Ratones transgénicos deficientes para HO-1<sup>-/-</sup> tratados con cisplatino, desarrollaron una falla e injuria renal más severa y significativamente mayor que los ratones *wild type* (Shiraishi et al., 2000). Sin embargo, estudios realizados demostraron que ZnPP no fue capaz de restaurar la sensibilidad al cisplatino en las células de melanoma con sobre-expresión de HO-1, y tampoco fue capaz de potenciar los efectos antitumorales del cisplatino, la doxorubicina o el fluorouracilo en tres modelos *in vivo* (Nowis et al., 2008). Los autores concluyen que el tratamiento con ZnPP no es efectivo para inducir efectos antitumorales en las células de melanoma B16F10 que sobre-expresan HO-1, ni tampoco en restaurar la sensibilidad al cisplatino. Estudios futuros deberían evaluar la administración de una droga en simultáneo con inhibidores de HO-1 y determinar los tiempos de administración para inhibir efectiva y selectivamente la actividad de HO-1 en las células tumorales. Por ende, surge el desafío de diseñar estrategias combinadas que apunten a modular HO-1 en los tumores y no en las células normales.

En resumen, el rol citoprotector del sistema HO-1 depende del medio celular y su aumento de expresión puede ser beneficiosa o perjudicial dependiendo de cada tejido. Esto explicaría los reportes contradictorios sobre este tema (Jozkowicz et al., 2007).

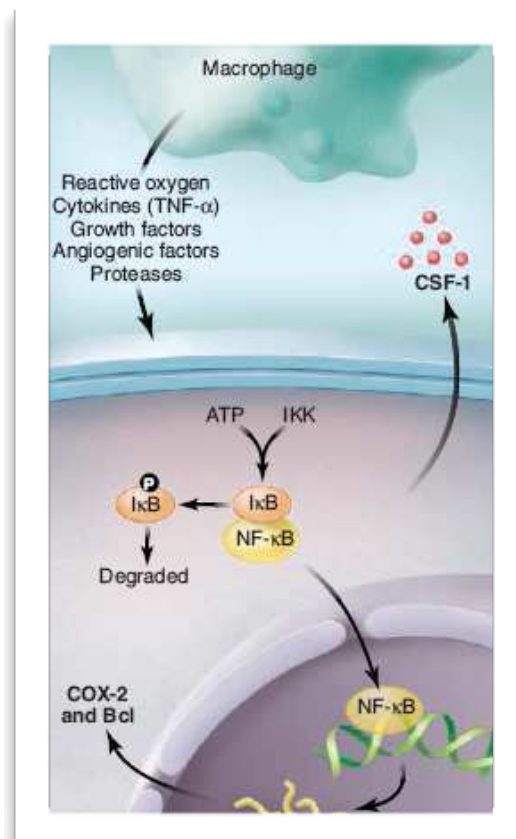
### **I.III.13 HO-1 E INFLAMACION**

La inflamación es un proceso dinámico iniciado por el cuerpo en respuesta a la injuria tisular o la infección. HO-1 podría contrarrestar la injuria oxidativa mediada por el sistema inmune a través de la prevención del daño oxidativo o vía la modulación de las células inflamatorias infiltrantes (Wagener et al., 2003b) (Fig. 17). Dado el rol fundamental que juega la inflamación en el desarrollo del tumor y la subsiguiente metástasis, la modulación genética o farmacológica de la expresión de HO-1 podría constituir una posibilidad



terapéutica. Comprender el nivel y la localización de HO-1 en la próstata normal y en las injurias prostáticas es crítico para controlar la inflamación crónica en el tejido tumoral (Sacca et al., 2007).

La activación de HO-1 es un gran estímulo para la síntesis y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos (Fig. 17). Este camino podría jugar un rol central en las situaciones patológicas donde la hipoxia/re-oxigenación del tejido local dispara una respuesta inflamatoria sistémica.



(Marx, 2004)

**FIGURA 17. Interacción macrófago – tumor.**

Los macrófagos producen varias sustancias que pueden aumentar el tamaño tumoral, incluyendo la activación de  $TNF\alpha$ , que a su vez puede incrementar la actividad de NF- $\kappa$ B tanto en las células del tejido blanco como en los mismos macrófagos. Las células tumorales producen sustancias como CSF-1 y COX-2 que aumentan los procesos inflamatorios, como también miembros de proteínas Bcl que inhiben la apoptosis.

Los macrófagos juegan un rol crítico en la iniciación, el mantenimiento y la resolución de la inflamación por la presentación de antígenos, fagocitosis y la inmunomodulación a través de la producción de citoquinas y factores de crecimiento. Estos macrófagos son activados y

desactivados en el proceso inflamatorio. Las señales de activación incluyen citoquinas, como interferones, GM-SCF, TNF $\alpha$  como también LPS, proteínas de ECM y otros mediadores químicos. Los macrófagos reconocen distintos patrones moleculares asociados a patógenos por los TLR que activan caminos de señalización induciendo la expresión de genes pro-inflamatorios (Akira y Takeda, 2004). La inhibición de la inflamación es un proceso necesario que permite al hospedador combatir organismos que invaden como también reparar los tejidos dañados. Los macrófagos activados son neutralizados por la autosecreción de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF $\beta$  durante el proceso inflamatorio. Como los macrófagos producen una amplia variedad de moléculas biológicamente activas con resultados tanto beneficiosos como nocivos, descubrir su función innata y sus productos durante la inflamación podría abrir nuevas ramas para las intervenciones terapéuticas a la hora de controlar las enfermedades inflamatorias. Tanto los ratones como los humanos deficientes en HO-1 tienen un fenotipo distintivo que muestra un alto grado inflamatorio (Pitcock et al., 2005).

La injuria crónica y la irritación disparan la respuesta inflamatoria y el riesgo de contraer cáncer se ve aumentado bajo condiciones de inflamación crónica (De Marzo et al., 2007a). La liberación de radicales libres de los leucocitos, puede dañar las células epiteliales vecinas y las células estromales, llevando a la carcinogénesis, alterando los blancos y los caminos de señalización, que son cruciales para mantener la homeostasis del tejido normal (Hussain et al., 2003). La inducción de HO-1 es considerada importante en la fase inicial de los mecanismos de protección celular luego de la exposición a hiperoxia (Dennery et al., 1997; Dennery et al., 1996) y a varios estímulos de estrés celular (Vogt et al., 1995). Abraham y colaboradores demostraron que la sobre-expresión de HO-1 protege a las células coronarias endoteliales del daño oxidativo producido por la exposición a hemoglobina. El grupo hemo es esencial para varias funciones biológicas y ejerce múltiples acciones inmuno-regulatorias. Estimula la proliferación y diferenciación celular y promueve la angiogénesis (Abraham et al., 1995; Deramaudt et al., 1998); un fenómeno íntimamente relacionado con la reacción inflamatoria. Se ha propuesto que durante la inflamación crónica, HO-1 ejerce por lo menos dos roles: en primer lugar provee una acción anti-inflamatoria inhibiendo el reclutamiento leucocitario y en segundo lugar promueve la angiogénesis anti-inflamatoria dirigida por

VEGF para facilitar la reparación tisular (Bussolati et al., 2004). También se ha sugerido que HO-1 sería la primera defensa protectora en la piel contra los insultos oxidativos e inflamatorios (Wagener et al., 2003a; Wagener et al., 2003b). La inducción de HO-1 por pro-oxidantes y la observación que la biliverdina y la bilirrubina son potentes anti-oxidantes, sugieren que el aumento de la actividad de HO-1 representa una respuesta celular adaptativa y protectora contra el estrés celular.

Los ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) pueden causar estrés genotóxico (Oshima y Bartsch, 1994) induciendo mutaciones, por lo tanto aumentando el riesgo a la transformación. El óxido nítrico (NO) induce al mRNA de HO-1 y aumenta la estabilidad de la expresión de dicha proteína (Durante et al., 1997; Sasaki et al., 2005).

Las proteínas como las enzimas reparadores de DNA, aquellas involucradas en la transducción de señales y la proteína p53, pueden ser modificadas estructural y funcionalmente cuando se exponen a radicales libres (Hussain *et al*, 2003). La interacción entre el NO y la proteína p53 es un camino clave en la carcinogénesis mediada por la inflamación. Se ha demostrado que p53 es modificada post-traduccionalmente en residuos cruciales para sus funciones luego de la exposición a NO (Hofseth et al., 2003). La inducción de HO-1 en respuesta al NO depende de una activación transcripcional limitada y en algunos tipos celulares, de una dramática estabilización del mRNA de HO-1. Sin embargo, poco se sabe de los caminos de señalación por los cuales el NO induce a HO-1.

HO-1 y los productos de la degradación del hemo, especialmente CO, son los reguladores críticos de la inflamación siendo los macrófagos los blancos principales (Otterbein et al., 2003) Tanto *in vitro* como *in vivo*, el CO inhibe las citoquinas pro-inflamatorias inducidas por LPS (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP1 $\alpha$ ) pero aumenta la expresión de la citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 en macrófagos (Otterbein et al., 2000; Sarady et al., 2002; Zuckerbraun et al., 2003).

Por otro lado, es interesante destacar que la IL-10 induce la expresión de HO-1, generando así una retroalimentación para CO (Lee and Chau, 2002), a fin de mantener un efecto anti-inflamatorio persistente. La habilidad del CO de ejercer sus efectos y dirigir el condicionamiento oxidativo es contingente con la rápida generación de ROS (Bilban et al., 2006; Bilban et al., 2008; Boczkowski et al., 2006; Chin et al., 2007; Zuckerbraun et al.,

2007).

### **I.III.14 SEÑALIZACION MEDIADA POR MENSAJEROS GASEOSOS**

#### **I.III.14.1 CO VIA ROS**

Entre los eventos tempranos de las células y los tejidos expuestos a bajas concentraciones de CO se encuentra la rápida producción de ROS (anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y radicales hidroxilos), comenzando dentro de los 5-10 minutos de exposición al gas (Bilban et al., 2006; Chin et al., 2007; Geiszt y Leto, 2004; Zuckerbraun et al., 2007). A pesar de que el  $\cdot\text{O}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son generalmente considerados productos tóxicos de la respiración, evidencias recientes sugieren que los ROS son importantes reguladores de la transducción de señales en eucariotas que controlan diversos procesos biológicos como la activación de las células del sistema inmune y la remodelación vascular en mamíferos (Geiszt and Leto, 2004). Se ha demostrado que una variedad de estímulos extracelulares desencadena el aumento transiente de las concentraciones intracelulares de ROS. (Gulati et al., 2001). Por lo tanto, los ROS pueden tener tanto efectos positivos (señalización) o negativos (injuría) dependiendo de la cantidad formada y del tipo celular que estén afectando.

El uso de un químico citotóxico como molécula de señalización obviamente tiene riesgos potenciales, con lo cual no es sorprendente que la generación de ROS esté estrictamente regulada. Diferentes niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden inducir respuestas distintas, no solo entre diversos tipos celulares sino también dentro de una misma célula. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  generada en respuesta a citoquinas y factores de crecimiento se comporta como segundo mensajero para oxidar y por lo tanto inhibir la actividad de tirosina fosfatasas (Meng et al., 2005; Tonks, 2005). Además de ROS, CO conduce a la generación de RNS derivadas de las óxido nítrico sintetasas (NOS). CO de alguna manera “marca” las enzimas NOS que contienen hemo y al hacerlo en las células endoteliales conduce a un aumento del NO y la consecuente generación de peroxinitrito. El peroxinitrito altamente reactivo provoca alteraciones de las funciones proteicas vía nitrosilación. La generación de ROS y RNS dictan río abajo la modulación y función de moléculas efectoras. Por lo tanto, la relación entre el CO y el NO,

gases de señalización, transforma a estas moléculas en reguladoras potentes de la función celular (Bilban et al., 2008).

#### **I.III.14.2 CO - NO**

El rol de CO en los sistemas biológicos debería ser re-evaluado, no como una molécula tóxica, sino como una molécula crítica en la señalización celular emparentada con NO. Al igual que este último compuesto, CO tiene un poderoso potencial terapéutico en la función inmune innata como también en las condiciones patofisiológicas. El hecho de que CO se genere endógenamente por enzimas altamente conservadas como la HO-1, apoya su rol en varios procesos biológicos. CO podría pensarse como una molécula arcaica, pero esencial que ha persistido a través de la evolución y a la cual sólo recientemente se le ha asignado una función beneficiosa.

La similitud e interrelación entre CO y NO y los sistemas de enzimas que los generan endógenamente es sorprendente. Son posiblemente las moléculas de señalización más simples, eficientes y efectivas conocidas hasta la fecha; son capaces de atravesar membranas y disparar selectivamente cascadas de señalización adicionales dentro de múltiples tipos celulares. Hay evidencias que muestran que CO y NO, en ciertas instancias se requieren mutuamente para impartir sus efectos (Zuckerbraun et al., 2003; Zuckerbraun et al., 2006).

Esto es notoriamente evidente en el hígado y en el pulmón. CO inhalado puede proteger profilácticamente en modelos de shock, donde iNOS (la isoforma inducible de NOS) y NO están bloqueados en el pulmón y aumentados en el hígado y también puede actuar revirtiendo la hipertensión pulmonar (Zuckerbraun et al., 2006). Este efecto provocado por CO está acompañado por un aumento de la expresión de eNOS (la isoforma endotelial de la NOS) en las células endoteliales, que a su vez vía un aumento en NO resulta en la muerte celular programada de las células del VSMC hiperproliferativas (Srisook et al., 2005). En cada una de las instancias descritas, la restauración de las funciones del tejido y del órgano requiere la modulación de la generación de NOS y de NO. La generación de NO puede reaccionar también con el radical superóxido para funcionar como un *scavenger* de radicales, generando peroxinitrito que puede ser removido por glutatión. Uno de los inductores más potentes de HO-1 es NO (Motterlini et al., 2002), presumiblemente vía un

---

proceso mediado por NOS o vía interacción con factores de transcripción que contienen hemo como NPAS2 (del inglés neuronal PAS domain protein 2) o Bach 1. Se ha demostrado que los efectos fisiológicos del NO, observados en muchos casos como en la vasculatura, son dependientes de HO-1 y a su vez de CO. Los pigmentos biliares y el hierro/ferritina, sin embargo no pueden ser considerados como participantes activos (Maines, 2005). La compleja interrelación entre estos mensajeros gaseosos todavía se desconoce, pero hay evidencia suficiente que demuestra que estas moléculas podrían ser blancos claves desde una perspectiva fisiológica y clínica.

# **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

---

## CAPITULO II

### HIPOTESIS Y OBJETIVOS

#### II.1 HIPOTESIS GENERAL

La inflamación crónica desregula la homeostasis celular. Los radicales libres producidos durante el proceso inflamatorio pueden inducir mutaciones génicas y modificaciones post-traduccionales de proteínas relacionadas con el cáncer. El efecto de los radicales libres depende de la concentración local de los mismos, del micro ambiente celular y del "background" genético del individuo. Existen diversos mecanismos de defensa antioxidante, que llevan a la inducción de la expresión de genes que responden al estado oxidativo celular. HO-1, miembro de la familia de las proteínas inducibles por calor (HSP-32), es un componente de la defensa celular contra el daño oxidativo y la inflamación. La sobre-expresión de HO-1 ejerce su efecto citoprotector por atenuación de la cascada de reacciones inflamatorias.

En cuanto al rol de HO-1 en el proceso tumoral, existen opiniones controvertidas: podría contrarrestar el daño peroxidativo desencadenando el arresto y/o la apoptosis de las células neoplásicas o podría modular el reclutamiento de las células inflamatorias infiltrantes.

En nuestra opinión, el concepto corriente del cáncer de próstata, que tiende a centralizarse en el rol del receptor de andrógenos, deberá reemplazarse por un concepto más comprometedor que involucre eventos moleculares que regulen el ciclo celular, la apoptosis, la invasión y migración local, las células metastásicas y los tejidos huéspedes.

Debido al rol clave que juega la inflamación en el desarrollo del tumor y la metástasis y considerando el potencial anti-inflamatorio de HO-1, nuestra hipótesis de trabajo es que la modulación de la expresión de HO-1 genética o farmacológicamente podría constituir una propuesta terapéutica.

#### II.2 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la expresión de HO-1 en la carcinogénesis prostática.



## II.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

### Estudios *in vitro*

Empleando líneas celulares humanas establecidas de cáncer de próstata, con distinto perfil de propagación al hueso y diferente sensibilidad a andrógenos nos proponemos:

1. Investigar la modulación farmacológica de la expresión de HO-1 a nivel transcripcional y post-transcripcional en las siguientes condiciones:

- Por exposición a un inductor específico de la actividad y de la expresión de dicha proteína (hemina).
- Por exposición a un inhibidor de la actividad de dicha proteína (SnPP).

2. Investigar el efecto de la modulación farmacológica de HO-1 sobre la proliferación, la invasión y la migración celular.

3. Modular genéticamente la expresión de HO-1 por generación de una línea celular estable que sobre-exprese HO-1 y una línea celular con expresión silenciada de HO-1 mediante la tecnología de siRNA e investigar de qué modo la modulación genética de HO-1 afecta la proliferación, la invasión y la migración celular.

4. Identificar los genes relacionados con inflamación y angiogénesis regulados por la sobre-expresión de HO-1 en líneas tumorales de PCa.

### Estudios *in vivo*

1. Analizar el efecto de HO-1 *in vivo* sobre el desarrollo de tumores derivados de la línea de PCa con sobre-expresión estable de HO-1, creciendo como xenógrafos en ratones desnudos y analizar:

- a. El crecimiento tumoral
- b. La expresión, mediante ensayos de inmunohistoquímica, de genes blanco regulados por HO-1, previamente identificados en los estudios *in vitro*.

# **MATERIALES Y METODOS**

---

**CAPITULO III****MATERIALES Y METODOS****III.I MATERIALES****III.I.1 REACTIVOS Y DROGAS**

Se utilizaron los siguientes reactivos cuya procedencia se indica a continuación: Cloruro de Hemina equina (hemina) (Sigma Aldrich, USA), Dicloruro de Estaño (IV) Protoporfirina IX (SnPP) (Frontier Scientific Europe, Ltd., Carnforth, Lancashire, Reino Unido), Cell Titer 96 aqueous one solution reagent MTS (Promega, USA), Ioduro de Propidio (Molecular Probe, Eugene, OR, USA), Kit para inmuno histoquímica LSAB + DAKO Peroxidasa (HRP) (DAKO Corp., California, USA), Medio de Montaje GVA (ZYMED, San Francisco, California, USA), Taq Hot Start (Fermentas International Inc., Canada), Omniscript RT-Kit (Quiagen Technology, Holanda).

El resto de los reactivos y las drogas utilizadas en su mayoría se adquirieron en Sigma-Aldrich, BD Pharmingen y Promega (Reino Unido).

**III.I.2 REACTIVOS PARA CULTIVO**

El medio RPMI-1640 fue comprado en Invitrogen (Argentina) y la gentamicina en GIBCO BRL (Reino Unido). El medio BRFF-HPC1 y el FNC Coating Mix se compró en Athena ES Company (USA).

El suero fetal bovino (SFB) se adquirió en GIBCO (USA) y la penicilina/streptomycin, L-glutamina, tripsina/EDTA se compraron en (SIGMA, USA).

**III.I.3 ANTICUERPOS**

El anticuerpo monoclonal humano anti-hemo oxigenasa 1 desarrollado en ratón (OSA-110) y el anticuerpo policlonal humano anti-hemo oxigenasa 1 desarrollado en conejo (SPA-896) se adquirieron en Stressgen Biotechnologies Corp., San Diego, USA. El anticuerpo monoclonal humano anti-actina  $\beta$  desarrollado en ratón se compró en Sigma Aldrich, Reino Unido. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-MMP9 (sc-21733) y anti-vimentina (sc-73259), se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA. Los segundos

anticuerpos conjugados con peroxidasa de rabanito fueron comprados en Amersham Ltd, Reino Unido.

### III.I.4 PROTEINAS RECOMBINANTES

La proteína recombinant humana HO-1 (Hsp 32) se adquirió en Stressgen (USA).

### III.I.5 OLIGONUCLEOTIDOS

Los oligonucleótidos que se detallan a continuación fueron diseñados con el programa Beacon 5 y sintetizados por MWG Biotech (Reino Unido) e Invitrogen (Argentina).

Nombre: Heme-Oxygenase 1 (HMOX)

Forward Sequence: 5'-GAGTGTAAGGACCCATCGGA-3'

Reverse Sequence: 5'-GCCAGCAACAAAGTGCAAG -3'

Nombre: Metaloproteasa 9 (MMP9)

Forward Sequence: 5'-AGACCTGGGCAGATTCCAAACC-3'

Reverse Sequence: 5'-GCAAAGGCGTCGTC AATCACC-3'

Nombre: Actina (ACTB)

Forward Sequence: 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'

Reverse Sequence: 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA -3'

### III.I.6 LINEAS CELULARES

#### Líneas celulares de cáncer de próstata

Se utilizaron tres líneas celulares derivadas de carcinomas de próstata humanos cuyas características se detallan en la TABLA III.

**LNCaP.** Esta línea celular proviene de un adenocarcinoma de próstata humano y se aisló de una biopsia de nódulo linfático supraclavicular, de un paciente con un diagnóstico confirmado de metástasis de próstata (Horoszewicz et al., 1983). Posee el receptor de andrógenos mutado en el codón 877, en el dominio de unión al ligando y es activado por progesterona, estradiol, etc. (Veldscholte et al., 1990). Es sensible a andrógenos y expresa PSA.

**MDA PCa 2b.** Esta línea celular fue establecida de una metástasis ósea y proviene de un adenocarcinoma de próstata humano (Navone et al., 1997). Es sensible a andrógenos y expresa PSA. Su perfil de crecimiento en hueso es osteoblástico.

**PC3.** Esta línea celular fue establecida de una metástasis ósea y proviene de un adenocarcinoma de próstata humano (Kaighn et al., 1979). Es insensible a andrógenos y no expresa PSA. Su perfil de crecimiento en hueso es osteolítico.

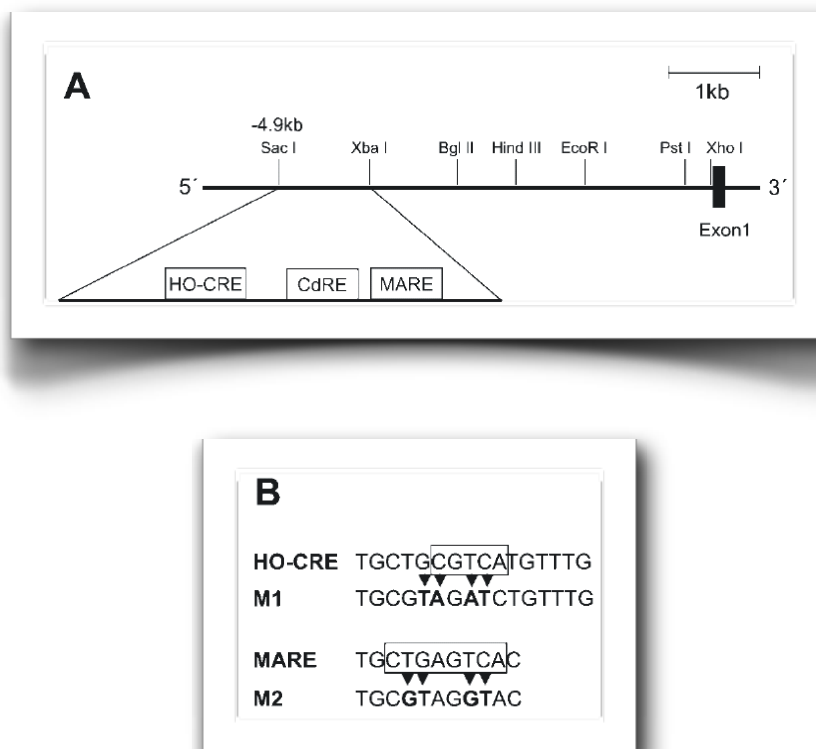
**TABLA III. Cuadro comparativo de las características de las líneas celulares de cáncer de próstata humano: LNCaP, MDA PCa 2b y PC3, utilizadas en este estudio**

Características	LNCaP	MDA PCa 2b	PC3
Origen	Nódulo linfático	Hueso	Hueso
Metástasis al hueso	No	Si (osteoblástica)	Si (osteolítica)
Sensibilidad a andrógenos	Si	Si	No
Expresión del receptor de andrógenos	Si (mutado)	Si	No
Expresión de PSA	Si	Si	No
Utilidad	Modelo sensible a andrógeno	Modelo sensible a andrógeno	Modelo insensible a andrógeno

**PC3-pcDNA3 y PC3HO-1.** Se generó la línea transfectada establemente (PC3HO-1) y su control (PC3-pcDNA3). La transfección se realizó por el método del fosfato de calcio. Los plásmidos utilizados fueron pcDNA3HO-1 o el plásmido vacío pcDNA3. A las 5 h post-transfección, las células se lavaron con medio y se cultivaron durante 24 h a 37°C. Luego se agregó G418 en una concentración óptima previamente determinada (100 µg/µl). Las células fueron mantenidas por 15 días, luego se seleccionaron y expandieron diversos clones individuales G418-resistentes. Luego de la selección de los clones PC3HO-1 y del control PC3pcDNA3, se utilizó una dosis de mantenimiento de G418 de 50 µg/µl.

### III.1.7 PLASMIDOS

Los plásmidos hHO4.9luc, hHO4.9\_M1luc y hHO4.9\_M2luc fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Leitinger, Dept. Vascular Biology & Thrombosis Research, University of Vienna, Viena (Kronke et al., 2003) (Fig. 18) y el vector de expresión humano pcDNA3HO-1 por Dr. M. Mayhofer (Clinical Institute for Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Vienna).



(Kronke et al., 2003)

**FIGURA 18.** Esquema del promotor de HO-1. Mutaciones en los sitios HO-CRE (A) y MARE (B).

## III.II METODOS

### III.II.1 CULTIVO CELULAR

#### III.II.1.1 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares LNCaP, PC3, PC3-pcDNA3 y PC3HO-1 se mantuvieron en medio RPMI 1640 con antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml) y SFB 10% (v/v). En el caso de las células transfectadas establemente, al medio de cultivo se le adicionó 50 µg/ml de G418. La línea celular MDA PCa 2b se mantuvo con medio BRFF-HPC1 con gentamicina 50 µg/ml y SFB 20% (v/v) y las placas de cultivo fueron previamente revestidas con el FNC Coating Mix para favorecer su adherencia. Las células se cultivaron a 37°C, en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%. Una vez que las células formaron una monocapa, el medio de cultivo fue aspirado y descartado, las células se lavaron dos veces con PBS (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl; 1,44 g de PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> y 0,24 g de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K en 1 litro de agua bidestilada; pH 7,4) para remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero y luego se agregó a cada

placa o botella 1,5 ml de solución de tripsina (0,25; EDTA 0,53 mM). Se incubaron a 37°C hasta observar en el microscopio que las células se despegaran. Posteriormente las células fueron resuspendidas en medio fresco. Se plaquearon a una densidad de  $2,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en botellas T 25 o T 75 o en placas de 100 mm de diámetro.

### **III.II.1.2 PRESERVACION CRIOGENICA**

Cuando los cultivos celulares alcanzaron el 85% de confluencia, las células fueron tripsinizadas como se describió anteriormente, centrifugadas por 5 min a 900 rpm y luego resuspendidas en medio de cultivo con SFB 20 % (v/v) y dimetil sulfóxido (DMSO) 10% (v/v). Las células fueron fraccionadas en alícuotas de a 1 ml en criotubos y colocadas en un dispositivo “cryo-cooler” a -80°C. Luego de 24 h las células fueron transferidas a nitrógeno líquido.

### **III.II.1.3 TRATAMIENTOS CON HEMINA Y SNPP**

Los cultivos celulares de PC3, LNCaP y MDA PCa 2b fueron tratados con:

- o Hemina , un inductor específico de la actividad y de la expresión de HO-1.
- o SnPP, un inductor de la expresión de HO-1 e inhibidor específico de su actividad.

#### **III.II.1.3.1 PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE HEMINA**

36 mg de cloruro de hemina se disolvieron en 0,4 ml de NaOH 0,5 N y se agregaron 0,5 ml de Tris-HCl 1M pH 8, se filtró utilizando filtros de 0,2 µm y se conservó alicuotado a -80°C (solución stock de hemina 550µM) (Muppala et al., 2000). Inmediatamente antes de su uso se diluyó en PBS 1:100 y se hicieron posteriores diluciones para obtener concentraciones finales de 30-70µM en RPMI 1640 (para PC3 o LNCaP) o BRFF-HPC1 (para MDA PCa 2b).

#### **III.II.1.3.1 PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE SNPP**

Se disolvió el SnPP en DMSO (0,2% v/v) y luego se diluyó en RPMI 1640 (para PC3 o LNCaP) o BRFF-HPC1 (para MDA PCa 2b) a una concentración final 10µM. La solución se filtró utilizando filtros de 0,2 µm.

### **III.II.2 PREPARACION DE VECTORES DE EXPRESION**

#### **III.II.2.1 PREPARACION DE BACTERIAS COMPETENTES**

Se prepararon bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  partiendo de un cultivo de 5 ml de medio completo Luria-Bertani (LB/ pH 7; 10 g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 5 g de cloruro de sodio, en un volumen final de 1 l de H<sub>2</sub>O d) sin antibiótico, crecido durante toda la noche a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4 a 0,6. Las bacterias fueron centrifugadas a 700g durante 5 min a 4°C, el pellet se resuspendió en 4 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril y se incubó durante 15 min en hielo. Luego se centrifugó nuevamente a 700 g durante 5 min a 4°C y el pellet se resuspendió en 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y estéril, se alicuotó en 15% de glicerol y se conservó a -70°C.

#### **III.II.2.2 TRANSFORMACION DE BACTERIAS COMPETENTES**

Las bacterias competentes (50  $\mu$ l) se transformaron con los plásmidos deseados (1 $\mu$ g) con resistencia a ampicilina, incubando durante 30 min en hielo y luego realizando un shock térmico (a 42°C durante 2 min y posteriormente 5 min en hielo) para permeabilizar la pared bacteriana. Se agregaron 450  $\mu$ l de LB sin antibiótico y se incubó durante 1 h a 37°C. Una alícuota (200  $\mu$ l), se rastrilló en una placa con LB + ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y se incubó toda la noche en estufa a 37°C. Se picó una colonia y se la dejó crecer en medio LB + ampicilina. Se guardó un stock en 15% glicerol a -70°C.

#### **III.II.2.3 AISLAMIENTO DEL DNA PLASMIDICO**

Se realizó un cultivo en medio LB líquido con ampicilina tomando las bacterias transformadas con el plásmido de interés e incubándolo toda la noche a 37°C con agitación orbital. Luego se centrifugó a 6.000 g durante 15 min a 4°C. El pellet se resuspendió en P1 (6,06 g de Tris base; 3,72 g de Na<sub>2</sub>-EDTA-2H<sub>2</sub>O; pH 8, volumen final 1 l; 100  $\mu$ g/ml de RNasa A) para lisar las bacterias. Se agregó P2 (8 g de NaOH en un volumen final de 1 l, conteniendo 20% de SDS) durante 5 min para desnaturalizar el DNA y luego P3 (294,5 g de acetato de potasio en un volumen final de 1 l, ajustando el pH a 5,5 con ácido acético glacial) para renaturalizarlo. Este método se basa en que debido a las diferencias de tamaño



del DNA cromosómico y del plasmídico, éste último de menor tamaño, será el único capaz de renaturalizar. Por lo tanto, se incubó en hielo durante 20 min para favorecer su renaturalización y se procedió a centrifugar a 20.000g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante 15 min y luego se precipitó el DNA con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 15.000 g durante 30 min a 4°C. El pellet se lavó con etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 15.000 g durante 10 min a 4°C. Se dejó secar y el pellet se redisolvió en buffer TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8). El plásmido aislado se cuantificó por medición de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant Pro).

#### **III.II.2.4 TRANSFECCIONES DE CELULAS DE MAMIFEROS CON FOSFATO DE CALCIO**

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 60%. Se preparó solución A (por cada pocillo: 215 µl H<sub>2</sub>O destilada estéril; 31,25 µl CaCl<sub>2</sub> 2M; 25 µg tRNA) y solución B (por cada pocillo: 250 µl HN buffer [50mM HEPES, 280mM NaCl, volumen final 1 l con H<sub>2</sub>O d; pH 7.1]; 6,25 µl NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 70 mM). Se agregó 5 µg del plásmido a transfectar a la solución A y a la solución B. Se incubó la mezcla durante 40 min y luego se agregó por goteo a las células. Se incubó durante 5 h a 37°C, en atmósfera con CO<sub>2</sub> 5% y se realizaron 3 lavados con medio RPMI 1640. Posteriormente, se realizaron cultivos durante 24 h de las células transfectadas con los plásmidos hHO4.9luc, hHO4.9\_M1luc, hHO4.9\_M2luc, PC3pcDNA3 y PC3HO-1.

#### **III.II.2.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA LUCIFERASA**

Luego de la transfección celular como se detalló anteriormente, las células se cosecharon al tiempo indicado en cada caso, se lavaron una vez con PBS 1X y se congelaron como mínimo por 30 min a -70° C. Luego se incubaron con 150 µl de buffer de lisis (Lysis Buffer 5X, Promega, USA) durante 30 min con agitación constante.

Para medir la actividad de luciferasa, se incubaron 30 µl del lisado celular con 50 µl del reactivo de luciferasa (Promega) en oscuridad e inmediatamente se cuantificó la actividad de luciferasa en un luminómetro (HIDEX) como emisión de luz durante 30 s. Como blanco se incubó únicamente 50 µl del buffer de ensayo de la luciferasa.

Para la normalización de los resultados no se utilizaron métodos que consideren controles internos de transfección, como actividad de luciferasa de renilla o actividad de  $\beta$ -galactosidasa, ya que cuando se usan otros reporteros como control interno estos pueden competir cuando se realiza un tratamiento con agentes genotóxicos, hormonas y citoquinas (Thavathiru y Das, 2001; Sims et al., 2003; Mulholland et al., 2004). Además, el control interno también puede estar influenciado por la presencia de otros factores de transcripción o cofactores.

En nuestra experiencia, la mejor manera de normalizar los datos es haciéndolo con respecto a la concentración de proteínas totales. Así, los valores obtenidos se normalizaron respecto de la concentración de proteínas medida por el método de Bradford. Cada transfección se realizó por triplicado y se hicieron por lo menos 3 experimentos independientes. Las barras de error se calcularon como el intervalo de confianza al 95% en el cual se encuentra el valor medio de la actividad de luciferasa para cada tratamiento.

### **III.II.2.6 TRANSFECCION CON siRNA**

Para producir el silenciamiento de la expresión de HO-1 se adquirió el siRNA generado por SIGMA (USA). Las secuencias 'sentido' y 'antisentido' del siRNA para HO-1 humano utilizadas fueron: (Secuencia sentido: 5'-GGAGAUUGAGCGCAACAAGdTdT-3' y antisentido 5'-CUUGUUGCGCU AAAUCUCCdTdT-3'). Se usó una secuencia que no hibrida con ningún RNA humano (siRNA scramble, Dharmacon) como control negativo. Las células MDA PCA 2b se cultivaron en placas de 60mm de diámetro y se hicieron crecer hasta alcanzar una confluencia del 50–60%. Luego fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en medio de cultivo BRFF-HPC1 (10% gentamicina) sin SFB. Luego de 5 h de incubación, se agregó medio nuevo conteniendo SFB 20%. Los ensayos de proliferación, invasión y migración fueron realizados 72 h post-transfección.

### III.II.3 ANALISIS MOLECULAR

#### III.II.3.1 AISLAMIENTO DEL RNA

Para extraer el RNA total de las células se utilizó el RNeasy Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de realizar el tratamiento correspondiente, los cultivos celulares se lavaron con PBS y las células se lisaron con buffer RLT con  $\beta$ -mercaptoetanol. Se cosecharon, y la solución se homogeneizó con una columna Qiasredder (Qiagen) centrifugando durante 2 min a 6.700 g. En la columna quedaron retenidos los restos celulares. Al eluido se le agregó etanol 70% y se lo colocó en una columna RNeasy, la cual se centrifugó a 6.700 g por 30 s. Se descartó el eluido, se agregó a la columna buffer de lavado RWI y se centrifugó a 6.700 g por 30 s. Nuevamente se descartó el eluido, se agregó otro buffer de lavado RPE y se volvió a centrifugar a 6.700 g por 30 s más. Se descartó el eluido y se procedió a centrifugar sin el agregado buffer para aumentar la pureza de la muestra. Se eluyó el RNA retenido en la columna con 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y se guardó el eluido a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### III.II.3.2 CUANTIFICACION Y PUREZA DEL RNA

La concentración del RNA obtenido se midió realizando una dilución de la muestra 1:140 con  $\text{H}_2\text{O}$  d y midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant Pro). El grado de pureza de la muestra se estimó como la razón entre  $A^{260\text{nm}}/A^{280\text{nm}}$ . Si la concentración del RNA era mayor a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con una pureza mayor a 1,7 se procedió a la retro-transcripción para la obtención del cDNA.

#### III.II.3.3 RT-PCR

La RT-PCR fue llevada a cabo utilizando el kit GeneScript one-step (GeneSys Ltd.) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Se prepararon dos soluciones mezcla “master mix” separadas en tubos libres de DNAsas y RNAsas y se mantuvieron en hielo. La Master mix 1 contenía para una reacción de un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ : 200  $\mu\text{M}$  dNTP mezcla, 500 pmol primers, 1  $\mu\text{g}$  RNA y agua destilada libre de nucleasas. La Master Mix 2 contenía para una reacción 5 x RT-PCR buffer (10  $\mu\text{l}$ ); 1.5 mM  $\text{MgSO}_4$  y 0,5  $\mu\text{l}$  de GeneScript Enyme Mix. La transcripción reversa se desarrolló de la siguiente forma: desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$  por 4 min

para la síntesis de la 1<sup>ra</sup> hebra, luego: 94°C por 60 s (denaturalización), 55°C por 30 s (annealing) y 72°C durante 1 min. Este programa se repitió por 30 ciclos y finalmente un paso de extensión a 72°C por 10 min. Las secuencias de los primers utilizados se muestran en la sección III.I.5.

#### **III.II.3.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Las muestras fueron separadas por electroforesis en un gel de agarosa 2 % (p/v) en TAE 1 X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8) conteniendo bromuro de etidio 0,2% (v/v). Se agregó 1 x BlueRun DNA loading buffer (Hybaid) a cada muestra y se procedió a realizar una electroforesis a 80 V. Las bandas de cDNA fueron visualizadas por iluminación con UV.

#### **III.II.3.5 PREPARACION DEL cDNA**

Para la obtención del cDNA, 2 µg de RNA de cada muestra se llevaron a un volumen final de 12,5 µl con H<sub>2</sub>O d y se desnaturalizaron a 65 °C durante 5 min. Luego se los colocó en hielo y se les agregó mezcla de reacción que contenía dNTPs, oligodT, inhibidores de RNAsas, buffer y retrotranscriptasa Omniscript RT-Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó a 37°C durante 2 h y se guardó a -20° C.

#### **III.II.3.6 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)**

El cDNA se amplificó por PCR en tiempo real (PCR cuantitativa) como se describió anteriormente (Smith et al., 2004). Brevemente, a 2,4 µl de la muestra se le agregó los oligos (1,5 µl) específicos diseñados previamente, SYBRgreen (0,25 µl) y la mezcla de enzima Taq polimerasa del kit HotStart Master Mix de Qiagen (12,5 µl), siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen final de 25 µl. Las muestras así preparadas se amplificaron en un aparato DNA Engine Opticon (MJ Research) siguiendo el siguiente programa: 12 min a 94°C, y 54 ciclos de: 20 s a 92°C, 20 s a 60°C (para actina) o 20 s a 58°C (para MMP9 y HO-1), 30 s a 72°C y 2 s a 79,5°C. Cada reacción se realizó por duplicado y los resultados se normalizaron con actina. Se hicieron 3 experimentos independientes. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software Opticon 3 trazando una recta en la parte exponencial de la curva de amplificación y obteniendo así los valores de C<sub>T</sub>. Para calcular la inducción de la expresión de los genes testeados se estimó el

promedio de los valores de  $C_T$  para el gen incógnita y para el No RT (RNA que había sido incubado en las condiciones de la reacción de retrotranscripción, pero en ausencia de la enzima retrotranscriptasa) de la siguiente manera:

$$C_T = (C_{T1} + C_{T2})/2 \quad (1)$$

La diferencia en los valores de  $C_T$  entre cada muestra y el No RT determina el delta- $C_T$  ( $\Delta C_T$ ). Esto se resume en la siguiente expresión:

$$\Delta C_T = (C_{T\text{NoRT}}) - (C_T^{\text{muestra}}) \quad (2)$$

Una vez normalizado y debido al exponente natural de qPCR, los valores son transformados a medidas relativas de veces de inducción ( $VI_a$ ) para una mejor comparación entre los experimentos:

$$VI_a = 2^{\Delta C_T} \quad (3)$$

Luego, se normalizaron nuevamente los niveles de cDNA de las muestras con su correspondiente control de carga (Actina) de la siguiente manera:

$$VI_b = VI_a \text{ muestra} / VI_a \text{ actina} \quad (4)$$

Donde  $VI_b$  representa las veces de inducción normalizada a Actina. Finalmente, los datos se normalizaron respecto al control ( $VI_n$ ).

$$VI_n = VI_b \text{ muestra} / VI_b \text{ control} \quad (5)$$

Para el cálculo de errores de cada medición se obtuvo el desvío estandar (ds) de las mediciones del  $C_T$  de las muestras tratadas y no tratadas del gen y del control de Actina de los datos obtenidos para cada tratamiento:

$$ds = \sqrt{\frac{\sum (C_T - \bar{C}_T)^2}{(n-1)}} \quad (6)$$

donde n es el tamaño de la muestra.

Luego, el error se calculó como la raíz cuadrada de la suma de los errores de los  $C_T$  de las muestras, de los  $C_T$  de los No RT y de los  $C_T$  de Actina (Smith et al., 2004), aplicando la siguiente fórmula:

$$E = [(ds/ C_T)^2 \text{ muestra} + (ds/ C_T)^2 \text{ noRT} + (ds/ C_T)^2 \text{ actina}]^{1/2} \quad (7)$$

y estos datos se multiplicaron por las veces de inducción finales.

### **III.II.4 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD, LA PROLIFERACION CELULAR Y LA APOPTOSIS**

#### **III.II.4.1 MEDICION DE LA VIABILIDAD CELULAR/ ENSAYO MTS**

El MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium), en presencia del metosulfato de fenazina (PMS), produce formazán, un producto soluble en agua que tiene presenta un máximo de absorbancia a 490-500 nm en PBS. Tiene la ventaja sobre el MTT de que los reactivos MTS + PMS se reducen más eficientemente que el MTT y además como el producto es hidrosoluble, disminuye la toxicidad sobre las células.

Para medir la viabilidad celular se utilizó el kit comercial CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células PC3 y MDA PCA 2b fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/200 µl de medio por pocillo (24 h, 37°C) y posteriormente en medio sin suero por 24 h a 37° C. Las células luego se incubaron por 24 h, se agregó al medio hemina o SnPP, y se incubaron por 24 h más. Luego se realizaron dos lavados con PBS, y se agregó 20 µl por pocillo de MTS y las células se incubaron durante 3 h a 37°C. El formazán soluble producido por la reducción celular del MTS se midió a 490 nm en un espectrofotómetro (Anthos 2020). Se realizó una curva estandar para cada línea celular, sembrando las células en densidades crecientes (4.000-40.000 células/pocillo).

#### **III.II.4.2 INCORPORACION DE <sup>3</sup>H-TIMIDINA**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a razón de  $2 \times 10^5$  células por pocillo con medio completo, suplementado con 10% de SFB por 24 h. Inmediatamente luego del tratamiento correspondiente (hemin (70 µM) o SnPP (10 µM) por 24 h), las células fueron incubadas con 1 µCi/ml <sup>3</sup>H-timidina (81 Ci/ mmol; Amersham Biosciences) durante 4 h a 37°C, lavadas 3 veces con PBS frío, cosechadas y centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. Luego fueron lisadas con 500 µl de tricloroacético (TCA) 5% durante 30 minutos y centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. El pellet fue lavado dos veces con agua fría y resuspendido en 50 µl de NaOH 1 M durante 1 h a temperatura ambiente. La radioactividad incorporada fue cuantificada en un contador de centelleo. La síntesis del DNA fue estimada como dpm/µg de proteína. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

### III.II.4.3 ANALISIS DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO

El análisis del ciclo celular fue realizado por FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter Analysis). Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células fueron cosechadas, tripsinizadas, lavadas con 1 ml de PBS frío y centrifugadas a 3.000 rpm por 3 min. Luego las células fueron resuspendidas en PBS frío y centrifugadas nuevamente a 3.000 rpm por 3 min. Los pellets fueron transferidos gota a gota a un tubo Eppendorf conteniendo 1 ml de etanol 70% (v/v) a  $-20^\circ\text{C}$ , donde fueron fijadas por 30 min a  $2^\circ\text{C}$  (las células se almacenaron  $-20^\circ\text{C}$  previo a la tinción y hasta el momento del análisis por citometría de flujo). Las células resuspendidas en etanol fueron centrifugadas a 3.000 rpm por 4 min, lavadas 2 veces con PBS frío, resuspendidas en 0,5 ml de PBS conteniendo  $10 \mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio (IP) y  $250 \mu\text{g/ml}$  RNasa A, permaneciendo en oscuridad a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min. Se utilizó IP como colorante para el análisis del ciclo celular. El IP se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del DNA y produce un aducto altamente fluorescente que puede ser excitado a 488 nm con un ancho de emisión centrado en alrededor de 600 nm. Dado que el IP también puede unirse al RNA, es necesario tratar a las células con RNAasa para una óptima resolución del DNA. Se realizó el análisis en un citómetro de flujo FACSCalibur usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y de 585 nm de emisión. Se empleó un programa para histogramas de deconvolución de la frecuencia del contenido de DNA (ModFit LT cell cycle analysis software) y se graficó el % de células en las distintas fases del ciclo celular. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

### III.II.4.4 CITOMETRIA DE FLUJO PARA ANÁLISIS DE CELULAS APOPTOTICAS

Las células apoptóticas fueron analizadas utilizando AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit 1 (BD Pharmingen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células luego de los tratamientos correspondientes fueron cosechadas, tripsinizadas y centrifugadas a 3.000 rpm por 3 min. Luego de la centrifugación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío y resuspendidas en buffer de binding 1X a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Posteriormente se transfirieron  $100 \mu\text{l}$  de la suspensión celular ( $1 \times 10^5$  células) a un tubo Eppendorf y se agregaron  $5 \mu\text{l}$  de AnexinaV-FITC y  $5 \mu\text{l}$  of PI a cada tubo. Los tubos fueron vortexeados levemente e incubados a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) por 15 min en oscuridad. Finalmente se agregó  $400 \mu\text{l}$  de buffer de binding 1X a cada tubo. Las muestras fueron

analizadas por citometría de flujo durante el transcurso de la hora siguiente. Se realizaron los siguientes controles para establecer las compensaciones y los cuadrantes: 1) células sin teñir, 2) células teñidas solamente con AnexinaV-FITC (sin IP) y 3) células teñidas solamente con IP (sin AnexinaV-FITC). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

### **III.II.5 ANALISIS DE PROTEINAS**

#### **III.II.5.1 PREPARACION DE LISADOS CELULARES**

Las células tratadas, se lavaron dos veces con PBS en presencia de inhibidores de fosfatasas (PMSF 10 mM y NaF 0.5  $\mu$ M) y se cosecharon con el agregado de 120  $\mu$ l de PBS e inhibidores. Luego se centrifugó a 900 g durante 1 min a 4°C y el pellet celular se resuspendió en buffer RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 20 mM; pH 8; deoxicolato de sodio 1% (p/v); azida de sodio 0,02%, SDS 0,1% (p/v); Tritón X-100 1%) con inhibidores (NaF 0,5  $\mu$ M; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,8 mM e inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA). Se incubó en hielo durante 20 min y se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 4 min. El sobrenadante conteniendo las proteínas totales se conservó a -20°C.

#### **III.II.5.2 MEDICION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS**

Se determinó la concentración proteica usando el método del ácido bicinconínico (BCA 98% y CuSO<sub>4</sub> 2%). La curva estandar se realizó utilizando cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) disuelta en buffer de lisis RIPA. Las muestras (10  $\mu$ l) se colocaron en una placa de 96 pocillos que contenía 200  $\mu$ l de CuSO<sub>4</sub>/BCA. Se agitó y se incubó durante 30 min a 37°C. Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (BIORAD Microplate Reader, Benchmark).

### **III.II.6 SDS-PAGE Y WESTERN BLOT**

#### **III.II.6.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

Las proteínas aisladas de los lisados celulares fueron diluídas a la concentración deseada con buffer de siembra (en un volumen final de 50 ml: 2,5 ml de Tris HCl 1M pH 8; 25 ml



de SDS 10%; 10 ml glicerol; 12,5g de sacarosa, una punta de espátula de azul de bromofenol) y buffer de lisis RIPA. Luego las muestras se calentaron durante 10 min a 80°C.

### **III.II.6.2 ELECTROFORESIS**

Las muestras fueron preparadas como se describió anteriormente y se sembraron 25 µl de cada de cada una por pocillo. Adicionalmente se sembró en otro pocillo el marcador de peso molecular (Rainbow Marker (Amersham GE)). Se utilizó el sistema vertical de Bio-Rad. Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida 10% en condiciones desnaturalizantes a 120V, por 1:30 h en presencia de buffer de electroforesis 1X (12 g Tris; 57,6 g glicina; 40 ml SDS 10 % 9 (v/v) en un volumen final de 1 l).

