

Tesis Doctoral

Efecto de la modulación del receptor de glucocorticoides sobre la progresión del cáncer de próstata

Leonardi, Daiana Beatriz

2017-11-24

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:

Leonardi, Daiana Beatriz. (2017-11-24). Efecto de la modulación del receptor de glucocorticoides sobre la progresión del cáncer de próstata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Leonardi, Daiana Beatriz. "Efecto de la modulación del receptor de glucocorticoides sobre la progresión del cáncer de próstata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-11-24.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



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

Efecto de la modulación del receptor de glucocorticoides sobre la progresión 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. Daiana Beatriz Leonardi

Director de tesis: **Dra. Elba Susana Vazquez**

Director asistente: **Dr. Javier Hernán Cotignola**

Consejero de estudios: **Dra. Susana Correa García**

Laboratorio de Inflamación y Cáncer
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires
IQIBICEN - CONICET

Buenos Aires, 2017

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muerte por cáncer entre los hombres occidentales y una de las estrategias terapéuticas actualmente utilizadas es la ablación de andrógenos. Sin embargo esta terapia resulta ineficaz en los estadios avanzados de los tumores, cuando se vuelven refractarios al tratamiento (cáncer de próstata resistente a la castración o CRPC). Entre las varias opciones terapéuticas para el CRPC, se pueden utilizar los glucocorticoides (GC) porque tienen un efecto inhibitorio parcial sobre la producción de andrógenos por la glándula adrenal. Los GC se han usado en el tratamiento del CaP para retardar la progresión de la enfermedad y controlar el dolor y los efectos colaterales de la terapia. Sin embargo, estos compuestos tienen el potencial de estimular el crecimiento del CaP vía el receptor de andrógenos (AR) mutado o el mismo receptor de glucocorticoides (GR).

Hemo oxigenasa-1 (HO-1) es la enzima limitante en la degradación del grupo hemo y tanto su expresión como actividad pueden ser inducidas de forma específica por Hemina. En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que la sobreexpresión de HO-1 en líneas de CaP disminuye su proliferación, invasión y migración *in vitro* y el crecimiento tumoral y angiogénesis *in vivo*. Además, reportamos que HO-1 inhibe la actividad transcripcional del receptor de andrógenos en el CaP interfiriendo con la vía de STAT3.

En este trabajo de tesis nos propusimos evaluar la vía de GR y su modulación por HO-1, e identificar los procesos celulares alterados que median la progresión del CaP. Para ello realizamos los siguientes tratamientos: Hemina (80 μ M, 24 h), Dexametasona (1×10^{-8} M, 6 h), la combinación de ambas drogas o PBS como control. Observamos que el tratamiento con Dexametasona no modificó la viabilidad de las líneas celulares PC3 (AR-/GR+) y C4-2B (AR+/GR+), mientras que el cultivo en presencia de Hemina disminuyó la viabilidad. En ambas líneas, además de corroborar que Hemina aumentaba la expresión génica ($p < 0,05$) y los niveles proteicos de HO-1, se comprobó que reducía significativamente la expresión de *NR3C1* (gen codifica para GR; $p < 0,01$) y afectaba la expresión de distintos genes blanco de GR. El tratamiento con Dexametasona indujo los niveles de GR en ambas líneas celulares. Mediante ensayos con genes reporteros evidenciamos que Dexametasona aumentaba la actividad transcripcional de GR ($p < 0,01$). Sin embargo, en la línea PC3 este efecto fue revertido parcialmente por el pre-tratamiento con Hemina ($p = 0,02$). También, observamos que HO-1 y GR co-inmunoprecipitaban tanto en núcleo como en citoplasma. Por inmunofluorescencia, pudimos ver que la presencia de Dexametasona aumentó la localización nuclear de GR; sin embargo, en el pre-tratamiento con Hemina el receptor quedó parcialmente retenido en el citoplasma ($p = 1 \times 10^{-7}$). Al estudiar la

expresión proteica de las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52, se observó un aumento significativo de FKBP51 en las células tratadas con Hemina+Dexametasona, lo que podría explicar la retención parcial en citoplasma de GR en estas condiciones. Por análisis bioinformático no se hallaron elementos de respuesta a GR en el gen *HMOX1*.

Dado el alto índice de metástasis óseas en el CaP, células PC3 pre-tratadas o no con Hemina, se co-cultivaron con la línea MC3T3 (preosteoblastos murinos). Observamos que el co-cultivo aumentó la expresión de *NR3C1* tanto en las células tumorales como en las progenitoras óseas.

Con el objetivo de analizar el efecto de los tratamientos con Hemina y Dexametasona *in vivo*, generamos tumores *s.c.* de células PC3 creciendo como xenotransplantes en ratones *nude*. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 150 mm³, los animales se inyectaron *i.p.* cada 48 h con 6 dosis de los siguientes tratamientos: Hemina (25 mg/kg), Dexametasona (0,2 mg/kg), Hemina+Dexametasona (misma dosis tratamientos individuales) o PBS (control). Los animales fueron sacrificados 24 h luego de la última dosis. Observamos que la administración *i.p.* de Hemina en ambos tratamientos muestra una tendencia hacia el aumento del crecimiento tumoral, mientras los tumores de ratones tratados con Dexametasona sola crecieron de forma similar a los del grupo control. Sin embargo, las diferencias no resultaron significativas probablemente debido al número limitado de animales incluidos (n=7 por grupo). El estudio de la expresión de HO-1 y GR por inmunohistoquímica reveló la ausencia de marcación para HO-1 en los tumores de todos los grupos y tinción positiva de HO-1 en los macrófagos infiltrantes al tumor. Para GR se observó una fuerte inmunorreactividad nuclear en los tumores de los grupos Hemina y Dexametasona. Al analizar lisados tumorales totales por Western Blot, se comprobó que la administración de Dexametasona sola o conjuntamente con Hemina causó un aumento significativo de HO-1. A nivel génico, se observó una disminución significativa en la expresión de *NR3C1* en los tumores tratados con Dexametasona respecto a los controles ($p=0,02$), sin evidenciarse cambios en los niveles de *HMOX1*.

Con el objetivo de estudiar la expresión de *HMOX1* y *NR3C1* en tumores humanos, utilizamos datos de *RNAseq* obtenidos de repositorios públicos. Los análisis revelaron que los pacientes con alta expresión de ambos genes presentan menor sobrevida libre de enfermedad y de recaída que aquellos pacientes que expresan niveles bajos.

En resumen, nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* sugieren que existe asociación y una posible modulación entre las vías de HO-1 y GR.

Abstract

Prostate cancer (CaP) is the second cause of cancer-related deaths among occidental men and one of the therapeutic strategy currently used is androgen deprivation. However, this therapy is not efficient in advanced tumours, when they become treatment refractory (castration resistant prostate cancer or CRPC). Among the many therapeutic options for CRPC, glucocorticoids (GC) are usually used because of their partial inhibitory effect on adrenal androgen synthesis. GC have been used in CaP to delay its progression and to control therapy-related pain and side effects. Nevertheless, this drugs are able to stimulate CaP growth via mutated androgen receptor (AR) or glucocorticoid receptor (GR).

Heme oxygenase-1 (HO-1) is the limiting rate heme degradation enzyme, and its expression and activity can be specifically induced by Hemin. In previous reports from our group we showed that HO-1 overexpression in CaP cell lines can reduce proliferation, invasion and migration *in vitro* and, tumor growth and angiogenesis *in vivo*. We also reported that HO-1 inhibits AR transcriptional activity in CaP by interfering in STAT3 signalling.

In this thesis, we studied GR signalling pathway and its modulation by HO-1, to identify the altered cellular processes that lead to CaP progression. Therefore, we performed the following treatments: Hemin (80 μ M, 24 h), Dexamethasone (1×10^{-8} M, 6 h), the combination of both drugs or PBS as control. We found that Dexamethasone did not affect the viability of the cell lines PC3 (AR-/GR+) or C4-2B (AR+/GR+), while the presence of Hemin reduced this parameter. In both cell lines we confirmed that Hemin treatment increased HO-1 gene expression ($p < 0.05$) and protein levels. We also demonstrated that Hemin significantly reduced *NR3C1* levels ($p < 0.01$; encodes for GR) and affected the expression of different GR downstream targets. In both cell lines Dexamethasone treatment induced GR levels. Using reporter genes assays we showed that Dexamethasone significantly increased GR transcriptional activity ($p < 0.01$). However, this effect was partially reverted by Hemin pre-treatment in PC3 cells ($p = 0.02$). We observed that HO-1 and GR co-immunoprecipitated in the nucleus and in the cytoplasm. We showed that Dexamethasone treatment increased GR nuclear localization using immunofluorescence microscopy; while Hemin pre-treatment partially abolished GR nuclear translocation ($p = 1 \times 10^{-7}$). When immunophilins FKBP51 and FKBP52 were studied, we evidenced a significant increase of FKBP51 protein level in Hemin+Dexamethasone treated cells, and this could possibly account for the partial GR cytoplasmic retention under this experimental condition. No GR response element was found in *HMOX1* gene using bioinformatics.

