Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL ELOIR FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral





HO-1 en la progresión ósea del cáncer de próstata

Ferrando, María Mercedes Catalina

2013

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ferrando, María Mercedes Catalina. (2013). HO-1 en la progresión ósea del cáncer de próstata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ferrando, María Mercedes Catalina. "HO-1 en la progresión ósea del cáncer de próstata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 **Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química Biológica

"HO-1 en la progresión ósea del cáncer de próstata"

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Lic. María Mercedes Catalina Ferrando

Directora de tesis: Dra. Elba Susana Vazquez

Consejero de Estudios: Dra. Elba Susana Vazquez

Laboratorio de Cáncer y Apoptosis, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. IQUIBICEN - CONICET

Buenos Aires, 2013

RESUMEN

HO-1 en la progresión ósea del cáncer de próstata

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer entre los hombres en Argentina. La angiogénesis es crucial para el crecimiento y progresión del PCa. El perfil de diseminación de estos tumores muestra tendencia a desarrollarse en el hueso como único sitio de progresión, donde las células tumorales interactúan con el microambiente interrumpiendo el equilibrio formación/degradación del hueso. Sin embargo, la naturaleza molecular de dicha interacción aún no se conoce completamente. En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que el aumento de expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1) en líneas de PCa disminuye su proliferación, invasión y migración in vitro y el crecimiento tumoral in vivo. En este trabajo de tesis nos propusimos estudiar el efecto de HO-1 sobre la angiogénesis y progresión del PCa. Comprobamos que la sobre-expresión de HO-1 en PC3 disminuye la expresión de genes pro-angiogénicos in vitro. Un ensayo de angiogénesis in vivo mostró que la inoculación intradérmica de las células con expresión estable de HO-1 (PC3HO-1), generaba tumores menos vascularizados, con reducida densidad de la microvasculatura e inmunomarcación disminuida de marcadores angiogénicos. Mediante un sistema de co-cultivo de células PC3 con cultivos primarios de osteoblastos de ratón (PMOs), comprobamos que la disminución de la proliferación de los PMOs inducida por las células tumorales, se restauraba cuando éstas fueron pre-tratadas con el inductor farmacológico de HO-1 (hemina). No se observaron alteraciones en la expresión de genes involucrados en la diferenciación y resorción ósea. Sin embargo, el tratamiento con hemina indujo DKK-1 en las células PC3 co-cultivadas y el estrés oxidativo y la vía de FoxO en los osteoblastos. Estos resultados se confirmaron utilizando explantes de calvarias. La inyección intra-ósea de PC3HO-1 produjo una robusta remodelación ósea. Mediante un microarray de tejidos derivados de creciendo metástasis de la castración pacientes resistentes а como SCID se determinó HO-1 xenotransplantes en ratones que presentaba inmunomarcación heterogénea. En conjunto, estos resultados demuestran que HO-1 es un factor clave para el control de la angiogénesis y altera el microambiente tumoral impactando sobre la progresión ósea del PCa.

Palabras claves: Hemo oxigenasa-1, cáncer de próstata, metástasis ósea, angiogénesis, osteoblastos.

ABSTRACT

HO-1 in prostate cancer bone progression

Prostate cancer (PCa) is a leading cause of death among males. The switch to an angiogenic phenotype is known to be critical for its progression. PCa is dominated by complications arising from metastasis to the bone where the tumoral cells interact with the bone microenviroment impairing the balance between bone formation and degradation. However, the molecular nature of this interaction is not completely understood. Previous studies from our laboratory showed that heme oxygenase 1 (HO-1) expression decreased PCa cells proliferation, invasion and migration in vitro and decreased tumor growth in vivo. The goal of this thesis is to study the role of HO-1 in PCa angiogenesis and progression. We demonstrated that pro-angiogenic genes were down-modulated in response to HO-1 over-expression in PC3 cells (PC3HO-1). An *in vivo* angiogenic assay showed that intradermic inoculation of PC3HO-1 cells generated tumors less vascularized, with decreased microvessel density and reduced expression of angiogenic markers. Using a co-culture system of PC3 cells that HO-1 with primary mouse osteoblasts (PMOs), we demonstrated pharmacological induction (hemin treatment) abrogated the diminution of PMOs proliferation induced by PCa cells. No changes were detected in the expression of genes involved in differentiation and bone resorption. However, co-culture of hemin pre-treated PC3 cells with PMOs induced DKK-1 expression in tumor cells and oxidative stress and FoxO signaling in osteoblasts. These findings were confirmed using a co-culture system of PCa cells with calvaria explants. In vivo bone injection of PC3HO-1 cells in the femur of SCID mice produced strong bone remodeling. Heterogeneous HO-1 immunoreactivity was detected in a tissue microarray of human prostate cancer metastasis from castrated resistant patients growing as xenografts in SCID mice. These results suggest that HO-1 is a key regulator of the angiogenic switch in PCa and has the potentiality to modify the bone micro-environment modulating PCa bone metastasis.

Key words: heme oxigenase-1, prostate cáncer, bone metastasis, angiogenesis, osteoblasts.

Quiero agradecer a todas las personas que colaboraron en la realización de este trabajo de tesis...

A la Universidad de Buenos Aires, especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por apoyar la formación y desarrollo de los jóvenes investigadores, habiéndome posibilitado realizar el doctorado.

A la Dra. Elba Vazquez, por todo su apoyo y generosidad, por haberme recibido en su laboratorio y ser un pilar fundamental en mi formación como científica, por haber estimulado la creatividad en el desarrollo de mi tesis, por haber promovido siempre mi capacitación, por compartir sus conocimientos y discutir los resultados, y por el esfuerzo y los buenos momentos compartidos durante las últimas semanas de trabajo.

A la Dra. Nora Navone, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme capacitarme y aprender sobre los temas de la tesis, por su buena predisposición ante mis consultas, por sus consejos sobre el rumbo de mis resultados, y por el importante aporte de insumos para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Roberto Meiss, por su paciencia y predisposición en el análisis de muestras y enseñarme a entenderlas, por darme el lugar para discutir juntos los resultados y por estar siempre disponible para todo lo que necesité.

A la Dra. Adriana De Siervi, por toda su colaboración, por ayudarme a solucionar las dificultades en los experimentos, por estar siempre presente para ayudarme y por compartir conmigo toda su experiencia.

A todos mis compañeros del laboratorio, por haber compartido grandes momentos juntos todos estos años, por ser un equipo y generar un espacio alegre donde trabajar, por el compañerismo, por las risas, por las ganas de resolver los problemas juntos y por el gran apoyo de cada uno.

A Javi, por su buena predisposición para enseñarme, por la paciencia con cada una de mis dificultades tecnológicas y por aconsejarme siempre que lo necesité.

A Geraldine, por sus consejos y por ayudarme cuando necesité su ayuda.

A Paola, por estar siempre dispuesta a enseñarme, por ayudarme a revisar los protocolos, a preparar soluciones, a interpretar resultados, por toda su ayuda, por ser de fierro, por estar siempre pendiente de que todos estemos bien y fundamentalmente por ser una gran amiga.

A Belén, por haberme acompañado y compartir juntas este camino, por su ayuda en los experimentos, en la interpretación de los resultados, en revisar protocolos, por sus consejos, por poder contar siempre con ella y fundamentalmente por ser una gran amiga.

A Florencia, por su alegría, por ser la mamá del grupo y preocuparse por todos, por su ayuda, por estar siempre, por todo su afecto y fundamentalmente por ser una gran amiga.

A Cristian, por haber compartido esta etapa doctoral, por ponerle música al laboratorio, por generar un buen ambiente de trabajo y fundamentalmente por ser un gran amigo y una más de nosotras.

A Daia, Feli, Tefi y Ale, por la alegría que transmiten en el labo, por el humor, por las charlas divertidas y por la buena predisposición para ayudar. También a Angie, a Alejandro y a todos los compañeros que pasaron por el labo, por los buenos recuerdos.

Al Dr. Gabriel Rabinovich, por toda su colaboración, la gran ayuda prestada para el desarrollo de nuestro laboratorio, y sus consejos para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Lucas Colombo, por su colaboración en los ensayos de angiogénesis, por su buen humor y por fomentar la creatividad en la ciencia.

A las Dras. Susana Correa, Mariana Bermudez, Edith Kordon, Adalí Pecci y Alejandra Guberman, por su generosidad para abrir las puertas de sus laboratorios, darnos un espacio para trabajar, compartir los equipos y colaborar con materiales lo que fue fundamental para poder realizar este trabajo de tesis.

Al Dr. Eduardo Cánepa, por su generosidad, por permitirme realizar experimentos en su laboratorio y por su calidez.

A la Dra. Mónica Kotler, por su aporte e interés en este trabajo y por su ayuda en la interpretación de los resultados sobre el estrés oxidativo.

Al Dr. Omar Coso, por compartir sus equipos para realizar experimentos y por sus aportes en las reuniones de hemo oxigenasa.

A la Dra. Elizabeth Jares-Erijman, por permitirme usar sus equipos y a Martín Toscani y Francisco Guaimas, por toda su ayuda para utilizar los equipos y procesar las imágenes.

A todos los compañeros del CM1 y del 4°piso, los actuales y pasados, por su generosidad, la colaboración y predisposición para enseñarme a usar los equipos, por compartir los protocolos, por la buena onda y fundamentalmente por las charlas, consejos y momentos divertidos que compartimos.

A mis amigas Mari, Jesi, Bere, Caro, Vani, Vangi, Alejandrita, Lucre y Ale, por el acompañamiento de todos estos años, por darme aliento y pilas, por estar dispuestas siempre a ayudarme y por toda la diversión.

A toda mi familia, a mis hermanos y especialmente a mis papás, por el cariño, por el apoyo incondicional, por la paciencia, por el incentivo y por su esfuerzo en mi formación.

A Ale, por su apoyo, por escucharme y aconsejarme, por su paciencia, por cuidarme, por toda la felicidad, por ser un gran compañero y fundamentalmente por escuchar mis presentaciones aunque no entienda nada.

A mis papás

PUBLICACIONES

El presente trabajo de tesis ha dado lugar a la siguiente publicación:

Ferrando M.*, Gueron G.*, Elguero B., Giudice J., Salles A., Leskow F., Jares-Erijman E., Colombo L., Meiss R., Navone N., De Siervi A., Vazquez E. "Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer", *Angiogenesis*, 2011, (14): 467-479. * las dos son primeras autoras.

Además he participado en el trabajo que dio origen a la siguiente publicación de gran relevancia para esta tesis:

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", *Molecular Cancer Research*, 2009, 7 (11): 1745-55.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	
CAPÍTULO I: CÁNCER DE PRÓSTATA	16
I.1 La glándula prostática	16
I.2 Generalidades del cáncer de próstata	17
CAPÍTULO II: ANGIOGÉNESIS	20
II.1 Generalidades	20
II.2 Mecanismos de la angiogénesis tumoral II.3 El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y sus receptores	21
(VEGFR)	22
II.4 Otros factores involucrados en la regulación	24
CAPÍTULO III: METÁSTASIS ÓSEA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	27
III. 1 Tejido óseo: Generalidades	27
III.1.1 Principales poblaciones celulares	30
III.1.1.1 Osteoblastos	30
III.1.1.2 Osteocitos	32
III.1.1.3 Osteoclastos	33
III.1.2 Remodelación ósea	34
III.2 I ropismo de los tumores prostaticos por el hueso	35
III.2.1 Mecanismos de la progresion al nueso	38
III.2.2 Tipos de metastasis oseas	41
III.2.2.1 Metastasis ostooblástico	41
III.2.2.1 Melasiasis Osleoblasiica	44 17
III.2.4 Estrés oxidativo en el establecimiento de la enfermedad	47
ósea	48
III.2.4.1 Generalidades	48
III.2.4.2 Estrés oxidativo en la remodelación ósea	49
III.2.4.3 Señalización de FoxO en la respuesta al estrés oxidativo	51
CAPÍTULO IV: HEMO OXIGENASA-1	56
IV.1 Generalidades	56
IV.2 Rol de HO-1 en la angiogénesis	60
IV.3 Rol de HO-1 en la biología tumoral	63
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	70
I. Hipótesis	71
II. Objetivo general	71
III. Objetivos específicos	72
A. Estudiar el efecto de HO-1 sobre la angiogénesis tumoral	72

B. Estudiar el efecto de HO-1 sobre la interacción de las	
células de PCa y el hueso	72
MATERIALES Y MÉTODOS	74
1. Cultivo de células	75
1.1 Líneas celulares utilizadas	75
1.2 Condiciones de crecimiento	75
1.3 Mantenimiento de las células	76
2. Generación de líneas celulares estables	76
2.1 Infección con lentivirus	76
3. Aislamiento de PMOs	77
4. Tratamiento con hemina	78
5. Co-cultivo	78
5.1 Co-cultivo de osteoblastos con células PC3	78
5.2 Co-cultivo de osteoblastos con células MDA PCa 2b	80
6. Análisis de la expresión génica a nivel del ARN mensajero	80
6.1 Aislamiento del ARN	80
6.2 Cuantificación del ARN	80
6.3 Preparación del ADNc: Transcripción reversa o	
retrotranscripción (RT)	81
6.4 PCR en tiempo real o cuantitativa	81
7. Análisis de la expresión de proteínas	84
7.1 Extracción de proteínas	84
7.2 Medición de la concentración de proteínas	84
7.3 Western blot	85
8. Obtención de plásmidos	86
8.1 Plásmidos	86
8.2 Preparación de bacterias competentes	87
8.3 Transformación de bacterias	88
8.4 Aislamiento del ADN plasmídico	88
8.5 Electroforesis en gel de agarosa	89
9. Ensayo de genes reporteros	89
9.1 Transfección	89
9.2 Medición de luciferasa	89
10. Zimografía	90
11. Ensayo de inmunofluorescencia	91
12. Ensayo de proliferación celular. Incorporación de ³ H-Timidina	92
13. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo	92
 14. Análisis de especies reactivas de oxígeno por 	
citometría de flujo	92
15. Tinción de Von Kossa	93
16. Ensayos de inmunohistoquímica	93
17. Tinción tricrómica de Masson	94
18. Ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i>	95
19. Cultivo de explantes de órganos	95

20. Inyección intra-ósea de células PC3HO-1 y PC3βgal
en ratones SCID
21. Inyección sub-cutánea de células PC3HO-1 y PC3βgal
en ratones <i>nu/nu</i>
RESULTADOS 97
CAPÍTULO I: ROL DE HO-1 EN LA ANGIOGÉNESIS DEL PCa 98
I.1 HO-1 reprime la expresión de genes pro-angiogénicos
en celulas PC3
1.2 HO-1 Inhibe la anglogenesis <i>In vivo</i>
CAPÍTULO II: ROL DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS
CÉLULAS DE PCa Y EL HUESO108
II.1 Inducción farmacológica de HO-1 en células PC3108
II.1.1 Mantenimiento de la inducción de HO-1 en función
del tiempo108
II.1.2 Efecto sobre la diferenciación de los PMOs109
II.1.3 Efecto sobre la osteoclastogénesis111
II.1.4 Efecto sobre otros factores moduladores de la
II 1 5 Efecto sobre factores implicados en la remodelación ósea 113
II 1 6 Efecto sobre la vía Wht/8-catenina
II.1.7 Efecto sobre la via win/p-caterinia
II.1.7 Electo sobre al prometación de los PINOS
II. 1.6 Electo sobre los více de coñclización en estechlectos
II. 1.9 Electo sobre las vias de senalización en osteoblastos
II.1.10 Efecto sobre la expresión de Gadd45d en osteoblastos 124
II.1.11 Efecto sobre el cultivo de explantes de calvarias
II.2 Silenciamiento genetico de la expresion de HO-1 en
celulas MDA PCa 2b
II.2.1 Generación de la línea MDA PCa 20 SNHO-1
II.2.2 Efecto sobre la diferenciación de los PMOs
II.2.3 Efecto sobre la osteoclastogenesis
II.2.4 Efecto sobre otros factores moduladores de la
resorcion osea
II.2.5 Efecto sobre la expresion de enzimas antioxidantes en PMOs
II.2.6 Efecto sobre la expresión de Ki-67 en PMOs
II.2.7 Efecto sobre la expresión de PSA135
CAPÍTULO III: RESULTADOS in vivo137
III 1 Tumores creciendo intra-óseos 137
III 2 Perfil de expresión de HO-1 en las metástasis de
nacientes con PCa resistentes a la castración 1/1

DISCUSIÓN	144
CAPÍTULO I: ROL DE HO-1 EN LA ANGIOGÉNESIS DEL PCa	145
CAPÍTULO II: ROL DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS	
CÉLULAS DE PCa Y EL HUESO	150
II.1 Efecto de la inducción farmacológica de HO-1 en células	
PC3 sobre el co-cultivo con PMOs	150
II.2 Efecto del silenciamiento genético de la expresión de HO-1 en	
células MDA PCa 2b sobre el co-cultivo con PMOs	163
II.3 Efecto de la inducción farmacológica de HO-1 en células	
PC3 sobre el co-cultivo con explantes de calvarias	164
II.4 Estudios <i>in vivo</i>	165
BIBLIOGRAFÍA	168

ABREVIATURAS

ACTB	actina-β
ADN	ácido desoxirribonucleico
ALP	fosfatasa alcalina
APC	adenamatous polyposis coli
AR	receptor de andrógenos
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATF4	factor de la activación de la transcripción-4
BCA	ácido bicinconínico
BMP	proteína morfogénica del hueso o morfogenética???
BMSCs	células del estroma de médula ósea
CCL2	ligando 2 de quimioquinas con motivo CC
cDNA	ADN copia
СО	monóxido de carbono
Col	colágeno
CoPP	cobalto protoporfirina IX
CORM-2	molécula tipo 2 liberadora de CO
CRPC	cáncer de próstata resistente a la castración
CSF-1	factor estimulante de colonias de macrófagos-1
CXCR4	receptor tipo 4 de quimioquinas con motivo CXC
DAB	p-dimetilaminoazobenzeno
DKK-1	dickkopf-1
DMSO	dimetil sulfóxido
Dnase	desoxiribonucleasa
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
ECM	matriz extracelular
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
EPCs	células progenitoras endoteliales
ET-1	endotelina-1
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FoxO	forkhead box O
Gadd45	factor involucrado en el arresto y en la reparación del daño al ADN
GSK	glucógeno sintasa quinasa
Hem	Hemina
HIF-1α	factor inducible por hipoxia 1α
HO-1	hemo oxigenasa-1
IFN-γ	interferón-γ
IGF	factor de crecimiento tipo insulina
IGFBP	proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina
IL	interleuquina
kDa	kilodalton
MMP	metaloproteinasa
MnSOD	manganeso superóxido dismutasa
MSCs	células madre mesenquimales
NF-E2	factor nuclear eritroide

NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	óxido nítrico
NP-1	neuropilin-1
NP-2	neuropilin-2
NSLC	carcinoma de pulmón a células no pequeñas
OCN	osteocalcina
OPG	osteoprogeterina
OPN	osteopontina
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	buffer fosfato salino
PCa	cáncer de próstata
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PIN	neoplasia prostática intra-epitelial
PIGF	factor de crecimiento placentario
PMOs	cultivo primario de osteoblastos de ratón
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
PSA	antígeno prostático específico
PTHrP	proteína relacionada a la hormona paratiroidea
RANK	receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
ROS	especies reactivas de oxígeno
RTqPCR	retro-transcripción y PCR en tiempo real
Runx-2	factor de transcripción 2 relacionado a runt
SDF-1	factor derivado del estroma-1
SDS	duodecil sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
shRNA	short hairpin ARN
siRNA	ácido ribonucleico anti sentido
SnPP	estaño (IV) protoporfirina IX
sVEGFR	receptor soluble del factor de crecimiento vascular endotelial
TAE	tris acetato EDTA
TAMs	macrófagos asociados a tumores
TBS	tris bufer salino
TBS-T	tris bufer salino Tween-20
TCF/Lef	factor de transcripción de células T / factor de expresión tardío
TCF/LEF	factor de transcripción de células T / factor de expresión tardío
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	factor de necrosis tumoral-α
Tris	tris (hydroximetil) aminoetano
TritonX-100	octil fenoxi polietoxietanol
Tween-20	polioxietileno (20) sorbitan monolaurato
uPA	activador de plasminógeno tipo uroquinasa
UV	ultravioleta
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR	receptor del factor de crecimiento vascular endotelial
Wnt	Int + Wg, wingless
β-cat	β-catenina

Introducción

CAPÍTULO I: CÁNCER DE PRÓSTATA

I.1 La glándula prostática

La próstata es un órgano glandular del aparato genitourinario, exclusivo de los hombres, localizada frente al recto, debajo y a la salida de la vejiga urinaria (Fig. 1). Contiene células que producen parte del líquido seminal que protege y nutre a los espermatozoides contenidos en el semen. Secreta varias enzimas como la fosfatasa ácida, la seminina, el activador del plasminógeno y el antígeno prostático específico (PSA). Este último es sintetizado exclusivamente en la próstata y su producción depende de la presencia de andrógenos y del tamaño de la glándula. La función fisiológica de esta proteasa es disolver el semen coagulado, que se forma por acción de las proteínas de las vesículas seminales a los pocos minutos de la eyaculación. En los hombres sanos, una pequeñísima parte del PSA pasa a la circulación sanguínea y un aumento de su concentración en la sangre es indicador de un crecimiento anormal o inflamación de la glándula prostática.



(http://urologiaperuana.blogspot.com.ar/2011/06/cancer-de-prostata.html)

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 el PSA y expresa al receptor de andrógenos (AR) (Liu *et al.* 1997).

El segundo tipo corresponde a las células basales, que forman una capa continua y no producen proteínas secretorias prostáticas (Liu *et al.* 1997; Bui y Reiter 1998), pero expresan factores que protegen del daño al ADN, tales como la proteína de defensa antioxidante glutatión-S-transferasa y el gen anti-apoptótico Bcl-2 (Bui y Reiter 1998; De Marzo *et al.* 1998). El tercer tipo celular es el neuroendócrino, el cual 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).



Figura 2. Representación esquemática de las poblaciones celulares en el ducto prostático. Adaptado de Abate-shen 2000 (Abate-Shen y Shen 2000).

I.2 Generalidades del cáncer de próstata

El cáncer de próstata (PCa) es el segundo tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado y la sexta causa de muerte por cáncer en los hombres en el mundo (Jemal *et al.* 2011). También en Argentina es el cáncer más diagnosticado entre los hombres y la segunda causa de muerte por esta malignidad (Proyecto GLOBOCAN 2008; http://globocan.iarc.fr/). Se trata de una enfermedad multifactorial y de etiología compleja.

El PCa se presenta principalmente en la zona periférica de la glándula y tiene distintas fases de progresión. Comienza siendo una enfermedad localizada, en la cual el tumor está confinado dentro de la cápsula de la próstata y no se ha dispersado hacia otras partes del cuerpo. Es dependiente de andrógenos para crecer y sobrevivir. En la siguiente fase, la enfermedad es metastásica, crece fuera de la próstata y en las áreas que la rodean. En la tercera fase, el PCa es refractario a hormonas y continúa creciendo sin responder a la ablación de andrógenos (Fig. 3).



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

Los factores de riesgo del PCa incluyen la edad, la etnia y los componentes hereditarios junto a los ambientales. Entre los últimos, el más importante es la inflamación crónica de la próstata. Esta puede ser debida a las infecciones, a la dieta y a cambios hormonales, entre otras causas (De Marzo *et al.* 2007).

Para el desarrollo de la tumorigénesis son ampliamente reconocidos los siguientes sellos o marcas (*hallmarks*): el mantenimiento de la proliferación celular y la resistencia a supresores de crecimiento; el establecimiento de la inmortalidad replicativa; la evasión de la apoptosis; la angiogénesis; la migración, la invasión y la capacidad de colonizar tejidos secundarios (metástasis) (Hanahan y Weinberg

2000). Recientemente se incorporaron la inflamación y la evasión del sistema inmune como factores determinantes de la progresión tumoral (Hanahan y Weinberg 2011). Esto último se debe a que algunos tumores están altamente infiltrados por células del sistema inmune y, por lo tanto, presentan condiciones inflamatorias. Históricamente, se consideraba que la activación del sistema inmune tenía el objetivo de erradicar a las células tumorales. En el año 2000, algunos estudios comenzaron a evidenciar que la respuesta inflamatoria asociada al tumor tenía un efecto imprevisto ya que favorecía la tumorigénesis. En la siguiente década, la investigación sobre las relaciones entre los procesos inflamatorios y la patogénesis del cáncer ha tomado importancia, siendo cada vez más evidentes los efectos de las células inmunes sobre la progresión neoplásica. De esta manera, la inflamación puede contribuir suministrando factores de crecimiento que favorecen la proliferación, factores anti-apoptóticos que favorecen la sobrevida, enzimas remodeladoras de la matriz extracelular que favorecen la angiogénesis, invasión y metástasis y señales que promueven la transición epitelio-mesenguimal (Hanahan y Weinberg 2011). Es importante destacar que en algunos casos la inflamación es evidente en las primeras etapas de la progresión neoplásica y que es capaz de promover la evolución de neoplasias incipientes a tumores francamente establecidos (Qian y Pollard 2010). Además, las células inflamatorias pueden liberar especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son altamente mutagénicas en las células cancerígenas adyacentes, acelerando su evolución hacia estados de mayor malignidad (Grivennikov et al. 2010). Más aún, el estrés oxidativo provoca la generación de un estroma reactivo, favoreciendo la progresión tumoral (Josson et al. 2010).

CAPÍTULO II: ANGIOGÉNESIS

II.1 Generalidades

Pequeños organismos, como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* o los gusanos *C. elegans*, carecen de un sistema vascular porque el oxígeno puede difundir desde el ambiente a todas las partes de sus cuerpos. A diferencia de éstos, los organismos superiores necesitan un sistema para el transporte de oxígeno y nutrientes, ya que estas sustancias no se pueden distribuir por difusión simple. Por lo tanto, el establecimiento del sistema vascular fue esencial en la evolución para aquellos organismos donde los límites de la difusión del oxígeno eran superados.

Los vasos sanguíneos funcionales constituyen la base de la homeostasis de los tejidos, con el suministro de oxígeno y nutrientes y la eliminación de los productos de degradación del metabolismo. Durante el desarrollo embrionario, las células progenitoras endoteliales (EPCs) se dividen y forman una red vascular en un proceso llamado "vasculogénesis". A continuación, la red se expande por la brotación de nuevos vasos a partir de otros pre-existentes en un proceso llamado "angiogénesis". No sólo durante el desarrollo embrionario, sino también en el crecimiento del organismo, en la cicatrización de las heridas y en el ciclo reproductivo femenino, la angiogénesis es un fenómeno normal. Sin embargo, es también un proceso fundamental en la transformación maligna durante el crecimiento tumoral. Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren nutrientes y oxígeno y también poder evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. De esta manera, la neovasculatura asociada al tumor cumple estas necesidades. Es así que durante la progresión tumoral, la angiogénesis está constantemente activada para favorecer el crecimiento neoplásico (Gueron et al. 2011).

Los vasos sanguíneos que se producen en los tumores por la activación crónica de la angiogénesis suelen ser aberrantes, estando marcados por la rápida velocidad en que se forman, siendo distorsionados, con excesiva ramificación, un flujo de sangre errático y presentan microhemorragias, permeabilidad y niveles anormales en la proliferación y apoptosis de las células endoteliales (Fig. 4).





Datos clínicos claramente indican una correlación entre la angiogénesis y la agresividad, el crecimiento y la diseminación tumoral. Históricamente, la angiogénesis era considerada sólo importante cuando los tumores macroscópicos ya habían crecido, pero los datos posteriores indicaron que también contribuye a la fase microscópica premaligna de la progresión neoplásica (Huss *et al.* 2001). Los primeros eventos moleculares que dictaminan el encendido del "switch angiogénico" no se conocen en el PCa, probablemente porque ocurren antes que pueda establecerse el diagnóstico clínico de la enfermedad (Huss *et al.* 2001).

II.2 Mecanismos de la angiogénesis tumoral

Se ha puesto especial interés en investigar las vías por las cuales los tumores adquieren su propio aporte sanguíneo. En la actualidad se proponen distintos mecanismos: la vasculogénesis, que involucra la formación de nuevos vasos a partir de las células progenitoras endoteliales las cuales se reclutan de la matriz ósea o residen en las paredes vasculares; la intususcepción, que implica la remodelación y expansión de los vasos por la inserción de columnas de tejido intersticial en el lumen de vasos sanguíneos pre-existentes; la brotación, a partir de vasos pre-existentes se

forman nuevos sanguíneos; la co-opción, donde las células tumorales crecen alrededor de los vasos sanguíneos pre-existentes; el mimetismo vascular, donde las células cancerígenas imitan a las células endoteliales con capacidad de conducir fluidos como la sangre; y por último, la diferenciación a partir de células madres tumorales a células endoteliales (Jain y Carmeliet 2012) (Fig. 5).



Figura 5. Tipos de angiogénesis. Adaptado de (Jain y Carmeliet 2012).

Por razones históricas y actualmente por conveniencia, el término "angiogénesis" es utilizado para describir todos estos métodos de formación de vasos sanguíneos en los tumores.

II.3 El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y sus receptores (VEGFR)

El proceso de angiogénesis se inicia cuando las células están expuestas a una baja presión de oxígeno y el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) desencadena una respuesta a esta condición. HIF-1 α es un factor de transcripión que se estabiliza en condiciones de hipoxia y activa la transcripción de determinados genes, incluyendo al factor de crecimiento vascular endotelial tipo A (VEGF-A), el cual posee un rol crucial en la angiogénesis y en el mantenimiento de la vasculatura.

VEGF-A forma parte de la familia VEGF, la cual comprende también los factores de crecimiento VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, el homólogo viral VEGF-E y el factor de crecimiento placentario (PIGF), todos estructuralmente relacionados. Estos factores de crecimiento se unen y señalizan mediante receptores, VEGFR, los cuales tienen siete dominios tipo inmunoglobulina en la región extracelular, una sola región transmembrana y un dominio tirosina quinasa (Shibuya *et al.* 1990; Terman *et al.* 1991; Berra *et al.* 2000). Por unión del ligando, el receptor se fosforila y desencadena la activación de varias moléculas de señalización (Cross y Claesson-Welsh 2001). Dichos ligandos se unen a las distintos miembros de VEGFR con diferente afinidad y selectividad: VEGF-A se une a VEGFR1 (antes llamado Flt-1) y VEGFR2 (antes llamado KDR/Flk-1); PIGF y VEGF-B a VEGFR1; VEGF-C y VEGF-D a VEGFR3 (antes llamado Flt-4) y, dependiendo de la especie, con menor afinidad a VEGFR2 (Fig. 6).





Los VEGFR pueden participar en varias funciones biológicas, incluyendo la supervivencia celular, la migración y la diferenciación, además de estar involucrados en la ramificación, estabilización y permeabilidad de los vasos sanguíneos.

Los VEGFR1 y VEGFR2 se expresan en todas las células endoteliales del adulto excepto en las del cerebro. La activación de VEGFR2 es necesaria y suficiente para la angiogénesis mediada por VEGF-A. VEGFR1 también se expresa en células madre hematopoyéticas, en células del músculo liso y en monocitos. Si bien no se

conoce exactamente la contribución de VEGFR1 en la angiogénesis, se ha demostrado que heterodimeriza con VEGFR2 y se une a VEGF-B y PIGF, lo que podría contribuir a la formación de nuevos vasos sanguíneos.

VEGFR3 se expresa en células endoteliales linfáticas y la unión de sus ligandos cumple un rol importante en la linfoangiogénesis.

Los otros tipos de receptores de la familia de VEGFR son neuropilin-1 (NP-1) y neuropilin-2 (NP-2) y no pertecen a la familia de receptores tipo tirosina quinasa. Se sugiere que estos funcionan como co-receptores de algunos subtipos e isoformas de VEGF (Soker *et al.* 1998; Gluzman-Poltorak *et al.* 2000).

II.4 Otros factores involucrados en la regulación

Hay muchas evidencias que indican que la angiogénesis se regula tanto por factores positivos (pro-angiogénicos) como por factores negativos (anti-angiogénicos). Por ejemplo, las señales pro-angiogénicas río abajo de la señalización de VEGF y angiotensina-2 pueden ser compensadas por factores anti-angiogénicos como VEGFR1 soluble (sVEGFR1), trombospondinas y semaforinas.

Las células tumorales expresan el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y una variedad de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo, el factor de necrosis tumoral-α, TNF-α) las cuales estimulan la proliferación de las células endoteliales. Además, estas últimas células pueden ser estimuladas por los fibroblastos asociados al tumor y por las células derivadas de la médula ósea, como también por un microambiente hipóxico y por la presencia de ROS (Berz y Wanebo 2011). Se demostró que la inhibición de la actividad del factor de transcripción nuclear κappa B (NF-κB, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) en células de PCa suprime la angiogénesis, invasión y migración debido a que se inhibe la expresión de sus genes blancos como el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), la metaloproteinasa 9 (MMP9) y VEGF (Kong *et al.* 2007).

En la próstata normal y en los tumores dependientes de andrógenos, la vasculatura está controlada por los andrógenos y la castración resulta en la regresión vascular (Stewart *et al.* 2001; Colombel *et al.* 2005). Esto probablemente sea un efecto

indirecto debido a la regulación por los andrógenos de factores pro y anti angiogénicos (VEGF y trombospondina-1, respectivamente) (Stewart *et al.* 2001; Colombel *et al.* 2005). Un aumento de la densidad de los vasos sanguíneos está asociado con la progresión del PCa independiente de andrógenos y con la metástasis (Weidner *et al.* 1993). Esto implica que los tumores independientes de andrógenos son capaces de inducir angiogénesis efectivamente, incluso en ausencia de las hormonas. Un *array* de genes específico para angiogénesis reveló una expresión disminuída de ADAMTS1 (desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina 1) respecto a la línea parental (sensible a andrógenos). Además se comprobó mediante estudios *in vivo* que ADAMTS1 se correlacionaba negativamente con la densidad de la microvasculatura (Gustavsson *et al.* 2008).

El microambiente tumoral contiene una cantidad excesiva de factores proangiogénicos y el desbalance entre los mediadores pro y anti angiogénicos crea una vasculatura con defectos morfológicos que promueve las metástasis hematógenas, fuertemente asociadas con un pobre pronóstico en pacientes con PCa (Hall K. y Ran 2010). Más aún, varias quimioquinas se encuentran elevadas en este tipo de tumores. Además, compuestos altamente reactivos producidos durante la inflamación pueden causar daño al ADN o reaccionar con otros componentes celulares favoreciendo el proceso angiogénico (De Marzo *et al.* 2007).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en base al concepto de Judah Folkman (Folkman 1971), donde la capacidad angiogénica controla el crecimiento tumoral, muchas terapias apuntan a la inhibición de la angiogénesis en los pacientes con cáncer. Sin embargo, esta estrategia terapéutica en muchas ocasiones resulta no efectiva, debido a una serie de mecanismos de resistencia generados por el tumor como la amplificación de genes pro-angiogénicos, el escape hacia diferentes vías de angiogénesis, la expresión de múltiples factores pro-angiogénicos secretados por las células cancerígenas, por las células del estroma y por las células reclutadas de la médula ósea (Fig. 7) (Loges *et al.* 2010). La implementación en la práctica clínica de los exitosos hallazgos pre-clínicos de la terapia anti-angiogénica para el tratamiento de pacientes con cáncer resultó más desafiante de lo que se podía preveer. Por ejemplo, bevacizumab, un anticuerpo bloqueante anti VEGF-A, mejora los resultados clínicos solamente cuando se administra combinado con quimioterapia, en parte

debido a que normaliza los vasos sanguíneos residuales en el tumor y mejora la llegada de la droga a las células tumorales {Jain, 2005 #721.



Figura 7. Mecanismos de resistencia a drogas anti-angiogénicas. Panel de arriba a la *izquierda:* las células cancerígenas amplifican genes pro-angiogénicos en sus genomas, produciendo niveles mayores de expresión del gen blanco. Panel de arriba a la derecha: los tumores pueden utilizar distintos mecanismos de angiogénesis. Panel de abajo a la derecha: los tumores reclutan células desde la médula ósea las cuales secretan potentes mediadores angiogénicos. Panel de abajo a la izquierda: en los tumores, tanto las células cancerígenas como las células del estroma, expresan múltiples factores pro-angiogénicos (Loges *et al.* 2010).

CAPÍTULO III: METÁSTASIS ÓSEA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

III. 1 Tejido óseo: Generalidades

El esqueleto humano es el conjunto de piezas óseas organizadas que proporciona al cuerpo una firme estructura multifuncional (locomoción, protección, contención, sustento, *etc.*). Los huesos se pueden clasificar según su función, posición, forma, tamaño y estructura. Según su localización se clasifica el esqueleto axial (huesos del cráneo, la columna vertebral, el esternón y las costillas) y el esqueleto apendicular (huesos de la cintura escapular, cintura pélvica y extremidades). Según su forma se distinguen los huesos planos (cráneo, esternón, pelvis y costillas), los huesos tubulares largos (extremidades) y cortos (falanges, metacarpianos y metatarsianos), los huesos irregulares (de la cara y la columna vertebral), huesos sesaimodeos (se desarrollan en los tendones específicos, por ejemplo la rótula) y los huesos accesorios (se generan en centros de osificación adicionales o que no lograron fusionarse con las principales partes durante el desarrollo). Según su tamaño se clasifican en largos (con forma tubular, un eje hueco y dos extremos) y cortos (con forma cuboidal).

El tejido óseo se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión. Se puede distinguir: a) el hueso compacto, denso, cortical o tejido óseo secundario, el cual es caparazón de muchos huesos y posee fibras de colágeno que se disponen en láminas concéntricas alrededor de un conducto vascular formando un canal haversiano; y b) el hueso esponjoso, trabecular, poroso o tejido óseo primario, el cual posee fibras de colágeno que se disponen al azar tomando el aspecto de una esponja por sus numerosas cavidades. El hueso trabecular es metabólicamente más activo que el hueso compacto debido a su mayor superficie de remodelación.

Según su origen durante el desarrollo, los huesos se clasifican en huesos intramembranosos, que se forman a partir de la transformación directa del mesénquima condensado (por ejemplo, los huesos planos) y huesos endocondrales, que se forman mediante la sustitución del cartílago (por ejemplo, los huesos largos).

La estructura básica de un hueso largo se puede dividir en varias regiones:

- Epífisis: Es la región entre la placa de crecimiento y el extremo del hueso, cubierto por cartílago articular. En una persona adulta, la epífisis consiste en abundante hueso trabecular y una fina capa de hueso cortical. Algunos tumores óseos, como el condroblastoma, tienen una fuerte predilección para crecer en esta región.
- Metáfisis: Es la región de unión entre la placa de crecimiento y la diáfisis. Contiene abundante hueso trabecular, y un adelgazamiento en el hueso cortical respecto a la diáfisis. Esta región es un sitio común para muchos tumores óseos primarios.
- Diáfisis: Es el eje de los huesos largos y está localizada entre las metáfisis. Está compuesta principalmente por hueso cortical compacto. Posee un canal medular que contiene la médula y una pequeña cantidad de hueso trabecular.
- Placa de crecimiento: Separa la epífisis de la metáfisis. Es la zona de osificación endocondral en un hueso en crecimiento activo. En un hueso adulto ya desarrollado sólo queda su cicatriz.

El endostio reviste todas las superficies internas del hueso, incluyendo los espacios medulares y conductos vasculares. El periostio es la membrana externa que rodea las partes de los huesos que no están cubiertas por los cartílagos. Tiene dos capas: la externa, que está compuesta por tejido conectivo denso e irregular que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios y la interna u osteogénica que contiene fibras elásticas, vasos sanguíneas y diferentes tipos de células óseas.

Se le llama sistema de Havers (u osteona) a la unidad fisiológica y anatómica del tejido óseo compacto. Está formado por un canal central y por varias laminillas de colágeno a su alrededor, las cuales contienen lagunas con osteocitos. Por el conducto central, llamado conducto de Havers, corren vasos sanguíneos y nervios, encargados de irrigar y enervar las células del tejido óseo compacto. Esto se logra a través de los canalículos calcóforos (disposición radial) que comunican desde el conducto de Havers hacia las lagunas más cercanas del tejido, donde se encuentran las células óseas. Cada osteocito introduce sus prolongaciones citoplasmáticas en dichos canalículos, para contactarse con otros osteocitos y con el conducto de Havers. Los conductos de Volkmann atraviesan totalmente las osteonas poniendo

en contacto los conductos de Havers entre sí. No están rodeados por laminillas y por ellos penetran los vasos desde el periostio y el canal medular conectándolos con las osteonas.

La figura 8 grafica las distintas partes del hueso recién caracterizadas.



El tejido óseo tiene un alto suministro vascular, sin embargo éste varía según los diferentes tipos de hueso, siendo los que contienen médula ósea roja los más vascularizados, especialmente en la zona de la metáfisis.

La inervación es más abundante en los extremos de los huesos largos (en la zona de la articulación), en las vértebras y en los huesos planos grandes. Los nervios del periostio son la mayoría sensoriales, especialmente transmisores del dolor. Acompañando a las arterias dentro de los huesos, se encuentran los nervios vasomotores, los cuales controlan la vaso-constricción y la dilatación.

III.1.1 Principales poblaciones celulares

III.1.1.1 Osteoblastos

Provienen de las células madre mesenquimales, las cuales también pueden diferenciarse a otros tipos celulares incluyendo adipocitos y condrocitos {Pittenger, 1999 #723}. Son responsables de la formación de hueso ya que sintetizan y secretan proteínas para formar el osteoide, el cual luego será mineralizado y se convertirá en hueso maduro.