### **III.II.6.3 TRANSFERENCIA A MEMBRANA DE NITROCELULOSA**

Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso un filtro de nitrocelulosa (Hybond, Amersham Pharmacia). Una de las caras del gel fue apoyada sobre un trozo de nitrocelulosa del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3M previamente humedecidos en buffer de transferencia (Towbin) 1X (Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 3,5 mM; pH 8,3 y metanol 20% (v/v)) y éstos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en el tanque electroforético, con buffer de transferencia 1X, con el filtro de nitrocelulosa del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 250 mA, durante 90 min. Se verificó que la transferencia fuese exitosa tiñendo las membranas con rojo Ponceau (0,1% Rojo Ponceau, 5% ácido acético). La decoloración de la membrana se llevó a cabo lavando varias veces con buffer TBS-T (NaCl 150 mM; KCl 2,68 mM; Tris base 24,7 mM; Tween-20 0,05% (v/v); pH 7,4).

### **III.II.6.4 INMUNODETECCION DE PROTEINAS**

Para realizar la detección de las proteínas en primer lugar se bloquearon las proteínas inespecíficas con TBS-T (Tween-20 005% (v/v) en 10mM Tris-HCl; pH 7.4) con 5% (p/v) de leche en polvo durante 60 min. Luego las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron durante 16 h (ON) a 4°C, con agitación suave, con los diferentes anticuerpos

primarios diluidos en TBS-T. Después de realizar 3 lavados de 15 min con TBS-T con agitación suave, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-conejo (1:5000) o anti-ratón (1:1000), según el anticuerpo primario utilizado, acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) y diluidos en TBS-T, durante 1:30 h, a temperatura ambiente, con agitación suave. Luego las membranas se lavaron con TBS-T.

Para visualizar las proteínas se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La visualización de las bandas se realizó con el analizador de imágenes Phosphoimager (Fuji Photo Film Co. Ld., Cypress, CA). Las bandas se cuantificaron densitométricamente utilizando el programa NIH ImageQuant y los resultados de normalizaron con  $\beta$ -actina.

### **III.II.7 INMUNOFLUORESCENCIA**

#### **III.II.7.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células de cada línea (PC3, PC3pcDNA3 y PC3HO-1) sobre cubreobjetos (20 mm x 20 mm) en placas de 6 pocillos. Luego de los tratamientos los cultivos fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y las células fijadas con paraformaldehído 4% v/v en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Los lavados se repitieron 3 veces. Posteriormente las células fueron permeabilizadas con tritón 0,2% (v/v) en PBS, por 15 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó mediante la utilización de una solución de BSA 1% (p/v) durante 1 h, a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se posicionaron boca arriba sobre Parafilm en una placa de Petri y se les agregó 150  $\mu$ l del anticuerpo primario correspondiente (HO-1, dilución 1:400; Vimentina, dilución 1:200), ON a 4°C con agitación suave. Luego los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se procedió a incubarlos durante 1 h, a temperatura ambiente, en oscuridad, con los anticuerpos secundarios específicos conjugados con un fluoróforo (rojo, Alexa flúor 594, Molecular Probe Invitrogen, para HO-1 y verde, Alexa flúor 488, Molecular Probe Invitrogen, para vimentina, dilución 1:1000 en PBS con BSA 1%). Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS, los cubreobjetos se sumergieron en agua y se invirtieron sobre un portaobjetos conteniendo 10  $\mu$ l de medio de montaje (VectaShield de Vector H1000) con el colorante

DAPI (Sigma D-8417, dilución 1/10000, pico máximo en el espectro de excitación/emisión: 358/461nm).

### **III.II.7.2 MICROSCOPIA CONFOCAL**

Las muestras teñidas según el protocolo de inmunofluorescencia (HO-1 o vimentina) o con el colorante fluorescente (DAPI) fueron observadas con un microscopio confocal Nikon i80 acoplado a una cámara refrigerada. La adquisición de las imágenes se obtuvieron utilizando el programa Nikon ACT-1 versión 2.63 copyright (c) 2000, Nikon Corporation. Las fotos fueron tomadas con objetivo de 63x, aumento total 630x (ocular 10x). Los parámetros de adquisición de la imagen fueron optimizados para cada foto individual, a fin de que la ganancia de la señal no se encuentre saturada y la señal de fondo/ruido sea casi nula.

### **III.II.8 ZIMOGRAFIA**

Con el objetivo de detectar la actividad proteolítica (gelatinasa) de MMP9 en las células de PCa se realizó la técnica de zimografía, para la cual se arman geles conteniendo gelatina como sustrato.

Muestras de medio condicionado de cada condición experimental, conteniendo igual cantidad de proteínas, llevadas a 10  $\mu$ l con el agregado de buffer (SDS 5% (v/v), glicerol 20% (v/v) en Tris-HCl 0.4 M, pH 6,8 conteniendo azul de bromofenol sin 2-mercaptoetanol) fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida (10%) conteniendo gelatina (2 mg/ml). La electroforesis fue realizada en condiciones no desnaturalizantes a voltaje constante de 100V y durante 2 h a 4°C.

Luego de la corrida electroforética se realizaron 6 lavados, de 5 minutos cada uno, en Triton X-100 2,5% (v/v) para eliminar el SDS presente y tres lavados, de 10 min, en PBS para eliminar el Triton del lavado anterior. Los geles fueron incubados ON a 37 ° C con agitación, en una solución de Tris-HCl 50 mM; pH 7.4 conteniendo NaCl 0.15 mM y CaCl<sub>2</sub> 30 mM. La solución fue removida luego de la incubación y el gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue G-250 al 0,5% (p/v) en metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) por 45 minutos. El gel fue desteñido con una solución conteniendo metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v) hasta que la actividad gelatinolítica fue detectada por la presencia de

bandas claras sobre un fondo azul. Todo el proceso de teñido y desteñido fue realizado en agitación a temperatura ambiente.

Los controles negativos de la técnica zimográfica fueron realizados agregando EDTA 0,2  $\mu$ M al buffer de incubación el cual anula toda actividad de metaloproteasas en su forma activa o latente.

La identificación de cada banda de degradación, correspondientes a MMP9 fue realizada usando marcadores de peso molecular estándares comerciales preteñidos considerando que el peso molecular de la metaloproteasa es de 92 kDa. Sin embargo, en algunos casos se ha observado la presencia de formas latentes de proMMP9 que pueden ser detectadas en estos geles debido a la presencia de SDS en la corrida electroforética que desestabiliza la unión de cisteína al átomo de zinc, activando así al zimógeno. Estas bandas de degradación enzimática son específicas ya que desaparecen cuando el gel es incubado en presencia de EDTA.

La intensidad de las bandas, correspondiente a la actividad enzimática, fue determinada con un Phosphoimager (Fuji Photo Film Co. Ld., Cypress, CA) y analizadas con el programa de densitometría ImageJ 1.37.v software (NIH, USA). Los datos fueron cuantificados como veces de actividad y comparados con el control. Para ello, previo a la comparación, los datos obtenidos en la densitometría de la MMP se normalizaron con la proteína total por análisis densitométrico en cada condición experimental.

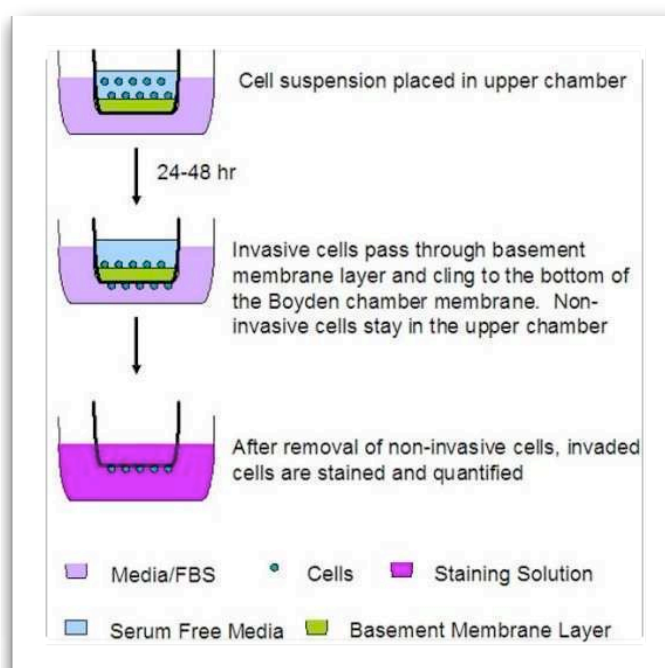
### **III.II.9 ENSAYOS CELULARES**

#### **III.II.9.1 INVASION CELULAR**

Las células metastásicas producen enzimas proteolíticas (ejemplo: colagenasas, activadores de plasminógeno, hidrolisados lisosomales) y también presentan expresión aumentada de ciertos receptores de proteasas de superficie de membrana. El ensayo de invasión consiste en colocar unos insertos de membrana de policarbonato (tamaño del poro: 8  $\mu$ m) en los pocillos de una placa de 24 pocillos. La superficie superior de los insertos está recubierta con una capa uniforme de Matrigel®. Esta capa de Matrigel® sirve como una barrera para discriminar entre las células invasivas y las no invasivas. Las células invasivas son capaces de degradar las proteínas de la matriz en esta capa, y atravesar los poros de la membrana de

policarbonato. Finalmente las células son removidas de la zona superior de la membrana y las que invadieron son teñidas y cuantificadas.

El ensayo de invasión se hizo a través de cámaras recubiertas de Matrigel® (Fig. 19). Se colocaron 200 µl por inserto y se dejó reposar por 2 h a temperatura ambiente. Se sembraron las distintas líneas celulares: PC3, PC3 tratadas con hemina o con SnPP, Pc3HO-1, PC3pcDNA3, MDA PCa 2b, MDA PCa 2b tratada con hemina, MDA PCa 2b control siRNA, MDA PCa 2b siRNAHO-1, LNCaP y LNCaP tratada con hemina ( $2 \times 10^6$  células/250ml de medio), en las cámaras superiores de los insertos. Los pocillos inferiores fueron llenados con 500 µl de medio de cultivo (correspondiente a cada línea celular). Luego de 24 h de incubación a 37°C se retiraron los insertos de los pocillos, se lavaron suavemente con 1 ml de PBS 1 X, se fijaron en metanol 100% (v/v) por 10 minutos (500 µl/pocillo) y finalmente se tiñeron con cristal violeta 0,1% (p/v) (Sigma) por 5 min. Luego se aspiró el cristal violeta, se lavaron los pocillos con agua para remover el exceso del colorante y las células que habían quedado en la parte superior de los insertos se removieron con un hisopo. Las células que habían atravesado los insertos hacia la cara inferior de los mismos, fueron contadas en 4 campos distintos por microscopía óptica. Se utilizó el test de Mann-Whitney (test no-paramétrico) con  $P < 0,05$  como criterio para la significancia estadística.



**FIGURA 19. Esquema del ensayo de Invasión** ([http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub2.pl?sub1=cell\\_invasion&sub2=fluorometric\\_cell\\_invasion\\_assays&main\\_group=cell\\_biology](http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub2.pl?sub1=cell_invasion&sub2=fluorometric_cell_invasion_assays&main_group=cell_biology)).

### **III.II.9.2 MIGRACION CELULAR**

La evaluación de la migración celular se hizo a través de un ensayo de “wound healing” (Petit y Thiery, 2000). Este método “imita” la migración celular durante la cicatrización in vivo. Los pasos involucran crear una “herida” en una monocapa celular, capturando las imágenes al comienzo y a intervalos regulares durante la migración celular al cerrar la herida, y comparando las imágenes para cuantificar la tasa migratoria de las células.

Se sembraron las células en placas de Petri de 35 mm de diámetro y se cultivaron por 24 h. Luego se hizo una herida con un tip de una micropipeta de 200  $\mu$ l, dejando al descubierto una sección de la monocapa celular. Las células fueron luego monitoreadas por fotografía “Time-Lapse” (1 cuadro cada 60 s durante un período total de 24 h). Las imágenes fueron tomadas montando el sistema sobre un microscopio invertido (Diavert, Leitz Wetzlar, Germany) equipado con una cámara digital Canon A520 o una Canon Rebel 350 XT acopladas sobre el microscopio. De esta manera se tomaron imágenes a intervalos regulares mediante un programa desarrollado por (Salierno et al., 2007) que controla las cámaras desde una PC y guarda las fotos en un disco rígido o mediante el programa comercial desarrollado para cámaras Canon GBtimelapse.

La cuantificación del ensayo fue realizada midiendo: 1) el área descubierta de la herida cada 6 h durante 24 h con el programa ImageJ 1.37v (NIH, USA; los gráficos representan el porcentaje de herida descubierta en los distintos intervalos de tiempo, tomando un valor de 100% de herida descubierta a 0 h; 2) la tasa migratoria calculada como la pendiente del área de la herida descubierta/ tiempo transcurrido; los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes  $\pm$  SD.

### **III.II.10 RT-qPCR MICROARRAYS DE EXPRESION**

#### **III.II.10.1 RT-qPCR OLIGO GEARRAY® HUMAN ANGIOGENESIS MICROARRAY ANALYSIS**

Se aisló y extrajo RNA de cultivos celulares de PC3, PC3HO-1, PC3pcDNA3 y MDA PCa 2b como se detalló anteriormente. Las muestras fueron enviadas en hielo seco a SuperArray Bioscience Corporation (Maryland, USA) para realizar el microarray: “RT-qPCR Oligo

GEArray® Human Angiogenesis Microarray análisis”. Se analizaron ciento trece genes relacionados con inflamación y angiogénesis. Los datos obtenidos fueron normalizados con los genes: B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH y ACTB. Se realizaron dos experimentos independientes.

### **III.II.11 TUMORES DE CANCER DE PROSTATA HUMANO CRECIENDO COMO XENOGRAFOS EN RATONES *NUDE*.**

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratones (*nu/nu*) machos atímicos de seis a ocho semanas de edad, con un peso aproximado de 20 g, provenientes del bioterio de la CONEA (Comisión Nacional de Energía Atómica- CENTRO ATOMICO EZEIZA-U.A. APLICACIONES TECNOLOGICAS Y AGROPECUARIAS – BIOTERIO- Buenos Aires, Argentina). Estos ratones son congénitamente atímicos y presentan una severa inmunodeficiencia. El tratamiento y manipulación de los animales se realizó de acuerdo a los lineamientos de la “Guía para el Bienestar de los animales en la Neoplasia Experimental” (United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research) y de acuerdo a la “guía establecida para el cuidado y uso de animales de laboratorio” elaborado por el Comité de la Asociación Argentina de especialistas en animales de laboratorio (AADEALC). Para cada experimento se utilizaron 10 ratones, los cuales fueron randomizados en dos grupos: PC3HO-1 y PC3pcDNA3. Se inyectaron *s.c.*  $3,6 \times 10^6$  células (PC3HO-1 o PC3pcDNA3, en 200  $\mu$ l de RPMI) en el flanco derecho de los animales ( $n=5$  para cada grupo), utilizando una jeringa monoject 200, 30-gauge x  $\frac{1}{2}$ . El tamaño de los tumores se midió con un calibre comenzando en el día 8 luego de la inoculación, cuando los tumores se volvieron palpables bajo la piel. Los volúmenes tumorales se calcularon utilizando la fórmula  $\pi/6 \times a \times b^2$ , donde  $a$  es la dimensión mayor del tumor y  $b$  corresponde al ancho del mismo. Los animales fueron sacrificados bajo anestesia, después de 23 días de la generación de los xenógrafos. Los tumores se extirparon y se congelaron en nitrógeno líquido, para su posterior procesamiento para ensayos de inmunohistoquímica y extracción de RNA. Se realizaron dos experimentos independientes.

### III.II.12 PROCESAMIENTO DE LOS TUMORES PARA EXTRACCION DE RNA

Para la disgregación de los tumores se utilizaron escalpelos. Los trozos obtenidos se colocaron en buffer RLT (relación 1:4 p/v) y se homogeneizaron con un Ultraturrax (pulsos de 10 s, a potencia máxima). El RNA se extrajo según el protocolo descrito anteriormente utilizando un RNeasy Mini Kit (QIAGEN) (sección III.II.3).

### III.II.13 HISTOLOGIA E INMUNOHISTOQUIMICA

Los tumores subcutáneos fueron removidos, fijados inmediatamente en para-formaldehído 4% (v/v) y procesados para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes sucesivos de 5 µm de espesor, siendo el primero coloreado con la técnica de hematoxilina-eosina; los restantes cortes, en blanco, se utilizaron para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas.

Para la técnica inmunohistoquímica se utilizó el sistema del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa. (LSAB ® + kit, HRP, DAKO). Brevemente, los cortes fueron desparafinados con xileno e hidratados con etanol en concentraciones decrecientes y con agua destilada. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (v/v) durante 10 min. Se realizaron varios lavados con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 2% (p/v) en PBS durante 20 min. La recuperación de antígenos se llevó a cabo con el sistema de microondas (750W, 3x1 min) en buffer citrato de sodio 10 mM; pH 6. Para estudiar la expresión de HO-1 y MMP9 las muestras se incubaron respectivamente con el anticuerpo HO-1 policlonal de conejo diluído 1:50 en PBS o con el anticuerpo MMP9 de ratón diluído 1:400 en PBS, ON a 4°C en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron incubando a las muestras con PBS en ausencia del anticuerpo primario. Luego los cortes se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG biotilado (DAKO LSAB + Kit, HRP) por 30 min y por último con estreptavidina conjugada con peroxidasa (DAKO LSAB + Kit, HRP) por 30 min. La reacción de la peroxidasa con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) (DAKO LSAB + Kit, HRP) formó un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. Se realizó una leve contra-coloración con hematoxilina al 10% y finalmente los cortes fueron montados con bálsamo, en forma definitiva, para su posterior evaluación. Los preparados fueron evaluados por el Dr. Roberto P. Meiss, Jefe de la División Patología Experimental de



la Academia Nacional de Medicina. La evaluación de los resultados se realizó señalando la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de la marcación. En los casos positivos se indicó la localización extra y/o intracelular; en la localización intracelular se señaló, a su vez, la ubicación nuclear y/o citoplasmática de la marcación. En los casos positivos se realizó un análisis semi-cuantitativo clasificando la intensidad de la marcación como: leve (1+), moderada (2+) o intensa (3+).

#### **III.II.14 ANALISIS ESTADISTICO**

La evaluación estadística de los datos se realizó en base a los valores promedios y desvío estandar (SD) o promedio de error estandar (S.E.M) de “n” experimentos independiente. Para los ensayos *in vitro* se utilizó el test de Mann-Whitney (test no-paramétrico) con  $P < 0,05$  como criterio para la significancia estadística. Para los ensayos *in vivo* se hizo el análisis de ANOVA (one-way) seguido del test de Dunnett's test, con  $P < 0,05$  como criterio para la significancia estadística.

# RESULTADOS

---

**CAPITULO IV****RESULTADOS**

La patogénesis del PCa refleja componentes tanto hereditarios como ambientales. Recientemente se ha propuesto que la inflamación, desencadenada por agentes infecciosos o exposición a otros factores, aumenta la tumorigénesis del PCa (De Marzo et al., 2007). Más aún, los ROS, producidos durante la inflamación, pueden causar daño oxidativo al DNA en las células epiteliales o reaccionar con otros componentes celulares iniciando así una reacción en cadena de radicales libres (Ames et al., 1995). Por lo tanto, el estrés oxidativo puede cumplir un rol importante en el proceso carcinogénico (De Marzo et al., 2007).

En este contexto, HO-1 sirve como un gen protector por sus habilidades anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y anti-proliferativas manifestadas en varios tipos celulares (Otterbein et al., 2003). Las evidencias sugieren que HO-1 ejerce un rol en el control del crecimiento celular de manera tejido específico (Berberat et al., 2005). Hemina, un potente inductor de esta proteína, atenúa la inflamación vía la activación de HO-1, la cual se correlaciona con la reducción de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (Datta et al., 1999; Lin et al., 2003; Vicente et al., 2003). Por lo tanto, la inducción de HO-1 es uno de los eventos clave en la respuesta celular a los insultos oxidativos e inflamatorios (Prawan et al., 2005).

HO-1 se expresa en líneas celulares derivadas de distintos cánceres (Busserolles et al., 2006; Liu et al., 2004; Nishie et al., 1999) y en tumores primarios (Fang et al., 2003; Mayerhofer et al., 2004; Tsuchihashi et al., 2003; Tsuji et al., 1999), sin embargo aún no se le puede adjudicar una función clara en esta enfermedad. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos encontrado que HO-1 se expresa en PCa y demostramos por primera vez que la expresión nuclear de HO-1 puede definir a un subgrupo de pacientes con tumores primarios de próstata y que la modulación de la expresión de esta proteína podría representar nuevas alternativas terapéuticas para esta enfermedad (Sacca et al., 2007).

En este trabajo utilizamos líneas celulares de cáncer de próstata, sensibles e insensibles a andrógenos y evaluamos si la modulación química o genética de su expresión podría tener impacto *in vitro* sobre la proliferación, invasión y migración celular e *in vivo* sobre el crecimiento tumoral.

**1<sup>RA</sup> PARTE****IV.I EFECTOS *IN VITRO* DE LA MODULACION FARMACOLOGICA DE LA EXPRESION DE HO-1 SOBRE DISTINTOS PROCESOS CELULARES****IV.I.1 HO-1 SE SOBRE-EXPRESA EN LAS LINEAS TUMORALES DE PROSTATA SENSIBLES A ANDROGENOS**

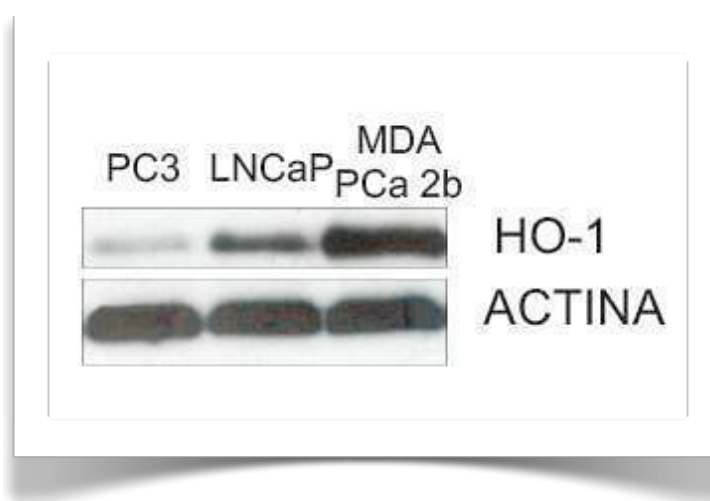
Los niveles de expresión endógena de HO-1 fueron examinados en tres líneas celulares de PCa: PC3 (insensible a andrógenos, derivada de una metástasis ósea de PCa), LNCaP (sensible a andrógenos, derivada de una metástasis a nódulo linfático de PCa) y MDA PCa 2b (sensible a andrógenos, derivada de una metástasis ósea de PCa). Primeramente cabe destacar que las tres líneas presentan una morfología diferente. En el caso de los cultivos de PC3, se observaron células fusiformes y moderada cantidad de células redondeadas y ovoides (Fig. 20). En los cultivos de LNCaP se detectó mayoritariamente células fusiformes estrelladas, con escasa presencia de células redondeadas aisladas, mientras que en los cultivos de MDA PCa 2b hubo predominio de células epiteliales con formas redondeadas, amoldadas entre sí y dispuestas en colgajos; también se identificaron escasas células fusiformes (Fig. 20).



**FIGURA 20.** Morfología de las líneas de cáncer de próstata.

Las células se crecieron y cultivaron bajo las condiciones descriptas en *materiales y métodos*. Las células PC3, LNCaP y MDA PCa 2b se visualizaron por microscopía óptica y se tomaron fotografías de los cultivos. Magnificación final: 500 x.

Mediante ensayos de Western Blot detectamos niveles endógenos diferenciales de HO-1 en las tres líneas estudiadas (cuantificación relativa: PC3 = 1, LNCaP = 2,08 y MDA PCa 2b = 6,7), presentando las células sensibles a andrógenos alta expresión de la proteína HO-1, con los mayores niveles observados en las células MDA PCa 2b, mientras que en las células PC3, insensibles a andrógenos, su expresión fue la menor (Fig. 21). Es ampliamente aceptado que la respuesta a andrógenos dispara estrés oxidativo (Venkateswaran et al., 2002) y por lo tanto, podemos especular que la alta expresión de HO-1 en LNCaP y MDA PCa 2b (que expresan el receptor de andrógeno y son sensibles a dicha hormona) podría estar asociada funcionalmente a un receptor de andrógeno activo.



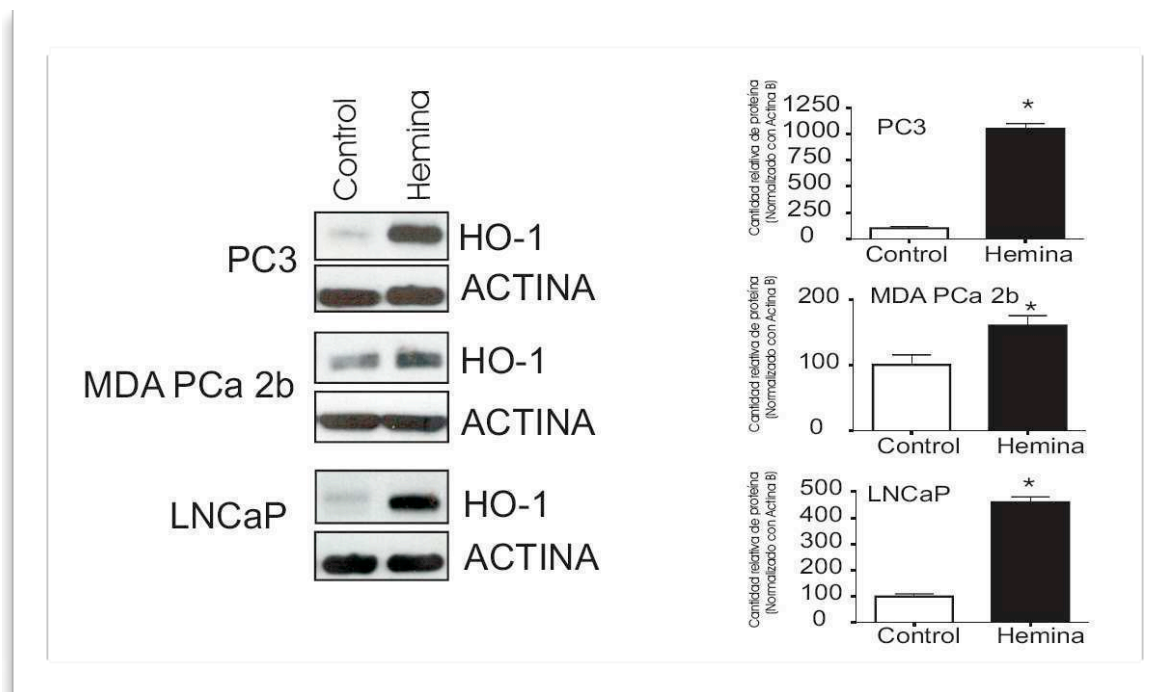
**FIGURA 21.** Expresión endógena de HO-1 en las líneas de cáncer de próstata.

Las células se crecieron y cultivaron bajo las condiciones descritas en *materiales y métodos*. Se extrajeron las proteínas totales y la expresión de HO-1 se analizó por Western Blot. Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga.

#### **IV.I.2 EL TRATAMIENTO CON HEMINA INDUCE LA EXPRESION DE HO-1 EN LAS LINEAS TUMORALES DE PROSTATA**

Dado el rol emergente de HO-1 como una proteína anti-inflamatoria con potencial para brindar protección ante distintos desafíos de estrés, nos planteamos si era factible inducir su expresión en todas las líneas tumorales de próstata utilizadas, las cuales poseían niveles basales diferenciales de la misma. Primeramente se estudió el efecto de la hemina sobre la expresión de HO-1 a diferentes dosis (30-80  $\mu$ M) y tiempos de tratamiento (1, 3, 6, 12, 18, 24 h) en las tres líneas celulares (datos no mostrados). Del análisis de los resultados obtenidos se seleccionó para los estudios posteriores una concentración de hemina de 70  $\mu$ M y un tiempo de exposición de los cultivos de 24 h, debido a que en estas condiciones se

obtuvieron incrementos significativos de los niveles de HO-1 en los tres tipos celulares. A nivel proteico, el tratamiento con hemina resultó en una inducción de la expresión de HO-1 de 10 veces en PC3; de 4,6 veces en LNCaP y de 1,6 veces en MDA PCa 2b, respecto a los cultivos crecidos en su ausencia, como se determinó por ensayos de Western Blot (Fig. 22).



**FIGURA 22. Inducción por hemina de la expresión proteica de HO-1 en líneas de cáncer de próstata.**

Las células PC3, LNCaP y MDA PCa 2b fueron expuestas a hemina (70  $\mu$ M) durante 24 h o cultivadas en su ausencia (control). La expresión de HO-1 se analizó por Western Blot y se cuantificó usando el software ImageJ (NIH, USA). Los datos se normalizaron respecto de  $\beta$ -actina. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se calculó la media  $\pm$  desviación estandar (SD) y se graficó como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

Con el objetivo de evaluar si esta inducción ocurría a nivel transcripcional, inicialmente analizamos de manera semi-cuantitativa los niveles de mRNA de HO-1 por RT-PCR, detectándose un aumento de la expresión HO-1 en PC3 y MDA PCa 2b (Fig. 23).



FIGURA 23. Detección por RT-PCR de la inducción del mRNA de HO-1 en PC3 y MDA PCa 2b.

Se extrajo el RNA total de las células expuestas a hemina (70 μM, 24 h) o cultivadas en su ausencia (control) y los niveles de mRNA de HO-1 se determinaron por RT-PCR. Los círculos rojos muestran la sobre-expresión de HO-1 bajo el tratamiento con hemina en ambas líneas celulares.

Posteriormente estos incrementos se confirmaron de manera más específica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), detectándose una inducción de la expresión del mRNA de HO-1 de 36.8 veces en el caso de PC3, de 4 veces para LNCaP y de 6.3 veces en MDA PCa 2b ( $P < 0,05$ ; Fig. 24). Estos resultados muestran que HO-1 puede ser modulada farmacológicamente en líneas celulares de PCa, tanto sensibles como insensibles a andrógenos.

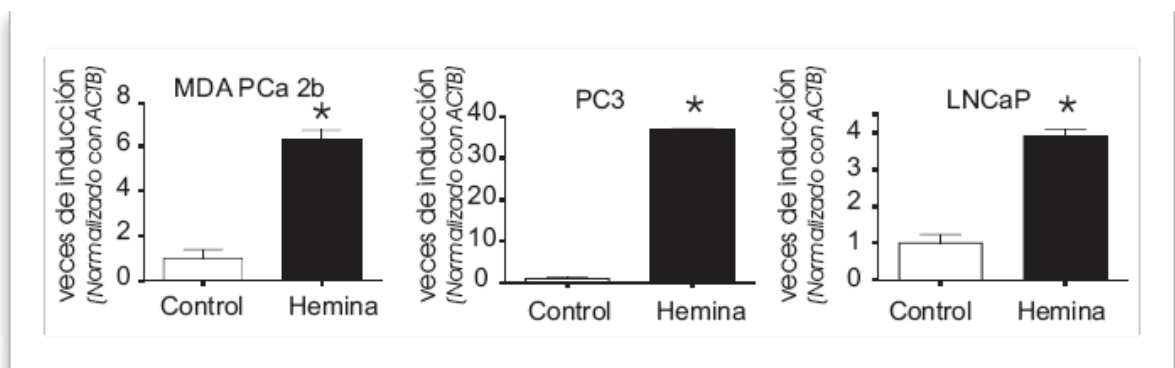


FIGURA 24. Inducción por hemina de los niveles del mRNA de HO-1 en líneas de cáncer de próstata.

Se extrajo el RNA total de células PC3, LNCaP y MDA PCa 2b expuestas a hemina (70 μM, 24 h) o cultivadas en su ausencia (control) y los niveles del mRNA de HO-1 se determinaron por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Los datos se normalizaron respecto de β-actina. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en *materiales y métodos*. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

Luego analizamos si la hemina afectaba la actividad del promotor de HO-1. Para ello utilizamos los siguientes genes reporteros: el promotor de HO-1 completo de 4.9 Kb clonado río arriba de la luciferasa (hHO4.9luc) y dos construcciones conteniendo un sitio CRE mutado (hHO4.9\_M1luc), o un sitio MARE mutado (hHO4.9\_M2luc) dentro del promotor, ambos elementos de respuesta anti-oxidante (ARE). La actividad del promotor hHO4.9luc visualizada por bioluminiscencia fue inducida significativamente por hemina en PC3 y LNCaP (Fig. 25), mientras que la respuesta fue completamente anulada cuando se utilizaron los reporteros con los promotores mutados (Fig. 25), sugiriendo que ambos sitios ARE son requeridos para la inducción de HO-1 por hemina. Estos resultados indican que HO-1 es regulada por hemina a nivel transcripcional en líneas celulares de PCa sensibles e insensibles a andrógenos.

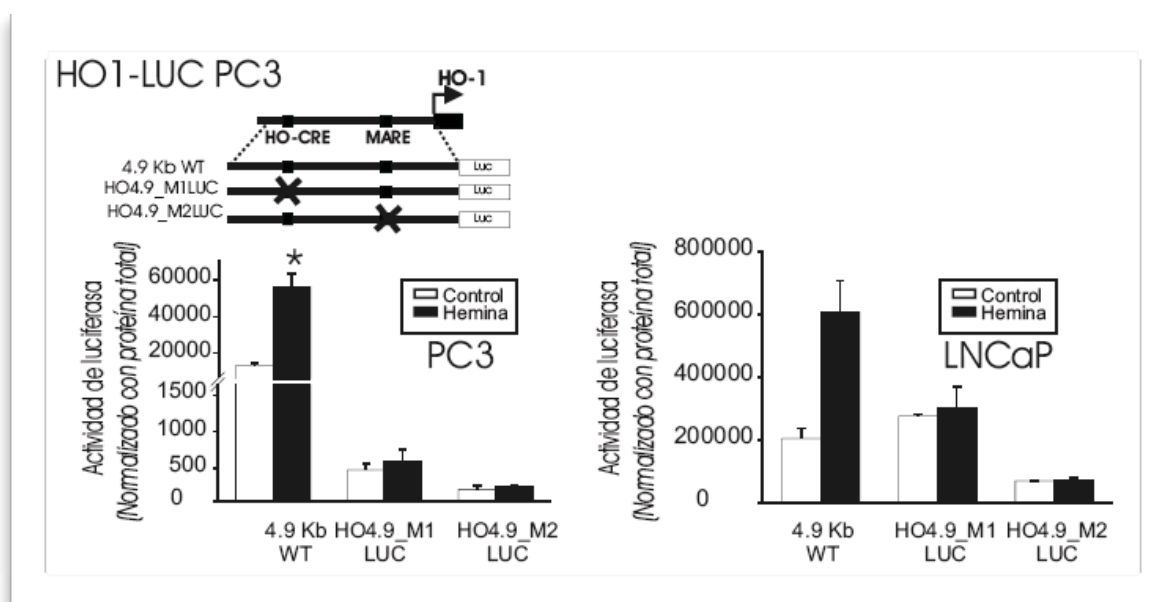


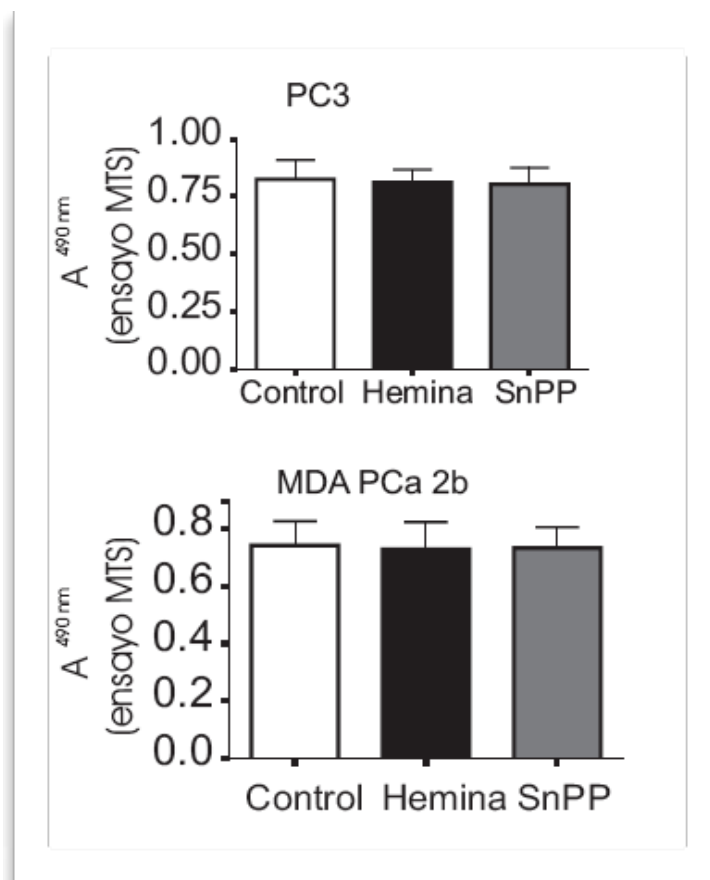
FIGURA 25. Inducción por hemina de la actividad del promotor de HO-1 en líneas de PCa.

Las células PC3 y LNCaP fueron transfectadas con el plásmido hHO4.9luc (promotor completo) o con la misma región promotora con los sitios HO-CRE o MARE mutados (hHO4.9\_M1luc o hHO4.9\_M2luc, respectivamente). Luego de la transfección las células fueron mantenidas en medio completo (control) o estimuladas con hemina (70 $\mu$ M, 24 h). Posteriormente fueron lisadas y se llevó a cabo el ensayo de actividad de luciferasa. Cada transfección se realizó por triplicado. Los datos se normalizaron respecto a la concentración de proteínas totales. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  SD. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

A fin de descartar efectos citotóxicos provocados por el fármaco utilizado, se realizaron ensayos de viabilidad celular (MTS) y de apoptosis (Anexina V-FITC/IP) en cultivos celulares expuestos a hemina 70  $\mu$ M, durante 24 h. Se comprobó que este compuesto a la



concentración y tiempo utilizados no provocó alteraciones ni en la viabilidad celular (Fig. 26) ni en la apoptosis (Fig. 27).



**FIGURA 26.** Ensayo de viabilidad celular por MTS en PC3 y MDA PCa 2b.

Las células PC3 y MDA PCa 2b se cultivaron en ausencia (control) o presencia de hemina (70  $\mu$ M, 24 h) o SnPP (10  $\mu$ M, 24 h) y la viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTS. Se graficaron los valores promedio de absorbancia  $\pm$  SD. Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

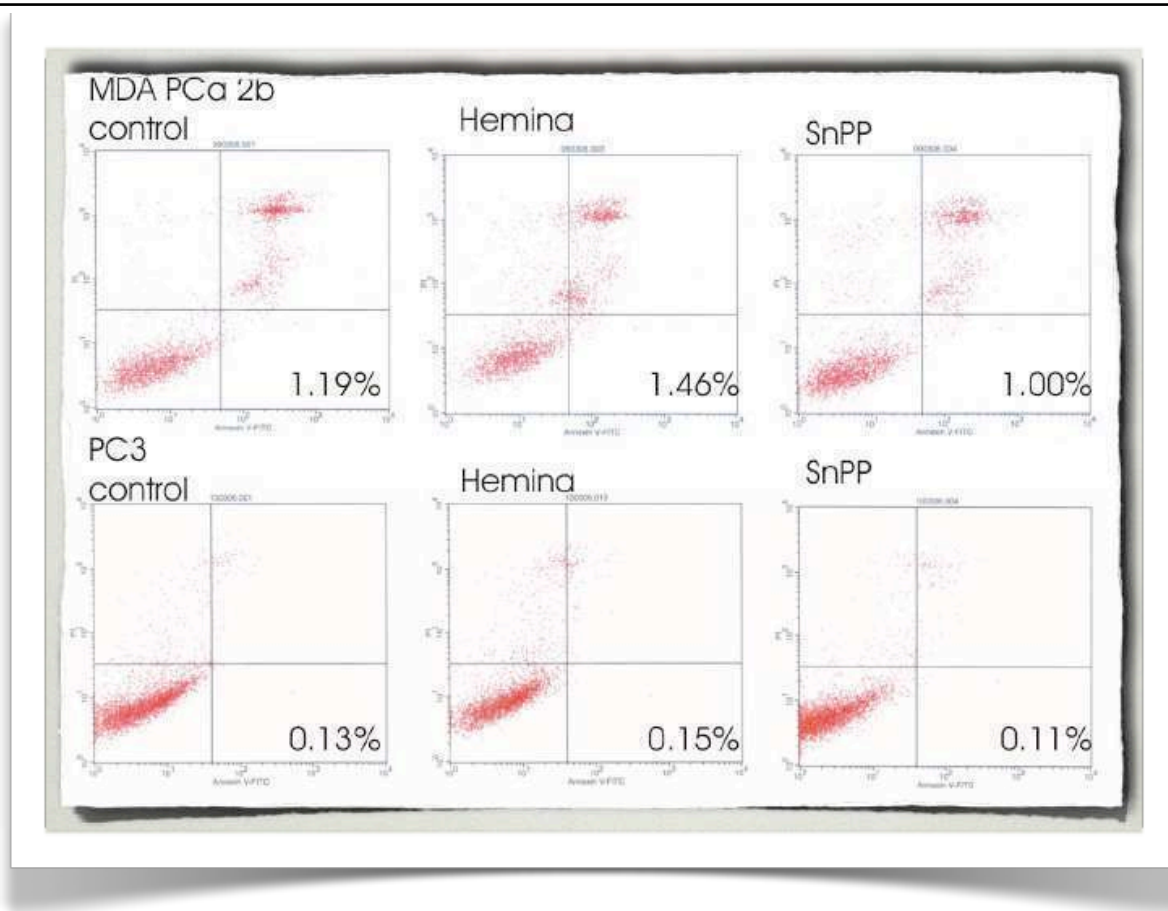


FIGURA 27. Ensayo de apoptosis celular por Anexina V-FITC/IP en líneas de cáncer de próstata.

Las células PC3 y MDA PCa 2b se cultivaron en ausencia (control) o presencia hemina (70  $\mu$ M, 24 h) o SnPP (10  $\mu$ M, 24 h) y luego fueron teñidas con Anexina V-FITC y con yoduro de propidio (IP). La apoptosis celular se determinó por citometría de flujo en un FACS Calibur utilizando el software *Cellquest*. Los gráficos muestran la cuantificación de la apoptosis temprana, tardía y total. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

#### IV.I.3 EFECTO CELULAR DE LA INDUCCION FARMACOLÓGICA DE HO-1 SOBRE LAS LINEAS TUMORALES DE PROSTATA.

Las células normales requieren de señales de crecimiento mitogénicas para que puedan entrar en un estado proliferativo activo. Estas señales son transmitidas dentro de las células por receptores transmembrana que se unen a diferentes moléculas de señalización: factores de crecimiento solubles, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión/interacción célula-célula. Ningún tipo de célula normal puede proliferar en ausencia de tales señales estimuladoras. En el cáncer, las células invariablemente muestran una reducida respuesta a la estimulación exógena del crecimiento, generando sus propias señales y evadiendo la dependencia del microambiente tisular. Esta liberación interrumpe un mecanismo homeostático crítico que normalmente opera para asegurar el comportamiento apropiado de las diferentes células dentro de un tejido.

La desregulación de la proliferación celular juega un rol esencial en la carcinogénesis y la posibilidad de gobernar dicho proceso es de importancia para controlar el desarrollo de las lesiones malignas. A su vez, la habilidad para migrar, invadir y dar metástasis capacita a las células cancerosas para escapar de la masa tumoral primaria y colonizar un nuevo terreno en el cuerpo donde, al menos inicialmente, los nutrientes y el espacio no se encuentran limitados. La invasión y la metástasis son procesos excesivamente complejos y sus determinantes genéticos y bioquímicos aún permanecen desconocidos. A nivel mecánico estos procesos están íntimamente ligados. Ambos utilizan estrategias operacionales similares involucrando cambios en el microambiente de las células y activación de las proteasas extracelulares (Mantovani, 2009).

#### IV.I.3.1 TRATAMIENTO CON HEMINA

##### i. PROLIFERACION CELULAR

Con el objetivo de analizar si la inducción de HO-1 ejercía un efecto sobre el crecimiento se decidió evaluar la proliferación celular bajo inducción farmacológica de HO-1. Se utilizó el método de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina. En las tres líneas celulares PC3, LNCaP y MDA PCa 2b, se observó una disminución significativa (23%; 35,5% y 45,5% respectivamente;  $P < 0,05$ ) de la proliferación celular, cuando los cultivos se expusieron a hemina (70  $\mu\text{M}$ , 24 h) respecto a las células crecidas en condiciones control (Fig. 28).

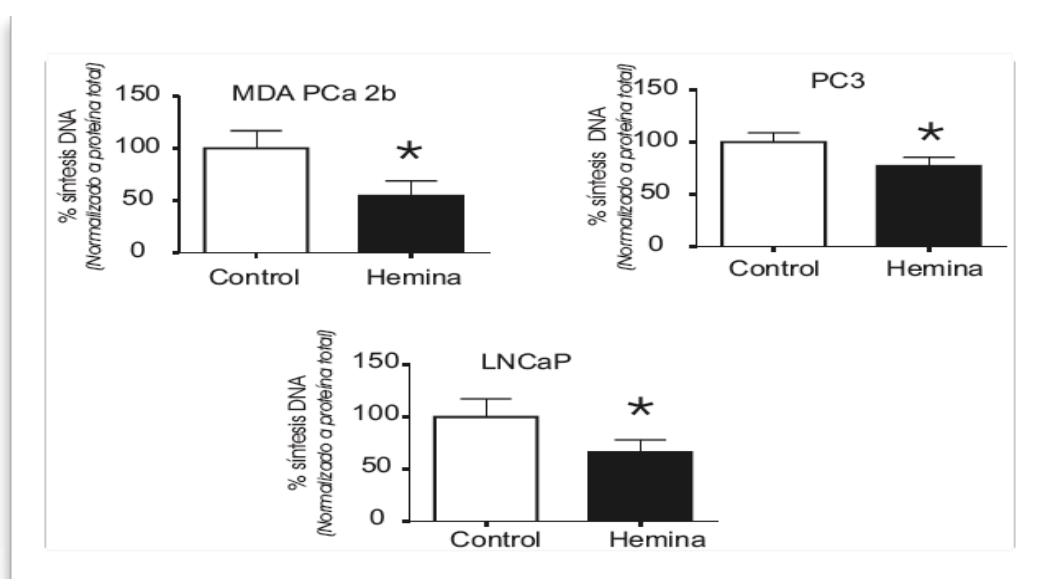


FIGURE 28. El tratamiento con hemina inhibe la proliferación celular en líneas de cáncer de próstata.

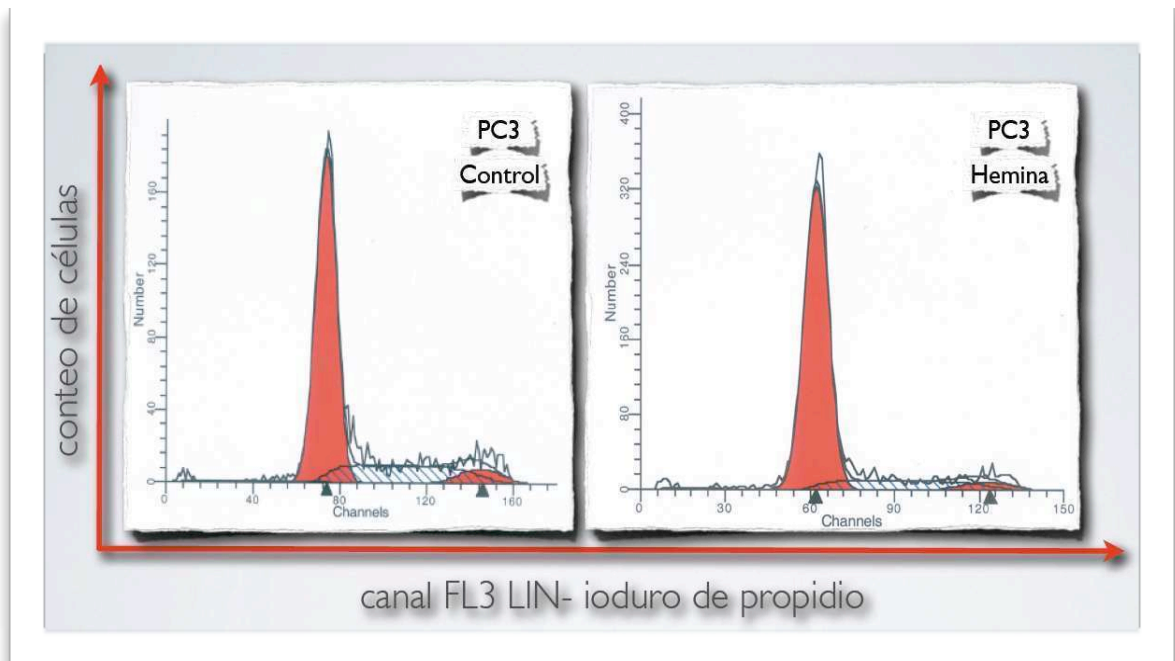
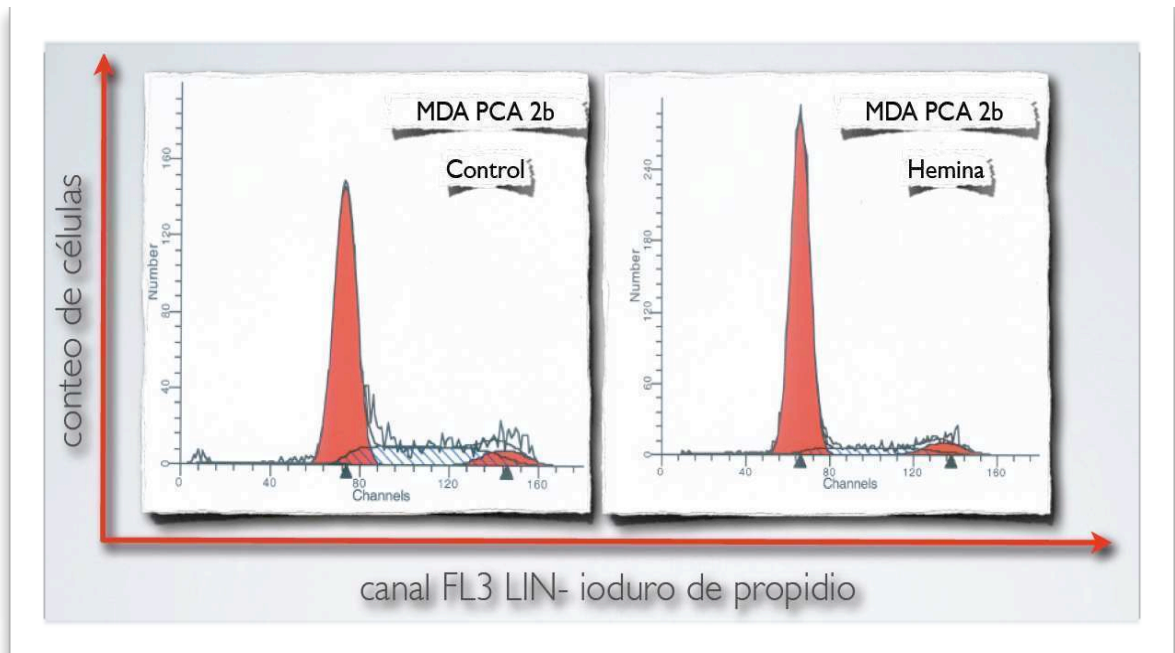
La proliferación celular de PC3, LNCaP y MDA PCa 2b fue cuantificada por incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina luego de la incubación en ausencia (control) o presencia de hemina (70μM, 24 h). Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficó la síntesis de DNA como porcentaje respecto del control que se consideró 100%. Las barras representan las medias ± SD. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

## ii. CICLO CELULAR

La inhibición de la progresión del ciclo celular desregulado en las células cancerígenas es una estrategia efectiva para limitar el crecimiento tumoral (Singh et al., 2002). Con el objetivo de analizar si la modulación de la expresión de HO-1 producía algún efecto sobre la progresión del ciclo celular, las células de las líneas PC3 y MDA PCa 2b se sometieron al análisis de la distribución de la población celular por citometría de flujo usando la tinción con IP. La inducción de los niveles de HO-1 por hemina (70μM, 24 h) aumentó significativamente el porcentaje de células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en MDA PCA 2b respecto del control (82,21% vs 71,04%;  $P < 0,01$ ) (Fig. 29 A y B, paneles superiores). Este predominio de la distribución en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fue mayoritariamente a expensas de la disminución en la fase S (9,93% hemina vs 19,53% control;  $P < 0,01$ ) con un mínimo aporte de la población en G<sub>2</sub>/M. Similarmente, las células PC3 mostraron un fuerte arresto en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> por tratamiento con hemina (84,65% vs 65,01%;  $P < 0,01$ ) también a expensas de la fase S (18,58% hemina vs 4,10% control;  $P < 0,01$ ) (Fig. 29 A y B, paneles inferiores).