Given that CaP usually metastasize to bone, PC3 cells pre-treated or not with Hemin were co-cultured with MC3T3 cells (murine preosteoblastic cell line). We observed that co-culture augmented *NR3C1* levels in both tumour and bone progenitor cells.

Aiming to study the effect of Hemin and Dexamethasone treatment *in vivo*, we generated *s.c.* PC3 tumours growing as xenografts in nude mice. When tumours reached a volume around 150 mm³, the animals were *i.p.* injected every 48 h with 6 doses of the following treatments: Hemin (25 mg/kg), Dexamethasone (0.2 mg/kg), Hemin+Dexamethasone (same doses that individual treatments) or PBS (control). The animals were sacrificed 24 h after the last dose. We observed that *i.p.* Hemin administration seemed to increase the tumour growth, while those treated with Dexamethasone alone grew similarly to controls. However, there were no significant differences probably due to the limited number of animals included (n=7 per group). By immunohistochemistry analysis, we demonstrated no positive staining for HO-1 in tumours, but high HO-1 reactivity was detected in macrophages infiltrating the tumours. High nuclear immunoreactivity for GR was observed in Hemin and Dexamethasone treated tumours. The analysis of total tumour lysates by Western Blot, revealed HO-1 levels significantly increased in animals treated with Dexamethasone. Further at the transcription level, we observed reduced expression of *NR3C1* in those tumours treated with Dexamethasone ($p=0.02$), with no changes in *HMOX1* levels.

To study *NR3C1* and *HMOX1* expression in human tumours, we used RNAseq data from public repositories. The analyses showed that patients expressing high levels of both genes have lower disease-free survival and lower relapse-free survival than those patients that express low levels.

In summary, our *in vitro* and *in vivo* results suggest an association and a possible modulation between HO-1 and GR pathways.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a todo el personal docente y no docente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, y al CONICET por permitirme realizar el doctorado.

A mis directores, Dra. Elba Vazquez y Dr. Javier Cotignola, por la dedicación, comprensión, la ayuda con la escritura y la estimulante discusión de la tesis.

A la Dra. Geraldine Gueron por su aporte económico para la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo, la compañía, los mates con miles de risas y los experimentos compartidos: Ale Paez, Nico Anselmino, Javi Brandani, Emi Ortiz, Mer Abbate, Sofi Lage Vickers, Feli Jaworski, Juan Bizzotto, Flor Cascardo y Flor Velazquez. El día a día con ustedes fue muy divertido y los voy a extrañar.

Al grupo de la Dra. Adriana de Siervi, con quienes compartí la primera etapa de mi doctorado: Pao De Luca, Flor Zalazar, Nico Dalton y Tefi Labanca.

Al grupo de Mariana Bermudez y Susana Correa, nuestros vecinos de labo. Les agradezco por compartir reactivos, experiencias y muchos consejos.

A la Dra. Adalí Pecci por guiarme en mis primeros pasos en la investigación del receptor de glucocorticoides.

Al Dr. Roberto Meiss por la dedicación y paciencia en el análisis inmuistoquímico de los tumores.

A la Dra. Myriam Nuñez por su ayuda inconmensurable con la estadística del trabajo *in vivo*.

Al Dr. Sergio Nemirovsky por su aporte en el análisis *in silico* de esta tesis.

Al grupo del Dr. Mario Galigniana, en particular a la Dra. Gisela Mazaira, por el tiempo que me prestaron para los ensayos con FKBP51 y FKBP52 y la discusión de los resultados.

A mis amigos de La Comunidad, con quienes comparto la pasión por la biología desde el primer año de la carrera: Caro Inda, Ber Pozzi, Euge Cuervo, Flor Scotto, Pau Trotz, Pau Prieto, Anita Biagini, Emi Di Rosso, Emi Przepiora, Benja Basanta, Feli Jaworski, Lucas Tedesco, Nico Bujak, Manu Pacin y Tomy Lopez Seal. Gracias por las infinitas charlas nerds y las ricas comidas de peña.

A mis amigas Lucía y Ludmila que me acompañan desde la niñez y me bancan en todas.

A mis papás, hermanos, cuñados, y sobrinos: Alfredo y Betty, Adri, Lore y Anto, Nati y Eze, Nella, Marco y Emi. Gracias por la incondicionalidad. Sin ustedes no podría haber llegado hasta acá.

Y finalmente a Fer, mi novio y gran compañero. Gracias por estar conmigo a lo largo de toda la escritura, por aconsejarme y cuidarme. Me haces muy feliz. Te amo.

Muchas gracias a todos!

A Fer

Abreviaciones	10
Introducción	12
1. El cáncer de próstata.	13
1.1. La glándula prostática.	13
1.2. El cáncer de próstata.	15
1.3. El receptor de andrógenos en el cáncer de próstata.	18
1.4. Metástasis ósea en el cáncer de próstata.	19
2. Hemo oxigenasa 1.	21
2.1. Expresión, localización y función de hemo oxigenasa 1	21
2.2. Hemo oxigenasa 1 en el cáncer de próstata.	24
3. El receptor de glucocorticoides.	26
3.1. Los glucocorticoides.	26
3.2. Expresión, localización y función del receptor de glucocorticoides.	27
3.3. El receptor de glucocorticoides en el cáncer de próstata.	31
3.4. El receptor de glucocorticoides y hemo oxigenasa 1.	32
Hipótesis y Objetivos	34
Materiales y métodos	36
1. Cultivo de células.	37
1.1. Líneas celulares utilizadas.	37
1.2. Condiciones de crecimiento.	37
1.3. Mantenimiento de las células.	37
2. Tratamiento con Hemina.	38
3. Tratamiento con Dexametasona.	38
4. Depleción de hormonas del SFB.	40
5. Co-cultivo de osteoblastos con células PC3.	40
6. Análisis de la expresión génica a nivel transcripcional.	41
6.1. Purificación del ARN total.	42
6.2. Cuantificación del ARN.	42
6.3. Preparación del ADNc: Transcripción reversa o retrotranscripción (RT).	42
6.4. PCR en tiempo real o cuantitativa.	43
7. Análisis de la expresión de proteínas.	43
7.1. Extracción de proteínas.	43
7.2. Medición de la concentración de proteínas.	44
7.3. Western blot.	45
7.4. Co-inmunoprecipitación de proteínas.	45
8. Plásmidos.	45
8.1. Vectores plasmídicos utilizados.	46
8.2. Preparación de bacterias competentes.	46
8.3. Transformación de bacterias competentes.	46
8.4. Purificación del ADN plasmídico.	47
8.5. Electroforesis en gel de agarosa.	47
9. Ensayo de genes reporteros.	47
9.1. Transfección de células para ensayo de gen reportero.	47
9.2. Medición de luciferasa.	47
10. Ensayo de inmunofluorescencia.	48
11. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.	48
12. Ensayo de viabilidad celular (MTS).	49

	Índice
13. <i>In vivo</i>: tratamiento de ratones <i>nu/nu</i>.	49
13.1. Inyección subcutánea de células PC3 en ratones <i>nu/nu</i> .	49
13.2. Tratamiento de ratones con Hemina+Dexametasona.	50
14. Histología e inmunohistoquímica de los tumores.	51
15. Análisis bioinformático.	52
15.1. Análisis <i>in silico</i> de secuencias.	52
15.2. Análisis de muestras tumorales de pacientes.	52
16. Análisis estadístico.	53
Resultados	55
1. Determinación de las condiciones experimentales.	56
2. Ensayos <i>in vitro</i>.	59
2.1. Ensayo de viabilidad en PC3 y C4-2B.	59
2.2. Expresión génica de <i>NR3C1</i> , <i>HMOX1</i> y genes blanco de GR en PC3 y C4-2B.	60
2.3. Expresión proteica de GR y HO-1 en PC3 y C4-2B.	62
2.4. Ensayo de genes reporteros en PC3 y C4-2B.	63
2.5. Co-inmunoprecipitación en PC3.	65
2.6. Localización celular de GR y HO-1 por inmunofluorescencia en PC3.	66
2.7. Análisis del ciclo celular en PC3 y C4-2B.	69
2.8. Expresión de FKBP51 y FKBP52 en PC3.	70
2.9. Estudio de células PC3 y preosteoblastos murinos en co-cultivo.	72
2.9.1. Ensayo de genes reporteros en MC3T3.	72
2.9.2. Expresión génica y proteica de GR en PC3 y MC3T3 en co-cultivo.	72
2.9.3. Análisis del ciclo celular en co-cultivo.	73
3. Análisis <i>in silico</i>.	74
4. Ensayos <i>in vivo</i>.	75
4.1. Evaluación del crecimiento tumoral.	76
4.2. Expresión génica y proteica <i>in vivo</i> .	79
4.3. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los tumores.	81
5. Análisis de muestras tumorales de pacientes obtenidas de repositorios públicos.	84
5.1. Análisis por RNAseq.	84
5.2. PrognoScan	86
Discusión	89
Bibliografía	99