La diferenciación de los osteoblastos es contralada por vías de señalización complejas que regulan la expresión de genes tanto a nivel transcripcional como traduccional. El factor de transcripción 2 relacionado a runt (Runx-2 o Cbfa1) es un factor de transcripción crucial para la diferenciación de estas células. Trabajos realizados con ratones con mutaciones en este gen demostraron que los animales mueren al nacer y sus huesos mostraron ausencia de osificación (Komori *et al.* 1997). La fosfatasa alcalina (ALP) es uno de los primeros marcadores de diferenciación que expresan los osteoblastos inmaduros. Los marcadores de diferenciación tardíos son los responsables de la deposición de la matriz ósea. Las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) juegan un rol importante en la diferenciación, al igual que otros factores como PIDGF, FGF y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), ya que estimulan el crecimiento y diferenciación de estas células (Roodman 2004).

La vía Wnt/ β -catenina (también llamada vía canónica) es crítica para la diferenciación, proliferación y síntesis de la matriz ósea en los osteoblastos. Cuando esta vía está apagada por ausencia de Wnt (del inglés *Int* y *Wg*, *wingless*) o por la inhibición de la unión de Wnt a sus receptores en la superficie celular, β -catenina es enviada a la degradación por el complejo formado por las proteínas: APC (del inglés *adenamatous polyposis coli*), axina y glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β) en donde las dos primeras proteínas actúan como proteínas *scaffold* (de andamiaje) para facilitar la fosforilación de β -catenina por GSK-3 β , marcándola para la ubiquitinización y posterior degradación mediante el proteosoma. Sin embargo, esta vía se encuentra activa cuando una proteína de la familia de Wnt se une al receptor Frizzled y a su co-receptor LRP5 o LRP6. A partir de ahí se activa la proteína

CAPÍTULO III: METÁSTASIS ÓSEA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Disheveled, la cual interrumpirá el complejo formado por las proteínas APC, axina y GSK-3β. De esta manera, β-catenina no será marcada para la degradación y se acumula en el citoplasma lo que facilitará posteriormente su tanslocación nuclear. Una vez en el núcleo, cumple un rol de co-factor de transcripción uniéndose a TCF/Lef (factor de transcripción de células T / factor de expresión tardío) activando la transcripción de sus genes blanco (Krishnan *et al.* 2006); aunque también está reportado que puede unirse a otros factores de transcripción. Los niveles de β-catenina se encuentran elevados en células del linage osteoblástico y la pérdida de su expresión resulta en una disminución en la deposición de hueso (Day *et al.* 2005). Más aún, la activación de la vía Wnt/β-catenina inhibe la diferenciación a adipocitos. Dickkopf-1 (DKK-1) es un potente inhibidor de la vía canónica ya que se une a LRP5 o LRP6 y la formación de los complejos entre DKK-1 y los receptores favorece su internalización y degradación y, de esta manera, disminuye el número de receptores de Wnt disponibles para su señalización (Fig. 9) (Mao *et al.* 2002).



Figura 9. Vía Wnt/β-catenina. *Panel izquierdo:* vía apagada. *Panel derecho:* vía encendida. APC: adenamatous polyposis coli; β-cat: β-catenina; CBP: proteína de unión a CREB; CK: quinasa caseína; Co-rep: co-represor; DSH: disheveled; FZD: frizzled; GBP: proteína de unión a GSK; GSK: glucógeno sintasa quinasa; LEF: factor *enhancer* linfoideo; P: fósforo; TCF: factor de transcripción de células T (Hall C. L. *et al.* 2006).

Los osteoblastos son además necesarios para la diferenciación de los osteoclastos, las células responsables de la degradación del hueso. Los osteoblastos expresan el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL), el cual se une a su receptor (RANK) en la superficie de los osteoclastos favoreciendo su diferenciación y actividad. A su vez, los osteoblastos también secretan el receptor *decoy* de RANKL, osteoprogeterina (OPG), que compite con RANK por la unión a RANKL, disminuyendo los niveles de RANKL disponibles para la activación de los osteoclastos. Del balance entre la expresión de RANKL y OPG en los osteoblastos se determinará el efecto neto sobre los osteoclastos (Fig. 10) (Glass y Karsenty 2007).



Figura 10. Rol de los osteoblastos y osteoclastos en la remodelación ósea. Los osteoblastos regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos a través de la expresión de citoquinas, como RANKL y OPG. Entre otros factores que estimulan la diferenciación y actividad de los osteoblastos se encuentran BMPs, TGF- β , IGF, FGF, PDGF, VEGF y Wnt. DKK-1 es antagonista de Wnt y bloquea la vía canónica (Logothetis y Lin 2005).

Una vez terminada la formación ósea, los osteoblastos pueden ser "embebidos" por la matriz ósea y convertirse en osteocitos, sufrir apoptosis o permanecer inactivos en la superficie del hueso (Dallas y Bonewald 2010).

III.1.1.2 Osteocitos

Son las células más abundantes del hueso. Se han identificado varios pasos necesarios para la transición de osteoblastos a osteocitos, en los cuales una sub-

población de osteoblastos adyacentes a la superficie del hueso comienza a producir menos matriz respecto a las células adyacentes. De esta manera, quedan "enterrados vivos" bajo la matriz producida por los osteoblastos vecinos (Franz-Odendaal *et al.* 2006). Sin embargo, Karsdal y col. (Karsdal *et al.* 2004) propusieron que la osteocitogénesis es un proceso activo que requiere la capacidad de clivar colágeno y otras proteínas de la matriz.

Dentro del hueso, la población de osteocitos es heterogénea: los más jóvenes expresan la proteína E11/gp38, la cual se postula que regula la dinámica del citoesqueleto de actina, mientras que los maduros expresan esclerotina, producto del gen SOST, que inhibe la formación de hueso al unirse a LRP5 o LRP6 apagando así la vía Wnt/β-catenina (Dallas y Bonewald 2010). Algunos autores sugieren que los osteocitos tienen la capacidad de actuar como mecanosensores y remodelar la matriz adyacente a la cavidad de la laguna donde se encuentran (Tatsumi *et al.* 2007; Bonewald y Johnson 2008). Por el momento se desconoce si la diferenciación a osteocitos es un proceso irreversible o si conservan la capacidad de revertir a osteoblastos o a otros linajes, como adipocitos o condrocitos.

III.1.1.3 Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de células madre hematopoyéticas (Suda *et al.* 1992) y responsables de la resorción ósea. Se localizan en el endostio y en el periostio y se caracterizan por tener dos formas funcionales. Una es cuando migran desde la médula ósea hacia el sitio de resorción y presentan una forma aplanada y no polarizada. La otra es cuando degradan hueso, donde adoptan una forma polarizada y se distinguen tres dominios de membrana: un borde con forma de "cepillo", una zona de sellado y un dominio secretor (Li *Z. et al.* 2006). Cuando se inicia la resorción ósea, los osteoclastos liberan desde el dominio con forma de "cepillo" vesículas con ácido clorhídrico y proteasas, las cuales disuelven los cristales de hidroxiapatita y a su vez las proteasas degradan la matriz orgánica formando una laguna de resorción. Los productos de la degradación son endocitados, transportados a través de la célula y

exocitados en el dominio secretor, permitiéndoles así degradar grandes cantidades de hueso sin alejarse de la superficie de resorción (Vaananen *et al.* 2000).

Los factores necesarios y suficientes para la osteoclastogénesis son el factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1, también llamado M-CSF) y RANKL. CSF-1 es producido por los osteoblastos y por las células del estroma y promueve la sobrevida y la proliferación en estadíos tempranos de la diferenciación. RANKL se expresa en los osteoblastos, los linfocitos T y las células endoteliales. Estimula la proliferación iniciada por CSF-1 y las células comienzan a expresar la fosfatasa ácida resistente al tartrato, un marcador de diferenciación de los osteoclastos. Luego las células se fusionan y comienzan a expresar otros marcadores de diferenciación como el receptor de calcitonina y la catepsina K (Kular *et al.* 2012).

III.1.2 Remodelación ósea

El hueso es un tejido dinámico que está en constante remodelación. Durante este proceso, la resorción mediada por los osteoclastos es seguida de la formación de hueso por los osteoblastos y así la laguna de resorción se completa hasta su nivel original. Si bien se lo define como un ciclo, se pueden distinguir las fases de iniciación, transición y terminación. La fase de iniciación incluye el reclutamiento de precursores de osteoclastos, su diferenciación y activación. El reclutamiento es dirigido principalmente por células del estroma y por osteoblastos adyacentes a la línea de formación de hueso al expresar, entre otros factores, la quimioquina CCL2 (también llamada proteína quimioatractante de monocitos, MCP-1) y el factor derivado del estroma-1 (SDF-1). Como ya se describió, para la osteoclastogénesis y su activación es esencial la unión de RANKL con RANK en la superficie de los osteoclastos. Muchos factores pueden aumentar este efecto, como por ejemplo la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP), TNF-α y la interleuquina-1β (IL-1β) entre otros. Al degradar la matriz ósea se liberan factores de crecimiento que se encuentran inmovilizados, como TGF- β , BMPs y el factor de crecimiento tipo insulina (IGF), los cuales activarán a los osteoblastos dando comienzo a la fase de transición. En esta fase los osteoblastos comienzan a expresar OPG. En la fase terminal estas células producen hueso nuevo (osteoide), el cual se mineraliza y los
CAPÍTULO III: METÁSTASIS ÓSEA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

osteoblastos entran en un estado de quiescencia. Los osteocitos producen esclerotina, la cual suprime la formación de hueso y posiblemente contribuye a inactivar a los osteoblastos. El proceso de finalización es más largo ya que la síntesis de hueso nuevo es más lenta que la resorción (Fig. 11) (Matsuo y Irie 2008).



Figura 11. Fases en la remodelación ósea. (Matsuo y Irie 2008)

III.2 Tropismo de los tumores prostáticos por el hueso

Las metástasis óseas son comunes en varios cánceres incluyendo el de pulmón, hígado, tiroides, mama y próstata. Sin embargo, el mimetismo de las células de próstata por el hueso es sorprendente, siendo en este tipo de tumores donde en la mayoría de los casos el hueso aparece como el único sitio de metástasis.

En 1889 Stephen Paget analizó los informes de las autopsias de 735 pacientes que murieron por cáncer de mama y observó que las células cancerígenas no se dispersaban al azar en los distintos órganos. Así propuso la hipótesis de "la semilla y el suelo" en la cual postuló que las células tumorales (las "semillas") se diseminaban por la vasculatura hacia todo el cuerpo pero sólo formaban metástasis en los órganos cuyo microambiente ofrecía ventajas para el crecimiento de las células tumorales (el "suelo" fértil) (Paget 1989).

La participación del esqueleto en la metastásis del PCa ocurre de manera predecible, las lesiones tienden a aparecer primero en el esqueleto axial y luego en

el esqueleto apendicular (Jacobs S. C. 1983). Afecta con más frecuencia a los huesos largos, las costillas y las vértebras y más comúnmente cerca de la metáfisis trabecular. Se considera que esta forma de distribución está influenciada, en parte, por la disminución en el flujo sanguíneo en la zona de la médula cercana a la metáfisis, donde el aumento de la presión sinusoidal en los vasos junto a la presencia de quimioquinas atractantes, favorecen la adhesión de las células metastásicas y su subsecuente extravasación.

Históricamente las metástasis se han caracterizado como osteolíticas u osteoblásticas según su apariencia en las radiografías. La metástasis osteolítica se caracteriza por la destrucción del hueso debido al aumento de la actividad de los osteoclastos, mientras que la osteoblástica se caracteriza por la sobreproducción de hueso mediada por los osteoblastos activados. En la actualidad esta clasificación representa los extremos de un proceso continuo en la desregulación de la remodelación ósea. Es decir, la mayoría de los pacientes con metástasis ósea presentan ambos fenotipos y de manera anormal.

Entre las células de PCa y las células del microambiente de la metástasis se generan *loops* regulatorios de retro-alimentación, los cuales interrumpen la homeostasis del hueso mantenida entre los osteoblastos, los osteoclastos, las células endoteliales y otros elementos del estroma (Fig. 12). Así se produce un desbalance en la tasa de degradación y formación de hueso, favoreciéndose la generación de tejido óseo inmaduro, de mala calidad y susceptible a la fractura. Esto es responsable de la apariencia esclerótica medida histomorfométricamente (Clarke *et al.* 1991) y observada en estudios radiológicos realizados en más del 90% de los pacientes con metástasis avanzada de PCa (Cook y Watson 1968).



Figura 12. Círculo vicioso entre células tumorales y el hueso. Las células tumorales liberan factores que estimulan la diferenciación y proliferación en los osteoblastos. Al activarse los osteoblastos producen hueso y expresan factores de crecimiento que se depositan en la matriz ósea y en el microambiente de la metástasis. Las células tumorales también producen factores osteolíticos los cuales pueden actuar vía la inducción de RANKL en los osteoblastos. Como consecuencia de la actividad de los osteoclastos se liberan factores de crecimiento que estaban inmovilizados en la matriz ósea enriqueciendo aún más el microambiente de las células tumorales (Guise T. A. *et al.* 2006).

La aceptación general del concepto que el PCa sólo producía lesiones osteoblásticas, demoró durante años el desarrollo de los estudios que demostraron que también ocurría la destrucción del hueso. Esto fue inicialmente sugerido por estudios histológicos (Galasko 1976) y posteriormente confirmado mediante mediciones histomorfométricas en biopsias de metástasis óseas escleróticas provenientes de carcinomas de próstata (Charhon *et al.* 1983) y ensayos bioquímicos para la determinación de los productos de la resorción ósea en muestras humanas (Urwin *et al.* 1985).

La paradoja del aumento del volumen del hueso en presencia de resorción ósea se explicó mediante estudios histomorfométricos, donde se demostró que la destrucción del hueso estaba acompañada por la formación de hueso anormal inmaduro, el cual luego era sometido a la resorción (Clarke *et al.* 1991). Muchas veces este proceso resulta en el aumento del volumen del hueso junto con la destrucción del esqueleto.

Si bien las lesiones osteoblásticas se presentan principalmente en PCa, en otros tipos de cánceres también se han reportado, como por ejemplo cáncer de páncreas, colon y cervical (Joffe y Antonioli 1978; Paling y Pope 1988; George y Lai 1995).

III.2.1 Mecanismos de la progresión al hueso

La metástasis al hueso ocurre en los estadíos más avanzados del PCa y no es un evento aleatorio, sino un proceso complejo de múltiples pasos que depende de factores anatómicos, de las propiedades de las células tumorales y del microambiente óseo.

La cascada metastásica implica la secuencia de eventos discretos que comienzan con el desprendimiento de las células cancerígenas desde el tumor primario, la invasión de tejidos adyacentes y la posterior entrada primero en los capilares de la vasculatura del tumor y luego en el sistema circulatorio y linfático general (Mundy 2002). Una vez en circulación la célula tumoral debe sobrepasar distintos tipos de estrés, incluyendo la evasión del sistema inmune. Luego de su detención en el lecho capilar y posterior extravasación, la célula tumoral colabora en la modificación del microambiente para favorecer su crecimiento en este nuevo sitio (Fig. 13).



Ampliando el concepto de Paget de "la semilla y el suelo", David Lynch y col. (Psaila y Lyden 2009) propusieron el modelo del nicho pre-metastásico, que propone la formación de un microambiente favorable antes de la llegada de las células tumorales. Estos facilitan la formación de micrometástasis y su transición a macrometástasis.

Las células endoteliales de los distintos tipos de tejidos que sufren metástasis expresan lectinas e integrinas específicas, a las cuales se unen las células tumorales con distinta preferencia. En el caso del PCa, la adhesión a las células endoteliales de la médula ósea es mediada por la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Sun Y. X. *et al.* 2007). En la extravasación intervienen enzimas proteolíticas como MMP9 y uPA, las cuales promueven la degradación y aumentan la permeabilidad de la membrana basal (Pienta y Loberg 2005).

Las células tumorales son atraídas preferentemente hacia los sitios de metástasis a través de interacciones específicas con las células del nicho que van a colonizar. Por ejemplo, las células tumorales que metastatizan a hueso expresan el receptor de quimioquinas CXCR4 (receptor tipo 4 de quimioquinas con motivo CXC) en su membrana, el cual responde a las señales quimioatractantes generadas por su ligando SDF-1, también llamado CXCL12. Este factor es secretado en el microambiente del hueso por diferentes células: los osteoblastos, los fibroblastos, por las células madre hematopoyéticas y las endoteliales en la médula ósea, y en niveles aún mayores en el nicho pre-metastásico (Sun Y. X. *et al.* 2007). A su vez, SDF-1 también atrae células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea y células progenitoras endoteliales al sitio metastásico (Kaplan *et al.* 2006). Más aún, la expresión de $\alpha_v\beta_3$ en las células metastásicas del PCa facilita la unión a proteínas de la matriz ósea, como colágeno, fibronectina, vitronectina y osteopontina (OPN), permitiéndoles a las células tumorales crecer dentro del hueso (Sun Y. X. *et al.* 2007).

Las células tumorales y las células óseas utilizan en los sitios de colonización las mismas vías de señalización y factores de transcripción y así facilitan sus interacciones para crecer en estos nuevos ambientes. Este fenómeno se ha llamado "osteomimetismo" de las células tumorales (Koeneman *et al.* 1999).

39

El hueso es una fuente de factores de crecimiento los cuales son liberados durante la resorción ósea mediada por los osteoclastos. El 90% de las proteínas de la matriz del hueso está constituido por colágeno y el restante 10% por IGFs, TGF- β , FGF, PDGF y BMPs (Pratap *et al.* 2005). Si bien se los reconoce como factores de crecimiento tumoral, no necesariamente actúan sobre la proliferación celular. Pueden promover la angiogénesis de manera indirecta e incrementar la producción de factores osteolíticos y osteoblásticos, favoreciendo la remodelación ósea y el crecimiento tumoral. A su vez, las propiedades físicas en la matriz ósea, como el bajo contenido de oxígeno, el pH ácido y la alta concentración de calcio extracelular, generan un microambiente favorable para el crecimiento del tumor.

Una vez establecidas las células de PCa en el sitio secundario, comienzan a crecer en el espacio de la médula ósea en estrecha asociación con la superficie del hueso, donde se perturba en forma local el microambiente de este tejido, generando un aumento de la remodelación ósea y favoreciendo el crecimiento de las células tumorales.

Se postula que las metástasis óseas comienzan con un perfil osteolítico, lo que dejará espacio para que se dividan las células tumorales y se establezca el crecimiento secundario. Las interacciones subsiguientes de las células cancerígenas con el microambiente determinarán si el balance neto de la remodelación ósea conduce a la resorción o a la formación de hueso nuevo (Fig. 14).



Figura 14. Modelo integrado de la metástasis al hueso del PCa. Cuando las células de PCa llegan al hueso producen factores pro-osteolíticos (por ejemplo, RANKL, IL-6, PTHrP, DKK-1). A causa de la resorción ósea se liberan factores de crecimiento que estaban inmobilizados en la matriz alterando el microambiente y el fenotipo de las células tumorales. Las células de PCa comienzan a expresar factores osteoblásticos (por ejemplo, BMPs, PTHrP, OPG) y disminuyen la expresión de DKK-1. De esta manera, ocurre una transición de una metástasis osteolítica hacia una osteoblástica. A medida que las células de PCa continúan creciendo el microambiente se torna hipóxico y las células tumorales comienzan a expresar VEGF y ET-1, los cuales tienen también actividad osteoblástica resultando en una marcada formación de hueso (Hall *et al.* 2006).

III.2.2 Tipos de metástasis óseas

III.2.2.1 Metástasis osteolítica

La metástasis osteolítica ocurre cuando las células tumorales inducen la actividad de los osteoclastos conjuntamente con la reducción de la función de los osteoblastos y, de esta manera, desacoplan la formación de hueso tras su degradación. La destrucción ósea es llevada a cabo por los osteoclastos y no por las células tumorales (Taube *et al.* 1994).

Las células tumorales liberan factores que promueven la activación de los osteoblastos. Los osteoblastos activados estimulan la síntesis de hueso y secretan factores para la maduración de los osteoclastos, produciendo la consiguiente resorción ósea. Esto último resultará en la liberación y activación de factores de crecimiento que se encontraban inmobilizados en la matriz ósea promoviendo el crecimiento de las células tumorales. Esta interacción recíproca entre las células

tumorales y el microambiente del hueso es vital para el crecimiento de las metástasis óseas y da por resultado el llamado "círculo vicioso" (Fig. 15) (Mundy 2002).



Figura 15. Círculo vicioso en la metástasis osteolítica. Las células tumorales secretan PTHrP el cual estimula a los osteoblastos (OBL) a producir RANKL y OPG. Los osteoclastos (OCL) activados degradan la matriz del hueso liberando los factores de crecimiento que se encontraban inmovilizados, incluyendo a TGF-β el cual estimula la expresión de PTHrP en las células cancerígenas volviendo a empezar el círculo. Las células de PCa también expresan GM-CSF (CSF-1) el cual estimula la diferenciación de las células de la médula ósea hacia osteoclastos (Steeg y Theodorescu 2008).

Si bien las lesiones en las metástasis osteolíticas son mediadas por la resorción ósea promovida por los osteoclastos, en las terapias donde se bloquea la actividad de dichas células no se revierte la resorción ósea, indicando que las células tumorales producen una señalización alterada en los osteoblastos, los cuales también cumplen un rol en la metástasis osteolítica (Tian *et al.* 2003).

PTHrP es uno de los mediadores más importantes de la resorción ósea en las metástasis osteolíticas. Es expresado por las células tumorales de PCa en altos niveles y en cantidades aún mayores respecto a las detectadas en las hiperplasias benignas y en la próstata normal (Asadi *et al.* 1996). Su producción exacerbada se asoció a las metástasis esqueléticas osteolíticas del PCa (Rabbani *et al.* 1999). En el cáncer de mama la expresión de este factor también es mayor (92%) en las metástasis al hueso, respecto a los tumores primarios (50%) y respecto a las metástasis no óseas (17%) (Powell *et al.* 1991). En el hueso normal es producido

por los osteoblastos y por las células del estroma. Ejerce su acción biológica cuando se une a PTHR1 en la superficie de los osteoblastos induciendo la expresión de RANKL y la disminución en los niveles de OPG lo que favorece la diferenciación de los osteoclastos. Estos últimos al degradar el hueso, liberan TGF-β de la matriz ósea y este factor estimula la expresión de PTHrP en las células cancerígenas, conduciendo nuevamente a la diferenciación de los osteoclastos y la consiguiente degradación del hueso, contribuyendo al "círculo vicioso" en la progresión de la metástasis ósea (Yin *et al.* 2005).

Otro factor que se libera cuando se degrada la matriz del hueso es IGF, el cual posee efectos mitogénicos, quimioatractantes y anti-apoptóticos en las células de PCa y en los osteoblastos (Feller *et al.* 2011).

Además de PTHrP, las células tumorales producen otros factores que estimulan la osteoclastogénesis vía RANKL o independiente de dicho factor, como IL-1 α , IL-6, IL-8, prostaglandina E₂, TNF- α y CSF-1 (Feller *et al.* 2011).

Las células cancerígenas creciendo en el hueso pueden expresar RANKL, pero aún no se ha demostrado si dicha expresión es suficiente para que las células tumorales activen la osteólisis (Zhang J. *et al.* 2001). En un modelo *in vivo* de metástasis de PCa desarrollado por Morrisey y col. (Morrissey *et al.* 2007) se demostró que la expresión de RANKL del hospedador es responsable de la osteólisis y no la producida por el tumor.

A su vez, la resorción ósea aumenta el nivel de calcio local el cual estimula el crecimiento de las células cancerígenas y la producción de PTHrP (Kingsley *et al.* 2007).

Otro mecanismo que utilizan las células tumorales para favorecer la resorción ósea es mediante la expresión del factor soluble DKK-1, inhibidor de la vía Wnt/β-catenina y, por lo tanto, regulador negativo de la formación de hueso. Hall y col. (Hall C. L. *et al.* 2005) en un modelo de metástasis al hueso, han demostrado que la inhibición de la expresión de DKK-1 en la línea celular osteolítica del PCa humano (PC3), favorece la actividad osteoblástica y, al contrario, la inducción de este factor en la línea del PCa humano C4-2B, que produce reacciones mixtas de formación y degradación de hueso, genera un perfil osteolítico.

III.2.2.1 Metástasis osteoblástica

En la metástasis osteoblástica, el balance entre la resorción y formación del hueso está inclinado a favor de este último. Cabe destacar el trabajo de Yi y col. (Yi *et al.* 2002) quienes demostraron, utilizando un modelo animal, que para el desarrollo de una metástasis osteoblástica es necesario una etapa inicial donde se degrade hueso seguido de una intensa formación ósea. De esta manera, la activación de los osteoclastos cumple un rol importante en la generación de la metástasis osteoblástica.

Las proteínas Wnt contribuyen al mecanismo por el cual las células de PCa inducen la formación de hueso, estimulando la proliferación y diferenciación de los osteoblastos y produciendo efectos autócrinos en las células tumorales (Hall C. L. et al. 2006). Las lineas celulares de PCa no solo expresan una variedad de isoformas de Wnt, sino que también los niveles de este factor están aumentados en tumores primarios de PCa respecto del tejido prostático no-neoplásico (Hall C. L. et al. 2005). La línea celular MDA PCa 2b, aislada de una metástasis osteoblástica de PCa, fue establecida en el laboratorio de la Dra. Navone (Navone et al. 1997; Navone et al. 2000). Una de sus principales características es que es sensible a los andrógenos y al crecer en el hueso de ratones SCID produce una reacción fuertemente osteoblástica. El co-cultivo de estas células con cultivos primarios de osteoblastos de ratón (PMOs) aumentó la proliferación en ambas poblaciones celulares. A su vez, estimuló la diferenciación de los PMOs. Estos autores también comprobaron que DKK-1 bloqueaba la proliferación de osteoblastos y la formación de hueso nuevo inducida por las células MDA PCa 2b. Este resultado junto al defecto en la formación de hueso en explantes de calvarias de ratones $Lrp5^{-1/2}$ (co-receptor de Wnt) tratadas con medio condicionado de MDA PCa 2b, demostraron que la reacción osteoblástica producida por dichas células de PCa era mediada por la vía Wnt/β-catenina (Li Z. G. et al. 2008d). En especímenes humanos, Wnt7b no se expresaba en próstata normal pero si en áreas de neoplasia prostática intra-epitelial (PIN) de alto grado, en tumores primarios y en metástasis óseas. Además, DKK-1 se expresaba en especímenes de metástasis osteolíticas. Así se propuso que DKK-1 determina el fenotipo de la lesión ósea provocada por el tumor (Li Z. G. et al. 2008d). Recientemente se confirmó que la acumulación nuclear de β-catenina ocurre en alrededor del 37% de las metástasis óseas de los tumores de PCa resistentes a la castración y, además, se identificó a la enzima ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2) como un blanco río abajo de β -catenina. La expresión de HAS2 y la relación entre la expresión de β -catenina y AR pueden ayudar a definir la evolución de la enfermedad en una subpoblación de hombres con PCa con metástasis óseas (Wan *et al.* 2012b).

Las células tumorales de PCa también expresan endotelina-1 (ET-1), el cual no solo tiene efectos como vasoconstrictor, sino que induce el crecimiento de los osteoblastos (Logothetis y Lin 2005; Guise T. A. *et al.* 2006). Más aún, ET-1 suprime el efecto negativo de DKK-1 sobre la vía de Wnt/β-catenina (Clines *et al.* 2007).

Otro factor relevante para predecir la progresión del PCa y el desarrollo de metástasis es TGF-β1 (Shariat *et al.* 2008) y recientemente se demostró que favorece la metástasis ósea osteoblástica en sistemas experimentales (Mishra *et al.* 2011). Se comprobó la eficacia anti-tumoral de un inhibidor específico de la quinasa del receptor-1 de TGF-β1, capaz de controlar el crecimiento de las células de PCa en el hueso y de aumentar la masa del hueso normal lo que representa un efecto colateral deseable para el tratamiento de la osteopenia o la osteoporosis secundaria a la ablación de andrógenos (Wan *et al.* 2012a).

Entre otros factores involucrados en la metástasis osteoblástica se encuentra uPA, que posee la capacidad de clivar y activar a TGF- β , permitiendo que éste regule no solo la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos sino también el crecimiento de las células cancerígenas. Otro factor es el PSA secretado por las células de PCa, el cual cliva y activa a TGF- β y a PTHrP en el extremo N-terminal y, de esta manera, no solo bloquea la resorción mediada por PTHrP sino que lo convierte en un factor estimulante para la deposición de hueso (Guise T. A. *et al.* 2006). PSA también puede clivar a IGFBP-3, la proteína de unión a IGF-1, lo que produce un aumento en los niveles de IGF-1 libre y, por lo tanto, aumento en la actividad de los osteoblastos (Mundy 2002).

Las proteínas BMPs pertenecen a la superfamilia de TGF-β y estimulan la diferenciación de los osteoblastos a través de distintos factores de transcripción, principalmente Runx-2 (McCarthy *et al.* 2000). En pacientes con PCa, la expresión de BMPs se ha correlacionado con recurrencia de la enfermedad y disminución de la sobrevida (Thomas y Hamdy 2000). Se demostró que las células de PCa expresan las proteínas BMP- 4, 6 y 7, las cuales además de tener efectos parácrinos en los

osteoblastos, también juegan un rol importante en la supervivencia y crecimiento de las células de PCa (Brubaker *et al.* 2004).

Poco se conoce acerca del mecanismo subyacente a la progresión independiente de andrógenos del PCa y varios grupos se encuentran dedicados a establecer los factores determinantes de este proceso. Así, recientemente se estableció lo que fue el primer xenotransplante de un tumor de próstata humano negativo para AR, cuyas células indujeron una reacción osteoblástica en el hueso creciendo subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, tanto castrados como salvajes. Se comprobó que FGF9 inducía la proliferación de osteoblastos y la formación de hueso nuevo y que los animales tratados con un anticuerpo neutralizante de este factor desarrollaban tumores óseos más pequeños y reducida formación de hueso. Asimismo se encontró inmunomarcación positiva para FGF9 en las células de PCa, en 24 de 56 tumores primarios humanos confinados en la glándula mientras que este patrón de inmuno-reactividad fue positivo en 25 de 25 muestras provenientes de metástasis al hueso de PCa. Estos resultados sugieren que FGF9 contribuye a la formación de hueso nuevo inducida por las células tumorales de próstata y que este factor participa en la progresión osteoblástica de esta enfermedad (Li Z. G. et al. 2008c).

En resumen, diversos factores actúan sobre la formación de hueso en la metástasis del PCa, impactando a su vez sobre los distintos componentes celulares que intervienen en la comunicación entre las células tumorales y las óseas (Fig. 16).



Figura 16. Modelo de la metástasis osteoblástica producida por el PCa. La producción de factores como FGFs, BMPs, PDGF y TGF- β por las células tumorales puede estimular de manera directa la actividad de los osteoblastos y la consiguiente formación de hueso. Las proteasas, como PSA, son activadas por uPA y pueden clivar a TGF- β , PTHrP y a la proteína de unión de IGF (IGFBPs) (Mundy 2002).

III.2.3 Cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC)

Las metástasis óseas, ya sean osteoblásticas u osteolíticas, presentan muchas complicaciones en los pacientes como dolor, hipercalcemia, fracturas y síndromes asociados a la compresión de la espina cordal y de los nervios. Estas complicaciones aumentan la mortalidad y disminuyen la calidad de vida de los enfermos. De esta manera, la presencia de metástasis óseas en pacientes con PCa representa la etapa final y más temida de la enfermedad.

En 1941, un estudio de Huggins y Hodges mostró la estrecha relación de los andrógenos con el crecimiento del PCa y así la terapia de deprivación de andrógenos (castración utilizando agentes químicos o por medios quirúrgicos), ya sea como terapia única o en combinación con otros métodos, se convirtió en el tratamiento para las etapas avanzadas de la enfermedad (Harris *et al.* 2009; Marques *et al.* 2010). La respuesta inicial a la terapia de castración es muy favorable, con una regresión clínica significativa y rápidas respuestas bioquímicas;

disminución en los niveles séricos del marcador PSA en el 80-90% de los pacientes con la enfermedad metastásica (Marques *et al.* 2010) (Harris *et al.* 2009; Sun S. *et al.* 2010). Sin embargo, a pesar de la buena respuesta inicial, suele ocurrir una reincidencia de la misma después de la castración (Harris *et al.* 2009; Watson *et al.* 2010). En estos casos, la enfermedad progresa a una fase insensible a la deprivación de hormonas, denominada cáncer de próstata resistente a la castración o CRPC (de sus siglas en inglés), que conlleva a un peor pronóstico que se traduce en un tiempo de supervivencia de 16-18 meses en promedio. La quimioterapia ha sido una opción para el tratamiento de estos pacientes. Sin embargo, no es bien tolerada por todos los enfermos con CRPC, dado que en su mayoría son hombres de edad avanzada.

Los distintos tratamientos para CRPC se pueden dividir en tres categorías según las células blanco hacia las cuales se dirigen. El primer tipo involucra a las células epiteliales y los tratamientos consisten en agentes citotóxicos como docetaxel y cabazitaxel. En la segunda categoría el blanco son los elementos del estroma, incluyendo a las células endoteliales, los osteoblastos y los osteoclastos. Entre otros agentes cabe destacar: talidomida, una droga anti-angiogénica; bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra VEGF-A; antrasentan, un inhibidor de la proliferación de los osteoblastos; denosumab, un anticuerpo monoclonal contra VEGF-A; antrasentan, un inhibidor de la proliferación de los osteoblastos; denosumab, un anticuerpo monoclonal contra RANKL y los bifosfonatos que actúan sobre los osteoclastos. En la tercera categoría se encuentran tanto las células epiteliales como los elementos del estroma y los agentes utilizados apuntan a interrumpir la activación del AR, el cual se expresa tanto en las células de PCa como en las células del microambiente. Entre ellos, abiraterone suprime la producción de testosterona y MDV3100 es antagonista del AR y bloquea su señalización al inhibir su traslocación al núcleo (Dayyani *et al.* 2011).

III.2.4 Estrés oxidativo en el establecimiento de la enfermedad ósea

III.2.4.1 Generalidades

El estrés oxidativo se caracteriza por el aumento en los niveles de ROS, las cuales interrumpen el balance intracelular de óxido-reducción. Durante los procesos celulares como el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria, el

metabolismo de xenobióticos y de ácidos grasos, entre otros, se forman ROS constantemente como productos intermedios. Estos consisten tanto en radicales libres de corta vida media, caracterizados por poseer electrones desapareados (por ejemplo el anión superóxido, O_2^-) como los no derivados de radicales libres, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual se forma rápidamente por la conversión del O_2^- por las superóxido dismutasas. Los ROS pueden causar peroxidación lipídica, daño a proteínas y lesiones en el ADN conduciendo a la muerte celular, pero también pueden controlar la proliferación y diferenciación celular (Balaban *et al.* 2005; Giorgio *et al.* 2007).

Dentro de las células existen distintas fuentes de generación de ROS, siendo principalmente la mitocondria donde se producen como un efecto secundario de la respiración celular. Sin embargo, la producción de ROS es también inducida por estímulos externos como, por ejemplo, los factores de crecimiento y las citoquinas inflamatorias. El tratamiento de las células con IL-1 α , TNF- α o con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) resulta en un aumento en los niveles de H₂O₂ (Radeke *et al.* 1990; Bae *et al.* 1997). La inhibición de los niveles de H₂O₂ debido al aumento de, por ejemplo, la enzima antioxidante catalasa, afecta la señalización de estos factores de crecimiento indicando que la producción de H₂O₂ actúa en el contexto de la señalización normal de dichos factores. Es decir, si bien el estrés oxidativo tradicionalmente fue asociado al envejecimiento, muchos estudios demuestran que también en bajas concentraciones puede poseer un rol fisiológico regulando las funciones celulares.

III.2.4.2 Estrés oxidativo en la remodelación ósea

En el hueso, la presencia de estrés oxidativo actúa como un modulador de la función de las células óseas e influencia la fisiopatología de los tejidos mineralizados.

En 1990, Garrett (Garrett *et al.* 1990) describió por primera vez la relación entre ROS, particularmente el anión superóxido, y la diferenciación y activación de los osteoclastos. En 2005, estos resultados luego fueron confirmados por Lee y col. (Lee *et al.* 2005) quienes demostraron que para la activación de RANKL se requiere la producción de ROS (Fig. 17). Más aún, en la línea celular humana de osteoblastos MG63, en cultivos primarios de células del estroma de médula ósea (BMSCs) y en

osteoblastos de calvarias, el aumento de los niveles de ROS estimuló la expresión de RANKL tanto a nivel del ARNm como de proteína (Bai *et al.* 2005).



Figura 17. Remodelación ósea y estrés oxidativo. En condiciones de estrés oxidativo la remodelación del hueso se encuentra desbalanceada: la formación ósea mediada por los osteoblastos se reduce, mientras que la diferenciación y actividad de los osteoclastos aumenta, ya sea de manera directa por los ROS como de manera indirecta por el aumento de RANKL (Wauquier *et al.* 2009).

Sin embargo, el estrés oxidativo también afecta la formación de hueso, inhibiendo la diferenciación de los osteoblastos y promoviendo la apoptosis (Almeida 2011).

Respecto a la metástasis ósea del PCa, un estudio realizado por Yossepowitch y col. (Yossepowitch *et al.* 2007) demostró que pacientes con PCa avanzado están sujetos a mayores niveles de estrés oxidativo. Este cumple un rol importante en la carcinogénesis del PCa y en particular en la progresión (Khandrika *et al.* 2009). Se ha reportado que el estrés oxidativo está implicado en la conversión del PCa dependiente de andrógenos al CRPC, a través de la regulación de la expresión del AR (Shiota *et al.* 2010). Sin embargo, los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo altera la señalización del AR e induce al CRPC no se conocen y necesitan ser estudiados con mayor profundidad.

III.2.4.3 Señalización de FoxO en la respuesta al estrés oxidativo

Las células intentan contrarrestar los efectos adversos de los ROS mediante la activación de varios mecanismos de defensa, incluyendo la inducción de las enzimas *scavengers* de radicales libres como la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), la catalasa y también los genes de reparación del ADN como Gadd45, factor involucrado en el arresto y en la reparación del daño al ADN (Kops *et al.* 2002; Tran *et al.* 2002). Esta respuesta requiere la activación de una familia ubicua de factores de transcripción conocidos como *forkhead box O* (FoxO), que representa una subclase de proteínas caracterizadas por la presencia de un sitio de unión al ADN con forma *winged-helix*. En mamíferos, esta subclase involucra a cuatro miembros: FoxO1 (o FKHR), FoxO3 (o FKHRL1), FoxO4 (o AFX) y FoxO6 (Greer y Brunet 2005). FoxO1, 3 y 4 se expresan de manera ubicua, pero en forma más abundante en el hueso. FoxO6 se expresa únicamente en el cerebro (Jacobs F. M. *et al.* 2003). El interés en estas proteínas comenzó a partir de las evidencias de que estos factores de transcripción promovían la resistencia al estrés y extendían la longevidad en *C. elegans* y en *Drosophila* (Puig y Mattila 2011).

La actividad de FoxO es importante en distintos procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis, autofagia, metabolismo y resistencia al estrés. Puede promover el arresto del ciclo celular en los puntos de chequeo G1/S y G2/M (Tran *et al.* 2002), los cuales son críticos para la respuesta al estrés, ya que en ellos se promueve la reparación del ADN. A su vez este arresto temporal permite el disparo del sistema de detoxificación por parte de las células. Por otro lado, FoxO puede inducir apoptosis a través de la regulación de varios genes pro-apoptóticos (Monsalve y Olmos 2011). El rol de FoxO en la muerte celular es dual, considerando que también está involucrado en la defensa contra el estrés. Sin embargo, la eliminación de las células dañadas o anormales mediante la apoptosis inducida por FoxO le hace cumplir un rol importante como supresor tumoral (Monsalve y Olmos 2011).

La actividad de FoxO es regulada por factores externos como insulina, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, estrés oxidativo y a través de una gran cantidad de modificaciones post-traduccionales incluyendo la fosforilación, ubiquitinización, acetilación y metilación. Estas modificaciones afectan tanto los niveles de la proteína como su localización celular, su unión al ADN y su actividad transcripcional.

En mamíferos, las proteínas FoxO1, 3 y 4 son reguladas negativamente por factores de crecimiento e insulina vía la fosforilación de dichas proteínas por Akt. Esta fosforilación promueve la unión de FoxO a la chaperona 14-3-3 en el núcleo previniendo la unión de FoxO al ADN y causando su exportación nuclear. Por lo tanto, la fosforilación de las proteínas FoxO mediadas por Akt conduce a su retención citoplasmática e inhibe la transcripción en respuesta a FoxO (Fig. 18). Además, estos factores también bloquean la acción de FoxO promoviendo su degradación a través del proteasoma (Almeida 2011).

En presencia de ROS, FoxO transloca al núcleo y activa la transcripción de genes. Los ROS promueven varias modificaciones post-traduccionales de las proteínas FoxO incluyendo fosforilación, mono-ubiquitinación, acetilación/desacetilación y oxidación de cisteína (Almeida 2011). Además, se ha reportado que las proteínas FoxO pueden regular las respuestas transcripcionales independientemente de su unión directa al ADN, es decir, pueden asociarse a co-factores modulando la expresión génica. Así la presencia de factores que se asocian a FoxO en un determinado tipo celular, es crítico para determinar la funcionalidad de esta proteína. Estas interacciones expanden las posibilidades de la regulación mediada por FoxO de los programas transcripcionales y determinan el destino celular (van der Vos y Coffer 2008) (Fig. 18).