Estos resultados muestran que en las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio, el tratamiento con hemina induce una acumulación de las células PC3 y MDA PCa 2b en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, en concordancia con la disminución de la proliferación celular bajo el mismo tratamiento. Así puede especularse que la modulación de la expresión de HO-1 se correlacionaría con una alteración diferencial del ciclo celular, sugiriendo que la inhibición por dicho tratamiento de la progresión del ciclo desregulado, podría ser un evento celular clave asociado a la eficacia del efecto antitumoral ejercido por HO-1 en PCa.

A)



B)

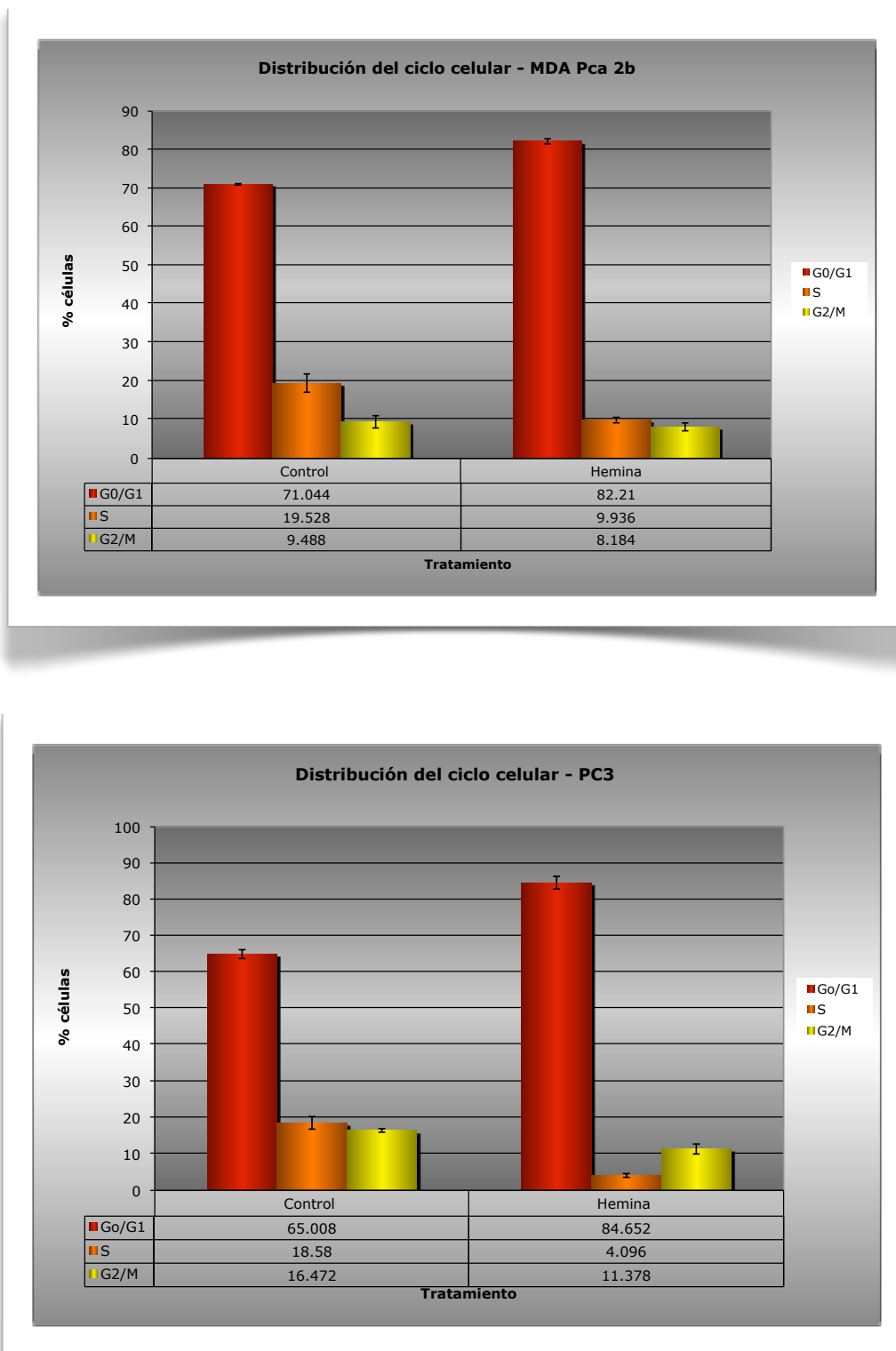
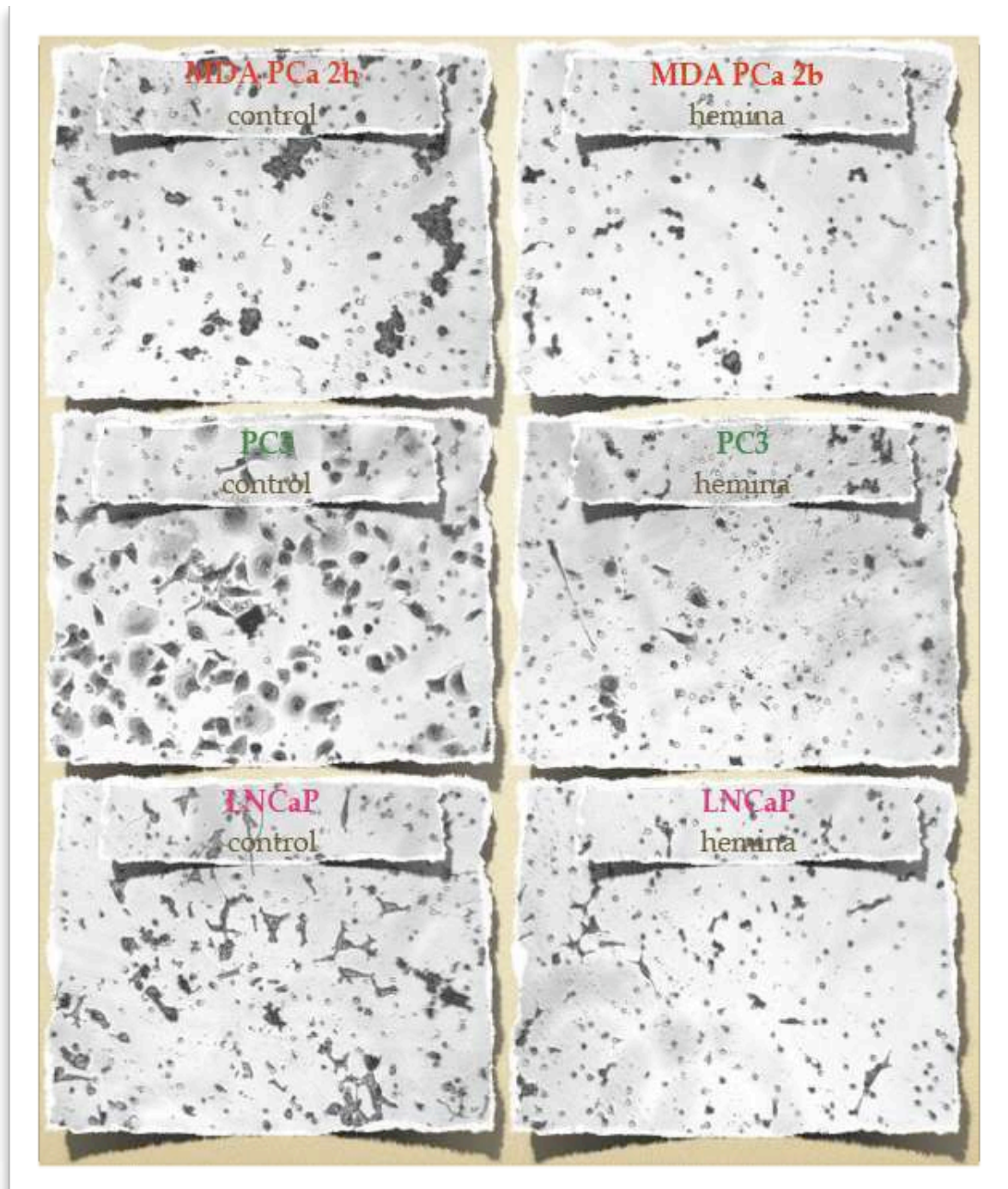


FIGURE 29. Efecto de la hemina sobre la progresión del ciclo celular en MDA Pca 2b y PC3.

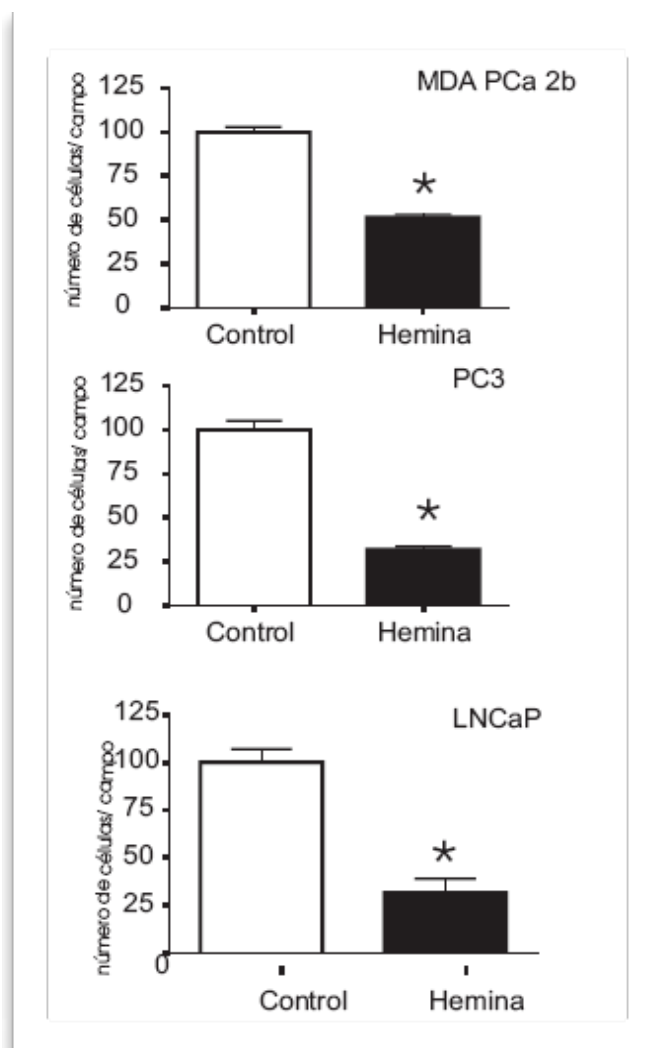
A) Patrón de fluorescencia de la tinción con IP para la distribución de la población celular analizada por citometría de flujo, luego del tratamiento con hemina (70  $\mu$ M, 24 h) o en condiciones control (panel superior MDA Pca 2b; panel inferior PC3). B) Las barras representan el porcentaje de células (panel superior MDA Pca 2b y panel inferior PC3) en las fases indicadas del ciclo celular y se expresan como la media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes. Diferencia significativa,  $P < 0,01$ .

**iii. INVASION CELULAR**

Mediante el ensayo de invasión a través de cámaras con Matrigel®, también evaluamos si la inducción de HO-1 afectaba este proceso celular. El tratamiento con hemina redujo significativamente la invasión celular en MDA PCa 2b, PC3 y LNCaP (51,7%; 68%; 70%;  $P < 0,05$  respectivamente) comparando con sus controles sin tratar (Fig. 30 A y B).

**A)**

B)



**FIGURE 30.** El tratamiento con hemina inhibe la invasión en líneas de cáncer de próstata.

La invasión de las células PC3, LNCaP y MDA PCa 2b fue cuantificada usando insertos de cultivo transwell recubiertos con Matrigel®. Las células se sembraron en las cámaras superiores de los insertos en ausencia (control) o presencia de hemina (70µM, 24 h) y aquellas que habían atravesado el matrigel y migrado a la cara inferior de los insertos luego de 24 h se contaron por microscopía óptica. A) Fotos representativas del ensayo de invasión para las tres líneas celulares. B) Cuantificación de la invasión. Los resultados representan la media de ocho campos ± S.E.M. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

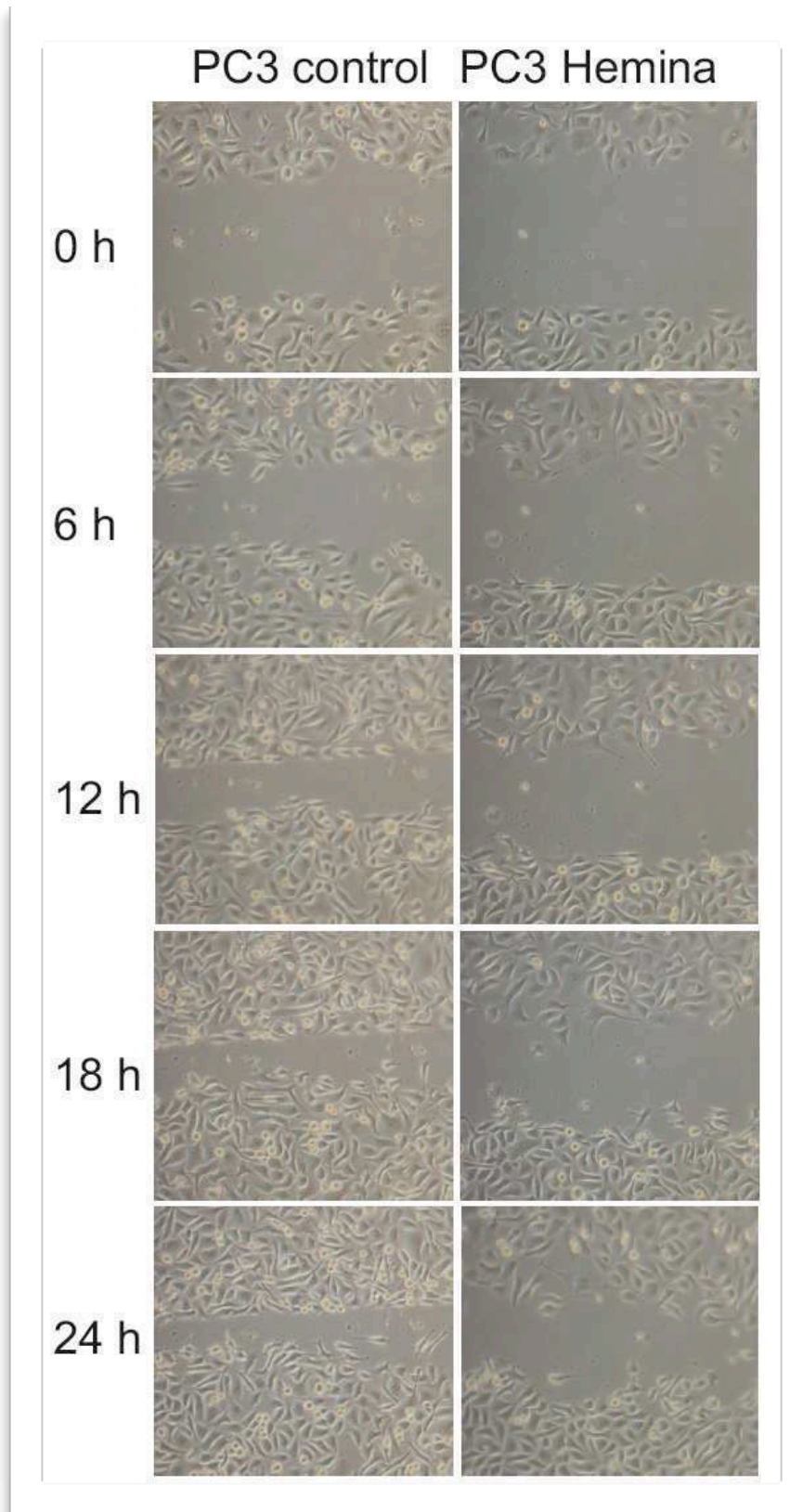
#### iv. MIGRACION CELULAR

Para evaluar la capacidad migratoria de las células de PCa utilizamos un ensayo de migración celular basado en el “scratch wound assay”. Con un tip de micropipeta se realizaron heridas sobre monocapas de cultivos confluentes de PC3, LNCaP y MDA PCa 2b tratadas o no con hemina (70 µM, 24 h). La cicatrización de la herida fue monitoreada por microscopía óptica con el sistema time-lapse, cada minuto durante 24 h.



En la Fig. 31 A se muestra la migración de las células PC3 sobre la herida a 0, 6, 12, 18 y 24 h. El seguimiento constante del avance de las células sobre la herida permitió hacer un análisis detallado del comportamiento de las mismas. Las células PC3 controles migraron hasta cerrar la herida en 24 h (área de herida sin cubrir 28,18%;  $P < 0,05$ ) mientras que las tratadas con hemina presentaron un área significativa de la herida que permanecía sin cubrir en el mismo período de tiempo (47,6%;  $P < 0,05$ ) (Fig. 31 A y B, VIDEO 1 <http://www.youtube.com/watch?v=GLor2E7ujyA> y VIDEO 2 <http://www.youtube.com/watch?v=qJlAycuVVB0>). Este hallazgo también se reflejó en la tasa migratoria (calculada como la pendiente del área de la herida sin cubrir/tiempo, Fig. 31 B) de PC3 control (pendiente=3) y de PC3 tratada con hemina (pendiente=2,1). En LNCaP, el efecto inhibitorio de la migración celular provocado por el tratamiento con hemina mantuvo el mismo perfil, aunque la cinética de la migración de esta línea celular fue más lenta (Fig. 32 A y B). El área de la herida sin cubrir en las condiciones controles luego de 24 h era de 64,54% mientras que en presencia de hemina se observó un área libre de células mayor en este mismo lapso (75,13%;  $P < 0,05$ ) y una disminución significativa de la tasa migratoria (control=9,12; hemina=6,52; Fig. 32 A y B). En contraste, la línea celular MDA PCa 2b, con altos niveles endógenos de HO-1, fue incapaz de migrar durante el mismo período (VIDEO 3 <http://www.youtube.com/watch?v=OlxzVRQR3e8>) y por ende tampoco se detectaron cambios en su capacidad migratoria bajo tratamiento con hemina (VIDEO 4 <http://www.youtube.com/watch?v=FAwKtIR5F2c>). En conclusión, la expresión basal alta de HO-1 podría ser responsable de la reducida motilidad detectada en estas células de PCa y de su escasa capacidad migratoria.

A)



B)

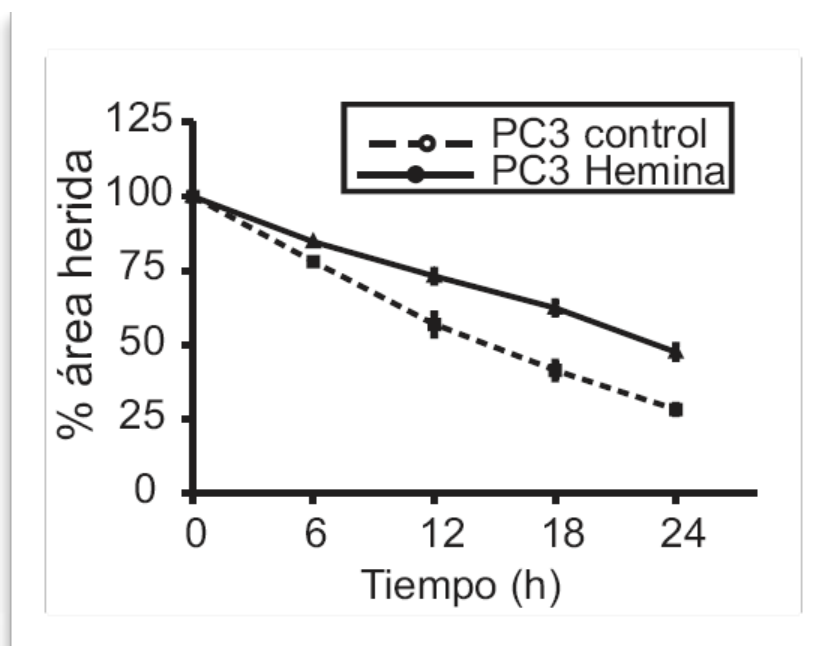
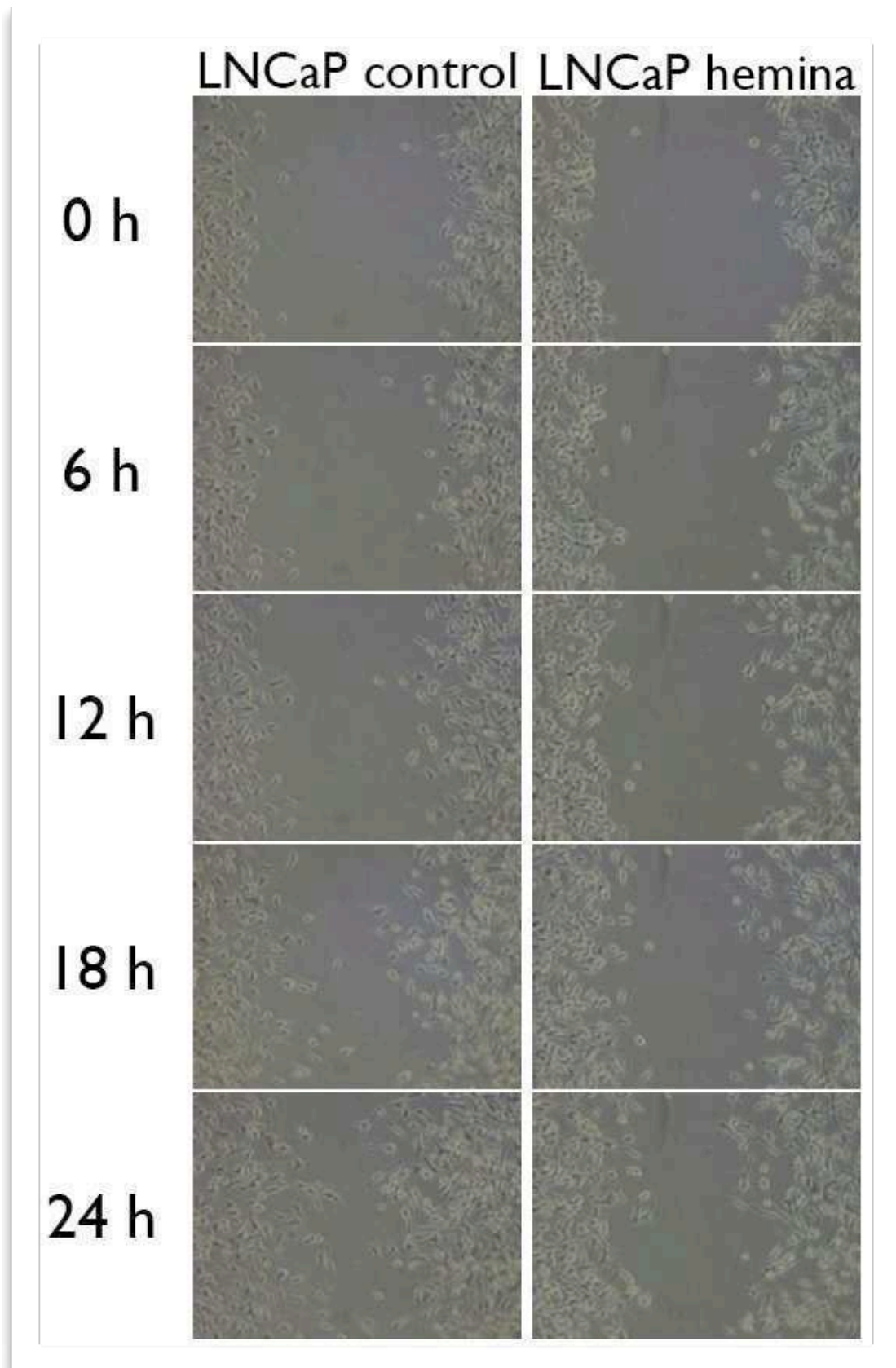


FIGURE 31. El tratamiento con hemina inhibe la migración celular en PC3.

A) Imágenes representativas (microscopía por contraste de fase) del ensayo de migración de cierre de la herida. Las células PC3 fueron crecidas hasta confluencia. Se realizó una herida lineal sobre la placa de cultivo y se monitoreó cada minuto durante 24 h. VIDEO 1 <http://www.youtube.com/watch?v=GLor2E7ujyA> VIDEO 2 <http://www.youtube.com/watch?v=qJIAycuVVB0> B) El área no cubierta de la herida en cultivos de PC3 fue cuantificada a diferentes intervalos de tiempo (0, 6, 12, 18 y 24 h) durante 24 h utilizando el *ImageJ* 1.37v software (NIH, USA). El gráfico representa el porcentaje de área no cubierta tomando el valor a 0 h como el 100%. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes. Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

A)



B)

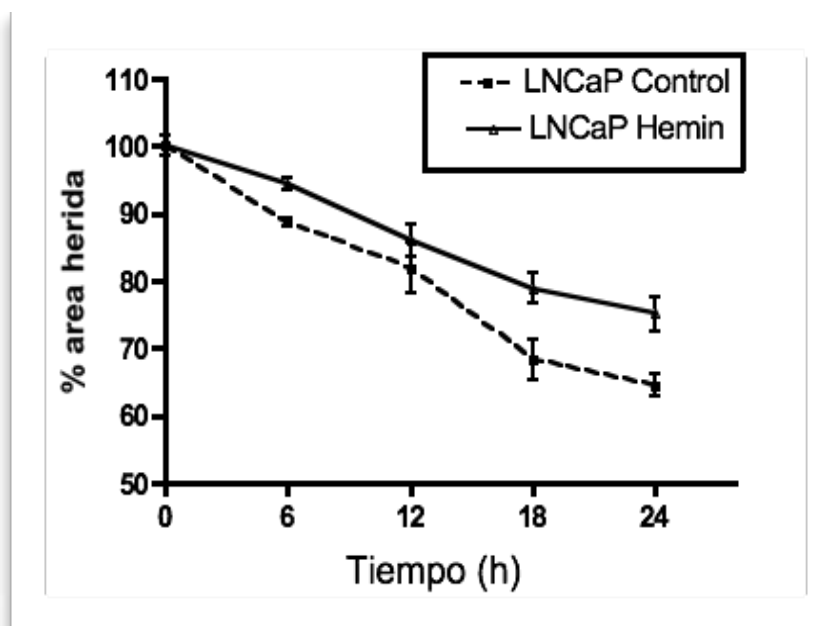


FIGURE 32. El tratamiento con hemina inhibe la migración celular en LNCaP.

A) Imágenes representativas (microscopía por contraste de fase) del ensayo de migración de cierre de la herida. Las células LNCaP fueron crecidas hasta confluencia. Se realizó una herida lineal sobre la placa de cultivo y se monitoreó cada minuto durante 24 h. B) El área no cubierta de la herida en cultivos de LNCaP fue cuantificada a diferentes intervalos de tiempo (0, 6, 12, 18 y 24 h) durante 24 h utilizando el ImageJ 1.37v software (NIH, USA). El gráfico representa el porcentaje de área no cubierta tomando el valor a 0h como el 100%. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes. Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

#### IV.I.3.2 TRATAMIENTO CON ESTAÑO PROTOPORFIRINA

Si bien es ampliamente aceptado que la hemina es un potente inductor selectivo de HO-1, consideramos importante dilucidar si la disminución de la proliferación, migración e invasión se debían a la sobre-expresión de HO-1 o a efectos provocados por los productos de su reacción catalítica. Así utilizamos SnPP (10 $\mu$ M, 24 h), un inhibidor de la actividad de HO, que a su vez tiene el efecto paradójico de inducir la expresión de HO-1 (Jozkowicz et al., 2007), y corroboramos que el tratamiento con este inhibidor produjo el esperado aumento transcripcional de HO-1 detectado por RT-qPCR (inducción de 2,73 veces en PC3, y 11,85 veces en MDA PCa 2b;  $P < 0,05$ ; Fig. 33).

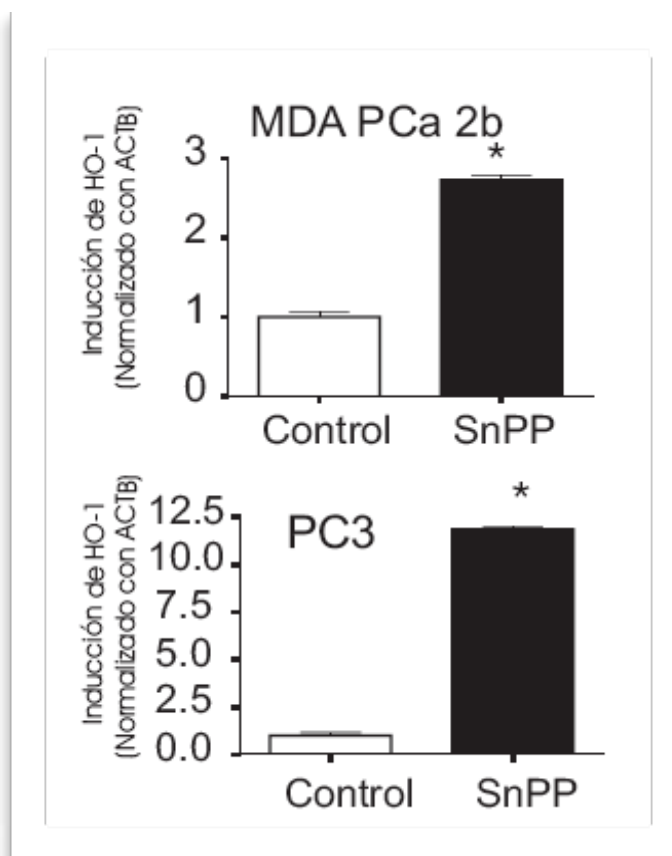


FIGURA 33. Efecto del SnPP sobre los niveles del mRNA de HO-1 en líneas de cáncer de próstata.

Se extrajo el RNA total de las células PC3 y MDA PCa 2b expuestas a SnPP (10  $\mu$ M, 24 h) o cultivadas en su ausencia (control) y los niveles de mRNA de HO-1 se determinaron por RT-qPCR. Los datos fueron normalizados respecto de  $\beta$ -actina. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Se graficaron las veces de inducción respecto del control y la SD calculada como se describe en *materiales y métodos*. \*Diferencia significativa,  $P < 0,01$ .

Posteriormente, evaluamos el efecto de la porfirina sobre la proliferación y la invasión en las líneas de PCa. El tratamiento con SnPP redujo significativamente la proliferación de las células PC3 (17,64%;  $P < 0,05$ ) y MDA PCa 2b (42,25%;  $P < 0,05$ ) (Fig. 34). También provocó una marcada disminución de la invasión de las células MDA PCa 2b (20,05%;  $P < 0,05$ ) (Fig. 35). Sin embargo, no se detectó ningún efecto significativo sobre la capacidad de invasión de PC3 bajo dicho tratamiento (Fig. 35).

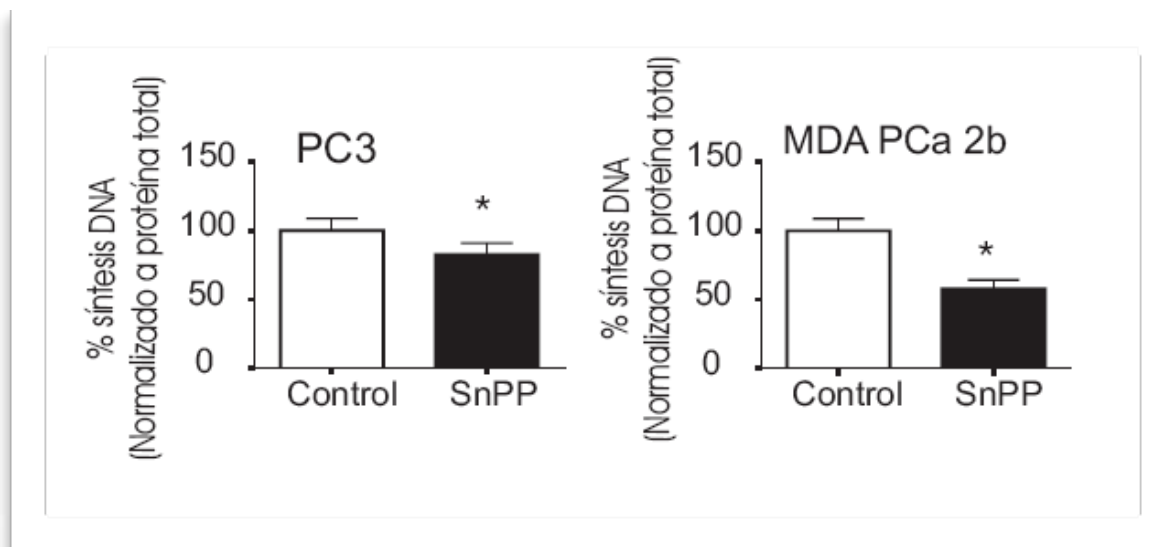


FIGURA 34. El tratamiento con SnPP inhibe la proliferación celular en líneas de cáncer de próstata.

La proliferación celular de PC3 y MDA PCa 2b fue cuantificada por incorporación de [ $^3\text{H}$ ]timidina luego de la incubación en ausencia (control) o presencia de SnPP ( $10\mu\text{M}$ , 24 h). Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficó la síntesis de DNA como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. Las barras representan las medias  $\pm$  SD. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

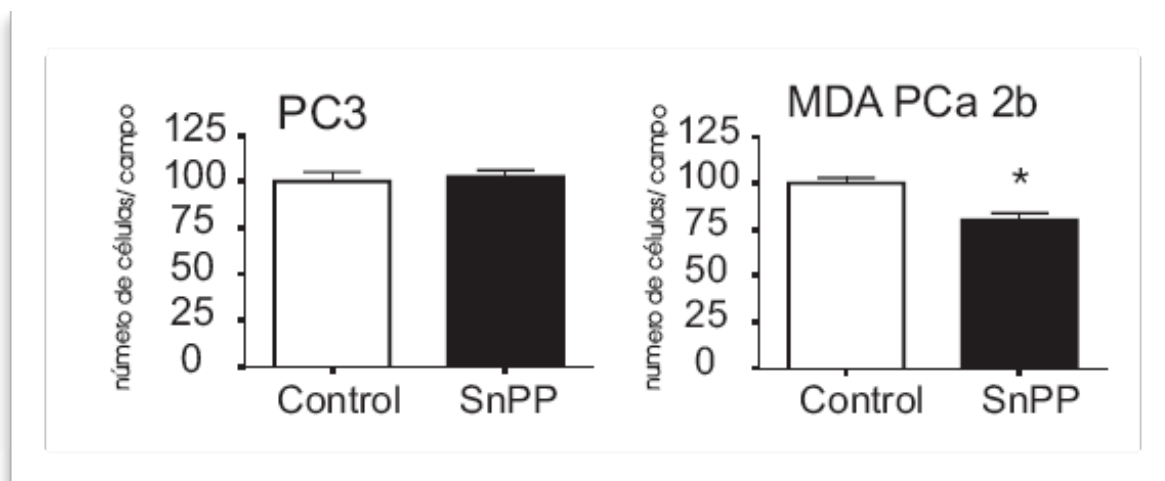


FIGURA 35. El tratamiento con SnPP inhibe la invasión en líneas de cáncer de próstata.

La invasión celular de PC3 y MDA PCa 2b fue cuantificada usando insertos de cultivo transwell recubiertos con Matrigel®. Las células se sembraron en las cámaras superiores de los insertos en ausencia (control) o presencia de SnPP ( $10\mu\text{M}$ , 24 h). Las células que habían atravesado el Matrigel® y migrado a la cara inferior de los insertos luego de 24 h se contaron por microscopía óptica. Los resultados representan la media de ocho campos  $\pm$  S.E.M. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

Además la exposición a esta porfirina produjo arresto de la población celular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (76,15% vs control 71,07%; *P* < 0,01) a expensas de la disminución en la fase S (19,53% vs control 14,42%; *P* < 0,01) en MDA PCa 2b (Fig. 36, panel superior). En PC3 si bien se obtuvo arresto en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, no fue tan marcado como en la otra línea celular (68,12% vs control 65,01%; *P* < 0.05) (Fig. 36, panel inferior).

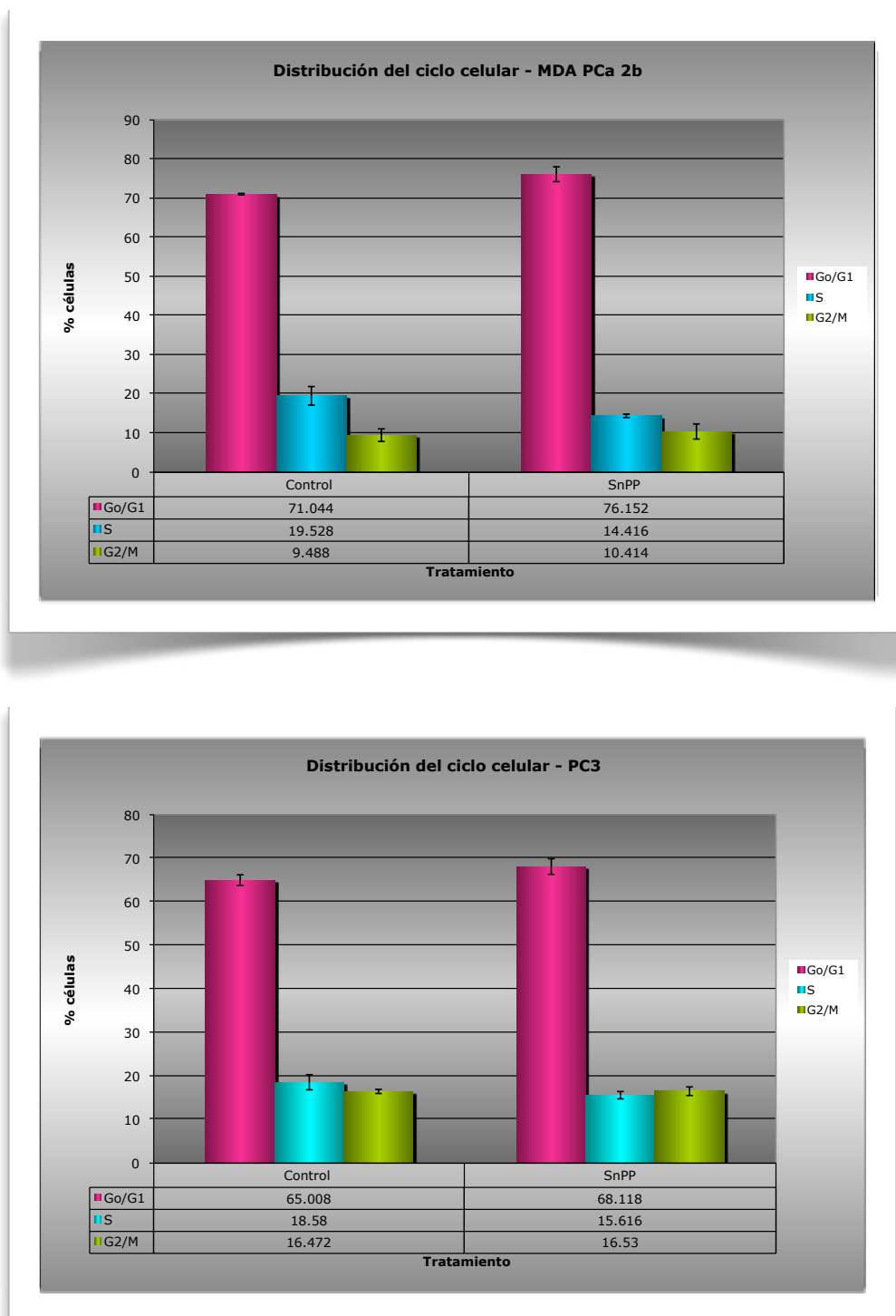


FIGURA 36. Efecto de la SnPP sobre la progresión del ciclo celular en MDA PCa 2b y PC3.



**Patrón de fluorescencia de la tinción con IP para la distribución de la población celular analizada por citometría de flujo, luego del tratamiento con SnPP (10  $\mu$ M, 24 h) o en condiciones control. Las barras representan el porcentaje de células (MDA PCa 2b, panel superior y PC3, panel inferior) en las fases indicadas del ciclo celular y se expresan como la media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes. Diferencia significativa,  $P < 0,01$ .**

A fin de descartar que la inhibición de los procesos celulares estudiados fuesen provocados por efectos citotóxicos colaterales al tratamiento con SnPP, se realizaron ensayos de viabilidad celular (MTS) y de apoptosis (Anexina V-FITC/IP) en cultivos celulares expuestos a SnPP 10  $\mu$ M, durante 24 h. Tanto el ensayo de viabilidad (Fig. 26) como el análisis de la apoptosis por citometría de flujo (Fig. 27) demostraron que esta droga no tiene efectos citotóxicos en las condiciones utilizadas.

Todos estos datos sugieren que la inducción farmacológica de la expresión de HO-1, bajo las condiciones experimentales ensayadas, es responsable de los efectos celulares observados en las líneas de PCa.

2<sup>DA</sup> PARTEIV.II EFECTOS *IN VITRO* DE LA MODULACION GENETICA DE LA EXPRESION DE HO-1 SOBRE DISTINTOS PROCESOS CELULARES

## IV.II.1 MODULACION GENETICA DE LA EXPRESION DE HO-1

A fin de descartar todo tipo de efecto celular mediado por los productos de la reacción catalítica de HO-1, decidimos modular la expresión de esta proteína de manera más específica. Considerando que la línea PC3 posee niveles endógenos de HO-1 muy bajos, sobre-expresamos la proteína mediante transfección estable. Las células PC3 se transfectaron con el plásmido de expresión pcDNA3HO1 (PC3HO-1). Así mismo generamos la línea control PC3pcDNA3 por transfección con el plásmido vacío (pcDNA3). Luego corroboramos el aumento de la expresión de HO-1 por RT-qPCR y Western Blot (Fig. 37).

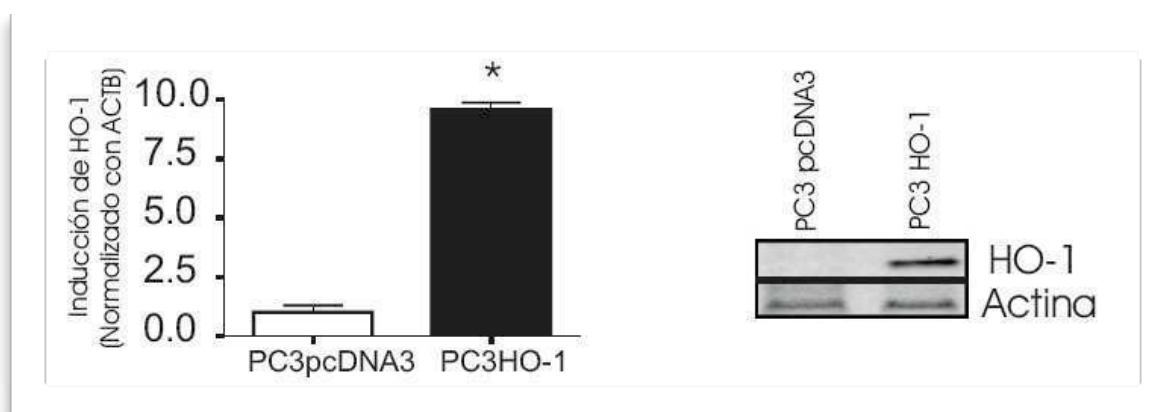
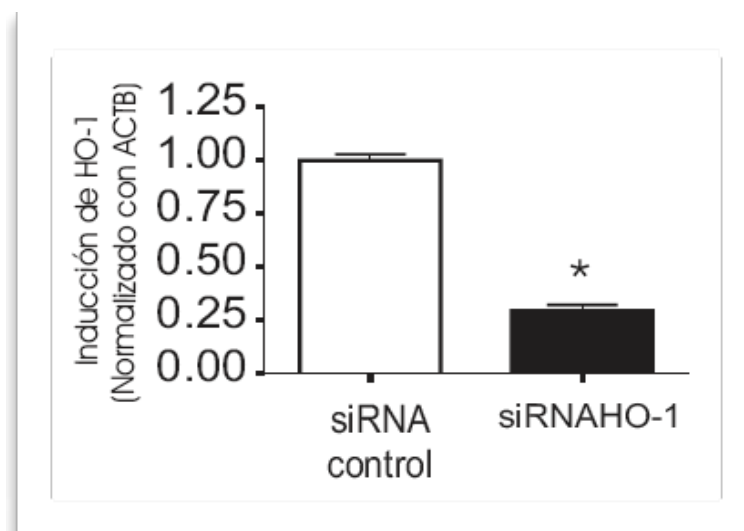


FIGURA 37. Sobre expresión de HO-1 en la línea PC3HO-1.

Las células PC3 fueron transfectadas en forma estable con el vector de expresión pcDNA3HO1 (PC3HO-1) o con el vector vacío pcDNA3 (PC3pcDNA3). Se extrajo RNA total de los extractos celulares, se analizó el nivel del mRNA de HO-1 por RT-qPCR. Los datos se normalizaron respecto de  $\beta$ -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control y la SD calculada como se describe en *materiales y métodos* (panel izquierdo). \*Diferencia significativa,  $P < 0,01$ . Se extrajeron proteínas totales y la expresión de HO-1 se analizó por Western Blot (panel derecho). Los niveles de  $\beta$ -actina se usaron como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Por otra parte, la línea MDA PCa 2b posee una alta expresión de HO-1 con lo cual decidimos silenciar HO-1 utilizando la tecnología de RNA de interferencia (HO-1siRNA). Como control de transfección utilizamos un siRNA “scrambled” (siRNA control). De esta

manera logramos silenciar la expresión de HO-1, detectándose niveles endógenos del mRNA reducidos en un 70% ( $P < 0,01$ ) respecto del control (Fig. 38).



**FIGURA 38.** Disminución de la expresión de HO-1 en la línea MDA PCa 2b por siRNA HO-1.

Las células MDA PCa 2b se transfectaron con siRNAHO-1 o siRNA control y los niveles del mRNA de HO-1 se analizaron por RT-qPCR. Los datos fueron normalizados respecto de  $\beta$ -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control y la SD calculada como se describe en *materiales y métodos*. \*Diferencia significativa,  $P < 0,01$ .

#### IV.II.2 EFECTO CELULAR DE LA SOBRE-EXPRESION Y SILENCIAMIENTO DE HO-1 SOBRE LAS LINEAS TUMORALES DE PROSTATA

Disponiendo de la línea que sobre-expresa HO-1 (PC3HO-1) de manera estable generada en nuestro laboratorio y de las células que tienen dicha expresión silenciada (MDA PCa 2b HO-1siRNA), decidimos estudiar la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva en comparación con sus respectivos controles.

La inducción genética de la expresión de HO-1 en las células PC3 (PC3HO-1) provocó una marcada disminución de la proliferación (42%,  $P < 0,05$ ; Fig. 39 panel superior) y de la migración celular (área de la herida sin cubrir luego de 24 h: 75,8% (PC3pcDNA3) vs 28,2% (PC3HO-1);  $P < 0,05$ ) (Fig. 40). Sin embargo, no se observaron cambios en el grado de invasividad de las células de dichas líneas (datos no mostrados).