Abreviaciones

ACTH: hormona corticotrofina

ADT: terapia de privación hormonal

ALA sintasa: ácido aminolevulínico sintasa

Ang-1: angiopoietina

AP1: *activator protein 1*

AR: receptor de andrógenos

ARE: elementos de respuesta a antioxidantes

Bach1: *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*

BMP: *bone marrow protein*

CaP: cáncer de próstata

CRH: factor liberador de corticotrofina

CRPC: cáncer de próstata resistente a la castración

Dex: Dexametasona

DHT: dihidrotestosterona

DKK1: *dickkopf-1*

DRE: examen digital rectal

ENZ: enzalutamide

ET-1: *endothelin-1*

GC: glucocorticoides

GR: receptor de glucocorticoides

GRE: elementos de respuestas a glucocorticoides

HO-1: hemo oxigenasa

HMOX1: gen que codifica para hemo oxigenasa 1

HPA: hipotálamo-pituitaria-adrenal

HPB: hiperplasia prostática benigna

IGF: *insulin-like growth factor*

i.p.: intraperitoneal

Keap1: *kelch-like ECH-associated protein-1*

LBD: dominio de unión al ligando

LH: hormona luteinizante

MAP kinasas: *mitogen-activated protein kinase*

NFkB: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NR3C1: gen que codifica para el receptor de glucocorticoides

Nrf2: *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*

OPG: *osteoprotegerin*

OPN: osteopontina

PDGF: *platelet-derived growth factor*

PIN: neoplasia prostática intraepitelial

PKA y PKC: *protein kinases A y C*

PMOs: cultivos primarios de osteoblastos murinos

PSA: antígeno prostático específico

RANKL: *receptor activator of nuclear factor κ -B ligand*

RE: retículo endoplasmático

ROS: especies reactivas de oxígeno

s.c.: subcutáneo

SMRT: *silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*

TGF- β : *transforming growth factor beta*

UPR: *unfolded protein response*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

WB: *western blot*

Wnt: *Wingless/integrated*

Introducción

1. El cáncer de próstata.

1.1. La glándula prostática.

La próstata es la principal glándula del aparato genitourinario masculino. Esta se encuentra frente al recto, por debajo de la vejiga, recubre la primera parte de la uretra y tiene forma de pirámide invertida (**Figura 1**). Su función principal es secretar la mayor parte del líquido seminal que protege y nutre a los espermatozoides. La próstata secreta varias enzimas como la fosfatasa ácida, la seminina y el activador de plasminógeno. Cabe destacar la transcripción dependiente de andrógenos, y posterior secreción, del antígeno prostático específico (PSA), serin-proteasa que licúa el semen permitiendo que los espermatozoides se muevan libremente¹.

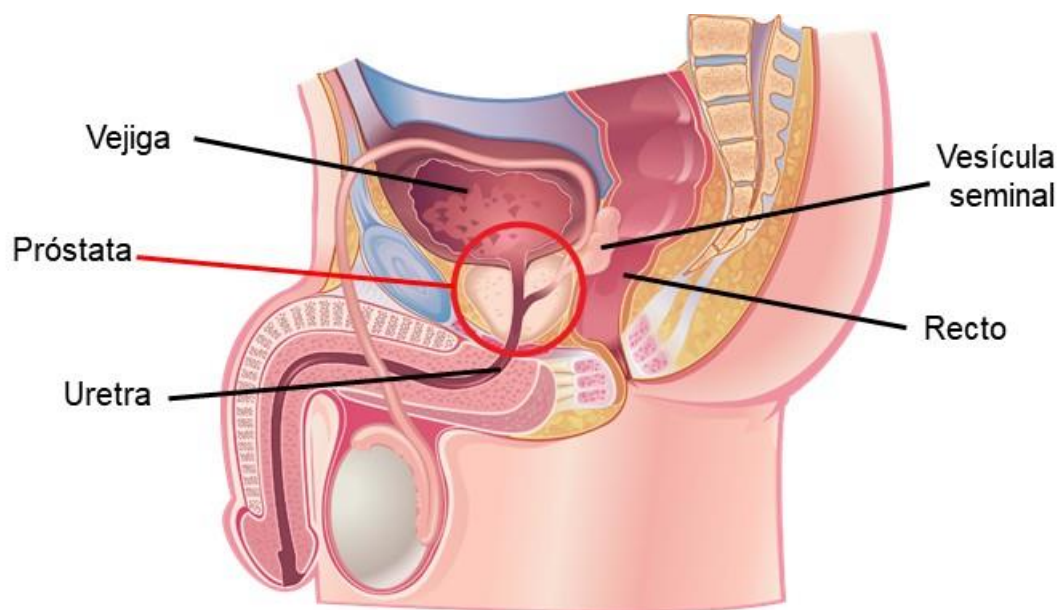


Figura 1: Localización de la próstata. Adaptado de <http://www.prostatecancercentre.ca/prostate-cancer/about-the-prostate/>

Anatómicamente, la glándula adulta se divide en tres zonas: central, de transición y periférica (**Figura 2**). La zona de transición, que representa el 5-10% del tejido glandular, rodea a la uretra cerca de los conductos eyaculadores. La zona central constituye el 20-25% de la próstata y se expande en forma de cono rodeando a los conductos eyaculadores proyectándose hacia la base de la vejiga. La zona periférica cubre la parte posterior y lateral de la glándula, y representa el 70% de su volumen^{2,3}.

Histológicamente, se distingue un epitelio glandular embebido en un estroma fibromuscular. El epitelio se compone de una capa secretoria luminal formada por un epitelio cilíndrico que es dependiente de andrógenos ya que sus células expresan el receptor de andrógenos (AR). Estas

producen las enzimas secretadas como parte del fluido seminal, por ejemplo el PSA⁴. El epitelio secretor se encuentra sostenido por una capa de células basales, de tipo epitelial cuboide, y células neuroendócrinas, estas últimas independientes de andrógenos⁵. Además, en muy baja proporción se encuentran las células *stem* que no expresan AR. Una membrana basal de matriz extracelular divide las células basales del estroma (Figura 3).

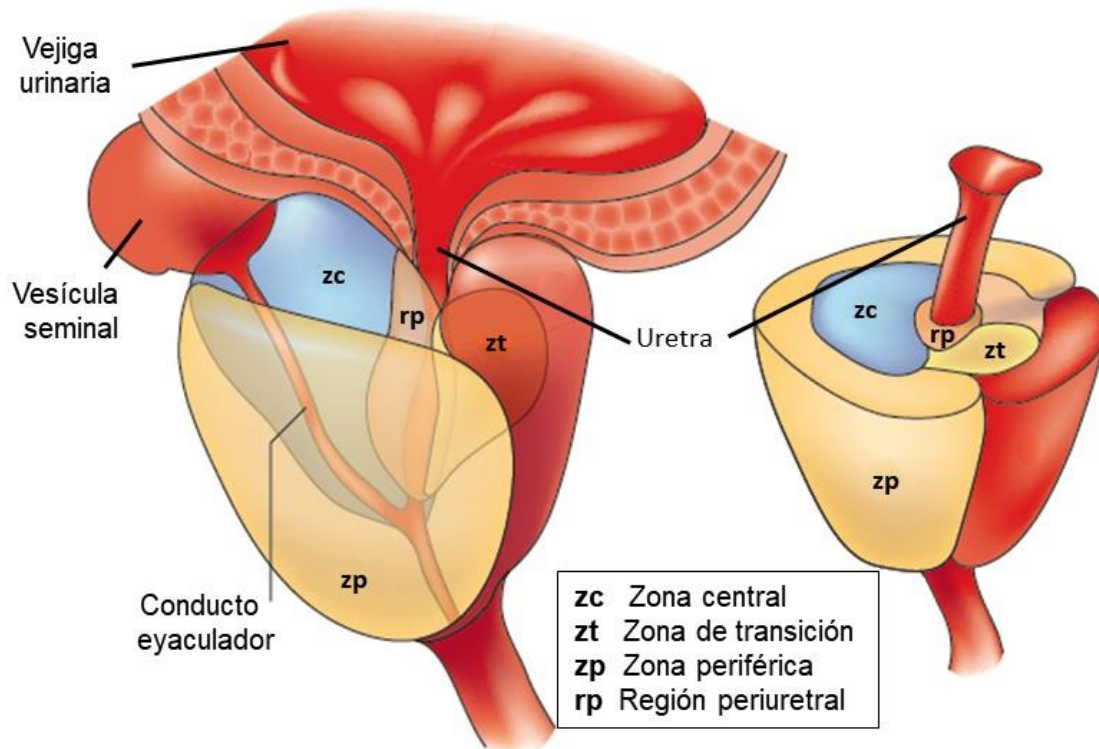


Figura 2: Zonas de la próstata. Adaptación².