En células del linage osteoblástico FoxO regula la expresión de genes específicos de osteoblastos como osteocalcina (OCN) y modifica la función de otros factores de transcripción vitales para la osteoblastogénesis como el factor de la activación de la transcripción-4 (ATF4), Runx-2 y β-catenina (Almeida 2011).



Figura 18. Activación de los factores de transcripción FoxO por ROS. La fosforilación de FoxO por Akt conduce a la retención de FoxO en el citoplasma. En presencia de ROS, vía la activación de JNK o de Mst1 se fosoforila a FoxO en determinados residuos promoviendo su traslocación nuclear y su actividad en la transcripción. Los ROS también actúan sobre la acetilación y desacetilación mediante la activación de Sirt1. Finalmente, promueven la unión de FoxO y β -catenina activando la transcripción mediada por FoxO (Almeida 2011).

En el año 2005 se descubrió que FoxO3 era activado por β -catenina en condiciones de estrés oxidativo (Essers *et al.* 2005). Hasta ese momento, los estudios realizados sobre FoxO mostraban que tenía un rol en el arresto del ciclo celular y la apoptosis. Pero el descubrimiento de su activación mediada por β -catenina condujo a una paradoja, ya que esta proteína se reconoce tradicionalmente por su importante rol en la proliferación celular. En el año 2007 el mismo grupo de investigación reportó que la interacción de FoxO3 con β -catenina resultaba en la inhibición de la actividad transcripcional del complejo β -catenina/TCF y, de esta manera, los ROS a través de FoxO3 pueden suprimir la diferenciación de los osteoblastos antagonizando la señalización canónica de Wnt (Almeida *et al.* 2007a; Hoogeboom *et al.* 2008). Más aún, la sobre-expresión de β -catenina es suficiente para prevenir la supresión de la diversificación del *pool* limitado de β -catenina desde TCF a FoxO en las células osteoblásticas puede explicar la atenuación de la osteoblastogénesis y de la

formación de hueso por aumento del estrés oxidativo (Fig. 19) (Almeida *et al.* 2007a). En el año 2010, el rol de FoxO en los osteoblastos se estudió mediante la generación de modelos de ratones en donde se manipuló genéticamente la expresión de estas proteínas. La deleción condicional de FoxO1, 3 y 4 en ratones de tres meses aumentó el estrés oxidativo en el hueso y la apoptosis en los osteoblastos, lo que conllevó a una disminución en el número de osteoblastos y en la tasa de formación de hueso. Por el contrario, la sobre-expresión de FoxO3 en osteoblastos maduros disminuyó el estrés oxidativo y la apoptosis en estas células, lo que se tradujo en un aumento en el número de osteoblastos y en la tasa de formación de hueso (Ambrogini *et al.* 2010). Estos hallazgos apoyan la hipótesis que FoxO3 reduce el estrés oxidativo y promueve la sobrevida de los osteoblastos.



Figura 19. El aumento de ROS antagoniza los efectos Wnt/ β -catenina al desviar a β -catenina de TCF hacia FOXO. Adaptado de (Manolagas y Almeida 2007).

Otros autores demostraron que de las tres proteínas FoxO solamente FoxO1 es requerida para la proliferación y el balance redox de los osteoblastos y, de esta forma, controla la formación de hueso. El efecto de FoxO1 sobre la proliferación de estas células óseas se debe a su interacción con ATF4, un factor de transcripción que regula el importe de aminoácidos e influencia la señalización de p53. De acuerdo con esto, los niveles de estrés oxidativo disminuidos o la síntesis de proteínas aumentada normaliza la formación de hueso en los ratones con FoxO1 delecionado únicamente en los osteoblastos. Estos resultados identifican a FoxO1 como un regulador crítico de la remodelación ósea (Rached *et al.* 2010b).

En conjunto, los resultados de los estudios realizados con manipulación genética de FoxO en osteoblastos maduros sugieren que estos factores de transcripción son mediadores críticos de la defensa contra el estrés oxidativo y, de esta forma, contribuyen a la homeostasis esquelética. Sin embargo, el envejecimiento o la deficiencia de esteroides sexuales lleva a un aumento en la prevalencia de la apoptosis de los osteoblastos y los osteocitos como consecuencia del estrés oxidativo incrementado (Almeida *et al.* 2007b). Una explicación probable sobre la incapacidad de FoxO para prevenir la apoptosis osteoblástica en estas condiciones, es que la defensa provista por estos factores está colapsada por la elevada cantidad de los ROS. Además otros caminos estimulados por los ROS pueden interferir con la actividad de FoxO, como por ejemplo NF-κB (Hu *et al.* 2004; Almeida 2011).

CAPÍTULO IV: HEMO OXIGENASA-1

IV.1 Generalidades

La historia de la proteína hemo oxigenasa (HO) (EC 1.14.99.3) comienza con la incorporación del oxígeno a la atmósfera debido a la actividad fotosintética de las cianobacterias, uno de los primeros seres vivos que lograron perdurar exitosamente. Sin embargo, el oxígeno es intrínsecamente tóxico, y su presencia en la atmósfera actuó como una presión evolutiva donde sobrevivieron y dejaron descendencia aquellos organismos que desarrollaron alternativas para superar al estrés oxidativo. En este contexto, uno de los mecanismos más ubicuos es la enzima HO (Morse y Choi 2005), la cual se encuentra preservada desde las algas verde-azules (cianobacterias) hasta los humanos, y esto indica el éxito de esta estrategia celular para la protección y su importancia en la sobrevida (Foresti y Motterlini 1999).

El grupo hemo (anillo de protoporfirina IX que contiene en el centro un átomo de Fe²⁺) existe esencialmente en las células como grupo prostético de las hemoproteínas. La proteína HO fue descubierta en 1968, cuando Tenhunen y col. (Tenhunen et al. 1969) describieron el mecanismo de la reacción catabólica del hemo, siendo HO la enzima responsable de catalizar el paso limitante en su degradación oxidativa para producir monóxido de carbono (CO), biliverdina IXa, la cual es reducida rápidamente a bilirrubina por la biliverdina reductasa, y hierro ferroso. Hasta la fecha se han identificado tres isoformas de HO, productos de distintos genes: HO-1 (Maines et al. 1986), HO-2 (Trakshel y Maines 1989; McCoubrey y Maines 1994) y HO-3 (McCoubrey et al. 1997; Elbirt y Bonkovsky 1999). 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 y es la isoforma inducible. HO-2 es constitutiva y está presente en altas concentraciones en el cerebro y en los testículos. HO-3 es estructuralmente similar a la HO-2, pero se diferencia por tener una actividad catalítica muy baja (McCoubrey et al. 1997).

Todos los productos de la reacción enzimática de HO ejercen efectos pleiotrópicos incluyendo numerosas respuestas citoprotectoras. La bilirrubina y la biliverdina son

los *scavengers* endógenos más potentes de los 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- α , de IL-1 β y de la quimioquina CCL4 (proteína 1 β inflamatoria de macrófago) y, a su vez, activa la síntesis de la interleuquina anti-inflamatoria IL-10 (Otterbein *et al.* 2000; Marcantoni *et al.* 2012). 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 metal libre, ejerciendo roles citoprotectores específicos (Fig. 20) (Crichton *et al.* 2002).



Figura 20. Sistema hemo/HO-1. La eliminación del hemo por HO-1 involucra el clivaje del anillo de protoporfirina IX con la producción de biliverdina (BV), CO y la liberación del Fe. Este último (representado por círculos amarillos) es capturado por la ferritina (FtH). La BV es convertida mediante la biliverdina reductasa (BVR) en bilirrubina (BR). Los productos finales tienen propiedades citoprotectoras (Gozzelino *et al.* 2010).

La expresión de HO-1 se encuentra regulada principalmente a nivel transcripcional del gen HMOX1, y numerosas vías de transducción de señales y factores de transcripción intervienen en su inducción. Así, las proteínas activadas por mitógeno (MAPK), la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina, el fosfatidilinositol y la proteína quinasa A (PKA) pueden conducir a la activación transcripcional de HO-1. Los principales factores de transcripción de respuesta a estrés en mamíferos están involucrados en la regulación de la expresión del gen HMOX1: el factor nuclear eritroide NF-E2 y sus factores relacionados (entre ellos, Nfr-2), la proteína activadora 1 (AP-1) y NF-kB. Además se demostró que otros factores de transcripción median la inducción de HO-1 como, por ejemplo la proteína de respuesta temprana-1 (Egr-1), *upstream regulatory factor-2* (USF-2), y la proteína específica-1 (SP-1) (Lundvig *et al.* 2012). Esta multiplicidad de reguladores podría ser responsable de la activación diferencial del gen por una gran cantidad de estímulos y condiciones de estrés (Alam y Cook 2007).

En la actualidad el efecto protector de HO-1, ejercido por sus productos y por la proteína misma, es ampliamente aceptado. 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). Se postula que todos estos estímulos llevarían a la formación de ROS en la mitocondria o en el retículo endoplasmático y estas especies conducirían a la liberación del hemo de las hemoproteínas. En condiciones de estrés oxidativo, ciertos factores de transcripción se unen a elementos regulatorios del gen HMOX1 induciendo su transcripción. Paralelamente, el grupo hemo se une a Bach1 (componente del complejo represor Bach1/Maf que se encuentra constitutivamente unido a elementos de respuesta a estrés) e induce cambios conformacionales que llevan a la disociación del ADN y a la exportación de Bach1 al citoplasma, donde es ubiquitinado y degradado. Los ROS también conducen a la degradación de Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), permitiendo la translocación de Nrf2 al núcleo y su asociación con Maf para activar la transcripción de HMOX1 (Fig. 21).



Figura 21. Regulación transcripcional de HMOX1. La transcripción de HMOX1 puede ser inducida tanto por el hemo como por una variedad de agonistas (1-n) que reconocen receptores específicos (1-n). Esto activa distintas vías de señalización que se asocian con la producción de ROS desde la mitocondria y del retículo endoplasmático, favoreciendo la liberación del hemo desde las hemoproteínas. El gen HMOX1 contiene múltiples elementos de respuesta en el ADN (RE_{1-n}) que en condiciones de estrés oxidativo son reconocidos y activados por factores de transcripción específicos (TF_{1-n}). En condiciones normales el dímero Bach1/Maf se encuentra unido a los elementos de respuesta a estrés (StREs) en el promotor de HMOX1 inhibiendo su transcripción. Frente al estrés oxidativo, Bach1 se exporta al citoplasma donde es ubiquitinado y degradado. Keap1 también es degradado permitiendo a Nrf2 traslocar al núcleo. Nrf2/Maf se unen a los sitios StRE en el promotor de HMOX1 activando su transcripción (Gozzelino *et al.* 2010).

Históricamente HO-1 se caracterizó por su localización en el retículo endoplasmático liso como una proteína integral de membrana (Tenhunen *et al.* 1969). Sin embargo, trabajos de la última década han detectado su redistribución en varias fracciones subcelulares luego de la inducción por estrés (Kim H. P. *et al.* 2004).

El grupo de Dennery en el año 2007 (Lin Q. *et al.* 2007) postuló que una forma nuclear de HO-1, sin actividad enzimática, podría regular la transcripción de genes que promueven la citoprotección contra el estrés oxidativo. Al año siguiente, el mismo grupo de investigación documentó 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 Q. S. *et al.* 2008b). Simultáneamente a estos hallazgos, nuestro grupo de investigación ha demostrado la localización nuclear de

HO-1 en muestras humanas de carcinoma primario de próstata e hiperplasias benignas por estudios de inmunohistoquímica. Además, por técnicas de Western blot y utilizando líneas celulares de PCa, demostramos que la sobre-expresión de HO-1 conduce a su translocación nuclear pero en este caso con conservación de su peso molecular (Sacca *et al.* 2007).

IV.2 Rol de HO-1 en la angiogénesis

El primer nexo entre HO-1 y angiogenésis fue propuesto por el grupo de Abraham (Deramaudt *et al.* 1998), quienes demostraron que la sobre-expresión de HO-1 inducía la proliferación de las células endoteliales. Experimentos posteriores demostraron la formación disminuida de capilares provenientes de células endoteliales deficientes en HO-1. Además, el tratamiento de estas células con moléculas liberadoras de CO restauraba la angiogénesis (Li Volti *et al.* 2005).

Uno de los productos de la actividad de HO-1, el CO, es un reconocido vasodilatador y posee efectos anti-inflamatorios y anti-apoptóticos en las células endoteliales, lo que podría contribuir a potenciar la angiogénesis (Loboda *et al.* 2008). El tratamiento de las células del músculo liso con gas CO 1% (Dulak *et al.* 2002) o el tratamiento de las células endoteliales con CORM-2, molécula liberadora de CO (Jozkowicz *et al.* 2003) indujo la producción de VEGF. Más aún, la inhibición de HO-1 por tratamiento con estaño protoporfirina IX (SnPP, inhibidor de la actividad de HO-1) impidió la angiogénesis mediada por VEGF, generando un *loop* auto regulatorio entre HO-1 y VEGF (Deramaudt *et al.* 1998; Jozkowicz *et al.* 2003). Se postuló que HO-1 puede ejercer sus efectos mediante la estimulación de factores de transcripción, como NF-KB o AP-1, los cuales regulan la síntesis de VEGF (Cisowski *et al.* 2005).

Mediante un modelo *in vivo* de la membrana corioalantoide en embriones de pollo, se demostró que VEGF regula positivamente la expresión de HO-1 y que se requiere de la actividad de HO-1 para que VEGF ejerza sus efectos angiogénicos (Fernandez y Bonkovsky 2003). Las células endoteliales de ratones *knock-out* para el gen HO-1 no proliferaban bajo el estímulo de VEGF (Cisowski *et al.* 2005). A la inversa, la sobre-expresión de HO-1 aumentó la formación de vasos sanguíneos en respuesta a VEGF (Jozkowicz *et al.* 2003). Este efecto podría ser mediado por el CO, ya que las

células tratadas con CORM-2 son más permisivas al tratamiento con VEGF (Jozkowicz et al. 2003).

Existen otras vías relevantes en la angiogénesis interconectadas con HO-1. El óxido nítrico (NO) incrementa los niveles del ARNm de HO-1 y aumenta la estabilidad de dicha proteína (Durante *et al.* 1997). Posee varias funciones biológicas incluyendo la neurotransmisión, la inflamación, la inhibición de la agregación plaquetaria y la regulación del flujo sanguíneo. Se ha demostrado que los efectos fisiológicos del NO, observados en muchos casos en la vasculatura, son dependientes de HO-1 y a su vez del CO (Morse y Choi 2005). El NO es considerado un regulador importante de la vía HO-1/CO; sin embargo, la compleja relación entre los mensajeros gaseosos NO y CO aún no se conoce en detalle (Chung *et al.* 2008).

La síntesis de otro mediador pro-angiogénico, IL-8, también puede ser modulada por HO-1. El tratamiento de células HUVEC con S-nitroso-penicilamina (SNAP), un donante de NO, resultó en un aumento de la expresión de HO-1 y de los niveles de VEGF e IL-8 (Pae *et al.* 2005). La disminución en los niveles de HO-1, mediante la transfección con un siRNA específico o con oligonucleótidos antisentido, disminuyó la inducción de VEGF e IL-8 por tratamiento con SNAP. Más aún, la síntesis de IL-8 se redujo en presencia de anticuerpos neutralizantes de VEGF, mientras que los niveles de este último factor no se modificaron cuando se usaron anticuerpos neutralizantes de IL-8. De esta manera, los autores propusieron la existencia de una cascada molecular NO/HO-1/VEGF/IL-8 en las células endoteliales (Pae *et al.* 2005). Por el contrario, otros resultados sugieren que la producción de IL-8 es independiente de la inducción de HO-1 en células HMEC-1 (células endoteliales de la microvasculatura humana) (Loboda *et al.* 2005).

Además, la expresión de HO-1 en células endoteliales también puede promover la angiogénesis mediante la atenuación de la síntesis de factores anti-angiogénicos. Cudmore y col. (Cudmore *et al.* 2007) demostraron que la sobre-expresión de HO-1 en células endoteliales disminuyó la expresión del receptor soluble de VEGFR1 (sFlt1) y de sEng (endoglina soluble). Más aún, ratones deficientes en HO-1 mostraron niveles significativamente mayores de sVEGFR1 y sEng en comparación con ratones salvajes (Cudmore *et al.* 2007).

En la figura 22 se muestran algunos de los factores mencionados que promueven la angiogénesis mediada por HO-1.



La deficiencia de HO-1 en humanos y ratones resulta en injuria oxidativa severa en las células endoteliales (Durante 2003; Bussolati et al. 2004; Dulak et al. 2004; Bussolati y Mason 2006). Es así que la marcada inducción de la expresión de HO-1 en condiciones de estrés oxidativo, sugiere que esta proteína puede estar particularmente involucrada en angiogénesis asociada la а condiciones inflamatorias. De hecho, el aumento de vascularización en tumores que sobreexpresan HO-1 (Was et al. 2006), el nexo entre HO-1 y la angiogénesis en la artritis reumatoidea (Devesa et al. 2005) y su importancia en la cicatrización de heridas (Deshane et al. 2007) confirman dicha hipótesis.

Sin embargo, el rol de HO-1 puede variar en distintas condiciones y se propuso que HO-1 cumpliría una función dual *in vivo*. Bussolati y col. (Bussolati *et al.* 2004; Bussolati y Mason 2006), demostraron que la inducción de la angiogénesis mediada por VEGF requiere la actividad de HO-1, mientras que en condiciones inflamatorias, la formación de nuevos vasos sanguíneos se atenúa por la sobre-expresión de HO-1. De esta manera, la influencia positiva o negativa de HO-1 en la angiogénesis depende de las diferentes condiciones tisulares (Loboda *et al.* 2008).

IV.3 Rol de HO-1 en la biología tumoral

Muchos trabajos han demostrado que HO-1 y sus productos ejercen efectos antiinflamatorios y participan en el control del crecimiento y la proliferación de las células tumorales. Se ha reportado que esta proteína se expresa en un número de tumores humanos incluyendo glioma, melanoma, próstata, cerebro, carcinoma de células renales y pancreáticas, linfosarcomas, sarcoma de Kaposi, hepatoma, leucemia mieloide crónica (Martin *et al.* 2007; Was *et al.* 2010; Grochot-Przeczek *et al.* 2012). Sin embargo, el rol de HO-1 en el desarrollo tumoral todavía no está completamente dilucidado y reportes de los últimos años demuestran resultados discordantes o completamente opuestos.

Varios estudios documentaron 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). Se ha observado una asociación entre los polimorfismos del gen HO-1 y la incidencia de esta enfermedad. Se identificaron repeticiones (GT)_n en el promotor de HO-1 y se demostró que estos micro-satélites son altamente polimórficos y que (GT)_n más cortas estaban asociadas con una alta actividad de HO-1, un riesgo mayor de progresión de melanomas (Okamoto et al. 2006) y un peor pronóstico de sobrevida libre de enfermedad en cáncer de páncreas (Vashist et al. 2011). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los efectos de la activación de HO-1 pueden ser diferentes en los distintos estadíos de la tumorigénesis. En cáncer de páncreas HO-1 potencia la agresividad tumoral (Sunamura et al. 2003) y, en concordancia con estos resultados se demostró que el silenciamiento de HO-1 con un siRNA específico resultó en la supresión de la proliferación de células tumorales pancreáticas y produjo tumores más sensibles a la radio-quimioterapia (Berberat et al. 2005). En células tumorales de pulmón el silenciamiento de la expresión de HO-1 indujo la apoptosis (Kim H. R. et al. 2008). Recientemente, Tsai y col. (Tsai et al. 2012) reportaron que el aumento de la expresión de HO-1 en líneas celulares de carcinoma de pulmón a células no pequeñas (NSLC) se correlacionó con un incremento de la invasión y la migración in vitro, mientras que el silenciamiento de su expresión tuvo efectos opuestos. También reportaron que los pacientes con alta expresión de HO-1 en tejido tumoral respecto al parénguima no tumoral mostraron un peor pronóstico y una mayor tasa de metástasis, respecto a pacientes con expresión similar en ambos tejidos. Resultados coincidentes fueron reportados

recientemente por el grupo de Facchinetti (Degese et al. 2012) utilizando un microarreglo de tejidos provenientes de pacientes con NSLC. Se demostró que el 96% de las células tumorales presentaron inmuno-marcación positiva para HO-1 y que dicha expresión era significativamente mayor en el tejido tumoral respecto al no tumoral. Más aún, la expresión de HO-1 se correlacionaba con estadíos avanzados de la enfermedad y la progresión a nódulo linfático; sin embargo, no se encontraron diferencias en la sobrevida de los pacientes. Estos mismos autores demostraron diferencias en la localización subcelular de esta proteína, hallándola principalmente en el núcleo de las células no malignas mientras que en el tejido tumoral se detectó mayoritariamente en el citoplasma (Degese et al. 2012). Por otro lado, Li y col. (Li M. Y. et al. 2008b) observaron la localización nuclear de esta proteína tanto en el epitelio tumoral pulmonar como en los tejidos no malignos. Más aún, en melanomas la sobre-expresión de HO-1 aumentó la viabilidad, la proliferación y el potencial angiogénico (Was et al. 2006). Ratones inoculados con células de melanoma 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 al. 2006). Por el contrario, en un modelo experimental et de hepatocarcinogénesis química murina, la disminución de la expresión de HO-1 se asoció con la progresión maligna (Caballero et al. 2004). A su vez, se sugirió que HO-1 podría promover la resistencia tumoral a las condiciones de estrés en células de cáncer de colon (Busserolles et al. 2006) y en cáncer renal su expresión podría promover el crecimiento tumoral inhibiendo la apoptosis y la autofagia (Banerjee et al. 2012). En trabajos más recientes, se reportó un aumento en la expresión de HO-1 en tejidos tumorales de cabeza y cuello respecto a tejidos no tumorales y la localización nuclear de esta proteína se correlacionó con la progresión del tumor (Gandini et al. 2012). Cabe destacar que los tumores que presentan una fuerte neovasculatura y hemorragias contienen niveles elevados de hemo como producto de la oxidación de hemoglobinas (Wen 2002). Esto puede inducir la expresión de HO-1 como un mecanismo de protección en cerebro (Morita et al. 2009) y en hígado (Hsu et al. 2007). Asimismo, la expresión de HO-1 también puede aumentar en respuesta a la quimioterapia, la irradiación (Berberat et al. 2005; Kuroda et al. 2010) o por la terapia fotodinámica (Nowis et al. 2006; Rapozzi et al. 2009).

Sin embargo, cabe destacar que 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 pacientes con leucemia mieloide crónica se identificó a HO-1 como un factor de sobrevida dependiente de la proteína de fusión BCR/ABL (Mayerhofer et al. 2004). En mastocitos neoplásicos se comprobó que HO-1 es un factor de sobrevida (Kondo et al. 2007). Hill y col. (Hill et al. 2005) propusieron que HO-1 ejerce funciones antitumorales en cáncer de mama de rata y humano mediante mecanismos antioxidantes. 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 carcinoma hepatocelular, utilizando líneas celulares y modelos in vivo, se demostró que HO-1 inhibe la migración y el crecimiento tumoral suprimiendo la expresión de IL-6 (Zou et al. 2011). Además, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, HO-1 inhibió la invasión inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), a través de la disminución de los niveles de ROS y la inhibición de la expresión de MMP9 mediada por CO (Lin C. W. et al. 2008a). A su vez, se ha sugerido que el CO bloquea la proliferación celular en líneas tumorales de PCa 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).

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; Gueron *et al.* 2009). Reportamos que HO-1 se expresa en carcinomas prostáticos primarios *naive* de tratamiento; demostramos por primera vez que la expresión nuclear de HO-1 puede definir a un subgrupo de pacientes con estos tumores y que la modulación de la expresión de esta proteína podría representar una nueva alternativa terapéutica para esta enfermedad (Sacca *et al.* 2007). Datos clínicos demostraron una diferencia significativamente estadística en la expresión de HO-1 epitelial entre hiperplasia benigna, PIN, PCa localizado y CRPC donde CRPC presentó la expresión más alta de HO-1 seguido por el tejido benigno. Este trabajo provee datos experimentales de un *cross-talk* entre la expresión de HO-1 y las deleciones de PTEN, lo cual se asoció con un pronóstico clínico adverso (Li Y. *et al.* 2011). Mediante estudios *in vitro* en nuestro laboratorio analizamos la expresión de HO-1 y sus consecuencias funcionales en líneas tumorales de PCa sensibles (MDA PCa 2b y LNCaP) e insensibles (PC3) a

andrógenos. Comprobamos que los niveles proteicos basales de HO-1 son menores en PC3 respecto a MDA PCa 2b y LNCaP (Gueron et al. 2009). Demostramos que es necesario el promotor completo de HO-1 para estimular su transcripción por inducción con hemina y que la mutación de cualquiera de los dos sitios de respuesta a estrés anula dicha inducción (Ferrando ; Gueron et al. 2009). Además, determinamos que el tratamiento con hemina aumentó la expresión de HO-1 tanto a nivel proteico como del ARNm en todas las líneas tumorales y disminuyó significativamente la proliferación e invasión en PC3 y MDA PCa 2b. Por fotografía time-lapse comprobamos en PC3 que la inducción de HO-1 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 un array de expresión 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 injectadas s.c. en ratones atímicos nu/nu para el análisis in vivo de tumores creciendo como xenotransplantes. El crecimiento tumoral y la expresión de MMP9 se redujeron significativamente en los tumores PC3HO-1 comparado con los tumores controles. Estos resultados implicaron por primera vez a HO-1 en la supresión de la carcinogénesis prostática (Gueron et al. 2009).

Alaoui-Jamali y col. (Alaoui-Jamali *et al.* 2009) reportaron un aumento de la expresión de HO-1 en las células epiteliales de muestras de PCa refractarios a hormona y no en el estroma circundante. Esta afirmación es contraria a lo establecido previamente por nuestro laboratorio, en el trabajo de Sacca y col. (Sacca *et al.* 2007), 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. Además, siempre hemos observado inmunomarcación positiva de HO-1 en diversos componentes estromales como por ejemplo en fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, *etc.* Esto coincide con observaciones de otros autores (Deininger *et al.* 2000; Torisu-Itakura *et al.* 2000). Alaoui-Jamali y col. (Alaoui-Jamali *et al.* 2009) desarrollaron un inhibidor de la actividad de HO-1, OB-24,

y testearon su actividad sobre PC3M, una línea derivada de PC3 con alta capacidad metastásica, y reportaron los efectos antitumorales de dicho compuesto. No es claro el origen de las diferencias obtenidas entre ambos grupos de trabajo, siendo necesario un estudio más profundo para establecer la causa de dichas discrepancias. Sin embargo, un punto a resaltar es que estos autores no analizaron los niveles de expresión de HO-1. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que los efectos antitumorales de HO-1 no serían causados por el aumento de su actividad enzimática. Comprobamos que cuando los cultivos de células de PCa son tratados con SnPP, inhibidor de la actividad de HO-1 con la acción paradójica de incrementar su expresión, se produjo la inhibición de la proliferación de forma semejante a la provocada por hemina (Gueron *et al.* 2009).

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

Por otro lado, no podemos descartar el rol que HO-1 cumpliría afectando el microambiente tumoral y así impactando en el destino final de la células cancerosas (Was *et al.* 2010).

Los tumores están infiltrados por muchos tipos de células del sistema inmune incluyendo células dendríticas, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, *natural killers*, linfocitos T y B y macrófagos constituyendo estos últimos la población más abundante (Lin E. Y. y Pollard 2004). Sin embargo, la respuesta inmune es ineficiente al tratar de erradicar el tumor, ya que éstos disparan mecanismos de evasión inmunológica (Whiteside *et al.* 2011; Rabinovich *et al.* 2012). Dichos mecanismos incluyen la antigenicidad débil de las células cancerígenas, el desarrollo de inmuno-resistencia y una función ineficiente de los linfocitos T

efectores. Las células tumorales también estimulan a las células del sistema inmune para producir citoquinas inflamatorias que promueven su proliferación, invasión y angiogénesis. De esta manera, la inflamación a su vez contribuye al desarrollo y la progresión tumoral.

HO-1 considerada una potente proteína anti-inflamatoria con efectos es inmunosupresores (Grochot-Przeczek et al. 2012). Muchos estudios sugieren que la sobre-expresión de HO-1 podría defender a los tejidos de los daños mediados por el sistema inmune, tanto a través de la protección contra el estrés oxidativo como de la inmunomodulación local (Otterbein et al. 2000; Pae et al. 2003). En el primer caso reportado de deficiencia genética de HO-1 en humanos, el paciente presentó alteraciones patológicas en el endotelio y un aumento en la sensibilidad frente al estrés oxidativo (Yachie et al. 1999). Ratones deficientes en HO-1 presentaron enfermedades inflamatorias crónicas (Poss y Tonegawa 1997). Esplenocitos aislados de estos animales expresaron mayores niveles de citoquinas proinflamatorias, incluyendo a IL-1 β , IFN-y, TNF- α e IL-6 en respuesta al tratamiento con LPS en comparación con las mismas células de animales salvajes (Kapturczak et al. 2004). La respuesta anti-inflamatoria de HO-1 se ha adjudicado al producto de su reacción enzimática, el CO. Así se propuso que HO-1 modula la respuesta de los linfocitos T, dado que el CO al inhibir la secreción de IL-2 suprime la activación y proliferación de linfocitos T CD4+ (Pae et al. 2004). Asimismo, la exposición de linfocitos T activados a bajas concentraciones de CO produjo efectos antiproliferativos (Song et al. 2004). La inhibición de la actividad de HO-1 por tratamiento con estaño mesoporfirina (SnMP, inhibidor de la actividad enzimática de HO-1) indujo la maduración, proliferación y activación de linfocitos T naive (Burt et al. 2010). Otra subpoblación influenciada por HO-1 son los linfocitos T regulatorios los cuales expresan dicha proteína en forma constitutiva (Pae et al. 2003). Se reportó que la inhibición farmacológica de HO-1 suprimió la función inmunosupresora de los linfocitos T regulatorios in vitro (Choi et al. 2005). Sin embargo, en ratones deficientes en HO-1, el desarrollo y la actividad de estas células no sufrió alteraciones (Zelenay et al. 2007). Es así que la modulación de la expresión de HO-1 podría tener un gran impacto clínico cuando se desea la tolerancia, como en un transplante, o el aumento de la inmunogenicidad, como en el cáncer (Simon et al. 2011). Otros estudios han mostrado que HO-1 modula las propiedades inmunosupresoras de células madre mesenquimales (MSCs). La invección de MSCs

demoró el rechazo de un injerto cardíaco; sin embargo la inhibición simultánea de HO-1 lo indujo, revirtiendo completamente el efecto protector de las MSCs en el injerto cardíaco (Chabannes *et al.* 2007). Así se propuso un posible mecanismo del efecto anti-inflamatorio de HO-1, producto de una inhibición de las células presentadoras de antígenos (Listopad *et al.* 2007). Resulta interesante destacar que HO-1 puede contribuir a la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo semejante a los macrófagos asociados a tumores (TAMs) (Weis *et al.* 2009). Los TAMs cumplen un rol importante en la inflamación asociada al cáncer, ya que favorecen, entre otras, a la proliferación celular, la angiogénesis y la remodelación de la matriz, impactando finalmente en la progresión de la enfermedad (Solinas *et al.* 2009).

Si bien no se conocen exactamente los mecanismos responsables de la función antiinflamatoria de HO-1, la señalización mediada por CO, combinada con las propiedades anti-oxidantes de biliverdina/bilirrubina y el secuestro de hierro mediado por ferritina podrían contribuir a ejercer dicho rol.

Hipótesis y Objetivos
I. Hipótesis

La angiogénesis se encuentra relacionada a la agresividad, el crecimiento y la diseminación tumoral siendo VEGF uno de los mediadores más importantes en este proceso. Se ha demostrado que HO-1 cumple un rol en la angiogénesis, con influencias positivas o negativas dependiendo de las condiciones del ambiente: la inducción de la angiogénesis mediada por VEGF requiere la actividad de HO-1; mientras que en condiciones inflamatorias, la formación de nuevos vasos sanguíneos se atenúa por la sobre-expresión de HO-1. **Nuestra primera hipótesis es que la expresión de HO-1 en células de PCa impactará sobre la angiogénesis tumoral.**

En trabajos previos de nuestro laboratorio hemos demostrado la reactividad positiva de HO-1 en muestras de pacientes con PCa. A su vez, hemos demostrado que la modulación de la expresión de HO-1 en células tumorales de próstata impacta en los procesos biológicos *in vitro* y retarda el crecimiento tumoral *in vivo*. La sobreexpresión de HO-1 también reprime la expresión de genes pro-inflamatorios. Una de las principales características de este tipo de cáncer es su alta predilección por dar metástasis óseas. Dentro del hueso, los osteoblastos son las células responsables de modular la diferenciación y activación de los osteoclastos, y cumplen un rol importante como mediadores entre estos últimos y las células cancerígenas. **Nuestra segunda hipótesis es que HO-1 estaría cumpliendo un rol en las metástasis óseas del PCa afectando al microambiente del hueso.**

II. Objetivo general

Estudiar el rol de hemo oxigenasa-1 en la progresión del cáncer de próstata.

III. Objetivos específicos

A. Estudiar el efecto de HO-1 sobre la angiogénesis tumoral.

- Evaluaremos mediante ensayos *in vitro* la expresión de genes involucrados en la angiogénesis en la línea celular PC3 con sobreexpresión estable de HO-1.
- : Utilizando un modelo de angiogénesis *in vivo* analizaremos el índice angiogénico y la expresión de marcadores pro-angiogénicos.

B. Estudiar el efecto de HO-1 sobre la interacción de las células de PCa y el hueso

Para cumplir este objetivo utilizamos diferentes modelos experimentales.

 Empleando líneas celulares humanas de PCa, con distinto perfil de propagación al hueso estudiaremos:

1. Mediante un sistema de co-cultivo de células PC3 bajo inducción farmacológica de HO-1 y cultivos primarios de osteoblastos de ratón:

- La proliferación y diferenciación de los osteoblastos.
- La expresión de genes involucrados en la resorción ósea tanto en osteoblastos como en células de PCa.
- Los niveles de estrés oxidativo y las vías de señalización activadas en los osteoblastos.

2. Mediante un sistema de co-cultivo de células PC3 bajo inducción farmacológica de HO-1 y explantes de calvarias de ratón:

- La formación de hueso.

3. Mediante un sistema de co-cultivo de células MDA PCa 2b con silenciamiento genético de HO-1 y cultivos primarios de osteoblastos de ratón:

- La expresión de genes involucrados en la diferenciación, la modulación de la resorción ósea, la proliferación y de enzimas anti-oxidantes en los osteoblastos.
- La expresión de PSA en las células tumorales.
- Empleando tumores generados por inyección intra-ósea de la línea celular PC3HO-1 y su control estudiaremos:
 - El impacto en la remodelación ósea
 - La tasa de mitosis de las células tumorales.
- : Empleando *microarrays* de metástasis de pacientes CRPC creciendo como xenotransplantes en ratones *SCID* estudiaremos:
 - La expresión y localización sub-celular de HO-1.

Materiales y Métodos

1. Cultivo de células

1.1 Líneas celulares utilizadas

PC3: Línea celular establecida de una metástasis ósea que 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. Posee bajos niveles endógenos de HO-1 (Gueron *et al.* 2009).

PC3HO-1 y PC3βgal: Clones derivados de PC3 que sobre-expresan HO-1 y su control. Fueron establecidos en nuestro laboratorio (Gueron *et al.* 2009) por medio de una transfección en forma estable con el plásmido de expresión pcDNA3HO-1 y pcDNA3β-galactosidasa, respectivamente.

 MDA PCa 2b: Línea celular establecida de una metástasis ósea que 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.
Posee altos niveles endógenos de HO-1 (Gueron *et al.* 2009).

MDA PCa 2b shHO-1 y MDA PCa 2b shControl: Clones derivados de MDA PCa 2b con silenciamiento de la expresión de HO-1 y su control. Fueron establecidos durante la presente tesis doctoral mediante la infección con lentivirus que codifican para shRNA HO-1 y shRNA control.

° C2C12: Línea celular de mioblastos de ratón (Yaffe y Saxel 1977). Estas células son utilizadas para estudiar el mecanismo de la diferenciación de los osteoblastos. Fueron gentilmente donadas por la Dra. Lorena Milanesi del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur.

1.2 Condiciones de crecimiento

Las células PC3 y sus clones derivados por transfección estable, se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con L-glutamina, bicarbonato de sodio 0,2% m/V, suero fetal bovino 10% (SFB) y antibióticos (penicilina 100 U/mI, estreptomicina 100 μ g/ml y anfotericina 0,5 μ g/ml) en una atmósfera húmeda con CO₂ 5%, a 37°C. A los clones PC3HO-1 y PC3 βgal se les adicionó 50 μ g/ml de G418 (Sigma-Aldrich).

La línea celular MDA PCa 2b se mantuvo en medio BRFF-HPC1 (AthenaES) suplementado con SFB 20% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100

 μ g/ml y anfotericina 0,5 μ g/ml) en una atmósfera húmeda con CO₂ 5%, a 37°C. Las placas de cultivo fueron previamente revestidas con FNC Coating Mix (AthenaES) para favorecer la adherencia de las células. A los clones MDA PCa 2b shHO-1 y MDA PCa 2b shcontrol se les adicionó 4 μ g/ml de puromicina.

La línea celular C2C12 se creció en medio DMEM baja glucosa (Invitrogen) suplementado con SFB 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml y anfotericina 0,5 μ g/ml) en una atmósfera húmeda con CO₂ 5%, a 37°C.

1.3 Mantenimiento de las células

Las líneas celulares se crecieron en placas de 100 mm de diámetro con 10 ml de medio de cultivo. Cuando los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia se repicaron realizando un lavado con 5 ml de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; Na₂HPO₄ 10,1 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM; pH 7,4) y una incubación con 1 ml de tripsina-EDTA (0,25% en PBS) durante 1-3 min en estufa a 37°C. El efecto de la tripsina se interrumpió por dilución con medio de cultivo. Las células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min y se sembraron en placas de 100 mm de diámetro.

El *stock* de las líneas celulares se realizó mediante criopreservación. Para esto, cuando los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia, las células fueron tripsinizadas como se describió anteriormente, centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 min y luego resuspendidas en medio de cultivo 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 48 h las células fueron transfer idas a nitrógeno líquido.

2. Generación de líneas celulares estables

2.1 Infección con lentivirus

Las células MDA PCa 2b se sembraron en placas de seis pocillos en una densidad de 42.000 células/cm². A las 24 h se removió el medio de cultivo y se agregó 1 ml de medio completo junto a un clon de lentivirus que codifica un shRNA específico para silenciar la expresión de HO-1 (MISSION Lentiviral Transduction Particles, Sigma-Aldrich) (Tabla 1) y polibreno (8 µg/ml, Sigma-Aldrich) para aumentar la eficiencia de

la infección. Como control las células MDA PCa 2b se infectaron con un lentivirus control que activa al complejo RISC pero que no reconoce ninguna secuencia específica en humanos (MISSION Non-Target shRNA Control Transduction Particles, Sigma-Aldrich).

Tabla 1. Secuencias de clones de lentivirus para silenciar HO-1 humana.

N°	Nombre del clon	Secuencia
52	NM_002133.1-888s1c1	CCGGTGGGTCCTTACACTCAGCTTTCTCGAGAAAGCTGAGTGTAAGGACCCATTTTTG
51	NM_002133.1-281s1c1	CCGGCAACAAGGAGAGCCCAGTCTTCTCGAGAAGACTGGGCTCTCCTTGTTGTTTTTG
50	NM_002133.1-918s1c1	CCGGACAGTTGCTGTAGGGCTTTATCTCGAGATAAAGCCCTACAGCAACTGTTTTTG
49	NM_002133.1-795s1c1	CCGGCGGGCCAGCAACAAAGTGCAACTCGAGTTGCACTTTGTTGCTGGCCCGTTTTTG
48	NM_002133.1-171s1c1	CCGGGCTGAGTTCATGAGGAACTTTCTCGAGAAAGTTCCTCATGAACTCAGCTTTTTG

Al cabo de 7 h, se agregó 1 ml de medio de cultivo completo. Luego de 24 h se removió el medio, se agregó medio fresco y después de 48 h de iniciada la infección, se utilizó medio de cultivo junto al antibiótico puromicina (8 µg/ml) para seleccionar a las células infectadas. Durante 10 días en total las células se seleccionaron con puromicina 8 µg/ml, cambiando el medio día por medio, y luego se mantuvieron con una dosis de puromicina 4 µg/ml. Se extrajo el ARN (ver Materiales y Métodos 6.1) y mediante RTqPCR (ver Materiales y Métodos 6.4) se seleccionó al *pool* de MDA PCa 2b con la expresión de HO-1 más baja. Debido a que las células MDA PCa 2b no pueden crecer cuando están en muy baja confluencia, se decidió trabajar con el *pool* de células infectadas con el clon de lentivirus que haya obtenido el menor porcentaje de expresión de HO-1.