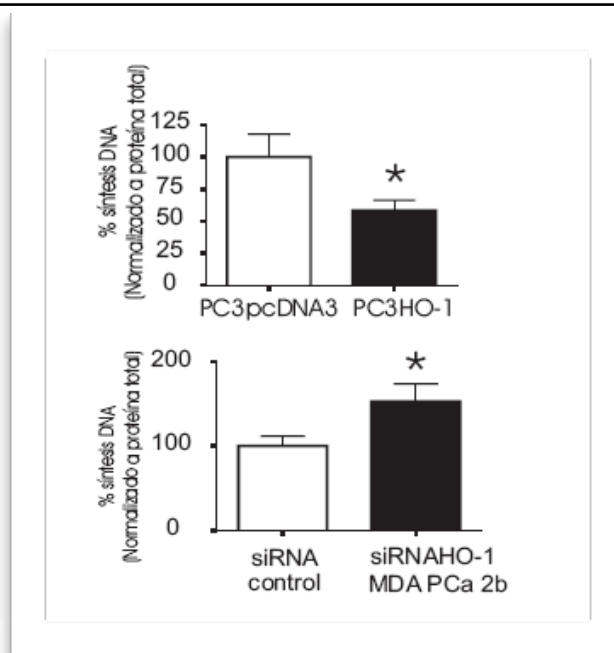


FIGURA 39. Efecto de la modulación genética de HO-1 sobre la proliferación en líneas de PCa.

La línea celular PC3 fue transfectada establemente con el vector de expresión pcDNA3HO1 (PC3pcDNA3) o con el vector vacío pcDNA3 (PC3pcDNA3). La línea celular MDA PCa 2b fue transfectada con siRNAHO-1 o siRNA control. Las células PC3pcDNA3, PC3HO-1, MDA PCA 2b siRNA control y MDA PCa 2b siRNAHO-1 se cultivaron y la proliferación celular se cuantificó por incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Se graficó la síntesis de DNA como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. Las barras representan las medias  $\pm$  SD. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

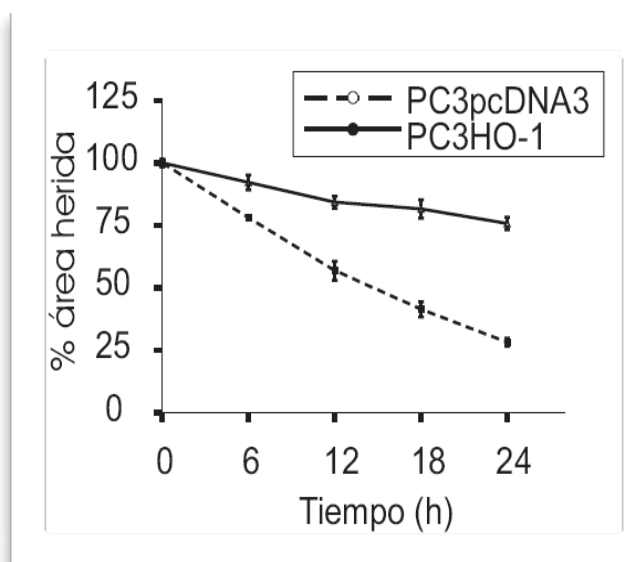


FIGURA 40. Disminución de la migración celular en PC3HO-1.

Las células PC3pcDNA3 y PC3HO-1 fueron crecidas hasta confluencia. Se realizó una herida lineal sobre la placa de cultivo y se monitoreó cada minuto durante 24 h. El área no cubierta de la herida en los cultivos fue cuantificada a diferentes intervalos de tiempo (0, 6, 12, 18 y 24 h) utilizando el *ImageJ 1.37v software* (NIH, USA). El gráfico representa el porcentaje de área no cubierta tomando el valor a 0h como el 100%. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes. Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

Por otro lado, el silenciamiento de HO-1 en la línea MDA PCa 2b (MDA PCa 2b siRNAHO-1) aumentó significativamente la proliferación (50%,  $P < 0,05$ ; Fig. 39 panel inferior) y la invasión celular (71%,  $P < 0,05$ ), respecto del control (Fig. 41). Sin embargo, no se observaron cambios detectables en la capacidad migratoria de estas células (datos no mostrados). Es posible que debido al fuerte efecto anti-migratorio de HO-1 y dado los niveles endógenos elevados de esta proteína en MDA PCa 2b, se requiera una mayor reducción de la expresión de HO-1 para alcanzar un efecto significativo en las propiedades migratorias de estas células. Además, cabe destacar que esta técnica puede no ser lo suficientemente sensible para detectar pequeños cambios cinéticos.

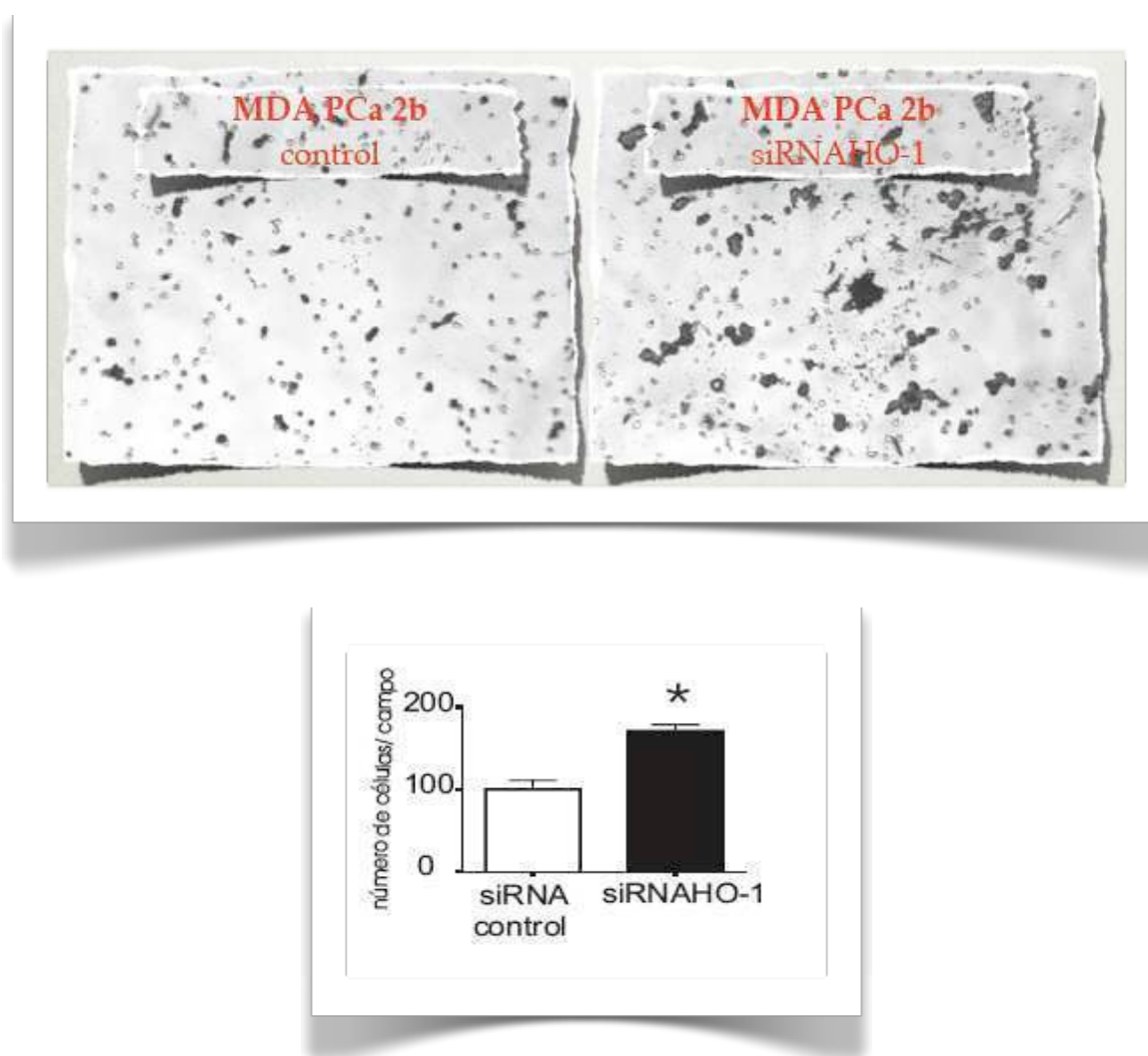


FIGURA 41. Aumento de la invasión celular en MDA PCa 2b por silenciamiento de HO-1.

Las células MDA PCa 2b se transfectaron con siRNAHO-1 o siRNA control. La invasión celular fue cuantificada usando insertos de cultivo transwell recubiertos con Matrigel®. Las células MDA PCa 2b siRNA control y MDA PCa 2b siRNAHO-1 fueron sembradas en las cámaras superiores de los insertos y aquellas que habían atravesado el Matrigel® y migrado a la cara inferior de los insertos luego de 24 h fueron contadas por microscopía óptica. Se observan fotos representativas del ensayo de invasión luego de 24 h (panel superior). Los resultados representan la media de ocho campos  $\pm$  S.E.M. (panel inferior). \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

### IV.II.3 IDENTIFICACION DE GENES Y GRUPO DE GENES REGULADOS POR HO-1

Estudios epidemiológicos han revelado que la inflamación crónica predispone a diferentes formas de cáncer. El uso de agentes anti-inflamatorios no esteroides se ha asociado con la protección contra varios tipos de tumores. Diversos componentes inflamatorios se encuentran presentes en el microambiente de la mayoría de los tejidos neoplásicos, incluyendo aquellos que no están relacionados causalmente a un proceso inflamatorio obvio. Los rasgos claves de la inflamación relacionada con el cáncer incluyen la infiltración de células del sistema inmune, moléculas inflamatorias como citoquinas y quimioquinas, moléculas de adhesión, la remodelación del tejido circundante y la angiogénesis.

La próxima pregunta de interés en nuestro proyecto, fue identificar diferencias en la expresión génica entre las líneas con alta y con baja expresión de HO-1, focalizándonos en genes implicados en inflamación y angiogénesis. Un análisis de microarray (RT-qPCR Oligo GEArray® Human Angiogenesis Microarray) detectó que un total de 55 de 113 genes mostraron una diferencia significativa, de por lo menos dos veces, entre la expresión de la línea sensible a andrógenos y la insensible (Fig. 42, TABLA IV). Adicionalmente, cabe destacar que se encontraron genes reprimidos que coincidían cuando se realizaron las siguientes comparaciones MDA PCa 2b/ PC3 y PC3HO-1/ PC3pcDNA3. Estos genes son: ANGPT1 (angiopietina 1), ANGPTL3 (angiopietin-like3), las quimioquinas CXCL1, 10, 3 y 5, FIGF (factor de crecimiento inducido por c-fos/ VEGF-D), IL-6 (interleuquina 6), IL-8 (interleuquina 8), MMP9 (metaloproteasa 9), THBS1 (trombospondina 1) y VEGFA (factor de crecimiento vascular endotelial A). Por otro lado, solo ID3 (inhibidor de la proteína 3 de unión al DNA) se detectó aumentado cuando se comparó MDA PCa 2b/ PC3 y PC3HO-1/ PC3pcDNA3. Los mismos hallazgos fueron obtenidos en un segundo experimento independiente.

El análisis exhaustivo de todos los datos obtenidos de este array sugieren que estos genes involucrados en inflamación y angiogénesis están asociados a la sobre-expresión de HO-1. Todas estas moléculas juegan un rol relevante de alguna manera en los diferentes estadios de la progresión tumoral. Brevemente resaltaremos el aspecto más significativo de cada uno de estos genes. Así las citoquinas pueden inducir migración de diferentes células inflamatorias infiltrantes, activar respuestas inflamatorias/inmunológicas, y han sido implicadas en la

regulación del crecimiento tumoral (Krieg y Boyman, 2009). Las metaloproteasas son responsables de la degradación de los componentes proteicos en la ECM y en el microambiente inmediato a la célula tumoral (Chakraborti et al., 2003). La angiopoyetina es también un factor capaz de inducir migración e invasión de las células cancerígenas (Imanishi et al., 2007). IL-6 e IL-8 están asociadas a la quimiotaxis celular y a la regulación de una multiplicidad de funciones incluyendo proliferación, apoptosis, angiogénesis y diferenciación (Culig et al., 2005; Waugh y Wilson, 2008). La trombospondina juega un rol clave en la agregación plaquetaria, la angiogénesis y la tumorigénesis (Komuro et al., 2009). Tanto FIFG/VEGF-D como VEGF-A son fundamentales para la angiogénesis, linfangiogénesis y crecimiento endotelial (Arigami et al., 2009).

Por lo tanto, la hipótesis que planteamos es que factores derivados de las células tumorales participan en la carcinogénesis prostática y que este efecto es modulado por la expresión de HO-1. En base a estos estudios de screening en el cual se ha identificado este grupo de genes relacionados con inflamación y angiogénesis, cuya expresión fue inhibida por la sobre-expresión de HO-1, esta proteína emerge como un “target” crítico en la adquisición de un fenotipo menos agresivo.

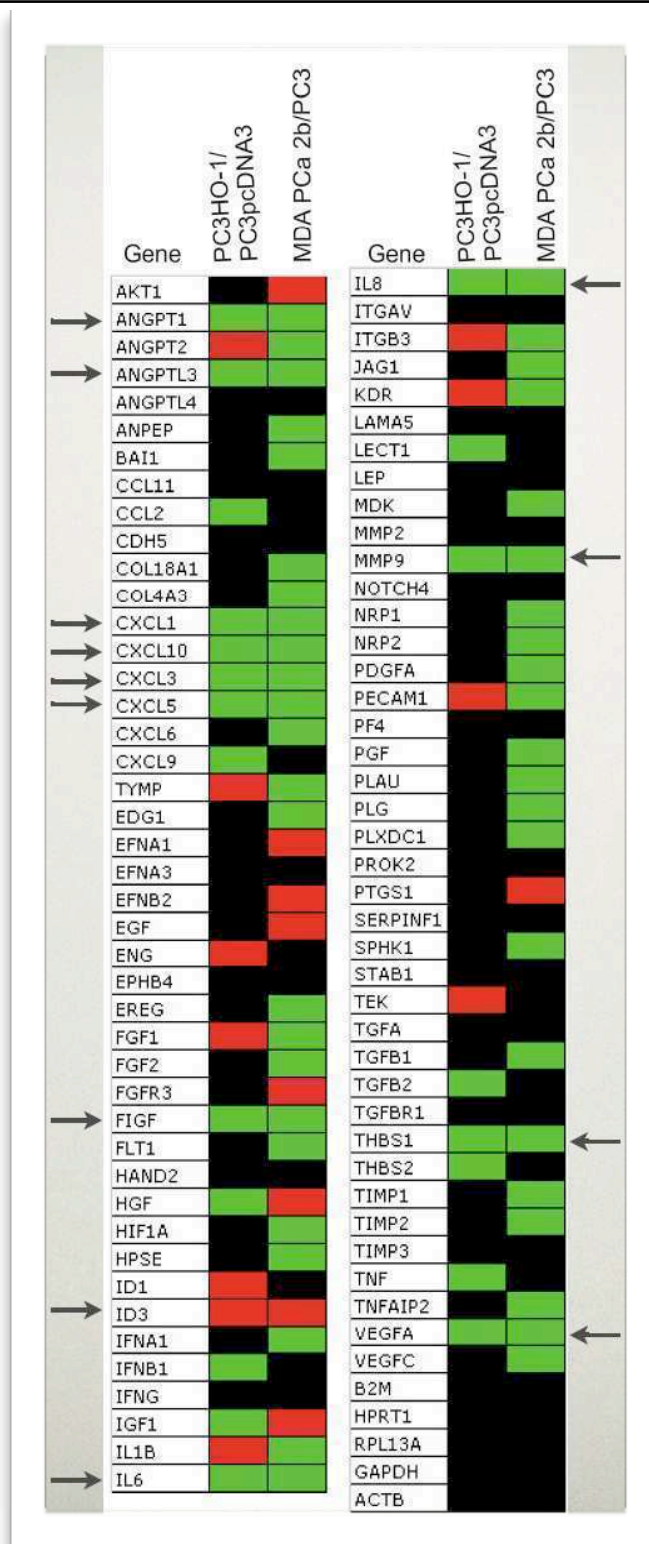


FIGURA 42. Identificación de genes y grupo de genes regulados por HO-1 por análisis de microarray.

Se realizó un microarray (RT-qPCR Oligo GEArray® Human Angiogenesis Microarray) para las siguientes muestras de RNA: PC3, MDA PCa 2b, PC3pcDNA3 y PC3HO-1. Los datos fueron normalizados con los genes B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH y ACTB. Se realizaron dos experimentos independientes. Se compararon y analizaron las líneas celulares MDA PCa 2b vs PC3 y PC3HO-1 vs PC3pcDNA3. Los genes con valores de expresión superiores a 2 fueron considerados “sobre-expresados” (casilleros rojos) y por debajo de -2 fueron considerados “reprimidos” (casilleros verdes). Los casilleros negros representan una diferencia no significativa entre las comparaciones. Las flechas señalan los genes cuyas expresiones se encuentran reprimidas/inducidas en ambas comparaciones.



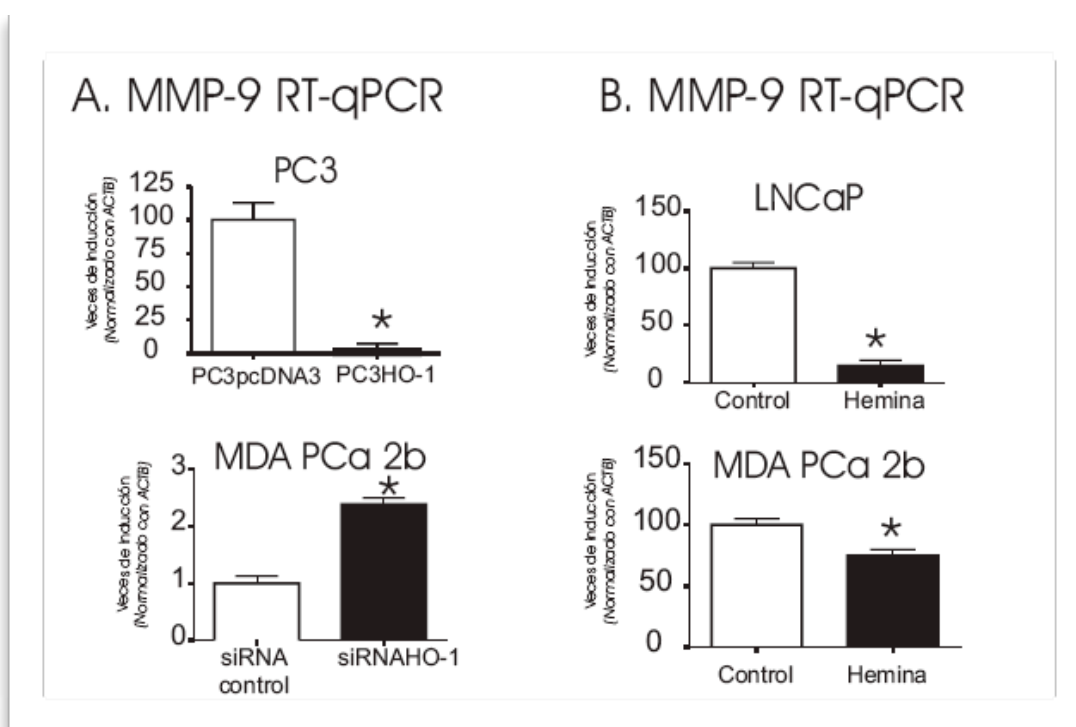
TABLA IV. Veces de inducción/represión de la expresión de genes regulados por HO-1 por análisis de microarray.

gene	PC3HO1/ PC3pcDNA3	MDA Pca 2b/ PC3	gene	PC3HO1/ PC3pcDNA3	MDA Pca 2b/ PC3
AKT1	-1.086734863	2.203810232	IL8	-8.111675838	-31871.95732
ANGPT1	-3.294364069	-19.15965927	ITGAV	-1.164733586	1.790050142
ANGPT2	2.989698497	-3.89061979	ITGB3	5.979396995	-613.1090968
ANGPTL3	-6.588728138	-3.386981249	JAG1	-1.536875181	-27.09585
ANGPTL4	1.132883885	1.356604327	KDR	3.680750602	-704.2774109
ANPEP	1.214194884	-116.1624519	LAMA5	-1.337927555	1.356604327
BAI1	-1.248330549	-50.56264396	LECT1	-4.055837919	1.356604327
CCL11	-1.086734863	1.180992661	LEP	-1.086734863	1.180992661
CCL2	-5.735820992	1.356604327	MDK	-1.01395948	-29.04061297
CDH5	-1.337927555	-1.042465761	MMP2	-1.337927555	1.356604327
COL18A1	-1.337927555	-58.08122594	MMP9	-9.67585511	-35.75318842
COL4A3	-1.01395948	-2.948538435	NOTCH4	-1.164733586	1.265756594
CXCL1	-5.735820992	-3236.009213	NRP1	1.132883885	-15.56247916
CXCL10	-4.34693945	-2.566851795	NRP2	1.602139755	-188.7064598
CXCL3	-11.47164198	-202.2505758	PDGFA	1.394743666	-2.234574276
CXCL5	-3.073750363	-9.579829637	PECAM1	3.944930818	-188.7064598
CXCL6	1.214194884	-248.9996665	PF4	-1.086734863	1.356604327
CXCL9	-7.568461174	1.101905116	PGF	-1.01395948	-33.35890435
TYMP	2.265767771	-2.084931522	PLAU	1.394743666	-118950.3507
EDG1	1.494849249	-76.6386371	PLG	-1.086734863	-7.781239579
EFNA1	-1.433955248	2.203810232	PLXDC1	-1.337927555	-5.502167273
EFNA3	-1.647182035	1.790050142	PROK2	-1.086734863	1.356604327
EFNB2	-1.086734863	4.112455307	PTGS1	1.214194884	6.680703355
EGF	-1.536875181	5.815890069	SERPINF1	1.132883885	-1.815038311
ENG	4.228072162	-1.197478705	SPHK1	-1.536875181	-76.6386371
EPHB4	-1.01395948	1.670175839	STAB1	1.057018041	-1.580082624
EREG	-1.433955248	-8.339726087	TEK	2.265767771	1.356604327
FGF1	2.428389769	-29.04061297	TGFA	-1.01395948	1.918528239
FGF2	1.602139755	-286.0255073	TGFB1	1.602139755	-2.751083636
FGFR3	-1.337927555	2.907945035	TGFB2	-2.496661098	-1.375541818
FIGF	-2.173469725	-3.160165247	TGFBR1	-1.647182035	-1.693490625
FLT1	-1.01395948	-13.547925	THBS1	-4.055837919	-41.06962872
HAND2	-1.086734863	1.356604327	THBS2	-17.3877578	1.356604327
HGF	-4.34693945	5184.539009	TIMP1	1.301341855	-47.17661495
HIF1A	-1.248330549	-6.773962499	TIMP2	1.214194884	-202.2505758
HPSE	1.132883885	-11.79415374	TIMP3	-1.086734863	1.356604327
ID1	2.789487333	-1.580082624	TNF	-52.70982511	1.180992661
ID3	2.428389769	9.447941291	TNFAIP2	-1.433955248	-31.12495832
IFNA1	1.057018041	-4.469148552	VEGFA	-2.02791896	-2.234574276
IFNB1	-2.329467173	-1.283425898	VEGFC	1.602139755	-5256.912476
IFNG	-1.086734863	1.356604327	B2M	1.057018041	1.670175839
IGF1	-11.47164198	6.233316637	HPRT1	-1.248330549	-1.375541818
IL1B	2.114036081	-9809.745548	RPL13A	1.301341855	1.356604327
IL6	-45.88656794	-657.1140596	GAPDH	1.057018041	1.101905116
			ACTB	-1.164733586	-1.815038311

Se realizó un microarray (RT-qPCR Oligo GEArray® Human Angiogenesis Microarray) para las siguientes muestras de RNA: PC3, MDA PCa 2b, PC3pcDNA3 y PC3HO-1. Los datos fueron normalizados con los genes B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH y ACTB y se hicieron dos experimentos independientes. Se compararon y analizaron las líneas celulares MDA PCa 2b vs PC3 y PC3HO-1 vs PC3pcDNA3. La tabla muestra los niveles de expresión de los genes analizados. Aquellos genes cuya expresión se detectó reprimida en ambas columnas se muestran en verde y en rojo los inducidos en ambos casos.

#### IV.II.4 HO-1 DISMINUYE LA EXPRESION Y ACTIVIDAD DE MMP9 EN CELULAS DE PCA

Subsiguientemente decidimos analizar en detalle uno de los genes regulados por HO-1 surgidos del microarray. Enfocamos nuestros estudios en MMP9 porque esta metaloproteasa ha sido implicada junto con otras MMP en la migración e invasión tumoral (John y Tuszynski, 2001). Como se describió en la sección anterior (IV.II.3) la expresión de MMP9 se encontraba significativamente disminuída en MDA PCa 2b (35,7 veces) comparada con PC3 y en PC3HO-1 (9,7 veces) comparada con PC3pcDNA3 (TABLA IV), revelando una marcada correlación negativa entre la expresión de MMP9 y HO-1. La regulación negativa de la expresión de MMP9 en PC3HO-1 fue confirmada por RT-qPCR (Fig. 43 A, panel superior). Más aún, cuando los cultivos celulares de LNCaP y MDA PCa 2b fueron expuestos a hemina (70  $\mu$ M, 24 h), los niveles del mRNA de MMP9 disminuyeron significativamente en comparación con sus respectivos controles sin tratar (85,55% para LNCaP; 26,29% para MDA PCa 2b;  $P < 0,05$ ; Fig. 43 B). De acuerdo a lo esperado, el porcentaje de disminución de la expresión de MMP9 en MDA PCa 2b fue menor que en LNCaP, dado los altos niveles endógenos de HO-1 en MDA PCa 2b.



**FIGURA 43.** Correlación entre la expresión de HO-1 y los niveles de mRNA de MMP9 en líneas de PCA.

Se extrajo el RNA total de cultivos celulares de PC3pcDNA3, PC3HO-1, MDA PCA 2b siRNA control y MDA pCA 2b siRNAHO-1 (A) y de células LNCaP y MDA PCa 2b cultivadas en ausencia (control) o presencia de hemina (70  $\mu$ M, 24 h) (B). Los niveles del mRNA de MMP9 se determinaron por RT-qPCR.

Los datos fueron normalizados respecto de  $\beta$ -actina. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Se grafica las veces de inducción respecto del control y la SD calculada como se describe en *materiales y métodos*. \* Diferencia significativa,  $P < 0,01$ .

También confirmamos que el tratamiento de los cultivos de MDA PCa 2b con SnPP (10  $\mu$ M, 24 h) producía el mismo efecto inhibitorio sobre la expresión del mRNA de MMP9 (70%,  $P < 0,01$ ; Fig. 44) seguramente como consecuencia de la inducción de la expresión de HO-1 (Fig. 33).

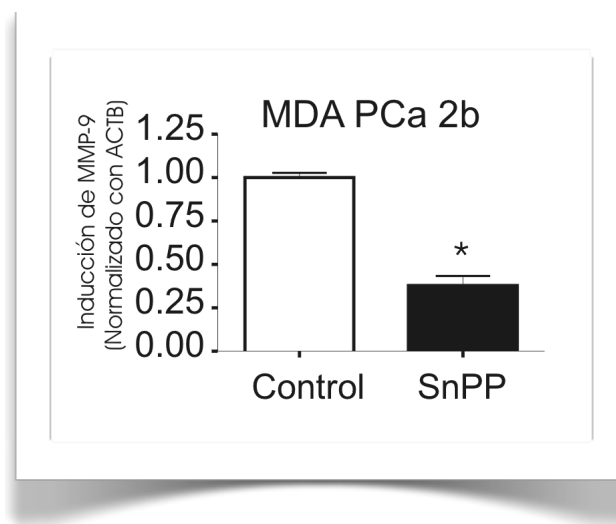


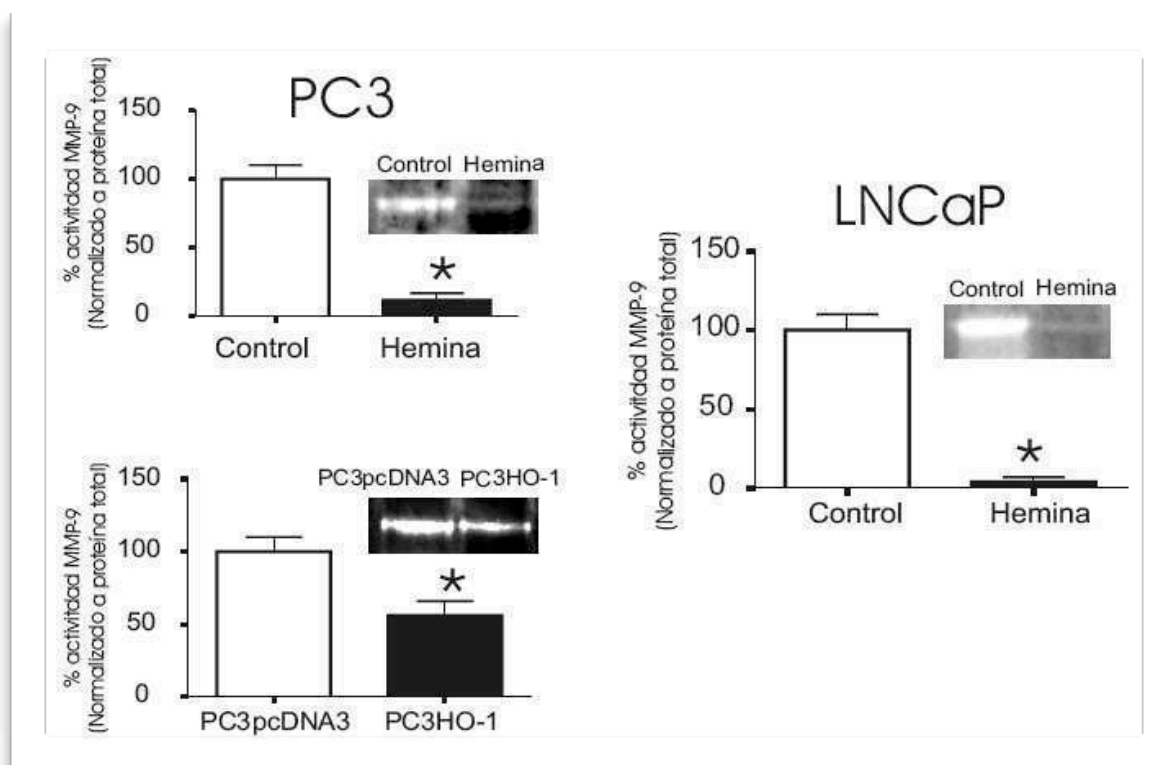
FIGURA 44. Disminución de la expresión de MMP9 en MDA PCa 2b expuestas a SnPP.

Se extrajo el RNA total de cultivos celulares de MDA PCA 2b realizados en ausencia (control) o presencia de SnPP (10  $\mu$ M, 24 h). Los niveles del mRNA de MMP9 se determinaron por RT-qPCR. Los datos fueron normalizados respecto de  $\beta$ -actina. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Se grafica las veces de inducción respecto del control y la SD calculada como se describe en *materiales y métodos*. \* Diferencia significativa,  $P < 0,01$ .

Para determinar si la sobre-expresión de HO-1 afectaba también la actividad de MMP9, se recolectó el medio condicionado de las células PC3HO-1 y PC3pcDNA3 cultivadas durante 24 h y se realizó un ensayo zimográfico. Se observó una disminución significativa (44,1%;  $P < 0.05$ ) de la actividad de MMP9 en los medios condicionados provenientes de las células transfectadas con HO-1 respecto al control (Fig. 45). Estos resultados claramente indican que la sobre-expresión de HO-1 se correlaciona con una disminución tanto de la expresión como de la actividad de MMP9 en PC3.

Para seguir documentando el rol de HO-1 en la expresión de MMP9, evaluamos la expresión de esta metaloproteasa en cultivos de la línea MDA PCa 2b tratadas con siRNAHO-1. La disminución de la expresión de HO-1 resultó en un aumento significativo de los niveles del

mRNA de MMP9 respecto del control, detectado por RT-qPCR (Fig. 43 A, panel inferior). Finalmente, evaluamos si el efecto represor de HO-1 sobre la actividad de MMP9 se reproducía cuando la sobre-expresión de HO-1 se lograba por tratamiento farmacológico. La exposición de los cultivos celulares a hemina (70  $\mu$ M, 24 h) provocó una importante disminución en la actividad enzimática de MMP9 tanto en PC3 como en LNCaP (Fig. 45). Estos resultados confirman que MMP9 es modulada, directa o indirectamente, por HO-1 en células de PCa.



**FIGURA 45.** El tratamiento con hemina y la sobre-expresión de HO-1 inhiben la actividad de MMP9 en células de cáncer de próstata.

Zimografía realizada con el medio condicionado de cultivos de células PC3pcDNA3, PC3HO-1, PC3 y LNCaP expuestas a hemina (70  $\mu$ M, 24 h) o cultivadas en su ausencia (control). Las bandas fueron cuantificadas usando el software *ImageJ 1.37.v* (NIH, USA) y normalizadas respecto a la cantidad de proteína total. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Se calculó la media  $\pm$  SD y se graficó como porcentaje respecto al control que se consideró 100%. \*Diferencia significativa,  $P < 0,05$ .

**3<sup>RA</sup> PARTE****IV.III EFECTOS *IN VIVO* DE LA MODULACION GENETICA DE LA EXPRESION DE HO-1****IV.III.1 INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE LOS TUMORES DE PCA QUE SOBRE-EXPRESAN HO-1 CRECIDOS COMO XENOGRAFOS**

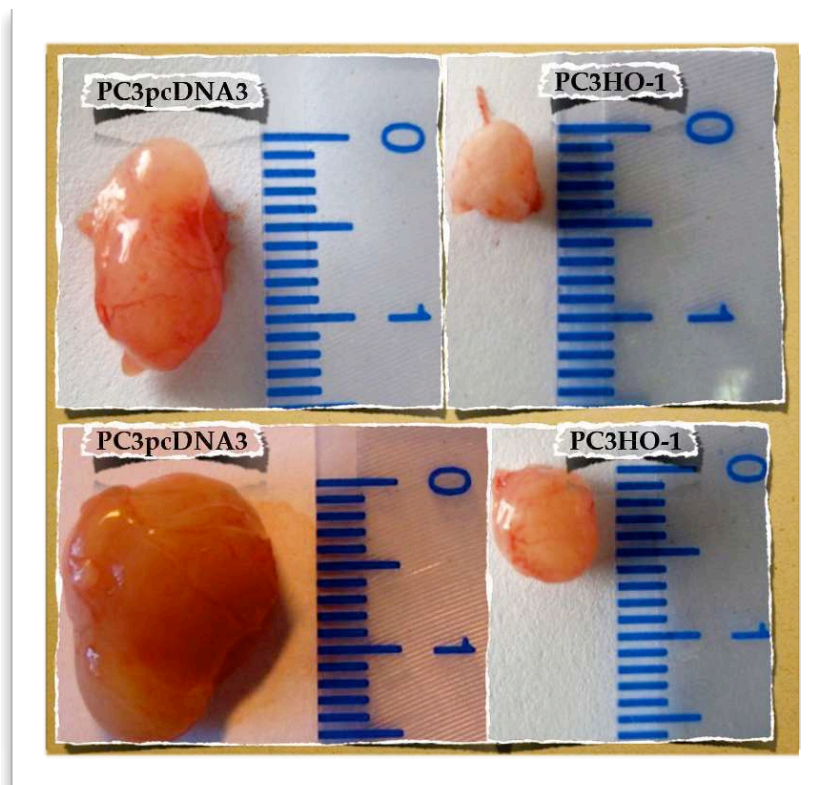
Las diferencias encontradas *in vitro* al analizar la modulación de la expresión de HO-1 sobre los procesos celulares evaluados, nos llevaron a investigar el efecto de la sobre-expresión de esta proteína sobre el crecimiento de tumores *in vivo*. Para lograr este objetivo utilizamos el modelo de inoculación de células tumorales humanas creciendo como xenógrafos en ratones inmunosuprimidos. De esta forma inyectamos *s.c.*  $3,6 \times 10^6$  células que sobre-expresan HO-1 (PC3HO-1) o su respectivo control (PC3pcDNA3) en el flanco derecho de ratones machos *nu/nu* atímicos.

Cabe resaltar que no se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los ratones inyectados con PC3HO-1 o con PC3pcDNA3 a lo largo del tiempo ensayado, aunque en todos los animales se comprobó el desarrollo de tumores. Los volúmenes tumorales se midieron cada dos días comenzando en el día 8 post-inoculación, período en el cual los tumores se hicieron palpables debajo de la piel. Los animales se sacrificaron después de 23 días cuando los tumores habían alcanzado un tamaño admisible de acuerdo a las regulaciones éticas (“Guía para el Bienestar de los animales en la Neoplasia Experimental” (United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research) y “Guía establecida para el cuidado y uso de animales de laboratorio” elaborado por el Comité de la Asociación Argentina de especialistas en animales de laboratorio (AADEALC)). En la Fig. 46 se muestran fotos representativas de los ratones portando ambos tipos de tumores, donde se puede observar macroscópicamente la diferencia del tamaño tumoral.



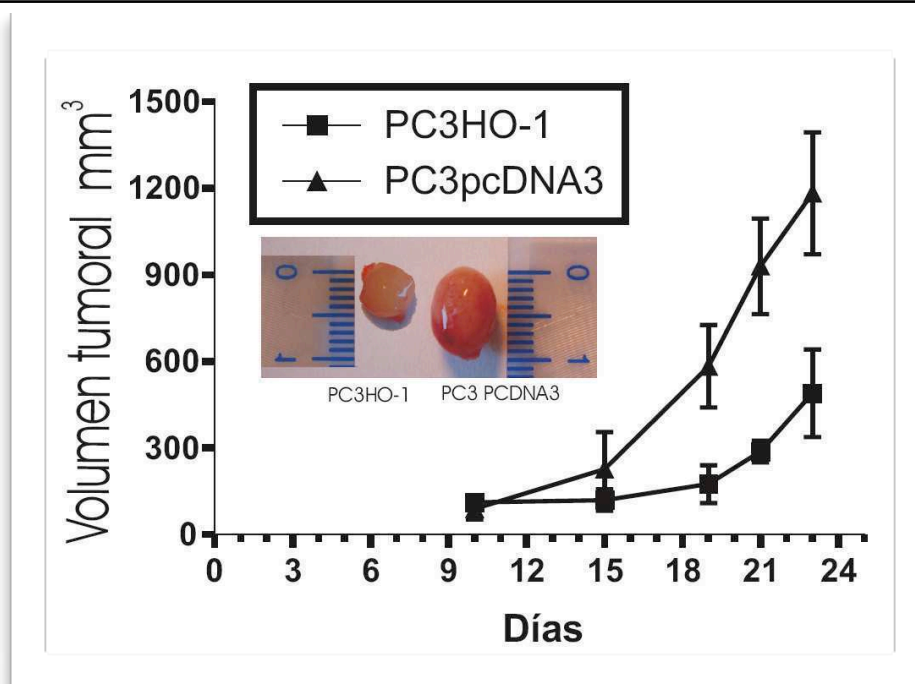
**FIGURA 46.** Fotos representativas de los ratones (nu/nu) sacrificados luego de 23 días post-inoculación, portando un tumor PC3pcDNA3 (foto superior) y un tumor PC3HO-1 (foto inferior).

En la Fig. 47 se observan fotos representativas de dos tumores de cada grupo, mostrando la medición del tamaño de los mismos.



**FIGURA 47.** Imágenes representativas de los tumores extirpados a los 23 días que muestran el tamaño tumoral reducido en los tumores PC3HO-1 (panel derecho) comparados con PC3pcDNA3 (panel izquierdo).

La sobre-expresión de HO-1 redujo significativamente (58,6%;  $P < 0,05$ ) el crecimiento tumoral. A los 23 días post-inoculación el volumen de los xenógrafos PC3HO-1 (volumen: 49 mm<sup>3</sup>,  $P < 0,05$ ) era significativamente menor que el de los tumores derivados de las células PC3pcDNA3 (volumen: 118 mm<sup>3</sup>,  $P < 0,05$ ) (Fig. 48).



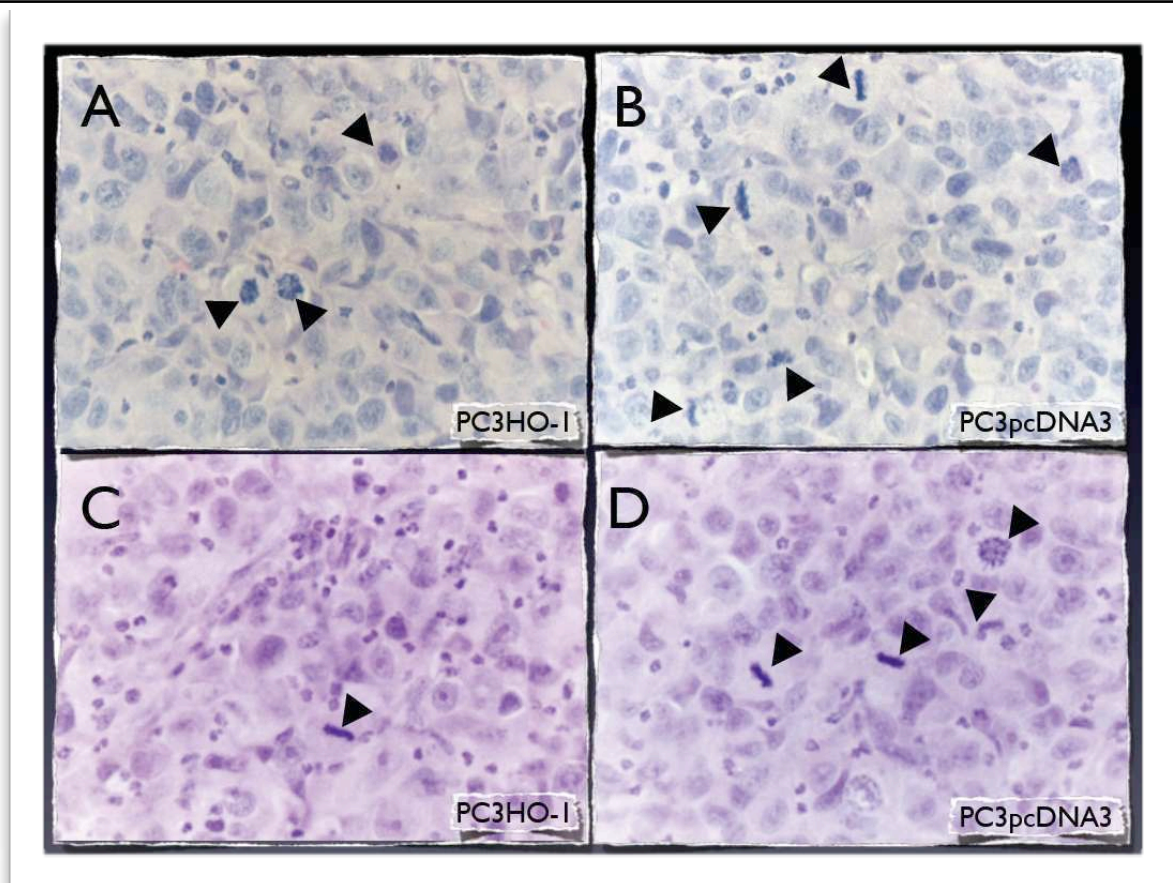
**FIGURA 48.** La sobre-expresión de HO-1 disminuye el crecimiento de los tumores de cáncer de próstata.

Ratones atímicos (*nu/nu*) machos, de seis/ocho semanas de edad, fueron randomizados en dos grupos: PC3HO-1 (n=5) y PC3pcDNA3 (n=5). Se inyectaron *s.c*  $3,6 \times 10^6$  células tumorales en el flanco derecho. El peso corporal y el tamaño tumoral fueron medidos cada dos días comenzando a 8 días luego de la inoculación y los animales fueron sacrificados a los 23 días. Se graficó la variación del volumen tumoral medio  $\pm$  SD en función del tiempo de crecimiento de los xenógrafos derivados de PC3HO-1 comparados con PC3pcDNA3. Inserto: Fotografías representativas de los tumores.

#### IV.III.2 PERFIL HISTOLOGICO DE LOS TUMORES DE PCA CRECIDOS COMO XENOGRAFOS

El examen de la histología de los tumores de ambos grupos mostró la presencia de figuras mitóticas con características normales y anormales. El índice mitótico estimado en promedio fue de 1-3 en tumores PC3HO-1 y de 4-6 en tumores PC3pcDNA3 (Fig. 49), en concordancia con la reducción en la tasa de proliferación observada en los ensayos *in vitro* (Fig. 39).

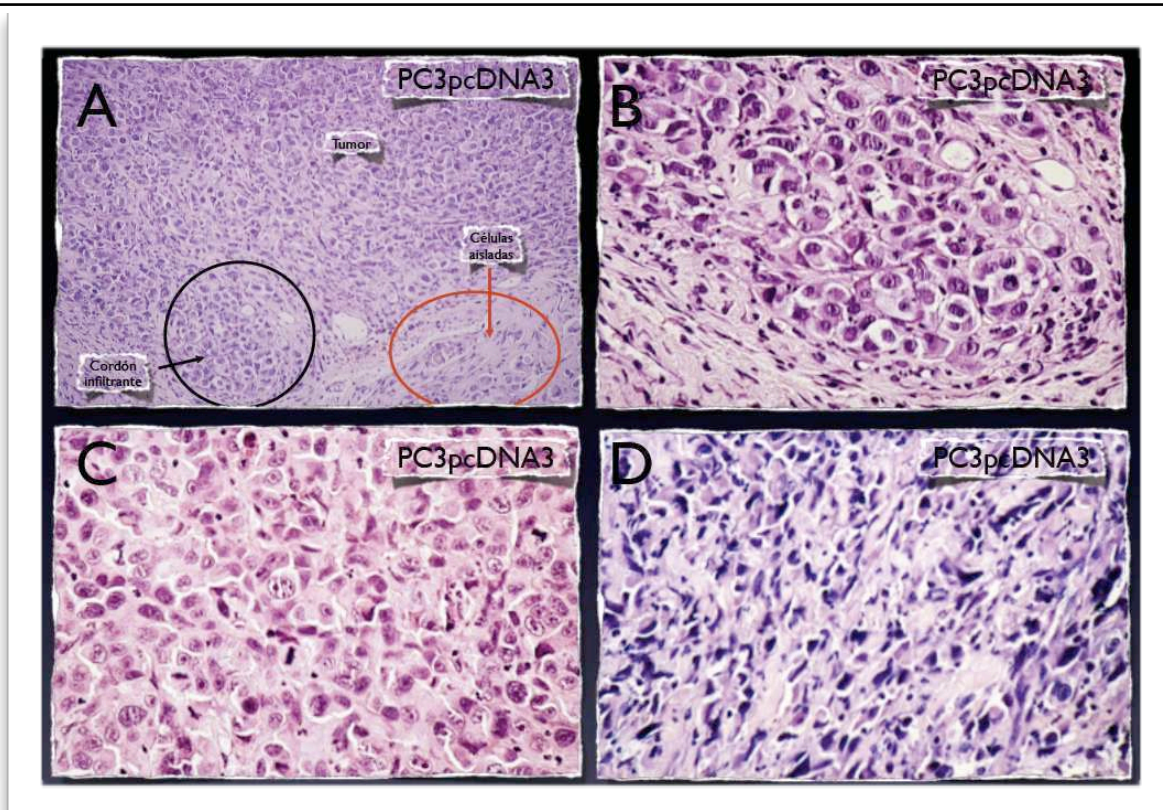




**FIGURA 49.** Disminución del índice mitótico en los tumores que sobre-expresan HO-1.

Los animales fueron inyectados y los tumores extirpados y procesados como se describió en la Fig. 47 y en *materiales y métodos*. Se realizaron tinciones de las secciones tumorales con H&E y las imágenes mitóticas se analizaron por microscopía óptica. Las puntas de flecha señalan las mitosis A) Corte de tumor PC3HO-1, resalta zona central con semi-diferenciación. B) Corte de tumor PC3pcDNA3; resalta zona central con semi-diferenciación. C) Imágenes mitóticas normales en los cortes de tumores PC3HO-1, promedio de 1-3 mitosis. D) Figuras mitóticas normales y anormales en tumores PC3pcDNA3, promedio de 4-6 mitosis. Aumento 25x.

Un análisis detallado de la histología revela que los tumores desarrollados en el flanco de los animales, corresponden a una proliferación neoplásica ubicada principalmente en el tejido subcutáneo. Ambos tipos de tumores, PC3HO-1 y PC3pcDNA3, están constituidos histológicamente por células atípicas de estirpe epitelial (carcinoma); las células se disponen en forma compacta amoldadas entre sí (Fig. 49 y 50).



**FIGURA 50.** Análisis histológico de los tumores controles creciendo como xenógrafos.

Fotos representativas de los cortes teñidos con H & E.

**A)** Borde tumoral donde histológicamente se ven células tumorales aisladas (derecha) y un cordón de células tumorales infiltrantes de aspecto diferenciado (izquierda) (Aumento 10x). **B)** Cordón de células tumorales diferenciadas con células ovoides de citoplasma claro y núcleos globulosos (Aumento 25x). **C)** Imagen histológica de un tumor PC3pcDNA3 indiferenciado, anaplásico, de aspecto sarcomatoide. (Aumento 25x). **D)** Zona central de un tumor PC3pcDNA3 histológicamente semidiferenciado en el que se ven imágenes de mitosis (Aumento 25x).