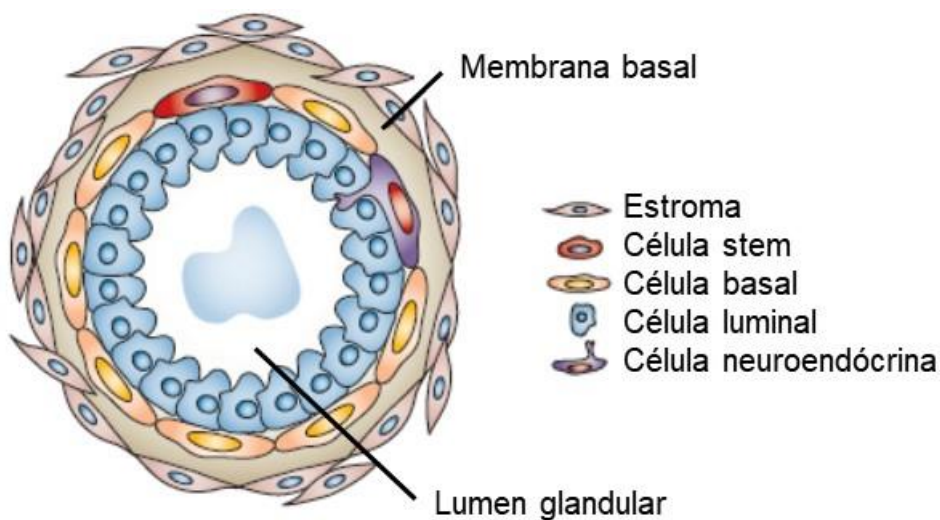


Figura 3: Histología de la próstata. Adaptación⁶.

Tanto el crecimiento de la próstata como el mantenimiento de su epitelio secretor, están regulados por andrógenos y el AR. La hipófisis, por medio de la hormona luteinizante (LH), estimula a las células de Leydig de los testículos a producir testosterona. En la próstata, esta hormona esteroidea es convertida por la 5 α -reductasa a dihidrotestosterona (DHT), metabolito más activo. La unión de DHT al AR de las células glandulares prostáticas, induce la acción transcripcional del receptor⁷.

1.2. El cáncer de próstata.

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres, después del carcinoma de pulmón, y es la sexta causa de muerte por cáncer en hombres de todo el mundo⁸ (**Figura 4**). Según el Instituto Nacional del Cáncer, Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta y el CaP es el de mayor incidencia en los hombres argentinos y el tercero en mortalidad, luego del carcinoma de pulmón y el cáncer colorrectal⁹.

Histopatológicamente, se acepta que la neoplasia prostática intraepitelial (PIN por sus siglas en inglés) representa las etapas anteriores al CaP^{5,10} (**Figura 5**). En esta lesión se observan células luminales anormales, con núcleos agrandados, pero se mantiene intacta la membrana basal, sin invasión del estroma. Se reconocen estadios de PIN de bajo grado y alto grado, siendo este último un marcador de riesgo para el posible desarrollo de CaP. El PIN no produce un aumento de los niveles de PSA y sólo puede ser detectado por análisis histológico¹¹. Además, esta lesión preneoplásica ocurre normalmente en la zona periférica de la glándula, que es donde se desarrollan la mayoría de los casos de CaP.

El CaP se clasifica como un adenocarcinoma, dado que el 95% de los casos se desarrolla a partir de una proliferación desmedida de las células luminales en los ductos prostáticos con ruptura de la membrana basal e invasión del estroma¹². En sus etapas iniciales, cuando el CaP está confinado a la próstata, la enfermedad es curable por intervención quirúrgica y/o radioterapia. Sin embargo, si no es detectado a tiempo, el CaP puede invadir las vesículas seminales y luego hacer metástasis. Cuando el tumor se encuentra restringido a la glándula generalmente es dependiente de andrógenos para su crecimiento. Sin embargo, se puede volver independiente de esta hormona, estadio que se conoce como resistente a la castración (CRPC)^{5,10}.

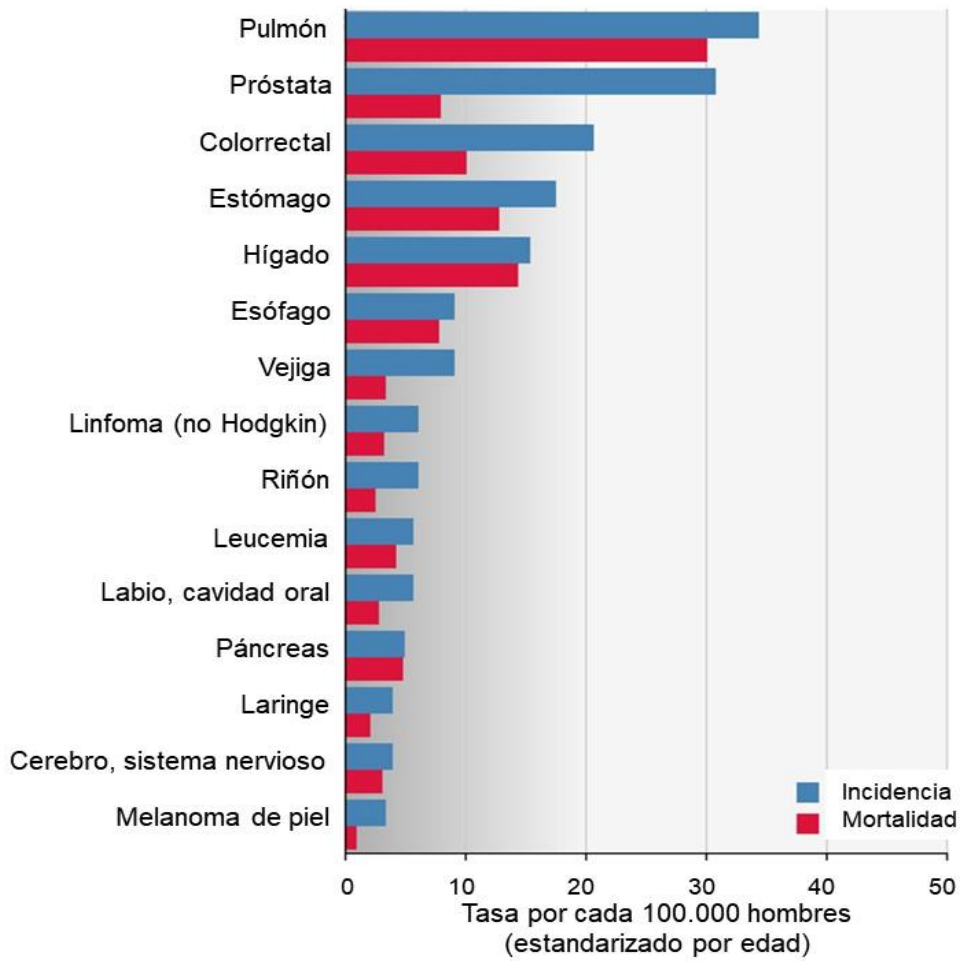


Figura 4: Incidencia y mortalidad de cáncer en hombres de todo el mundo para el año 2012 según GLOBOCAN, IARC - OMS. Adaptación¹³.