3. Aislamiento de PMOs

Se trabajó con cultivos primarios de osteoblastos de ratón (PMO, *Primary Mouse Osteoblasts*). Estos fueron aislados de las calvarias de ratones *CF-1* de 2 a 4 días de edad. Las calvarias fueron diseccionadas y lavadas en PBS estéril. Se digerieron en un baño en agitación a 37°C, durante 10 min, en medio αMEM (Invitrogen) con colagenasa P 0,1 mg/ml (Roche), tripsina-EDTA 2,5%, estreptomicina y penicilina. También fueron agitadas suavemente a mano. Se descartó la suspensión enriquecida en células del tejido conectivo. Se repitió la digestión agitando durante 20 min. Se recogió la suspensión enriquecida en osteoblastos (PMOs) y se

centrifugó durante 5 min, a 1.000rpm. Se repitió la agitación durante otros 20 min y los pasos subsiguientes durante 3 veces más. Finalmente, se juntaron los PMOs recolectados en placas de 150 mm de diámetro y se cultivaron en medio α MEM con SFB 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml) en una atmósfera húmeda con CO₂ 5%, a 37°C. Siempre se trabajó con cultivos frescos de PMOs (72 h luego de la extracción) ya que se encuentran en una etapa proliferativa, en la cual se forma una monocapa confluente y las células expresan marcadores de diferenciación de osteoblastos, tales como ALP y colágeno tipo I.

4. Tratamiento con Hemina

La hemina es un inductor específico de la actividad y expresión de HO-1.

- Para preparar la solución *stock*: Se pesaron 36 mg de cloruro de hemina (Sigma-Aldrich) y se disolvieron en 0,4 ml de NaOH 0,5N; 0,5 ml de Tris-HCl 1M (pH 8) y 0,1 ml de PBS. A continuación se filtró para esterelizarla, se alicuotó y se conservó a -20℃. Inmediatamente antes de su uso se realizó una dilución en PBS 1:100, obteniéndose una nueva solución *stock* 550 µM. Luego se diluyó en medio RPMI 1640 hasta obtener una concentración final 80 µM.
- Tratamiento: Se removió el medio de cultivo de las células PC3 y se les adicionó el medio RPMI 1640 completo conteniendo hemina en una concentracion final de 80 µM, durante 24 h.

5. Co-cultivo

5.1 Co-cultivo de osteoblastos con células PC3

En el inicio del experimento (día 0) se sembraron 100.000 células PC3 en insertos para placas de seis pocillos (#353090, Becton Dickinson) los cuales poseen en su base poros de 0,4 µm en una densidad 2,0 \pm 0,2 x 10⁶ / cm², permitiendo el paso de pequeñas moléculas. Al día siguiente (día 1) se trató a estas células con hemina en una concentración final de 80 µM durante 24 h (hasta el día 2), para inducir la expresión y actividad de HO-1, o en condiciones control (sin agregado de hemina). En el día 1 también se sembraron en otras placas de 6 pocillos los PMOs (75.000 células/pocillo, aislados 72 h antes). En el día 2 se removió el medio de cultivo de los

PMOs y se agregó 2 ml de medio αMEM suplementado con antibióticos y SFB 2%. A su vez, en los insertos con las células PC3 pre-tratadas o no con hemina se realizaron tres lavados exhaustivos con PBS. Una vez terminados, los insertos se colocaron en las placas donde estaban cultivados los PMOs y se les agregó 2 ml de medio αMEM suplementado con antibióticos y SFB 2%. De esta manera, ambas poblaciones celulares comparten el medio de cultivo pero no están en interacción física directa. Como control, se cultivaron células PC3 solas pre-tratadas o no con hemina y PMOs creciendo solos (en ausencia de PC3). Cada condición experimental se realizó por triplicado. El co-cultivo se llevó a cabo por 24 h y en el día 3 se cosecharon las células para realizar distintos ensayos (Fig. 23).



Figura 23. Diseño experimental del co-cultivo. Esquema de los pasos realizados desde el día 0 donde se plaquean las células PC3 hasta el día 3 donde se cosechan las células. En el día 1 se plaquean los PMOs siempre aislados 72 h antes de la calvaria de ratones de 2-4 días de edad.

5.2 Co-cultivo de osteoblastos con células MDA PCa 2b

El protocolo fue muy similar al detallado en la sección 5.1, con la diferencia que el mismo día que se sembraron las células MDA PCa 2b en los insertos para placas de seis pocillos, también se sembraron en otras placas de seis pocillos los PMOs aislados 72 h antes (día 0). En el día 1 se co-cultivaron las células o se dejaron en condiciones control sin co-cultivar y en el día 2 se cosecharon. Esta variación en el protocolo respecto al correspondiente para las células PC3 se debe a que estas últimas recibieron un pre-tratamiento con hemina antes de ser co-cultivadas (modulación farmacológica de HO-1). Esto no fue necesario para las MDA PCa 2b ya que se trabajó con *pooles* estables en los cuales la expresión de HO-1 fue silenciada genéticamente (MDA PCa 2b shHO-1 y MDA PCa 2b shControl).

6. Análisis de la expresión génica a nivel del ARN mensajero

6.1 Aislamiento del ARN

Para extraer el ARN total de las células se utilizó "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 β -mercaptoetanol 1%. Se cosecharon, y la solución se homogeneizó utilizando una aguja 22G. Se agregó etanol 70% (v/v) y se lo colocó en una columna RNeasy, la cual se centrifugó a 6.700 g por 30 seg. Se descartó el eluído, se agregó a la columna buffer de lavado RWI y se centrifugó nuevamente a 6.700 g por 30 seg. Se descartó el eluído, se agregó buffer de lavado RPE y se volvió a centrifugar a 6.700 g por 30 seg. Nuevamente se descartó el eluído y se procedió a centrifugar sin el agregado del buffer para aumentar la pureza de la muestra. Se eluyó el RNA retenido en la columna con 30 µl de agua libre de nucleasas y el eluído se conservó a -70° C.

6.2 Cuantificación del ARN

La concentración del ARN obtenido se midió realizando una dilución de la muestra 1:140 con H_2O (d) y midiendo la absorbancia (A) a 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant Pro, Amersham Biosciences). El grado de pureza de la muestra se

estimó como el cociente entre A^{260nm} / A^{280nm}. Si la concentración del ARN era mayor a 1 µg/µl con una pureza mayor a 1,7 se procedió a la retro-transcripción para la obtención del ADNc (ADN copia).

6.3 Preparación del ADNc: Transcripción reversa o retrotranscripción (RT)

El ADNc se sintetizó a partir del ARN total mediante la transcripción reversa o retrotranscripción (RT) utilizando el kit RevertAid RT (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubó 0,5 - 1 µg de ARN con Oligo dT (concentración final 0,025 µg/µl) y agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 12 µl. Se desnaturalizaron las muestras a 65°C dura nte 5 min. Luego se agregó la mezcla de reacción obteniendo así una solución final con buffer de reacción 1X, dNTPs 0,5 mM, inhibidores de RNAsas 1U/µl y transcriptasa reversa 10 U/µl. Se incubó durante 60 min a 42°C. La reacción se inacti vó a 70°C durante 5 min. El ADNc obtenido se utilizó en reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) o se conservó a -20°C. Como control se realizó el mismo protocolo pero sin el agregado de la enzima transcriptasa reversa (NoRT).

6.4 PCR en tiempo real o cuantitativa

El ADNc se amplificó por qPCR utilizando el kit Taq DNA Polimerasa (Fermentas). Se amplificó 1 μ l de una dilución 1:5 del ADNc, obtenido en la RT, en una mezcla de reacción conteniendo el buffer de reacción 1X; MgCl₂ 2 mM; oligos específicos 0,4 μ M; dNTPs 0,2 mM; 0,025 μ l de SYBRgreen y Taq DNA polimerasa recombinante 0,03 U/ μ l (Fermentas) en un volumen final de 25 μ l.

Los *primers* utilizados se diseñaron con el programa Beacon Designer 5, se testearon con el UCSC Genome Browser Home URL y se sintetizaron por IDT. En la Tabla 2 se encuentran las secuencias de los *primers* específicos para cada gen analizado en humanos y en la Tabla 3 para los genes analizados en ratón. En la sección "Resultados" al nombre del gen estudiado por RTqPCR en los PMOs le antecede la letra "m" (indicando el origen murino).

Gen	primer forward (5´-3´)	primer reverse (5´ - 3´)	T ^{annealing}
β-actina	AAGATCATTGCTCCTCCTGAGC	CATACTCCTGCTTGCTGATCCA	℃ 00
HIF-1α	AGCCCTAACGTGTTATCTGTCGCT	GCTGCATGATCGTCTGGCTGCT	58°C
HO-1	GAGTGTAAGGACCCATCGGA	GCCAGCAACAAAGTGCAAG	58°C
IRGAα5	CTGGCACCCCAAGGACAGAGGT	TCGGGGGCTTCAACTTAGACGCG	58°C
PTHrP	GTCTCAGCCGCCGCCTCAA	GGAAGAATCGTCGCCGTAAA	58°C
uPA	GAGATCACTGGCTTTGGAAAA	CCAGCTCACAATTCCAGTCA	58°C
PSA	ACTGCCCTGCCACGAGAG	GTTGTCTTCCTCACCCTGTCC	58°C
TGF-β1	TACCTGAACCCGTGTTGCTC	GCGAAAGCCCTCAATTTCCC	3 00
DKK1	TTCCAGAAGAACCACCTTGT	CTAGCACAACACAATCCTGA	3 00

Tabla 2. Secuencia de primers humanos para amplificar ADNc por qPCR.

Tabla 3. Secuencia de primers murinos para amplificar ADNc por qPCR.

Gen	primer forward (5´-3´)	primer reverse (5´- 3´)	T ^{annealing}
β-actina	CCGCACGACAACCGCACCAT	CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG	℃ 00
ALP	AACCCAGACACAAGCATTCC	GAGACATTTTCCCGTTCACC	℃ 00
Catalasa	TTGCTGAAGTTGAACAGATGG	ATCACGCTGGTAGTTGGC	58°C
CCL2	TGCTACTCATTAACCAGCAAGAT	TGCTTGAGGTGGTTGTGGAA	℃ 00
Col1a1	CATGTTCAGCTTTGTGGACCT	GCAGCTGACTTCAGGGATGT	3 °00
Col1a2	GCAGGTTCACCTACTCTGTCCT	CTTGCCCCATTCATTTGTCT	℃ 00
CSF-1	CAACAGCTTTGCTAAGTGCTCTA	CACTGCTAGGGGTGGCTTTA	3 °00
Gadd45α	AGACCCCGGACCTGCACTGT	TGCCATCACCGTTCCGGGAGA	62°C
IL-6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT	GAAGTAGGGAAGGCCGTGG	3 °00
Ki-67	GCTGTCCTCAAGACAATCATCA	GGCGTTATCCCAGGAGACT	3 °00
MnSOD	CCACACATTAACGCGCAGATC	TAACATCTCCCTT GGCCAGAGC	58°C
OCN	GCAGCTTGGTGCACACCTAG	GGAGCTGCTGTGACATCCATAC	3 °00
OPG	GAAGGGCGCTACCTTGAGAT	GCAAACTGTATTTCGCTCTGG	3 °00
OPN	CTTTCACTCCAATCGTCCCTA	GCTCTCTTTGGAATGCTCAAGT	58°C
RANKL	TGATTCATGTAGGAGAATTAAACAGG	GATGTGCTGTGATCCAACGA	3 °00
Runx-2	CCGCACGACAACCGCACCAT	AGGCATTTCGGAGCTCGGCG	℃ 00

La reacción de PCR se llevó a cabo en el aparato DNA Engine Opticon (MJ Research). El programa de amplificación se detalla a continuación:

- 94°C por 2 min
- 40 ciclos: 92°C 20 seg

T^{annealing} 20 seg

72℃ 20 seg

79,5℃ 0,03 seg

Lectura de fluorescencia

Curva de *melting*: de 65 a 91℃ cada 0,2℃

Cada reacción de qPCR se realizó por duplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. 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_T . El cálculo de la inducción de la expresión de los genes analizados se basa en el método del $\Delta\Delta$ CT (Current Protocols in Molecular Biology). Se estimó el promedio de los valores de C_T para el gen incógnita y para el NoRT (ARN que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retrotranscriptasa) de la siguiente manera:

$$C_T = (C_T 1 + C_T 2) / 2$$

La diferencia en los valores de C_T entre cada muestra y el NoRT determina el delta-C_T (Δ CT). Esto se resume en la siguiente expresión:

$$\Delta CT = (C_T NORT) - (C_T muestra)$$

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

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

$$VI_b = VI_a$$
 muestra / $VI_a \beta$ -actina

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

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 β -actina de los datos obtenidos para cada tratamiento:

$$ds = \sqrt{\frac{\sum (C_{T} - \overline{C}_{T})^{2}}{(n-1)}}$$

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 NoRT y de los C_T de β -actina (Smith *et al.* 2004), aplicando la siguiente fórmula:

E =
$$[(ds/C_T)^2$$
 muestra + $(ds/C_T)^2$ NoRT + $(ds/C_T)^2$ β-actina]^{1/2}

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

7. Análisis de la expresión de proteínas

7.1 Extracción de proteínas

Se lavaron las placas tres veces con PBS en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 10 mM y NaF 0,5 μ M) y se cosecharon con espátula con el agregado de PBS e inhibidores. Luego se centrifugó a 1.000 rpm, durante 5 min, a 4°C y el *pellet* celular se resuspendió en buffer RIPA [Tris HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 20 mM pH 8; Deoxicolato de Sodio 1%; SDS 0,1%; Tritón X-100 1%) conteniendo inhibidores de fosfatasas (NaF 0,5 μ M; ortovanadato 0,8 mM) e inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA-ALDRICH). Se incubó en hielo durante 20 min y se centrifugó a 12.500 rpm, durante 20 min, a 4°C. El sobrenadante conteniendo las proteínas totales se conservó a -80°C.

7.2 Medición de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración proteica usando el método del ácido bicinconínico (BCA, BCA 98% y CuSO₄ 2%; Sigma-Aldrich). La curva estándar se realizó utilizando cantidades conocidas de sero-albúmina bovina (BSA) disuelta en buffer de lisis RIPA. En una placa de 96 pocillos se sembraron diluciones de cada concentración para realizar la curva de BSA y 1 µl de las correspondientes diluciones de muestra. Se agregaron 200 µl de BCA y se incubó en oscuridad 30 min a 37°C. Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (BIORAD Microplate Reader, Benchmark).

7.3 Western blot

Una vez determinada la concentración de proteínas de las muestras, éstas se diluyeron con buffer de siembra (Tris-HCl 10 mM pH 8, SDS 1%, Glicerol 4%, Sacarosa 0,146 M, una punta de espátula de azul de bromofenol y DTT 10 mM ó β-mercaptoetanol 1%) y con buffer de lisis RIPA a una concentración final de 2 μ g/ μ l. Luego se calentaron durante 5 min a 95°C y una alíc uota del lisado que contenía 50 μ g de proteínas se resolvió en un gel de poliacrilamida 12%.

Los geles se armaron con Tris 0,4 M (pH 8,8); Acrilamida/Bisacrilamida 12%; SDS 0,1%; APS 0,1% y TEMED 0,24% (v/v). Las muestras de proteínas se resolvieron en una cuba de electroforesis (BIORAD POWERPAC Basic) a 80 V hasta que las muestras entraron en el gel concentrador [Tris 0,128 M (pH 6,8); SDS 0,1%; Acrilamida /Bisacrilamida 3,85%; APS 0,1% y TEMED 0,2 % (v/v)] y luego a 100 V en buffer de electroforesis (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%). Se corrió en paralelo a las muestras un marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas). Luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BIORAD POWERPAC Basic) durante 1 h a 250 mA en buffer Towbin (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1% pH 8,3) suplementado con 20 % de metanol.

Para realizar la detección de las proteínas se comenzó bloqueando los sitios inespecíficos con leche descremada en polvo o BSA 4% en TBS-T (NaCl 150 mM, KCl 2,68 mM, Tris base 24,7 mM, 0,05% de Tween-20, pH 7,4) en agitación durante 50 min. Luego las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron en agitación suave a 4°C durante 16 h con los diferentes anticue rpos primarios diluidos en TBS-T y BSA 0,4%: HO-1 policional de conejo (1:5000) (Stressgen Biotechnologies Corp.), actina- β policional de ratón (1:5000) (Sigma-Aldrich), β -catenina monocional de ratón (1:5000) (BDBiosciences), β -Tubulina policional de ratón (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology), Ciclina B1 monocional de ratón (1:200) (Santa Cruz Biotechnology), Ciclina D1 monocional de ratón (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) o p21 monocional de ratón (1:200) (Santa Cruz Biotechnology) o p21 monocional de ratón (1:200) (Santa Cruz Biotechnology). Luego se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-T y las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti conejo (1:5000) o anti ratón (1:5000), según el anticuerpo primario utilizado, acoplados a

peroxidasa y diluidos en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente. Luego las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min 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. Alternativamente, la detección se realizó con ECL no comercial mezclando 1,5 ml de Reactivo 1 (luminol 29,7 mM; Tris 68,4 mM pH 8), 1 ml de Reactivo 2 (4-iodofenol 18,2 mM; Tris 10,4 mM pH 8), 100 µl de Tris 1M (pH 6,8) en un volumen final de 20 ml y agregando en el momento de usar 5 µl de H₂O₂ de 30 volúmenes. 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 Image J y los resultados de normalizaron con β -actina.

8. Obtención de plásmidos

8.1 Plásmidos

Los plásmidos utilizados se describen a continuación:

VEGF-A luc: Plásmido conteniendo el promotor humano de VEGF-A río arriba del gen reportero luciferasa en el plásmido pGL2. Fue gentilmente donado por el Dr. Omar Coso, Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEyN, UBA (Mueller *et al.* 2000).



TOPflash y FOP flash: Se utilizaron para estudiar la activación de la vía Wnt/ β-catenina. El plásmido TOP flash posee cuatro sitios de unión a TCF y un sitio de unión mínimo para Fos río arriba del gen reportero de luciferasa. El plásmido control FOP flash posee los sitios de unión a TCF mutados (Fig. 24) (Korinek *et al.* 1997). Fueron gentilmente donados por la Dra. Nora Navone, MD Anderson Cancer Center, Estados Unidos.

Figura 24. Esquema de los plásmidos TOPflash y FOPflash.

Foxo-luc: Contiene 6 copias del dominio de unión al ADN de DAF-16 (ortólogo a FoxO en *C. elegans*) río arriba del gen reportero de luciferasa (Furuyama *et al.* 2000). Fue gentilmente donado por el Dr. Burgering, University Medical Center, Países Bajos.

8.2 Preparación de bacterias competentes

Se prepararon bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 α y DH10B partiendo de un cultivo de 5 ml de medio completo Luria-Bertani (LB, peptona 1% (m/v); extracto de levadura 0,5 % (m/v) y NaCl 1% (m/v), pH 7,5) sin antibiótico crecido durante toda la noche a 37°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4 a 0,6 a 600nm. Las bacterias fueron centrifugadas a 700g durante 5 min a 4°C, el *pellet* se resuspendió en 4 ml de CaCl₂ 50 mM estéril y se incubó durante 15 min en hielo. Luego se centrifugó nuevamente a 700g durante 5 min a 4°C y el *pellet* obtenido se resuspendió en 3 ml de CaCl₂ 50 mM frío y estéril y se alicuotó con 15% de glicerol y se conservó a -70°C.

8.3 Transformación de bacterias

Las bacterias competentes (100 µl) se transformaron con los plásmidos deseados (1 µg) 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 agregó 450 µl de LB sin antibiótico y se incubó durante 1 h a 37°C. Para seleccionar las bacterias transformadas se rastrillaron 100 µl de cultivo en una placa de LB agar con 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante 16 h a 37°C. Se tomó una colonia con un tip y se creció en 2 ml de medio líquido LB con ampicilina durante 4 h. Luego, se inoculó en 100 ml de LB con ampicilina y se crecieron durante 16 h a 37°C en agitación. Se preparó un *stock* con 15 % de glicerol (400 µl de cultivo con bacterias y 100 µl de glicerol 75%) y se guardó a -70°C. El resto del cultivo se utilizó para hacer la extracción de ADN plasmídico.

8.4 Aislamiento del ADN plasmídico

La extracción se llevó a cabo por el método de lisis alcalina. Para ello el medio de cultivo que contenía las bacterias se centrifugó a 6.000 g 15 min a 4°C (Sorvall SS-34) y el *pellet* se resuspendió en 10 ml de buffer de lisis P1 (Tris base 0,606 % m/V; Na₂-EDTA-2H₂O 0,372 % m/V pH 8; 50 µg/ml de RNasa A). Luego se agregó 10 ml de buffer de desnaturalización de ADN P2 (NaOH 0,8 % (m/v); SDS 20%), se mezcló por inversión, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, y luego se agregó 10 ml de buffer de renaturalización P3 (acetato de potasio 29,45 % (m/v) pH 5,5). Este método se basa en que debido a las diferencias de tamaño entre el ADN cromosómico y el plasmídico, este último de menor tamaño, el único capaz de renaturalizar será el plasmídico. Por lo tanto, se incubó en hielo durante 20 min para favorecer su renaturalización, se procedió a centrifugar a 20.000 g durante 30 min a 4℃ conservando el sobrenadante y repitiéndolo con otra centrifugación de 15 min. El ADN se precipitó del sobrenadante obtenido con 0,7 volúmenes de isopropanol y centrifugación a 15.000 g, durante 30 min a 4°C. El pellet de ADN plasmídico se lavó con 5 ml de etanol 70 %, se centrifugó nuevamente a 15.000 g durante 10 min a 4℃, se secó y se resuspendió en 300-500 µl de buff er TE pH 8. El plásmido aislado se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (GeneQuant Pro, Amersham Biosciences) y se analizó su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa.

8.5 Electroforesis en gel de agarosa

En una cuba de electroforesis horizontal (Wide Mini-Sub GT, BioRad) se armó un gel de agarosa 1 % con bromuro de etidio (0,01 µg/ml) en buffer de electroforesis TAE (40 mM Tris-Acetato pH 8; 1 mM EDTA). Se sembró la muestra junto con el buffer de siembra (glicerol 50%; EDTA 50 mM pH 8; SDS 10 %; orange G 0.2 % m/v). También se sembró un marcador de peso molecular de 1Kb (Productos Bio-Lógicos). La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min, utilizando una fuente de poder (PowerPac Basic, BioRad). Los plásmidos se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz UV (G:Box, Syngene).

9. Ensayo de genes reporteros

9.1 Transfección

Se plaquearon 75.000 células C2C12 en placas de 6 pocillos. Al día siguiente se removió el medio y se lavaron 3 veces con PBS. A cada pocillo se le agregó 400 µl de medio DMEM solo y gota a gota 100 µl de medio conteniendo 8 µg de PEI y 4 µg de plásmido. Al cabo de 6 h en estufa a 37°C con at mósfera de CO₂ 5 % se les agregó medio DMEM con antibióticos y 2% SFB. En ese momento se co-cultivaron con células PC3 pre-tratadas o no con hemina o continuaron creciendo solas. Entre las C2C12 que habían sido transfectadas y crecían solas (sin co-cultivar) se dejaron triplicados sin ningún tratamiento y sobre otros triplicados se realizaron los controles de actividad de los reporteros. Como control positivo para el plásmido TOPflash y FOPflash como control positivo se utilizó el tratamiento de las células con H_2O_2 100 µM. A partir de ese momento, a las 24 h se cosecharon los cultivos y se midió la actividad de la luciferasa en las células C2C12.

9.2 Medición de luciferasa

Se midió la actividad de luciferasa utilizando el reactivo Steady Glo Luciferase System (Promega), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las células se lavaron tres veces con PBS, se lisaron por incubación durante 15 min a temperatura ambiente, en oscuridad, con 70 µl de RPMI sin rojo fenol y 40 µl de reactivo de

luciferasa. La actividad de luciferasa se determinó en 20 µl de cada lisado en el luminómetro Glomax Multidetection System (Promega).

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 β-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.

10. Zimografía

La actividad de MMP9 fue estudiada realizando un zimograma con gelatina. Se tomó medio condicionado de los co-cultivos y de las células sin co-cultivar. Se cuantificaron las proteínas mediante el método del ácido bicinconínico (ver Materiales y Métodos 7.2). A 50 µg de proteínas de cada muestra se les agregó buffer de siembra (Tris-HCl 10 mM pH 8, SDS 1%, Glicerol 4%, Sacarosa 0,146 M y una punta de espátula de azul de bromofenol) y se los sometió a electroforesis en SDS-PAGE conteniendo 2 mg/ml de gelatina. Luego de la corrida el gel se lavó con Triton X-100 (2,5%v/v) durante 30 min y se incubó a 37°C durante 48 h en una solución para favorecer la renaturalización de las proteínas y la actividad de la colagenasas (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10mM). Se tiñó con Coomasie Brilliant Blue y se destiñó con lavados sucesivos con una solución de metanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) hasta que la actividad gelatinolítica fue detectada por la presencia de bandas claras sobre un fondo azul.

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.

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 Image J. Los datos fueron cuantificados como veces de actividad y comparados con el control.

11. Ensayo de inmunofluorescencia

Para realizar el ensayo de inmunofluorescencia en los PMOs, se colocó en los pocillos un cubreobjetos al sembrar las células en las placas (previo al co-cultivo) para que las mismas crecieran adheridas a este. Una vez finalizado el co-cultivo, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y los PMOs fueron fijados con metanol por 20 min a 4°C. Se realizaron otros 3 lavados y las célu las se permeabilizadas con tritón 0,2% (v/v) en PBS por 15 min a temperatura ambiente. El bloqueo se llevó a cabo incubando las muestras con una solución de BSA 1% (p/v) durante 1 h, a temperatura ambiente. Luego se les agregó 150 μl del anticuerpo β-catenina (BD Biosciences #610154, dilución 1:200) y los cubreobjetos se colocaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Los cont roles negativos se realizaron incubando a las muestras con PBS en ausencia del anticuerpo primario. Al finalizar esta incubación se hicieron 3 lavados con PBS durante 10 min y se procedió a incubarlos durante 1 h a temperatura ambiente, en oscuridad, con el anticuerpo secundario específico conjugado con un fluoróforo (rojo, Alexa flúor 594, Molecular Probe Invitrogen) en PBS con BSA 1%. Se hicieron 3 lavados con PBS durante 10 min y se marcó el núcleo incubando las muestras con Hoescht durante 10 min. Se volvieron a realizar 3 lavados con PBS durante 10 min y se invirtieron los cubreobjetos sobre un portaobjetos conteniendo 10 µl de medio de montaje. Las muestras se analizaron en el microscopio Olympus IX71 con una platina motorizada (PriorScanII) y controlador para el eje Z Prior Nano ScanZ. Se utilizaron objetivos de inmersión en agua UPLSAPO 60XW 1,2 AN (Olympus). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Hamammatsu Orca-ER utilizando el software Andor IQ y procesadas con el software Image J.

12. Ensayo de proliferación celular. Incorporación de ³H-Timidina

Durante las últimas 4 h de co-cultivo, se agregó a las células ³H-Timidina (1 μ Ci ³H-Timidina /ml (Amersham Biosciences)). Finalizada la incubación se removió el medio y se lavaron las células 2 veces con PBS frío. Se fijaron con metanol frío durante 10 min a 4°C y se lavaron nuevamente 2 veces con PBS. Se incubó con tricloroacético 5% durante 30 min a 4°C y se lavó con PBS. A cada p ocillo se le agregaron 500 μ l de NaOH 0,5N/SDS 0,5% y se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Se colocaron en viales con líquido de centelleo y la radioactividad incorporada se cuantificó en un contador de centelleo (Bekman) (Freshney 1994).

13. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo

Finalizado el co-cultivo, las células fueron cosechadas, tripzinizadas y lavadas con PBS frío. Las células se resuspendieron en 1,5 ml de PBS frío y fueron a un tubo Eppendorf. Se agregaron 3,5 ml de etanol 96 % en pulsos de 700 µl con agitación suave en vortex donde fueron fijadas por 30 min a 4 °C (las células se almacenaron -20 °C previo a la tinción y hasta el momento del análisis por citometría de flujo). Las células resuspendidas en etanol fueron centrifugadas 4 min a 3.000 rpm y lavadas con 5 ml de PBS frío. Se utilizó ioduro de propidio como colorante para el análisis del ciclo celular (Krishan 1975), el cual se intercala en la cavidad mayor de la doble cadena del ADN y produce una aducto altamente fluorescente que puede ser excitado a 488 nm con un ancho de emisión centrado en alrededor de 600 nm. Dado que el ioduro de propidio también puede unirse al ARN, es necesario tratar a las células con RNAsa para una óptima resolución del ADN. De esta manera, se realizó la marcación resuspendiendo el pellet celular en 500 µl de PBS con 50 µg/ml de ioduro de propidio y 120 µg/ml de RNAsa A e incubando 1 h a 37℃ en oscuridad. La distribución del ciclo celular se analizó en el citómetro de flujo BD FACS ARIA II y se estudió el porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular utilizando el software WinMDI 2.9.

14. Análisis de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo

Una vez finalizado el co-cultivo, los PMOs se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 5,6-clorometil-2'7'-diclorodihidro-fluoresceína diacetato (CM-

H₂DCFDA, Invitrogen) preparado en medio de cultivo RPMI sin rojo fenol durante 1 h a 37℃ en oscuridad (a partir de este momento siemp re se trabajó en oscuridad). Luego se lavaron las células, se tripsinizaron y se agregó RPMI sin rojo fenol con SFB10% para detener la tripsinización. Se pasaron las muestras a Eppendorfs, y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min, se lavaron con PBS y se centrifugaron nuevamente a 1.000 rpm otros 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en 300 µl de PBS. La distribución de la población celular se analizó mediante citometría de flujo (BD FACS ARIA II) y los resultados se analizaron con el software WinMDI2.9 (Eruslanov y Kusmartsev 2010).

15. Tinción de Von Kossa

Este método se utiliza para el estudio de la formación de partículas de fosfato de calcio durante el crecimiento óseo. El nitrato de plata forma fosfato de plata insoluble en presencia de iones fosfato. Cuando se somete a un agente reductor se forma plata elemental de color negro. De esta manera, los PMOs luego del co-cultivo con las células tumorales o cultivados solos se lavaron con PBS y se incubaron durante 5 min con AgNO₃ 1%. Posteriormente se lavaron con H₂O (d) por 10 min y se incubaron durante 5 min con sodaformol. Se realizaron lavados con agua de la canilla por 10 min y se procedió a incubar las muestras con Na₂SO₃ durante 5 min. Por último, se realizaron lavados nuevamente con agua de la canilla por 10 min. Una vez finalizada la tinción, las placas fueron fotografiadas y se analizó la presencia de precipitado negro.

16. Ensayos de inmunohistoquímica

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído 4%, se embebieron en parafina formando un taco, se cortaron en secciones de 5 µm y se montaron sobre portaobjetos. Luego, los cortes se desparafinaron con xileno y con tolueno. Se hidrataron con etanol en concentraciones decrecientes y con agua destilada. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H_2O_2 durante 10 min. Luego se realizaron lavados con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 2% en PBS durante 20 min. La recuperación de antígenos se llevó a cabo con microondas (750W, 3 veces durante 1 min) en buffer citrato de sodio 10 mM (pH 6). Las muestras se incubaron con el anticuerpo específico durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda (HO-1 policlonal: #SPA-896, Stressgen Biotechnologies Corp.; MMP9: #sc-21733, Santa Cruz Biotechnology; VEGFR2: #55B11, Cell Signaling; CD34: #14-0341-81, eBioscience; Ki-67: Clone SP-6, Bio SB). Los controles negativos se realizaron incubando a las muestras con PBS en ausencia del anticuerpo primario. Al día siguiente se lavaron y se detectó la señal del anticuerpo primario utilizando el kit para inmunohistoquímica LSAB + DAKO Peroxidasa (HRP). Las muestras se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG biotinilado por 30 min y por último con estreptavidina conjugada con peroxidasa por otros 30 min. La reacción peroxidasa con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) formó un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. La contratinción fue realizada con hematoxilina y montados en forma definitiva con bálsamo para su posterior evaluación.

Los preparados fueron analizados por el patólogo, Dr. Roberto Meiss (Academia Nacional de Medicina). La evaluación de los resultados se realizó señalando la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de la marcación y en los casos positivos, clasificando la intensidad se clasificó como leve (+), moderada (++) o intensa (+++), especificando la localización celular de la misma y la localización tisular de las células positivas.

17. Tinción tricrómica de Masson

Es una técnica de coloración especial que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia; también evidencia, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno.

Se comenzó desparafinando las muestras con xileno e hidratándolas con etanol en concentraciones decrecientes y con agua destilada. Se trataron las muestras con Hematoxilina de Weigert durante 5 min y luego se lavaron 10 min con agua de la canilla. A continuación, se utilizó Fucsina de Ponceau durante otros 5 min, ácido fosfotúngstico 5% 5 min, Verde luz otros 5 min y se lavó con agua destilada. Finalmente, se deshidrataron y montaron para su posterior evaluación por el Dr. Roberto Meiss (Academia Nacional de Medicina)

18. Ensayo de angiogénesis in vivo

El ensayo de angiogénesis in vivo se realizó de acuerdo al método previamente descripto (Davel et al. 2004). Se utilizaron ratones machos atímicos (nu/nu) de 6 a 8 semanas de edad con peso mínimo de 20 g de acuerdo con "Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia" (United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research). Los ratones se dividieron en forma azarosa en 2 grupos: PC3HO-1 y PC3βGal. Se invectaron 2 x 10⁵ células en RPMI junto a una gota del colorante azul de tripán intradérmicamente en el flanco derecho del ratón. El vehículo (RPMI junto a una gota de azul de tripán) se inyectó en el flanco contralateral de cada ratón. Al cabo de 6 dias se sacrificaron los ratones por dislocación cervical, se diseccionaron las pieles y se las fotografiaron del lado interior de la piel en el sitio de las invecciones. Para esto se utilizó una lupa (Carl Zeiss, Stemi 2000-C) acoplada a una cámara fotográfica (Canon digital power shot A-640 camera, 10 megapixels and optic zoom 4X). Los vasos de pequeño y mediano calibre adyacentes al tumor y del lado contralateral se cuantificaron a una magnificación 40X. La densidad de la vascultura se calculó de acuerdo a la cantidad de vasos por mm². Se realizaron 3 experimentos independientes con 5, 5 y 7 animales por condición en cada experimento. Este ensayo fue realizado en colaboración del Dr. Lucas Colombo (Instituto de Oncología, Ángel H. Roffo).

19. Cultivo de explantes de órganos

Se extrajeron las calvarias de ratones CF1 (2 a 4 días de edad) y se cortaron a lo largo de la línea media. La mitad derecha se usó como control y la mitad izquierda se utilizó para el tratamiento. Las calvarias se mantuvieron en medio BGJ (Sigma-Aldrich) conteniendo BSA fracción V de Cohen 0,1% en insertos dentro de placas de 24 pocillos. Luego de 24 h se co-cultivó una mitad de la calvaria con PC3 pre-tratadas con hemina y la otra mitad con PC3 sin pre-tratar, durante 7 días renovando cada 24 h las células PC3 tratadas o no con hemina. Como control interno de la técnica se incubó una de las mitades de la calvaria en condiciones control y la otra mitad tratada con insulina (20 µg/ml, inductor de la formación de hueso). Una vez terminado el experimento las calvarias fueron fijadas en formalina tamponada y procesadas para el análisis histológico e inmunohistoquímico (Garrett 2003).

20. Inyección intra-ósea de células PC3HO-1 y PC3βgal en ratones SCID

La inyección intra-ósea de los tumores se realizó de acuerdo al método previamente descripto (Yang J. *et al.* 2001). Se utilizaron ratones machos adultos *SCID*, los cuales fueron anestesiados con inyecciones intra-musculares de ketamina 100 mg/kg y acepromacina 2,5 mg/kg. Se inyectaron 3×10^5 células PC3HO-1 o PC3βgal en 5 µl de medio en la cabeza distal del fémur izquierdo de cada ratón. Dos semanas después se tomaron radiografías mediante rayos X, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se diseccionaron tanto las patas inyectadas (izquierdas) como las control (derechas) para su estudio histológico donde se realizaron tinciones de Hematoxilina & Eosina, inmunohistoquímicas de HO-1 y se calculó el índice mitótico de las células tumorales. Este ensayo fue realizado por duplicado con grupos de 5 y 7 animales en cada experimento en el laboratorio de la Dra. Nora Navone, en el MD Anderson Cancer Center, Houston, Estados Unidos.

21. Inyección subcutánea de células PC3HO-1 y PC3βgal en ratones nu/nu

Se utilizaron muestras de tumores derivados de PC3HO-1 o PC3βgal creciendo como xenotransplantes en ratones *nu/nu* durante 23 días (largo plazo) desarrollados durante la tesis doctoral de Geraldine Guerón. Brevemente, ratones machos *nu/nu* de seis a ochos semanas de edad y con un peso aproximado de 20 g. Se inyectaron subcutáneamente 3,6 x 10⁶ células (PC3HO-1 o PC3βgal, en 200 µl de RPMI) en el flanco derecho de los animales. Al cabo de 23 días los tumores se extirparon y se procesaron para su posterior análisis inmunohistoquímico.

Resultados

CAPÍTULO I: ROL DE HO-1 EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL DEL PCa

I.1 HO-1 reprime la expresión de genes pro-angiogénicos en células PC3

En nuestro laboratorio generamos la línea PC3HO-1, la cual se desarrolló mediante la transfección estable de la línea celular PC3 con el plásmido de expresión pcDNA3HO-1 (gentilmente cedido por Dr. M. Mayhofer, Clinical Institute for Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, University of Vienna, Austria) y posterior selección de las células transfectadas por la resistencia al antiobiótico G418. Las células PC3βgal se utilizaron como control y se desarrollaron con el mismo procedimiento pero transfectándolas con el plásmido pcDNA3βgalactosidasa. Se seleccionó un clon que expresaba 5 veces la proteína HO-1 respecto a las células control (Gueron *et al.* 2009).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, mediante el análisis de un *array* de genes involucrados en inflamación y angiogénesis de células de PCa que sobre-expresan HO-1 y sus controles (*RT-qPCR Oligo GEArray*[®] *Human Angiogenesis Microarray analysis*), se demostró que la expresión aumentada de HO-1 se correlacionaba con la represión de varios genes pro-inflamatorios y pro-angiogénicos tales como ANGPT1 (angiopoietina 1), ANGPTL3 (angiopietina tipo 3), FIGF (factor de crecimiento inducido por c-fos), IL-6, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y THBS1 (trombospondina 1) (Gueron *et al.* 2009). En este trabajo de tesis decidimos evaluar el efecto represor de la sobre-expresión de HO-1 mediante RTqPCR en algunos de los genes del *array* e incluir otros genes involucrados en el proceso angiogénico (por ejemplo, integrinas).

Actualmente, la integrina $\alpha_5\beta_1$ es una de las integrinas mejor caracterizada por su función en el cáncer y su contribución a la angiogénesis. De acuerdo con los hallazgos previamente descriptos por nosotros sobre el efecto represor de HO-1 en la expresión de genes angiogénicos, los niveles del ARNm de la subunidad α_5 (IRGA α 5) se encontraron significativamente reducidos (50%, *P*<*0,05*) en las células PC3 que sobre-expresaban HO-1 comparadas a su control (Fig. 25 A). También se observó una reducción del 60% en los niveles del transcripto de HIF-1 α (*P*<0,05) (otro gen relevante en la cascada angiogénica) en las células PC3HO-1 comparadas con las PC3 β Gal (Fig. 25 B). De todos los genes pro-angiogénicos inducidos por

CAPÍTULO I: ROL DE HO-1 EN LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL DEL PCa

HIF-1α, VEGF es uno de los más destacados por sus potentes propiedades angiogénicas y por estar expresado en muchos tipos de cánceres humanos, incluyendo el PCa. En concordancia con esta observación, las células PC3HO-1 mostraron una reducción tanto en los niveles del ARNm de VEGF-C (70%, *P*<0,05) como de VEGF-A (30%, *P*<0,05) en comparación con el control PC3βGal (Fig. 25 C y D). Para examinar el efecto de la inducción de HO-1 en la activación transcripcional de VEGF-A, las células se transfectaron con un plásmido conteniendo el promotor de VEGF-A humano clonado río arriba del gen de la luciferasa. Se demostró que la sobre-expresión de HO-1 en las células PC3 inhibió significativamente la actividad transcripcional del promotor de VEGF-A (Fig. 25 E).



Figura 25. HO-1 regula negativamente la expresión de genes pro-angiogénicos en células PC3. Las células PC3 fueron establemente transfectadas con el plásmido pcDNA3HO-1 (PC3HO-1) o con el plásmido vacío pcDNA3βgal (PC3βgal). Se analizó los niveles de expresión de los mRNA de (A) la subunidad α_5 de la integrina $\alpha_5\beta_1$, (B) HIF-1 α , (C) VEGF-C y (D) VEGF-A mediante RTqPCR. Los valores se normalizaron con β -actina. (E) Las células PC3HO-1 y PC3βgal se transfectaron con VEGF-A luc. Luego fueron lisadas y se realizó el ensayo de actividad de la luciferasa. Los valores se normalizaron con la cantidad de proteínas totales. * Diferencia significativa (*P*<0,05).

I.2 HO-1 inhibe la angiogénesis in vivo

En los tumores, la densidad de vasos sanguíneos es un marcador importante del pronóstico de la enfermedad y un factor predictivo independiente de los estadíos patológicos y el potencial maligno del PCa (Joseph *et al.* 1997).