Los tumores PC3HO-1 presentan un mayor grado de diferenciación histológica, con un menor índice de mitosis por campo de gran aumento (promedio: 2-3 mitosis, 40x); en cambio los tumores PC3pcDNA3 muestran un menor grado de diferenciación histológica (Fig. 50 D) y un mayor índice de mitosis por campo de gran aumento (promedio: 4-6 mitosis, 40x). En la mayoría de los tumores de ambos grupos se observan zonas de necrosis, predominantemente en la zona central con un compromiso, en general, de entre un 5 y 15%.

Todos los tumores (PC3HO1 y PC3pcDNA3) tienden a ser más diferenciados en el zona central con una progresiva indiferenciación hacia los bordes tumorales. El patrón de infiltración de los tejidos circundantes (músculo, conectivo y adiposo) varía según el grupo. En los tumores PC3HO-1 la infiltración es por igual de tipo compresivo (push), en forma de invasión de células aisladas (spray) o por cordones infiltrantes. En los tumores PC3pcDNA3

predomina el crecimiento por compresión (push). En ambos grupos se observa una leve infiltración inflamatoria, a predominio linfocitario de disposición intratumoral.

#### IV.III.3 DISMINUCION DE LA EXPRESION DE MMP9 EN LOS TUMORES QUE SOBRES-EXPRESAN HO-1 CRECIDOS COMO XENOGRAFOS

A fin de determinar los niveles de expresión de MMP9, se extrajo mRNA de ambos tipos de tumores y se realizó RT-qPCR. Los niveles de MMP9 fueron significativamente menores en los tumores PC3HO-1 comparado con los tumores PC3pcDNA3 (Fig. 51), nuevamente avalando los datos obtenidos de los estudios *in vitro* (Fig. 43 y 45).

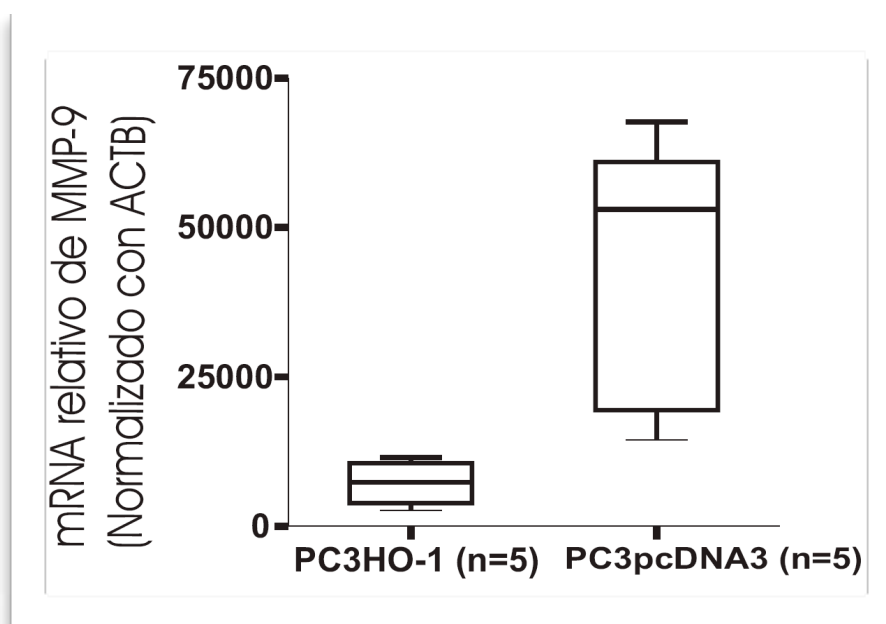


FIGURA 51. Disminución de los niveles del mRNA de MMP9 en los tumores que sobre-expresan HO-1 crecidos como xenógrafos.

Los animales fueron inyectados y los tumores (PC3HO-1 y PC3pcDNA3) extirpados, congelados en nitrógeno líquido y procesados para la extracción de mRNA como se describió en *materiales y métodos*. Los niveles de mRNA de MMP9 se determinaron por RT-qPCR. Los datos fueron normalizados respecto de  $\beta$ -actina. Se muestra el diagrama de distribución de datos, indicando las medias y los SD.

Mediante análisis por inmunohistoquímica, se corroboró que los tumores generados por las células PC3HO-1 mostraban inmuno-reactividad positiva para HO-1 (Fig. 52 A-F) mientras que los tumores derivados de las células controles (PC3pcDNA3) presentaban inmunomarcación negativa para esta proteína (Fig. 52 G y H). Estos estudios también demostraron que los tumores provenientes de las células controles presentaban inmuno-

reactividad positiva para MMP9 predominantemente citoplasmática (Fig. 53 A-F), mientras que los tumores que sobre-expresaban HO-1 presentaron inmunomarcación negativa para esta proteína (Fig. 53 G y H), en concordancia con los resultados obtenidos *in vitro* (sección IV.II.4) y con la cuantificación del mRNA de MMP9 de los xenógrafos (Fig. 51). Cabe resaltar que se observó tanto tinción citoplasmática como nuclear para HO-1 en los tumores PC3HO-1 (Fig. 52 A-F). La detección de la tinción nuclear de HO-1 confirma hallazgos previos de nuestro laboratorio en carcinomas prostáticos primarios humanos y células tumorales tratadas con hemina (Sacca et al., 2007). En el presente trabajo de tesis, utilizamos técnicas de inmunofluorescencia y comprobamos la marcación nuclear de HO-1, tanto en células PC3 tratadas con hemina como en la línea PC3HO-1 (Fig. 54 A y B). Más aún, no solamente observamos una mayor señal inmuno-reactiva en citoplasma sino que pudimos detectar una fuerte inmunofluorescencia nuclear consecuencia de la expresión aumentada HO-1 en ambos tipos celulares respecto de sus respectivos controles (Fig. 54 A y B). Los resultados mostraron zonas de color amarillo producto de la localización de HO-1 (teñida de rojo) en el citoplasma (vimentina/verde). Luego de la inducción con hemina o la sobre-expresión de HO-1 (PC3HO-1) se detectó color rosa magenta, producto de la colocalización nuclear de HO-1 (rojo) con los núcleos (azul). Así podemos proponer que tanto la modulación farmacológica como la sobre-expresión estable indujeron la translocación nuclear de HO-1.

Los resultados presentados en este manuscrito claramente indican que HO-1 juega un rol central como molécula mediadora de la progresión tumoral en cáncer de próstata.

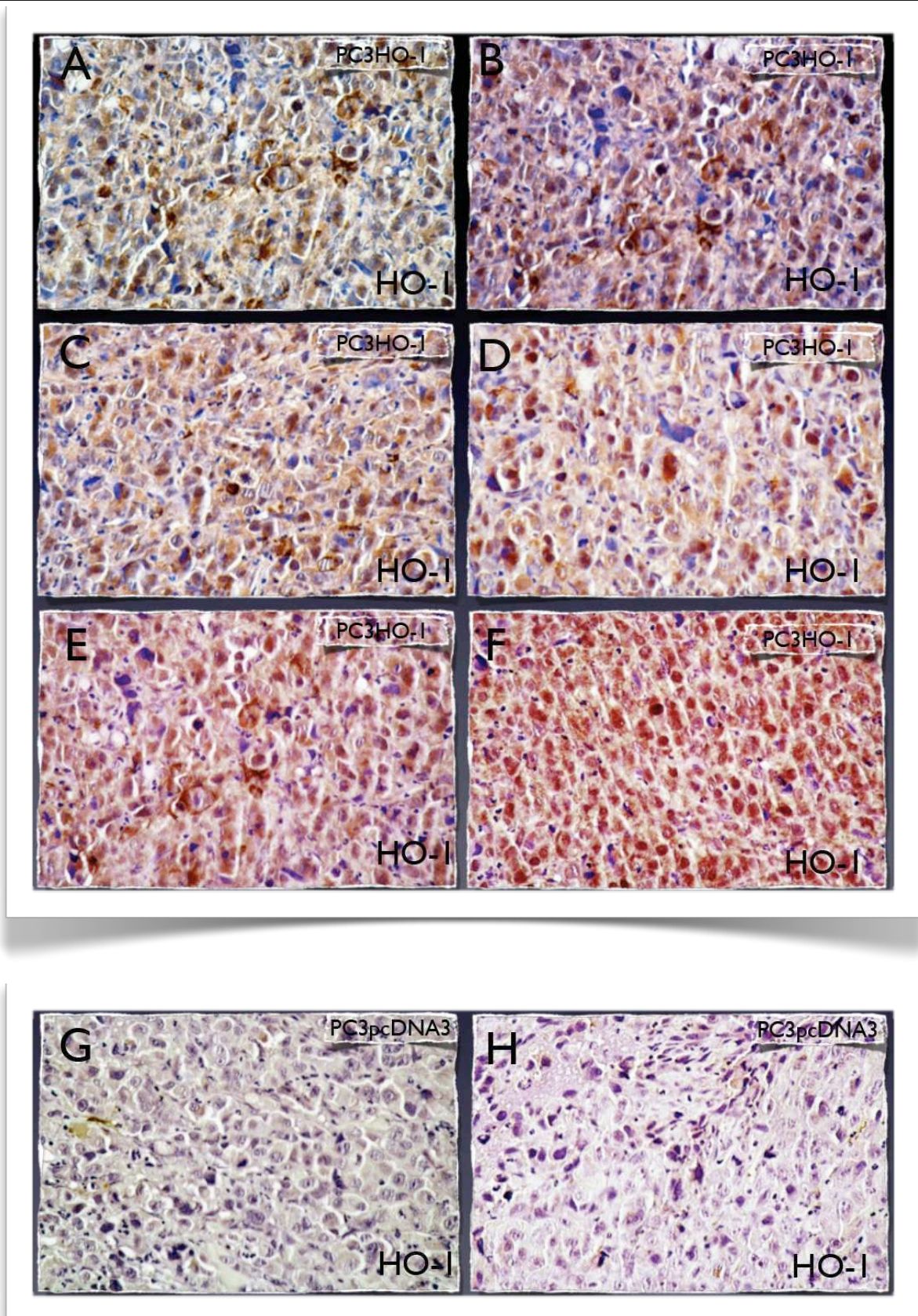
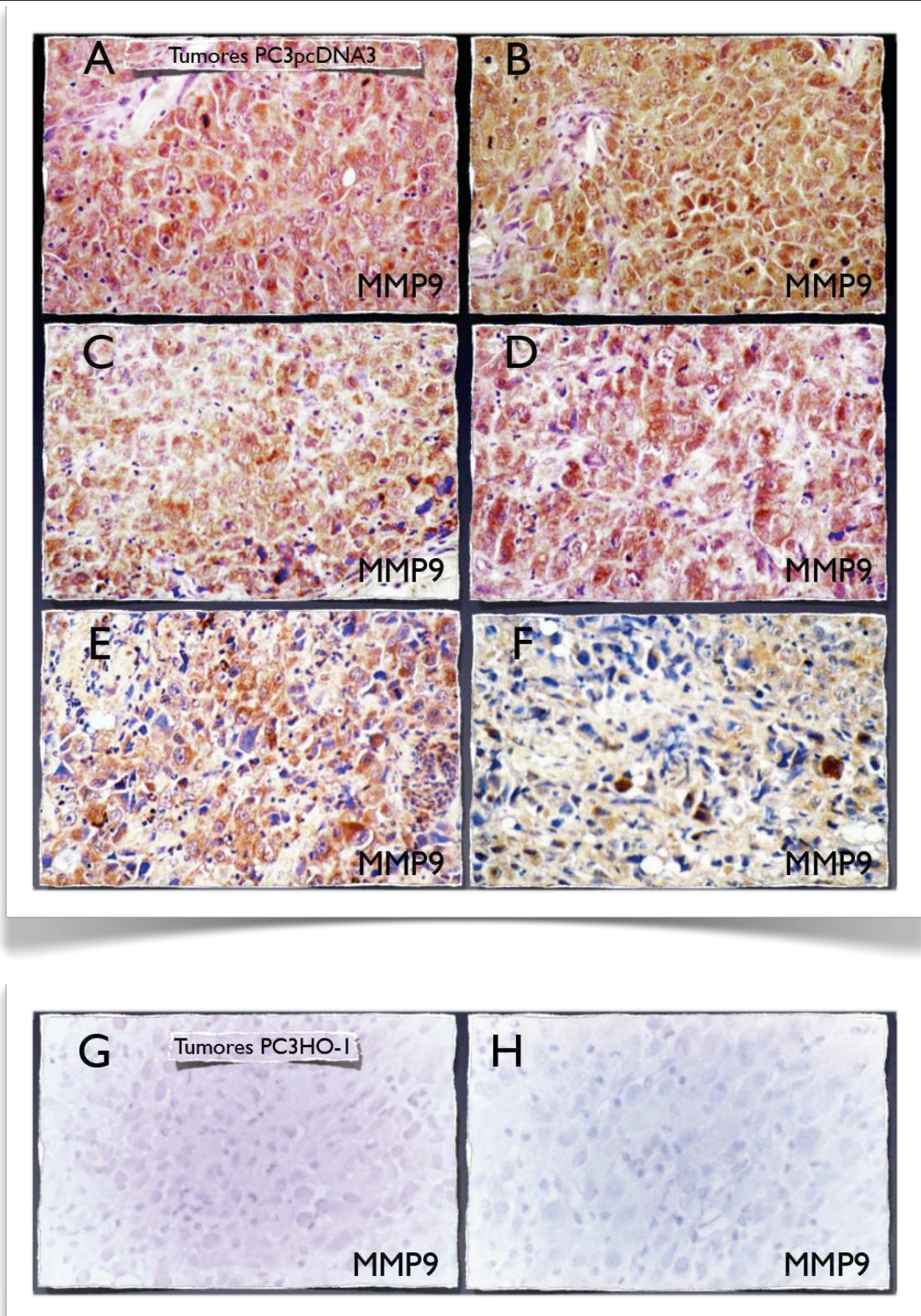


FIGURA 52. Inmunomarcación de HO-1 en los tumores de PCa creciendo como xenógrafos. Fotos representativas de la inmuno-reactividad de HO-1 en tumores PC3HO-1 y controles.

A) Zona periférica de un tumor PC3HO-1 histológicamente menos diferenciado. Inmuno-marcación positiva para HO-1, a predominio citoplasmática con algunos núcleos con intensa marcación. B) Imagen

donde se aprecia la intensa marcación nuclear para HO-1. C y D) Zona central de un tumor PC3HO-1 histológicamente diferenciado. Inmunomarcación positiva para HO-1, nuclear, intensa y con marcación citoplasmática de menor intensidad. E) Zona central de un tumor PC3HO-1 histológicamente semidiferenciado. Inmunomarcación positiva para HO-1, a predominio citoplasmático con aspecto difuso. Escasos núcleos aislados con marcación positiva de mayor intensidad. F) Zona central de un tumor PC3HO-1 con mayor diferenciación histológica. Inmunomarcación positiva para HO-1 intensa, a predominio citoplasmático y de aspecto difuso; núcleos aislados positivos de mayor intensidad. G) Tumor PC3pcDNA3 con células tumorales con inmuno-reactividad negativa para HO-1 y fibroblasto intratumoral positivo para HO-1 (izquierda). H) Zona central de un tumor PC3pcDNA3 histológicamente semidiferenciado con inmunomarcación negativa para HO-1. Aumento 25x.



**FIGURA 53.** Inmunomarcación positiva de MMP9 en los tumores de PCa creciendo como xenógrafos. Fotos representativas de la inmuno-reactividad de MMP9 en tumores PC3HO-1 y controles.

A) Zona central de un tumor PC3pcDNA3 histológicamente diferenciado. Inmunomarcación positiva para MMP9, grumosa, con predominio citoplasmático y de aspecto difuso. Tabique conjuntivo-vascular negativo. B) Zona central de un tumor PC3pcDNA3 histológicamente semidiferenciado. Inmunomarcación positiva para MMP9, grumosa, con predominio citoplasmático y de aspecto difuso. Células en mitosis con citoplasma positivos para MMP9 de gran intensidad. Tabique conjuntivo-vascular negativo. C y D) Zona central de un tumor PC3pcDNA3 histológicamente semidiferenciado. Inmunomarcación positiva para MMP9, grumosa, con predominio citoplasmático y de aspecto difuso. E) Zona central de un tumor PC3pcDNA3 con indiferenciación histológica. Inmunomarcación positiva para MMP9, grumosa, a predominio citoplasmático y de aspecto parcialmente difuso. Células anaplásicas negativas para MMP9. F) Zona periférica infiltrante de un tumor PC3pcDNA3 histológicamente indiferenciado que engloba tejido adiposo. Inmunomarcación positiva para MMP9, grumosa, a predominio citoplasmático. Células tumorales, aisladas, con núcleos positivos para MMP9. G y H) Zona central de un tumor PC3HO-1 histológicamente diferenciado. Inmunomarcación negativa de las células tumorales para MMP9. Aumento 25x.



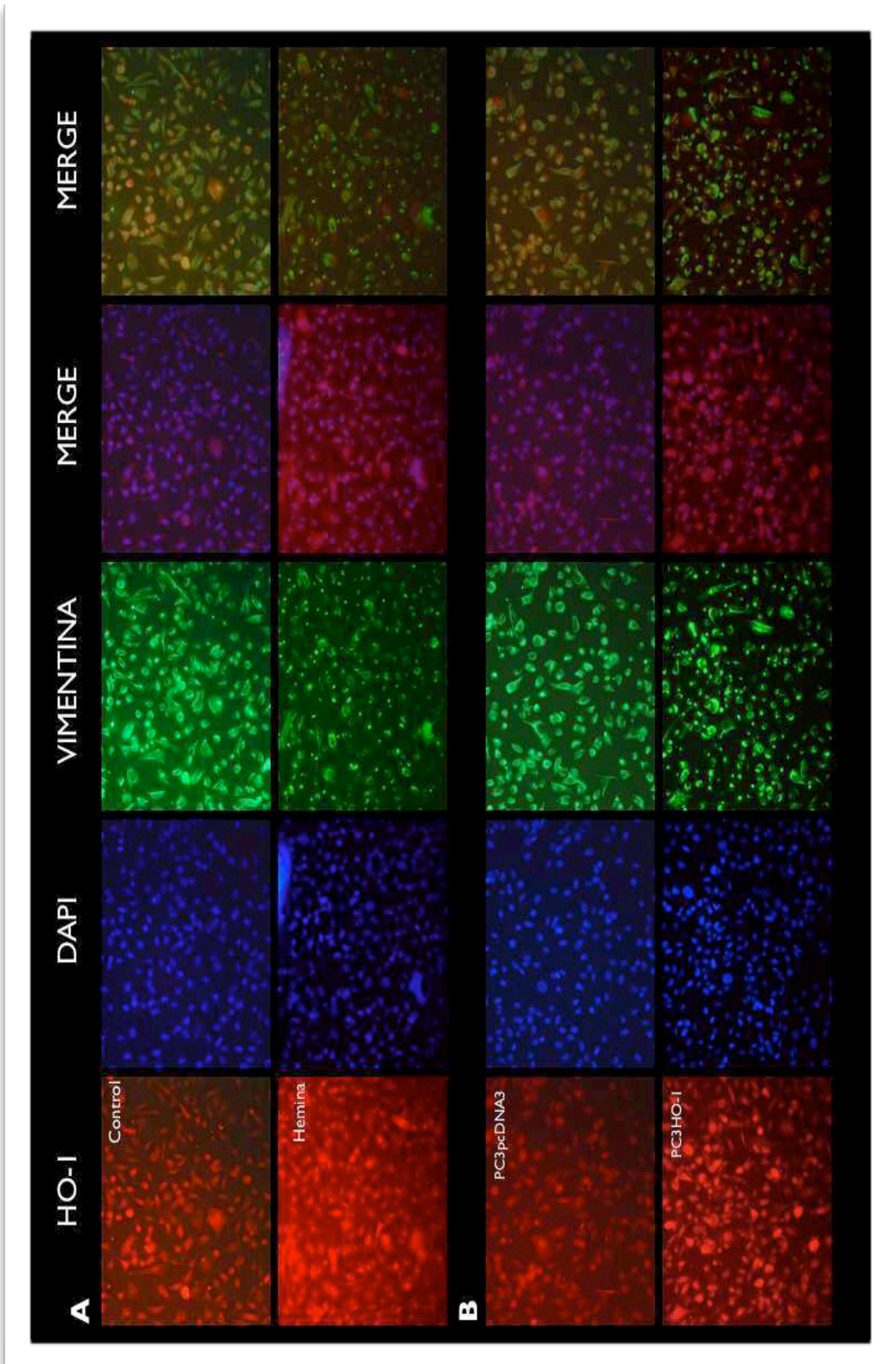


FIGURA 54. HO-1 se localiza en el núcleo cuando su expresión es inducida farmacológica o genéticamente.

---

**Expresión de HO-1 en células PC3 control y PC3 tratadas con hemina (70  $\mu$ M, 24 h) (A) y PC3pcDNA3 y PC3HO-1 (B) por inmunofluorescencia. Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos durante 24 h. Las fotos muestran la tinción inmunocitológica para HO-1 (rojo; Alexa Flúor 594) y para Vimentina (verde; Alexa Flúor 488). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). La colocalización citoplasmática (amarillo) de HO-1 con vimentina y la colocalización nuclear (rosa/magenta) de HO-1 con DAPI se muestra en los paneles MERGE. Magnificación final 630x.**

# DISCUSION

---

**CAPITULO V****DISCUSION**

El cáncer tiene una importancia única en el contexto de la biología celular, ya que implica un cambio en la conducta de un grupo de células, que no responden a los lineamientos básicos de comportamiento dentro del organismo. Para comprender los procesos asociados al cáncer y para idear procedimientos racionales para tratarlo, los investigadores deben conocer tanto los procesos internos que ocurren en las células, como las interacciones sociales entre éstas y los tejidos del cuerpo.

Las células epiteliales prostáticas requieren niveles fisiológicos de andrógenos tanto para estimular la proliferación como para inhibir la apoptosis (Isaacs, 1994). Debido a que el crecimiento de las células de próstata es andrógeno dependiente, casi todos los pacientes con PCa avanzado responden inicialmente a la deprivación hormonal y a la terapia con anti-andrógenos. Sin embargo, virtualmente estos pacientes harán recidivas debido al disparo del crecimiento independiente de andrógenos de las células tumorales o a la aparición de células resistentes a la castración. Estas células expresan genes respondedores a andrógenos y frecuentemente también al AR en núcleo, sugiriendo que el receptor es activado por mecanismos que no requieren del suministro exógeno de andrógenos (Lee et al., 2007). Obviamente los niveles séricos de testosterona están significativamente reducidos después de la terapia de deprivación, sin embargo la cantidad de andrógenos intraprostáticos son suficientes para activar al AR (Marks et al., 2008; Montgomery et al., 2008). La comprensión de los mecanismos biológicos involucrados en la progresión del PCa hacia la independencia de andrógenos y la generación de metástasis, es un tema crucial en la investigación de esta enfermedad (De Marzo et al., 2007). La inducción de HO-1 surge como un proceso de defensa celular fundamental frente a estímulos de estrés como ante insultos provenientes del medio ambiente (Otterbein et al., 2003). Los efectos anti-inflamatorios de HO-1 protegen a las células, tejidos e incluso a órganos enteros de estas alteraciones ambientales. El rol fundamental de HO-1 frente al estrés oxidativo se comprobó a través de la generación de líneas celulares murinas deficientes en HO-1, las cuales son susceptibles a la acumulación de radicales libres y a la injuria oxidativa tanto *in vitro* como *in vivo* (Poss y Tonegawa, 1997b). Este rol crítico también se demostró a partir de los estudios realizados con el único

caso humano de deficiencia de HO-1, el cual presentó altos niveles de daño endotelial e inflamación prolongada (Kawashima et al., 2002; Yachie et al., 2003).

Diferentes cánceres humanos expresan altos niveles de HO-1 y han surgido opiniones controvertidas sobre su rol en esta enfermedad, emergiendo dudas sobre si esta proteína confiere ventajas de crecimiento a las células tumorales (Jozkowicz et al., 2007). Trabajos anteriores realizados por nuestro laboratorio y por otro grupo de investigación han asociado a HO-1 con la carcinogénesis prostática (Maines y Abrahamsson, 1996; Sacca et al., 2007). Sin embargo, el rol de esta molécula en PCa quedaba aún por dilucidar.

Los datos presentados en esta tesis demuestran que las líneas celulares de PCa expresan HO-1 siendo los niveles basales superiores en las células sensibles a andrógenos, MDA PCa 2b y LNCaP, comparados con los detectados en las células de la línea PC3, insensible a andrógenos (Fig. 21). Trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que la disminución de la expresión de HO-1 se correlacionaba con la progresión maligna en un modelo experimental de hepatocarcinogénesis en ratones (Caballero et al., 2004). En concordancia con este hallazgo en la presente tesis observamos que la expresión de HO-1 es menor en PC3, la línea de cáncer de próstata más agresiva en comparación con las otras líneas estudiadas. Dado que la respuesta a andrógenos dispara estrés oxidativo (Venkateswaran et al., 2002), nosotros creemos que los niveles endógenos altos de HO-1 en LNCaP y en MDA PCa 2b, pueden estar asociados al mantenimiento de la homeostasis celular como fuera documentado en otros modelos (Was et al., 2006). Sin embargo, no podemos establecer una conclusión válida respecto al significado de los diferentes niveles basales de expresión de HO-1 asociados al receptor de andrógenos todavía. En conclusión, la falta de HO-1 en las células PC3 podría de alguna manera ser responsable del potencial metastásico aumentado de estas células, reflejado a través de su capacidad de proliferación, migración e invasión incrementada. Así, es razonable hipotetizar que HO-1 está implicada en la modulación de estos procesos celulares.

La hemina es un potente inductor selectivo de HO-1 (Shibahara et al., 1979). En este trabajo comprobamos que en las tres líneas celulares (independientemente de los niveles proteicos endógenos) hemina efectivamente fue capaz de ejercer su efecto inductor sobre la expresión

de HO-1 confirmado por RT-qPCR y Western Blot (Fig. 22-24). Además, comprobamos que los sitios ARE ubicados en el promotor de HO-1 son esenciales para la activación transcripcional de esta proteína (Fig. 25).

A nivel celular, nosotros demostramos aquí que la inducción de HO-1, por su activador específico hemina, provocó una disminución significativa de la proliferación e invasión de las células de PCa (Fig. 28 y 30). Más aún, cuando monitoreamos la motilidad de las células PC3, pudimos documentar por primera vez la capacidad migratoria disminuía en estas células por tratamiento con hemina (Fig. 31; VIDEOS 1 y 2). El mismo efecto fue observado en LNCaP (Fig. 32). Además, este hallazgo sustenta la baja movilidad observada en las células de la línea MDA PCa 2b, probablemente relacionada en parte a su alta expresión endógena de HO-1 (VIDEO 3). El tratamiento con el inhibidor de HO-1, SnPP produjo un marcado incremento en la expresión de HO-1 en las líneas de PCa estudiadas (Fig. 33) y a su vez la disminución de la proliferación celular y la invasión tanto en PC3 como en MDA PCa 2b (Fig. 34 y 35). Estos resultados son coherentes con los mencionados previamente originados por el inductor de HO-1, ya que SnPP si bien es un inhibidor de la actividad de hemo-oxigenasa produce un efecto paradójico induciendo la expresión de la proteína.

Por ensayos de viabilidad celular y apoptosis demostramos que los tratamientos farmacológicos utilizados no eran citotóxicos (Fig. 26 y 27). Así, estos datos nos dan un apoyo adicional a nuestras observaciones que sería la expresión y no los productos de la actividad de HO-1 la responsable de los efectos celulares observados, al menos bajo las condiciones experimentales ensayadas. Incluso, como mencionáramos en la introducción, debemos resaltar la hipótesis sugerida por el grupo de Dennery (2008) que la proteína HO-1 misma regula su propia expresión de una manera feedback positiva y que este efecto autorregulatorio sería importante para la inducción del gen en respuesta al estrés oxidativo (Lin et al., 2008b). En células NIH3T3 en cultivo, la transfección con el cDNA de HO-1 o la administración de la proteína pura resultó en la activación del promotor y en el aumento concomitante del mRNA y de la proteína HO-1. Estos efectos eran independientes de la actividad de HO-1, ya que una mutante enzimáticamente inactiva de la misma, activaba de manera similar al promotor de HO-1 y el tratamiento con SnPP no afectó la activación de

dicho promotor. Más aún, el siRNA específico para HO-1 significativamente redujo la inducción de la proteína mediada por hemina. Estos experimentos documentan que HO-1 tiene un rol auto-regulatorio en su proceso de inducción apoyando nuestra hipótesis sugiriendo que la expresión de HO-1 puede jugar un rol clave en procesos celulares independiente de su actividad. Recientemente, durante la etapa final de la escritura de esta tesis, los mismos autores reportaron que la administración de Zinc protoporfirina IX (ZnPP), un análogo del hemo, que inhibe la actividad de hemo oxigenasa, se transloca al núcleo e induce la expresión del gen *hmx-1*, reprimiendo a su vez el crecimiento tumoral. Por un análisis de microarray demostraron que ZnPP inhibía la actividad del promotor de ciclina D1. Además, comprobaron que tanto los niveles del mRNA como de la proteína disminuían en presencia de la profirina. Confirmaron que el efecto de ZnPP se debía parcialmente a la asociación con las proteínas Sp1 y Egr1, más que a la interacción directa con el DNA. A su vez, la administración de ZnPP inhibía la expresión de ciclina D1 y la progresión de un linfoma de células B en ratones, efectos independientes de la actividad de HO (La et al., 2009).

Si bien es ampliamente conocido que hemina es un potente inductor selectivo de HO-1, decidimos descartar otros efectos mediados por la hemina, que no fuesen causados por la sobre-expresión de HO-1. Para dilucidar si la expresión de HO-1 en sí misma es responsable de la modulación de los procesos celulares observados, generamos la línea PC3HO-1 por transfección estable de HO-1 (Fig. 37) y confirmamos que la sobre-expresión de la proteína reducía significativamente la proliferación y migración de las células tumorales (Fig. 39 y 40). Sin embargo, no pudimos detectar reducción de la invasión celular en la línea PC3HO-1. Si bien no podemos dar una explicación clara para esta observación, es importante señalar que los niveles de inducción de HO-1 por tratamiento con hemina son significativamente más altos que los obtenidos por transfección estable y probablemente el nivel de expresión alcanzado después de la transfección no sea suficiente para contrarrestar el potencial invasivo de estas células, altamente metastásicas. Además no podemos dejar de mencionar que la hemina también modula otros genes (por ejemplo, moléculas de adhesión), muchos de los cuales ejercen una influencia importante en los procesos celulares descritos (Kapturczak et al., 2004) lo que finalmente podría explicar la respuesta invasiva diferencial observada en la células PC3 tratadas con hemina respecto a las células PC3HO-1.

HO-1 inhibe la proliferación e induce la apoptosis en varias líneas tumorales como células de carcinoma de mama (Hill et al., 2005). La inducción de HO-1 por la droga quimio-preventiva sulforafano, contribuye a la supresión del crecimiento tumoral, aumentando la actividad de los genes de respuesta antioxidante en células de cáncer de mama y hematoma (Cornblatt et al., 2007; Keum et al., 2006). A pesar de que el efecto antitumoral de HO-1 ha sido investigado, el rol de HO-1 en la invasión y migración en cáncer permanecen indefinidos.

Los ROS son importantes segundos mensajeros en la regulación de las cascadas de señalación intracelular. Un aumento en los niveles intracelulares de ROS fue detectado en tumores, y se ha identificado la inducción de la proliferación y la invasión en células tumorales con activación de MMP9 mediada por ROS (Lin et al., 2007b; Wu et al., 2006). Está bien documentado que la inducción de HO-1 reduce los niveles intracelulares de ROS (Chen et al., 2006b; Hill et al., 2005; Lin et al., 2007a). Sin embargo, el rol de estas especies en la acción de HO-1 sobre la invasión de las células tumorales permanece indeterminado. Se ha reportado que el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) induce la carcinogénesis a través de la activación de cascadas de señalización intracelulares, incluyendo PKC, MAPK y ROS *in vitro* e *in vivo* (Jorgensen et al., 2005; Racz et al., 2006; Uht et al., 2007; Wu et al., 2006).

Simultáneamente con la publicación de los resultados de esta tesis, Alaoui-Jamali y colaboradores proponen a HO-1 como un biomarcador y un potencial blanco terapéutico para el PCa avanzado refractario a hormonas. Los resultados publicados por estos autores se contradicen con nuestro hallazgos y con el dogma ampliamente aceptado sobre el incuestionable rol anti-oxidante de HO-1 (Alaoui-Jamali et al., 2009). Estos autores reportan un aumento de la expresión de HO-1 en las células epiteliales de muestras de cánceres refractarios a hormona, y no en el estroma circundante. Esta afirmación es contraria a lo establecido previamente por nosotros, en el trabajo de Sacca y colaboradores, donde se demuestra que la expresión citoplasmática de HO-1 es equivalente en parénquima tumoral, en el no tumoral y en las muestras de hiperplasia benigna (Sacca et al., 2007). Además en nuestros análisis inmuno-histoquímicos siempre hemos observado inmunomarcación positiva para HO-1 en ciertos componentes estromales como por ejemplo en fibroblastos,



células endoteliales, macrófagos, etc. Por otra parte dicho grupo reporta que el silenciamiento de HO-1 disminuyó el estrés oxidativo y la activación de p38 (MAPK), cuando el efecto anti-oxidante de la biverdina/bilirrubina es incuestionable. Ellos desarrollaron el inhibidor nuevo de HO-1, OB-24, y testearon su actividad sobre PC3M, una línea derivada de PC3 con alta capacidad metastásica, reportando efectos antitumorales de dicho compuesto. No es claro el origen de las diferencias obtenidas entre ambos grupos de trabajo, sin embargo resultados preliminares reportados por el grupo de Otterbein (congreso HO-1, 2009) trabajando con células PC3 y LNCaP coinciden completamente con los resultados presentados en este manuscrito.

Con el fin de provocar condiciones experimentales de deficiencia de HO-1, muchos estudios han utilizado análogos del hemo como las porfirinas, los cuales no son específicos para HO-1 y además presentan el efecto paradójico de inhibir la actividad pero de aumentar su expresión (Jozkowicz et al., 2007). Para evitar este efecto dual, en este estudio bloqueamos la expresión de HO-1 *in vitro* mediante la estrategia de siRNA (Zhang et al., 2004). El tratamiento de las células MDA PCa 2b con siRNA específico para HO-1 provocó el esperado silenciamiento de la expresión del mRNA de HO-1 (Fig. 38). Este tratamiento a su vez redujo significativamente la proliferación e invasión de las células MDA PCa 2b (Fig. 39 y 41). Por otro lado, no se consiguió modificar la motilidad celular de esta línea, lo que en parte puede deberse a la reducida movilidad basal de estas células y probablemente debido a las limitaciones técnicas para detectar cambios cinéticos de menor dimensión. Alternativamente, podría ser que los niveles de disminución de la expresión de HO-1 logrados por la metodología de RNAi no hayan sido suficientes para producir un aumento detectable en la motilidad de las células tumorales. Es posible que HO-1 actúe como un reóstato capaz de controlar la capacidad proliferativa, invasora y migratoria en respuesta a estrés. Es necesario realizar estudios cinéticos adicionales para poder dilucidar este hallazgo.

La diseminación de las células de PCa y su capacidad de sobrevivir cuando llegan al nuevo microambiente del nicho metastásico está afectada por factores de crecimiento, quimioquinas, moléculas de adhesión, factores angiogénicos y hormonas (De Marzo et al., 2007). En este contexto, el presente estudio pretendió correlacionar la expresión constitutiva

de genes asociados a angiogénesis e inflamación en las líneas MDA PCa 2b y PC3, y analizar la expresión de dichos genes luego de la modulación genética de HO-1. Así identificamos un set de genes cuya expresión se detectó disminuída en las células PC3HO-1 respecto a PC3pcDNA3 y en las MDA PCA 2b (con alta expresión endógena de HO-1) en comparación con PC3 (con baja expresión endógena de HO-1) (Fig. 42 y TABLA IV). Las principales variaciones las encontramos en los siguientes genes: ANGPT1, ANGPTL3, CXCL1, 3,10 y 5, FIGF, IL-6, IL-8, MMP9, THBS1 y VEGFA. Por otro lado, solamente ID3 se encontró inducido. Estos datos sugieren que la modulación de un set de genes implicados en angiogénesis e inflamación está directamente relacionada con HO-1. Las CXCL, son pequeñas citoquinas quimiotácticas que pueden inducir migración de leucocitos, activar respuestas inflamatorias/inmunes, y han sido implicadas en la regulación del crecimiento (Krieg and Boyman, 2009). Los miembros de la familia de MMP son responsables de la degradación de los componentes proteicos en la ECM, en el microambiente inmediato a la célula tumoral, como también de la activación de factores de crecimiento latentes, de receptores de la superficie celular y de moléculas de adhesión (Chakraborti et al., 2003). Las interacciones células-ECM disparan señales celulares que promueven la diferenciación, la migración y la movilización celular, procesos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis. Las MMP se sintetizan como pro-zimógenos. Pueden ser secretadas o pueden permanecer unidas a membrana y luego procesadas y activadas, permitiendo así la degradación localizada de sus sustratos (Brooks et al., 1996; Yu y Stamenkovic, 2000). Los inhibidores fisiológicos de las metaloproteasas (TIMP) limitan su actividad (Olson et al., 1997). La expresión aumentada de las MMP, particularmente MMP2 y MMP9, ha sido intensamente correlacionada con la malignidad de los tumores y una supervivencia menor en pacientes con cáncer (Hanemaaijer et al., 2000; Pellikainen et al., 2004). La angiopoyetina es un factor de crecimiento capaz de inducir migración e invasión de células tumorales mamarias MCF-7 *in vivo*, reduciendo los niveles de Caderina E, y aumentando la actividad de Akt (Imanishi et al., 2007). La IL-8 es una quimioquina pro-inflamatoria asociada con la promoción de la quimiotaxis de neutrófilos y la degranulación. Esta quimioquina activa múltiples vías de señalización intracelulares río debajo de dos receptores (CXCR1 y 2) asociados a la proteína G. La expresión aumentada de IL-8 y/o de sus receptores se ha detectado en células tumorales, endoteliales, neutrófilos

infiltrantes y macrófagos asociados al tumor, sugiriendo que esta interleuquina puede actuar como un factor regulatorio dentro del ambiente tumoral (Waugh y Wilson, 2008). La IL-6 es una citoquina involucrada en la regulación de una multiplicidad de funciones incluyendo proliferación, apoptosis, angiogénesis y diferenciación. La IL-6 se expresa en próstata y sus niveles aumentan durante la carcinogénesis prostática, considerándose un factor de crecimiento positivo para este tipo celular. También juega un rol en la modulación de la respuesta inmune. Señaliza a través de un receptor de membrana (Culig et al., 2005). La trombospondina es una glicoproteína adhesiva que media las interacciones célula a célula y célula matriz. Se puede unir a fibrinógeno, fibronectina, laminina, colágeno tipo V e integrinas. Juega un rol clave en la agregación plaquetaria, la angiogénesis y la tumorigénesis (Komuro et al., 2009). El FIFG (VEGF-D) es un miembro de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas y vascular endotelial (PDGF/VEGF). Es activo en angiogénesis, linfangiogénesis y crecimiento endotelial. Es estructural y funcionalmente similar a VEGF-C. La expresión de VEGF-C y D está relacionada con la invasión y metástasis a nódulo linfático en varios neoplasmas (Arigami et al., 2009). El VEGF-A es otro miembro de dicha familia. Es un mitógeno glicosilado que actúa en las células endoteliales, aumentando la permeabilidad vascular, la vasculogénesis y el crecimiento endotelial, promoviendo la migración celular e inhibiendo la apoptosis. La sobre-expresión de VEGF-A se ha correlacionado con riesgo aumentado de progresión en PCa (Peyromaure et al., 2007). Por otro lado, las proteínas ID (inhibidores de diferenciación) son un tipo de antagonistas dominantes negativos de factores de transcripción hélice-loop-hélice. A estas proteínas les falta el dominio de unión al DNA y funcionan formando heterodímeros e inhibiendo la expresión génica (Ling et al., 2006; Wong et al., 2004). Las ID regulan negativamente la diferenciación y promueven la proliferación, por lo tanto la expresión específica de subgrupos de esta familia varía en diversos tipos de tumores. Sin embargo, la expresión de las diferentes isoformas de ID y su función potencial en esta enfermedad aún se desconoce. En líneas de PCa las cuatro isoformas de ID se expresan diferencialmente. Se reportó que un complejo equilibrio entre estas isoformas determina el destino celular. Mientras que ID1 e ID3 están involucradas en proliferación celular e ID2 en apoptosis, ID4 parecería actuar como un supresor tumoral en el epitelio prostático (Asirvatham et al., 2006). En resumen, el probable efecto anti-

inflamatorio y anti-angiogénico de HO-1 podría estar dado por la modulación mayoritariamente negativa de la expresión de estos genes.

Es claro que la proliferación de las células tumorales solamente, no es suficiente para causar cáncer; la proliferación celular sostenida en un ambiente rico en células inflamatorias, factores de crecimiento, estroma activado, y agentes que promueven el daño en el DNA, ciertamente potencia y/o promueve el riesgo neoplásico. Durante la injuria tisular asociada con heridas la proliferación celular está aumentada durante la regeneración del tejido. La proliferación y la inflamación disminuyen después que el agente agresor desaparece o que la reparación se completó. En contraste las células proliferantes que presentan daño en el DNA o un insulto mutagénico (las células iniciadas) continúan proliferando en microambientes ricos en células inflamatorias y en factores de crecimiento/sobrevida que sustentan su crecimiento. En este sentido los tumores actúan como heridas que no pueden cicatrizar. En la actualidad la relación causal entre inflamación, inmunidad innata y cáncer es ampliamente aceptada.

Por otra parte, se sabe que las deficiencias en las células T<sub>reg</sub> están asociadas con la autoinmunidad. Por el contrario, las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se acumulan en el microambiente tumoral y se relacionan con la prevención de la inmunidad antitumoral y la inmunoterapia anti-cáncer. Si bien los linfocitos CD4<sup>+</sup> se han estudiado en profundidad, poco se sabe sobre las células CD8<sup>+</sup> y los antígenos que ellos reconocen. Recientemente Andersen y colaboradores, identificaron el primer blanco natural de estas células. Estos autores detectaron células T<sub>reg</sub> CD8<sup>+</sup> (CDHLA-A2- restricted CD8<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>) específicas para HO-1, tanto *ex vivo* como *in situ* entre las células T de pacientes con cáncer, capaces de suprimir la respuesta inmune con alta eficiencia y esta actividad supresora parecía estar mediada por factores solubles. Estas células inhibían la liberación de citoquinas, la proliferación y la citotoxicidad de otras células inmunes. Así estos resultados ligan la respuesta celular al estrés y a la regulación de la inmunidad adaptativa y expanden las funciones de HO-1 mediando la inmuno-regulación (Andersen et al., 2009).

Existen muchas evidencias que indican que las células prostáticas pueden sobrevivir a la

deprivación hormonal aumentando la síntesis de andrógenos dentro de la glándula. Los andrógenos intracrininos pueden sintetizarse *de novo* a partir de colesterol o a partir de precursores ubicuos que son convertidos a testosterona en la próstata. Todavía no se han identificado todos los factores que regulan la síntesis *de novo* de estas hormonas. Uno de ellos, la IL-6 se ha implicado en la modulación de la activación del AR y en el crecimiento y diferenciación del PCa. Recientemente se comprobó que IL-6 aumenta la expresión de genes que codifican para enzimas esteroideogénicas, involucradas en la síntesis de andrógenos. Incluso se comprobó que los niveles séricos de testosterona se incrementaban significativamente cuando se inoculaban células LNCaP que sobre-expresan IL-6 en ratones *nude* castrados. Estos resultados muestran que esta citoquina interviene en la regulación de la expresión de genes que median el metabolismo de andrógenos en las células tumorales (Chun et al., 2009). Esto brindaría apoyo adicional al rol anti-proliferativo de HO-1 mediado por la represión de IL-6 y otras citoquinas como se observó en el array.

Teniendo en cuenta que la expresión de HO-1 es regulada principalmente a nivel transcripcional (Jozkowicz et al., 2007) y que hasta la fecha hay solo dos reportes que claramente documentan su translocalización nuclear (Lin et al., 2007b; Sacca et al., 2007), HO-1 emerge como un potencial factor de transcripción. Considerando que HO-1 no tiene en su secuencia, motivos de unión al DNA podría estar actuando como un co-regulador de la transcripción. Por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) actualmente estamos tratando de identificar genes que interactúan con HO-1.

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se comprobó que la marcación citoplasmática de HO-1 parece correlacionarse con niveles moderados de expresión de la proteína mientras que niveles altos de la misma tienden a asociarse con el desplazamiento hacia el núcleo en PCa (Sacca et al., 2007). Cabe resaltar que en el presente trabajo también comprobamos que al sobre-expresar HO-1 por transfección estable o inducción farmacológica pudimos detectar su translocación nuclear (Fig. 52 y 54).

Se propuso que la diferente localización intracelular de las isoformas de HO puede estar relacionada con funciones selectivas en distintos tipos celulares (Parfenova et al., 2001). En particular, la localización nuclear de HO-1 en células astrogiales se asoció con el desarrollo

cerebral y con enfermedades neurodegenerativas (Li Volti et al., 2004), en células de pulmón de rata fetal expuestas a hiperoxia como una chaperona o mensajero nuclear (Suttner et al., 1999) y en adipocitos como un factor de transcripción en la adipogénesis (Giordano et al., 2000). También se detectó señal inmuno-reactiva de HO-1 en el núcleo de células en cultivo después de la exposición a hipoxia y hemo y se sugirió que esta localización podría estimular genes que promueven la citoprotección contra el estrés oxidativo (Lin et al., 2007b). Aunque varios estudios han implicado a HO-1 con cáncer (Prawan et al., 2005), ningún reporte ha asociado esta proteína con su translocación nuclear en esta enfermedad. Como ocurre con otras proteínas heat-shock (Segui-Simarro et al., 2003), el transporte de HO-1 podría involucrar interacciones de esta proteína con el complejo del poro nuclear o con otros componentes citoplasmáticos involucrados en el transporte de la misma (Li Volti et al., 2004).

La regulación redox es uno de los mecanismos claves de adaptación a una variedad de estímulos de estrés incluyendo el estrés oxidativo (Goodman et al., 1997). El exceso de la generación de ROS puede causar daño en el DNA (Ohshima et al., 2003; Toyokuni, 2006), conduciendo a alteraciones en la información genómica a pesar de la fuerte acción ejercida por las enzimas de reparación y los caminos apoptóticos, a fin de contrarrestar dicho daño. La localización del daño oxidativo en los ácidos nucleicos en ciertas secuencias específicas, las cuales son especialmente vulnerables al estrés oxidativo, puede diferir según el tipo y el entorno celular (Toyokuni, 2006). HO-1 puede entonces surgir como un probable guardián del genoma limitando las mutaciones del DNA y promoviendo la delección de las células aberrantes (Oates y West, 2006). Un balance alterado pro-oxidante/anti-oxidante en pacientes con PCa, reflejado por una elevada peroxidación lipídica y la concomitante depleción anti-oxidante, se sugirió que lleva a un aumento en el daño oxidativo el cual juega un importante rol en la carcinogénesis prostática (Aydin et al., 2006; Yilmaz et al., 2004). De esta forma, si en las células de PCa HO-1 está primariamente funcionando como un sistema de defensa adaptativo, su movimiento hacia el núcleo desde el citoplasma tendría un impacto sobre la capacidad de esta proteína para llevar a cabo otras funciones probablemente relacionadas a la regulación de las actividades de reparación del DNA, lo cual resultaría en un fenotipo oncogénico diferente. En este trabajo además comprobamos la localización nuclear de HO-1 en los tumores derivados de PC3HO-1 (Fig. 52).

La formación de metástasis involucra muchos pasos limitantes incluyendo la sobrevida en un órgano distante, la extravasación y el establecimiento de un crecimiento persistente. La expresión de genes iniciadores de metástasis en los tumores primarios es desencadenada por la necesidad de la movilidad celular, de la invasividad, de la angiogénesis y de la evasión del sistema inmune durante el crecimiento fuera del sitio primario, así como para el subsiguiente crecimiento en el sitio distante. Sin embargo, la expresión prominente de genes de progresión de la metástasis en los tumores primarios presenta una base más compleja. Estos genes están expresados principalmente en los tumores primarios porque ellos sustentan el crecimiento tumoral a través de un efecto particular, mientras ellos aumentan las metástasis distantes a través de otros efectos, los límites entre los genes iniciadores de las metástasis y los que intervienen en la progresión de la misma no son rígidos. Los mediadores de la metástasis, que previamente se pensó que regulaban una de dichas actividades, podrían también conferir habilidades que participan en los otros procesos. La tumorigénesis en la próstata está altamente asociada con la inflamación y los mediadores inflamatorios claves pueden jugar roles diferentes o múltiples en la etiología tanto de las enfermedades benignas como malignas de este órgano. Por ende, es razonable pensar que los mecanismos de señalización molecular involucrados en la invasión, migración y proliferación no son necesariamente los mismos. Más aún, el ensayo de migración documentado por fotografía time-lapse (VIDEOS 1 y 2) claramente demuestra que las células expuestas al tratamiento con hemina eran aún capaces de proliferar aunque su movilidad se encontraba severamente reducida. Aunque no podemos descartar efectos de solapamiento, el array de genes realizado bajo sobre-expresión de HO-1 reveló la inhibición de genes muy relacionados con los efectos tanto proliferativos como invasivos, tales como IL-6, IL-8, FIGF y un grupo de quimioquinas (CXCL1,10,3,5) mediadores inflamatorios primariamente asociados a la invasividad y a la migración.