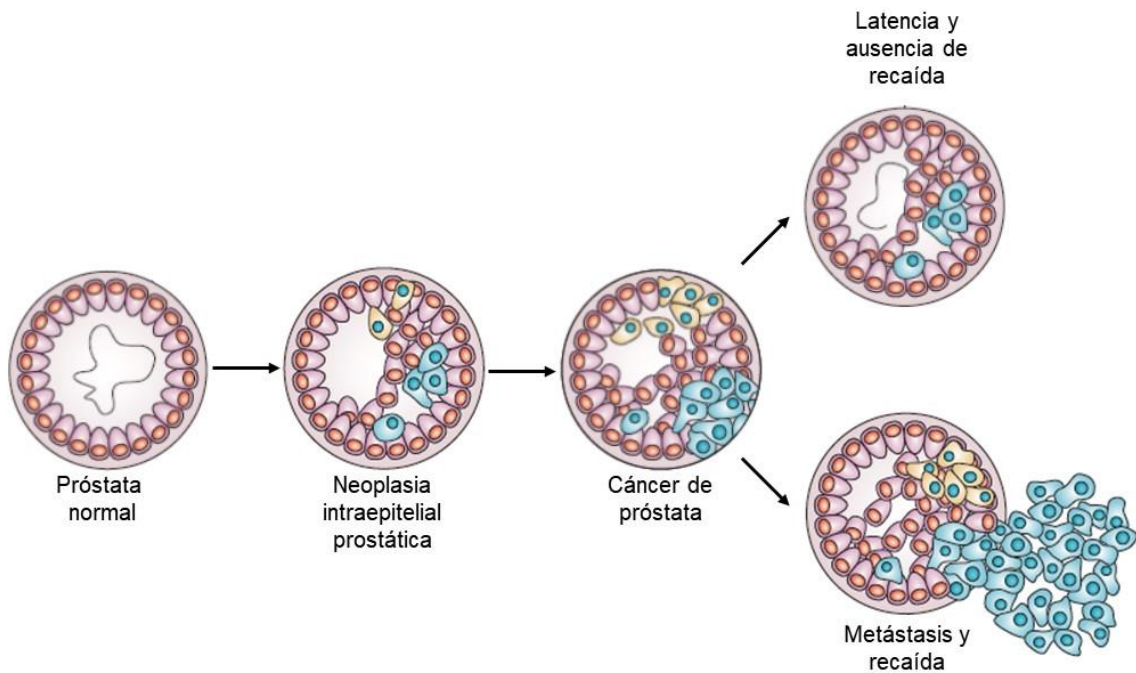


Figura 5: Evolución del cáncer de próstata. Adaptación¹⁴.

El CaP puede ser diagnosticado tempranamente por análisis de sangre, examen digital rectal (DRE), ultrasonografía transrectal y biopsia. El análisis de sangre se basa en la cuantificación del PSA sérico. Actualmente, este último marcador es un indicador para la detección temprana de una patología prostática, ya que los casos hallados por DRE suelen ser tumores avanzados. Sin embargo, el DRE permite detectar casos de CaP con PSA normal, ya que este marcador puede elevarse temporalmente por otras afecciones prostáticas no-tumorales. Por lo tanto, suelen usarse ambos métodos en paralelo. Las biopsias suelen realizarse en pacientes con PSA elevado, DRE anormal o ambos.

Una vez que se ha clasificado el tipo de tumor y teniendo en cuenta las características individuales del paciente, se elige el tratamiento a implementar. Los tratamientos más comunes son tres y se suelen usar distintas combinaciones de ellos de acuerdo a las características de la enfermedad: prostatectomía radical, radiación y terapia hormonal. Para los casos de CRPC se utilizan los taxanos, que son drogas que se unen a la tubulina e inhiben el desensamble de los microtúbulos.

Como en muchos otros tipos de cáncer, el CaP se desarrolla por una acumulación de cambios somáticos y epigenéticos, resultando en la inactivación de genes supresores tumorales y la activación de oncogenes. Sin embargo, la causa exacta de esta afección y los mecanismos específicos que llevan a su desarrollo son aún desconocidos. Si bien muchos factores de riesgo han sido propuestos, sólo 3 son plenamente aceptados como tales: la edad, la historia familiar y el origen étnico¹⁵.

En la carcinogénesis humana, los tumores adquieren distintas capacidades biológicas que permiten el crecimiento de los mismos y su diseminación¹⁶. Los sellos actualmente reconocidos son: el mantenimiento de la proliferación celular y la resistencia a supresores de crecimiento, la inmortalidad replicativa, la evasión de la apoptosis, la angiogénesis, la migración, la invasión y la capacidad de colonizar órganos distantes (metástasis)¹⁶ y más recientemente se incorporaron la evasión del sistema inmune y la desregulación energética¹⁷ (**Figura 6**). Además se acepta que la inflamación¹⁸ y la inestabilidad genómica son características propias neoplásicas que promueven la progresión tumoral¹⁷. La adquisición de la mayoría de estos sellos puede deberse al menos en parte a la señalización aberrante del AR que conducen a la tumorigénesis prostática y su transición hacia el fenotipo resistente a la castración¹⁹.

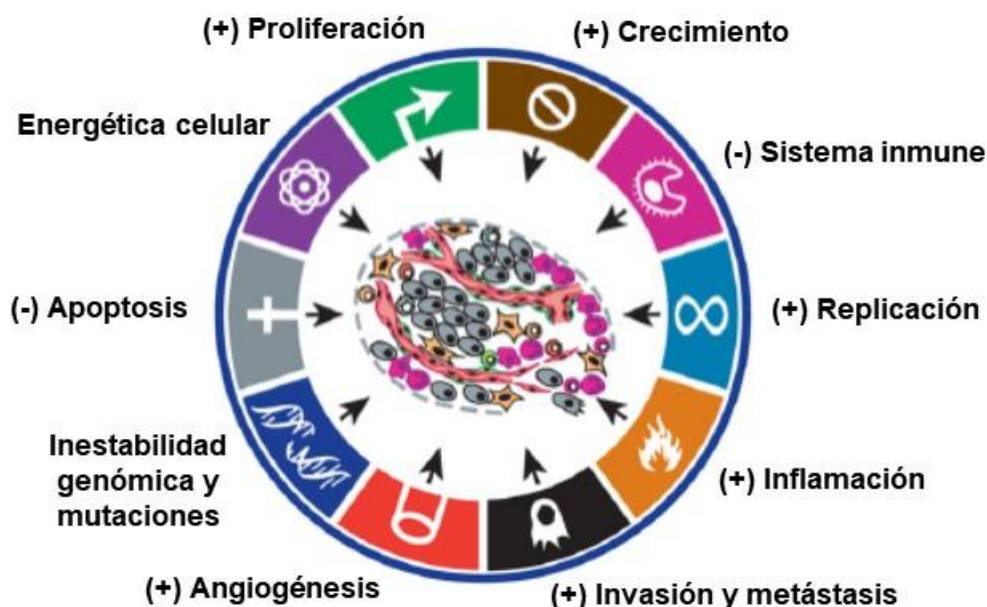


Figura 6: Características (*hallmarks*) del cáncer que permiten la progresión tumoral a través de distintos procesos malignos que comprometen vías fisiológicas. Adaptación¹⁷.

1.3. El receptor de andrógenos en el cáncer de próstata.

El AR cumple un rol fundamental en el desarrollo de la próstata, así como también en su transformación celular. En la glándula normal, la unión de la hormona DHT a este receptor causa su dimerización, translocación nuclear y la transcripción de genes dependiente de andrógenos. Es este mismo camino de señalización el que favorece el crecimiento tumoral y la proliferación en el CaP en su etapa inicial. Inmediatamente después de la terapia de deprivación hormonal (ADT, *Androgen Deprivation Therapy*), la mayoría de las células del CaP entran en apoptosis o quedan arrestadas en G1. Sólo aquellas células que se adapten a las bajas concentraciones de andrógenos, van a proliferar²⁰. Mediante tecnología de microarray se demostró que el aumento del AR a nivel del ARNm y de proteína es necesario y suficiente para la transición desde un estadio sensible a hormonas hacia el resistente a la castración y además que este proceso es dependiente de la funcionalidad del dominio de unión al ligando²¹. Son múltiples los mecanismos que se propusieron para explicar dicha transición. Entre ellos, la amplificación génica del AR²² y mutaciones con ganancia de función²³.

En células de CaP se demostró que, bajo el tratamiento con IL-6 en ausencia de testosterona, STAT3 se activa, interactúa con el AR e induce la transcripción de sus genes blanco, indicando que existe una activación del AR independiente de ligando estimulada por IL-6, y que es mediada por STAT3^{24,25}. Sin embargo, también se comprobó que en respuesta a IL-6 y testosterona, STAT3 puede actuar como un co-activador del AR ejerciendo un efecto sinérgico con la hormona en la

actividad transcripcional de este receptor^{24,26}. Estos mecanismos podrían permitir la proliferación de las células de CaP a bajas concentraciones de andrógenos o en ausencia de los mismos durante la ADT. Además, se reportó que el AR también puede ser activado por vías independientes de hormonas como ser las de PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*) y MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (**Figura 7**). Todas estas cascadas culminan en la activación del AR o de vías alternativas que aumentan la proliferación, migración y sobrevida de las células prostáticas tumorales.