A fin de determinar si la variación en la expresión de estos genes pro-angiogénicos por efecto de la inducción de HO-1 tenía un impacto en el proceso angiogénico se realizó un ensayo de angiogénesis *in vivo*, donde se evaluó la densidad de la microvasculatura adyacente al tumor en xenotransplantes de células de PCa en ratones *nu/nu*. Los tumores se establecieron y desarrollaron según se detalla en Materiales y Métodos (sección 18).

Brevemente, se inyectaron células PC3HO-1 o PC3ßGal intradérmicamente en el flanco derecho de los ratones junto a una gota de azul de tripán. Como control interno, para distinguir los efectos en la angiogénesis producidos por el pinchazo de los producidos por las células tumorales, en el flanco izquierdo de los animales se inyectó RPMI junto a una gota de azul de tripán para localizar el sitio de la inyección. Se dejó crecer el tumor durante 6 días, un período corto considerado clave para la evaluación de la angiogénesis. Luego de sacrificar a los animales, se diseccionaron las pieles y se fotografiaron del lado interno. Para tener una referencia del tamaño, se fotografió al mismo aumento papel milimetrado. Una vez obtenidas las fotos se cuantificaron los vasos de pequeño calibre y contorsionados, considerados vasos angiogénicos y los vasos de mediano calibre, a los cuales se los consideró como vasculatura pre-existente. Luego utilizando el papel milimetrado se dividió la cantidad de vasos cuantificados por el área analizada, obteniendo de esta manera la densidad de vasos sanguíneos por mm². También se midió el tamaño del tumor. Este último fue expresado en mm² ya que se lo calculó como el tamaño que ocupaba en la superficie de la piel. A continuación, en la Figura 26 se detalla el diseño experimental.



muestra el papel milimetrado como referencia del tamaño. Aumento: 4X. En el período corto de tiempo donde se desarrollaron los tumores, no hubo diferencias significativas en el tamaño del tumor entre los grupos inyectados con PC3HO-1 o PC3βgal (Fig. 27 A). Debido a que la angiogénesis se produce a partir

de vasos pre-existentes, se cuantificó la densidad de vasos de mediano calibre sin observarse diferencias significativas entre los grupos (Fig. 27 B).



Figura 27. Los tumores PC3βgal y PC3HO-1 no presentan diferencias de tamaño y tampoco en el número de vasos medianos. A: Tamaño del tumor fotografiado en las pieles, medido en mm², en los tumores que sobre-expresan HO-1 y en los controles. B: Cuantificación de vasos medianos en el lado inoculado con las células tumorales (barras blancas) y en el lado contralateral inoculado con el vehículo (barras negras).

Sin embargo, al analizar las fotografías de la piel de los animales adyacente al sitio de inoculación, se observó en los tumores PC3HO-1 una menor cantidad de pequeños capilares tubulares, los cuales representan la formación de nuevos vasos sanguíneos (Fig. 28).

Fotografías de pieles



Figura 28. Fotografías de la piel adyacente a los tumores. *Panel izquierdo:* Fotografías mostrando el tumor y los vasos medianos. Aumento: 12,5X. *Panel derecho:* Ampliación del recuadro de las fotos del panel izquierdo. Las flechas indican los pequeños capilares tubulares. Aumento: 40X.

Luego se cuantificaron los pequeños capilares tubulares tanto del lado del tumor como del lado contralateral de cada animal y se realizó un cociente entre las densidades de los pequeños vasos detectados en cada lado, obteniéndose un índice de angiogénesis (lado tumor/lado contralateral). Se observó en los ratones inyectados con células PC3HO-1 un cociente menor a 1 (0,59 \pm 0,11, promedio \pm desvío estándar), lo que representa una mayor densidad de vasos sanguíneos en el lado contralateral respecto al lado con el tumor (Fig. 29, panel izquierdo). Lo opuesto se observó en los ratones inyectados con las células control PC3βgal, donde el

cociente es mayor a 1 (1,53 \pm 0,11, promedio \pm desvío estándar), representando una mayor densidad de pequeños vasos en el lado tumoral respecto al lado contralateral (Fig. 29, panel izquierdo). Una observación interesante es que en el grupo de ratones inyectados con PC3 β gal solo un ratón presentó una disminución en la densidad de pequeños vasos en el lado del tumor y, de la misma forma, solo un ratón del grupo inyectado con PC3HO-1 presentó una mayor densidad de pequeños vasos en el lado se stos resultados en los 3 experimentos independientes realizados (Fig. 29, panel izquierdo).



Ensayo de Angiogénesis

Figura 29. HO-1 inhibe la angiogénesis *in vivo. Panel izquierdo:* Se cuantificó la cantidad de vasos pequeños por mm² (densidad de vasos pequeños) y se realizó el cociente entre los valores del lado del tumor y del lado contralateral en cada ratón. Cada punto representa a un animal. *Panel derecho:* En cada grupo de ratones inyectados con PC3HO-1 o con PC3βgal se representa la densidad de vasos pequeños en el lado contralateral y en el lado del tumor de cada ratón (cada línea representa a un animal). Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres independientes.

Este mismo resultado se representa también en el panel derecho de la figura 29, donde cada línea que une la densidad de pequeños vasos en el lado contralateral con el lado tumoral, corresponde a un animal. En el grupo PC3βgal todos los animales, excepto uno, presentan una pendiente positiva (indicando un aumento en la densidad de vasos sanguíneos) y en el grupo PC3HO-1 todos los animales,

excepto uno, presentan una pendiente negativa (indicando una disminución en la densidad de vasos sanguíneos) (Fig. 29, panel derecho).

Para confirmar estos resultados, se realizó un estudio histológico mediante la tinción del Tricrómico de Masson. Esta técnica de coloración especial permite visualizar claramente las fibras de colágeno y, de esta manera, localizar vasos sanguíneos. De acuerdo a lo observado en las fotografías de las pieles, se observó menor cantidad de vasos en los tumores que sobre-expresan HO-1 (Fig. 30).

Tricrómico de Masson



Figura 30. Los tumores PC3HO-1 presentan una menor marcación de vasos sanguíneos respecto a los tumores PC3βgal. Tinción del Tricrómico de Masson en muestras de tumores. *Panel izquierdo:* tumores PC3βgal donde se observan vasos de tamaño mediano en la periferia del tumor (círculo con línea entera) y en la zona adyacente al tumor (círculo con línea punteada). La flecha señala los vasos de mayor calibre en el tejido adyacente. *Panel derecho:* tumores PC3HO-1 donde se observan unos pocos vasos pequeños en el tumor (círculo con línea entera) y en el tejido que lo rodea (círculo con línea punteada). Aumento: 100X

También se evaluó el efecto inhibitorio de la angiogénesis provocado por la sobreexpresión de HO-1, por ensayo de inmunohistoquímica. Se analizó la inmunoreactividad del marcador de células endoteliales murinas CD34. En los tumores PC3HO-1 se observaron células esporádicamente marcadas para CD34, mientras que en los tumores PC3βgal se encontraron numerosas células con inmunomarcación positiva para CD34 (Fig. 31).





Figura 31. Inmunomarcación de CD34 en tumores creciendo como xenotransplantes. Inmunohistoquímica de CD34 en secciones de tumores de PC3βgal (panel superior, A y B) y PC3HO-1 (panel inferior, C y D), crecidos durante 6 días en ratones *nu/nu*. Las flechas indican marcación positiva de CD34. **A:** Borde tumoral con numerosas estructuras vasculares de calibre mediano y grande. **B:** Estructuras vasculares intratumorales de calibre mediano y grande con prominente endotelio. **C:** Borde del tumor con pocas estructuras vasculares de mediano calibre. **D:** Estructuras vasculares aisladas intratumorales de mediano tamaño. Aumento: **A** y **C** 250X, **B** y **D** 400X.

Previamente demostramos en nuestro laboratorio que los tumores sub-cutáneos generados por la inoculación de las células de la línea PC3HO-1, crecidos durante 23 días en ratones *nu/nu*, presentaban una menor inmuno-reactividad para MMP9 respecto a los tumores derivados por la inyección de las células de la línea control PC3βgal (Gueron *et al.* 2009). De acuerdo con estos resultados, en los tumores intradérmicos PC3HO-1 desarrollados durante 6 días en ratones *nu/nu*, detectamos pocas células con marcación positiva para MMP9, con señales nucleares y citoplasmáticas débiles y difusas en comparación con los tumores controles que presentaron numerosas células con marcación intensa de MMP9 en núcleo y citoplasma (Fig. 32).



Inmunohistoquímica MMP9



Para estudiar más profundamente el rol anti-angiogénico de HO-1 *in vivo*, analizamos mediante inmunohistoquímica la expresión de VEGFR2, un marcador angiogénico que media la mayoría de las respuestas celulares de VEGF-A (Holmes *et al.* 2007). En este caso se usaron tumores subcutáneos que sobre-expresan HO-1 (PC3HO-1) y sus controles (PC3βgal) crecidos por un período más largo (23 días) (Gueron *et al.* 2009). Corroboramos en estos tumores de mayor crecimiento la acción inhibitoria de HO-1 sobre la angiogénesis. Los tumores PC3HO-1 mostraron baja inmuno-reactividad para VEGFR2. Se detectó marcación citoplasmática positiva débil en escasas células de PCa respecto a los tumores PC3βgal que presentaron muchas células con marcación positiva intensa tanto en citoplasma como en membrana (Fig. 33).
Inmunohistoquímica VEGFR2



Figura 33. Inmunomarcación de VEGFR2 en tumores creciendo 23 días como xenotransplantes. Inmunohistoquímica de VEGFR2 en secciones de tumores PC3βgal (panel izquierdo) y PC3HO-1 (panel derecho) crecidos durante 23 días en ratones *nu/nu*. Las flechas indican marcación positiva para VEGFR2. Aumento: 400X.

Los resultados mostrados en este capítulo claramente revelan el efecto inhibitorio de HO-1 sobre la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* en PCa.

CAPÍTULO II: ROL DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS DE PCa Y EL HUESO

II.1 Inducción farmacológica de HO-1 en células PC3

II.1.1 Mantenimiento de la inducción de HO-1 en función del tiempo

Para estudiar el efecto de la modulación de HO-1 en las células de PCa sobre las células óseas, se pre-trataron cultivos de PC3 con hemina durante 24 h. Posteriormente se lavaron con PBS y se co-cultivaron con PMOs por otras 24 h.

Primeramente se realizó una curva de expresión de HO-1 en función del tiempo a fin de determinar el período de mantenimiento de la inducción de HO-1, posterior al tratamiento con hemina (Fig. 34).



Figura 34. Curva de tiempo de la expresión de HO-1. Western blot de HO-1 en células PC3 crecidas en condición control (sin tratamiento) y posterior al tratamiento con hemina (80 μ M, 24 h). El tiempo de mantenimiento de la inducción se tomó a partir de la finalización de las 24 h de inducción que se consideró tiempo 0. β -actina se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

También se determinó que la inducción de HO-1 en las células PC3 se mantuviese luego del co-cultivo con PMOs, tanto a nivel del ARNm (Fig. 35 A) como de proteína (Fig. 35 B).

Western blot

A. RTqPCR HO-1

B. Western blot HO-1



Figura 35. Expresión de HO-1 en células PC3 co-cultivadas con PMOs. Las células PC3 fueron pre-tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o crecidas en su ausencia (control) y co-cultivadas o no con PMOs. Los niveles del ARNm de HO-1 se determinaron por RTqPCR **(A)** y los de proteínas por Western blot **(B)**. Los datos se normalizaron respecto de β -actina. En el panel izquierdo se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia significativa: * *P*<0,05.

II.1.2 Efecto sobre la diferenciación de los PMOs

Con el objetivo de estudiar si la inducción de HO-1 afectaba la diferenciación de los osteoblastos, se co-cultivaron células PC3 pre-tratadas o no con hemina con PMOs y se analizó el perfil de expresión de genes involucrados en la diferenciación ósea. Mediante RTqPCR se determinaron los niveles del ARNm de genes de diferenciación temprana (Runx-2 y ALP) y tardía; estos últimos responsables de la deposición de la matriz de colágeno (colágeno tipo 1a1 y 1a2; Col1a1 y Col1a2, respectivamente) y no colágeno (OCN). Si bien no se observaron diferencias en la expresión de ALP, Col1a1 y Col1a2, resultó muy interesante el aumento de la expresión de Runx-2 (130%, P<0,05) en los PMOs que fueron co-cultivados con células PC3 pre-tratadas con hemina (Fig. 36). Los niveles de OCN disminuyeron significativamente debido al co-cultivo con PC3 pre-tratadas o no con hemina (68% y 81%, P<0,01; respectivamente) (Fig. 36).

RESULTADOS



Figura 36. Expresión de genes de diferenciación de osteoblastos. RTqPCR de Runx-2 (A), ALP (B), Col1a1 (C), Col1a2 (D) y OCN (E) en PMOs crecidos solos (PMO) o cocultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) (PMO PC3 Hem). Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia significativa: * *P*<0,05, ** *P*<0,01.

Para confirmar los resultados obtenidos respecto a la expresión de genes de diferenciación, se realizó el ensayo de tinción de *Von Kossa*, en el cual la presencia de un precipitado oscuro indica que las células ya diferenciadas secretaron una matriz osteoide sobre la cual se depositó calcio. Confirmando los resultados obtenidos por RTqPCR, no se observaron diferencias en la cantidad y tamaño de precipitado cuando los PMOs crecieron solos o co-cultivados con PC3 pre-tratadas o no con hemina (Fig. 37).

Tinción de Von Kossa





Estos resultados indican que el co-cultivo de los PMOs con PC3 tratadas o no con hemina no produjo alteraciones en la diferenciación de osteoblastos, evaluada por el ensayo de *Von Kossa*, a pesar de la disminución detectada en los niveles de OCN por el co-cultivo y el aumento de Runx-2 por el pre-tratamiento con hemina. Es probable que las alteraciones en la expresión de genes no sean suficientes para producir modificaciones observables a nivel macroscópico, o bien que mecanismos compensatorios estén operando a fin de mantener la diferenciación celular.

II.1.3 Efecto sobre la osteoclastogénesis

Los osteoblastos producen diversos mediadores que modulan la diferenciación de los precursores de osteoclastos, paso inicial imprescindible para que comience la resorción ósea.

Se evaluó el nivel de expresión de RANKL y OPG, su receptor *decoy*, mediante RTqPCR en los PMOs co-cultivados con PC3 crecidas en condiciones control o bajo inducción farmacológica de HO-1. Se observó un importante efecto inductor de la expresión de RANKL en PMOs, provocado por el co-cultivo con células PC3 control o pre-tratadas con hemina respecto a los PMOs solos (150% y 120%, *P*<0,05; respectivamente) (Fig. 38 A). Sin embargo, en las mismas condiciones de co-cultivo los niveles de OPG disminuyeron significativamente en los PMOs (47% y 57%, *P*<0,05; respectivamente) (Fig. 38 B). El aumento en los niveles de RANKL y la

disminución en los de OPG en los PMOs co-cultivados con PC3 respecto a los cultivados solos coinciden con resultados previamente obtenidos en el laboratorio de la Dra. Navone (Fizazi *et al.* 2003). Nosotros demostramos en esta tesis que la inducción farmacológica de HO-1 en las células PC3 no modifica los niveles de RANKL y OPG modulados por el co-cultivo.



Figura 38. Expresión de genes involucrados en la modulación de osteoclastos. RTqPCR de RANKL (A) y OPG (B) en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia significativa: * *P*<0,05.

Cabe destacar que existen otros mecanismos, además de la vía de RANKL/OPG, que regulan la diferenciación, proliferación y actividad de los osteoclastos.

II.1.4 Efecto sobre otros factores moduladores de la resorción ósea

Uno de los factores más importantes implicados en el proceso de resorción del hueso es CSF-1. Mediante RTqPCR se estudió su expresión en los PMOs crecidos solos o co-cultivados con PC3 pre-tratadas o no con hemina. Se detectó una significativa disminución en los niveles de CSF-1 (52%, *P*<0,01) cuando los PMOs fueron co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina (Fig. 39 A).

También analizamos la expresión de la quimioquina CCL2, la cual modula la migración de macrófagos asociados al tumor y promueve su maduración, y de OPN, una proteína no colagenosa de la matriz del hueso donde media la adhesión de los osteoclastos para la resorción ósea. Comprobamos que la expresión de ambos

genes es reprimida en los PMOs por efecto de PC3 cuando estas células fueron pretratadas con hemina (52%, *P*<0,05 y 53%, *P*<0,001; respectivamente) (Fig. 39 B y C).

La medición de IL-6, una citoquina que estimula la formación de precursores osteoclásticos, demostró que los niveles del ARNm de este factor no sufrieron modificaciones en los PMOs cultivados en las diferentes condiciones ensayadas (Fig. 39 D).



Figura 39. Expresión de genes involucrados en la remodelación ósea. RTqPCR de CSF-1 **(A)**, CCL2 **(B)**, OPN **(C)** e IL-6 **(D)** en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia significativa: * *P*<0,05; ** *P*<0,01; *** *P*<0,001.

II.1.5 Efecto sobre factores implicados en la remodelación ósea

Se encuentra bien documentada la función de PTHrP en el hueso. Las células de PCa y las del hueso, producen esta hormona que se une a receptores en los osteoblastos, y estimula la formación y resorción del hueso. La expresión de este gen en los tumores de próstata se correlaciona con su potencialidad de invasión y metástasis (Gujral *et al.* 2001). Corroboramos que las células PC3 expresan altos

niveles endógenos de PTHrP y comprobamos que dicha expresión no se vio modificada ni por el pre-tratamiento con hemina ni por efecto del co-cultivo con PMOs (Fig. 40 A).

Otra característica de la línea PC3 es la alta expresión de la proteasa uPA. Al igual que el gen PTHrP no se detectaron diferencias significativas en su expresión por el pre-tratamiento con hemina o por el co-cultivo con PMOs (Fig. 40 B).

TGF-β1 es un factor de crecimiento pleiotrópico que regula la proliferación celular, la quimiotaxis, la diferenciación, la respuesta inmune y la angiogénesis (Wakefield y Roberts 2002). Si bien el hueso es el mayor reservorio de este factor, las células de PCa también lo expresan favoreciendo su crecimiento e invasión (Ao *et al.* 2007). Al analizar por RTqPCR la expresión de TGF-β1 no se encontraron diferencias en los niveles del ARNm cuando las células PC3 fueron pre-tratadas o no con hemina y co-cultivadas o no con PMOs (Fig. 40 C).

La metaloproteasa MMP9 se expresa en las células de PCa cumpliendo un rol importante en la invasión y en la metástasis. A su vez, en el hueso tiene una función relevante en la osificación endocondral. Se analizó la actividad de MMP9 en los medios condicionados de las células PC3 en condiciones control y pre-tratadas con hemina co-cultivadas o no con PMOs. También se midió la actividad de esta metaloproteasa en los medios condicionados de PMOs crecidos solos. Mediante un ensayo de zimografía comprobamos que en ninguna de las condiciones experimentales se afectó la actividad de gelatinasa (Fig. 40 D).

RESULTADOS



Figura 40. Estudio de factores involucrados en la resorción ósea secretados por las células PC3. Las células PC3 fueron pre-tratadas con hemina (80 μ M, 24 h, barras negras) o crecidas en su ausencia (control, barras blancas) y co-cultivadas o no con PMOs. Los niveles del ARNm de PTHrP (A), uPA (B) y TGF- β 1 (C) se determinaron por RTqPCR. Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control \pm SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. (D) Zimografía realizada con los medios condicionados de las células PC3 pre-tratadas o no con hemina y co-cultivadas o no con PMOs y de osteoblastos creciendo solos. Las bandas representan la actividad de gelatinasa de MMP9 y los números las cuantificaciones realizadas con el software Image J. V.R.: valores relativos. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia no significativa: NS.

II.1.6 Efecto sobre la vía Wnt/β-catenina

La línea celular PC3 posee altos niveles endógenos de DKK-1, un potente inhibidor de la vía Wnt/ β -catenina, de relevancia en la formación del hueso. Se observó mediante RTqPCR que sus niveles de expresión aumentaron significativamente cuando las células PC3 fueron pre-tratadas con hemina y co-cultivadas con PMOs (300%, *P*<0,05) (Fig. 41 A). También se estudiaron los niveles endógenos de la proteína β -catenina mediante Western blot en los PMOs. Acompañando el aumento

en la expresión de DKK-1, se observó una disminución en el *pool* total de β -catenina en los PMOs co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina (50%, *P*<0,05) (Fig. 41 B).



Figura 41. Estudio de la vía Wnt/β-catenina. A: Las células PC3 fueron pre-tratadas con hemina (80 μM, 24 h; barras negras) o crecidas en su ausencia (control, barras blancas) y cocultivadas o no con PMOs. Los niveles del ARNm de DKK-1 se determinaron por RTqPCR. Los datos se normalizaron respecto de β-actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. **B:** Western blot de βcatenina en los PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). El panel derecho muestra la cuantificación de los niveles de expresión realizado con el software Image J, relativizado con β-actina. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia significativa: * *P*<0,05; Diferencia no significativa: NS.

A continuación, se estudió la localización de β -catenina en los PMOs mediante microscopía de inmunofluorescencia. Los resultados indicaron que β -catenina se localiza tanto en la membrana como en el citoplasma y en el núcleo, sin observarse diferencias significativas según los distintos tratamientos (Fig. 42).



Inmunofluorescencia β-catenina

Figura 42. Inmunofluorescencia de β **-catenina.** Los PMOs fueron crecidos sobre cubreobjetos durante 24 h y luego cultivados solos (PMO) o con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem) por otras 24 h. Las fotos muestran la marcación inmunocitológica para β -catenina (rojo). Los núcleos se tiñeron con Hoescht (verde). En el *Merge* se muestra la superposición de las imágenes. La barra representa 30 µm.

II.1.7 Efecto sobre la proliferación de los PMOs

Las células PC3 producen predominantemente la destrucción del hueso. De hecho, parte de este efecto es mediado por la disminución en la proliferación de los osteoblastos. En este trabajo de tesis mediante un ensayo de incorporación ³H-Timidina, estudiamos la síntesis de ADN y corroboramos la disminución de la proliferación de los osteoblastos por efecto del co-cultivo con las células PC3 (57,6%, *P*<0,05) (Fizazi *et al.* 2003). Sin embargo, el pre-tratamiento con hemina restableció la actividad de síntesis de ADN al nivel observado en los PMOs crecidos solos. (Fig. 43).



Incorporación de ³H-Timidina

Figura 43. Ensayo de incorporación de ³**H-Timidina.** La proliferación celular se cuantificó por incorporación de ³H-Timidina en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). Se graficó la síntesis de ADN como porcentaje respecto a los PMOs cultivados solos, que se consideró 100%. Las barras representan las medias \pm SD. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia significativa: * *P*<0,05.

Este aumento se confirmó mediante la determinación de la expresión de Ki-67, un marcador de proliferación celular. El nivel de expresión del ARNm de este factor se incrementó en los PMOs co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina (200%, P<0,05) (Fig. 44).

RTqPCR mKi-67



Figura 44. Expresión de Ki-67. RTqPCR de Ki67 en PMOs crecidos solos (PMO) o cocultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia significativa: * *P*<0,05. Por citometría de flujo se estudió la progresión del ciclo celular. Se observó un aumento significativo (4%, *P*<0,05) de células en la fase G2/M, cuando los PMOs fueron co-cultivados con PC3 previamente tratadas con hemina (Fig. 45 A). Por otra parte, al analizar los niveles de expresión de proteínas involucradas en el progreso del ciclo celular mediante Western blot, se detectó un aumento de la expresión de ciclina A cuando los PMOs fueron co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina (Fig. 45 B). En dicha condición, también se restablecieron los niveles de expresión de ciclina B1, ciclina D1 (los cuales habían disminuido en los PMOs por el co-cultivo con células PC3) y disminuyeron los niveles de p21 (Fig. 45 B).



A. Incorporación de loduro de propidio

Figura 45. Análisis de la progresión del ciclo celular en PMOs. A: Ensayo de incorporación de loduro de propidio en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). En el panel superior se representan las distribuciones de las poblaciones de los PMOs en los distintos tratamientos, graficadas como el número de eventos según la intensidad de marcación. Abajo a la izquierda se grafica la cuantificación del porcentaje de células en las distintas etapas del ciclo celular. Diferencia significativa: * *P*<0,05. **B:** Western blot de Ciclina B1, Ciclina A, Ciclina D1 y p21. Los números debajo de las bandas representan la cuantificación de los niveles de expresión, realizada con el software Image J y relativizados con β-Tubulina.

A continuación se analizó en los PMOs cuando se co-cultivaron con células PC3 pretratadas con hemina si el restablecimiento de la actividad de síntesis del ADN, el aumento de la expresión de los marcadores de proliferación celular y el incremento de células en la fase G2/M, se correlacionaba con una diferencia en el número de células. Se contó el número de PMOs crecidos solos o co-cultivados con PC3 pretratadas o no con hemina. Corroborando los resultados obtenidos en la bibliografía (Yang J. *et al.* 2001), el número de PMOs disminuyó cuando se co-cultivaron con PC3 respecto a cuando se cultivaron solos (28,1%, *P*<0,05) (Fig. 46 A). En este trabajo de tesis comprobamos que el co-cultivo de los PMOs con PC3 pre-tratadas con hemina restableció el número de osteoblastos (Fig. 46 A).

Luego se decidió estudiar en las células PC3 si el co-cultivo y/o el pre-tratamiento con hemina afectaban el número de las células tumorales. Los resultados mostraron que ni el pre-tratamiento ni el co-cultivo, ni la combinación de ambos produjeron modificaciones detectables en el número de células PC3 (Fig. 46 B).







Figura 46. Número de células. A: Número de PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). **B:** Número de células PC3 que fueron pre-tratadas con hemina (80 μ M, 24 h, barras negras) o crecidas en su ausencia (control, barras blancas) y co-cultivadas o no con PMOs. Diferencia significativa: * *P*<0,05; Diferencia no significativa: NS.

II.1.8 Efecto sobre el estrés oxidativo

En el hueso, el estrés oxidativo puede conducir a una disminución en el número de osteoblastos provocando menor tasa de formación de hueso (Bai *et al.* 2004). A fin de analizar los niveles de estrés oxidativo en los PMOs crecidos solos o en co-

cultivo, se investigaron los niveles de expresión de algunas enzimas anti-oxidantes. El co-cultivo de las células PC3 sin pre-tratar o pre-tratadas con hemina aumentó los niveles del ARNm de MnSOD (206% y 134%, P<0,05; respectivamente) y de catalasa (35% y 95%, P<0,05; respectivamente) determinados por RTqPCR en las células óseas (Fig. 47 A y B) y, a su vez, indujo la expresión de HO-1 en los PMOs como se determinó mediante Western blot (Fig. 47 C). A fin de establecer los niveles de estrés oxidativo, se determinó la presencia de ROS por citometría de flujo monitoreando la oxidación de la sonda H2DCFDA. Se observaron mayores niveles de fluorescencia debido al aumento de ROS en los PMOs que fueron co-cultivados con PC3 previamente tratadas con hemina (15%, P<0,01) (Fig. 47 D).



Figura 47. Análisis de estrés oxidativo. Mediciones realizadas en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). **A:** RTqPCR de MnSOD. **B:** RTqPCR de catalasa. En A y B los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. **C:** Western blot de HO-1. Los números debajo de las bandas representan la cuantificación de los niveles de expresión realizado con el software Image J, relativizado con β -actina. **D:** Cuantificación de los niveles de flujo. Diferencia significativa: * *P*<0,05; ** *P*<0,01.

II.1.9 Efecto sobre las vías de señalización en osteoblastos

En los osteoblastos, la activación de la vía Wnt/ β -catenina conduce a la translocación de β-catenina al núcleo, donde se une con los factores de transcripción TCF/Lef dando por resultado final la diferenciación de estas células. Sin embargo, en presencia de ROS, FoxO transloca al núcleo y se une a β -catenina, produciendo la activación de otra vía de señalización. Dependiendo del balance de ROS en las células, la vía de FoxO podrá arrestar el ciclo celular o favorecer la proliferación (Almeida et al. 2007a). En base a estos datos decidimos estudiar la modulación de las vías Wnt/β-catenina y FoxO en los osteoblastos creciendo solos o co-cultivados con PC3 bajo inducción farmacológica de HO-1. Debido a la dificultad de transfectar los cultivos primarios, trabajamos con la línea celular de mioblastos de ratón, C2C12, la cual es utilizada como una herramienta para dilucidar los mecanismos de diferenciación de los osteoblastos. Para estudiar la vía Wnt/β-catenina se utilizó el plásmido TOP flash, el cual posee cuatro sitios de unión a TCF y un sitio mínimo de unión a Fos río arriba del gen reportero de la luciferasa. Como control se utilizó el plásmido FOP flash el cual posee los sitios de unión a TCF mutados. Como control positivo de activación de la vía de Wnt, se utilizó LiCl (20 mM), inhibidor de la actividad de la proteína GSK-36 que impide la fosforilación y la degradación de 6catenina y facilita su translocación al núcleo donde activa la transcripción de distintos genes. Como control negativo de la activación de la vía de Wnt, las células se trataron con H_2O_2 (100µM), ya que en presencia de ROS el pool nuclear de β catenina se separa de los factores de transcripción a los que estaba asociada para unirse a FoxO y activar la señalización de esta vía. Para estudiar la vía de FoxO se utilizó el plásmido FoxO-luc, que posee seis sitios de unión a FoxO clonados en un promotor río arriba del gen reportero de la luciferasa. Como control positivo se usó el tratamiento con H₂O₂ (100 µM). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la actividad del plásmido TOP flash, indicando que en nuestras condiciones experimentales no hay cambios en la activación de la vía Wnt/βcatenina en los osteoblastos cultivados solos o en presencia de PC3 pre-tratadas o no con hemina (Fig. 48 A). Sin embargo, se observó un aumento significativo en la actividad de luciferasa del plásmido FoxO-luc cuando los osteoblastos se cocultivaron con PC3 pre-tratadas con hemina respecto a los osteoblastos crecidos solos (140%, P<0,05) (Fig. 48 B).



A. Vía Wnt/β-catenina





Figura 48. Ensayo de genes reporteros. Las células C2C12 fueron transfectadas de manera transiente con los plásmidos FOPflash (plásmido con los sitios TCF/Lef mutados) **(A, barras negras)** o TOPflash (plásmido con los sitios TCF/Lef) **(A, barras grises)** o con el plásmido FoxO-luc **(B)**. Luego de la transfección las células fueron cultivadas solas (C2C12), con células PC3 sin pre-tratar (C2C12 PC3) o pre-tratadas con hemina (C2C12 PC3 Hem). Como controles se usó el agregado de LiCI (sólo en A) o H_2O_2 (A y B). Posteriormente las células 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.

Estos resultados estarían indicando que en los osteoblastos co-cultivados con células PC3 pre-tratadas con hemina está activa la vía de FoxO. Esto podría explicar los efectos de la inducción de HO-1 sobre la restitución en la proliferación de los osteoblastos co-cultivados con células PC3 pre-tratadas con hemina (Fig. 43).

II.1.10 Efecto sobre la expresión de Gadd45α en osteoblastos

Como se describió anteriormente, FOXO3 modula la expresión de genes involucrados en la respuesta frente al estrés en el punto de chequeo G2/M. La proteína Gadd45α está involucrada en el arresto del ciclo celular y en la reparación del ADN dañado. Dado que la expresión de esta proteína es regulada por FoxO (Tran *et al.* 2002) decidimos estudiar los niveles de expresión del ARNm en osteoblastos creciendo solos o co-cultivados con PC3 pre-tratadas o no con hemina. Sorprendentemente, los resultados demostraron que la expresión de Gadd45α aumenta en los PMOs co-cultivados con PC3 respecto a los PMOs creciendo solos o co-cultivados con hemina (100% y 46%, *P*<0,05; respectivamente) (Fig. 49).



Figura 49. Expresión de Gadd45 α . RTqPCR de Gadd45 α en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (PMO PC3) o pre-tratadas con hemina (PMO PC3 Hem). Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control \pm SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra un experimento representativo de por lo menos 3 experimentos independientes. Diferencia significativa: * *P*<0,05.

II.1.11 Efecto sobre el cultivo de explantes de calvarias

El cultivo de explantes de calvarias se ha utilizado durante muchos años como un modelo para el estudio de la formación de hueso. Una de sus ventajas más importantes es que preserva las relaciones entre las distintas poblaciones celulares del hueso y la matriz. De esta manera, se decidió estudiar el efecto de la inducción farmacológica de HO-1 en las células PC3 sobre los osteoblastos en el ambiente de las calvarias. Se trabajó con células PC3 pre-tratadas o no con hemina, que se co-

cultivaron con explantes de calvarias durante 7 días en total, renovando los cultivos de las células de PCa cada 24 h. Una vez terminado el co-cultivo se procedió al análisis histológico de los huesos. Similar a lo observado en los resultados *in vitro*, no se detectaron diferencias en la formación de hueso (osteoide de igual coloración) entre las calvarias que se habían cultivado solas o en presencia de PC3 pre-tratadas o no con hemina. Como control positivo de esta técnica se cultivaron calvarias con insulina (20 µg/ml), donde, efectivamente, se observó un aumento en la formación de hueso (Fig. 50).



Hematoxilina & Eosina

Figura 50. Histología de los explantes de calvarias. Se cultivaron explantes de calvarias solas, en co-cultivo con células PC3 sin pre-tratar o pre-tratadas con hemina. El agregado de insulina (20 µg/ml) se usó como control positivo de formación de hueso. Luego de 7 días las calvarias se fijaron y procesaron para el análisis histológico como se describe en Materiales y Métodos. Detalle de las fotografías: (A) Calvarias cultivadas solas: Lámina delgada de hueso rodeada por tejido fibroso suelto con baja celularidad. (B) Calvarias co-cultivadas con PC3: Lámina delgada de hueso rodeada por tejido fibroso so con celularidad moderada. (C) Calvarias co-cultivadas con PC3 pre-tratadas con hemina: Lámina delgada de hueso rodeada por tejido fibroso con celularidad moderada. (D) Calvarias tratadas con insulina: Placa ósea gruesa e irregular rodeada por tejido fibroso con abundante celularidad. Aumento: 250X.

Mediante ensayos de inmunohistoquímica, se analizó la expresión de HO-1 y Ki-67 utilizando anticuerpos específicos. El análisis cuantitativo de la inmunomarcación se realizó por conteo de los osteoblastos con inmuno-reactividad positiva para cada

CAPÍTULO II: ROL DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS DEL PCa Y EL HUESO

marcador, que se encontraban adyacentes a la línea de formación de hueso (considerados osteoblastos activados). Se contaron el número total de osteoblastos en 6 campos como mínimo y se calculó el porcentaje de osteoblastos con inmunomarcación positiva para el gen estudiado.

Se observó un aumento significativo del porcentaje de osteoblastos con marcación positiva de HO-1 en la línea de formación de hueso (adyacentes a la matriz ósea) en las calvarias co-cultivadas con PC3 (60%, *P*<0,05) y una diferencia mayor aun cuando las células PC3 fueron pre-tratadas con hemina (105%, *P*<0,01) (Fig. 51). Estos resultados confirman la inducción de la expresión de HO-1 en PMOs, detectada por Western blot (Fig. 47 C).

También estudiamos la expresión del marcador de proliferación celular Ki-67. Al cuantificar el número de células positivas (osteoblastos y células del estroma) se comprobó un aumento significativo del porcentaje de células con inmuno-reactividad positiva para Ki-67 en las calvarias co-cultivadas con células PC3 sin pre-tratar (49%, *P*<0,01) o pre-tratadas con hemina (23%, *P*<0,01), respecto a las calvarias cultivadas solas (Fig. 51).

Inmunohistoquímica



Figura 51. Inmunohistoquímicas de HO-1 y Ki-67 en explantes de calvarias. Se cultivaron explantes de calvarias solas (A y D), o en presencia de células PC3 sin pretratar (B y E) o pre-tratadas con hemina (C y F) durante 7 días. Luego se fijaron y procesaron para el análisis histológico como se describe en Materiales y Métodos. Detalle de las fotografías: Inmunohistoquímica de HO-1: (A) Osteoblastos positivos adyacentes a la matriz del hueso. (B) Osteoblastos abundantes adyacentes a la matriz del hueso, con marcación positiva intensa de HO-1. (C) Osteoblastos abundantes adyacentes a la matriz del hueso, con marcación positiva intensa de HO-1. Las flechas indican osteoblastos activados con marcación positiva de HO-1. Inmunohistoquímica de Ki-67: (D) Osteoblastos positivos adyacentes a la matriz del hueso (flechas). (E y F) Numerosos osteoblastos y tejido conectivo con marcación positiva de Ki-67 (círculo). Aumento: 400X. (G y H) Cuantificación de HO-1 y Ki-67, respectivamente. Se graficó el porcentaje de osteoblastos con inmuno-reactividad positiva para cada marcador respecto al total de osteoblastos contados en cada condición. Diferencia significativa: * P<0,05; ** P<0,01. Todos los resultados presentados en este capítulo confirman la pérdida del número de osteoblastos producida por el co-cultivo con células PC3 y, por primera vez, demuestran que la inducción farmacológica de HO-1 en las células PC3 impacta la proliferación de los osteoblastos y no su diferenciación y sugieren que este efecto puede estar mediado por la activación de la vía de FoxO.

II.2 Silenciamiento genético de la expresión de HO-1 en células MDA PCa 2b

II.2.1 Generación de la línea MDA PCa 2b shHO-1

Con el fin de estudiar el efecto de HO-1 sobre la interacción de las células de PCa y los osteoblastos, decidimos analizar los parámetros óseos evaluados en la sección II. 1 en las condiciones experimentales establecidas en este trabajo, usando la línea celular MDA PCa 2b que posee altos niveles endógenos de HO-1 (Gueron *et al.* 2009) y presenta una reacción osteoblástica cuando se inocula en el hueso (Yang J. *et al.* 2001). Así decidimos silenciar la expresión de HO-1 en las células tumorales y luego de co-cultivarlas con los PMOs estudiamos la expresión de distintos genes involucrados en la homeostasis ósea.

Mediante infección de las células MDA PCa 2b con clones de lentivirus que codifican para shHO-1 o shControl (de origen comercial, descriptos en Materiales y Métodos 2.1, Tabla 1) y la selección de los *pooles* infectados por tratamiento con el antibiótico puromicina, se eligió el *pool* generado a partir de la infección con el clon 48 para realizar los experimentos de co-cultivo, porque fue con el que se obtuvo la mayor disminución en la expresión del ARNm de HO-1 (73%) (Fig. 52).



Figura 52. Silenciamiento de la expresión de HO-1 en células MDA PCa 2b. Las células MDA PCa 2b se infectaron con diferentes clones de lentivirus shHO-1 o shControl. Se extrajo el ARN de los *pooles* de las células infectadas con cada clon del lentivirus. Como control del silenciamiento se usó un shControl. También se extrajo ARN de un cultivo control sin infectar. Los niveles de HO-1 se determinaron por RTqPCR. Los datos fueron normalizados respecto de β -actina. Se graficó el porcentaje de expresión respecto de las células sin infectar ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos.

Además, se verificó mediante RTqPCR que la expresión de HO-1 en MDA PCa 2b se mantenía silenciada luego del co-cultivo (Fig. 53).



Figura 53. Expresión de HO-1 en células MDA PCa 2b co-cultivadas con PMOs. Se utilizaron *pooles* de células MDA PCa 2b infectadas con lentivirus control (MDA PCa 2b shControl) o con lentivirus que codifican para shHO-1 (MDA PCa 2b shHO-1), que se co-cultivaron o no con PMOs. Los niveles del ARNm de HO-1 se determinaron por RTqPCR. Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Diferencia significativa: * *P*<0,05.

Resulta interesante destacar que al comparar los niveles de expresión de HO-1 en las células MDA PCa 2b shControl o las MDA PCa 2b shHO-1 creciendo solas respecto a las co-cultivadas con PMOs, la expresión de HO-1 en ambos *pooles* de células tumorales aumentó debido al co-cultivo (60% y 40%, *P*<0,05; respectivamente) (Fig. 53).

II.2.2 Efecto sobre la diferenciación de los PMOs

Se estudió la expresión de genes involucrados en la diferenciación temprana (Runx-2 y ALP) y tardía, estos últimos involucrados en la deposición de matriz colágena (Col1a1 y Col1a2) y no colágena (OCN) mediante RTqPCR. Se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de Col1a1 en los PMO cocultivados con MDA PCa 2b shControl y MDA PCa 2b shHO-1 respecto a los PMOs crecidos solos (32% y 25%, *P*<0,05; respectivamente). También se detectaron niveles significativamente menores del ARNm de Col1a2 pero solo en los PMOs cocultivados con MDA PCa 2b shHO-1 (26%, *P*<0,05) (Fig. 54). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes Runx-2, ALP y OCN cuando los PMOs crecían solos o co-cultivados con MDA PCa 2b con la expresión de HO-1 silenciada o su control (Fig. 54).

RESULTADOS



ALP (B), Col1a1 (C), Col1a2 (D) y OCN (E) en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con MDA PCa 2b shControl o MDA PCa 2b shHO-1. Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Diferencia significativa: * *P*<0,05.

Estos resultados sugieren que HO-1 no parecería modificar la diferenciación de los osteoblastos. Si ejerciera un efecto, éste sería muy sutil y afectaría los estadíos más avanzados donde regularía la síntesis de colágeno.