Las MMP regulan el crecimiento y la migración celular y el remodelado de la matriz extracelular (Ortega et al., 2004). En células tumorales de próstata se ha comprobado que estas proteínas se requieren para los procesos de invasión y angiogénesis (Dong et al., 2005). Estudios previos han relacionado a las MMP con el potencial metastásico de líneas celulares y establecieron la importancia de hallar los genes blanco específicos involucrados

en el control de la actividad de las MMP (Aalinkeel et al., 2004). Miembros de esta familia, en particular MMP2 y MMP9, se han asociado con el desarrollo de metástasis óseas en PCa (Corey et al., 2003; Festuccia et al., 1999; Kanoh et al., 2002; Nemeth et al., 2002). Las MMP constituyen un blanco atractivo para la intervención en la progresión del PCa. Un número limitado de estudios pre-clínicos reportaron la capacidad de los inhibidores sintéticos de estas proteínas de disminuir el crecimiento de tumores de PCa primarios y metastásicos en modelos animales. Previamente se comprobó que la administración de un inhibidor de amplio espectro de MMP (*Batimastat*) reduce la carga tumoral y la degradación del hueso en células de PC3 creciendo en asociación con hueso humano inoculados en ratones SCID (Nemeth et al., 2002). A pesar del éxito del uso de estos inhibidores en estudios pre-clínicos, estos compuestos fallaron en demostrar su eficacia en ensayos clínicos en pacientes con PCa avanzado y además produjeron efectos colaterales indeseables (Coussens et al., 2002; Pavlaki y Zucker, 2003; Rammath y Creaven, 2004). La falta de selectividad es una de las razones que justifican el escaso resultado obtenido por el uso de los inhibidores de MMP en ensayos clínicos (Coussens et al., 2002; Pavlaki y Zucker, 2003; Rammath y Creaven, 2004).

En este trabajo de tesis, identificamos a MMP9 a como un blanco nuevo río abajo de HO-1 y demostramos que la sobre-expresión de HO-1 en las células PC3 y LNCaP inhibía significativamente la expresión y actividad de MMP9 (Fig. 43 y 45). Más aún, el silenciamiento de HO-1 en MDA PCa 2b resultó en la inducción de la expresión de MMP9 (Fig. 43). Estos resultados confirman que MMP9 es modulado por HO-1.

Si bien trabajos previos mostraron que las MMP son blancos potenciales del CO o de las CORMs (Desmard et al., 2005; Lin et al., 2008a), nosotros analizamos la expresión de MMP9 por RT-qPCR en células MDA PCa 2b (con altos niveles endógenos de HO-1) tratadas con SnPP y obtuvimos nuevamente una marcada reducción de la expresión de esta metaloproteasa (Fig. 44). Estos hallazgos brindan un soporte adicional a nuestra propuesta sobre la relevancia de la expresión de HO-1 más que de su actividad, en la modulación de MMP9 y en la regulación de los procesos celulares evaluados.



Un hallazgo muy interesante de este trabajo de investigación surgió de los experimentos *in vivo*. Encontramos que el crecimiento tumoral se redujo en los animales con tumores derivados de la línea PC3HO-1 en comparación con los tumores inducidos por inoculación de las células PC3pcDNA3 (Fig. 46-48). También comprobamos que el índice mitótico estaba claramente reducido en los tumores derivados de la línea PC3HO-1 respecto a los obtenidos cuando se inyectaron las células PC3pcDNA3 (Fig. 49). Todos estos hallazgos están en perfecta concordancia con la tasa de proliferación disminuida observada en los estudios *in vitro* (Fig. 39). En los tumores creciendo como xenógrafos comprobamos que los niveles endógenos de MMP9 eran significativamente menores en aquellos derivados de PC3HO-1 comparados con los tumores derivados de PC3pcDNA3, tanto medidos por técnicas de RT-qPCR como de inmunohistoquímica (Fig. 51 y 53). Así podemos corroborar mediante los estudios *in vivo* que la disminución de la expresión de MMP9 se correlaciona con un crecimiento reducido de los tumores de próstata que sobre-expresan HO-1.

Muy recientemente en simultáneo con el desarrollo de la última parte de estos experimentos, Lin y colaboradores reportaron que HO-1 inhibía la invasión inducida por TPA a través de la supresión de la actividad de MMP9 en células de cáncer de mama (Lin et al., 2008a). Nuestros resultados son consistentes con las observaciones de estos autores y extienden aún más el alcance de la propuesta de los mismos, ya que se basan en la identificación de la expresión endógena de HO-1 en células de PCa. Nuestros hallazgos documentan que la represión de MMP9 mediada por HO-1 en las células de PCa *in vitro* e *in vivo* son de particular interés y sugieren, por primera vez, que la expresión aumentada de HO-1 en las células de PCa puede definir un fenotipo menos invasivo y por lo tanto menos agresivo. En este contexto, HO-1 podría emerger como un blanco pronóstico con implicancias terapéuticas.

La gran mayoría de las muertes por PCa ocurren en pacientes con metástasis (Dong et al., 2005). La terapia de dichas metástasis debería focalizarse no solamente en las propiedades de crecimiento y supervivencia intrínsecas de las células tumorales, sino también en factores homeostáticos que controlan la migración, la invasividad y la angiogénesis. En este escenario, HO-1 emerge como un blanco nuevo para la prevención de la progresión del PCa. Nosotros argumentamos que la restauración del estado homeostático resultante será

dictaminado diferencialmente, dependiendo del estado metabólico y funcional de las células y tejidos involucrados. Surge entonces la pregunta porqué ocurren los estados patológicos?. El polimorfismo en el promotor de HO-1 es indudablemente un factor tan importante como la potencia del estímulo. Sin embargo, si las células se encuentran saturadas por la magnitud de los estímulos estresores continuos, sería difícil para HO-1 poder disparar las medidas correctivas necesarias. Claramente, HO-1 no es un gen maestro para controlar la respuesta al estrés como sí lo son los productos de otros genes, tales como otras proteínas heat shock y antioxidantes. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos provistos por los ratones *hmox* *-/-* y el caso de deficiencia humana *hmox* surge un argumento fuerte que apoya el rol de HO-1 como un regulador central de la sobrevivencia celular.

El aumento de la expectativa de vida en las células de PCa es el producto del aumento de la proliferación celular y la disminución de la apoptosis, por lo tanto es importante analizar la expresión de los genes anti y pro-apoptóticos y los reguladores del ciclo celular. En la actualidad, el concepto de PCa que tiende a centralizarse en el rol del receptor de andrógeno debería reemplazarse por un concepto más molecular que involucre los eventos que regulan el ciclo celular, la apoptosis, la invasión local, las células metastásicas y los tejidos hospedadores. Teniendo en cuenta el potencial anti-inflamatorio de HO-1, es vital estudiar el mecanismo de acción de esta proteína en PCa y su asociación con los procesos proliferativos y apoptóticos.

A pesar de los continuos avances en las técnicas quirúrgicas y del desarrollo de terapias adyuvantes, la gran mayoría de las muertes por cáncer se relaciona con la diseminación metastásica. En el proceso de invasión tumoral y metástasis participan distintos factores derivados del tumor y del propio organismo huésped, como factores angiogénicos, proteolíticos y proliferativos, entre otros. Para alcanzar un órgano distante y desarrollar un nuevo foco tumoral, las células neoplásicas deben escapar del tumor primario, intravasarse, diseminarse a través del sistema arterial o linfático, adherirse al endotelio del órgano blanco y extravasarse, para finalmente organizarse y crecer como un nuevo foco metastásico (Fidler, 1991). Este proceso secuencial de invasión y metástasis se ve favorecido por la neovascularización o angiogénesis, la que permite la nutrición y crecimiento de la masa tumoral.

Hasta el momento, la medicina ha tratado el cáncer de forma agresiva, con tratamientos cortos e intensivos, que tienen como resultado un rotundo éxito o fracaso. Sin embargo, paulatinamente el cáncer comienza a ser enfocado como una enfermedad crónica, con características biológicas particulares, que requiere el uso prolongado de terapias específicas para cada tipo tumoral. Este parece ser el camino que se seguirá en el futuro, incorporándose nuevas estrategias surgidas de avances logrados en el conocimiento de la biología celular y molecular del cáncer. Existe una tendencia creciente hacia el diseño de nuevos esquemas de tratamiento con blancos moleculares específicos. Estos tratamientos buscan una menor toxicidad y una mayor respuesta a menor dosis, que la quimioterapia tradicional.

Debido a las propiedades moduladoras del comportamiento de las células tumorales, la acción sobre factores de la hemostasia y sobre ciertas proteasas relacionadas con la diseminación tumoral, HO-1 se erige como un blanco de interés para su aplicación en el manejo del cáncer.

# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- Aalinkeel, R., Nair, M.P., Sufrin, G., Mahajan, S.D., Chadha, K.C., Chawda, R.P., and Schwartz, S.A. (2004). Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 5311-5321.
- Abate, A., Zhao, H., Wong, R.J., and Stevenson, D.K. (2007). The role of Bach1 in the induction of heme oxygenase by tin mesoporphyrin. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 757-763.
- Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14, 2410-2434.
- Abraham, N.G., Jiang, S., Yang, L., Zand, B.A., Laniado-Schwartzman, M., Marji, J., Drummond, G.S., and Kappas, A. (2000). Adenoviral vector-mediated transfer of human heme oxygenase in rats decreases renal heme-dependent arachidonic acid epoxygenase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 494-500.
- Abraham, N.G., Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., Stoltz, R.A., Levere, R.D., Gerritsen, M.E., Shibahara, S., and Kappas, A. (1995). Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6798-6802.
- Abraham, N.G., Scapagnini, G., and Kappas, A. (2003). Human heme oxygenase: cell cycle-dependent expression and DNA microarray identification of multiple gene responses after transduction of endothelial cells. *J Cell Biochem* 90, 1098-1111.
- Abrahamsson, P.A., Cockett, A.T., and di Sant'Agnes, P.A. (1998). Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma. *Prostate Suppl* 8, 37-42.
- Acker, T., Fandrey, J., and Acker, H. (2006). The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. *Cardiovasc Res* 71, 195-207.
- Acquaviva, R., Campisi, A., Raciti, G., Avola, R., Barcellona, M.L., Vanella, L., and Li Volti, G. (2005). Propofol inhibits caspase-3 in astroglial cells: role of heme oxygenase-1. *Curr Neurovasc Res* 2, 141-148.
- Acuff, H.B., Carter, K.J., Fingleton, B., Gorden, D.L., and Matrisian, L.M. (2006a). Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res* 66, 259-266.
- Acuff, H.B., Sinnamon, M., Fingleton, B., Boone, B., Levy, S.E., Chen, X., Pozzi, A., Carbone, D.P., Schwartz, D.R., Moin, K., et al. (2006b). Analysis of host- and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66, 7968-7975.
- Adley, B.P., and Yang, X.J. (2006). Application of alpha-methylacyl coenzyme A racemase immunohistochemistry in the diagnosis of prostate cancer: a review. *Anal Quant Cytol Histol* 28, 1-13.
- Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Alam, J. (1994). Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals. *J Biol Chem* 269, 25049-25056.
- Alam, J., Camhi, S., and Choi, A.M. (1995). Identification of a second region upstream of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. *J Biol Chem* 270, 11977-11984.
- Alam, J., and Cook, J.L. (2003). Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr Pharm Des* 9, 2499-2511.
- Alam, J., and Cook, J.L. (2007). How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 166-174.
- Alam, J., Igarashi, K., Immenschuh, S., Shibahara, S., and Tyrrell, R.M. (2004). Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase. *Antioxid Redox Signal* 6, 924-933.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A.M., and Cook, J.L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem* 274, 26071-26078.
- Alam, J., Wicks, C., Stewart, D., Gong, P., Touchard, C., Otterbein, S., Choi, A.M., Burrow, M.E., and Tou, J. (2000). Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J Biol Chem* 275, 27694-27702.
- Alaoui-Jamali, M.A., Bismar, T.A., Gupta, A., Szarek, W.A., Su, J., Song, W., Xu, Y., Xu, B., Liu, G., Vlahakis, J.Z., et al. (2009). A novel experimental heme oxygenase-1-targeted therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 69, 8017-8024.
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222, 155-161.
- Ames, B.N., Gold, L.S., and Willett, W.C. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5258-5265.
- Ananthanarayanan, V., Deaton, R.J., Yang, X.J., Pins, M.R., and Gann, P.H. (2006). Alteration of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. *BMC Cancer* 6, 73.
- Andersen, M.H., Sorensen, R.B., Brimnes, M.K., Svane, I.M., Becker, J.C., and thor Straten, P. (2009). Identification of heme oxygenase-1-specific regulatory CD8+ T cells in cancer patients. *J Clin Invest* 119, 2245-2256.

- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., *et al.* (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* *13*, 1050-1059.
- Araki, Y., Okamura, S., Hussain, S.P., Nagashima, M., He, P., Shiseki, M., Miura, K., and Harris, C.C. (2003). Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. *Cancer Res* *63*, 728-734.
- Araujo, J.A., Meng, L., Tward, A.D., Hancock, W.W., Zhai, Y., Lee, A., Ishikawa, K., Iyer, S., Buelow, R., Busuttill, R.W., *et al.* (2003). Systemic rather than local heme oxygenase-1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse. *J Immunol* *171*, 1572-1580.
- Arigami, T., Natsugoe, S., Uenosono, Y., Yanagita, S., Ehi, K., Arima, H., Mataka, Y., Nakajo, A., Ishigami, S., and Aikou, T. (2009). Vascular endothelial growth factor-C and -D expression correlates with lymph node micrometastasis in pN0 early gastric cancer. *J Surg Oncol* *99*, 148-153.
- Armstrong, A.J., and Carducci, M.A. (2006). New drugs in prostate cancer. *Curr Opin Urol* *16*, 138-145.
- Asatiani, E., Huang, W.X., Wang, A., Rodriguez Ortner, E., Cavalli, L.R., Haddad, B.R., and Gelmann, E.P. (2005). Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res* *65*, 1164-1173.
- Asirvatham, A.J., Schmidt, M.A., and Chaudhary, J. (2006). Non-redundant inhibitor of differentiation (Id) gene expression and function in human prostate epithelial cells. *Prostate* *66*, 921-935.
- Aydin, A., Arsova-Sarafinovska, Z., Sayal, A., Eken, A., Erdem, O., Erten, K., Ozgok, Y., and Dimovski, A. (2006). Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Biochem* *39*, 176-179.
- Bacherikov, V.A., Chang, J.Y., Lin, Y.W., Chen, C.H., Pan, W.Y., Dong, H., Lee, R.Z., Chou, T.C., and Su, T.L. (2005a). Synthesis and antitumor activity of 5-(9-acridinylamino)anisidine derivatives. *Bioorg Med Chem* *13*, 6513-6520.
- Bacherikov, V.A., Chou, T.C., Dong, H.J., Zhang, X., Chen, C.H., Lin, Y.W., Tsai, T.J., Lee, R.Z., Liu, L.F., and Su, T.L. (2005b). Potent antitumor 9-anilinoacridines bearing an alkylating N-mustard residue on the anilino ring: synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem* *13*, 3993-4006.
- Bae, S.H., Kim, D.W., Kim, J., Kim, J.H., Kim, D.H., Kim, H.D., Kang, H.Y., and Seo, Y.S. (2002). Coupling of DNA helicase and endonuclease activities of yeast Dna2 facilitates Okazaki fragment processing. *J Biol Chem* *277*, 26632-26641.
- Bailar, J.C., 3rd, Mellinger, G.T., and Gleason, D.F. (1966a). Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage, and differentiation--preliminary report. *Cancer Chemother Rep* *50*, 129-136.
- Bailar, J.C., 3rd, Thomas, L.B., Thomson, A.D., Eisenberg, H., and Vick, R.M. (1966b). Morphology and survival rates of cervical cancer in Connecticut and southwest England. *Natl Cancer Inst Monogr* *19*, 385-403.
- Bailar, J.C., 3rd, and Young, J.L., Jr. (1966). Oregon malignancy pattern and radioisotope storage. *Public Health Rep* *81*, 311-317.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* *357*, 539-545.
- Banday, A.A., Asghar, M., Hussain, T., and Lokhandwala, M.F. (2003). Dopamine-mediated inhibition of renal Na,K-ATPase is reduced by insulin. *Hypertension* *41*, 1353-1358.
- Banerjee, A.K., Mandal, A., Chanda, D., and Chakraborti, S. (2003). Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem* *253*, 307-312.
- Bastian, P.J., Ellinger, J., Wellmann, A., Wernert, N., Heukamp, L.C., Muller, S.C., and von Ruecker, A. (2005a). Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin Cancer Res* *11*, 4097-4106.
- Bastian, P.J., Palapattu, G.S., Lin, X., Yegnasubramanian, S., Mangold, L.A., Trock, B., Eisenberger, M.A., Partin, A.W., and Nelson, W.G. (2005b). Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* *11*, 4037-4043.
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J.P., Knudsen, B., Plymate, S., and Nelson, P.S. (2006). The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res* *66*, 794-802.
- Baylin, S.B., and Ohm, J.E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* *6*, 107-116.
- Becker, J.C., Fukui, H., Imai, Y., Sekikawa, A., Kimura, T., Yamagishi, H., Yoshitake, N., Pohle, T., Domschke, W., and Fujimori, T. (2007). Colonic expression of heme oxygenase-1 is associated with a better long-term survival in patients with colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* *42*, 852-858.
- Bennett, B.D., and Gardner, W.A., Jr. (1986). Teaching laboratory medicine. The clinical laboratory experience. *Arch Pathol Lab Med* *110*, 978-979.
- Berberat, P.O., Dambrauskas, Z., Gulbinas, A., Giese, T., Giese, N., Kunzli, B., Autschbach, F., Meuer, S., Buchler, M.W., and Friess, H. (2005). Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin Cancer Res* *11*, 3790-3798.
- Berger, P., Gruschwitz, M., Spoettl, G., Dirnhofner, S., Madersbacher, S., Gerth, R., Merz, W.E., Plas, E., and Sampson, N. (2007). Human chorionic gonadotropin (hCG) in the male reproductive tract. *Mol Cell Endocrinol* *260-262*, 190-196.
- Bethel, C.R., Faith, D., Li, X., Guan, B., Hicks, J.L., Lan, F., Jenkins, R.B., Bieberich, C.J., and De Marzo, A.M. (2006). Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res* *66*, 10683-10690.

- Bielas, J.H., Loeb, K.R., Rubin, B.P., True, L.D., and Loeb, L.A. (2006). Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 18238-18242.
- Bilban, M., Bach, F.H., Otterbein, S.L., Ifedigbo, E., d'Avila, J.C., Esterbauer, H., Chin, B.Y., Usheva, A., Robson, S.C., Wagner, O., *et al.* (2006). Carbon monoxide orchestrates a protective response through PPARgamma. *Immunity* *24*, 601-610.
- Bilban, M., Haschemi, A., Wegiel, B., Chin, B.Y., Wagner, O., and Otterbein, L.E. (2008). Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. *J Mol Med* *86*, 267-279.
- Bin Hafeez, B., Adhami, V.M., Asim, M., Siddiqui, I.A., Bhat, K.M., Zhong, W., Saleem, M., Din, M., Setaluri, V., and Mukhtar, H. (2009). Targeted knockdown of Notch1 inhibits invasion of human prostate cancer cells concomitant with inhibition of matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator. *Clin Cancer Res* *15*, 452-459.
- Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., *et al.* (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* *107*, 2112-2122.
- Boczkowski, J., Poderoso, J.J., and Motterlini, R. (2006). CO-metal interaction: Vital signaling from a lethal gas. *Trends Biochem Sci* *31*, 614-621.
- Bonkhoff, H., and Remberger, K. (1998). Morphogenetic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Virchows Arch* *433*, 195-202.
- Bonnet, P., Reiter, E., Bruyninx, M., Sente, B., Dombrowicz, D., de Leval, J., Closset, J., and Hennen, G. (1993). Benign prostatic hyperplasia and normal prostate aging: differences in types I and II 5 alpha-reductase and steroid hormone receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) levels, but not in insulin-like growth factor mRNA levels. *J Clin Endocrinol Metab* *77*, 1203-1208.
- Borowsky, A.D., Dingley, K.H., Ubick, E., Turteltaub, K.W., Cardiff, R.D., and Devere-White, R. (2006). Inflammation and atrophy precede prostatic neoplasia in a PhIP-induced rat model. *Neoplasia* *8*, 708-715.
- Borrello, M.G., Alberti, L., Fischer, A., Degl'innocenti, D., Ferrario, C., Gariboldi, M., Marchesi, F., Allavena, P., Greco, A., Collini, P., *et al.* (2005). Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 14825-14830.
- Bostwick, D.G. (1996). Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. *Cancer* *78*, 330-336.
- Bostwick, D.G. (1997). *Urological surgical pathology* (Mosby, St. Louis).
- Bostwick, D.G., de la Roza, G., Dundore, P., Corica, F.A., and Iczkowski, K.A. (2003). Intraepithelial and stromal lymphocytes in the normal human prostate. *Prostate* *55*, 187-193.
- Bostwick, D.G., and Qian, J. (2004). High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* *17*, 360-379.
- Bradford, T.J., Tomlins, S.A., Wang, X., and Chinnaiyan, A.M. (2006a). Molecular markers of prostate cancer. *Urol Oncol* *24*, 538-551.
- Bradford, T.J., Wang, X., and Chinnaiyan, A.M. (2006b). Cancer immunomics: using autoantibody signatures in the early detection of prostate cancer. *Urol Oncol* *24*, 237-242.
- Brand, S., Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Diebold, J., Otte, J.M., Goke, B., and Eichhorst, S.T. (2005). CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* *310*, 117-130.
- Brinkman, B.M. (2004). Splice variants as cancer biomarkers. *Clin Biochem* *37*, 584-594.
- Brodin, G., ten Dijke, P., Funari, K., Heldin, C.H., and Landstrom, M. (1999). Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res* *59*, 2731-2738.
- Brooks, C., Ketsawatsomkron, P., Sui, Y., Wang, J., Wang, C.Y., Yu, F.S., and Dong, Z. (2005). Acidic pH inhibits ATP depletion-induced tubular cell apoptosis by blocking caspase-9 activation in apoptosome. *Am J Physiol Renal Physiol* *289*, F410-419.
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., and Chersesh, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* *85*, 683-693.
- Brouard, S., Berberat, P.O., Tobiasch, E., Seldon, M.P., Bach, F.H., and Soares, M.P. (2002). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis. *J Biol Chem* *277*, 17950-17961.
- Brouard, S., Otterbein, L.E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F.H., Choi, A.M., and Soares, M.P. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* *192*, 1015-1026.
- Brown, J.E., Cook, R.J., Major, P., Lipton, A., Saad, F., Smith, M., Lee, K.A., Zheng, M., Hei, Y.J., and Coleman, R.E. (2005). Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors. *J Natl Cancer Inst* *97*, 59-69.
- Bruckheimer, E.M., and Kyprianou, N. (2002). Bcl-2 antagonizes the combined apoptotic effect of transforming growth factor-beta and dihydrotestosterone in prostate cancer cells. *Prostate* *53*, 133-142.
- Bubendorf, L., Kolmer, M., Kononen, J., Koivisto, P., Mousses, S., Chen, Y., Mahlamaki, E., Schraml, P., Moch, H., Willi, N., *et al.* (1999). Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst* *91*, 1758-1764.
- Bui, M., and Reiter, R.E. (1998). Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* *17*, 391-399.

- Bullock, T.L., and Andriole, G.L., Jr. (2006). Emerging drug therapies for benign prostatic hyperplasia. *Expert Opin Emerg Drugs* 11, 111-123.
- Buratti, E., Baralle, M., and Baralle, F.E. (2006). Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. *Nucleic Acids Res* 34, 3494-3510.
- Bushman, W. (2000). Prostatic Diseases. In *Prostatic Diseases*, H. Lepor, ed. (Philadelphia, W. B. Saunders Company).
- Bussemakers, M.J., van Bokhoven, A., Verhaegh, G.W., Smit, F.P., Karthaus, H.F., Schalken, J.A., Debruyne, F.M., Ru, N., and Isaacs, W.B. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 59, 5975-5979.
- Busserolles, J., Megias, J., Terencio, M.C., and Alcaraz, M.J. (2006). Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1510-1517.
- Bussolati, B., Ahmed, A., Pemberton, H., Landis, R.C., Di Carlo, F., Haskard, D.O., and Mason, J.C. (2004). Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood* 103, 761-766.
- Caballero, F., Meiss, R., Gimenez, A., Batlle, A., and Vazquez, E. (2004). Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in preneoplastic and neoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis. *Int J Exp Pathol* 85, 213-222.
- Caccamo, D., Campisi, A., Curro, M., Aguenouz, M., Li Volti, G., Avola, R., and Ientile, R. (2005a). Nuclear factor-kappaB activation is associated with glutamate-evoked tissue transglutaminase up-regulation in primary astrocyte cultures. *J Neurosci Res* 82, 858-865.
- Caccamo, D., Campisi, A., Curro, M., Bramanti, V., Tringali, M., Li Volti, G., Vanella, A., and Ientile, R. (2005b). Antioxidant treatment inhibited glutamate-evoked NF-kappaB activation in primary astroglial cell cultures. *Neurotoxicology* 26, 915-921.
- Caccamo, D., Campisi, A., Marini, H., Adamo, E.B., Li Volti, G., Squadrito, F., and Ientile, R. (2005c). Glutamate promotes NF-kappaB pathway in primary astrocytes: protective effects of IRFI 016, a synthetic vitamin E analogue. *Exp Neurol* 193, 377-383.
- Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006a). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6, 857-866.
- Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006b). MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 66, 7390-7394.
- Cao, E., Zang, X., Ramagopal, U.A., Mukhopadhyaya, A., Fedorov, A., Fedorov, E., Zencheck, W.D., Lary, J.W., Cole, J.L., Deng, H., *et al.* (2007). T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity* 26, 311-321.
- Carey, J.L., Sasur, L.M., Kawakubo, H., Gupta, V., Christian, B., Bailey, P.M., and Maheswaran, S. (2004). Mutually antagonistic effects of androgen and activin in the regulation of prostate cancer cell growth. *Mol Endocrinol* 18, 696-707.
- Carlquist, J.F., McKinney, J.T., Nicholas, Z.P., Clark, J.L., Kahn, S.F., Horne, B.D., Muhlestein, J.B., May, H.T., and Anderson, J.L. (2008). Rapid melting curve analysis for genetic variants that underlie inter-individual variability in stable warfarin dosing. *J Thromb Thrombolysis* 26, 1-7.
- Carroll, P.R., Chan, J.M., D'Amico, A.V., Gelmann, E.P., Iversen, P., Klotz, L., Nelson, J.B., Nelson, P.S., Nelson, W.G., Oh, W.K., *et al.* (2004). Fourth International Conference on Innovations and Challenges in Prostate Cancer: Prevention, Detection and Treatment. *J Urol* 172, S3-5.
- Carstens, R.P., Eaton, J.V., Krigman, H.R., Walther, P.J., and Garcia-Blanco, M.A. (1997). Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 2 (FGF-R2) in human prostate cancer. *Oncogene* 15, 3059-3065.
- Carthew, R.W. (2006). Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* 16, 203-208.
- Castro, P., Giri, D., Lamb, D., and Ittmann, M. (2003). Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 55, 30-38.
- Cerutti, J.M., Oler, G., Michaluart, P., Jr., Delcelo, R., Beaty, R.M., Shoemaker, J., and Riggins, G.J. (2007). Molecular profiling of matched samples identifies biomarkers of papillary thyroid carcinoma lymph node metastasis. *Cancer Res* 67, 7885-7892.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253, 269-285.
- Chan, J.M., Feraco, A., Shuman, M., and Hernandez-Diaz, S. (2006). The epidemiology of prostate cancer--with a focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Hematol Oncol Clin North Am* 20, 797-809.
- Chang, Y.C., Chen, T.C., Lee, C.T., Yang, C.Y., Wang, H.W., Wang, C.C., and Hsieh, S.L. (2008). Epigenetic control of MHC class II expression in tumor-associated macrophages by decoy receptor 3. *Blood* 111, 5054-5063.
- Chauveau, C., Remy, S., Royer, P.J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F.X., Tesson, L., Brion, R., Berioux, G., Gregoire, M., *et al.* (2005). Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106, 1694-1702.
- Chen, C.D., Welsbie, D.S., Tran, C., Baek, S.H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M.G., and Sawyers, C.L. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 10, 33-39.
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., and Ames, B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4337-4341.
- Chen, X., Zhao, J., Salim, S., and Garcia, F.U. (2006a). Intraprostatic spermatozoa: zonal distribution and association with atrophy. *Hum Pathol* 37, 345-351.



- Chen, X.L., and Kunsch, C. (2004). Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 10, 879-891.
- Chen, Y.C., Chow, J.M., Lin, C.W., Wu, C.Y., and Shen, S.C. (2006b). Baicalein inhibition of oxidative-stress-induced apoptosis via modulation of ERKs activation and induction of HO-1 gene expression in rat glioma cells C6. *Toxicol Appl Pharmacol* 216, 263-273.
- Cheng, Y., Dong, Q., Sun, L.R., Yang, C.M., and Jiang, B.X. (2005). [Correlation between expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1 and metastasis of neuroblastoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 27, 164-166.
- Chin, B.Y., Jiang, G., Wegiel, B., Wang, H.J., Macdonald, T., Zhang, X.C., Gallo, D., Cszimadia, E., Bach, F.H., Lee, P.J., *et al.* (2007). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5109-5114.
- Chinni, S.R., Sivalogan, S., Dong, Z., Filho, J.C., Deng, X., Bonfil, R.D., and Cher, M.L. (2006). CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. *Prostate* 66, 32-48.
- Cho, Y.M., Takahashi, S., Asamoto, M., Suzuki, S., Inaguma, S., Hokaiwado, N., and Shirai, T. (2003). Age-dependent histopathological findings in the prostate of probasin/SV40 T antigen transgenic rats: lack of influence of carcinogen or testosterone treatment. *Cancer Sci* 94, 153-157.
- Choo-Kang, B.S., Hutchison, S., Nickdel, M.B., Bundick, R.V., Leishman, A.J., Brewer, J.M., McInnes, I.B., and Garside, P. (2005). TNF-blocking therapies: an alternative mode of action? *Trends Immunol* 26, 518-522.
- Chu, K., Kim, M., Chae, S.H., Jeong, S.W., Kang, K.S., Jung, K.H., Kim, J., Kim, Y.J., Kang, L., Kim, S.U., *et al.* (2004). Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 50, 459-465.
- Chun, J.Y., Nadiminty, N., Dutt, S., Lou, W., Yang, J.C., Kung, H.J., Evans, C.P., and Gao, A.C. (2009). Interleukin-6 regulates androgen synthesis in prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 15, 4815-4822.
- Cinar, B., Koeman, K.S., Edlund, M., Prins, G.S., Zhou, H.E., and Chung, L.W. (2001). Androgen receptor mediates the reduced tumor growth, enhanced androgen responsiveness, and selected target gene transactivation in a human prostate cancer cell line. *Cancer Res* 61, 7310-7317.
- Clark, J., Merson, S., Jhavar, S., Flohr, P., Edwards, S., Foster, C.S., Eeles, R., Martin, F.L., Phillips, D.H., Crundwell, M., *et al.* (2007a). Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26, 2667-2673.
- Clark, J.C., Thomas, D.M., Choong, P.F., and Dass, C.R. (2007b). RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26, 675-683.
- Clark, J.E., Foresti, R., Green, C.J., and Motterlini, R. (2000). Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. *Biochem J* 348 Pt 3, 615-619.
- Cockett, A.T., di Sant'Agnes, P.A., Gopinath, P., Schoen, S.R., and Abrahamsson, P.A. (1993). Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. *Urology* 42, 512-519.
- Coffey, D.S. (2001). Similarities of prostate and breast cancer: Evolution, diet, and estrogens. *Urology* 57, 31-38.
- Cohen, R.J., Shannon, B.A., McNeal, J.E., Shannon, T., and Garrett, K.L. (2005). Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution? *J Urol* 173, 1969-1974.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65, 10946-10951.
- Colombrita, C., Lombardo, G., Scapagnini, G., and Abraham, N.G. (2003). Heme oxygenase-1 expression levels are cell cycle dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 1001-1008.
- Contag, C.H., Spilman, S.D., Contag, P.R., Oshiro, M., Eames, B., Dennery, P., Stevenson, D.K., and Benaron, D.A. (1997). Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol* 66, 523-531.
- Converso, D.P., Taille, C., Carreras, M.C., Jaitovich, A., Poderoso, J.J., and Boczkowski, J. (2006). HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J* 20, 1236-1238.
- Cooper, C.S., Campbell, C., and Jhavar, S. (2007). Mechanisms of Disease: biomarkers and molecular targets from microarray gene expression studies in prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 4, 677-687.
- Cordon-Cardo, C., Koff, A., Drobnjak, M., Capodiceci, P., Osman, I., Millard, S.S., Gaudin, P.B., Fazzari, M., Zhang, Z.F., Massague, J., *et al.* (1998). Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 90, 1284-1291.
- Corey, E., Brown, L.G., Quinn, J.E., Poot, M., Roudier, M.P., Higano, C.S., and Vessella, R.L. (2003). Zoledronic acid exhibits inhibitory effects on osteoblastic and osteolytic metastases of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 9, 295-306.
- Cornblatt, B.S., Ye, L., Dinkova-Kostova, A.T., Erb, M., Fahey, J.W., Singh, N.K., Chen, M.S., Stierer, T., Garrett-Mayer, E., Argani, P., *et al.* (2007). Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis* 28, 1485-1490.
- Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C.M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7024-7029.

- Cote, R.J., Shi, Y., Groshen, S., Feng, A.C., Cordon-Cardo, C., Skinner, D., and Lieskovosky, G. (1998). Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 90, 916-920.
- Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387-2392.
- Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Couzin, J. (2004a). Clinical trials. Nail-biting time for trials of COX-2 drugs. *Science* 306, 1673-1675.
- Couzin, J. (2004b). Drug safety. Withdrawal of Vioxx casts a shadow over COX-2 inhibitors. *Science* 306, 384-385.
- Couzin, J. (2004c). Medicine. Estrogen's ties to COX-2 may explain heart disease gender gap. *Science* 306, 1277.
- Craft, N., Chhor, C., Tran, C., Belldegrun, A., DeKernion, J., Witte, O.N., Said, J., Reiter, R.E., and Sawyers, C.L. (1999). Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process. *Cancer Res* 59, 5030-5036.
- Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R., and Ward, R.J. (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* 91, 9-18.
- Croci, D.O., Zacarias Fluck, M.F., Rico, M.J., Matar, P., Rabinovich, G.A., and Scharovsky, O.G. (2007). Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 56, 1687-1700.
- Crowder, D.W., Horowitz, A.R., Tabashnik, B.E., Dennehy, T.J., Denholm, I., Gorman, K., and Carriere, Y. (2009). Analyzing haplodiploid inheritance of insecticide resistance in whitefly biotypes. *Bull Entomol Res* 99, 307-315.
- Culig, Z., Comuzzi, B., Steiner, H., Bartsch, G., and Hobisch, A. (2004). Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 265-271.
- Culig, Z., Steiner, H., Bartsch, G., and Hobisch, A. (2005). Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem* 95, 497-505.
- Dai, K.J., Hou, L.B., and Luo, Q.Z. (2009). [Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves by high-performance liquid chromatographic-tandem mass/mass spectrometry]. *Zhong Yao Cai* 32, 375-377.
- Dang, Y.M., Huang, Y.S., Yang, Z.C., Zhang, D.X., Li, X.D., and Chen, L.F. (2004). [Inhibition of the expression of cardiomyocytic hypoxic induction factor-1alpha during hypoxic state by double chain siRNA]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 20, 278-280.
- Darash-Yahana, M., Pikarsky, E., Abramovitch, R., Zeira, E., Pal, B., Karplus, R., Beider, K., Avniel, S., Kasem, S., Galun, E., *et al.* (2004). Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J* 18, 1240-1242.
- Das, S., Mandal, M., Chakraborti, T., Mandal, A., and Chakraborti, S. (2003). Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. *Mol Cell Biochem* 253, 31-40.
- Datta, P.K., Koukouritaki, S.B., Hopp, K.A., and Lianos, E.A. (1999). Heme oxygenase-1 induction attenuates inducible nitric oxide synthase expression and proteinuria in glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 10, 2540-2550.
- David, A., Mabeesh, N., Azar, I., Biton, S., Engel, S., Bernstein, J., Romano, J., Avidor, Y., Waks, T., Eshhar, Z., *et al.* (2002). Unusual alternative splicing within the human kallikrein genes KLK2 and KLK3 gives rise to novel prostate-specific proteins. *J Biol Chem* 277, 18084-18090.
- De Marzo, A.M., Coffey, D.S., and Nelson, W.G. (1999a). New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 53, 29-39; discussion 39-42.
- De Marzo, A.M., DeWeese, T.L., Platz, E.A., Meeker, A.K., Nakayama, M., Epstein, J.I., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2004). Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J Cell Biochem* 91, 459-477.
- De Marzo, A.M., Knudsen, B., Chan-Tack, K., and Epstein, J.I. (1999b). E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. *Urology* 53, 707-713.
- De Marzo, A.M., Marchi, V.L., Epstein, J.I., and Nelson, W.G. (1999c). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 155, 1985-1992.
- De Marzo, A.M., Nakai, Y., and Nelson, W.G. (2007a). Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol* 25, 398-400.
- De Marzo, A.M., Nelson, W.G., Meeker, A.K., and Coffey, D.S. (1998). Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol* 160, 2381-2392.
- De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2007b). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 256-269.
- De Siervi, A., De Luca, P., Moiola, C., Gueron, G., Tongbai, R., Chandramouli, G.V., Haggerty, C., Dzekunova, I., Petersen, D., Kawasaki, E., *et al.* (2009). Identification of new Rel/NFkappaB regulatory networks by focused genome location analysis. *Cell Cycle* 8, 2093-2100.
- Deng, C., Wu, B., Yang, H., Hussain, R.Z., Lovett-Racke, A.E., Christadoss, P., and Racke, M.K. (2003). Decreased expression of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 reduces T cell activation threshold but not the severity of experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 138, 76-82.

- Dennery, P.A., and Rodgers, P.A. (1996). Ontogeny and developmental regulation of heme oxygenase. *J Perinatol* 16, S79-83.
- Dennery, P.A., Rodgers, P.A., Lum, M.A., Jennings, B.C., and Shokoohi, V. (1996a). Hyperoxic regulation of lung heme oxygenase in neonatal rats. *Pediatr Res* 40, 815-821.
- Dennery, P.A., Sridhar, K.J., Lee, C.S., Wong, H.E., Shokoohi, V., Rodgers, P.A., and Spitz, D.R. (1997). Heme oxygenase-mediated resistance to oxygen toxicity in hamster fibroblasts. *J Biol Chem* 272, 14937-14942.
- Dennery, P.A., Wong, H.E., Sridhar, K.J., Rodgers, P.A., Sim, J.E., and Spitz, D.R. (1996b). Differences in basal and hyperoxia-associated HO expression in oxidant-resistant hamster fibroblasts. *Am J Physiol* 271, L672-679.
- Dennis, L.K., Lynch, C.F., and Torner, J.C. (2002). Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 60, 78-83.
- Deramandt, B.M., Braunstein, S., Remy, P., and Abraham, N.G. (1998). Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 68, 121-127.
- Deshane, J., Chen, S., Caballero, S., Grochot-Przeczek, A., Was, H., Li Calzi, S., Lach, R., Hock, T.D., Chen, B., Hill-Kapturczak, N., *et al.* (2007). Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 605-618.
- Desmard, M., Amara, N., Lanone, S., Motterlini, R., and Boczkowski, J. (2005). Carbon monoxide reduces the expression and activity of matrix metalloproteinases 1 and 2 in alveolar epithelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51, 403-408.
- Dhanasekaran, S.M., Barrette, T.R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K.J., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-826.
- Diep, C.B., Kleivi, K., Ribeiro, F.R., Teixeira, M.R., Lindgjaerde, O.C., and Lothe, R.A. (2006). The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 31-41.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- Dobosy, J.R., Roberts, J.L., Fu, V.X., and Jarrard, D.F. (2007). The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 177, 822-831.
- Dong, J.T. (2001). Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 20, 173-193.
- Dong, J.T., Isaacs, W.B., and Isaacs, J.T. (1997). Molecular advances in prostate cancer. *Curr Opin Oncol* 9, 101-107.
- Dong, Z., Bonfil, R.D., Chinni, S., Deng, X., Trindade Filho, J.C., Bernardo, M., Vaishampayan, U., Che, M., Sloane, B.F., Sheng, S., *et al.* (2005). Matrix metalloproteinase activity and osteoclasts in experimental prostate cancer bone metastasis tissue. *Am J Pathol* 166, 1173-1186.
- Douglas, D.A., Zhong, H., Ro, J.Y., Oddoux, C., Berger, A.D., Pincus, M.R., Satagopan, J.M., Gerald, W.L., Scher, H.I., Lee, P., *et al.* (2006). Novel mutations of epidermal growth factor receptor in localized prostate cancer. *Front Biosci* 11, 2518-2525.
- Du, Q., Thonberg, H., Zhang, H.Y., Wahlestedt, C., and Liang, Z. (2004). Validating siRNA using a reporter made from synthetic DNA oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 243-249.
- Dubois, D.Y., Blaise, M., Becker, H.D., Campanacci, V., Keith, G., Giege, R., Cambillau, C., Lapointe, J., and Kern, D. (2004). An aminoacyl-tRNA synthetase-like protein encoded by the *Escherichia coli* yadB gene glutamylates specifically tRNA<sup>Asp</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7530-7535.
- Duckers, H.J., Boehm, M., True, A.L., Yet, S.F., San, H., Park, J.L., Clinton Webb, R., Lee, M.E., Nabel, G.J., and Nabel, E.G. (2001). Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med* 7, 693-698.
- Dulak, J., and Jozkowicz, A. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. *Antioxid Redox Signal* 5, 123-132.
- Durante, W., Kroll, M.H., Christodoulides, N., Peyton, K.J., and Schafer, A.I. (1997). Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 80, 557-564.
- Egan, K.M., Lawson, J.A., Fries, S., Koller, B., Rader, D.J., Smyth, E.M., and Fitzgerald, G.A. (2004). COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 306, 1954-1957.
- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Ellem, S.J., Schmitt, J.F., Pedersen, J.S., Frydenberg, M., and Risbridger, G.P. (2004). Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2434-2441.
- Elo, J.P., and Visakorpi, T. (2001). Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med* 33, 130-141.
- Elster, L., Kristiansen, U., Pickering, D.S., Olsen, R.W., and Schousboe, A. (2001). Molecular determinants of desensitization and assembly of the chimeric GABA(A) receptor subunits (alpha1/gamma2) and (gamma2/alpha1) in combinations with beta2 and gamma2. *Neurochem Int* 38, 581-592.

- Engl, T., Relja, B., Blumenberg, C., Muller, I., Ringel, E.M., Beecken, W.D., Jonas, D., and Blaheta, R.A. (2006). Prostate tumor CXC-chemokine profile correlates with cell adhesion to endothelium and extracellular matrix. *Life Sci* 78, 1784-1793.
- Epstein, J.I., Allsbrook, W.C., Jr., Amin, M.B., and Egevad, L.L. (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29, 1228-1242.
- Ewing, J.F., and Maines, M.D. (2006). Regulation and expression of heme oxygenase enzymes in aged-rat brain: age related depression in HO-1 and HO-2 expression and altered stress-response. *J Neural Transm* 113, 439-454.
- Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Akuta, T., Sahoo, S.K., Khaled, G., Hamada, A., and Maeda, H. (2003). In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res* 63, 3567-3574.
- Feldman, B.J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 34-45.
- Feneley, M.R., Young, M.P., Chinyama, C., Kirby, R.S., and Parkinson, M.C. (1996). Ki-67 expression in early prostate cancer and associated pathological lesions. *J Clin Pathol* 49, 741-748.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.
- Festuccia, C., Giunciuglio, D., Guerra, F., Villanova, I., Angelucci, A., Manduca, P., Teti, A., Albini, A., and Bologna, M. (1999). Osteoblasts modulate secretion of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human prostate cancer cells promoting migration and matrigel invasion. *Oncol Res* 11, 17-31.
- Fidaner, C., Eser, S.Y., and Parkin, D.M. (2001). Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. *Eur J Cancer* 37, 83-92.
- Fidler, I.J. (1991). Cancer metastasis. *Br Med Bull* 47, 157-177.
- Franks, L.M. (1954a). Atrophy and hyperplasia in the prostate proper. *J Pathol Bacteriol* 68, 617-621.
- Franks, L.M. (1954b). Latent carcinoma of the prostate. *J Pathol Bacteriol* 68, 603-616.
- Frasca, G.M., Onetti-Muda, A., Mari, F., Longo, I., Scala, E., Pescucci, C., Roccatello, D., Alpa, M., Coppo, R., Li Volti, G., *et al.* (2005). Thin glomerular basement membrane disease: clinical significance of a morphological diagnosis--a collaborative study of the Italian Renal Immunopathology Group. *Nephrol Dial Transplant* 20, 545-551.
- Freeman, M.R., Cinar, B., and Lu, M.L. (2005). Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* 16, 273-279.
- Fung, K.M., Samara, E.N., Wong, C., Metwalli, A., Krlin, R., Bane, B., Liu, C.Z., Yang, J.T., Pitha, J.V., Culkin, D.J., *et al.* (2006). Increased expression of type 2 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) and its relationship with androgen receptor in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 13, 169-180.
- Gardner, W.A., Jr., Culberson, D.E., and Bennett, B.D. (1986). *Trichomonas vaginalis* in the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med* 110, 430-432.
- Garlanda, C., Riva, F., Veliz, T., Polentarutti, N., Pasqualini, F., Radaelli, E., Sironi, M., Nebuloni, M., Zorini, E.O., Scanziani, E., *et al.* (2007). Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. *Cancer Res* 67, 6017-6021.
- Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006a). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 12, 580-587.
- Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Iuliano, R., Cimmino, A., Aqeilan, R., Volinia, S., Bhatt, D., Alder, H., Marcucci, G., *et al.* (2006b). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5078-5083.
- Geddes, J.W., Pettigrew, L.C., Holtz, M.L., Craddock, S.D., and Maines, M.D. (1996). Permanent focal and transient global cerebral ischemia increase glial and neuronal expression of heme oxygenase-1, but not heme oxygenase-2, protein in rat brain. *Neurosci Lett* 210, 205-208.
- Geiszt, M., Lekstrom, K., and Leto, T.L. (2004). Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant. *J Biol Chem* 279, 51661-51668.
- Geiszt, M., and Leto, T.L. (2004). The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem* 279, 51715-51718.
- Gelmann, E.P., and Semmes, O.J. (2004). Expression of genes and proteins specific for prostate cancer. *J Urol* 172, S23-26; discussion S26-27.
- Gennigens, C., Menetrier-Caux, C., and Droz, J.P. (2006). Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 58, 124-145.
- Ghani, Q.P., Wagner, S., and Hussain, M.Z. (2003). Role of ADP-ribosylation in wound repair. The contributions of Thomas K. Hunt, MD. *Wound Repair Regen* 11, 439-444.
- Ghosh, S., Hirsch, H.A., Sekinger, E.A., Kapranov, P., Struhl, K., and Gingeras, T.R. (2007). Differential analysis for high density tiling microarray data. *BMC Bioinformatics* 8, 359.
- Gillera, J.P., Putz, O., DeJong, M., DeJong, S., Birch, L., Pu, Y., Huang, L., and Prins, G.S. (2003). The role of prolactin in the prostatic inflammatory response to neonatal estrogen. *Endocrinology* 144, 2046-2054.

- Giordano, A., Nisoli, E., Tonello, C., Canello, R., Carruba, M.O., and Cinti, S. (2000). Expression and distribution of heme oxygenase-1 and -2 in rat brown adipose tissue: the modulatory role of the noradrenergic system. *FEBS Lett* 487, 171-175.
- Glazov, E.A., Pheasant, M., Nahkuri, S., and Mattick, J.S. (2006). Evidence for control of splicing by alternative RNA secondary structures in Dipteran homothorax pre-mRNA. *RNA Biol* 3, 36-39.
- Gleason, D.F. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50, 125-128.
- Gonzalez-Michaca, L., Farrugia, G., Croatt, A.J., Alam, J., and Nath, K.A. (2004). Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F370-377.
- Gonzalzo, M.L., Brotzman, M., Trock, B.J., Geringer, A.M., Burnett, A.L., and Jarow, J.P. (2003). Clinical efficacy of sildenafil citrate and predictors of long-term response. *J Urol* 170, 503-506.
- Gonzalzo, M.L., and Isaacs, W.B. (2003). Molecular pathways to prostate cancer. *J Urol* 170, 2444-2452.
- Goodman, A.I., Choudhury, M., da Silva, J.L., Schwartzman, M.L., and Abraham, N.G. (1997). Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 54-61.
- Gordon, D., Reidy, M.A., Benditt, E.P., and Schwartz, S.M. (1990). Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4600-4604.
- Grignon, D.J., Caplan, R., Sarkar, F.H., Lawton, C.A., Hammond, E.H., Pilepich, M.V., Forman, J.D., Mesic, J., Fu, K.K., Abrams, R.A., *et al.* (1997). p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RT0G 8610. *J Natl Cancer Inst* 89, 158-165.
- Guate, J.L., Escaf, S., Menendez, C.L., del Valle, M., and Vega, J.A. (1997). Neuroendocrine cells in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: effect of hormonal treatment. *Urol Int* 59, 149-153.
- Gueron, G., De Siervi, A., Ferrando, M., Salierno, M., De Luca, P., Elguero, B., Meiss, R., Navone, N., and Vazquez, E.S. (2009). Critical Role of Endogenous Heme Oxygenase 1 as a Tuner of the Invasive Potential of Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Res* 7, 1745-1755.
- Gulati, P., Kohn, P.C., Krug, H., Gottlicher, M., Markova, B., Bohmer, F.D., and Herrlich, P. (2001). Redox regulation in mammalian signal transduction. *IUBMB Life* 52, 25-28.
- Guo, J.S., Cho, C.H., Wang, W.P., Shen, X.Z., Cheng, C.L., and Koo, M.W. (2003). Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats. *World J Gastroenterol* 9, 1767-1771.
- Gupta, G.P., Nguyen, D.X., Chiang, A.C., Bos, P.D., Kim, J.Y., Nadal, C., Gomis, R.R., Manova-Todorova, K., and Massague, J. (2007). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 446, 765-770.
- Haggar, A., Hussain, M., Lonnie, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A., and Flock, J.I. (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect Immun* 71, 2310-2317.
- Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H.Y., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59, 177-189.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Handsfield, H.H., Lipman, T.O., Harnisch, J.P., Tronca, E., and Holmes, K.K. (1974). Asymptomatic gonorrhea in men. Diagnosis, natural course, prevalence and significance. *N Engl J Med* 290, 117-123.
- Hanemaaijer, R., Verheijen, J.H., Maguire, T.M., Visser, H., Toet, K., McDermott, E., O'Higgins, N., and Duffy, M.J. (2000). Increased gelatinase-A and gelatinase-B activities in malignant vs. benign breast tumors. *Int J Cancer* 86, 204-207.
- Harkonen, P., Torn, S., Kurkela, R., Porvari, K., Pulkka, A., Lindfors, A., Isomaa, V., and Vihko, P. (2003). Sex hormone metabolism in prostate cancer cells during transition to an androgen-independent state. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 705-712.
- Harkonen, P.L., and Makela, S.I. (2004). Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 297-305.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Harrison, M.L., Obermueller, E., Maisey, N.R., Hoare, S., Edmonds, K., Li, N.F., Chao, D., Hall, K., Lee, C., Timotheadou, E., *et al.* (2007). Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. *J Clin Oncol* 25, 4542-4549.
- Hatzoglou, A., Kampa, M., Kogia, C., Charalampopoulos, I., Theodoropoulos, P.A., Anezinis, P., Dambaki, C., Papakonstanti, E.A., Stathopoulos, E.N., Stournaras, C., *et al.* (2005). Membrane androgen receptor activation induces apoptotic regression of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 893-903.
- He, N.P., Han, X.G., Sun, W., and Pan, Q.M. (2004). Biogenic VOCs emission inventory development of temperate grassland vegetation in Xilin River basin, Inner Mongolia, China. *J Environ Sci (China)* 16, 1024-1032.
- He, X.H., Wu, G.F., Zhang, Y., Chen, X.L., Zhang, Z.S., Zhan, C.Y., Liu, J., He, J.G., Xiong, Y., Fang, D.Q., *et al.* (2008). [Effect of chronic enhanced external counterpulsation on gene expression profiles of arterial endothelial cells of pigs fed with high-cholesterol diet]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 28, 1195-1197.
- He, Y., Liu, X.D., Chen, Z.Y., Zhu, J., Xiong, Y., Li, K., Dong, J.H., and Li, X. (2007). Interaction between cancer cells and stromal fibroblasts is required for activation of the uPAR-uPA-MMP-2 cascade in pancreatic cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 13, 3115-3124.