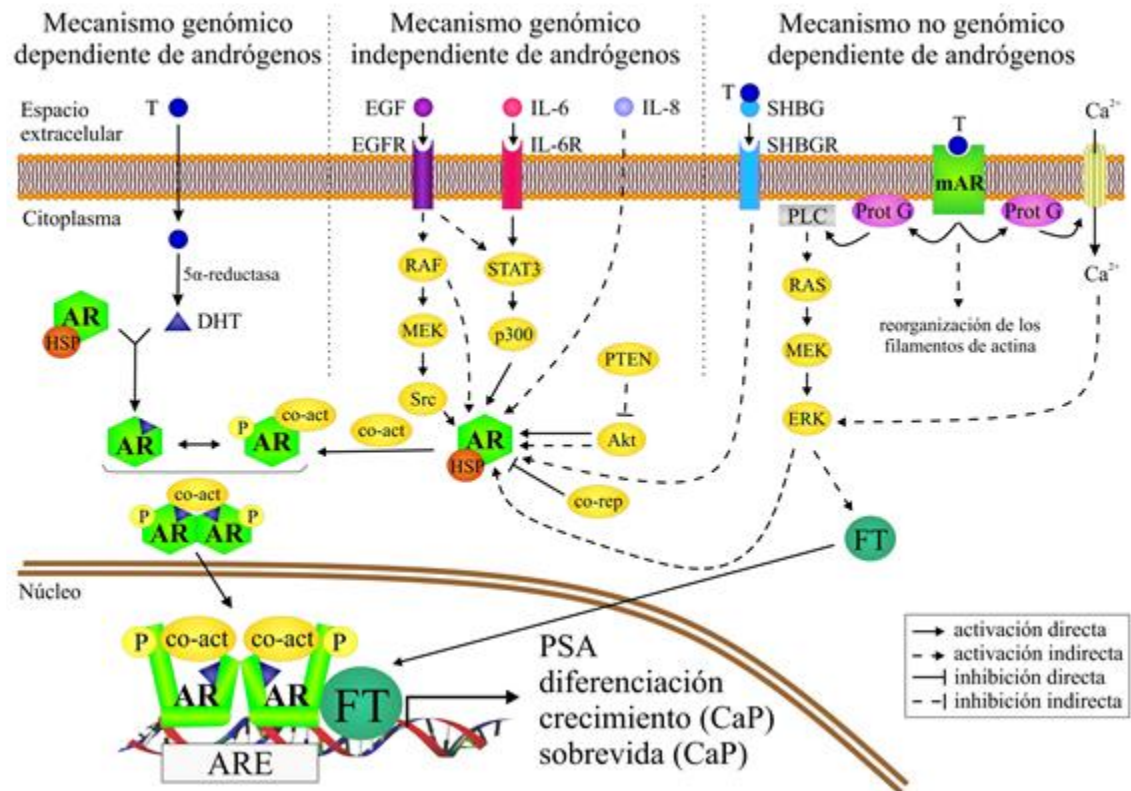


Figura 7: Señalización del AR en el cáncer de próstata dependiente e independiente de hormonas. Adaptación¹⁵.

1.4. Metástasis ósea en el cáncer de próstata.

Las metástasis óseas son comunes en varios cánceres incluyendo el de pulmón, hígado, tiroides, mama y próstata. El tropismo de las células de próstata por el hueso es sorprendente, donde en el 90% de los casos el hueso aparece como el único sitio de metástasis.

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 CaP y las células del microambiente de la metástasis se generan *loops* regulatorios de retro-alimentación, los cuales interrumpen la homeostasis entre los osteoblastos, los osteoclastos, las células endoteliales y otros elementos del estroma. 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. Además en 2014, Ottewell *et al.* demostraron que la ADT favorece el crecimiento de células tumorales diseminadas en hueso, a través de mecanismos dependientes de osteoclastos²⁷.

Las etapas iniciales de la metástasis involucran el desprendimiento de células del tumor primario y la migración de estas a los vasos sanguíneos cercanos²⁸. Luego de la intravasación, la atracción inicial de las células tumorales a sitios distales es regulada por integrinas y quimoquinas producidas por la médula ósea y células estromales. El receptor para la quimoquina CXCL12, está presente en osteoclastos, pero también en las células prostáticas²⁹. Es por esta vía que las células tumorales son guiadas hacia el hueso. Una vez allí, diferentes moléculas de anclaje expresadas por las células óseas como osteopontina (OPN) y angiopoietina (Ang-1), también favorecen la adherencia de las células tumorales al nicho óseo²⁸.

Las células tumorales metastásicas pueden estimular a los osteoblastos mediante la secreción de Wnt (*Wingless/integrated*), mientras que DKK1 (*dickkopf-1*), inhibidor de esta vía, puede promover la osteólisis en las etapas tempranas del cáncer. Existen otros factores parácrinos liberados por las células de CaP que regulan la proliferación y/o diferenciación de los osteoblastos: BMP (*bone marrow protein*), TGF- β (*transforming growth factor beta*), IGF (*insulin-like growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) y ET-1 (*endothelin-1*)³⁰. Se reportó que VEGF controla la formación de hueso a través de la vasculatura de la placa de crecimiento del mismo³¹.

En condiciones fisiológicas normales, las células osteoblásticas regulan la actividad de los osteoclastos por el balance entre la expresión de OPG (*osteoprotegerin*) y de RANKL (*receptor activator of nuclear factor κ -B ligand*)³². La degradación del hueso promueve la proliferación de las células tumorales por la liberación de múltiples factores de crecimiento. A su vez, estos factores estimulan la proliferación tanto de los osteoblastos como de las células del tumor, creándose así un círculo vicioso³³ (**Figura 8**).

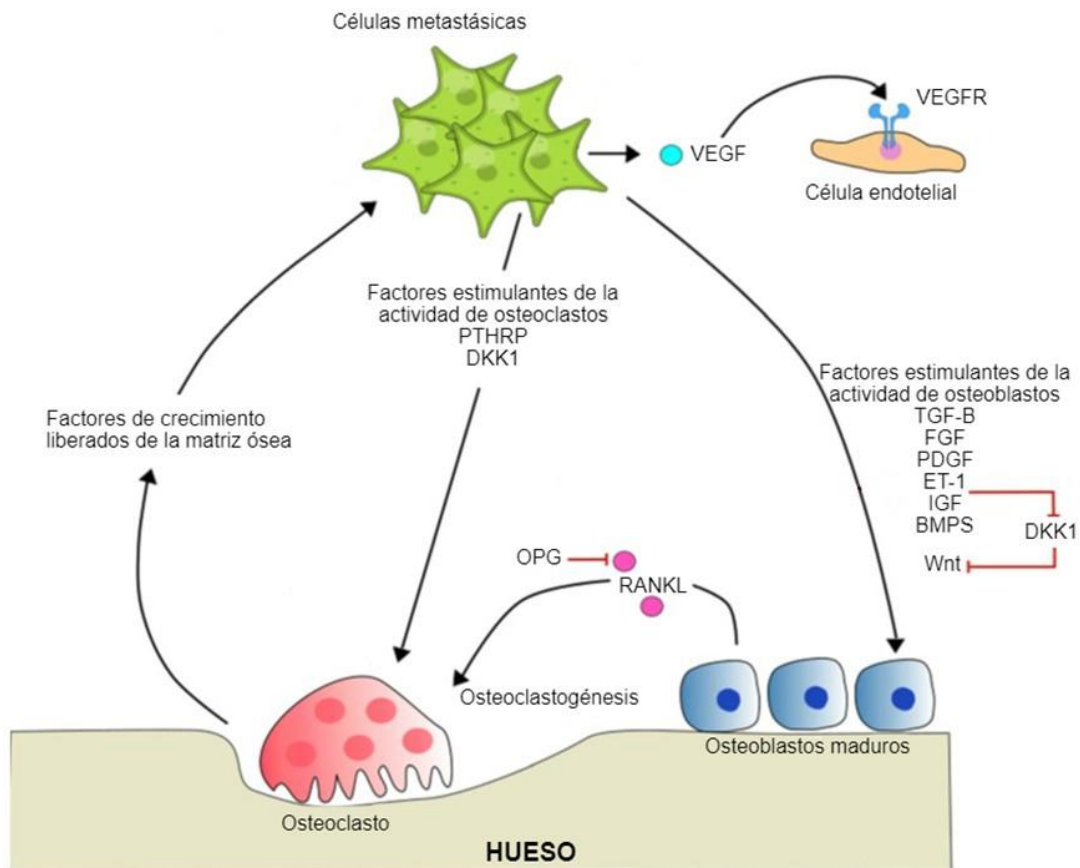


Figura 8: Mecanismos de señalización entre las células tumorales y el hueso durante la metástasis ósea. Adaptación³⁴.