II.2.3 Efecto sobre la osteoclastogénesis

A continuación decidimos estudiar si la disminución de los niveles de expresión de HO-1 en la línea celular MDA PCa 2b afectaba la expresión en los PMOs de genes moduladores de la diferenciación y la actividad de osteoclastos. En concordancia con datos previamente publicados (Fizazi *et al.* 2003), el co-cultivo de las células MDA PCa 2b shControl con los PMOs aumentó los niveles de expresión de RANKL en las células de hueso (335%, P<0,001). La inhibición de la expresión de HO-1 en las células MDA PCa 2b no modificó el efecto producido por el co-cultivo (333%, P<0,001) (Fig. 55 A). Al analizar los niveles de expresión de OPG obtuvimos resultados similares. La expresión de este gen disminuyó por efecto del co-cultivo con células MDA PCa 2b shControl (67%, P<0,001) (confirmando resultados

previamente reportados, (Fizazi *et al.* 2003)) o con las células con HO-1 silenciada (57%, *P*<0,001) (Fig. 55 B).



Figura 55. Expresión de genes involucrados en la modulación de osteoclastos. RTqPCR de RANKL (A) y OPG (B) en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con MDA PCa 2b shControl o MDA PCa 2b shHO-1. Los datos se normalizaron respecto de β actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Diferencia significativa: *** *P*<0,001.

Estos resultados demuestran que el silenciamiento de la expresión de HO-1 en las células MDA PCa 2b no produce modificaciones el eje RANKL/OPG, regulador de los osteoclastos.

II.2.4 Efecto sobre otros factores moduladores de la resorción ósea

Mediante RTqPCR se estudió la expresión de CSF-1 en los PMOs crecidos solos o co-cultivados con MDA PCa 2b shControl o con MDA PCa 2b shHO-1. Se detectó una significativa disminución en los niveles del ARNm de dicho gen cuando los PMOs fueron co-cultivados con ambos *pooles* de células de PCa respecto a los PMOs cultivados solos (59% y 61%, *P*<0,01; respectivamente) (Fig. 56 A).

También analizamos la expresión de la quimioquina CCL2. Comprobamos que los niveles de este gen disminuyeron (53%, *P*<0,05) en los PMOs por efecto del co-cultivo con células MDA PCa 2b control respecto a los osteoblastos creciendo solos y esta disminución fue mayor aun cuando la expresión de HO-1 estaba silenciada en las células de PCa (65%, *P*<0,01) (Fig. 56 B).

El análisis de la expresión de OPN e IL-6 no mostró diferencias significativas a nivel de los ARNm de dichos factores en los PMOs cultivados en las diferentes condiciones ensayadas (Fig. 56 C y D).



Figura 56. Expresión de genes involucrados en la remodelación ósea. RTqPCR de CSF-1 **(A)**, CCL2 **(B)**, OPN **(C)** e IL-6 **(D)** en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con MDA PCa 2b shControl o MDA PCa 2b shHO-1. Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Diferencia significativa: * *P*<0,05; ** *P*<0,01.

Estos resultados demuestran que el silenciamiento de la expresión de HO-1 en la línea celular MDA PCa 2b no afecta la transcripción de los genes analizados responsables de la resorción ósea.

II.2.5 Efecto sobre la expresión de enzimas antioxidantes en PMOs

En la sección de resultados II.1.8, detectamos la inducción de la expresión de catalasa y MnSOD en los PMOs por el co-cultivo con células PC3 pre-tratadas o no con hemina. Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto que produce en las células óseas el co-cultivo con MDA PCa 2b control o con la expresión silenciada de HO-1.

Mediante RTqPCR observamos una disminución significativa en los niveles de expresión de MnSOD cuando los PMOs fueron co-cultivados con MDA PCa 2b shControl respecto a los PMOs crecidos solos (30%, *P*<0,05). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los niveles del ARNm de MnSOD en PMOs cuando la expresión de HO-1 fue silenciada en las células de PCa (Fig. 57 A). La expresión de catalasa no sufrió alteraciones en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas (Fig. 57 B).







Figura 57. Expresión de genes antioxidantes. RTqPCR de MnSOD **(A)** y catalasa **(B)** en PMOs crecidos solos (PMO) o co-cultivados con MDA PCa 2b shControl o MDA PCa 2b shHO-1. Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Diferencia significativa: * *P*<0,05.

II.2.6 Efecto sobre la expresión de Ki-67 en PMOs

Se analizó el efecto del silenciamiento de HO-1 en células MDA PCa 2b en los niveles del gen Ki-67. No se observaron diferencias significativas en su expresión cuando los PMOs crecían solos o en co-cultivo con los distintos *pooles* de MDA PCa 2b (Fig. 58).

Expresión relativa 1.0

RTqPCR mKi-67



Figura 58. Expresión de Ki-67. RTqPCR de Ki-67 en PMOs crecidos solos (PMO) o cocultivados con MDA PCa 2b shControl o MDA PCa 2b shHO-1. Los datos se normalizaron respecto de β-actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos.

En resumen, el silenciamiento de la expresión de HO-1 en las células MDA PCa 2b si bien produjo algunas diferencias significativas en la expresión de los genes investigados, en su mayoría no fueron diferentes a las provocadas por el pool control. Esto sugiere que el silenciamiento de HO-1 en la línea MDA PCa 2b no interfiere en la relación con los osteoblastos in vitro.

II.2.7 Efecto sobre la expresión de PSA

La línea MDA PCa 2b es sensible a andrógenos y expresa PSA. Se estudió si la disminución de los niveles de HO-1 afecta la expresión de este factor específico de células prostáticas tanto en las MDA PCa 2b creciendo solas como en las cocultivadas con PMOs. Mediante RTqPCR se determinó que los niveles del ARNm de PSA aumentaron en las células MDA PCa 2b shHO-1 respecto al pool control. Esta diferencia no se observó cuando las células de PCa crecían en co-cultivo con los PMOs. Más aún, los niveles de expresión de PSA aumentaron en las células MDA PCa 2b co-cultivadas con PMOs respecto a la condición sin co-cultivar (Fig. 59).



Figura 59. Expresión de PSA en células MDA PCa 2b co-cultivadas con PMOs. Se utilizaron *pooles* de células MDA PCa 2b infectadas con lentivirus control (MDA PCa 2b shControl) o con lentivirus que codifican para shHO-1 (MDA PCa 2b shHO-1) las cuales se co-cultivaron o no con PMOs. Los niveles del ARNm de PSA se determinaron por RTqPCR. Los datos se normalizaron respecto de β -actina. Se graficaron las veces de inducción respecto del control ± SD calculada como se describe en Materiales y Métodos. Diferencia significativa: * *P*<0,05; Diferencia no significativa: NS.

Estos resultados concuerdan con datos publicados por nuestro laboratorio, donde se demostró recientemente que la inducción de HO-1 reprime la señalización del AR (Elguero *et al.* 2012). Aquí demostramos que el silenciamiento de HO-1 en las células MDA PCa 2b altera los niveles de PSA, principal producto de la actividad transcripcional del AR (Fig. 59). Cabe resaltar que en el contexto experimental de la comunicación entre las células de PCa y los osteoblastos, el co-cultivo produce también un aumento en los niveles endógenos de PSA (Fig. 59, barras blancas), probablemente alterando el fenotipo de las células MDA PCa 2b.



CAPÍTULO III: RESULTADOS in vivo

III.1 Tumores creciendo intra-óseos

Las diferencias encontradas *in vitro* al analizar la modulación de la expresión de HO-1 sobre los osteoblastos, nos llevaron a investigar el efecto de la sobre-expresión de esta proteína en la metástasis ósea del PCa *in vivo*. Para lograr este objetivo utilizamos el modelo de inoculación de células tumorales humanas en la cabeza distal del fémur de ratones *SCID*. De esta forma realizamos una inyección intra-ósea con 3 x 10^5 células que sobre-expresan HO-1 (PC3HO-1) y su respectivo control (PC3βgal). Al cabo de 15 días se tomaron radiografías mediante rayos-X, se evaluó el establecimiento del tumor, se procedió a sacrificar a los ratones y se realizó el análisis histológico de las metástasis óseas.

Las radiografías mostraron una robusta remodelación ósea en los fémures de los ratones inyectados con PC3HO-1 respecto a los inyectados con PC3βgal. Dicha remodelación se representa en la deformación de los huesos inyectados, donde se observa un ensanchamiento y pérdida de la forma normal (en comparación con el fémur contralateral de cada ratón). Se comprobó una fuerte reacción osteolítica en los ratones inyectados con PC3HO-1, caracterizada por sitios descalcificados que muestran menor intensidad en la placa radiográfica y una marcada reacción osteoblástica en el periostio (superficie externa del hueso) (Fig. 60).

Ninguna de las patas contralaterales mostró evidencias de metástasis originadas desde la pata inyectada (Fig. 60).

Radiografías



Figura 60. Imágenes de rayos X de los tumores creciendo en el hueso *in vivo.* Las células PC3βgal (panel izquierdo) o PC3HO-1 (panel derecho) se inyectaron en la cabeza distal del fémur izquierdo de ratones *SCID.* Al cabo de dos semanas se tomaron radiografías mediante rayos X. Las flechas rojas indican el sitio de la inyección y las cabezas de flechas amarillas muestran el periostio engrosado. Se muestran las imágenes representativas de 2 animales de cada grupo.

Una vez sacrificados los animales se procedió al estudio histológico donde se comenzó realizando una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en los cortes de las patas. Se comprobó que las células de PCa se establecieron en los huesos, en la zona de la metáfisis, debajo de la línea de crecimiento. Se observaron sitios de reacción osteoblástica, con presencia de hueso nuevo (inmaduro) y periostio activo, siendo estos eventos de mayor magnitud en las metástasis derivadas de las células PC3 que sobre-expresaban HO-1 (Fig. 61 A-F). Estos resultados se condicen con las radiografías, donde se observó una marcada reacción osteoblástica en el periostio.

Se realizó también la inmunomarcación de HO-1 mediante la técnica de inmunohistoquímica. Los tumores PC3βgal presentaron células dispersas con marcación positiva de HO-1 en el citoplasma. Los tumores PC3HO-1 presentaron numerosas células con inmuno-reactividad positiva de HO-1 en el citoplasma y en el núcleo (Fig. 61 G y H). La presencia de HO-1 nuclear detectada en los tumores creciendo en el hueso, concuerda con lo reportado previamente por nuestro laboratorio para los carcinomas humanos primarios de próstata, los xenotransplantes subcutáneos y las líneas de PCa (Sacca *et al.* 2007; Gueron *et al.* 2009).



Figura 61. Análisis histológico de las metástasis intra-óseas. Las células PC3HO-1 y PC3βgal se inyectaron en la cabeza distal del fémur izquierdo de ratones SCID. Al cabo de 2 semanas los ratones se sacrificaron y se diseccionaron sus patas para realizar el análisis histológico. A: PC3βgal (H&E). Tumor intra-óseo (círculo). Las puntas de flechas rojas indican cartílago. Aumento: 100X. B: PC3HO-1 (H&E). Tumor intra-óseo (círculo). Las puntas de flechas rojas indican cartílago y las flechas rojas periostio activo. Aumento: 100X. C: PC3βgal (H&E). Tumor intra-óseo (círculo). Las flechas rojas indican periostio activo, las flechas negras hueso inmaduro y la cabeza de flecha negra hueso maduro. Aumento: 400X. D: PC3HO-1 (H&E). Tumor (círculo negro) y médula ósea (círculo rojo). Las flechas negras indican hueso inmaduro y la cabeza de flecha negra hueso maduro. Aumento: 400X. E: PC3βgal (H&E). Células tumorales. Aumento: 400X. F: PC3HO-1 (H&E). Células tumorales. Aumento: 400X. G: PC3ßgal. Inmunohistoquímica de HO-1. Células dispersas con marcación positiva en el citoplasma de HO-1 (flechas negras). Aumento: 400X. H: PC3HO-1. Inmunohistoquímica de HO-1. Abundantes células con marcación intensa positiva en citoplasma y núcleo de HO-1 (flechas negras). Aumento: 400X.

Para calcular el índice mitótico de los tumores, se contó el número de células cancerígenas en mitosis (típica o atípica) en 10 campos de cada tumor. Se observó una disminución significativa en el porcentaje de células malignas en mitosis en los tumores de células PC3 que sobre-expresan HO-1 creciendo en hueso respecto a las metástasis óseas derivadas de las células control (48%, *P*<0,001) (Fig. 62). Estos resultados concuerdan con observaciones previamente reportadas por nuestro laboratorio, en donde demostramos que tumores PC3HO-1 creciendo *s.c.* en ratones *nu/nu* también presentaron menor índice mitótico (Gueron *et al.* 2009).





Figura 62. Índice mitótico en los tumores creciendo en el hueso. Se contó el porcentaje de mitosis en células tumorales PC3βgal o PC3HO-1 creciendo en la cabeza distal del fémur izquierdo de ratones *SCID* durante dos semanas. Diferencia significativa: *** *P*<0,001.

Los resultados *in vivo* mostraron una mayor remodelación ósea en los tumores derivados de células PC3 que sobre-expresan HO-1 creciendo en el hueso, respecto a los derivados de PC3βgal. Dicha remodelación presentó tanto características osteolíticas (huesos descalcificados y rotos) como osteoblásticas (aumento del periostio). Considerando que los tumores provenientes de PC3HO-1 presentaron un índice mitótico menor en relación a los derivados de PC3βgal, se podría sugerir que el aumento de la remodelación ósea no es un efecto producido por el número de células cancerígenas, sino que probablemente los factores secretados por el tumor podrían ser los responsables de las diferencias observadas.

III.2 Perfil de expresión de HO-1 en las metástasis de pacientes con PCa resistentes a la castración

Los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* demostraron que HO-1 está implicada en la remodelación ósea y en la agresividad de la metástasis del PCa. De esta manera, nos propusimos investigar el perfil de expresión de HO-1 que presentan las muestras de los pacientes CRPC. Utilizamos *microarrays* de tejidos tumorales gentilmente cedidos por la Dra. Nora Navone del MD Anderson Cancer Center, Houston, USA. Los *microarrays* fueron diseñados a partir de metástasis provenientes de 12 pacientes con PCa resistentes a la castración crecidos sub-cutáneamente como xenotransplantes en ratones machos *SCID* eugonadales o castrados (Li Z. G. *et al.* 2008c). Se analizaron 24 muestras en las cuales se contó con el acceso a parámetros clínico-patológicos registrados en los tumores originales y en los transplantados en ratones, para efectuar correlaciones entre éstos y los datos hallados por inmunohistoquímica.

Los resultados de la inmunomarcación de HO-1 mostraron diversidad en la presencia de marcación positiva de las muestras y diferencias tanto en los niveles de expresión (evaluados semicuantitativamente) como en la localización de esta proteína. Seis muestras pobremente diferenciadas presentaron marcación positiva para HO-1 moderada en el citoplasmática e intensa en el núcleo. Dentro de los 12 pacientes analizados, a 3 de ellos se les tomó muestras de la metástasis creciendo en el hueso. Los 3 presentaron marcación positiva para HO-1 entre moderada e intensa en el citoplasma y uno de los pacientes presentó marcación positiva en el núcleo (Fig. 63).

Resulta interesante remarcar los resultados obtenidos en la figura 63 D, donde las células de PCa humanas provenientes de una metástasis ósea, sin expresión de AR y con una fuerte reacción osteoblástica en el hueso, al crecer como xenotransplantes en ratones *SCID* subcutáneamente indujeron la formación de un tejido tipo-hueso. El grupo de investigación de la Dra. Navone (Li Z. G. *et al.* 2008c) demostró que el hueso había sido formado por células tipo-osteoblastos de origen murino y que el proceso de formación del hueso ectópico, inducido por las células tumorales, se asemejaba al de origen intramembranoso (no se observó la presencia de cartílago). Nosotros detectamos en esta misma muestra inmuno-reactividad

positiva para HO-1 en las células tumorales con marcación moderada en el citoplasma e intensa en el núcleo.



Figura 63. Inmunomarcación de HO-1 en muestras de metástasis de pacientes con PCa resistentes a la castración creciendo como xenotransplantes en ratones SCID. A: Diagnóstico morfológico compatible con carcinoma neuroendócrino. Inmunomarcación positiva heterogénea en células atípicas, de disposición nuclear y citoplasmática. B: Carcinoma neuroendócrino con inmunomarcación positiva con predominio nuclear en células atípicas. C: Carcinoma neuroendócrino con presencia de matriz osteoide. Inmunomarcación positiva difusa, con menor intensidad en citoplasma y con predominio nuclear de mayor intensidad. E: Adenocarcinoma bien diferenciado con inmunomarcación positiva en todas las células tumorales, con un refuerzo de la inmunomarcación en la región apical de las células que forman las glándulas. F: Adenocarcinoma poco diferenciado. Inmunomarcación positiva citoplasmática y difusa. Presencia de un foco de metaplasia condroide (cartílago) con intensa marcación para HO-1.
En conclusión, estos resultados indican que HO-1 se expresa con diferente reactividad y localización celular en muestras de tumores derivados de pacientes con metástasis de PCa, crecidas en ratones inmunodeficientes. Esto da origen a diversas herramientas para el estudio de la funcionalidad e impacto de la presencia de HO-1 y a futuro, posiblemente, podrán usarse para el diagnóstico y/o tratamiento de las diferentes subpoblaciones de pacientes.

Discusión

CAPÍTULO I: ROL DE HO-1 EN LA ANGIOGÉNESIS DEL PCa

El PCa es uno de los tipos de cánceres más frecuente entre los hombres. Las células cancerígenas presentan muchas alteraciones moleculares conduciendo a una activación constitutiva de señales mitogénicas y de sobrevida, como también a la pérdida de la apoptosis. Como resultado final, los pacientes desarrollan tumores resistentes a la castración, con un aumento de la expresión de factores proangiogénicos. La conversión a un fenotipo angiogénico (llamado switch angiogénico) es considerado crucial para el crecimiento y progresión del PCa desde tumores latentes y localizados hacia carcinomas invasivos. Es así, que las terapias antiangiogénicas emergen como un blanco importante para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, la angiogénesis es un proceso complejo mediado por múltiples factores (entre ellos, la hipoxia, los factores de crecimiento, las citoquinas y el estrés oxidativo) (Berz y Wanebo 2011) y, por lo tanto, resulta esencial descifrar los pasos críticos involucrados en este proceso durante el desarrollo del PCa. Los resultados de esta tesis demuestran que HO-1 es un factor clave para el control de la angiogénesis en el tejido tumoral prostático y, por lo tanto, esta proteína emerge como una nueva opción terapéutica para esta enfermedad.

Los ROS actúan como moléculas de señalización que median diversas respuestas celulares como la proliferación, la migración y la expresión de genes tanto en células endoteliales como en células cancerígenas (Ushio-Fukai y Nakamura 2008). Más aún, la alta producción de ROS en las células tumorales está implicada en la regulación de la angiogénesis y en el crecimiento tumoral, posiblemente controlando la expresión de HIF-1 α y VEGF (Tertil *et al.* 2010). En nuestro laboratorio demostramos que ante un estímulo estresor (H₂O₂) los niveles de ROS alcanzados fueron significativamente menores en las células PC3HO-1 respecto a las PC3 β gal y este efecto, probablemente, esté frenando el disparo angiogénico.

En esta tesis confirmamos que la sobre-expresión de HO-1 en la línea celular PC3 (insensible a andrógenos y con reactividad osteolítica) reprime la expresión del ARNm de VEGF-A, VEGF-C, HIF-1α e IRGAα5 y la actividad del promotor de VEGF-A *in vitro* (Fig. 25). Más aún, los resultados obtenidos de los estudios *in vivo* mostraron que la sobre-expresión de HO-1 inhibe la formación de nuevos vasos

sanguíneos en tumores PC3HO-1 creciendo como xenotransplantes en ratones *nu/nu* a corto plazo (6 días) (Fig. 29). Este hallazgo fue confirmado histológicamente mediante la tinción del tricrómico de Masson (Fig. 30). Asimismo, cuando analizamos la expresión de marcadores de angiogénesis como CD34 y MMP9, comprobamos que la inmuno-reactividad de dichos marcadores fue menor en los tumores que sobre-expresan HO-1 (Fig. 31 y 32). Confirmando los resultados obtenidos en los tumores de corto plazo, también se observó una menor inmuno-reactividad para VEGFR2 en tumores derivados de células PC3HO-1 crecidos durante un período más largo (23 días) (Fig. 33). Estas observaciones indican que la sobre-expresión de HO-1 en células PC3 ejerce un efecto anti-angiogénico que se mantiene en el transcurso del crecimiento tumoral. La disminución de la angiogénesis pudo observarse aún macroscópicamente, cuando estos tumores crecidos por 23 días se extirparon y compararon con los controles, señalando así el fuerte efecto inhibidor de la angiogénesis ejercido por HO-1.

El proceso de la invasión tumoral y de la metástasis requiere la degradación del tejido conectivo asociado a la membrana basal de la vasculatura y al tejido intersticial (Kong et al. 2007). La estimulación con VEGF aumenta la motilidad de las células tumorales y en cooperación con las MMPs y uPA incrementa la invasión (McCawley y Matrisian 2001). De acuerdo con estas afirmaciones y con trabajos previamente reportados por nuestro laboratorio (Gueron et al. 2009), en esta tesis comprobamos que los tumores PC3HO-1 de corto plazo presentaron una menor inmuno-marcación positiva para MMP9 comparados con los xenotransplantes derivados de PC3ßgal (Fig. 32). Esta menor inmuno-reactividad de MMP9 se observó aún en los tumores que sobre-expresaban HO-1 crecidos durante 23 días (Gueron et al. 2009). Además, el crecimiento de estos tumores se vio retardado respecto a los controles como se detectó al medir el volumen tumoral a lo largo del tiempo (Gueron et al. 2009), probablemente como producto de la reducción de la angiogénesis. Dado que las evidencias clínicas han mostrado que el aumento en los niveles de VEGF se asocia a un peor pronóstico y que los niveles plasmáticos de VEGF en PCa aumentan durante la progresión al esqueleto (Latil et al. 2000), el control de la angiogénesis puede a su vez restringir la capacidad metastásica de las células de PCa.

Hasta el momento, las terapias anti-angiogénicas han mostrado una baja eficiencia, alta toxicidad y una relativa falta de especificidad (Zayed *et al.* 2010). En esta tesis hemos demostrado que la sobre-expresión de HO-1 atenúa la angiogénesis tumoral *in vivo*, proponiendo un nuevo rol para HO-1 en la progresión del PCa, pudiendo ser blanco de terapias anti-angiogénicas y aportando al conocimiento sobre la biología tumoral de este tipo de cáncer.

El efecto de HO-1 podría estar relacionado a su expresión relativa, a los productos de su actividad enzimática y a su interacción sinérgica/antagonista con otras moléculas de señalización y con factores mediadores de la angiogénesis. Además, las células tumorales y el estroma que las rodean están expuestos al medio y reciben distintos estímulos, donde HO-1 podría participar modulando las señales pro-tumorales, dependiendo del microambiente.

Por otro lado debemos tener en cuenta el repertorio de tipos celulares que son reclutados al sitio tumoral en respuesta a la cascada de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento secretados por el tumor y el estroma circundante. En este contexto hemos demostrado, mediante el análisis de un *array* de genes involucrados en inflamación y angiogénesis de células de PCa que sobre-expresan HO-1 y sus controles, que la expresión aumentada de HO-1 se correlacionaba con la represión de varios genes pro-inflamatorios y angiogénicos, tales como: ANGPT1, ANGPTL3, FIGF, IL-6, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y THBS1, epirregulina y las quimoquinas CXCL 1, 10, 3 y 5, (Gueron *et al.* 2009). Así, HO-1 podría modificar el microambiente tumoral frenando la inflamación y emergiendo como un proceso de defensa celular fundamental frente a estímulos de estrés (Otterbein *et al.* 2003).

Bussolati y col. (Bussolati *et al.* 2004; Bussolati y Mason 2006) propusieron un rol dual para HO-1 en la angiogénesis. Demostraron que la inducción de la angiogénesis mediada por VEGF requiere de la actividad de HO-1, mientras que en condiciones inflamatorias, la formación de nuevos vasos sanguíneos se atenúa por la sobre-expresión de esta proteína. Sin embargo, y como ya se ha descripto, el rol de HO-1 tanto en el crecimiento tumoral como en la angiogénesis es controversial. Nuestros resultados están de acuerdo en que la función de HO-1 depende del microambiente, demostrando la complejidad de la señalización mediada por esta molécula. De esta manera, los hallazgos contradictorios sobre el rol de HO-1 en la angiogénesis reportados por distintos grupos (Loboda *et al.* 2008; Marcantoni *et al.*

2012) podrían reflejar los distintos efectos de esta proteína sobre la tumorigénesis, cumpliendo diferentes funciones en las distintas etapas de este proceso que ocurre en múltiples fases (Was *et al.* 2010).

Es bien aceptado que HO-1 confiere citoprotección contra el estrés oxidativo y la inflamación y que varias moléculas de señalización están involucradas en esta acción citoprotectora (Tertil *et al.* 2010). Además, esta proteína ejerce funciones metabólicas vitales, regulando la degradación del hemo y manteniendo la homeostasis celular. Aunque clásicamente se la reconoce por su localización microsomal, también se ha reportado su presencia en otros compartimentos celulares (Converso *et al.* 2006; Lin Q. *et al.* 2007; Sacca *et al.* 2007; Slebos *et al.* 2007), tales como el núcleo donde cumpliría una función no canónica (Lin Q. S. *et al.* 2008b) que aún no ha sido revelada.

En este trabajo demostramos que HO-1 impedía la formación de estructuras vasculares en los tumores PC3HO-1 con una marcada disminución en el número de vasos contorsionados de pequeño calibre (Fig. 29). Es bien aceptado que la inflamación es un componente crítico del crecimiento y la progresión tumoral (De Marzo *et al.* 2007) y que varias vías de señalización convergen en la regulación del mismo, aún no se comprende completamente de qué forma cada uno de ellos está regulado y su aporte al efecto global. Así nos propusimos analizar cómo HO-1 desacopla la angiogénesis asociada a la inflamación. De esta manera, analizamos la vía de NF-κB por su importancia en el PCa y en la inflamación/angiogénesis.

La activación de NF- κ B ocurre a través de la degradación de las proteínas I κ B, mediada por la actividad del complejo quinasa I κ B (IKK). En nuestro laboratorio demostramos que la sobre-expresión de HO-1 en células PC3 reprimía la activación de NF- κ B, inducía la acumulación de I κ B y provocaba la disminución de los niveles del ARNm de IKK (Salles). Estos hallazgos concuerdan con el rol fisiopatológico de NF- κ B en PCa (Rettig *et al.* 2008). Este factor también se asoció con la expresión aumentada de MMP9 y VEGF en esta enfermedad (Shukla *et al.* 2004). Más aún, se encontró que NF- κ B está involucrado en la señalización de la matriz extracelular acoplada a integrinas en respuesta al estrés oxidativo. Así, muchos genes que son regulados por estrés oxidativo, a su vez son blancos de NF- κ B, tales como las integrinas (Eliceiri 2001). En este contexto, comprobamos que la inducción de HO-1 reducía los niveles del transcripto de la subunidad α 5 de la integrina β_1 (Fig. 25 A).

Considerando que NF-κB regula transcripcionalmente la expresión de genes involucrados en la angiogénesis y que nuestros resultados demuestran que HO-1 reduce el crecimiento tumoral en tumores de PCa xenotransplantados (Gueron *et al.* 2009), nuestra hipótesis postula que el efecto inhibitorio de HO-1 sobre la activación de NF-κB es al menos parcialmente responsable de la disminución del crecimiento tumoral. Adicionalmente, debemos considerar los efectos directos que HO-1 tiene sobre blancos angiogénicos, como por ejemplo la reducción de la generación de ROS y la represión de factores pro-angiogénicos e inflamatorios.

En resumen, en este trabajo de tesis demostramos que la inducción de HO-1 atenúa la angiogénesis tumoral *in vivo* y proponemos un nuevo rol para esta proteína en la carcinogénesis prostática.

CAPÍTULO II: ROL DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS DE PCa Y EL HUESO

II.1 Efecto de la inducción farmacológica de HO-1 en células PC3 sobre el cocultivo con PMOs

Según el Instituto Nacional de Cáncer, el PCa es el cáncer de mayor incidencia y la segunda causa de muerte por esta enfermedad entre los hombres en Argentina. El perfil de diseminación metastásico de este tipo de cáncer muestra tendencia a desarrollarse en el hueso como único sitio de progresión. Las metástasis al hueso del PCa son principalmente osteoblásticas y se manifiestan por un aumento de la masa ósea en los sitos de las lesiones (Catalona 1994). Sin embargo, la degradación del hueso es también un componente importante en la metástasis. La patogénesis del PCa refleja componentes hereditarios como también ambientales. Las citoquinas, quimioquinas, y las MMPs constituyen una red pro-inflamatoria que contribuye directamente con la progresión maligna y el aumento de estos factores se correlaciona con invasión, angiogénesis y metástasis (Hanahan y Weinberg 2011). Se ha demostrado que los osteoblastos producen factores que favorecen el crecimiento y sobrevida de las células de PCa y que esta interacción favorece la progresión de la enfermedad. Sin embargo, la naturaleza molecular de dicha interacción aún no se conoce completamente.

La isoforma inducible de la hemo oxigenasa (HO-1) confiere citoprotección contra el estrés oxidativo y la inflamación en varios modelos animales. Esta proteína ejerce funciones metabólicas vitales limitando la vía de degradación del hemo y el mantenimiento de la homeostasis celular. Trabajos previos de nuestro laboratorio nos permitieron reportar por primera vez que la inducción farmacológica o genética de la expresión de HO-1 disminuye la proliferación, invasión y migración en líneas celulares de PCa *in vitro* y disminuye el crecimiento tumoral y la angiogénesis *in vivo*. Asimismo, la sobre-expresión de HO-1 en las células de PCa inhibe la secreción de factores inflamatorios/angiogénicos al medio, lo que va a modificar el microambiente tumoral y en el caso de las metástasis también el microambiente del hueso.

Uno de los hallazgos más importantes de esta tesis es el aumento en la proliferación de los PMOs cuando fueron co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina

CAPÍTULO II: ROL DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS DEL PCa Y EL HUESO

respecto a los PMOs co-cultivados con PC3 sin pre-tratar (Fig. 43). Este aumento se manifestó como una restitución en la proliferación de los PMOs, que había disminuido debido al co-cultivo con células PC3. Dicho en otras palabras: el co-cultivo de los PMOs con las células PC3 disminuyó la proliferación en los osteoblastos; sin embargo, el pre-tratamiento de las células PC3 con hemina evitó dicha disminución. Esto nos indica que la inducción farmacológica de HO-1 en las células PC3 alteró la comunicación entre estas células y los PMOs, pudiendo afectar tanto a los factores solubles liberados por las células tumorales como a los liberados por las células óseas e impactando en la proliferación de los osteoblastos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación mediante la incorporación de ³H-Timidina, los experimentos en los cuales se contó el número de células reflejaron el mismo patrón de respuesta: el número de PMOs disminuyó por el co-cultivo con células PC3 pero se restituyó cuando las células tumorales fueron pre-tratadas con hemina (Fig. 43 y 46 A).

Cabe aclarar que cuando nos referimos a la "restitución de la proliferación" indicamos que la respuesta biológica final obtenida es igual; en ambas condiciones (PMOs crecidos solos y en co-cultivo con PC3 pre-tratadas con hemina) se logró el mismo porcentaje de incorporación de ³H-Timidina y se alcanzó el mismo número de células finales. Sin embargo, estos hallazgos no aseguran que los mecanismos/factores involucrados en la proliferación celular sean los mismos en los PMOs creciendo solos respecto a los PMOs co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina. Es posible que el co-cultivo de los PMOs con las células tumorales PC3 produzca un estrés en los osteoblastos y que la inducción farmacológica de HO-1 en las células PC3 co-cultivadas modifique su fenotipo contribuyendo a un aumento en la proliferación de los PMOs. Esto se ve reflejado en un mayor porcentaje de PMOs en la fase G2/M cuando son co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina respecto a los PMOs co-cultivados con PC3 sin pre-tratar y a los PMOs crecidos solos (Fig. 45 A). De esta manera, también mediante el análisis de Western blot, se detectó un aumento de la expresión de ciclina A (involucrada en el progreso de la fase S hacia G2/M) cuando los PMOs fueron co-cultivados con PC3 previamente tratadas con hemina (Fig. 45 B). En dicha condición, no solo se restablecieron los niveles de expresión de ciclina B1, ciclina D1 (los cuales habían disminuido en los PMOs por el co-cultivo con células PC3), sino que además disminuyeron los niveles

proteicos de p21 (Fig. 45 B) y aumentaron los niveles del ARNm de Ki-67 (Fig. 44), un marcador de proliferación celular.

La disminución de la proliferación y el número de células detectados en los PMOs co-cultivados con PC3 sin pre-tratar coinciden con los hallazgos previamente reportados por el laboratorio de la Dra. Navone (Li Z. G. *et al.* 2008d). Otros ensayos realizados en esta tesis también se alinean con dichos datos, como la disminución de los niveles de expresión de las ciclinas A, B1 y D1 provocada por el co-cultivo y el aumento de los niveles de p21 medidos por Western blot (Fig. 45 B).

Sin embargo, si bien observamos que en los PMOs co-cultivados con PC3 disminuye el número de células finales respecto a los PMOs crecidos solos, al concluir el experimento el número de PMOs co-cultivados con PC3 sin pre-tratar era mayor al número inicial de PMOs sembrados. Es decir, las células óseas mantienen su capacidad de proliferación. El patrón de ciclinas analizadas mediante Western blot y las diferencias obtenidas en la proliferación, indican que los PMOs co-cultivados con PC3 sin pre-tratar proliferan, pero significativamente menos que al cultivarlos solos o con células tumorales pre-tratadas. De esta manera, nada indicaría que los osteoblastos estén sufriendo apoptosis y, por lo tanto, no se planteó el objetivo de analizar este proceso de muerte celular.

La disminución en la proliferación y en el número de PMOs co-cultivados con células PC3 respecto a los PMOs crecidos solos sugeriría que dicho co-cultivo representa un estrés para los osteoblastos. Si bien no se observaron diferencias significativas en la cantidad de ROS entre ambas condiciones (Fig. 47 D), los niveles del transcripto de Gadd45 α , involucrado en el arresto del ciclo celular y en la reparación del daño al ADN, se encontraron elevados en los PMOs co-cultivados con PC3 respecto a los crecidos solos (Fig. 49). Además, este incremento se pierde en el co-cultivo con las células tumorales pre-tratadas con hemina (Fig. 49). Esto nos conduce a proponer que los PMOs co-cultivados con células PC3 sin pre-tratar estarían bajo una situación de estrés, donde aumentan los niveles de Gadd45 α como también los niveles de expresión de enzimas involucradas en la defensa anti-oxidante como catalasa, MnSOD y HO-1 (Fig. 47). Sin embargo, los niveles de las enzimas involucradas en el estrés oxidativo aumentaron también en los PMOs co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina respecto a los cultivados solos (Fig. 47), pero no se observaron diferencias significativas en los niveles del ARNm de

CAPÍTULO II: ROL DE HO-1 EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS DEL PCa Y EL HUESO

DISCUSIÓN

Gadd45a entre estas condiciones (Fig. 49). En conjunto, estos resultados nos podrían conducir a la hipótesis, que en los PMOs co-cultivados con células PC3 se presenta una situación de estrés que podría estar afectando su proliferación, pero al inducir la expresión de HO-1 farmacológicamente en las células tumorales, los PMOs logran superarlo aumentando la expresión de las enzimas de defensa y restituyendo la proliferación. Es posible que todos estos efectos estén mediados por la activación de la vía de FoxO. Sin embargo, la expresión de Gadd45α, que es un gen blanco de esta vía, se encontró aumentada en los PMOs co-cultivados con PC3 sin pre-tratar respecto a los PMOs co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina (Fig. 49). Es posible que los PMOs co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina superen la situación de estrés a través de la vía de FoxO, pero sin la activación transcripcional de Gadd45a o que el ARNm de este gen se haya inducido en un espacio temporal temprano dentro de las primeras horas del co-cultivo, permitiendo la reparación del daño y posteriormente el ingreso a la fase G2/M. Concluido el lapso del co-cultivo (24 h), probablemente, ya no se detecten diferencias en los niveles del ARNm de Gadd45α.

Descubrimientos en las células osteoblásticas sugieren que la interacción entre βcatenina y FoxO podría ser vital para la homeostasis del hueso y que esta vía participa del mecanismo de la osteoporosis relacionada con la edad (Almeida 2011). En los huesos de los animales adultos, la expresión de los genes blanco de β catenina/TCF está disminuida, mientras que la de los genes blanco de FoxO está inducida. Estas características acompañadas por el aumento de los marcadores de estrés oxidativo resultan en la disminución de la formación ósea (Almeida et al. 2007a; Almeida et al. 2007b). Más aún, en muchos tipos celulares incluyendo a los osteoblastos, el estrés oxidativo induce la asociación de FoxO con β-catenina, la cual es requerida para activar la transcripción de los genes blanco de FoxO. Es interesante resaltar que el estrés oxidativo producido por el H₂O₂ promueve la activación de la transcripción de FoxO, a expensas del re-direccionamiento de la vía Wnt/ β -catenina y de la diferenciación de los osteoblastos (Almeida *et al.* 2007a). En el presente trabajo demostramos que no ocurre un re-direccionamiento de βcatenina desde la vía canónica de Wnt hacia la activación de FoxO. Esta observación surge de los ensayos usando genes reporteros, que demostraron que no hubo alteraciones en la activación de la vía Wnt/β-catenina cuando las células madre mesenquimales en vías de diferenciación hacia osteoblastos (C2C12) se

cultivaron solas o en presencia de células tumorales (Fig. 48 A). En cambio se comprobó que el pre-tratamiento con hemina en las células PC3 inducía la vía de FoxO en las C2C12 por efecto del co-cultivo (Fig. 48 B). Una explicación posible en esta última condición experimental es que el *pool* de β-catenina nuclear sería suficiente para encender la vía de FoxO y mantener en niveles basales la vía Wnt/βcatenina. Esta observación puede justificarse con los datos obtenidos con los ensayos de Western blot e inmunofluorescencia, ya que si bien en los PMOs cocultivados con PC3 pre-tratadas con hemina los niveles totales de β-catenina se redujeron a la mitad, su distribución subcelular no se modificó (Fig. 41 B y 42). Además, si bien en las células PC3 pre-tratadas con hemina y co-cultivadas con PMOs aumentó la expresión de DKK-1 a nivel del ARNm y en los PMOs cocultivados con estas células disminuyó el *pool* total de β -catenina (Fig. 41), no se afectó la activación de la vía de Wnt/β-catenina en los osteoblastos (Fig. 48 A). El gran incremento de DKK-1 en las células PC3 podría no llegar a producir una respuesta proporcional en los PMOs por dos motivos. Por un lado porque las células PC3 expresan altos niveles endógenos de DKK-1 y un aumento adicional de su expresión, probablemente no tenga efecto sobre los PMOs por la saturación de la inhibición de la vía. Por otro lado podría ocurrir que DKK-1 favorezca la degradación de β-catenina en los PMOs, lo que se correlaciona con la disminución de sus niveles proteicos (Fig. 41 B), sin que en las condiciones experimentales utilizadas detectemos alteraciones en su señalización canónica o distribución subcelular, pero a su vez, siendo capaz de inducir otra vía alternativa que responde al estrés como es la de FoxO. Quizás este camino sea muy sensiblemente activado por ROS y con menores concentraciones de β -catenina (Fig. 47 D y 48 B).

La relevancia de DKK-1 en PCa proviene de hallazgos clínicos. En muestras de pacientes con lesiones metastásicas de PCa, la expresión de DKK-1 fue mayor en estos tejidos respecto a los tejidos no neoplásicos pero, sin embargo, fue menor respecto a las muestras del tumor primario. El aumento de expresión de DKK-1 en las metástasis se correlacionó con una menor sobrevida de los pacientes y se concluyó que el incremento de DKK-1 es un evento temprano en el PCa y que sus niveles disminuyen en metástasis avanzadas a hueso. Esta disminución podría favorecer la activación de la vía Wnt/β-catenina en los osteoblastos. De esta manera, DKK-1 actuaría como una proteína que marca el cambio de un fenotipo de metástasis osteolítico hacia uno osteoblástico (Hall C. L. *et al.* 2006).

Además, DKK-1 es un factor que se secreta y se considera que ejerce un rol crítico sobre el microambiente tumoral (Menezes *et al.* 2012). Así, DKK-1 podría unirse a otras proteínas diferentes a sus ligandos LRP5/6 o KREMEN y tener distintos mecanismos de acción y respuestas biológicas, aún no conocidos.

Teniendo en cuenta la plétora de factores que son liberados por las células tumorales y que varios de estos factores son pro-angiogénicos y pro-inflamatorios, la modulación de la expresión de genes en las células de PCa origina un microambiente diferente al que se encuentra expuesto el hueso. Así consideramos que el cambio ocasionado por la exposición a hemina de las células tumorales impactará sobre el microambiente y la formación/resorción del hueso.