- Hendriksen, P.J., Dits, N.F., Kokame, K., Veldhoven, A., van Weerden, W.M., Bangma, C.H., Trapman, J., and Jenster, G. (2006). Evolution of the androgen receptor pathway during progression of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 5012-5020.
- Herawi, M., De Marzo, A.M., Kristiansen, G., and Epstein, J.I. (2007). Expression of CDX2 in benign tissue and adenocarcinoma of the prostate. *Hum Pathol* 38, 72-78.
- Hermann, M., Untergasser, G., Rumpold, H., and Berger, P. (2000). Aging of the male reproductive system. *Exp Gerontol* 35, 1267-1279.
- Hertz, R., and Bailer, J.C., 3rd (1966). Estrogen-progestogen combinations for contraception. *JAMA* 198, 1000-1006.
- Hill, M., Pereira, V., Chauveau, C., Zagani, R., Remy, S., Tesson, L., Mazal, D., Ubillos, L., Brion, R., Asghar, K., *et al.* (2005a). Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase. *FASEB J* 19, 1957-1968.
- Hill, R., Song, Y., Cardiff, R.D., and Van Dyke, T. (2005b). Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell* 123, 1001-1011.
- Hill, R.P. (2006). Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 66, 1891-1895; discussion 1890.
- Hill-Kapturczak, N., Jarmi, T., and Agarwal, A. (2007). Growth factors and heme oxygenase-1: perspectives in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 9, 2197-2207.
- Hirai, K., Sasahira, T., Ohmori, H., Fujii, K., and Kuniyasu, H. (2007). Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice. *Int J Cancer* 120, 500-505.
- Hiramatsu, M., Maehara, I., Ozaki, M., Harada, N., Orikasa, S., and Sasano, H. (1997). Aromatase in hyperplasia and carcinoma of the human prostate. *Prostate* 31, 118-124.
- Hjertner, O., Standal, T., Borset, M., Sundan, A., and Waage, A. (2005). Identification of new targets for therapy of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Curr Drug Targets* 6, 701-711.
- Hofseth, L.J., Saito, S., Hussain, S.P., Espey, M.G., Miranda, K.M., Araki, Y., Jhappan, C., Higashimoto, Y., He, P., Linke, S.P., *et al.* (2003). Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 143-148.
- Hong, L., Ning, X., Shi, Y., Shen, H., Zhang, Y., Lan, M., Liang, S., Wang, J., and Fan, D. (2004). Reversal of multidrug resistance of gastric cancer cells by down-regulation of ZNRD1 with ZNRD1 siRNA. *Br J Biomed Sci* 61, 206-210.
- Hong, R.L., Lin, C.H., Chao, T.Y., Kao, W.Y., Wang, C.H., Hsieh, R.K., and Hwang, W.S. (2008). A phase-I study evaluating the combination of pegylated liposomal doxorubicin and paclitaxel as salvage chemotherapy in metastatic breast cancer previously treated with anthracycline. *Cancer Chemother Pharmacol* 61, 847-853.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., and Murphy, G.P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43, 1809-1818.
- Horoszewicz, J.S., and Murphy, G.P. (1990). Prospective new developments in laboratory research and clinical trials in prostatic cancer. *Cancer* 66, 1083-1085.
- Howe, H.L., Wingo, P.A., Thun, M.J., Ries, L.A., Rosenberg, H.M., Feigal, E.G., and Edwards, B.K. (2001). Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 93, 824-842.
- Hu, K., Lin, L., Tan, X., Yang, J., Bu, G., Mars, W.M., and Liu, Y. (2008). tPA protects renal interstitial fibroblasts and myofibroblasts from apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 19, 503-514.
- Hu, P.P., Shen, X., Huang, D., Liu, Y., Counter, C., and Wang, X.F. (1999). The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 274, 35381-35387.
- Huang, L., Pu, Y., Alam, S., Birch, L., and Prins, G.S. (2004). Estrogenic regulation of signaling pathways and homeobox genes during rat prostate development. *J Androl* 25, 330-337.
- Huang, L., Pu, Y., Alam, S., Birch, L., and Prins, G.S. (2005). The role of Fgf10 signaling in branching morphogenesis and gene expression of the rat prostate gland: lobe-specific suppression by neonatal estrogens. *Dev Biol* 278, 396-414.
- Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., Sheils, O., and O'Leary, J. (2005). Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 58, 673-684.
- Humez, S., Monet, M., Legrand, G., Lepage, G., Delcourt, P., and Prevarskaya, N. (2006). Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 13, 181-195.
- Hunter, T. (1994). 1001 protein kinases redux--towards 2000. *Semin Cell Biol* 5, 367-376.
- Hussain, I., Hawkins, J., Shikotra, A., Riddell, D.R., Faller, A., and Dingwall, C. (2003a). Characterization of the ectodomain shedding of the beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1). *J Biol Chem* 278, 36264-36268.
- Hussain, M.M., Kotz, H., Minasian, L., Premkumar, A., Sarosy, G., Reed, E., Zhai, S., Steinberg, S.M., Raggio, M., Oliver, V.K., *et al.* (2003b). Phase II trial of carboxyamidotriazole in patients with relapsed epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21, 4356-4363.
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., and Harris, C.C. (2003c). Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 276-285.
- Hussain, T. (2003). Renal angiotensin II receptors, hyperinsulinemia, and obesity. *Clin Exp Hypertens* 25, 395-403.
- Ianus, A., Holz, G.G., Theise, N.D., and Hussain, M.A. (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111, 843-850.

- Ikeguchi, M., Oka, S., Saito, H., Kondo, A., Tsujitani, S., Maeta, M., and Kaibara, N. (1999). Clinical significance of the detection of thymidine phosphorylase activity in esophageal squamous cell carcinomas. *Eur Surg Res* 31, 357-363.
- Imanishi, Y., Hu, B., Jarzynka, M.J., Guo, P., Elishaev, E., Bar-Joseph, I., and Cheng, S.Y. (2007). Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the alpha(5)beta(1) integrin-mediated pathway. *Cancer Res* 67, 4254-4263.
- Inaguma, S., Takahashi, S., Ohnishi, H., Suzuki, S., Cho, Y.M., and Shirai, T. (2003). High susceptibility of the ACI and spontaneously hypertensive rat (SHR) strains to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) prostate carcinogenesis. *Cancer Sci* 94, 974-979.
- Inguaggiato, P., Gonzalez-Michaca, L., Croatt, A.J., Haggard, J.J., Alam, J., and Nath, K.A. (2001). Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney Int* 60, 2181-2191.
- Intengan, H.D., and Schiffrin, E.L. (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38, 581-587.
- Iqbal, J., Anwar, K., and Hussain, M.M. (2003). Multiple, independently regulated pathways of cholesterol transport across the intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 278, 31610-31620.
- Ireson, C., Orr, S., Jones, D.J., Verschoyle, R., Lim, C.K., Luo, J.L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., *et al.* (2001). Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res* 61, 1058-1064.
- Isaacs, J.T. (1994). Role of androgens in prostatic cancer. *Vitam Horm* 49, 433-502.
- Isaacs, W.B. (1995). Molecular genetics of prostate cancer. *Cancer Surv* 25, 357-379.
- Ishikawa, K., Navab, M., Leitinger, N., Fogelman, A.M., and Lusis, A.J. (1997). Induction of heme oxygenase-1 inhibits the monocyte transmigration induced by mildly oxidized LDL. *J Clin Invest* 100, 1209-1216.
- Jacobs, E.J., Rodriguez, C., Mondul, A.M., Connell, C.J., Henley, S.J., Calle, E.E., and Thun, M.J. (2005). A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 97, 975-980.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J., and Thun, M.J. (2005). Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55, 10-30.
- Jeon, E.M., Choi, H.C., Lee, K.Y., Chang, K.C., and Kang, Y.J. (2009). Hemin inhibits hypertensive rat vascular smooth muscle cell proliferation through regulation of cyclin D and p21. *Arch Pharm Res* 32, 375-382.
- Jiang, Z., Woda, B.A., Wu, C.L., and Yang, X.J. (2004). Discovery and clinical application of a novel prostate cancer marker: alpha-methylacyl CoA racemase (P504S). *Am J Clin Pathol* 122, 275-289.
- Jofre-Monseny, L., Loboda, A., Wagner, A.E., Huebbe, P., Boesch-Saadatmandi, C., Jozkowicz, A., Minihane, A.M., Dulak, J., and Rimbach, G. (2007). Effects of apoE genotype on macrophage inflammation and heme oxygenase-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 319-324.
- Johansen, C.A., van den Hurk, A.F., Pyke, A.T., Zborowski, P., Phillips, D.A., Mackenzie, J.S., and Ritchie, S.A. (2001). Entomological investigations of an outbreak of Japanese encephalitis virus in the Torres Strait, Australia, in 1998. *J Med Entomol* 38, 581-588.
- John, A., and Tuszynski, G. (2001). The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 7, 14-23.
- Jones, J.O., Bolton, E.C., Huang, Y., Feau, C., Guy, R.K., Yamamoto, K.R., Hann, B., and Diamond, M.I. (2009). Non-competitive androgen receptor inhibition in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7233-7238.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.
- Jongsma, J., Oomen, M.H., Noordzij, M.A., Romijn, J.C., van Der Kwast, T.H., Schroder, F.H., and van Steenbrugge, G.J. (2000). Androgen-independent growth is induced by neuropeptides in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 42, 34-44.
- Jorgensen, K., Skrede, M., Cruciani, V., Mikalsen, S.O., Slipicevic, A., and Florenes, V.A. (2005). Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate promotes anchorage-independent growth and survival of melanomas through MEK-independent activation of ERK1/2. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 266-274.
- Jozkowicz, A., Huk, I., Nigisch, A., Weigel, G., Dietrich, W., Motterlini, R., and Dulak, J. (2003). Heme oxygenase and angiogenic activity of endothelial cells: stimulation by carbon monoxide and inhibition by tin protoporphyrin-IX. *Antioxid Redox Signal* 5, 155-162.
- Jozkowicz, A., Was, H., and Dulak, J. (2007). Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal* 9, 2099-2117.
- Juan, S.H., Lee, T.S., Tseng, K.W., Liou, J.Y., Shyue, S.K., Wu, K.K., and Chau, L.Y. (2001). Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 104, 1519-1525.
- Jung, K., Reiche, J., Boehme, A., Stephan, C., Loening, S.A., Schnorr, D., Hoesel, W., and Sinha, P. (2004). Analysis of subforms of free prostate-specific antigen in serum by two-dimensional gel electrophoresis: potential to improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 50, 2292-2301.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., and Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16-23.
- Kanekawa, A., Tsuji, T., Oga, A., Sasaki, K., and Shinozaki, F. (1999). Chromosome 17 abnormalities in squamous cell carcinoma of the oral cavity, and its relationship with p53 and Bcl-2 expression. *Anticancer Res* 19, 81-86.

- Kang, H.Y., Huang, K.E., Chang, S.Y., Ma, W.L., Lin, W.J., and Chang, C. (2002). Differential modulation of androgen receptor-mediated transactivation by Smad3 and tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 277, 43749-43756.
- Kanoh, Y., Akahoshi, T., Ohara, T., Ohtani, N., Mashiko, T., Ohtani, S., Egawa, S., and Baba, S. (2002). Expression of matrix metalloproteinase-2 and prostate-specific antigen in localized and metastatic prostate cancer. *Anticancer Res* 22, 1813-1817.
- Kapranov, P., Willingham, A.T., and Gingeras, T.R. (2007). Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. *Nat Rev Genet* 8, 413-423.
- Kaptureczak, M.H., Wasserfall, C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T.M., Atkinson, M.A., and Agarwal, A. (2004). Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol* 165, 1045-1053.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- Kashkar, H., Haefs, C., Shin, H., Hamilton-Dutoit, S.J., Salvesen, G.S., Kronke, M., and Jurgensmeier, J.M. (2003). XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med* 198, 341-347.
- Kassovska-Bratinova, S., Yang, G., Igarashi, K., and Dennery, P.A. (2009). Bach1 modulates heme oxygenase-1 expression in the neonatal mouse lung. *Pediatr Res* 65, 145-149.
- Kattan, M.W., Shariat, S.F., Andrews, B., Zhu, K., Canto, E., Matsumoto, K., Muramoto, M., Scardino, P.T., Otori, M., Wheeler, T.M., *et al.* (2003). The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor beta1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 21, 3573-3579.
- Kawada, M., Inoue, H., Masuda, T., and Ikeda, D. (2006a). Insulin-like growth factor I secreted from prostate stromal cells mediates tumor-stromal cell interactions of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 4419-4425.
- Kawada, M., Seno, H., Uenoyama, Y., Sawabu, T., Kanda, N., Fukui, H., Shimahara, Y., and Chiba, T. (2006b). Signal transducers and activators of transcription 3 activation is involved in nuclear accumulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Cancer Res* 66, 2913-2917.
- Kawanishi, K., Shiozaki, H., Doki, Y., Sakita, I., Inoue, M., Yano, M., Tsujinaka, T., Shamma, A., and Monden, M. (1999). Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 85, 1649-1657.
- Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S., and Nakanishi, I. (2002). Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* 33, 125-130.
- Ke, B., Buelow, R., Shen, X.D., Melinek, J., Amersi, F., Gao, F., Ritter, T., Volk, H.D., Busuttill, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002a). Heme oxygenase 1 gene transfer prevents CD95/Fas ligand-mediated apoptosis and improves liver allograft survival via carbon monoxide signaling pathway. *Hum Gene Ther* 13, 1189-1199.
- Ke, B., Shen, X.D., Zhai, Y., Gao, F., Busuttill, R.W., Volk, H.D., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002b). Heme oxygenase 1 mediates the immunomodulatory and antiapoptotic effects of interleukin 13 gene therapy in vivo and in vitro. *Hum Gene Ther* 13, 1845-1857.
- Kenzelmann, M., Rippe, K., and Mattick, J.S. (2006). RNA: Networks & Imaging. *Mol Syst Biol* 2, 44.
- Keum, Y.S., Yu, S., Chang, P.P., Yuan, X., Kim, J.H., Xu, C., Han, J., Agarwal, A., and Kong, A.N. (2006). Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells. *Cancer Res* 66, 8804-8813.
- Keyse, S.M., and Tyrrell, R.M. (1989). Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 99-103.
- Kiaris, H., Chatzistamou, I., Trimis, G., Frangou-Plemmenou, M., Pafiti-Kondi, A., and Kalofoutis, A. (2005). Evidence for nonautonomous effect of p53 tumor suppressor in carcinogenesis. *Cancer Res* 65, 1627-1630.
- Kim, A.A., Martinez, A.N., Klausner, J.D., Goldenson, J., Kent, C., Liska, S., and McFarland, W. (2009). Use of sentinel surveillance and geographic information systems to monitor trends in HIV prevalence, incidence, and related risk behavior among women undergoing syphilis screening in a jail setting. *J Urban Health* 86, 79-92.
- Kim, H.P., Wang, X., Galbiati, F., Ryter, S.W., and Choi, A.M. (2004). Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J* 18, 1080-1089.
- Kim, H.R., Kim, S., Kim, E.J., Park, J.H., Yang, S.H., Jeong, E.T., Park, C., Youn, M.J., So, H.S., and Park, R. (2008). Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells toward cisplatin. *Lung Cancer* 60, 47-56.
- Kim, J., Kim, J.H., Lee, S.H., Kim, D.H., Kang, H.Y., Bae, S.H., Pan, Z.Q., and Seo, Y.S. (2002). The novel human DNA helicase hFBH1 is an F-box protein. *J Biol Chem* 277, 24530-24537.
- Kim, K.M., Pae, H.O., Zheng, M., Park, R., Kim, Y.M., and Chung, H.T. (2007). Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circ Res* 101, 919-927.
- Kimura, Y., Kashima, K., Daa, T., Kondo, Y., Yada, K., Sasaki, A., Matsumoto, T., Kitano, S., Kubo, N., and Yokoyama, S. (2005). Biotin-rich intranuclear inclusions in morule-lacking adenocarcinoma of the gallbladder: a new category of "neoplastic/non-morular" lesions. *Virchows Arch* 446, 194-199.
- King, H., and Bailar, J.C., 3rd (1966). Epidemiology of urinary bladder cancer. A review of selected literature. *J Chronic Dis* 19, 735-772.
- King, R.W., Jackson, P.K., and Kirschner, M.W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* 79, 563-571.



- Kinobe, R.T., Dercho, R.A., and Nakatsu, K. (2008). Inhibitors of the heme oxygenase - carbon monoxide system: on the doorstep of the clinic? *Can J Physiol Pharmacol* *86*, 577-599.
- Kirby, R.S., Lowe, D., Bultitude, M.I., and Shuttleworth, K.E. (1982). Intra-prostatic urinary reflux: an aetiological factor in bacterial prostatitis. *Br J Urol* *54*, 729-731.
- Kitamuro, T., Takahashi, K., Ogawa, K., Udono-Fujimori, R., Takeda, K., Furuyama, K., Nakayama, M., Sun, J., Fujita, H., Hida, W., *et al.* (2003). Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J Biol Chem* *278*, 9125-9133.
- Klein, F., Feldhahn, N., Lee, S., Wang, H., Ciuffi, F., von Elstermann, M., Toribio, M.L., Sauer, H., Wartenberg, M., Barath, V.S., *et al.* (2003a). T lymphoid differentiation in human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6747-6752.
- Klein, M., Kotz, A., Bernardo, K., and Kronke, M. (2003b). Detection of Chlamydia pneumoniae-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. *J Clin Microbiol* *41*, 1957-1962.
- Knize, M.G., and Felton, J.S. (2005). Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat. *Nutr Rev* *63*, 158-165.
- Koester, L.S., Ortega, G.G., Mayorga, P., and Bassani, V.L. (2004). Mathematical evaluation of in vitro release profiles of hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets containing carbamazepine associated to beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* *58*, 177-179.
- Koivisto, P.A. (1996). Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Crit Rev Oncog* *7*, 143-150.
- Kokufu, I.I., Yamamoto, M., Fukuda, K., Kitano, H., Horioka, Y., and Tsuji, M. (1999). Squamous Cell Carcinoma of the Breast: Three Case Reports. *Breast Cancer* *6*, 63-68.
- Komuro, A., Yashiro, M., Iwata, C., Morishita, Y., Johansson, E., Matsumoto, Y., Watanabe, A., Aburatani, H., Miyoshi, H., Kiyono, K., *et al.* (2009). Diffuse-type gastric carcinoma: progression, angiogenesis, and transforming growth factor beta signaling. *J Natl Cancer Inst* *101*, 592-604.
- Kondapaka, S.B., Fridman, R., and Reddy, K.B. (1997). Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells. *Int J Cancer* *70*, 722-726.
- Krieg, C., and Boyman, O. (2009). The role of chemokines in cancer immune surveillance by the adaptive immune system. *Semin Cancer Biol* *19*, 76-83.
- Kronke, G., Bochkov, V.N., Huber, J., Gruber, F., Bluml, S., Furnkranz, A., Kadl, A., Binder, B.R., and Leitinger, N. (2003). Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* *278*, 51006-51014.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 12072-12077.
- Krut, O., Utermohlen, O., Schlossherr, X., and Kronke, M. (2003). Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical Staphylococcus aureus isolates. *Infect Immun* *71*, 2716-2723.
- Kulbe, H., Thompson, R., Wilson, J.L., Robinson, S., Hagemann, T., Fatah, R., Gould, D., Ayhan, A., and Balkwill, F. (2007). The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* *67*, 585-592.
- Kushida, T., Quan, S., Yang, L., Ikehara, S., Kappas, A., and Abraham, N.G. (2002). A significant role for the heme oxygenase-1 gene in endothelial cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* *291*, 68-75.
- Kyprianou, N., Tu, H., and Jacobs, S.C. (1996). Apoptotic versus proliferative activities in human benign prostatic hyperplasia. *Hum Pathol* *27*, 668-675.
- La, P., Fernando, A.P., Wang, Z., Salahudeen, A., Yang, G., Lin, Q., Wright, C.J., and Dennery, P.A. (2009). Zinc protoporphyrin regulates cyclin D1 expression independent of heme oxygenase inhibition. *J Biol Chem*.
- Lang, H., Lindner, V., Saussine, C., Havel, D., Faure, F., and Jacqmin, D. (2000). Microscopic venous invasion: a prognostic factor in renal cell carcinoma. *Eur Urol* *38*, 600-605.
- Langowski, J.L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J.D., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Oft, M. (2006). IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* *442*, 461-465.
- Lapointe, J., Li, C., Higgins, J.P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., *et al.* (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 811-816.
- LaTulippe, E., Satagopan, J., Smith, A., Scher, H., Scardino, P., Reuter, V., and Gerald, W.L. (2002). Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res* *62*, 4499-4506.
- Le, H., Arnold, J.T., McFann, K.K., and Blackman, M.R. (2006). DHT and testosterone, but not DHEA or E2, differentially modulate IGF-I, IGFBP-2, and IGFBP-3 in human prostatic stromal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *290*, E952-960.
- Leav, I., Lau, K.M., Adams, J.Y., McNeal, J.E., Taplin, M.E., Wang, J., Singh, H., and Ho, S.M. (2001). Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am J Pathol* *159*, 79-92.
- Lee, J.Y., Bielawska, A.E., and Obeid, L.M. (2000). Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide. *Exp Cell Res* *261*, 303-311.
- Lee, S.O., Chun, J.Y., Nadiminty, N., Lou, W., and Gao, A.C. (2007). Interleukin-6 undergoes transition from growth inhibitor associated with neuroendocrine differentiation to stimulator accompanied by androgen receptor activation during LNCaP prostate cancer cell progression. *Prostate* *67*, 764-773.

- Lee, T.S., and Chau, L.Y. (2002). Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8, 240-246.
- Leitzmann, M.F., Platz, E.A., Stampfer, M.J., Willett, W.C., and Giovannucci, E. (2004). Ejaculation frequency and subsequent risk of prostate cancer. *JAMA* 291, 1578-1586.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Li, D., Yea, S., Dolios, G., Martignetti, J.A., Narla, G., Wang, R., Walsh, M.J., and Friedman, S.L. (2005a). Regulation of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylation. *Cancer Res* 65, 9216-9225.
- Li, F., Harmer, P., Glasgow, R., Mack, K.A., Sleet, D., Fisher, K.J., Kohn, M.A., Millet, L.M., Mead, J., Xu, J., *et al.* (2008). Translation of an effective tai chi intervention into a community-based falls-prevention program. *Am J Public Health* 98, 1195-1198.
- Li, L.C., Carroll, P.R., and Dahiya, R. (2005b). Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst* 97, 103-115.
- Li Volti, G. (2005). Letter regarding article by Hu et al, "heme oxygenase-1 inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro and in vivo". *Circulation* 111, e100; author reply e100.
- Li Volti, G., Ientile, R., Abraham, N.G., Vanella, A., Cannavo, G., Mazza, F., Curro, M., Raciti, G., Avola, R., and Campisi, A. (2004). Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: effect of glutamate. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 517-524.
- Li Volti, G., Sacerdoti, D., Sangras, B., Vanella, A., Mezentsev, A., Scapagnini, G., Falck, J.R., and Abraham, N.G. (2005). Carbon monoxide signaling in promoting angiogenesis in human microvessel endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 7, 704-710.
- Li, W., Cvasotto, C.N., Cardozo, T., Ha, S., Dang, T., Taneja, S.S., Logan, S.K., and Garabedian, M.J. (2005c). Androgen receptor mutations identified in prostate cancer and androgen insensitivity syndrome display aberrant ART-27 coactivator function. *Mol Endocrinol* 19, 2273-2282.
- Li, Y., Dong, X., Yin, Y., Su, Y., Xu, Q., Zhang, Y., Pang, X., and Chen, W. (2005d). BJ-TSA-9, a novel human tumor-specific gene, has potential as a biomarker of lung cancer. *Neoplasia* 7, 1073-1080.
- Lin, C.W., Shen, S.C., Hou, W.C., Yang, L.Y., and Chen, Y.C. (2008a). Heme oxygenase-1 inhibits breast cancer invasion via suppressing the expression of matrix metalloproteinase-9. *Mol Cancer Ther* 7, 1195-1206.
- Lin, C.W., Yang, L.Y., Shen, S.C., and Chen, Y.C. (2007a). IGF-I plus E2 induces proliferation via activation of ROS-dependent ERKs and JNKs in human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol* 212, 666-674.
- Lin, H.Y., Juan, S.H., Shen, S.C., Hsu, F.L., and Chen, Y.C. (2003). Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by flavonoids in RAW264.7 macrophages involves heme oxygenase-1. *Biochem Pharmacol* 66, 1821-1832.
- Lin, H.Y., Shen, S.C., Lin, C.W., Yang, L.Y., and Chen, Y.C. (2007b). Baicalein inhibition of hydrogen peroxide-induced apoptosis via ROS-dependent heme oxygenase 1 gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1073-1086.
- Lin, Q., Weis, S., Yang, G., Weng, Y.H., Helston, R., Rish, K., Smith, A., Bordner, J., Polte, T., Gaunitz, F., *et al.* (2007c). Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem* 282, 20621-20633.
- Lin, Q.S., Weis, S., Yang, G., Zhuang, T., Abate, A., and Dennery, P.A. (2008b). Catalytic inactive heme oxygenase-1 protein regulates its own expression in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 44, 847-855.
- Ling, M.T., Wang, X., Zhang, X., and Wong, Y.C. (2006). The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation* 74, 481-487.
- Liu, A.Y., True, L.D., LaTray, L., Nelson, P.S., Ellis, W.J., Vessella, R.L., Lange, P.H., Hood, L., and van den Engh, G. (1997). Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10705-10710.
- Liu, L.G., Yan, H., Zhang, W., Yao, P., Zhang, X.P., Sun, X.F., and Nussler, A.K. (2004a). Induction of heme oxygenase-1 in human hepatocytes to protect them from ethanol-induced cytotoxicity. *Biomed Environ Sci* 17, 315-326.
- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N.S., Jackson, K.W., Suri, P., and Wicha, M.S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 66, 6063-6071.
- Liu, W.B., Yang, C.Q., Jiang, W., Wang, Y.Q., Guo, J.S., He, B.M., and Wang, J.Y. (2003). Inhibition on the production of collagen type I, III of activated hepatic stellate cells by antisense TIMP-1 recombinant plasmid. *World J Gastroenterol* 9, 316-319.
- Liu, Z.M., Chen, G.G., Ng, E.K., Leung, W.K., Sung, J.J., and Chung, S.C. (2004b). Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* 23, 503-513.
- Loboda, A., Jazwa, A., Grochot-Przeczek, A., Rutkowski, A.J., Cisowski, J., Agarwal, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2008). Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 10, 1767-1812.
- Loboda, A., Jazwa, A., Jozkowicz, A., Dorosz, J., Balla, J., Molema, G., and Dulak, J. (2006). Atorvastatin prevents hypoxia-induced inhibition of endothelial nitric oxide synthase expression but does not affect heme oxygenase-1 in human microvascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 187, 26-30.
- Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Diebold, J., and Hermeking, H. (2005). Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* 65, 4218-4227.

- Long, R.M., Morrissey, C., Fitzpatrick, J.M., and Watson, R.W. (2005). Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci (Lond)* 108, 1-11.
- Louro, R., Nakaya, H.I., Amaral, P.P., Festa, F., Sogayar, M.C., da Silva, A.M., Verjovski-Almeida, S., and Reis, E.M. (2007). Androgen responsive intronic non-coding RNAs. *BMC Biol* 5, 4.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
- Luo, H.M., Deng, H., Xiao, F., Gao, Q., Weng, W., Zhang, P.F., and Li, X.G. (2004). Down-regulation amyloid beta-protein 42 production by interfering with transcript of presenilin 1 gene with siRNA. *Acta Pharmacol Sin* 25, 1613-1618.
- Luo, J., Duggan, D.J., Chen, Y., Sauvageot, J., Ewing, C.M., Bittner, M.L., Trent, J.M., and Isaacs, W.B. (2001a). Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res* 61, 4683-4688.
- Luo, J.L., Tong, W.M., Yoon, J.H., Hergenbahn, M., Koomagi, R., Yang, Q., Galendo, D., Pfeifer, G.P., Wang, Z.Q., and Hollstein, M. (2001b). UV-induced DNA damage and mutations in Hupki (human p53 knock-in) mice recapitulate p53 hotspot alterations in sun-exposed human skin. *Cancer Res* 61, 8158-8163.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9, 935-944.
- Madiai, F., Hussain, S.R., Goettl, V.M., Burry, R.W., Stephens, R.L., Jr., and Hackshaw, K.V. (2003). Upregulation of FGF-2 in reactive spinal cord astrocytes following unilateral lumbar spinal nerve ligation. *Exp Brain Res* 148, 366-376.
- Mahmud, S., Franco, E., and Aprikian, A. (2004). Prostate cancer and use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer* 90, 93-99.
- Maines, M. (1999). Heme Oxygenase: Clinical Applications and Functions. In, M. M., ed. (Boca Raton, Florida, CRC Press), p. 109.
- Maines, M.D. (2005). New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiology (Bethesda)* 20, 382-389.
- Maines, M.D., and Abrahamsson, P.A. (1996). Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* 47, 727-733.
- Maines, M.D., Eke, B.C., and Zhao, X. (1996). Corticosterone promotes increased heme oxygenase-2 protein and transcript expression in the newborn rat brain. *Brain Res* 722, 83-94.
- Maines, M.D., and Ewing, J.F. (1996). Stress response of the rat testis: in situ hybridization and immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 (HSP32) induction by hyperthermia. *Biol Reprod* 54, 1070-1079.
- Mansour, Z., Kochetkova, E.A., Santelmo, N., Ducrocq, X., Quoix, E., Wihlm, J.M., and Massard, G. (2008). Persistent N2 disease after induction therapy does not jeopardize early and medium term outcomes of pneumonectomy. *Ann Thorac Surg* 86, 228-233.
- Mantovani, A. (2009). Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 457, 36-37.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
- Marks, L.S., Fradet, Y., Deras, I.L., Blase, A., Mathis, J., Aubin, S.M., Cancio, A.T., Desaulniers, M., Ellis, W.J., Rittenhouse, H., *et al.* (2007). PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 69, 532-535.
- Marks, L.S., Mostaghel, E.A., and Nelson, P.S. (2008). Prostate tissue androgens: history and current clinical relevance. *Urology* 72, 247-254.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-241.
- Marx, J. (2004). Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* 306, 966-968.
- Masinde, G.L., Li, R., Nguyen, B., Yu, H., Srivastava, A.K., Edderkaoui, B., Wergedal, J.E., Baylink, D.J., and Mohan, S. (2006). New quantitative trait loci that regulate wound healing in an intercross progeny from DBA/1J and 129 x 1/SvJ inbred strains of mice. *Funct Integr Genomics* 6, 157-163.
- Matsuoka, Y., Masuda, H., Yokoyama, M., and Kihara, K. (2007). Protective effects of heme oxygenase-1 against cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in rats. *BJU Int* 100, 1402-1408.
- Mattick, J.S., and Makunin, I.V. (2006). Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 15 *Spec No 1*, R17-29.
- Mattie, M.D., Benz, C.C., Bowers, J., Sensinger, K., Wong, L., Scott, G.K., Fedele, V., Ginzinger, D., Getts, R., and Haqq, C. (2006). Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 5, 24.
- Mayerhofer, M., Florian, S., Krauth, M.T., Aichberger, K.J., Bilban, M., Marculescu, R., Printz, D., Fritsch, G., Wagner, O., Selzer, E., *et al.* (2004). Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* 64, 3148-3154.
- McCord, J.M. (1998). Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin Hematol* 35, 5-12.
- McCoubrey, W.K., Jr., Huang, T.J., and Maines, M.D. (1997). Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247, 725-732.

- McDonnell, T.J., Navone, N.M., Troncoso, P., Pisters, L.L., Conti, C., von Eschenbach, A.C., Brisbay, S., and Logothetis, C.J. (1997). Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *J Urol* 157, 569-574.
- McNeal, J.E. (1988). Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol* 12, 619-633.
- McNeal, J.E., Redwine, E.A., Freiha, F.S., and Stamey, T.A. (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 12, 897-906.
- Meeker, A.K. (2006). Telomeres and telomerase in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer biology. *Urol Oncol* 24, 122-130.
- Melancon, K., Cheng, Q., Kiefer, T.L., Dai, J., Lai, L., Dong, C., Yuan, L., Collins, A., Thiyagarajah, A., Long, S., *et al.* (2005). Regression of NMU-induced mammary tumors with the combination of melatonin and 9-cis-retinoic acid. *Cancer Lett* 227, 39-48.
- Meng, T.C., Hsu, S.F., and Tonks, N.K. (2005). Development of a modified in-gel assay to identify protein tyrosine phosphatases that are oxidized and inactivated in vivo. *Methods* 35, 28-36.
- Meyron-Holtz, E.G., Ghosh, M.C., and Rouault, T.A. (2004). Mammalian tissue oxygen levels modulate iron-regulatory protein activities in vivo. *Science* 306, 2087-2090.
- Michael, I.P., Kurlender, L., Memari, N., Yousef, G.M., Du, D., Grass, L., Stephan, C., Jung, K., and Diamandis, E.P. (2005). Intron retention: a common splicing event within the human kallikrein gene family. *Clin Chem* 51, 506-515.
- Michaud, D.S., Augustsson, K., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willet, W.C., and Giovannucci, E. (2001a). A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* 12, 557-567.
- Michaud, D.S., Clinton, S.K., Rimm, E.B., Willett, W.C., and Giovannucci, E. (2001b). Risk of bladder cancer by geographic region in a U.S. cohort of male health professionals. *Epidemiology* 12, 719-726.
- Miller, A.M., Lundberg, K., Ozenci, V., Banham, A.H., Hellstrom, M., Egevad, L., and Pisa, P. (2006). CD4+CD25<sup>high</sup> T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol* 177, 7398-7405.
- Miragliotta, G., Antonetti, R., Di Taranto, A., Mosca, A., and Del Prete, R. (2005). Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in pulmonary and extrapulmonary samples by BDProbeTec ET system. *New Microbiol* 28, 67-73.
- Miyamoto, H., Rahman, M., Takatera, H., Kang, H.Y., Yeh, S., Chang, H.C., Nishimura, K., Fujimoto, N., and Chang, C. (2002). A dominant-negative mutant of androgen receptor coregulator ARA54 inhibits androgen receptor-mediated prostate cancer growth. *J Biol Chem* 277, 4609-4617.
- Montgomery, R.B., Mostaghel, E.A., Vessella, R., Hess, D.L., Kalhorn, T.F., Higano, C.S., True, L.D., and Nelson, P.S. (2008). Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res* 68, 4447-4454.
- Montironi, R., Bostwick, D.G., Bonkhoff, H., Cockett, A.T., Helpap, B., Troncoso, P., and Waters, D. (1996). Origins of prostate cancer. *Cancer* 78, 362-365.
- Montironi, R., Mazzucchelli, R., and Scarpelli, M. (2002). Precancerous lesions and conditions of the prostate: from morphological and biological characterization to chemoprevention. *Ann NY Acad Sci* 963, 169-184.
- Moon, S.K., Cha, B.Y., and Kim, C.H. (2004a). ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol* 198, 417-427.
- Moon, S.K., Jung, S.Y., Choi, Y.H., Lee, Y.C., Patterson, C., and Kim, C.H. (2004b). PDTC, metal chelating compound, induces G1 phase cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells through inducing p21Cip1 expression: involvement of p38 mitogen activated protein kinase. *J Cell Physiol* 198, 310-323.
- Morita, S., Yano, M., Tsujinaka, T., Akiyama, Y., Taniguchi, M., Kaneko, K., Miki, H., Fujii, T., Yoshino, K., Kusuoka, H., *et al.* (1999). Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 80, 685-688.
- Mosca, A., Berruti, A., Russo, L., Torta, M., and Dogliotti, L. (2005). The neuroendocrine phenotype in prostate cancer: basic and clinical aspects. *J Endocrinol Invest* 28, 141-145.
- Motterlini, R., Green, C.J., and Foresti, R. (2002). Regulation of heme oxygenase-1 by redox signals involving nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 4, 615-624.
- Mulholland, D.J., Cox, M., Read, J., Rennie, P., and Nelson, C. (2004a). Androgen responsiveness of Renilla luciferase reporter vectors is promoter, transgene, and cell line dependent. *Prostate* 59, 115-119.
- Mulholland, P.J., Self, R.L., Harris, B.R., Littleton, J.M., and Prendergast, M.A. (2004b). Choline exposure reduces potentiation of N-methyl-D-aspartate toxicity by corticosterone in the developing hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 153, 203-211.
- Mulholland, P.J., Self, R.L., Harris, B.R., Littleton, J.M., and Prendergast, M.A. (2004c). (-)-nicotine ameliorates corticosterone's potentiation of N-methyl-d-aspartate receptor-mediated cornu ammonis 1 toxicity. *Neuroscience* 125, 671-682.
- Muppala, V., Lin, C.S., and Lee, Y.H. (2000). The role of HNF-1alpha in controlling hepatic catalase activity. *Mol Pharmacol* 57, 93-100.
- Murphy, N., Ring, M., Heffron, C.C., King, B., Killalea, A.G., Hughes, C., Martin, C.M., McGuinness, E., Sheils, O., and O'Leary, J.J. (2005). p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol* 58, 525-534.

- Nabel, G.J., Gordon, D., Bishop, D.K., Nickoloff, B.J., Yang, Z.Y., Aruga, A., Cameron, M.J., Nabel, E.G., and Chang, A.E. (1996). Immune response in human melanoma after transfer of an allogeneic class I major histocompatibility complex gene with DNA-liposome complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 15388-15393.
- Nair, R.R., Avila, H., Ma, X., Wang, Z., Lennartz, M., Darnay, B.G., Boyd, D.D., and Yan, C. (2008). A novel high-throughput screening system identifies a small molecule repressive for matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol Pharmacol* *73*, 919-929.
- Nakai, Y., Nelson, W.G., and De Marzo, A.M. (2007). The dietary charred meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine acts as both a tumor initiator and promoter in the rat ventral prostate. *Cancer Res* *67*, 1378-1384.
- Nakayama, M., Bennett, C.J., Hicks, J.L., Epstein, J.I., Platz, E.A., Nelson, W.G., and De Marzo, A.M. (2003). Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* *163*, 923-933.
- Nanni, S., Priolo, C., Grasselli, A., D'Eletto, M., Merola, R., Moretti, F., Gallucci, M., De Carli, P., Sentinelli, S., Cianciulli, A.M., *et al.* (2006). Epithelial-restricted gene profile of primary cultures from human prostate tumors: a molecular approach to predict clinical behavior of prostate cancer. *Mol Cancer Res* *4*, 79-92.
- Narla, G., Difeo, A., Reeves, H.L., Schaid, D.J., Hirshfeld, J., Hod, E., Katz, A., Isaacs, W.B., Hebbing, S., Komiya, A., *et al.* (2005a). A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* *65*, 1213-1222.
- Narla, G., DiFeo, A., Yao, S., Banno, A., Hod, E., Reeves, H.L., Qiao, R.F., Camacho-Vanegas, O., Levine, A., Kirschenbaum, A., *et al.* (2005b). Targeted inhibition of the KLF6 splice variant, KLF6 SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread. *Cancer Res* *65*, 5761-5768.
- Navone, N.M., Olive, M., Ozen, M., Davis, R., Troncoso, P., Tu, S.M., Johnston, D., Pollack, A., Pathak, S., von Eschenbach, A.C., *et al.* (1997). Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis. *Clin Cancer Res* *3*, 2493-2500.
- Nelson, P.S. (2004). Predicting prostate cancer behavior using transcript profiles. *J Urol* *172*, S28-32; discussion S33.
- Nelson, P.S., Clegg, N., Arnold, H., Ferguson, C., Bonham, M., White, J., Hood, L., and Lin, B. (2002). The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11890-11895.
- Nelson, W.G., De Marzo, A.M., and Isaacs, W.B. (2003). Prostate cancer. *N Engl J Med* *349*, 366-381.
- Nelson, W.G., Yegnasubramanian, S., Agoston, A.T., Bastian, P.J., Lee, B.H., Nakayama, M., and De Marzo, A.M. (2007). Abnormal DNA methylation, epigenetics, and prostate cancer. *Front Biosci* *12*, 4254-4266.
- Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., and Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* *306*, 2090-2093.
- Nemeth, J.A., Yousif, R., Herzog, M., Che, M., Upadhyay, J., Shekarraz, B., Bhagat, S., Mullins, C., Fridman, R., and Cher, M.L. (2002). Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Inst* *94*, 17-25.
- Nishie, A., Ono, M., Shono, T., Fukushi, J., Otsubo, M., Onoue, H., Ito, Y., Inamura, T., Ikezaki, K., Fukui, M., *et al.* (1999). Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* *5*, 1107-1113.
- Nowis, D., Bugajski, M., Winiarska, M., Bil, J., Szokalska, A., Salwa, P., Issat, T., Was, H., Jozkowicz, A., Dulak, J., *et al.* (2008). Zinc protoporphyrin IX, a heme oxygenase-1 inhibitor, demonstrates potent antitumor effects but is unable to potentiate antitumor effects of chemotherapeutics in mice. *BMC Cancer* *8*, 197.
- Nowis, D., Legat, M., Grzela, T., Niderla, J., Wilczek, E., Wilczynski, G.M., Glodkowska, E., Mrowka, P., Issat, T., Dulak, J., *et al.* (2006). Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene* *25*, 3365-3374.
- Nupponen, N.N., and Visakorpi, T. (2000). Molecular cytogenetics of prostate cancer. *Microsc Res Tech* *51*, 456-463.
- Oates, P.S., and West, A.R. (2006). Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol* *12*, 4281-4295.
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* *13*, 54-61.
- Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., Hirao, A., Saya, H., Taketo, M.M., and Oshima, M. (2008). Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *EMBO J* *27*, 1671-1681.
- Oh, W.K., and Small, E.J. (2002a). Complementary and alternative therapies in prostate cancer. *Semin Oncol* *29*, 575-584.
- Oh, W.K., and Small, E.J. (2002b). PC-SPES and prostate cancer. *Urol Clin North Am* *29*, 59-66, viii.
- Ohshima, H., and Bartsch, H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* *305*, 253-264.
- Ohshima, H., Tatemichi, M., and Sawa, T. (2003). Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* *417*, 3-11.

- Okamoto, H., Fujioka, Y., Takahashi, A., Takahashi, T., Taniguchi, T., Ishikawa, Y., and Yokoyama, M. (2006). Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylase, inhibits smooth muscle cell proliferation via induction of p21(WAF1). *J Atheroscler Thromb* 13, 183-191.
- Olson, M.W., Gervasi, D.C., Mobashery, S., and Fridman, R. (1997). Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272, 29975-29983.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.
- Ortega, N., Behonick, D.J., and Werb, Z. (2004). Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14, 86-93.
- Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A., and Choi, A.M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6, 422-428.
- Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K., and Bach, F.H. (2003). Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 24, 449-455.
- Pae, H.O., Oh, G.S., Choi, B.M., Chae, S.C., Kim, Y.M., Chung, K.R., and Chung, H.T. (2004). Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 172, 4744-4751.
- Pajares, M.J., Ezponda, T., Catena, R., Calvo, A., Pio, R., and Montuenga, L.M. (2007). Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 8, 349-357.
- Pan, Q., Shai, O., Misquitta, C., Zhang, W., Saltzman, A.L., Mohammad, N., Babak, T., Siu, H., Hughes, T.R., Morris, Q.D., *et al.* (2004). Revealing global regulatory features of mammalian alternative splicing using a quantitative microarray platform. *Mol Cell* 16, 929-941.
- Pandini, G., Mineo, R., Frasca, F., Roberts, C.T., Jr., Marcelli, M., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2005). Androgens up-regulate the insulin-like growth factor-I receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res* 65, 1849-1857.
- Parfenova, H., Neff, R.A., 3rd, Alonso, J.S., Shlopov, B.V., Jamal, C.N., Sarkisova, S.A., and Leffler, C.W. (2001a). Cerebral vascular endothelial heme oxygenase: expression, localization, and activation by glutamate. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1954-1963.
- Parfenova, H., Parfenov, V.N., Shlopov, B.V., Levine, V., Falkos, S., Pourcyrus, M., and Leffler, C.W. (2001b). Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C166-178.
- Park, H.W., Ahn, Y., Jeong, M.H., Cho, J.G., Park, J.C., Kang, J.C., Shin, M.G., Shin, J.H., Suh, S.P., Ryang, D.W., *et al.* (2007). Chronic atrial fibrillation associated with somatic mitochondrial DNA mutations in human atrial tissue. *J Clin Pathol* 60, 948-950.
- Park, J.H., Cho, Y.H., Kim, J.H., Lee, J.K., and Kim, C.J. (2009). Abducens nerve schwannoma: case report and review of the literature. *Neurosurg Rev* 32, 375-378; discussion 378.
- Parkin, D.M., Bray, F.I., and Devesa, S.S. (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37 Suppl 8, S4-66.
- Parrinello, S., Coppe, J.P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 118, 485-496.
- Partridge, E.A., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., Nabi, I.R., Wrana, J.L., and Dennis, J.W. (2004). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* 306, 120-124.
- Patra, S.K., Patra, A., and Dahiya, R. (2001). Histone deacetylase and DNA methyltransferase in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 705-713.
- Pavlaki, M., and Zucker, S. (2003). Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev* 22, 177-203.
- Pecha, J., Ankrapp, D., Jiang, C., Tang, W., Hoshino, I., Bruck, K., Wagner, K.U., and Xiao, H. (2007). Deletion of Tip30 leads to rapid immortalization of murine mammary epithelial cells and ductal hyperplasia in the mammary gland. *Oncogene* 26, 7423-7431.
- Peehl, D.M. (2005). Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 12, 19-47.
- Pekarsky, Y., Santanam, U., Cimmino, A., Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Volinia, S., Alder, H., Liu, C.G., Rassenti, L., *et al.* (2006). Tc1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 66, 11590-11593.
- Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., *et al.* (2000). The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95, 3289-3296.
- Pellikainen, J.M., Ropponen, K.M., Kataja, V.V., Kellokoski, J.K., Eskelinen, M.J., and Kosma, V.M. (2004). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 10, 7621-7628.
- Pelouze, P.S. (1935). *Gonorrhea in the male and female: a book for practitioners* (Philadelphia, W. B. Saunders Company).