2. Hemo oxigenasa 1.

2.1. Expresión, localización y función de hemo oxigenasa 1.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden causar daño en los tejidos debido a la acumulación de cambios en macromoléculas vitales como lípidos, carbohidratos, proteínas e incluso el ADN³⁵. Actualmente, no se conocen completamente los mecanismos por los cuales las células censan estados pro-oxidantes y activan caminos de señalización para contrarrestar los cambios. Sin embargo, se sabe que la expresión de las enzimas de la familia hemo oxigenasa (HO), que catabolizan el hemo, es una estrategia muy conservada a lo largo de la evolución³⁶.

En humanos, se expresan principalmente dos isoformas de HO que comparten el 40% de homología de secuencia aminoacídica³⁷: hemo oxigenasa 1 (HO-1), que es inducible y codificada por el gen HMOX1, y hemo oxigenasa 2 (HO-2), de expresión constitutiva y codificada por HMOX2³⁸. Se reportó una tercera isoforma de la enzima, HO-3, la cual comparte un 90% de identidad con HO-2 pero tiene menor peso molecular y no posee actividad catalítica³⁹.

HO-1 es una proteína de 32 kDa, que se expresa en bajos niveles en la mayoría de los tejidos de los mamíferos³⁸ y es inducible en todas las células por una vasta variedad de estímulos como: su propio sustrato, metales pesados⁴⁰, irradiación UV, ROS⁴¹, óxido nítrico⁴² y citoquinas inflamatorias⁴³.

Los niveles intracelulares de hemo juegan un papel importante en la regulación de muchas funciones celulares. Por lo tanto, la cantidad de hemo es finamente regulada por su síntesis, a cargo de la enzima ALA sintasa (ácido aminolevulínico sintasa), y su degradación dirigida por HO. Altos niveles de hemo reprimen la síntesis de la enzima ALA sintasa e inducen la expresión de HO⁴⁴.

Existen múltiples factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de HO-1: las MAP kinasas (*mitogen-activated protein kinase*), Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), Bach1 (*BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*), PKA y PKC (*protein kinases A y C*), AP1 (*activator protein 1*) y NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), entre otros⁴⁵. La regulación más ampliamente conocida es la que llevan a cabo Nrf2 junto a Keap1 (*kelch-like ECH-associated protein-1*). En condiciones basales, Nrf2 es ubiquitinado por medio de Keap1 y enviado a degradación. En situaciones de estrés, Nrf2 se libera de Keap1 y transloca al núcleo donde activa distintos genes, entre ellos *HMOX1*, por unión a los sitios ARE (elementos de respuesta a antioxidantes)⁴⁶ (**Figura 9**).

En general, el hemo se libera por la oxidación de las hemoproteínas, siendo las más abundantes la hemoglobina y la mioglobina (expresadas en glóbulos rojos y células musculares, respectivamente)⁴⁷. El hemo libre (complejo de protoporfirina IX con hierro ferroso) puede catalizar, a través de la reacción de Fenton, la formación de los radicales hidroxilo, altamente tóxicos, a partir de peróxido de hidrógeno. HO-1 es responsable de la catálisis del complejo de la protoporfirina IX produciendo biliverdina (que es rápidamente convertida a bilirrubina por la biliverdina reductasa), monóxido de carbono (CO) y hierro que es secuestrado por la ferritina⁴⁷ (**Figura 10**). Estos 3 productos de la catálisis presentan capacidades citoprotectoras, mientras que el hemo libre es pro-oxidante⁴⁸, pro-inflamatorio⁴⁹ y pro-apoptótico⁵⁰.

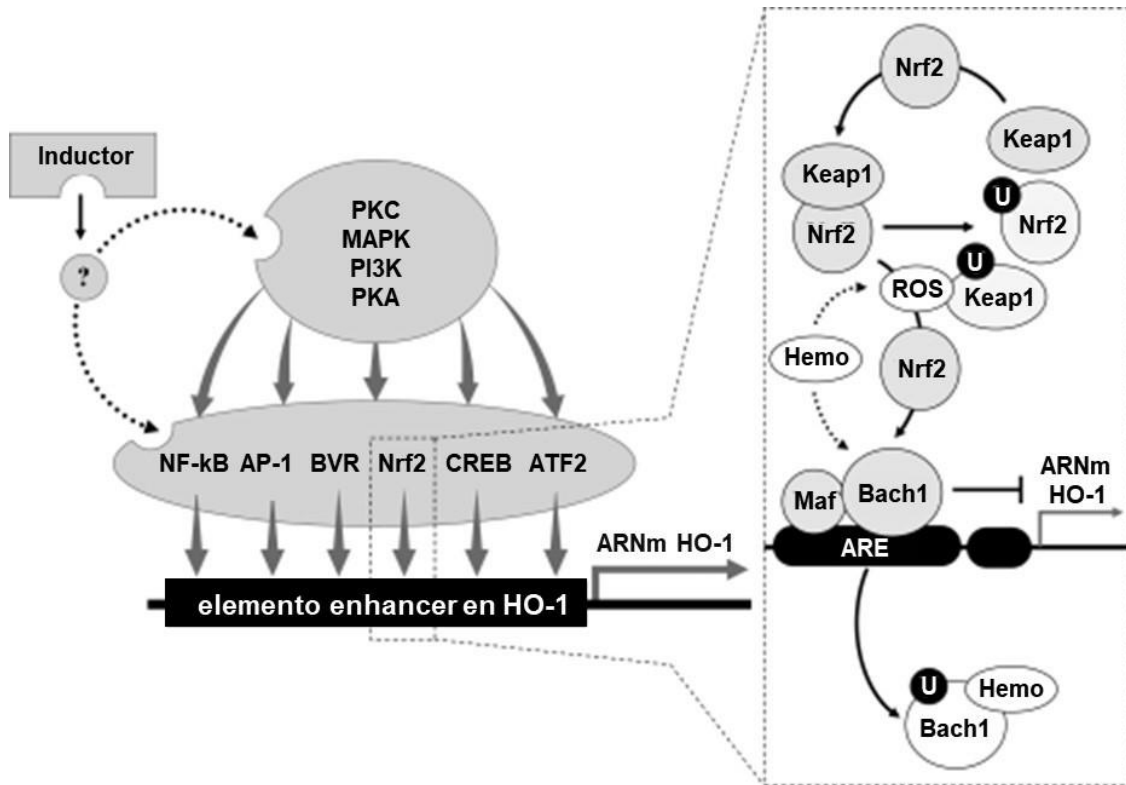


Figura 9: Vías de regulación de la transcripción de HO-1. Adaptación⁴⁵.

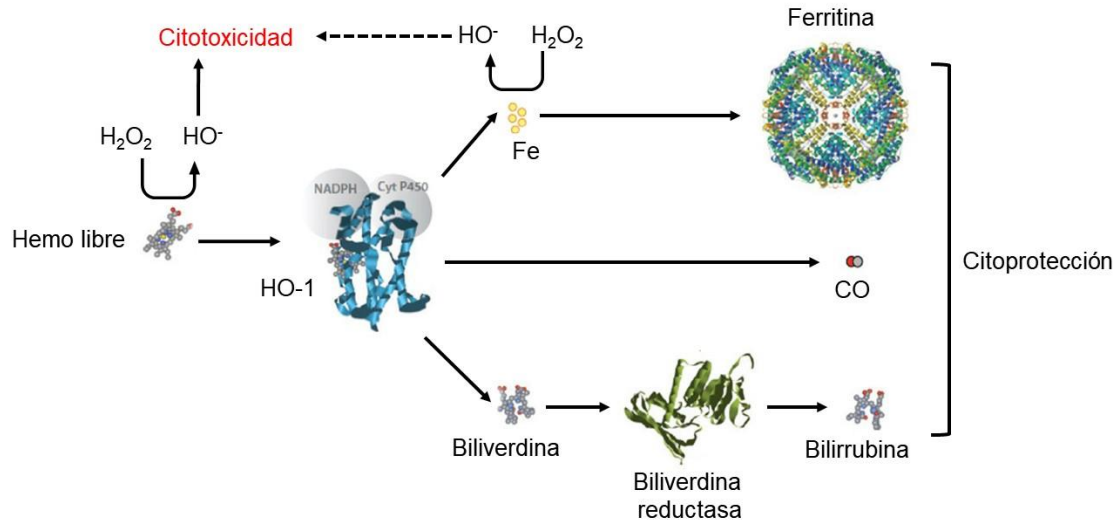


Figura 10: Reacción catalizada por HO-1. Adaptación⁴⁷.