Los estudios realizados en esta tesis sobre estrés oxidativo mostraron no sólo un aumento en los niveles de ROS, sino también en la expresión de enzimas antioxidantes. Esto nos condujo a pensar si el aumento de HO-1 en los osteoblastos debido al co-cultivo con las células PC3 pre-tratadas o no con hemina tendría alguna otra implicancia biológica y si en condiciones normales cumpliría alguna función en la homeostasis del hueso. Varios trabajos abordaron el estudio del rol de HO-1 en el metabolismo óseo en diferentes condiciones experimentales. Uno de los primeros trabajos demostró que en huesos expuestos a carga mecánica la expresión de HO-1 aumenta en los osteoblastos (Rawlinson et al. 1998). Posteriormente, Zwerina y col. (Zwerina et al. 2005) reportaron que el tratamiento con hemina reguló de manera dosis-dependiente la expresión de HO-1 e inhibió la diferenciación de precursores de osteoclastos, derivados de células de bazo in vitro y, por lo tanto, la resorción ósea. Este efecto fue mediado por el bloqueo de señales esenciales para la diferenciación de los osteoclastos, como la reducción en los niveles del receptor de CSF-1 y los de RANK. A su vez, este tratamiento, nuevamente de manera dosis-dependiente, bloqueó la osteoclastogénesis mediada por TNF tanto in vitro como in vivo. También la pérdida de hueso asociada a la presencia de citoquinas pro-inflamatorias inducida por LPS, fue muy sensible al tratamiento con hemina *in vivo*. Estos datos sugieren un rol central de HO-1 para interferir en la pérdida de hueso asociada a la inflamación (Zwerina et al. 2005). Recientemente, Sakai y col. (Sakai et al. 2012) utilizaron como modelo experimental macrófagos derivados de médula ósea de ratón estimulados con CSF-1 y RANKL y demostraron que el tratamiento con hemina disminuyó significativamente la osteoclastogénesis. Comprobaron que RANKL aumentaba la

concentración extracelular de HMGB1 (high mobility group box 1), una citoquina involucrada en la diferenciación de osteoclastos, y que el tratamiento con hemina revertía este efecto. A su vez, observaron que la osteoclastogénesis mediada por RANKL disminuye los niveles de HO-1 y promueve la liberación de HMGB1, sugiriendo que la disminución en los niveles de HO-1 es el paso inicial para la inducción de la diferenciación mediada por RANKL (Sakai et al. 2012). Ishigatsubo y col. (Hama et al. 2012) reconfirmaron la disminución en los niveles de HO-1 por RANKL en las etapas tempranas de la osteoclastogénesis. Estudios realizados con macrófagos derivados de médula ósea provenientes de ratones deficientes para el represor de la expresión de HO1 (Bach1^{-/-}) fueron parcialmente resistentes a la disminución de HO-1 inducida por RANKL y, consecuentemente, presentaron fallas en la osteoclastogénesis. De acuerdo con dichas observaciones, el tratamiento de estas células con shRNAHO-1 aumentó el número de osteoclastos. Más aún, en ensayos in vivo la destrucción ósea mediada por TNF-α fue menor en ratones Bach1^{-/-} (Hama et al. 2012). Por otro lado, se reportó que las citoquinas y la actividad de HO tienen efectos regulatorios sobre el microambiente de las MSCs y la hematopoiesis (Abraham 1991). Más específicamente, al indagar el rol de HO-1 en los osteoblastos, encontramos que esta proteína inhibe la apoptosis osteoblástica inducida por TNF- α vía la generación de CO (Chae et al. 2006), que regula negativamente la producción de citoquinas (Chaea et al. 2007) y que está implicada durante la diferenciación de las MSCs hacia el linaje osteoblástico (Vanella et al. 2010) (Barbagallo et al. 2010). También se demostró que el aumento de la expresión de HO-1 disminuye la adipogénesis en animales obesos (Li M. et al. 2008a). Bargaballo y col. comprobaron que los niveles de HO-1 aumentaban durante la diferenciación de los osteoblastos, siendo este aumento previo a la expresión del ARNm de marcadores de diferenciación como ALP, BMPs, osteonectina y Runx-2. Durante la adipogénesis los niveles de HO-1 disminuyeron y, efectivamente, el tratamiento de las células MSCs con CoPP (cobalto protoporfirina IX, un activador de HO-1) disminuyó la adipogénesis y aumentó la diferenciación a osteoblastos de manera dosis-dependiente (Barbagallo et al. 2010). El tratamiento con el péptido de crecimiento de osteoblastos (OGP) aumentó los niveles de HO-1, así como la proliferación y diferenciación de las células mediante la inducción de la vía de Akt. Más aún, el tratamiento con SnPP o con siRNA HO-1 revirtieron el efecto mediado por OGP, sugiriendo que la función de este péptido es dependiente de la expresión y

actividad de HO-1 (Vanella et al. 2010). En un modelo de osteoartritis, donde los osteoblastos fueron estimulados con IL-1β, el tratamiento con CoPP aumentó la mineralización y la expresión de marcadores de diferenciación ósea. También se detectó una reducción en la expresión de MMPs y en la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 y un aumento en los niveles de la interleuguina anti-inflamatoria IL-10. De esta manera, los autores propusieron a HO-1 como una proteína citoprotectora de los osteoblastos en la osteoartitris (Clerigues et al. 2012). Otros estudios donde investigaron el efecto del CO y la biliverdina en un modelo de artritis reumatoidea, demostraron que en animales expuestos a CO disminuyó la inflamación, la erosión y el número de osteoclastos, mientras que se previno la degradación del cartílago tanto en ratones tratados con biliverdina como con CO (Bonelli et al. 2012). Sin embargo, también existen reportes opuestos. El grupo de Yang (Lin T. H. et al. 2010) trabajó con cultivos primarios de osteoblastos de rata y, mediante tratamiento con hemina o sobre-expresión de HO-1 por infección adenoviral, demostró que HO-1 inhibía la maduración de los osteoblastos incluyendo la mineralización y la actividad de ALP y disminuía los niveles del ARNm de marcadores de diferenciación como ALP, OCN y Runx-2. Más aún, los productos de la reacción enzimática de HO-1 estaban involucrados en esta acción inhibitoria. El ligando natural de PPARy (de gran importancia en la adipogénesis), 15d-PGJ2, regula de manera negativa la diferenciación de los osteoblastos y su administración aumentó los niveles del ARNm y de la proteína HO-1 vía p38 MAPK, ERK y PI3K-Akt. El bloqueo de la actividad de HO-1 antagonizó el efecto represor de 15d-PGJ2 sobre la diferenciación de los osteoblastos, indicando que HO-1 mediaría la acción inhibitoria de 15d-PGJ2 (Lin T. H. et al. 2010).

En este trabajo de tesis observamos que los niveles de la proteína HO-1 en los PMOs aumentaron debido al co-cultivo con células PC3 pre-tratadas o no con hemina (Fig. 47 C). Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales no observamos diferencias en la expresión de la mayoría de los marcadores de diferenciación de osteoblastos analizados (ALP, Col1a1, Col1a2) ni en la marcación de Von Kossa (Fig. 36 y 37). La falta de coincidencia de estos hallazgos con lo reportado por Bargaballo y col. (Barbagallo *et al.* 2010) podría deberse al hecho de que estos autores detectan el aumento de HO-1 previo a la expresión de los marcadores de diferenciación. Bajo esta hipótesis, es posible que en nuestro modelo nos encontremos en una ventana temporal donde aumentó la expresión de HO-1

pero aún no se detectan alteraciones en la diferenciación. Por otro lado, según Yang y col. (Lin T. H. *et al.* 2010) HO-1 inhibe la maduración de los osteoblastos. En este contexto, nuestros resultados discrepan de los de estos autores ya que no observamos cambios en la diferenciación a pesar del aumento de HO-1. Cabe resaltar que los niveles del ARNm de OCN disminuyeron significativamente en los PMOs co-cultivados con PC3 pre-tratados o no con hemina respecto a los PMOs crecidos solos (Fig. 36 E) y esta disminución se correlacionaría con el aumento a nivel proteico de HO-1 (Fig. 47 C). En conclusión, si el aumento de HO-1 afecta de alguna forma la expresión de OCN, nuestros datos se encontrarían alineados con el modelo de Yang y col. (Lin T. H. *et al.* 2010).

Las células madre mesenquimales en vías de diferenciación hacia osteoblastos (preosteoblastos) expresan Runx-2, el primer factor de transcripción responsable de determinar el linaje osteoblástico. Su expresión aumenta en osteoblastos inmaduros y finalmente disminuye cuando alcanzan el grado de osteoblastos maduros. En esta última etapa, Runx-2 inhibe la maduración de estas células y, por lo tanto, la formación de hueso. Más aún, en osteoblastos inmaduros, activa la transcripción de genes de diferenciación y puede tanto favorecer como reprimir la proliferación (Komori 2010). Nuestros resultados mostraron un aumento en los niveles del transcripto de Runx-2 cuando los PMOs fueron co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina respecto a los PMOs crecidos solos (Fig. 36 A). Sin embargo, este aumento de Runx-2 no se correlacionó con un aumento en la expresión de ningún otro marcador de diferenciación (Fig. 36), ni con cambios en la deposición de calcio (Fig. 37). Se demostró que los genes tempranos a intermedios en la diferenciación de los osteoblastos que codifican para OCN, OPN, algunos colágenos y MMPs son inducidos por Runx-2, mientras que los niveles de ALP no se modifican (Karsenty 1998). En nuestras condiciones experimentales Runx-2 no afectó la transcripción de los genes blanco estudiados. Es bien conocido que Runx-2 está involucrado en numerosas interacciones proteína-proteína, muchas de las cuales pueden activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco (Jonason et al. 2009).

Se demostró que Runx-2 regula la proliferación de los osteoblastos y sus niveles de expresión están sujetos a las señales de crecimiento. Además se comprobó que Runx-2 se induce frente a la deprivación de factores de crecimiento cuando las células entran en quiescencia y sus niveles están elevados durante la diferenciación.

Cuando se activa la proliferación en respuesta a señales de crecimiento, los niveles de Runx-2 se encuentran deprimidos (Pratap *et al.* 2003). Así Runx-2 emerge como un sensor del microambiente celular.

Se ha propuesto un concepto fundamental en el cual los cambios en los reguladores transcripcionales maestros, como por ejemplo Runx-2, representan la funcionalidad de las redes de señalización de las células y tales cambios pueden ser determinantes en la reprogramación del destino de forma tal de definir la identidad celular en el microambiente. Es decir, debido a la reprogramación de la red de señalización, los progenitores que expresan Runx-2 reaccionan y se comportan diferencialmente a sus células madre de origen en el mismo microambiente del hueso reteniendo la memoria de identidad del osteo-progenitor. La retención de tal memoria puede surgir por remodelación de la cromatina, ya que Runx-2 es parte de los complejos de modificación de la cromatina (Lian *et al.* 2003).

Dado que en nuestros resultados mostraron que en los PMOs co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina se encuentra activada la vía de FoxO, resulta interesante destacar los trabajos donde se demostró que FoxO1 se une a Runx-2 en osteoblastos (Teixeira et al. 2010; Yang S. et al. 2011). Es interesante resaltar que mientras Runx-2 no afecta la unión al ADN de FoxO1 (Yang S. et al. 2011), FoxO1 puede estimular o reprimir la actividad transcripcional de Runx-2 dependiendo del modelo experimental utilizado (Teixeira et al. 2010; Yang S. et al. 2011; Zhang H. et al. 2011). Estudios realizados en osteoblastos han sugerido que FoxO1 puede inhibir la expresión de OCN, ya sea uniéndose directamente a su promotor, o interactuando con Runx-2 y reprimiendo su actividad o ambos (Rached et al. 2010a; Yang S. et al. 2011). De esta manera, es posible que en los PMOs co-cultivados con PC3 pretratadas con hemina los niveles de OCN estén disminuidos respecto a los PMOs crecidos solos debido a que FoxO1 se encontraría activado y podría o bien reprimir directamente al promotor de OCN, o mediante la unión a Runx-2, o como consecuencia de ambos efectos. Sin embargo, esto no explicaría el mecanismo por el cual los niveles de OCN también están disminuidos en los PMOs co-cultivados con PC3 sin pre-tratar. Seguramente en este último caso otras vías diferentes podrían inhibir la transcripción de OCN.

En resumen, descubrimientos recientes han demostrado que FoxO cumple un rol importante en la homeostasis del hueso, ejerciendo funciones dependientes e independientes de ROS. En células del linaje osteoblástico, FoxO regula la expresión de genes de diferenciación como OCN y la función de factores de transcripción vitales para la osteoblastogénesis, como Runx-2 y β-catenina. Futuros experimentos seguramente dilucidarán otros genes blancos de FoxO, así como su acción indirecta sobre otros factores de transcripción involucrados en la homeostasis del hueso (Almeida 2011).

En la presente tesis hemos demostrado que la vía de FoxO está activa. Sin embargo, según los ensayos realizados, no podemos saber cuales de las isoformas de FoxO estarían involucradas.

Es importante resaltar que el número de células PC3 no se modificó ya sea por el pre-tratamiento con hemina, por el co-cultivo con PMOs o por la combinación de ambas condiciones (Fig. 46). De esta manera, los cambios hallados en la proliferación de los PMOs se deben a los factores solubles secretados al medio por la interacción de ambas poblaciones celulares en el co-cultivo y no por diferencias en el número de células cancerígenas, siendo que esta condición afectaría el patrón de moléculas liberadas al medio y su concentración.

Al analizar los niveles del ARNm de factores involucrados en la resorción ósea (PTHrP, uPA, TGF- β 1) y la actividad de MMP9 en las células PC3 no se observaron diferencias, ya sea que las células estaban pre-tratadas o no con hemina y cocultivadas o no con PMOs (Fig. 40). Considerando que los tumores derivados de PC3 creciendo en el hueso producen una reacción primordialmente osteolítica, en una primera instancia se esperaría alteraciones en la expresión de estos factores de resorción cuando las células crecen en co-cultivo con osteoblastos. Sin embargo, los datos obtenidos en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo deben limitarse al modelo *in vitro* estudiado, en donde los osteoclastos y la matriz del hueso, entre otros, están ausentes. Es decir, en un modelo *in vivo* los resultados podrían diferir ya que la actividad de los osteoclastos y la siguiente liberación de TGF- β embebido en la matriz podría afectar de distinta manera, por ejemplo, la expresión de PTHrP, según la modulación de HO-1 en las células PC3.

Con respecto a la expresión de los genes involucrados en la resorción ósea, el pretratamiento con hemina de las células tumorales si bien no produjo cambios en los niveles de expresión del ARNm de RANKL y OPG en los PMOs (más allá de los cambios producidos por el co-cultivo) (Fig. 38) disminuyó los niveles de expresión de CSF-1, CCL2 y OPN, involucrados en la osteoclastogénesis, en la migración, en la maduración y en la adhesión de los osteoclastos (Fig. 39). Es decir, considerando el rol regulatorio que ejercen los osteoblastos sobre los osteoclastos, cuando se induce HO-1 en las células PC3, el co-cultivo con PMOs afectaría el diálogo entre ambas poblaciones del hueso. Cabe resaltar que los niveles de los transcriptos de IL-6 no se modificaron en ninguna de las condiciones experimentales.

Como ya reportó el grupo de la Dra Navone (Fizazi *et al.* 2003), los niveles del ARNm de RANKL aumentaron y los de OPG disminuyeron en los PMOs debido al co-cultivo con las células tumorales tanto PC3 como MDA PCa 2b. Este efecto no se modificó cuando en ambos tipos celulares se moduló la expresión de HO-1 (Fig. 38 y 55), demostrando que HO-1 no participa en la regulación de este eje *in vitro*. Debido a que las dos líneas de PCa al crecer en hueso presentan un fenotipo distinto (resorción y formación ósea, respectivamente), se hubiese esperado que la modulación del eje RANKL/OPG sea distinta. Una posible explicación sería que la vía RANKL/OPG no estaría involucrada en la remodelación ósea desencadenada por ambas líneas celulares o que el modelo utilizado de co-cultivo no representa adecuadamente el crecimiento de las células en el hueso *in vivo*.

La figura 64 muestra el modelo propuesto del co-cultivo de células PC3 pre-tratadas con hemina y co-cultivadas con osteoblastos. En las células PC3 aumenta la expresión de HO-1 y de DKK-1 mientras que en los osteoblastos aumenta la proliferación y los niveles de ROS, sin observarse cambios en la diferenciación. Asimismo se activa la vía de FoxO, mientras que no se producen modificaciones en la vía Wnt/β-catenina (Fig. 64).



Figura 64. Modelo propuesto del co-cultivo de células PC3 pre-tratadas con hemina y co-cultivadas con osteoblastos. En las células PC3 **(arriba)** aumenta la expresión de HO-1 y de DKK-1. En los osteoblastos **(abajo)** no hay cambios en la diferenciación pero aumenta la proliferación y los niveles de ROS. Se activa la vía de FoxO, mientras que no se producen modificaciones en la vía Wnt/β-catenina. En el núcleo, la flecha angosta representa la actividad basal de la vía mientras que la flecha ancha representa la vía activada.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis mostraron que al inducir farmacológicamente HO-1 en las células PC3 co-cultivadas aumenta la expresión de DKK-1 en estas células mientras que los osteoblastos logran recuperar el número celular que había disminuido debido al co-cultivo. Un mecanismo posible para esta restitución en la proliferación es la activación de la vía de FoxO. Estos resultados confirman que la inducción farmacológica de HO-1 en las células PC3 y posterior co-cultivo con PMOs afecta los factores que son secretados al medio y, de esta manera, al alterarse el microambiente se modifica la comunicación entre las células de PCa y los osteoblastos.

II.2 Efecto del silenciamiento genético de la expresión de HO-1 en células MDA PCa 2b sobre el co-cultivo con PMOs

De los experimentos realizados con la línea celular MDA PCa 2b, donde se silenció la expresión de HO-1 a nivel genético, no podemos concluir que HO-1 ejerza algún rol tanto en la proliferación como en la diferenciación de los PMOs co-cultivados con dichas células. Es importante resaltar que en la línea tumoral MDA PCa 2b, con altos niveles endógenos de HO-1 (Gueron *et al.* 2009), sensible a andrógenos y con reactividad osteoblástica (Navone *et al.* 1997), logramos silenciar alrededor del 70% la expresión de HO-1 a nivel del ARNm (Fig. 52) y que la modulación negativa persistía luego del co-cultivo (Fig. 53).

Los niveles de expresión de los ARNm de los marcadores de diferenciación tempranos Runx-2 y ALP en los PMOs, no se modificaron ni por el co-cultivo con las células MDA PCa 2b ni por el silenciamiento de HO-1 en las células tumorales (Fig. 54). Al estudiar la expresión de los marcadores de diferenciación tardíos encontramos que Col1a1 en los PMOs disminuyó debido al co-cultivo con las células MDA PCa 2b shControl y shHO-1, Col1a2 disminuyó solo en los PMOs co-cultivados con MDA PCa 2b shHO-1 y los niveles de OCN no se modificaron (Fig. 54). En conjunto estos resultados sugieren que el silenciamiento de HO-1 en la línea MDA PCa 2b no parecería modificar la diferenciación de los osteoblastos. Si ejerciera un efecto, éste sería muy sutil y afectaría los estadíos más avanzados donde regularía la síntesis de colágeno.

A su vez, al estudiar los genes involucrados en la resorción ósea, no encontramos diferencias en la expresión de OPN e IL-6 entre los PMOs crecidos solos y los cocultivados con los distintos *pooles* de MDA PCa 2b (Fig. 56). En cambio, se observó una disminución en los niveles de expresión de CSF-1 y CCL2 en los PMOs cocultivados con los *pooles* de células MDA PCa 2b respecto a los PMOs crecidos solos, sin hallarse diferencias según la modulación de HO-1 en las células cancerígenas (Fig. 56). Estos resultados demuestran que la expresión de HO-1 en la línea celular MDA PCa 2b no afecta la transcripción de los genes analizados responsables de la resorción ósea.

DISCUSIÓN

Asimismo, continuamos estudiando si la modulación de HO-1 en las células MDA PCa 2b co-cultivadas con PMOs afectaba la expresión de enzimas involucradas en la defensa ante el estrés oxidativo. Se observó que los niveles del ARNm de MnSOD disminuían en PMOs debido al co-cultivo con MDA PCa 2b shControl y que el silenciamiento de HO-1 no produjo alteraciones. Los niveles de catalasa no sufrieron modificaciones en los PMOs crecidos solos o co-cultivados (Fig. 57). Estos resultados no son suficientes para evaluar si hay alteraciones en balance oxidativo en los osteoblastos como consecuencia del co-cultivo con las células MDA PCa 2b. Tampoco se observaron diferencias en los niveles de Ki-67 (Fig. 58). Considerando que trabajamos con cultivos primarios de osteoblastos, se espera que estas células posean mecanismos de defensa que las protejan frente a diferentes injurias como las provocadas por los factores secretados por las células tumorales.

Recientemente en nuestro laboratorio demostramos que la inducción de la expresión farmacológica o genética de HO-1 en células de PCa regula negativamente la señalización del AR, por un mecanismo mediado por la retención citoplasmática del factor de transcripción STAT-3 (de la familia de proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción) (Elguero *et al.* 2012). En el presente trabajo confirmamos que al silenciar HO-1 en células MDA PCa 2b aumentan los niveles de PSA, reflejando la pérdida de la regulación negativa de la actividad del AR también en esta línea celular. Sin embargo, un hallazgo importante en esta tesis es que el co-cultivo con los osteoblastos aumentó la expresión de PSA y que el silenciamiento de HO-1 no fue capaz de modular dicha inducción (Fig. 59). Así sugerimos que el co-cultivo con las células óseas podría alterar el fenotipo de las células tumorales o los mecanismos regulatorios funcionales.

En resumen, consideramos que es necesario profundizar el estudio de la modulación de la expresión de HO-1 y el efecto sobre el estrés oxidativo en las células tumorales y en los osteoblastos.

II.3 Efecto de la inducción farmacológica de HO-1 en células PC3 sobre el cocultivo con explantes de calvarias

Con el fin de estudiar más profundamente el rol de HO-1 en las células tumorales sobre los osteoblastos, se trabajó con explantes de calvarias. Estas poseen un nivel

de complejidad mayor al de los cultivos de PMOs y preservan las relaciones entre las distintas poblaciones celulares del hueso y la matriz. El análisis histológico no mostró diferencias en la formación de hueso, ya sea en las calvarias crecidas solas como en las co-cultivadas con PC3 sin pre-tratar o pre-tratadas con hemina, al menos en las condiciones experimentales analizadas. Estos hallazgos coinciden con los resultados *in vitro* donde no se observaron cambios en la diferenciación de los PMOs entre las distintas condiciones.

El análisis de la expresión de HO-1 por inmunohistoquímica reflejó resultados similares a los obtenidos *in vitro*, ya que aumentó el porcentaje de osteoblastos activados (en la línea de formación de hueso) con inmuno-reactividad positiva para HO-1 en las calvarias co-cultivadas con células PC3 y este aumento fue aún mayor cuando las células PC3 fueron pre-tratadas con hemina (Fig. 51). Comparando estos resultados con lo reportado por Bargaballo y col. (Barbagallo *et al.* 2010), quienes detectaron un aumento en la expresión de HO-1 previo a la inducción de los marcadores de diferenciación, es posible que en nuestro modelo de co-cultivo con explantes de calvarias nos encontremos nuevamente en una ventana temporal donde aumentó la expresión de HO-1 pero aún no se detectan alteraciones en la diferenciación y, por lo tanto, en la formación de hueso.

Resulta interesante el análisis de la inmunohistoquímica de Ki-67, donde la cuantificación de las células positivas para este marcador aumentó en las calvarias co-cultivadas con PC3 pre-tratadas o no con hemina respecto a las calvarias creciendo solas (Fig. 51). Dichas células, que presentaron reactividad positiva para Ki-67, incluyeron a los osteoblastos y a las células del tejido conectivo. En este experimento el efecto de las células tumorales se debe a los factores solubles secretados por las mismas cuando están en co-cultivo con un explante de órgano, en el cual no se encuentra una única población celular como en el caso del co-cultivo con PMOs. Estos datos nuevamente ponen de manifiesto la importancia en cáncer del análisis de las células tumorales y el microambiente que las rodea.

II.4 Estudios in vivo

Con el objetivo de estudiar el efecto de la sobre-expresión de HO-1 en las células PC3 en un modelo de metástasis ósea *in vivo*, se inyectaron las células PC3HO-1

DISCUSIÓN

(que sobre-expresan esta proteína de manera estable) o su control (PC3βgal) en el fémur de ratones machos *SCID*. Las radiografías y los análisis histológicos mostraron una robusta remodelación ósea en los huesos inyectados con PC3HO-1 respecto a los inyectados con PC3βgal. Dicha remodelación se presentó como un incremento en la resorción del tejido óseo en el sitio de la inyección, un aumento en la formación de hueso en el periostio y una deformación en el hueso inyectado (Fig. 60 y 61). Esto nos sugiere que las células PC3 que sobre-expresan HO-1 al crecer en el microambiente del hueso producen un mayor desbalance en las tasas de formación/resorción ósea. Sin embargo, las células PC3HO-1 presentaron un índice mitótico menor que el clon control (Fig. 62). Si bien no se cuantificó el volumen tumoral, dicho índice mitótico reflejaría que los tumores creciendo en hueso derivados de PC3HO-1 crecieron menos que los derivados de PC3βgal y que el aumento en la remodelación ósea, observado cuando las células PC3 sobre-expresan HO-1, se debería a los factores liberados por estas células y a la alteración desencadenada en la interacción con el microambiente.

Uno de los problemas para poder identificar los factores responsables de la reacción osteoblástica/osteolítica disparada por las células de próstata es la limitación de los modelos clínicamente relevantes para estudiar la progresión ósea del PCa. De esta manera, se han desarrollado nuevas estrategias para obtener modelos murinos de PCa generados a partir de especímenes de tumores humanos obtenidos de metástasis óseas (Navone *et al.* 1998).

Al analizar la expresión de HO-1 en *microarrays* de tejidos tumorales se observó que en los tumores creciendo en el hueso, al igual que en los carcinomas primarios (Sacca *et al.* 2007) y que en los xenotransplantes *s.c.* (Gueron *et al.* 2009), existe marcación nuclear de HO-1 (Fig. 63). La misma observación, sobre esta localización particular de HO-1, también la detectamos en los tumores derivados de células PC3HO-1 creciendo en el fémur de ratones *SCID* (Fig. 61 H). En resumen, en este trabajo de tesis detectamos la marcación nuclear de HO-1 utilizando muestras de metástasis óseas de PCa. Esto nos lleva a pensar que HO-1 cumple un rol más allá de su actividad enzimática, aún no determinado pero relacionado con la regulación de la expresión génica. Lo más interesante de estos hallazgos es que HO-1 está alterando el crecimiento de las células tumorales en el hueso y modificando la remodelación ósea. El análisis de la expresión de HO-1 en muestras de metástasis de pacientes CRPC creciendo como xenotransplantes *s.c.* en ratones nos permite confirmar la heterogeneidad de los tumores de próstata y consecuentemente las diferencias en la expresión de HO-1 y su localización y el grado de diferenciación. Aún no podemos correlacionar un perfil de expresión de esta proteína con un determinado patrón de evolución de la enfermedad.

Creemos que estudios futuros, seleccionando el modelo adecuado del tumor creciendo como xenotransplante, nos permitirán determinar si HO-1 puede emerger como un marcador diagnóstico/pronóstico del crecimiento de las células tumorales en el hueso. La modulación de la expresión de HO-1 así podría asociarse a un perfil de malignidad y derivar en el desarrollo de nuevas terapias.

Bibliografía

- Abate-Shen C. y Shen M.M. (2000). "Molecular genetics of prostate cancer." *Genes Dev* 14(19): 2410-2434.
- Abraham N.G. (1991). "Molecular regulation--biological role of heme in hematopoiesis." *Blood Rev* 5(1): 19-28.
- Abrahamsson P.A., Cockett A.T. y di Sant'Agnese P.A. (1998). "Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in clinically localized prostatic carcinoma." *Prostate Suppl* 8: 37-42.
- Alam J. y 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(2): 166-174.
- 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., Roman G., Jiao J. y Schipper H.M. (2009). "A novel experimental heme oxygenase-1-targeted therapy for hormone-refractory prostate cancer." *Cancer Res* 69(20): 8017-8024.
- Almeida M. (2011). "Unraveling the role of FoxOs in bone--insights from mouse models." Bone 49(3): 319-327.
- Almeida M., Han L., Martin-Millan M., O'Brien C.A. y Manolagas S.C. (2007a). "Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription." *J Biol Chem* 282(37): 27298-27305.
- Almeida M., Han L., Martin-Millan M., Plotkin L.I., Stewart S.A., Roberson P.K., Kousteni S., O'Brien C.A., Bellido T., Parfitt A.M., Weinstein R.S., Jilka R.L. y Manolagas S.C. (2007b). "Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids." *J Biol Chem* 282(37): 27285-27297.
- Ambrogini E., Almeida M., Martin-Millan M., Paik J.H., Depinho R.A., Han L., Goellner J., Weinstein R.S., Jilka R.L., O'Brien C.A. y Manolagas S.C. (2010). "FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice." *Cell Metab* 11(2): 136-146.
- Ao M., Franco O.E., Park D., Raman D., Williams K. y Hayward S.W. (2007). "Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium." *Cancer Res* 67(9): 4244-4253.
- Asadi F., Farraj M., Sharifi R., Malakouti S., Antar S. y Kukreja S. (1996). "Enhanced expression of parathyroid hormone-related protein in prostate cancer as compared with benign prostatic hyperplasia." *Hum Pathol* 27(12): 1319-1323.
- Bae Y.S., Kang S.W., Seo M.S., Baines I.C., Tekle E., Chock P.B. y Rhee S.G. (1997).
 "Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* 272(1): 217-221.

- Bai X.C., Lu D., Bai J., Zheng H., Ke Z.Y., Li X.M. y Luo S.Q. (2004). "Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB." *Biochem Biophys Res Commun* 314(1): 197-207.
- Bai X.C., Lu D., Liu A.L., Zhang Z.M., Li X.M., Zou Z.P., Zeng W.S., Cheng B.L. y Luo S.Q. (2005). "Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast." *J Biol Chem* 280(17): 17497-17506.
- Balaban R.S., Nemoto S. y Finkel T. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* 120(4): 483-495.
- Banerjee P., Basu A., Wegiel B., Otterbein L.E., Mizumura K., Gasser M., Waaga-Gasser A.M., Choi A.M. y Pal S. (2012). "Heme oxygenase-1 promotes survival of renal cancer cells through modulation of apoptosis- and autophagy-regulating molecules." J Biol Chem 287(38): 32113-32123.
- Barbagallo I., Vanella A., Peterson S.J., Kim D.H., Tibullo D., Giallongo C., Vanella L., Parrinello N., Palumbo G.A., Di Raimondo F., Abraham N.G. y Asprinio D. (2010).
 "Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation." *J Bone Miner Metab* 28(3): 276-288.
- Becker J.C., Fukui H., Imai Y., Sekikawa A., Kimura T., Yamagishi H., Yoshitake N., Pohle T., Domschke W. y 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(7): 852-858.
- Berberat P.O., Dambrauskas Z., Gulbinas A., Giese T., Giese N., Kunzli B., Autschbach F., Meuer S., Buchler M.W. y Friess H. (2005). "Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment." *Clin Cancer Res* 11(10): 3790-3798.
- Berra E., Pages G. y Pouyssegur J. (2000). "MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression." *Cancer Metastasis Rev* 19(1-2): 139-145.
- Berz D. y Wanebo H. (2011). "Targeting the growth factors and angiogenesis pathways: Small molecules in solid tumors." *J Surg Oncol* 103(6): 574-586.
- Bonelli M., Savitskaya A., Steiner C.W., Rath E., Bilban M., Wagner O., Bach F.H., Smolen J.S. y Scheinecker C. (2012). "Heme oxygenase-1 end-products carbon monoxide and biliverdin ameliorate murine collagen induced arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 30(1): 73-78.
- Bonewald L.F. y Johnson M.L. (2008). "Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling." *Bone* 42(4): 606-615.
- Bostwick D.G. (1996). "Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia." *Cancer* 78(2): 330-336.
- Brubaker K.D., Corey E., Brown L.G. y Vessella R.L. (2004). "Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines." *J Cell Biochem* 91(1): 151-160.

- Bui M. y Reiter R.E. (1998). "Stem cell genes in androgen-independent prostate cancer." *Cancer Metastasis Rev* 17(4): 391-399.
- Burt T.D., Seu L., Mold J.E., Kappas A. y McCune J.M. (2010). "Naive human T cells are activated and proliferate in response to the heme oxygenase-1 inhibitor tin mesoporphyrin." *J Immunol* 185(9): 5279-5288.
- Busserolles J., Megias J., Terencio M.C. y Alcaraz M.J. (2006). "Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway." *Int J Biochem Cell Biol* 38(9): 1510-1517.
- Bussolati B., Ahmed A., Pemberton H., Landis R.C., Di Carlo F., Haskard D.O. y Mason J.C. (2004). "Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration." *Blood* 103(3): 761-766.
- Bussolati B. y Mason J.C. (2006). "Dual role of VEGF-induced heme-oxygenase-1 in angiogenesis." *Antioxid Redox Signal* 8(7-8): 1153-1163.
- Caballero F., Meiss R., Gimenez A., Batlle A. y Vazquez E. (2004). "Immunohistochemical analysis of heme oxygenase-1 in preneoplastic and neoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis." *Int J Exp Pathol* 85(4): 213-222.
- Catalona W.J. (1994). "Management of cancer of the prostate." *N Engl J Med* 331(15): 996-1004.
- Cisowski J., Loboda A., Jozkowicz A., Chen S., Agarwal A. y Dulak J. (2005). "Role of heme oxygenase-1 in hydrogen peroxide-induced VEGF synthesis: effect of HO-1 knockout." *Biochem Biophys Res Commun* 326(3): 670-676.
- Clarke N.W., McClure J. y George N.J. (1991). "Morphometric evidence for bone resorption and replacement in prostate cancer." *Br J Urol* 68(1): 74-80.
- Clerigues V., Guillen M.I., Castejon M.A., Gomar F., Mirabet V. y Alcaraz M.J. (2012). "Heme oxygenase-1 mediates protective effects on inflammatory, catabolic and senescence responses induced by interleukin-1beta in osteoarthritic osteoblasts." *Biochem Pharmacol* 83(3): 395-405.
- Clines G.A., Mohammad K.S., Bao Y., Stephens O.W., Suva L.J., Shaughnessy J.D., Jr., Fox J.W., Chirgwin J.M. y Guise T.A. (2007). "Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation." *Mol Endocrinol* 21(2): 486-498.
- Colombel M., Filleur S., Fournier P., Merle C., Guglielmi J., Courtin A., Degeorges A., Serre C.M., Bouvier R., Clezardin P. y Cabon F. (2005). "Androgens repress the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in normal and neoplastic prostate." *Cancer Res* 65(1): 300-308.
- Converso D.P., Taille C., Carreras M.C., Jaitovich A., Poderoso J.J. y Boczkowski J. (2006). "HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism." *FASEB J* 20(8): 1236-1238.

- Cook G.B. y Watson F.R. (1968). "Events in the natural history of prostate cancer: using salvage curves, mean age distributions and contingency coefficients." *J Urol* 99(1): 87-96.
- Crichton R.R., Wilmet S., Legssyer R. y Ward R.J. (2002). "Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells." *J Inorg Biochem* 91(1): 9-18.
- Cross M.J. y Claesson-Welsh L. (2001). "FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition." *Trends Pharmacol Sci* 22(4): 201-207.
- Cudmore M., Ahmad S., Al-Ani B., Fujisawa T., Coxall H., Chudasama K., Devey L.R., Wigmore S.J., Abbas A., Hewett P.W. y Ahmed A. (2007). "Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1." *Circulation* 115(13): 1789-1797.
- Chabannes D., Hill M., Merieau E., Rossignol J., Brion R., Soulillou J.P., Anegon I. y Cuturi M.C. (2007). "A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells." *Blood* 110(10): 3691-3694.
- Chae H.J., Chin H.Y., Lee G.Y., Park H.R., Yang S.K., Chung H.T., Pae H.O., Kim H.M., Chae S.W. y Kim H.R. (2006). "Carbon monoxide and nitric oxide protect against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: HO-1 is necessary to mediate the protection." *Clin Chim Acta* 365(1-2): 270-278.
- Chaea H.J., Kim H.R., Kang Y.J., Hyun K.C., Kim H.J., Seo H.G., Lee J.H., Yun-Choi H.S. y Chang K.C. (2007). "Heme oxygenase-1 induction by (S)-enantiomer of YS-51 (YS-51S), a synthetic isoquinoline alkaloid, inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB translocation in ROS 17/2.8 cells activated with inflammatory stimulants." *Int Immunopharmacol* 7(12): 1559-1568.
- Charhon S.A., Chapuy M.C., Delvin E.E., Valentin-Opran A., Edouard C.M. y Meunier P.J. (1983). "Histomorphometric analysis of sclerotic bone metastases from prostatic carcinoma special reference to osteomalacia." *Cancer* 51(5): 918-924.
- Choi B.M., Pae H.O., Jeong Y.R., Kim Y.M. y Chung H.T. (2005). "Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression." *Biochem Biophys Res Commun* 327(4): 1066-1071.
- Chung H.T., Choi B.M., Kwon Y.G. y Kim Y.M. (2008). "Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): heme oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO-mediated antiapoptosis and anti-inflammation." *Methods Enzymol* 441: 329-338.
- Dallas S.L. y Bonewald L.F. (2010). "Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte." *Ann N Y Acad Sci* 1192: 437-443.

- Davel L.E., Rimmaudo L., Espanol A., de la Torre E., Jasnis M.A., Ribeiro M.L., Gotoh T., de Lustig E.S. y Sales M.E. (2004). "Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines." *Angiogenesis* 7(1): 45-51.
- Day T.F., Guo X., Garrett-Beal L. y Yang Y. (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis." *Dev Cell* 8(5): 739-750.
- Dayyani F., Gallick G.E., Logothetis C.J. y Corn P.G. (2011). "Novel therapies for metastatic castrate-resistant prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* 103(22): 1665-1675.
- De Marzo A.M., Nelson W.G., Meeker A.K. y Coffey D.S. (1998). "Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells." *J Urol* 160(6 Pt 2): 2381-2392.
- De Marzo A.M., Platz E.A., Sutcliffe S., Xu J., Gronberg H., Drake C.G., Nakai Y., Isaacs W.B. y Nelson W.G. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* 7(4): 256-269.
- Degese M.S., Mendizabal J.E., Gandini N.A., Gutkind J.S., Molinolo A., Hewitt S.M., Curino A.C., Coso O.A. y Facchinetti M.M. (2012). "Expression of heme oxygenase-1 in nonsmall cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data." *Lung Cancer* 77(1): 168-175.
- Deininger M.H., Meyermann R., Trautmann K., Duffner F., Grote E.H., Wickboldt J. y Schluesener H.J. (2000). "Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression." *Brain Res* 882(1-2): 1-8.
- Deramaudt B.M., Braunstein S., Remy P. y Abraham N.G. (1998). "Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis." *J Cell Biochem* 68(1): 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., Siegal G.P., Dulak J., Jozkowicz A., Grant M.B. y Agarwal A. (2007). "Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism." *J Exp Med* 204(3): 605-618.
- Devesa I., Ferrandiz M.L., Guillen I., Cerda J.M. y Alcaraz M.J. (2005). "Potential role of heme oxygenase-1 in the progression of rat adjuvant arthritis." *Lab Invest* 85(1): 34-44.
- Dulak J., Jozkowicz A., Foresti R., Kasza A., Frick M., Huk I., Green C.J., Pachinger O., Weidinger F. y Motterlini R. (2002). "Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells." *Antioxid Redox Signal* 4(2): 229-240.
- Dulak J., Loboda A., Zagorska A. y Jozkowicz A. (2004). "Complex role of heme oxygenase-1 in angiogenesis." *Antioxid Redox Signal* 6(5): 858-866.

- Durante W. (2003). "Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease." *J Cell Physiol* 195(3): 373-382.
- Durante W., Kroll M.H., Christodoulides N., Peyton K.J. y Schafer A.I. (1997). "Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* 80(4): 557-564.
- Elbirt K.K. y Bonkovsky H.L. (1999). "Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role." *Proc Assoc Am Physicians* 111(5): 438-447.
- Elguero B., Gueron G., Giudice J., Toscani M.A., De Luca P., Zalazar F., Coluccio-Leskow F., Meiss R., Navone N., De Siervi A. y Vazquez E. (2012). "Unveiling the association of STAT3 and HO-1 in prostate cancer: role beyond heme degradation." *Neoplasia* 14(11): 1043-1056.
- Eliceiri B.P. (2001). "Integrin and growth factor receptor crosstalk." *Circ Res* 89(12): 1104-1110.
- Eruslanov E. y Kusmartsev S. (2010). "Identification of ROS using oxidized DCFDA and flowcytometry." *Methods Mol Biol* 594: 57-72.
- Essers M.A., de Vries-Smits L.M., Barker N., Polderman P.E., Burgering B.M. y Korswagen H.C. (2005). "Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling." *Science* 308(5725): 1181-1184.
- Fang J., Sawa T., Akaike T., Akuta T., Sahoo S.K., Khaled G., Hamada A. y Maeda H. (2003). "In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor." *Cancer Res* 63(13): 3567-3574.
- Feller L., Kramer B. y Lemmer J. (2011). "A short account of metastatic bone disease." *Cancer Cell Int* 11: 24.
- Fernandez M. y Bonkovsky H.L. (2003). "Vascular endothelial growth factor increases heme oxygenase-1 protein expression in the chick embryo chorioallantoic membrane." *Br J Pharmacol* 139(3): 634-640.
- Ferrando M. (2008). Tesina de Licenciatura: VEGF y HO-1 en la progresión del cáncer de próstata. *Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*, Universidad de Buenos Aires.
- Fizazi K., Yang J., Peleg S., Sikes C.R., Kreimann E.L., Daliani D., Olive M., Raymond K.A., Janus T.J., Logothetis C.J., Karsenty G. y Navone N.M. (2003). "Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts." *Clin Cancer Res* 9(7): 2587-2597.
- Folkman J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* 285(21): 1182-1186.
- Foresti R. y Motterlini R. (1999). "The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis." *Free Radic Res* 31(6): 459-475.