- Perner, S., Demichelis, F., Beroukhi, R., Schmidt, F.H., Mosquera, J.M., Setlur, S., Tchinda, J., Tomlins, S.A., Hofer, M.D., Pienta, K.G., *et al.* (2006). TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 8337-8341.
- Perner, S., Mosquera, J.M., Demichelis, F., Hofer, M.D., Paris, P.L., Simko, J., Collins, C., Bismar, T.A., Chinnaiyan, A.M., De Marzo, A.M., *et al.* (2007). TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol* 31, 882-888.
- Perry, C., Blaine, J., Le, H., and Grichtchenko, II (2006). PMA- and ANG II-induced PKC regulation of the renal Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter (hKNBCe1). *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F417-427.
- Persson, B.E., and Ronquist, G. (1996). Evidence for a mechanistic association between nonbacterial prostatitis and levels of urate and creatinine in expressed prostatic secretion. *J Urol* 155, 958-960.
- Persson, B.E., Ronquist, G., and Ekblom, M. (1996). Ameliorative effect of allopurinol on nonbacterial prostatitis: a parallel double-blind controlled study. *J Urol* 155, 961-964.
- Petit, E., and Mayer, F. (2000). A population genetic analysis of migration: the case of the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Mol Ecol* 9, 683-690.
- Petit, V., Boyer, B., Lentz, D., Turner, C.E., Thiery, J.P., and Valles, A.M. (2000). Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J Cell Biol* 148, 957-970.
- Petit, V., and Thiery, J.P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 92, 477-494.
- Petitclerc, E., Boutaud, A., Prestayko, A., Xu, J., Sado, Y., Ninomiya, Y., Sarras, M.P., Jr., Hudson, B.G., and Brooks, P.C. (2000). New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem* 275, 8051-8061.
- Peto, J. (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411, 390-395.
- Petrocca, F., Iliopoulos, D., Qin, H.R., Nicoloso, M.S., Yendamuri, S., Wojcik, S.E., Shimizu, M., Di Leva, G., Vecchione, A., Trapasso, F., *et al.* (2006). Alterations of the tumor suppressor gene ARLTS1 in ovarian cancer. *Cancer Res* 66, 10287-10291.
- Peyromaure, M., Camparo, P., Badoual, C., Descazeaud, A., and Dinh-Xuan, A.T. (2007). The expression of vascular endothelial growth factor is associated with the risk of cancer progression after radical prostatectomy. *BJU Int* 99, 1150-1153.
- Peyton, K.J., Reyna, S.V., Chapman, G.B., Ensenat, D., Liu, X.M., Wang, H., Schafer, A.I., and Durante, W. (2002). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood* 99, 4443-4448.
- Pihan, G.A., Wallace, J., Zhou, Y., and Doxsey, S.J. (2003). Centrosome abnormalities and chromosome instability occur together in pre-invasive carcinomas. *Cancer Res* 63, 1398-1404.
- Pischke, S.E., Zhou, Z., Song, R., Ning, W., Alam, J., Ryter, S.W., and Choi, A.M. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway mediates heme oxygenase-1 regulation by lipopolysaccharide. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51, 461-470.
- Pishvaian, M.J., Feltes, C.M., Thompson, P., Bussemakers, M.J., Schalken, J.A., and Byers, S.W. (1999). Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res* 59, 947-952.
- Pitcock, S.T., Norby, S.M., Grande, J.P., Croatt, A.J., Bren, G.D., Badley, A.D., Caplice, N.M., Griffin, M.D., and Nath, K.A. (2005). MCP-1 is up-regulated in unstressed and stressed HO-1 knockout mice: Pathophysiologic correlates. *Kidney Int* 68, 611-622.
- Plas, E., Berger, P., Hermann, M., and Pfluger, H. (2000). Effects of aging on male fertility? *Exp Gerontol* 35, 543-551.
- Platz, E.A., Rohrmann, S., Pearson, J.D., Corrada, M.M., Watson, D.J., De Marzo, A.M., Landis, P.K., Metter, E.J., and Carter, H.B. (2005). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of prostate cancer in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 390-396.
- Poletti, F., Medici, M.C., Alinovi, A., Menozzi, M.G., Sacchini, P., Stagni, G., Toni, M., and Benoldi, D. (1985). Isolation of *Chlamydia trachomatis* from the prostatic cells in patients affected by nonacute abacterial prostatitis. *J Urol* 134, 691-693.
- Polo, C.F., Buzaleh, A.M., Vazquez, E.S., Afonso, S.G., Navone, N.M., and Batlle, A.M. (1997). Griseofulvin-induced hepatopathy due to abnormalities in heme pathway. *Gen Pharmacol* 29, 207-210.
- Ponniah, S., Arah, I., and Alexander, R.B. (2000). PSA is a candidate self-antigen in autoimmune chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Prostate* 44, 49-54.
- Popivanova, B.K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., Oshima, M., Fujii, C., and Mukaida, N. (2008). Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 118, 560-570.
- Porkka, K.P., Pfeiffer, M.J., Waltering, K.K., Vessella, R.L., Tammela, T.L., and Visakorpi, T. (2007). MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res* 67, 6130-6135.
- Poss, K.D., and Tonegawa, S. (1997a). Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10919-10924.
- Poss, K.D., and Tonegawa, S. (1997b). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10925-10930.
- Powell, C., Bubb, S., and Clark, J. (2007). Toxic shock syndrome in a neonate. *Pediatr Infect Dis J* 26, 759-760.
- Prakash, K., Pirozzi, G., Elashoff, M., Munger, W., Waga, I., Dhir, R., Kakehi, Y., and Getzenberg, R.H. (2002). Symptomatic and asymptomatic benign prostatic hyperplasia: molecular differentiation by using microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7598-7603.

- Pratap, J., Javed, A., Languino, L.R., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2005). The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Mol Cell Biol* 25, 8581-8591.
- Prawan, A., Kundu, J.K., and Surh, Y.J. (2005). Molecular basis of heme oxygenase-1 induction: implications for chemoprevention and chemoprotection. *Antioxid Redox Signal* 7, 1688-1703.
- Prins, G.S., Birch, L., Couse, J.F., Choi, I., Katzenellenbogen, B., and Korach, K.S. (2001). Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res* 61, 6089-6097.
- Priore Oliva, C., Pisciotto, L., Li Volti, G., Sambataro, M.P., Cantafora, A., Bellocchio, A., Catapano, A., Tarugi, P., Bertolini, S., and Calandra, S. (2005). Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 411-417.
- Pulukuri, S.M., and Rao, J.S. (2007). Small interfering RNA directed reversal of urokinase plasminogen activator demethylation inhibits prostate tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 67, 6637-6646.
- Putzi, M.J., and De Marzo, A.M. (2000). Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 56, 828-832.
- Pylkkanen, L., Santti, R., Salo, L., Maentausta, O., Vihko, R., and Nurmi, M. (1994). Immunohistochemical localization of estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase in the human and mouse prostate. *Prostate* 25, 292-300.
- Quesada, A.R., Barbacid, M.M., Mira, E., Fernandez-Resa, P., Marquez, G., and Aracil, M. (1997). Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. *Clin Exp Metastasis* 15, 26-32.
- Quinn, D.I., Henshall, S.M., Head, D.R., Golovsky, D., Wilson, J.D., Brenner, P.C., Turner, J.J., Delprado, W., Finlayson, J.F., Stricker, P.D., *et al.* (2000). Prognostic significance of p53 nuclear accumulation in localized prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Cancer Res* 60, 1585-1594.
- Racz, G.Z., Szucs, A., Szlavik, V., Vag, J., Burghardt, B., Elliott, A.C., and Varga, G. (2006). Possible role of duration of PKC-induced ERK activation in the effects of agonists and phorbol esters on DNA synthesis in Panc-1 cells. *J Cell Biochem* 98, 1667-1680.
- Raghow, S., Shapiro, E., and Steiner, M.S. (1999). Immunohistochemical localization of transforming growth factor-alpha and transforming growth factor-beta during early human fetal prostate development. *J Urol* 162, 509-513.
- Rajagopal, S., Navone, N.M., Troncoso, P., Fritsche, H.A., and Chakrabarty, S. (1998). Modulation of cellular proliferation and production of prostate-specific antigen and matrix adhesion molecules in human prostate carcinoma cells by polypeptide growth factors: comparative analyses of MDA PCa2a with established cell lines. *Int J Oncol* 12, 589-595.
- Raju, V.S., and Maines, M.D. (1996). Renal ischemia/reperfusion up-regulates heme oxygenase-1 (HSP32) expression and increases cGMP in rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 1814-1822.
- Ramnath, N., and Creaven, P.J. (2004). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Oncol Rep* 6, 96-102.
- Reese, J.H., McNeal, J.E., Redwine, E.A., Stamey, T.A., and Freiha, F.S. (1988). Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones, within the human prostate gland. *Prostate* 12, 47-53.
- Reichard, J.F., Motz, G.T., and Puga, A. (2007). Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Res* 35, 7074-7086.
- Reiter, B., and Mayhew, J.F. (1998). Novel use of the Inter-Link adapter. *J Clin Anesth* 10, 614-615.
- Reiter, B., and Perraudin, J.P. (1998). The antibacterial activity of lactoferrin and neonatal *E. coli* infections. A selective and critical review. *Adv Exp Med Biol* 443, 175-188.
- Reiter, B.P., Marin, M.L., Teodorescu, V.J., and Mitty, H.A. (1998). Endoluminal repair of an internal carotid artery pseudoaneurysm. *J Vasc Interv Radiol* 9, 245-248.
- Revillion, F., Lhotellier, V., Hornez, L., Bonnetterre, J., and Peyrat, J.P. (2008). ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. *Ann Oncol* 19, 73-80.
- Ribeiro, F.R., Diep, C.B., Jeronimo, C., Henrique, R., Lopes, C., Eknaes, M., Lingjaerde, O.C., Lothe, R.A., and Teixeira, M.R. (2006). Statistical dissection of genetic pathways involved in prostate carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 154-163.
- Ricci, R., Sumara, G., Sumara, I., Rozenberg, I., Kurrer, M., Akhmedov, A., Hersberger, M., Eriksson, U., Eberli, F.R., Becher, B., *et al.* (2004). Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherosclerosis. *Science* 306, 1558-1561.
- Rich, A.R. (1934). On the frequency of occurrence of occult carcinoma of the prostate. *J Urol* 33, 215-223.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A.S., Nizet, V., Johnson, R.S., Haddad, G.G., and Karin, M. (2008). NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453, 807-811.
- Rizzo, S., Attard, G., and Hudson, D.L. (2005). Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif* 38, 363-374.
- Rocchi, P., Muracciole, X., Fina, F., Mulholland, D.J., Karsenty, G., Palmari, J., Ouafik, L., Bladou, F., and Martin, P.M. (2004). Molecular analysis integrating different pathways associated with androgen-independent progression in LuCaP 23.1 xenograft. *Oncogene* 23, 9111-9119.
- Rodgers, P.A., Seidman, D.S., Wei, P.L., Dennery, P.A., and Stevenson, D.K. (1996). Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. *Pediatr Res* 39, 1041-1049.



- Roig, J., Krause, J.M., Berger, P., and Merz, W.E. (2007). Time-dependent folding of immunological epitopes of the human chorionic gonadotropin beta-subunit. *Mol Cell Endocrinol* 260-262, 12-22.
- Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., Perou, C.M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S.S., Van de Rijn, M., Waltham, M., *et al.* (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24, 227-235.
- Roy, M., Xu, Q., and Lee, C. (2005). Evidence that public database records for many cancer-associated genes reflect a splice form found in tumors and lack normal splice forms. *Nucleic Acids Res* 33, 5026-5033.
- Royuela, M., Arenas, M.I., Bethencourt, F.R., Sanchez-Chapado, M., Fraile, B., and Paniagua, R. (2002). Regulation of proliferation/apoptosis equilibrium by mitogen-activated protein kinases in normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostate. *Hum Pathol* 33, 299-306.
- Rubin, M.A., Zhou, M., Dhanasekaran, S.M., Varambally, S., Barrette, T.R., Sanda, M.G., Pienta, K.J., Ghosh, D., and Chinnaiyan, A.M. (2002). alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 287, 1662-1670.
- Rudkowski, J.C., Barreiro, E., Harfouche, R., Goldberg, P., Kishta, O., D'Orleans-Juste, P., Labonte, J., Lesur, O., and Hussain, S.N. (2004). Roles of iNOS and nNOS in sepsis-induced pulmonary apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L793-800.
- Rumpold, H., Heinrich, E., Untergasser, G., Hermann, M., Pfister, G., Plas, E., and Berger, P. (2002a). Neuroendocrine differentiation of human prostatic primary epithelial cells in vitro. *Prostate* 53, 101-108.
- Rumpold, H., Untergasser, G., Madersbacher, S., and Berger, P. (2002b). The development of benign prostatic hyperplasia by trans-differentiation of prostatic stromal cells. *Exp Gerontol* 37, 1001-1004.
- Rushworth, S.A., and O'Connell, M.A. (2004). Haem oxygenase-1 in inflammation. *Biochem Soc Trans* 32, 1093-1094.
- Ruska, K.M., Sauvageot, J., and Epstein, J.I. (1998). Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am J Surg Pathol* 22, 1073-1077.
- Russell, J.P., Engiles, J.B., and Rothstein, J.L. (2004). Proinflammatory mediators and genetic background in oncogene mediated tumor progression. *J Immunol* 172, 4059-4067.
- Russell, J.P., Shinohara, S., Melillo, R.M., Castellone, M.D., Santoro, M., and Rothstein, J.L. (2003). Tyrosine kinase oncoprotein, RET/PTC3, induces the secretion of myeloid growth and chemotactic factors. *Oncogene* 22, 4569-4577.
- Ryter, S.W., Otterbein, L.E., Morse, D., and Choi, A.M. (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem* 234-235, 249-263.
- Sacca, P., Meiss, R., Casas, G., Mazza, O., Calvo, J.C., Navone, N., and Vazquez, E. (2007). Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *Br J Cancer* 97, 1683-1689.
- Sacerdoti, D., Colombrita, C., Ghattas, M.H., Ismaeil, E.F., Scapagnini, G., Bolognesi, M., Li Volti, G., and Abraham, N.G. (2005a). Heme oxygenase-1 transduction in endothelial cells causes downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and of genes involved in inflammation and growth. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51, 363-370.
- Sacerdoti, D., Olszanecki, R., Li Volti, G., Colombrita, C., Scapagnini, G., and Abraham, N.G. (2005b). Heme oxygenase overexpression attenuates glucose-mediated oxidative stress in quiescent cell phase: linking heme to hyperglycemia complications. *Curr Neurovasc Res* 2, 103-111.
- Salierno, M., Cabrera, R., Filevich, O., and Etchenique, R. (2007). Encapsulated Petri dish system for single-cell drug delivery and long-term time lapse microscopy. *Anal Biochem* 371, 208-214.
- Salinari, S., Bertuzzi, A., Asnaghi, S., Guidone, C., Manco, M., and Mingrone, G. (2009). First-phase insulin secretion restoration and differential response to glucose load depending on the route of administration in type 2 diabetic subjects after bariatric surgery. *Diabetes Care* 32, 375-380.
- Salm, S.N., Burger, P.E., Coetzee, S., Goto, K., Moscatelli, D., and Wilson, E.L. (2005). TGF- $\beta$  maintains dormancy of prostatic stem cells in the proximal region of ducts. *J Cell Biol* 170, 81-90.
- Samanta, M., Harkins, L., Klemm, K., Britt, W.J., and Cobbs, C.S. (2003). High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 170, 998-1002.
- Sampson, N., Untergasser, G., Plas, E., and Berger, P. (2007). The ageing male reproductive tract. *J Pathol* 211, 206-218.
- Sarady, J.K., Otterbein, S.L., Liu, F., Otterbein, L.E., and Choi, A.M. (2002). Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27, 739-745.
- Sasaki, T., Yoshida, K., Kondo, H., Ohmori, H., and Kuniyasu, H. (2005). Heme oxygenase-1 accelerates protumoral effects of nitric oxide in cancer cells. *Virchows Arch* 446, 525-531.
- Sass, G., Seyfried, S., Parreira Soares, M., Yamashita, K., Kaczmarek, E., Neuhuber, W.L., and Tiegs, G. (2004). Cooperative effect of biliverdin and carbon monoxide on survival of mice in immune-mediated liver injury. *Hepatology* 40, 1128-1135.
- Sawitzki, B., Amersi, F., Ritter, T., Fisser, M., Shen, X.D., Ke, B., Busuttill, R., Volk, H.D., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002). Upregulation of Bag-1 by ex vivo gene transfer protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Hum Gene Ther* 13, 1495-1504.
- Schaaf, G.J., Maas, R.F., de Groene, E.M., and Fink-Gremmels, J. (2002). Management of oxidative stress by heme oxygenase-1 in cisplatin-induced toxicity in renal tubular cells. *Free Radic Res* 36, 835-843.
- Schalken, J.A., Hessels, D., and Verhaegh, G. (2003). New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology* 62, 34-43.

- Schalcken, J.A., and van Leenders, G. (2003). Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology* 62, 11-20.
- Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., Smith, L.H., Lee, J.K., Tanabe, L., Kohn, K.W., Reinhold, W.C., Myers, T.G., Andrews, D.T., *et al.* (2000). A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24, 236-244.
- Schroedl, C., McClintock, D.S., Budinger, G.R., and Chandel, N.S. (2002). Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1 $\alpha$  requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L922-931.
- Schulz, W.A., and Hatina, J. (2006). Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med* 10, 100-125.
- Schuurmans, A.L., Bolt, J., Veldscholte, J., and Mulder, E. (1990). Stimulatory effects of antiandrogens on LNCaP human prostate tumor cell growth, EGF-receptor level and acid phosphatase secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 849-853.
- Segui-Simarro, J.M., Testillano, P.S., and Risueno, M.C. (2003). Hsp70 and Hsp90 change their expression and subcellular localization after microspore embryogenesis induction in *Brassica napus* L. *J Struct Biol* 142, 379-391.
- Seike, M., Yanaiharu, N., Bowman, E.D., Zanetti, K.A., Budhu, A., Kumamoto, K., Mechanic, L.E., Matsumoto, S., Yokota, J., Shibata, T., *et al.* (2007). Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *J Natl Cancer Inst* 99, 1257-1269.
- Shabo, I., Stal, O., Olsson, H., Dore, S., and Svanvik, J. (2008). Breast cancer expression of CD163, a macrophage scavenger receptor, is related to early distant recurrence and reduced patient survival. *Int J Cancer* 123, 780-786.
- Shah, U.S., and Getzenberg, R.H. (2004). Fingerprinting the diseased prostate: associations between BPH and prostate cancer. *J Cell Biochem* 91, 161-169.
- Shand, R.L., and Gelmann, E.P. (2006). Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol* 16, 123-131.
- Shariat, S.F., Ashfaq, R., Roehrborn, C.G., Slawin, K.M., and Lotan, Y. (2005). Expression of survivin and apoptotic biomarkers in benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 174, 2046-2050.
- Shariat, S.F., Kattan, M.W., Erdamar, S., Nguyen, C., Scardino, P.T., Spencer, D.M., Wheeler, T.M., and Slawin, K.M. (2003). Detection of clinically significant, occult prostate cancer metastases in lymph nodes using a splice variant-specific rt-PCR assay for human glandular kallikrein. *J Clin Oncol* 21, 1223-1231.
- Sharma, R., Zheng, L., Guo, X., Fu, S.M., Ju, S.T., and Jarjour, W.N. (2006). Novel animal models for Sjogren's syndrome: expression and transfer of salivary gland dysfunction from regulatory T cell-deficient mice. *J Autoimmun* 27, 289-296.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672-1677.
- Shibahara, S., Yoshida, T., and Kikuchi, G. (1979). Mechanism of increase of heme oxygenase activity induced by hemin in cultured pig alveolar macrophages. *Arch Biochem Biophys* 197, 607-617.
- Shin, J.H., Jung, H.J., Lee, H.R., Kim, J.H., Kim, H.R., and Lee, J.N. (2007a). Prevalence, identification, and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus lugdunensis* from various clinical specimens in Korea. *Jpn J Infect Dis* 60, 312-313.
- Shin, Y., Yoon, S.H., Choe, E.Y., Cho, S.H., Woo, C.H., Rho, J.Y., and Kim, J.H. (2007b). PMA-induced up-regulation of MMP-9 is regulated by a PKC $\alpha$ -NF- $\kappa$ B cascade in human lung epithelial cells. *Exp Mol Med* 39, 97-105.
- Shiraishi, F., Curtis, L.M., Truong, L., Poss, K., Visner, G.A., Madsen, K., Nick, H.S., and Agarwal, A. (2000). Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 278, F726-736.
- Simon, O., Williams, T., Lopez-Ferber, M., and Caballero, P. (2004). Virus entry or the primary infection cycle are not the principal determinants of host specificity of Spodoptera spp. nucleopolyhedroviruses. *J Gen Virol* 85, 2845-2855.
- Sims, R.J., 3rd, Liss, A.S., and Gottlieb, P.D. (2003). Normalization of luciferase reporter assays under conditions that alter internal controls. *Biotechniques* 34, 938-940.
- Singh, D., Febbo, P.G., Ross, K., Jackson, D.G., Manola, J., Ladd, C., Tamayo, P., Renshaw, A.A., D'Amico, A.V., Richie, J.P., *et al.* (2002). Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell* 1, 203-209.
- Skliarenko, J.V., Lunt, S.J., Gordon, M.L., Vitkin, A., Milosevic, M., and Hill, R.P. (2006). Effects of the vascular disrupting agent ZD6126 on interstitial fluid pressure and cell survival in tumors. *Cancer Res* 66, 2074-2080.
- Slebos, D.J., Ryter, S.W., van der Toorn, M., Liu, F., Guo, F., Baty, C.J., Karlsson, J.M., Watkins, S.C., Kim, H.P., Wang, X., *et al.* (2007). Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36, 409-417.
- Smales, C., Ellis, M., Baumber, R., Hussain, N., Desmond, H., and Staddon, J.M. (2003). Occludin phosphorylation: identification of an occludin kinase in brain and cell extracts as CK2. *FEBS Lett* 545, 161-166.
- Small, E.J., and Roach, M., 3rd (2002). Prostate-specific antigen in prostate cancer: a case study in the development of a tumor marker to monitor recurrence and assess response. *Semin Oncol* 29, 264-273.

- Smith, J.L., Freebern, W.J., Collins, I., De Siervi, A., Montano, I., Haggerty, C.M., McNutt, M.C., Butscher, W.G., Dzekunova, I., Petersen, D.W., *et al.* (2004). Kinetic profiles of p300 occupancy in vivo predict common features of promoter structure and coactivator recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11554-11559.
- Soares, M.P., Lin, Y., Anrather, J., Csizmadia, E., Takigami, K., Sato, K., Grey, S.T., Colvin, R.B., Choi, A.M., Poss, K.D., *et al.* (1998). Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* *4*, 1073-1077.
- Sofer, S., Bawaskar, H.S., and Gueron, M. (2009). Antivenom for children with neurotoxicity from scorpion stings. *N Engl J Med* *361*, 631-632; author reply 632.
- Song, R., Mahidhara, R.S., Liu, F., Ning, W., Otterbein, L.E., and Choi, A.M. (2002). Carbon monoxide inhibits human airway smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* *27*, 603-610.
- Song, R., Mahidhara, R.S., Zhou, Z., Hoffman, R.A., Seol, D.W., Flavell, R.A., Billiar, T.R., Otterbein, L.E., and Choi, A.M. (2004). Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway. *J Immunol* *172*, 1220-1226.
- Song, W., Sun, Q., Dong, Z., Spencer, D.M., Nunez, G., and Nor, J.E. (2005). Antiangiogenic gene therapy: disruption of neovascular networks mediated by inducible caspase-9 delivered with a transcriptionally targeted adenoviral vector. *Gene Ther* *12*, 320-329.
- Soronen, P., Laiti, M., Torn, S., Harkonen, P., Patrikainen, L., Li, Y., Pulkka, A., Kurkela, R., Herrala, A., Kaija, H., *et al.* (2004). Sex steroid hormone metabolism and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* *92*, 281-286.
- Srisook, K., Kim, C., and Cha, Y.N. (2005a). Cytotoxic and cytoprotective actions of O<sub>2</sub>- and NO (ONOO-) are determined both by cellular GSH level and HO activity in macrophages. *Methods Enzymol* *396*, 414-424.
- Srisook, K., Kim, C., and Cha, Y.N. (2005b). Role of NO in enhancing the expression of HO-1 in LPS-stimulated macrophages. *Methods Enzymol* *396*, 368-377.
- Stanbrough, M., Bubley, G.J., Ross, K., Golub, T.R., Rubin, M.A., Penning, T.M., Febbo, P.G., and Balk, S.P. (2006). Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* *66*, 2815-2825.
- Stearns, M.E., Fudge, K., Garcia, F., and Wang, M. (1997). IL-10 inhibition of human prostate PC-3 ML cell metastases in SCID mice: IL-10 stimulation of TIMP-1 and inhibition of MMP-2/MMP-9 expression. *Invasion Metastasis* *17*, 62-74.
- Stearns, M.E., and Wang, M. (1998). Alendronate blocks metalloproteinase secretion and bone collagen I release by PC-3 ML cells in SCID mice. *Clin Exp Metastasis* *16*, 693-702.
- Stearns, M.E., Wang, M., Hu, Y., Kim, G., and Garcia, F.U. (2004). Expression of a flt-4 (VEGFR3) splicing variant in primary human prostate tumors. VEGF D and flt-4t(Delta773-1081) overexpression is diagnostic for sentinel lymph node metastasis. *Lab Invest* *84*, 785-795.
- Steiner, G.E., Newman, M.E., Paikl, D., Stix, U., Memaran-Dagda, N., Lee, C., and Marberger, M.J. (2003a). Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate* *56*, 171-182.
- Steiner, G.E., Stix, U., Handisurya, A., Willheim, M., Haitel, A., Reithmayr, F., Paikl, D., Ecker, R.C., Hrachowitz, K., Kramer, G., *et al.* (2003b). Cytokine expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue. *Lab Invest* *83*, 1131-1146.
- Steiner, M.S., Couch, R.C., Raghov, S., and Stauffer, D. (1999). The chimpanzee as a model of human benign prostatic hyperplasia. *J Urol* *162*, 1454-1461.
- Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 463-516.
- Stickens, D., Behonick, D.J., Ortega, N., Heyer, B., Hartenstein, B., Yu, Y., Fosang, A.J., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., and Werb, Z. (2004). Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* *131*, 5883-5895.
- Stocker, R., and Perrella, M.A. (2006). Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation* *114*, 2178-2189.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N., and Ames, B.N. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* *235*, 1043-1046.
- Strickler, H.D., and Goedert, J.J. (2001). Sexual behavior and evidence for an infectious cause of prostate cancer. *Epidemiol Rev* *23*, 144-151.
- Stuelten, C.H., DaCosta Byfield, S., Arany, P.R., Karpova, T.S., Stetler-Stevenson, W.G., and Roberts, A.B. (2005). Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. *J Cell Sci* *118*, 2143-2153.
- Su, C.C., and Lin, Y.H. (2008). Tanshinone IIA down-regulates the protein expression of ErbB-2 and up-regulates TNF-alpha in colon cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Mol Med* *22*, 847-851.
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., and Nagao, M. (2004). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci* *95*, 290-299.
- Suliman, H.B., Carraway, M.S., Ali, A.S., Reynolds, C.M., Welty-Wolf, K.E., and Piantadosi, C.A. (2007). The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *J Clin Invest* *117*, 3730-3741.

- Sun, J., Brand, M., Zenke, Y., Tashiro, S., Groudine, M., and Igarashi, K. (2004). Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1461-1466.
- Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., *et al.* (2002). Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* *21*, 5216-5224.
- Sun, M.H., Pang, J.H., Chen, S.L., Kuo, P.C., Chen, K.J., Kao, L.Y., Wu, J.Y., Lin, K.K., and Tsao, Y.P. (2007). Photoreceptor protection against light damage by AAV-mediated overexpression of heme oxygenase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *48*, 5699-5707.
- Sunamura, M., Duda, D.G., Ghattas, M.H., Lozonschi, L., Motoi, F., Yamauchi, J., Matsuno, S., Shibahara, S., and Abraham, N.G. (2003). Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* *6*, 15-24.
- Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, J.F., Chang, T.H., Gaydos, C.A., Zenilman, J.M., De Marzo, A.M., Willett, W.C., and Platz, E.A. (2006a). Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *15*, 939-945.
- Sutcliffe, S., Giovannucci, E., De Marzo, A.M., Leitzmann, M.F., Willett, W.C., and Platz, E.A. (2006b). Gonorrhea, syphilis, clinical prostatitis, and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *15*, 2160-2166.
- Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Gaydos, C.A., Viscidi, R.P., Jenkins, F.J., Zenilman, J.M., Jacobson, L.P., De Marzo, A.M., Willett, W.C., and Platz, E.A. (2007). Plasma antibodies against *Chlamydia trachomatis*, human papillomavirus, and human herpesvirus type 8 in relation to prostate cancer: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *16*, 1573-1580.
- Suttner, D.M., Sridhar, K., Lee, C.S., Tomura, T., Hansen, T.N., and Dennery, P.A. (1999). Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells. *Am J Physiol* *276*, L443-451.
- Suzuki, H., Tashiro, S., Hira, S., Sun, J., Yamazaki, C., Zenke, Y., Ikeda-Saito, M., Yoshida, M., and Igarashi, K. (2004). Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J* *23*, 2544-2553.
- Takahashi, T., Shimizu, H., Morimatsu, H., Inoue, K., Akagi, R., Morita, K., and Sassa, S. (2007). Heme oxygenase-1: a fundamental guardian against oxidative tissue injuries in acute inflammation. *Mini Rev Med Chem* *7*, 745-753.
- Takeda, K., Ishizawa, S., Sato, M., Yoshida, T., and Shibahara, S. (1994). Identification of a cis-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene. *J Biol Chem* *269*, 22858-22867.
- Takkellapati, S.R., Chen, C.Y., Neschadimenko, V., Nampalli, S., Xiao, H., Wegener, J., Dhulipala, P., Kumar, S., and Fuller, C. (2007). Synthesis of aminomethyl- and bis-aminomethyl-fluorescein energy transfer terminators. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* *26*, 1467-1470.
- Tamanaha, R., Camacho, C.P., Ikejiri, E.S., Maciel, R.M., and Cerutti, J.M. (2007). Y791F RET mutation and early onset of medullary thyroid carcinoma in a Brazilian kindred: evaluation of phenotype-modifying effect of germline variants. *Clin Endocrinol (Oxf)* *67*, 806-808.
- Tang, W., and Norlin, M. (2006). Regulation of steroid hydroxylase CYP7B1 by androgens and estrogens in prostate cancer LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* *344*, 540-546.
- Tarter, T.H., and Vaughan, E.D., Jr. (2006). Inhibitors of 5alpha-reductase in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Curr Pharm Des* *12*, 775-783.
- Taylor, R.A., Cowin, P., Couse, J.F., Korach, K.S., and Risbridger, G.P. (2006). 17beta-estradiol induces apoptosis in the developing rodent prostate independently of ERalpha or ERbeta. *Endocrinology* *147*, 191-200.
- Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *61*, 748-755.
- Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1969). Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* *244*, 6388-6394.
- Thavathiru, E., and Das, G.M. (2001). Activation of pRL-TK by 12S E1A oncoprotein: drawbacks of using an internal reference reporter in transcription assays. *Biotechniques* *31*, 528-530, 532.
- Theres, H.P., Wagner, K.D., Romberg, D., Feig, C., Strube, S., Leiterer, K.P., Gunther, J., Stangl, K., Baumann, G., and Schimke, I. (2000). Combined treatment with ramipril and metoprolol prevents changes in the creatine kinase isoenzyme system and improves hemodynamic function in rat hearts after myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* *14*, 597-606.
- Thompson, S.L., Konfortova, G., Gregory, R.I., Reik, W., Dean, W., and Feil, R. (2001). Environmental effects on genomic imprinting in mammals. *Toxicol Lett* *120*, 143-150.
- Thomson, L. (1920). Syphilis of the prostate. *Am J Syphilis*, 323-341.
- Tokar, E.J., Ancrile, B.B., Cunha, G.R., and Webber, M.M. (2005). Stem/progenitor and intermediate cell types and the origin of human prostate cancer. *Differentiation* *73*, 463-473.
- Tom, D.J., Rodgers, P.A., Shokoohi, V., Stevenson, D.K., and Dennery, P.A. (1996). Hepatic heme oxygenase is inducible in neonatal rats during the early postnatal period. *Pediatr Res* *40*, 288-293.
- Tomlins, S.A., Laxman, B., Dhanasekaran, S.M., Helgeson, B.E., Cao, X., Morris, D.S., Menon, A., Jing, X., Cao, Q., Han, B., *et al.* (2007). Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* *448*, 595-599.

- Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Smith, L.R., Roulston, D., Helgeson, B.E., Cao, X., Wei, J.T., Rubin, M.A., Shah, R.B., *et al.* (2006). TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 3396-3400.
- Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., *et al.* (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644-648.
- Tonks, N.K. (2005). Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* 121, 667-670.
- Toyokuni, S. (2006). Novel aspects of oxidative stress-associated carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 8, 1373-1377.
- Tran, C., Ouk, S., Clegg, N.J., Chen, Y., Watson, P.A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P.M., Yoo, D., Kwon, A., *et al.* (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 324, 787-790.
- True, L., Coleman, I., Hawley, S., Huang, C.Y., Gifford, D., Coleman, R., Beer, T.M., Gelmann, E., Datta, M., Mostaghel, E., *et al.* (2006). A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10991-10996.
- Tsai, J.C., Kumar, M., and Lin, J.G. (2009). Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. *J Hazard Mater* 164, 847-855.
- Tsuchihashi, S., Tamaki, T., Tanaka, M., Kawamura, A., Kaizu, T., Ikeda, A., and Kakita, A. (2003). Pyrrolidine dithiocarbamate provides protection against hypothermic preservation and transplantation injury in the rat liver: the role of heme oxygenase-1. *Surgery* 133, 556-567.
- Tsuji, M.H., Yanagawa, T., Iwasa, S., Tabuchi, K., Onizawa, K., Bannai, S., Toyooka, H., and Yoshida, H. (1999). Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 138, 53-59.
- Tsujinaka, T., Shiozaki, H., Yamamoto, M., Inoue, M., Yano, M., Doki, Y., and Monden, M. (1999). Role of preoperative chemoradiation in the management of upper third thoracic esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Surg* 177, 503-506; discussion 507.
- Tsurusaki, T., Aoki, D., Kanetake, H., Inoue, S., Muramatsu, M., Hishikawa, Y., and Koji, T. (2003). Zone-dependent expression of estrogen receptors alpha and beta in human benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1333-1340.
- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Smith, M.J., Smith, V.C., Dang, T.D., and Rowley, D.R. (2002). Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 8, 2912-2923.
- Uchida, K., Masumori, N., Takahashi, A., Itoh, N., Kato, K., Matusik, R.J., and Tsukamoto, T. (2006). Murine androgen-independent neuroendocrine carcinoma promotes metastasis of human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate* 66, 536-545.
- Uht, R.M., Amos, S., Martin, P.M., Riggan, A.E., and Hussaini, I.M. (2007). The protein kinase C-eta isoform induces proliferation in glioblastoma cell lines through an ERK/Elk-1 pathway. *Oncogene* 26, 2885-2893.
- Untergasser, G., Madersbacher, S., and Berger, P. (2005a). Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol* 40, 121-128.
- Untergasser, G., Plas, E., Pfister, G., Heinrich, E., and Berger, P. (2005b). Interferon-gamma induces neuroendocrine-like differentiation of human prostate basal-epithelial cells. *Prostate* 64, 419-429.
- Utermohlen, O., Karow, U., Lohler, J., and Kronke, M. (2003). Severe impairment in early host defense against *Listeria monocytogenes* in mice deficient in acid sphingomyelinase. *J Immunol* 170, 2621-2628.
- Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A., and Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 375-536.
- van der Poel, H.G. (2005). Androgen receptor and TGFbeta1/Smad signaling are mutually inhibitory in prostate cancer. *Eur Urol* 48, 1051-1058.
- van Leenders, G.J., Gage, W.R., Hicks, J.L., van Balken, B., Aalders, T.W., Schalken, J.A., and De Marzo, A.M. (2003). Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol* 162, 1529-1537.
- van Leenders, G.J., and Schalken, J.A. (2001). Stem cell differentiation within the human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. *BJU Int* 88 Suppl 2, 35-42; discussion 49-50.
- Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., *et al.* (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624-629.
- Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., van Rooij, H.C., Trapman, J., Brinkmann, A.O., and Mulder, E. (1990a). A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 534-540.
- Veldscholte, J., Voorhorst-Ogink, M.M., Bolt-de Vries, J., van Rooij, H.C., Trapman, J., and Mulder, E. (1990b). Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *Biochim Biophys Acta* 1052, 187-194.
- Venkateswaran, V., Fleshner, N.E., and Klotz, L.H. (2002). Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. *J Urol* 168, 1578-1582.

- Verma, R.S., Manikal, M., Conte, R.A., and Godec, C.J. (1999). Chromosomal basis of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Invest* 17, 441-447.
- Vicari, A.P., and Caux, C. (2002). Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 143-154.
- Vicente, A.M., Guillen, M.I., Habib, A., and Alcaraz, M.J. (2003). Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther* 307, 1030-1037.
- Vigil, J.M. (2009). A socio-relational framework of sex differences in the expression of emotion. *Behav Brain Sci* 32, 375-390; discussion 391-428.
- Visakorpi, T. (2003). The molecular genetics of prostate cancer. *Urology* 62, 3-10.
- Vitek, L., and Schwertner, H.A. (2007). The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 43, 1-57.
- Vo, H.P., Lee, M.K., and Crowe, D.L. (1998). alpha2beta1 integrin signaling via the mitogen activated protein kinase pathway modulates retinoic acid-dependent tumor cell invasion and transcriptional downregulation of matrix metalloproteinase 9 activity. *Int J Oncol* 13, 1127-1134.
- Vogt, B.A., Alam, J., Croatt, A.J., Vercellotti, G.M., and Nath, K.A. (1995). Acquired resistance to acute oxidative stress. Possible role of heme oxygenase and ferritin. *Lab Invest* 72, 474-483.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., *et al.* (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2257-2261.
- Wagener, F.A., van Beurden, H.E., von den Hoff, J.W., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (2003a). The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood* 102, 521-528.
- Wagener, F.A., Volk, H.D., Willis, D., Abraham, N.G., Soares, M.P., Adema, G.J., and Figdor, C.G. (2003b). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 55, 551-571.
- Wagner, K.R., Hua, Y., de Courten-Myers, G.M., Broderick, J.P., Nishimura, R.N., Lu, S.Y., and Dwyer, B.E. (2000). Tin-mesoporphyrin, a potent heme oxygenase inhibitor, for treatment of intracerebral hemorrhage: in vivo and in vitro studies. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 597-608.
- Walmsley, S.R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R.S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A.M., Cowburn, A.S., Johnson, N., *et al.* (2005). Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med* 201, 105-115.
- Wang, J., Cai, Y., Ren, C., and Ittmann, M. (2006). Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 66, 8347-8351.
- Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., and Chu, T.M. (1979). Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17, 159-163.
- Wang, X., Hauptmann, N., Taylor, E., Foreman, M., Khawli, L.A., and Maines, M.D. (2003). Neotrofin increases heme oxygenase-1 selectively in neurons. *Brain Res* 962, 1-14.
- Was, H., Cichon, T., Smolarczyk, R., Rudnicka, D., Stopa, M., Chevalier, C., Leger, J.J., Lackowska, B., Grochot, A., Bojkowska, K., *et al.* (2006). Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am J Pathol* 169, 2181-2198.
- Wasserberg, N., Pileggi, A., Salgar, S.K., Ruiz, P., Ricordi, C., Inverardi, L., and Tzakis, A.G. (2007). Heme oxygenase-1 upregulation protects against intestinal ischemia/reperfusion injury: a laboratory based study. *Int J Surg* 5, 216-224.
- Waugh, D.J., and Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6735-6741.
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677-688.
- Wegiel, B., Chin, B.Y., and Otterbein, L.E. (2008). Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation. *Cell Cycle* 7, 1379-1384.
- Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. (2006). Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 66, 1883-1890; discussion 1895-1886.
- Willis, D., Moore, A.R., Frederick, R., and Willoughby, D.A. (1996). Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2, 87-90.
- Wong, O.G., Nitkunan, T., Oinuma, I., Zhou, C., Blanc, V., Brown, R.S., Bott, S.R., Nariculam, J., Box, G., Munson, P., *et al.* (2007). Plexin-B1 mutations in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19040-19045.
- Wong, Y.C., Wang, X., and Ling, M.T. (2004). Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis* 9, 279-289.
- Wu, J.D., Haugk, K., Woodke, L., Nelson, P., Coleman, I., and Plymate, S.R. (2006a). Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 99, 392-401.
- Wu, W.S., Tsai, R.K., Chang, C.H., Wang, S., Wu, J.R., and Chang, Y.X. (2006b). Reactive oxygen species mediated sustained activation of protein kinase C alpha and extracellular signal-regulated kinase for migration of human hepatoma cell Hepg2. *Mol Cancer Res* 4, 747-758.
- Wu, X., Dong, X., Liu, W., and Chen, J. (2006c). Characterization of CHEK2 mutations in prostate cancer. *Hum Mutat* 27, 742-747.
- Xiao, H., Gulen, M.F., Qin, J., Yao, J., Bulek, K., Kish, D., Altuntas, C.Z., Wald, D., Ma, C., Zhou, H., *et al.* (2007). The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity* 26, 461-475.
- Xing, J., Lin, T., and Zhan, W. (2008). Variations of enzyme activities in the haemocytes of scallop *Chlamys farreri* after infection with the acute virus necrobiosis virus (AVNV). *Fish Shellfish Immunol* 25, 847-852.

- Xu, J., Stolk, J.A., Zhang, X., Silva, S.J., Houghton, R.L., Matsumura, M., Vedvick, T.S., Leslie, K.B., Badaro, R., and Reed, S.G. (2000). Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res* 60, 1677-1682.
- Xu, K., Shimelis, H., Linn, D.E., Jiang, R., Yang, X., Sun, F., Guo, Z., Chen, H., Li, W., Kong, X., *et al.* (2009a). Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination. *Cancer Cell* 15, 270-282.
- Xu, L., Fang, G., Li, X., Yuan, J., Hu, X., Zhu, W., Xiao, H., and Ji, G. (2007). DFT study on the structures and properties of 3-nitro-1,2,4-triazol-5-one crystals at high pressure. *J Mol Graph Model* 26, 415-419.
- Xu, Z., Lu, G., and Wu, F. (2009b). Simvastatin suppresses homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells: roles of caspase-3, cIAP-1 and cIAP-2. *Hypertens Res* 32, 375-380.
- Xue, Y., van der Laak, J., Smedts, F., Schoots, C., Verhofstad, A., de la Rosette, J., and Schalken, J. (2000). Neuroendocrine cells during human prostate development: does neuroendocrine cell density remain constant during fetal as well as postnatal life? *Prostate* 42, 116-123.
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y., and Koizumi, S. (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103, 129-135.
- Yachie, A., Toma, T., Mizuno, K., Okamoto, H., Shimura, S., Ohta, K., Kasahara, Y., and Koizumi, S. (2003). Heme oxygenase-1 production by peripheral blood monocytes during acute inflammatory illnesses of children. *Exp Biol Med* (Maywood) 228, 550-556.
- Yan, C., and Boyd, D.D. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 211, 19-26.
- Yan, Q.J., Zhang, Y.F., Yang, J., Ding, Q., Wang, J.G., Jiang, H.W., Zhao, H., Xu, K., Gong, J., Li, L.J., *et al.* (2004). [The porcine alpha1, 3 galactosyltransferase gene siRNA targeted heterozygous hepatocyte negative express GT]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 12, 482-484.
- Yanagawa, T., Omura, K., Harada, H., Nakaso, K., Iwasa, S., Koyama, Y., Onizawa, K., Yusa, H., and Yoshida, H. (2004). Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 40, 21-27.
- Yang, J.C., Huang, J.H., Pan, Q.M., Tang, J.W., and Han, X.G. (2004). Long-term impacts of land-use change on dynamics of tropical soil carbon and nitrogen pools. *J Environ Sci (China)* 16, 256-261.
- Yang, X., Chen, M.W., Terry, S., Vacherot, F., Chopin, D.K., Bemis, D.L., Kitajewski, J., Benson, M.C., Guo, Y., and Buttyan, R. (2005). A human- and male-specific protocadherin that acts through the wnt signaling pathway to induce neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Cancer Res* 65, 5263-5271.
- Yang, Y., Ohta, K., Shimizu, M., Morimoto, K., Goto, C., Nakai, A., Toma, T., Kasahara, Y., Yachie, A., Seki, H., *et al.* (2003). Selective protection of renal tubular epithelial cells by heme oxygenase (HO)-1 during stress-induced injury. *Kidney Int* 64, 1302-1309.
- Yang, Z.Y., Simari, R.D., Perkins, N.D., San, H., Gordon, D., Nabel, G.J., and Nabel, E.G. (1996). Role of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7905-7910.
- Yano, M., Tsujinaka, T., Shiozaki, H., Inoue, M., Doki, Y., Yamamoto, M., Tanaka, E., Inoue, T., and Monden, M. (1999). Concurrent chemotherapy (5-fluorouracil and cisplatin) and radiation therapy followed by surgery for T4 squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Surg Oncol* 70, 25-32.
- Yao, J., Xiong, S., Klos, K., Nguyen, N., Grijalva, R., Li, P., and Yu, D. (2001). Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin-beta1 in human breast cancer cells. *Oncogene* 20, 8066-8074.
- Yegnasubramanian, S., Kowalski, J., Gonzalgo, M.L., Zahurak, M., Piantadosi, S., Walsh, P.C., Bova, G.S., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2004). Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res* 64, 1975-1986.
- Yeh, B.K., Igarashi, M., Eliseenkova, A.V., Plotnikov, A.N., Sher, I., Ron, D., Aaronson, S.A., and Mohammadi, M. (2003). Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2266-2271.
- Yeole, B.B., Sunny, L., Swaminathan, R., Sankaranarayanan, R., and Parkin, D.M. (2001). Population-based survival from colorectal cancer in Mumbai (Bombay) India. *Eur J Cancer* 37, 1402-1408.
- Yilmaz, M.I., Saglam, K., Sonmez, A., Gok, D.E., Basal, S., Kilic, S., Akay, C., and Kocar, I.H. (2004). Antioxidant system activation in prostate cancer. *Biol Trace Elem Res* 98, 13-19.
- Yoo, C.B., and Jones, P.A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 5, 37-50.
- Yoshinaga, T., Sassa, S., and Kappas, A. (1982). The occurrence of molecular interactions among NADPH-cytochrome c reductase, heme oxygenase, and biliverdin reductase in heme degradation. *J Biol Chem* 257, 7786-7793.
- You, R.I., Chang, Y.C., Chen, P.M., Wang, W.S., Hsu, T.L., Yang, C.Y., Lee, C.T., and Hsieh, S.L. (2008). Apoptosis of dendritic cells induced by decoy receptor 3 (DcR3). *Blood* 111, 1480-1488.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14, 163-176.
- Zambrano, A., Kalantari, M., Simoneau, A., Jensen, J.L., and Villarreal, L.P. (2002). Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *Prostate* 53, 263-276.

- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P., and Anderson, T.A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 302, 1-12.
- Zhang, H., and Altman, S. (2004). Inhibition of the expression of the human RNase P protein subunits Rpp21, Rpp25, Rpp29 by external guide sequences (EGSs) and siRNA. *J Mol Biol* 342, 1077-1083.
- Zhang, J., Hess, M.W., Thurnher, M., Hobisch, A., Radmayr, C., Cronauer, M.V., Hittmair, A., Culig, Z., Bartsch, G., and Klocker, H. (1997). Human prostatic smooth muscle cells in culture: estradiol enhances expression of smooth muscle cell-specific markers. *Prostate* 30, 117-129.
- Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Iwai, T., Matsushita, Y., Shimamura, H., Araki, H., and Shimotohno, K. (2004a). Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology* 320, 135-143.
- Zhang, Q., Zhang, Z.F., Rao, J.Y., Sato, J.D., Brown, J., Messadi, D.V., and Le, A.D. (2004b). Treatment with siRNA and antisense oligonucleotides targeted to HIF-1 $\alpha$  induced apoptosis in human tongue squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 111, 849-857.
- Zhang, W., Lin, T.R., Hu, Y., Fan, Y., Zhao, L., Stuenkel, E.L., and Mulholland, M.W. (2004c). Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol* 559, 729-737.
- Zhang, W., Singam, R., Hellermann, G., Kong, X., Juan, H.S., Lockey, R.F., Wu, S.J., Porter, K., and Mohapatra, S.S. (2004d). Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery. *Genet Vaccines Ther* 2, 8.
- Zhang, W., Yang, H., Kong, X., Mohapatra, S., San Juan-Vergara, H., Hellermann, G., Behera, S., Singam, R., Lockey, R.F., and Mohapatra, S.S. (2005). Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* 11, 56-62.
- Zhang, X., Shan, P., Alam, J., Davis, R.J., Flavell, R.A., and Lee, P.J. (2003). Carbon monoxide modulates Fas/Fas ligand, caspases, and Bcl-2 family proteins via the p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase pathway during ischemia-reperfusion lung injury. *J Biol Chem* 278, 22061-22070.
- Zhang, X., Shan, P., Jiang, D., Noble, P.W., Abraham, N.G., Kappas, A., and Lee, P.J. (2004e). Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J Biol Chem* 279, 10677-10684.
- Zhang, X.N., Xiong, W., Wang, J.D., Hu, Y.W., Xiang, L., and Yuan, Z.H. (2004f). siRNA-mediated inhibition of HBV replication and expression. *World J Gastroenterol* 10, 2967-2971.
- Zhang, Z., Karam, J., Frenkel, E., Sagalowsky, A., and Hsieh, J.T. (2006). The application of epigenetic modifiers on the treatment of prostate and bladder cancer. *Urol Oncol* 24, 152-160.
- Zheng, L., Wang, F., Qian, C., Neumann, R.M., Cheville, J.C., Tindall, D.J., and Liu, W. (2006). Unique substitution of CHEK2 and TP53 mutations implicated in primary prostate tumors and cancer cell lines. *Hum Mutat* 27, 1062-1063.
- Zhou, H.W., Lou, S.Q., and Zhang, K. (2004). Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology (Oxford)* 43, 555-568.
- Zuckerbraun, B.S., Billiar, T.R., Otterbein, S.L., Kim, P.K., Liu, F., Choi, A.M., Bach, F.H., and Otterbein, L.E. (2003). Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J Exp Med* 198, 1707-1716.
- Zuckerbraun, B.S., Chin, B.Y., Bilban, M., d'Avila, J.C., Rao, J., Billiar, T.R., and Otterbein, L.E. (2007). Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J* 21, 1099-1106.
- Zuckerbraun, B.S., Chin, B.Y., Wegiel, B., Billiar, T.R., Czirsimadia, E., Rao, J., Shimoda, L., Ifedigbo, E., Kanno, S., and Otterbein, L.E. (2006). Carbon monoxide reverses established pulmonary hypertension. *J Exp Med* 203, 2109-2119.