- Franz-Odendaal T.A., Hall B.K. y Witten P.E. (2006). "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes." *Dev Dyn* 235(1): 176-190.
- Freshney R.I. (1994). "Culture of animal cells. A manual of basic technique." *Wiley-Liss, Inc: New York.*
- Furuyama T., Nakazawa T., Nakano I. y Mori N. (2000). "Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues." *Biochem J* 349(Pt 2): 629-634.
- Galasko C.S. (1976). "Mechanisms of bone destruction in the development of skeletal metastases." *Nature* 263(5577): 507-508.
- Gandini N.A., Fermento M.E., Salomon D.G., Blasco J., Patel V., Gutkind J.S., Molinolo A.A., Facchinetti M.M. y Curino A.C. (2012). "Nuclear localization of heme oxygenase-1 is associated with tumor progression of head and neck squamous cell carcinomas." *Exp Mol Pathol* 93(2): 237-245.
- Garrett I.R. (2003). "Assessing bone formation using mouse calvarial organ cultures." *Methods Mol Med* 80: 183-198.
- Garrett I.R., Boyce B.F., Oreffo R.O., Bonewald L., Poser J. y Mundy G.R. (1990). "Oxygenderived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo." *J Clin Invest* 85(3): 632-639.
- George J. y Lai F.M. (1995). "Metastatic cervical carcinoma presenting as psoas abscess and osteoblastic and lytic bony metastases." *Singapore Med J* 36(2): 224-227.
- Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E. y Pelicci P.G. (2007). "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 722-728.
- Glass D.A., 2nd y Karsenty G. (2007). "In vivo analysis of Wnt signaling in bone." *Endocrinology* 148(6): 2630-2634.
- Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Herzog Y. y Neufeld G. (2000). "Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]." *J Biol Chem* 275(24): 18040-18045.
- Gozzelino R., Jeney V. y Soares M.P. (2010). "Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 323-354.
- Greer E.L. y Brunet A. (2005). "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression." *Oncogene* 24(50): 7410-7425.
- Grivennikov S.I., Greten F.R. y Karin M. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." *Cell* 140(6): 883-899.
- Grochot-Przeczek A., Dulak J. y Jozkowicz A. (2012). "Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology." *Clin Sci (Lond)* 122(3): 93-103.

- Gueron G., De Siervi A., Ferrando M., Salierno M., De Luca P., Elguero B., Meiss R., Navone N. y 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(11): 1745-1755.
- Gueron G., De Siervi A. y Vazquez E. (2011). "Key questions in metastasis: new insights in molecular pathways and therapeutic implications." *Curr Pharm Biotechnol* 12(11): 1867-1880.
- Guise T. (2010). "Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment." *Semin Oncol* 37 Suppl 2: S2-14.
- Guise T.A., Mohammad K.S., Clines G., Stebbins E.G., Wong D.H., Higgins L.S., Vessella R., Corey E., Padalecki S., Suva L. y Chirgwin J.M. (2006). "Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases." *Clin Cancer Res* 12(20 Pt 2): 6213s-6216s.
- Gujral A., Burton D.W., Terkeltaub R. y Deftos L.J. (2001). "Parathyroid hormone-related protein induces interleukin 8 production by prostate cancer cells via a novel intracrine mechanism not mediated by its classical nuclear localization sequence." *Cancer Res* 61(5): 2282-2288.
- Gustavsson H., Jennbacken K., Welen K. y Damber J.E. (2008). "Altered expression of genes regulating angiogenesis in experimental androgen-independent prostate cancer." *Prostate* 68(2): 161-170.
- Hall C.L., Bafico A., Dai J., Aaronson S.A. y Keller E.T. (2005). "Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts." *Cancer Res* 65(17): 7554-7560.
- Hall C.L., Kang S., MacDougald O.A. y Keller E.T. (2006). "Role of Whits in prostate cancer bone metastases." *J Cell Biochem* 97(4): 661-672.
- Hall K. y Ran S. (2010). "Regulation of tumor angiogenesis by the local environment." *Front Biosci* 15: 195-212.
- Hama M., Kirino Y., Takeno M., Takase K., Miyazaki T., Yoshimi R., Ueda A., Itoh-Nakadai A., Muto A., Igarashi K. y Ishigatsubo Y. (2012). "Bach1 regulates osteoclastogenesis in a mouse model via both heme oxygenase 1-dependent and heme oxygenase 1independent pathways." *Arthritis Rheum* 64(5): 1518-1528.
- Hanahan D. y Weinberg R.A. (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.
- Hanahan D. y Weinberg R.A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Harris W.P., Mostaghel E.A., Nelson P.S. y Montgomery B. (2009). "Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion." *Nat Clin Pract Urol* 6(2): 76-85.

- Hill M., Pereira V., Chauveau C., Zagani R., Remy S., Tesson L., Mazal D., Ubillos L., Brion R., Asghar K., Mashreghi M.F., Kotsch K., Moffett J., Doebis C., Seifert M., Boczkowski J., Osinaga E. y Anegon I. (2005). "Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation: mutual cross inhibition with indoleamine 2,3dioxygenase." *FASEB J* 19(14): 1957-1968.
- Hirai K., Sasahira T., Ohmori H., Fujii K. y 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(3): 500-505.
- Holmes K., Roberts O.L., Thomas A.M. y Cross M.J. (2007). "Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition." *Cell Signal* 19(10): 2003-2012.
- Hoogeboom D., Essers M.A., Polderman P.E., Voets E., Smits L.M. y Burgering B.M. (2008). "Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity." *J Biol Chem* 283(14): 9224-9230.
- Hsu J.T., Kan W.H., Hsieh C.H., Choudhry M.A., Schwacha M.G., Bland K.I. y Chaudry I.H. (2007). "Mechanism of estrogen-mediated attenuation of hepatic injury following trauma-hemorrhage: Akt-dependent HO-1 up-regulation." *J Leukoc Biol* 82(4): 1019-1026.
- Hu M.C., Lee D.F., Xia W., Golfman L.S., Ou-Yang F., Yang J.Y., Zou Y., Bao S., Hanada N., Saso H., Kobayashi R. y Hung M.C. (2004). "IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a." *Cell* 117(2): 225-237.
- Huss W.J., Hanrahan C.F., Barrios R.J., Simons J.W. y Greenberg N.M. (2001). "Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch." *Cancer Res* 61(6): 2736-2743.
- Inguaggiato P., Gonzalez-Michaca L., Croatt A.J., Haggard J.J., Alam J. y Nath K.A. (2001). "Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis." *Kidney Int* 60(6): 2181-2191.
- Jacobs F.M., van der Heide L.P., Wijchers P.J., Burbach J.P., Hoekman M.F. y Smidt M.P. (2003). "FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics." *J Biol Chem* 278(38): 35959-35967.
- Jacobs S.C. (1983). "Spread of prostatic cancer to bone." Urology 21(4): 337-344.
- Jain R.K. y Carmeliet P. (2012). "SnapShot: Tumor angiogenesis." *Cell* 149(6): 1408-1408 e1401.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E. y Forman D. (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* 61(2): 69-90.
- Joffe N. y Antonioli D.A. (1978). "Osteoblastic bone metastases secondary to adenocarcinoma of the pancreas." *Clin Radiol* 29(1): 41-46.

- Jonason J.H., Xiao G., Zhang M., Xing L. y Chen D. (2009). "Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage." *J Dent Res* 88(8): 693-703.
- Joseph I.B., Nelson J.B., Denmeade S.R. y Isaacs J.T. (1997). "Androgens regulate vascular endothelial growth factor content in normal and malignant prostatic tissue." *Clin Cancer Res* 3(12 Pt 1): 2507-2511.
- Josson S., Matsuoka Y., Chung L.W., Zhau H.E. y Wang R. (2010). "Tumor-stroma coevolution in prostate cancer progression and metastasis." *Semin Cell Dev Biol* 21(1): 26-32.
- Jozkowicz A., Huk I., Nigisch A., Weigel G., Dietrich W., Motterlini R. y 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(2): 155-162.
- Jozkowicz A., Was H. y Dulak J. (2007). "Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend?" *Antioxid Redox Signal* 9(12): 2099-2117.
- Kaighn M.E., Narayan K.S., Ohnuki Y., Lechner J.F. y Jones L.W. (1979). "Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)." *Invest Urol* 17(1): 16-23.
- Kaplan R.N., Rafii S. y Lyden D. (2006). "Preparing the "soil": the premetastatic niche." *Cancer Res* 66(23): 11089-11093.
- Kapturczak M.H., Wasserfall C., Brusko T., Campbell-Thompson M., Ellis T.M., Atkinson M.A. y Agarwal A. (2004). "Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse." *Am J Pathol* 165(3): 1045-1053.
- Karsdal M.A., Andersen T.A., Bonewald L. y Christiansen C. (2004). "Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte viability." DNA Cell Biol 23(3): 155-165.
- Karsenty G. (1998). "Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development." *Front Biosci* 3: d834-837.
- Khandrika L., Kumar B., Koul S., Maroni P. y Koul H.K. (2009). "Oxidative stress in prostate cancer." *Cancer Lett* 282(2): 125-136.
- Kim H.P., Wang X., Galbiati F., Ryter S.W. y Choi A.M. (2004). "Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells." *FASEB J* 18(10): 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. y Park R. (2008). "Suppression of Nrf2-driven heme oxygenase-1 enhances the chemosensitivity of lung cancer A549 cells toward cisplatin." *Lung Cancer* 60(1): 47-56.
- Kingsley L.A., Fournier P.G., Chirgwin J.M. y Guise T.A. (2007). "Molecular biology of bone metastasis." *Mol Cancer Ther* 6(10): 2609-2617.
- Koeneman K.S., Yeung F. y Chung L.W. (1999). "Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment." *Prostate* 39(4): 246-261.
- Komori T. (2010). "Regulation of osteoblast differentiation by Runx2." *Adv Exp Med Biol* 658: 43-49.
- Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S. y Kishimoto T. (1997). "Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." *Cell* 89(5): 755-764.
- Kondo R., Gleixner K.V., Mayerhofer M., Vales A., Gruze A., Samorapoompichit P., Greish K., Krauth M.T., Aichberger K.J., Pickl W.F., Esterbauer H., Sillaber C., Maeda H. y Valent P. (2007). "Identification of heat shock protein 32 (Hsp32) as a novel survival factor and therapeutic target in neoplastic mast cells." *Blood* 110(2): 661-669.
- Kong D., Li Y., Wang Z., Banerjee S. y Sarkar F.H. (2007). "Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer." *Cancer Res* 67(7): 3310-3319.
- Kops G.J., Dansen T.B., Polderman P.E., Saarloos I., Wirtz K.W., Coffer P.J., Huang T.T., Bos J.L., Medema R.H. y Burgering B.M. (2002). "Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress." *Nature* 419(6904): 316-321.
- Korinek V., Barker N., Morin P.J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K.W., Vogelstein B. y Clevers H. (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." *Science* 275(5307): 1784-1787.
- Krishan A. (1975). "Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining." *J Cell Biol* 66(1): 188-193.
- Krishnan V., Bryant H.U. y Macdougald O.A. (2006). "Regulation of bone mass by Wnt signaling." *J Clin Invest* 116(5): 1202-1209.
- Kular J., Tickner J., Chim S.M. y Xu J. (2012). "An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level." *Clin Biochem* 45(12): 863-873.
- Kuroda H., Takeno M., Murakami S., Miyazawa N., Kaneko T. y Ishigatsubo Y. (2010).
 "Inhibition of heme oxygenase-1 with an epidermal growth factor receptor inhibitor and cisplatin decreases proliferation of lung cancer A549 cells." *Lung Cancer* 67(1): 31-36.
- Latil A., Bieche I., Pesche S., Valeri A., Fournier G., Cussenot O. y Lidereau R. (2000). "VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms." *Int J Cancer* 89(2): 167-171.

- Lee N.K., Choi Y.G., Baik J.Y., Han S.Y., Jeong D.W., Bae Y.S., Kim N. y Lee S.Y. (2005). "A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation." *Blood* 106(3): 852-859.
- Li M., Kim D.H., Tsenovoy P.L., Peterson S.J., Rezzani R., Rodella L.F., Aronow W.S., Ikehara S. y Abraham N.G. (2008a). "Treatment of obese diabetic mice with a heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance." *Diabetes* 57(6): 1526-1535.
- Li M.Y., Yip J., Hsin M.K., Mok T.S., Wu Y., Underwood M.J. y Chen G.G. (2008b). "Haem oxygenase-1 plays a central role in NNK-mediated lung carcinogenesis." *Eur Respir J* 32(4): 911-923.
- Li Volti G., Sacerdoti D., Sangras B., Vanella A., Mezentsev A., Scapagnini G., Falck J.R. y Abraham N.G. (2005). "Carbon monoxide signaling in promoting angiogenesis in human microvessel endothelial cells." *Antioxid Redox Signal* 7(5-6): 704-710.
- Li Y., Su J., DingZhang X., Zhang J., Yoshimoto M., Liu S., Bijian K., Gupta A., Squire J.A., Alaoui Jamali M.A. y Bismar T.A. (2011). "PTEN deletion and heme oxygenase-1 overexpression cooperate in prostate cancer progression and are associated with adverse clinical outcome." *J Pathol* 224(1): 90-100.
- Li Z., Kong K. y Qi W. (2006). "Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling." *Biochem Biophys Res Commun* 343(2): 345-350.
- Li Z.G., Mathew P., Yang J., Starbuck M.W., Zurita A.J., Liu J., Sikes C., Multani A.S., Efstathiou E., Lopez A., Wang J., Fanning T.V., Prieto V.G., Kundra V., Vazquez E.S., Troncoso P., Raymond A.K., Logothetis C.J., Lin S.H., Maity S. y Navone N.M. (2008c). "Androgen receptor-negative human prostate cancer cells induce osteogenesis in mice through FGF9-mediated mechanisms." *J Clin Invest* 118(8): 2697-2710.
- Li Z.G., Yang J., Vazquez E.S., Rose D., Vakar-Lopez F., Mathew P., Lopez A., Logothetis C.J., Lin S.H. y Navone N.M. (2008d). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mediates the prostate cancer-induced formation of new bone." *Oncogene* 27(5): 596-603.
- Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S., van Wijnen A.J., Montecino M., Javed A., Gutierrez S., Shen J., Zaidi S.K. y Drissi H. (2003). "Runx2/Cbfa1 functions: diverse regulation of gene transcription by chromatin remodeling and co-regulatory protein interactions." *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1: 141-148.
- Lin C.W., Shen S.C., Hou W.C., Yang L.Y. y Chen Y.C. (2008a). "Heme oxygenase-1 inhibits breast cancer invasion via suppressing the expression of matrix metalloproteinase-9." *Mol Cancer Ther* 7(5): 1195-1206.
- Lin E.Y. y Pollard J.W. (2004). "Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread." *Br J Cancer* 90(11): 2053-2058.

- Lin Q., Weis S., Yang G., Weng Y.H., Helston R., Rish K., Smith A., Bordner J., Polte T., Gaunitz F. y Dennery P.A. (2007). "Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress." *J Biol Chem* 282(28): 20621-20633.
- Lin Q.S., Weis S., Yang G., Zhuang T., Abate A. y Dennery P.A. (2008b). "Catalytic inactive heme oxygenase-1 protein regulates its own expression in oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 44(5): 847-855.
- Lin T.H., Tang C.H., Hung S.Y., Liu S.H., Lin Y.M., Fu W.M. y Yang R.S. (2010). "Upregulation of heme oxygenase-1 inhibits the maturation and mineralization of osteoblasts." *J Cell Physiol* 222(3): 757-768.
- Listopad J., Asadullah K., Sievers C., Ritter T., Meisel C., Sabat R. y Docke W.D. (2007). "Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells." *Exp Dermatol* 16(8): 661-670.
- Liu A.Y., True L.D., LaTray L., Nelson P.S., Ellis W.J., Vessella R.L., Lange P.H., Hood L. y van den Engh G. (1997). "Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10705-10710.
- Loboda A., Jazwa A., Grochot-Przeczek A., Rutkowski A.J., Cisowski J., Agarwal A., Jozkowicz A. y Dulak J. (2008). "Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* 10(10): 1767-1812.
- Loboda A., Jazwa A., Wegiel B., Jozkowicz A. y Dulak J. (2005). "Heme oxygenase-1dependent and -independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chloride on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascular endothelial cells." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51(4): 347-355.
- Loges S., Schmidt T. y Carmeliet P. (2010). "Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates." *Genes Cancer* 1(1): 12-25.
- Logothetis C.J. y Lin S.H. (2005). "Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone." *Nat Rev Cancer* 5(1): 21-28.
- Lundvig D.M., Immenschuh S. y Wagener F.A. (2012). "Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: the good, the bad, and the ugly?" *Front Pharmacol* 3: 81.
- Maines M.D. y Abrahamsson P.A. (1996). "Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution." *Urology* 47(5): 727-733.
- Maines M.D., Trakshel G.M. y Kutty R.K. (1986). "Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible." *J Biol Chem* 261(1): 411-419.

- Manolagas S.C. y Almeida M. (2007). "Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism." *Mol Endocrinol* 21(11): 2605-2614.
- Mao B., Wu W., Davidson G., Marhold J., Li M., Mechler B.M., Delius H., Hoppe D., Stannek P., Walter C., Glinka A. y Niehrs C. (2002). "Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling." *Nature* 417(6889): 664-667.
- Marcantoni E., Di Francesco L., Dovizio M., Bruno A. y Patrignani P. (2012). "Novel insights into the vasoprotective role of heme oxygenase-1." *Int J Hypertens* 2012: 127910.
- Marques R.B., Dits N.F., Erkens-Schulze S., van Weerden W.M. y Jenster G. (2010). "Bypass mechanisms of the androgen receptor pathway in therapy-resistant prostate cancer cell models." *PLoS One* 5(10): e13500.
- Martin M.J., Tanos T., Garcia A.B., Martin D., Gutkind J.S., Coso O.A. y Marinissen M.J. (2007). "The Galpha12/13 family of heterotrimeric G proteins and the small GTPase RhoA link the Kaposi sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor to heme oxygenase-1 expression and tumorigenesis." J Biol Chem 282(47): 34510-34524.
- Matsuo K. y Irie N. (2008). "Osteoclast-osteoblast communication." *Arch Biochem Biophys* 473(2): 201-209.
- Mayerhofer M., Florian S., Krauth M.T., Aichberger K.J., Bilban M., Marculescu R., Printz D., Fritsch G., Wagner O., Selzer E., Sperr W.R., Valent P. y Sillaber C. (2004).
 "Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia." *Cancer Res* 64(9): 3148-3154.
- McCarthy T.L., Ji C., Chen Y., Kim K.K., Imagawa M., Ito Y. y Centrella M. (2000). "Runt domain factor (Runx)-dependent effects on CCAAT/ enhancer-binding protein delta expression and activity in osteoblasts." *J Biol Chem* 275(28): 21746-21753.
- McCawley L.J. y Matrisian L.M. (2001). "Tumor progression: defining the soil round the tumor seed." *Curr Biol* 11(1): R25-27.
- McCoubrey W.K., Jr., Huang T.J. y Maines M.D. (1997). "Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis." *J Biol Chem* 272(19): 12568-12574.
- McCoubrey W.K., Jr. y Maines M.D. (1994). "The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2." *Gene* 139(2): 155-161.
- Menezes M.E., Devine D.J., Shevde L.A. y Samant R.S. (2012). "Dickkopf1: a tumor suppressor or metastasis promoter?" *Int J Cancer* 130(7): 1477-1483.
- Mishra S., Tang Y., Wang L., deGraffenried L., Yeh I.T., Werner S., Troyer D., Copland J.A. y Sun L.Z. (2011). "Blockade of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling inhibits osteoblastic tumorigenesis by a novel human prostate cancer cell line." *Prostate* 71(13): 1441-1454.

- Monsalve M. y Olmos Y. (2011). "The complex biology of FOXO." *Curr Drug Targets* 12(9): 1322-1350.
- Morita K., Lee M.S. y Her S. (2009). "Possible relation of hemin-induced HO-1 expression to the upregulation of VEGF and BDNF mRNA levels in rat C6 glioma cells." *J Mol Neurosci* 38(1): 31-40.
- Morrissey C., Kostenuik P.L., Brown L.G., Vessella R.L. y Corey E. (2007). "Host-derived RANKL is responsible for osteolysis in a C4-2 human prostate cancer xenograft model of experimental bone metastases." *BMC Cancer* 7: 148.
- Morse D. y Choi A.M. (2005). "Heme oxygenase-1: from bench to bedside." *Am J Respir Crit Care Med* 172(6): 660-670.
- Mueller M.D., Vigne J.L., Minchenko A., Lebovic D.I., Leitman D.C. y Taylor R.N. (2000). "Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10972-10977.
- Mulholland D.J., Cox M., Read J., Rennie P. y Nelson C. (2004). "Androgen responsiveness of Renilla luciferase reporter vectors is promoter, transgene, and cell line dependent." *Prostate* 59(2): 115-119.
- Mundy G.R. (2002). "Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities." *Nat Rev Cancer* 2(8): 584-593.
- Navone N.M., Logothetis C.J., von Eschenbach A.C. y Troncoso P. (1998). "Model systems of prostate cancer: uses and limitations." *Cancer Metastasis Rev* 17(4): 361-371.
- Navone N.M., Olive M., Ozen M., Davis R., Troncoso P., Tu S.M., Johnston D., Pollack A., Pathak S., von Eschenbach A.C. y Logothetis C.J. (1997). "Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis." *Clin Cancer Res* 3(12 Pt 1): 2493-2500.
- Navone N.M., Rodriquez-Vargas M.C., Benedict W.F., Troncoso P., McDonnell T.J., Zhou J.H., Luthra R. y Logothetis C.J. (2000). "TabBO: a model reflecting common molecular features of androgen-independent prostate cancer." *Clin Cancer Res* 6(3): 1190-1197.
- Nowis D., Legat M., Grzela T., Niderla J., Wilczek E., Wilczynski G.M., Glodkowska E., Mrowka P., Issat T., Dulak J., Jozkowicz A., Was H., Adamek M., Wrzosek A., Nazarewski S., Makowski M., Stoklosa T., Jakobisiak M. y Golab J. (2006). "Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity." Oncogene 25(24): 3365-3374.
- Okamoto I., Krogler J., Endler G., Kaufmann S., Mustafa S., Exner M., Mannhalter C., Wagner O. y Pehamberger H. (2006). "A microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with risk for melanoma." *Int J Cancer* 119(6): 1312-1315.

- Otterbein L.E., Bach F.H., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis R.J., Flavell R.A. y Choi A.M. (2000). "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway." *Nat Med* 6(4): 422-428.
- Otterbein L.E., Soares M.P., Yamashita K. y Bach F.H. (2003). "Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme." *Trends Immunol* 24(8): 449-455.
- Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Chae S.C. y Chung H.T. (2003). "Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells." *Biochem Biophys Res Commun* 306(3): 701-705.
- Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Chae S.C., Kim Y.M., Chung K.R. y Chung H.T. (2004).
 "Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production." *J Immunol* 172(8): 4744-4751.
- Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Kim Y.M. y Chung H.T. (2005). "A molecular cascade showing nitric oxide-heme oxygenase-1-vascular endothelial growth factorinterleukin-8 sequence in human endothelial cells." *Endocrinology* 146(5): 2229-2238.
- Paget S. (1989). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889." *Cancer Metastasis Rev* 8(2): 98-101.
- Paling M.R. y Pope T.L. (1988). "Computed tomography of isolated osteoblastic colon metastases in the bony pelvis." *J Comput Tomogr* 12(3): 203-207.
- Pienta K.J. y Loberg R. (2005). "The "emigration, migration, and immigration" of prostate cancer." *Clin Prostate Cancer* 4(1): 24-30.
- Poss K.D. y Tonegawa S. (1997). "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10925-10930.
- Powell G.J., Southby J., Danks J.A., Stillwell R.G., Hayman J.A., Henderson M.A., Bennett R.C. y Martin T.J. (1991). "Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites." *Cancer Res* 51(11): 3059-3061.
- Pratap J., Galindo M., Zaidi S.K., Vradii D., Bhat B.M., Robinson J.A., Choi J.Y., Komori T., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S. y van Wijnen A.J. (2003). "Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts." *Cancer Res* 63(17): 5357-5362.
- Pratap J., Javed A., Languino L.R., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S. y 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(19): 8581-8591.
- Psaila B. y Lyden D. (2009). "The metastatic niche: adapting the foreign soil." *Nat Rev Cancer* 9(4): 285-293.
- Puig O. y Mattila J. (2011). "Understanding Forkhead box class O function: lessons from Drosophila melanogaster." *Antioxid Redox Signal* 14(4): 635-647.

- Qian B.Z. y Pollard J.W. (2010). "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." *Cell* 141(1): 39-51.
- Rabbani S.A., Gladu J., Harakidas P., Jamison B. y Goltzman D. (1999). "Over-production of parathyroid hormone-related peptide results in increased osteolytic skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo." *Int J Cancer* 80(2): 257-264.
- Rabinovich G.A., van Kooyk Y. y Cobb B.A. (2012). "Glycobiology of immune responses." Ann N Y Acad Sci 1253: 1-15.
- Rached M.T., Kode A., Silva B.C., Jung D.Y., Gray S., Ong H., Paik J.H., DePinho R.A., Kim J.K., Karsenty G. y Kousteni S. (2010a). "FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice." *J Clin Invest* 120(1): 357-368.
- Rached M.T., Kode A., Xu L., Yoshikawa Y., Paik J.H., Depinho R.A. y Kousteni S. (2010b).
 "FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts." *Cell Metab* 11(2): 147-160.
- Radeke H.H., Meier B., Topley N., Floge J., Habermehl G.G. y Resch K. (1990). "Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells." *Kidney Int* 37(2): 767-775.
- Rapozzi V., Miculan M. y Xodo L.E. (2009). "Evidence that photoactivated pheophorbide a causes in human cancer cells a photodynamic effect involving lipid peroxidation." *Cancer Biol Ther* 8(14): 1318-1327.
- Rawlinson S.C., Zaman G., Mosley J.R., Pitsillides A.A. y Lanyon L.E. (1998). "Heme oxygenase isozymes in bone: induction of HO-1 mRNA following physiological levels of mechanical loading in vivo." *Bone* 23(5): 433-436.
- Rettig M.B., Heber D., An J., Seeram N.P., Rao J.Y., Liu H., Klatte T., Belldegrun A., Moro A., Henning S.M., Mo D., Aronson W.J. y Pantuck A. (2008). "Pomegranate extract inhibits androgen-independent prostate cancer growth through a nuclear factorkappaB-dependent mechanism." *Mol Cancer Ther* 7(9): 2662-2671.
- Roodman G.D. (2004). "Mechanisms of bone metastasis." N Engl J Med 350(16): 1655-1664.
- Ruiz de Almodovar C., Lambrechts D., Mazzone M. y Carmeliet P. (2009). "Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system." *Physiol Rev* 89(2): 607-648.
- Ryter S.W., Alam J. y Choi A.M. (2006). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications." *Physiol Rev* 86(2): 583-650.
- Sacca P., Meiss R., Casas G., Mazza O., Calvo J.C., Navone N. y Vazquez E. (2007). "Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer." Br J Cancer 97(12): 1683-1689.
- Sakai E., Shimada-Sugawara M., Nishishita K., Fukuma Y., Naito M., Okamoto K., Nakayama K. y Tsukuba T. (2012). "Suppression of RANKL-dependent heme

oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis." *J Cell Biochem* 113(2): 486-498.

- Salles A. (2011). Tesina de Licenciatura: Mecanismos de señalización involucrados en el efecto anti-inflamatorio de HO-1 en cáncer de próstata. *Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*, Universidad de Buenos Aires.
- Shariat S.F., Walz J., Roehrborn C.G., Montorsi F., Jeldres C., Saad F. y Karakiewicz P.I. (2008). "Early postoperative plasma transforming growth factor-beta1 is a strong predictor of biochemical progression after radical prostatectomy." *J Urol* 179(4): 1593-1597.
- Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikeda T., Tojo A., Matsushime H. y Sato M. (1990). "Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family." *Oncogene* 5(4): 519-524.
- Shiota M., Yokomizo A., Tada Y., Inokuchi J., Kashiwagi E., Masubuchi D., Eto M., Uchiumi T. y Naito S. (2010). "Castration resistance of prostate cancer cells caused by castration-induced oxidative stress through Twist1 and androgen receptor overexpression." Oncogene 29(2): 237-250.
- Shukla S., MacLennan G.T., Fu P., Patel J., Marengo S.R., Resnick M.I. y Gupta S. (2004).
 "Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression." *Neoplasia* 6(4): 390-400.
- Simon T., Anegon I. y Blancou P. (2011). "Heme oxygenase and carbon monoxide as an immunotherapeutic approach in transplantation and cancer." *Immunotherapy* 3(4 Suppl): 15-18.
- Sims R.J., 3rd, Liss A.S. y Gottlieb P.D. (2003). "Normalization of luciferase reporter assays under conditions that alter internal controls." *Biotechniques* 34(5): 938-940.
- 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., Lee J.S., Postma D.S., Kauffman H.F. y Choi A.M. (2007).
 "Mitochondrial localization and function of heme oxygenase-1 in cigarette smoke-induced cell death." *Am J Respir Cell Mol Biol* 36(4): 409-417.
- 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., Kawasaki E., Merchant J.L. y Gardner K. (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(32): 11554-11559.
- Soker S., Takashima S., Miao H.Q., Neufeld G. y Klagsbrun M. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." *Cell* 92(6): 735-745.
- Solinas G., Germano G., Mantovani A. y Allavena P. (2009). "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation." *J Leukoc Biol* 86(5): 1065-1073.

- Song R., Mahidhara R.S., Zhou Z., Hoffman R.A., Seol D.W., Flavell R.A., Billiar T.R., Otterbein L.E. y Choi A.M. (2004). "Carbon monoxide inhibits T lymphocyte proliferation via caspase-dependent pathway." *J Immunol* 172(2): 1220-1226.
- Steeg P.S. y Theodorescu D. (2008). "Metastasis: a therapeutic target for cancer." *Nat Clin Pract Oncol* 5(4): 206-219.
- Stewart R.J., Panigrahy D., Flynn E. y Folkman J. (2001). "Vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis are regulated by androgens in hormone responsive human prostate carcinoma: evidence for androgen dependent destabilization of vascular endothelial growth factor transcripts." J Urol 165(2): 688-693.
- Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A.F., Glazer A.N. y Ames B.N. (1987). "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance." *Science* 235(4792): 1043-1046.
- Suda T., Takahashi N. y Martin T.J. (1992). "Modulation of osteoclast differentiation." *Endocr Rev* 13(1): 66-80.
- Sun S., Sprenger C.C., Vessella R.L., Haugk K., Soriano K., Mostaghel E.A., Page S.T., Coleman I.M., Nguyen H.M., Sun H., Nelson P.S. y Plymate S.R. (2010). "Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant." *J Clin Invest* 120(8): 2715-2730.
- Sun Y.X., Fang M., Wang J., Cooper C.R., Pienta K.J. y Taichman R.S. (2007). "Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells." *Prostate* 67(1): 61-73.
- Sunamura M., Duda D.G., Ghattas M.H., Lozonschi L., Motoi F., Yamauchi J., Matsuno S., Shibahara S. y Abraham N.G. (2003). "Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer." *Angiogenesis* 6(1): 15-24.
- Tatsumi S., Ishii K., Amizuka N., Li M., Kobayashi T., Kohno K., Ito M., Takeshita S. y Ikeda K. (2007). "Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction." *Cell Metab* 5(6): 464-475.
- Taube T., Elomaa I., Blomqvist C., Beneton M.N. y Kanis J.A. (1994). "Histomorphometric evidence for osteoclast-mediated bone resorption in metastatic breast cancer." *Bone* 15(2): 161-166.
- Teixeira C.C., Liu Y., Thant L.M., Pang J., Palmer G. y Alikhani M. (2010). "Foxo1, a novel regulator of osteoblast differentiation and skeletogenesis." *J Biol Chem* 285(40): 31055-31065.
- Tenhunen R., Marver H.S. y Schmid R. (1969). "Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme." *J Biol Chem* 244(23): 6388-6394.
- Terman B.I., Carrion M.E., Kovacs E., Rasmussen B.A., Eddy R.L. y Shows T.B. (1991). "Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase." *Oncogene* 6(9): 1677-1683.

- Tertil M., Jozkowicz A. y Dulak J. (2010). "Oxidative stress in tumor angiogenesistherapeutic targets." *Curr Pharm Des* 16(35): 3877-3894.
- Thavathiru E. y Das G.M. (2001). "Activation of pRL-TK by 12S E1A oncoprotein: drawbacks of using an internal reference reporter in transcription assays." *Biotechniques* 31(3): 528-530, 532.
- Thomas B.G. y Hamdy F.C. (2000). "Bone morphogenetic protein-6: potential mediator of osteoblastic metastases in prostate cancer." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 3(4): 283-285.
- Tian E., Zhan F., Walker R., Rasmussen E., Ma Y., Barlogie B. y Shaughnessy J.D., Jr. (2003). "The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma." N Engl J Med 349(26): 2483-2494.
- Torisu-Itakura H., Furue M., Kuwano M. y Ono M. (2000). "Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas." *Jpn J Cancer Res* 91(9): 906-910.
- Trakshel G.M. y Maines M.D. (1989). "Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit." *J Biol Chem* 264(2): 1323-1328.
- Tran H., Brunet A., Grenier J.M., Datta S.R., Fornace A.J., Jr., DiStefano P.S., Chiang L.W. y Greenberg M.E. (2002). "DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein." *Science* 296(5567): 530-534.
- Tsai J.R., Wang H.M., Liu P.L., Chen Y.H., Yang M.C., Chou S.H., Cheng Y.J., Yin W.H., Hwang J.J. y Chong I.W. (2012). "High expression of heme oxygenase-1 is associated with tumor invasiveness and poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients." *Cell Oncol (Dordr)* 35(6): 461-471.
- Tsuji M.H., Yanagawa T., Iwasa S., Tabuchi K., Onizawa K., Bannai S., Toyooka H. y Yoshida H. (1999). "Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis." *Cancer Lett* 138(1-2): 53-59.
- Urwin G.H., Percival R.C., Harris S., Beneton M.N., Williams J.L. y Kanis J.A. (1985). "Generalised increase in bone resorption in carcinoma of the prostate." *Br J Urol* 57(6): 721-723.
- Ushio-Fukai M. y Nakamura Y. (2008). "Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy." *Cancer Lett* 266(1): 37-52.
- Vaananen H.K., Zhao H., Mulari M. y Halleen J.M. (2000). "The cell biology of osteoclast function." *J Cell Sci* 113 (Pt 3): 377-381.
- van der Vos K.E. y Coffer P.J. (2008). "FOXO-binding partners: it takes two to tango." Oncogene 27(16): 2289-2299.
- Vanella L., Kim D.H., Asprinio D., Peterson S.J., Barbagallo I., Vanella A., Goldstein D., Ikehara S., Kappas A. y Abraham N.G. (2010). "HO-1 expression increases

mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage." *Bone* 46(1): 236-243.

- Vashist Y.K., Uzungolu G., Kutup A., Gebauer F., Koenig A., Deutsch L., Zehler O., Busch P., Kalinin V., Izbicki J.R. y Yekebas E.F. (2011). "Heme oxygenase-1 germ line GTn promoter polymorphism is an independent prognosticator of tumor recurrence and survival in pancreatic cancer." *J Surg Oncol* 104(3): 305-311.
- Wagener F.A., Volk H.D., Willis D., Abraham N.G., Soares M.P., Adema G.J. y Figdor C.G. (2003). "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation." *Pharmacol Rev* 55(3): 551-571.
- Wakefield L.M. y Roberts A.B. (2002). "TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis." *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 22-29.
- Wan X., Li Z.G., Yingling J.M., Yang J., Starbuck M.W., Ravoori M.K., Kundra V., Vazquez E. y Navone N.M. (2012a). "Effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor I kinase inhibitor on prostate cancer bone growth." *Bone* 50(3): 695-703.
- Wan X., Liu J., Lu J.F., Tzelepi V., Yang J., Starbuck M.W., Diao L., Wang J., Efstathiou E., Vazquez E.S., Troncoso P., Maity S.N. y Navone N.M. (2012b). "Activation of betacatenin signaling in androgen receptor-negative prostate cancer cells." *Clin Cancer Res* 18(3): 726-736.
- Was H., Cichon T., Smolarczyk R., Rudnicka D., Stopa M., Chevalier C., Leger J.J., Lackowska B., Grochot A., Bojkowska K., Ratajska A., Kieda C., Szala S., Dulak J. y Jozkowicz A. (2006). "Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice." *Am J Pathol* 169(6): 2181-2198.
- Was H., Dulak J. y Jozkowicz A. (2010). "Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy." *Curr Drug Targets* 11(12): 1551-1570.
- Watson P.A., Chen Y.F., Balbas M.D., Wongvipat J., Socci N.D., Viale A., Kim K. y Sawyers C.L. (2010). "Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(39): 16759-16765.
- Wauquier F., Leotoing L., Coxam V., Guicheux J. y Wittrant Y. (2009). "Oxidative stress in bone remodelling and disease." *Trends Mol Med* 15(10): 468-477.
- Wegiel B., Chin B.Y. y Otterbein L.E. (2008). "Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation." *Cell Cycle* 7(10): 1379-1384.
- Weidner N., Carroll P.R., Flax J., Blumenfeld W. y Folkman J. (1993). "Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma." *Am J Pathol* 143(2): 401-409.

- Weis N., Weigert A., von Knethen A. y Brune B. (2009). "Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants." *Mol Biol Cell* 20(5): 1280-1288.
- Wen W.N. (2002). "Methemoglobin contributes to the growth of human tumor cells." *Life Sci* 70(8): 907-916.
- Whiteside T.L., Mandapathil M., Szczepanski M. y Szajnik M. (2011). "Mechanisms of tumor escape from the immune system: adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs." *Bull Cancer* 98(2): E25-31.
- Yachie A., Niida Y., Wada T., Igarashi N., Kaneda H., Toma T., Ohta K., Kasahara Y. y Koizumi S. (1999). "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency." *J Clin Invest* 103(1): 129-135.
- Yaffe D. y Saxel O. (1977). "A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation." *Differentiation* 7(3): 159-166.
- Yanagawa T., Omura K., Harada H., Nakaso K., Iwasa S., Koyama Y., Onizawa K., Yusa H. y Yoshida H. (2004). "Heme oxygenase-1 expression predicts cervical lymph node metastasis of tongue squamous cell carcinomas." *Oral Oncol* 40(1): 21-27.
- Yang J., Fizazi K., Peleg S., Sikes C.R., Raymond A.K., Jamal N., Hu M., Olive M., Martinez L.A., Wood C.G., Logothetis C.J., Karsenty G. y Navone N.M. (2001). "Prostate cancer cells induce osteoblast differentiation through a Cbfa1-dependent pathway." *Cancer Res* 61(14): 5652-5659.
- Yang S., Xu H., Yu S., Cao H., Fan J., Ge C., Fransceschi R.T., Dong H.H. y Xiao G. (2011). "Foxo1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF1)/insulin regulation of osteocalcin expression by antagonizing Runx2 in osteoblasts." *J Biol Chem* 286(21): 19149-19158.
- Yi B., Williams P.J., Niewolna M., Wang Y. y Yoneda T. (2002). "Tumor-derived plateletderived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer." *Cancer Res* 62(3): 917-923.
- Yin J.J., Pollock C.B. y Kelly K. (2005). "Mechanisms of cancer metastasis to the bone." *Cell Res* 15(1): 57-62.
- Yossepowitch O., Pinchuk I., Gur U., Neumann A., Lichtenberg D. y Baniel J. (2007). "Advanced but not localized prostate cancer is associated with increased oxidative stress." *J Urol* 178(4 Pt 1): 1238-1243; discussion 1243-1234.
- Zayed M.A., Yuan W., Chalothorn D., Faber J.E. y Parise L.V. (2010). "Tumor growth and angiogenesis is impaired in CIB1 knockout mice." *J Angiogenes Res* 2: 17.
- Zelenay S., Chora A., Soares M.P. y Demengeot J. (2007). "Heme oxygenase-1 is not required for mouse regulatory T cell development and function." *Int Immunol* 19(1): 11-18.

- Zhang H., Pan Y., Zheng L., Choe C., Lindgren B., Jensen E.D., Westendorf J.J., Cheng L. y Huang H. (2011). "FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion." *Cancer Res* 71(9): 3257-3267.
- Zhang J., Dai J., Qi Y., Lin D.L., Smith P., Strayhorn C., Mizokami A., Fu Z., Westman J. y Keller E.T. (2001). "Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone." J Clin Invest 107(10): 1235-1244.
- Zou C., Zhang H., Li Q., Xiao H., Yu L., Ke S., Zhou L., Liu W., Wang W., Huang H., Ma N., Liu Q., Wang X., Zhao W., Zhou H. y Gao X. (2011). "Heme oxygenase-1: a molecular brake on hepatocellular carcinoma cell migration." *Carcinogenesis* 32(12): 1840-1848.
- Zwerina J., Tzima S., Hayer S., Redlich K., Hoffmann O., Hanslik-Schnabel B., Smolen J.S., Kollias G. y Schett G. (2005). "Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption." *FASEB J* 19(14): 2011-2013.