HO-1 se encuentra normalmente anclada a retículo endoplasmático (RE) por un único fragmento transmembrana localizado en su extremo C-terminal y el resto de la proteína reside en el citoplasma. En el RE puede formar dímeros u oligómeros⁵¹. Aunque distintos trabajos habían planteado la posible localización nuclear de HO-1^{52,53}, en 2007 se reportó por primera vez que,

frente a estímulos como hipoxia o tratamiento con Hemina, HO-1 es capaz de migrar al núcleo con pérdida de la actividad enzimática⁵⁴. En trabajos de nuestro grupo también se ha demostrado la presencia nuclear de HO-1⁵⁵. Actualmente, se sabe que esta enzima limitante en la degradación del hemo, es clivada en su extremo C-terminal dentro de la membrana del RE por una peptidasa (SPP)⁵⁶ permitiendo así la translocación al núcleo. Se demostró una correlación entre la expresión nuclear de HO-1 y los niveles de SPP en las líneas celulares A549 (carcinoma de pulmón) y DU145 (CaP) y se comprobó que la translocación nuclear de HO-1 mediada por esta peptidasa promueve la proliferación celular y la invasión, procesos independientes de su actividad enzimática⁵⁶. Aunque HO-1 no tiene una secuencia consenso para la localización nuclear, se halló una secuencia putativa que sería la responsable de dicha localización⁵⁴. Sin embargo, las proteínas de menos de 50 kDa pueden difundir libremente entre núcleo y citoplasma. HO-1 nuclear presenta reducida o nula actividad enzimática y en su secuencia no se encuentran motivos conocidos de unión al ADN. Sin embargo, se sabe que HO-1 puede unirse a otras proteína y consecuentemente activar factores de transcripción involucrados en proliferación celular y protección frente a estrés oxidativo⁵⁴.

2.2. Hemo oxigenasa 1 en el cáncer de próstata.

Algunos resultados sugieren que HO-1 puede actuar como una enzima protectora, disminuyendo el riesgo a desarrollar determinados tumores. Sin embargo, mucho más se sabe de su función en la progresión tumoral. Los efectos procancerígenos de la enzima están asociados con su actividad citoprotectora⁵⁷ y antiapoptótica⁵⁰, que resulta en aumentada sobrevivencia de las células tumorales y resistencia a las terapias. Además, HO-1 es un mediador proangiogénico lo que favorece la vascularización tumoral aumentando el potencial metastásico⁵⁸. Por otro lado, existen numerosos reportes que demuestran que la acción antiinflamatoria de HO-1 puede resultar en inmunosupresión, favoreciendo la progresión tumoral. Aunque en general, HO-1 parece facilitar el crecimiento y metástasis del tumor, los efectos dependen del tipo de cáncer⁵⁹.

En nuestro laboratorio se reportó por primera vez la expresión nuclear de HO-1 en carcinomas humanos de próstata *naive* de tratamiento⁵⁵. Además, demostramos que la inducción farmacológica y genética de HO-1, induce su translocación nuclear e inhibe la proliferación, migración e invasión *in vitro* y disminuye el crecimiento tumoral *in vivo*⁶⁰. Demostramos que la sobreexpresión de HO-1 en líneas celulares de CaP insensibles a andrógenos disminuye la expresión y actividad de MMP9⁶⁰, metaloproteasa que cumple un rol crítico en la invasión y

angiogénesis del CaP⁶¹. Por otra parte, reportamos un rol clave de HO-1 como modulador de la angiogénesis en CaP también mediado por la represión de la vía de NFkB⁶². En este último trabajo se observó que al inducir HO-1 disminuye la expresión de un set de genes inflamatorios y pro-angiogénicos como VEGFA, VEGFC, HIF1 α and α 5 β 1 integrina⁶². Así mismo, demostramos que HO-1 modula negativamente la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (AR) interfiriendo con la señalización de STAT3, apoyando la evidencia al rol adicional propuesto para HO-1, más allá de la degradación del hemo⁶³. HO-1 reprime la actividad del promotor del PSA en presencia de hormona y determinamos que se asocia a promotores génicos adjudicándole un rol como co-regulador de la transcripción⁶³. Nuestros hallazgos permitieron por primera vez revelar que el supresor tumoral BRCA1, con la cooperación de Nrf2, se une al promotor de HO-1 e induce su expresión en líneas celulares de CaP⁶⁴. En 2013, demostramos que HO-1 participa en la metástasis ósea del CaP, restaurando la proliferación de osteoblastos inhibida por las células tumorales prostáticas⁶⁵. Comprobamos además que HO-1 es capaz de: modular vías de señalización relevantes para la metástasis ósea, como la de FoxO/ β -catenina y promover la remodelación ósea cuando las células tumorales son transplantadas en el fémur de ratones SCID⁶⁵.

Más recientemente, reportamos que la enzima modula las adhesiones celulares en CaP, por aumento de la expresión de E-caderina y β -catenina y su posterior relocalización a la membrana plasmática, favoreciendo un fenotipo más epitelial⁶⁶. También, reportamos que la inducción de HO-1 altera la expresión de distintos genes del citoesqueleto y se asocia a factores claves que inducen la remodelación de los filamentos de actina en los filopodios, aumentando la adhesión y disminuyendo la invasividad de las células de CaP⁶⁷.

Sin embargo, el rol de HO-1 en el CaP es controversial y distintos grupos han reportado resultados contrarios a los nuestros⁶⁸. En 1996, Maines y Abrahamsson evaluaron la expresión de HO-1 en muestras de pacientes sanos o con diversas patologías prostáticas. Ellos observaron que los niveles de HO-1 se encuentran aumentados tanto en muestras de pacientes con hiperplasia prostática benigna como en aquellos con CaP y lo asociaron con un rol positivo para la progresión de la enfermedad, a pesar de que trabajaron con un número muy limitado de muestras⁶⁹. Posteriormente, Alaoui-Jamali *et al.* mediante análisis inmunohistoquímico de un microarray de tejido de pacientes con CaP localizado y distintas etapas de la enfermedad revelaron un aumento significativo de HO-1 en las células cancerosas epiteliales, pero no así en las células estromales de CRPC comparado con CaP dependiente de hormonas y tejido benigno⁷⁰. Al estudiar los niveles de HO-1 en plasma de pacientes libres de enfermedad (n=26) o con patologías prostáticas (n=22 con patologías benignas; n=30 con CaP), también se observó

una correlación positiva entre los niveles de HO-1, VEGF, PSA y estadios más avanzados de la enfermedad⁷¹. Además, a través de un estudio clínico se comprobó que existía una diferencia significativa en la expresión de HO-1 epitelial entre la hiperplasia benigna, el PIN, el CaP localizado y el CRPC. La mayor expresión de HO-1 se detectó en CRPC y en segundo lugar se encontraban los casos de patologías benignas. Este trabajo provee datos experimentales de una asociación entre la expresión de HO-1 y las deleciones de PTEN, que se asoció con un pronóstico clínico adverso⁷².

3. El receptor de glucocorticoides.

3.1. Los glucocorticoides.

Los glucocorticoides (GC) son las principales hormonas mediadoras de la respuesta a estrés y del ritmo circadiano y su producción está regulada por el eje HPA (hipotálamo-pituitaria-adrenal). Frente a determinados estímulos, las neuronas neuroendócrinas del hipotálamo liberan CRH (factor liberador de corticotrofina). Esta hormona actúa sobre la glándula pituitaria induciendo liberación de ACTH (hormona corticotrofina), la cual es transportada hasta la glándula adrenal donde estimula la secreción de los GC naturales: cortisol (en humanos) y corticosterona (en roedores) (**Figura 11**). El eje HPA es regulado por *feedback* negativo⁷³. La principal función de los GC está ligada al metabolismo de la glucosa y su rápida movilización frente a la respuesta a estrés o al inicio del día (pico máximo de cortisol). Sin embargo, también actúan en la modulación de la respuesta inmune, como antiinflamatorios e inmunosupresores, en la embriogénesis y en la apoptosis⁷⁴.

Los GC endógenos están predominantemente unidos a la globulina transcortina, permitiendo así su transporte por el torrente sanguíneo. Los GC son luego liberados en el sitio de acción necesario. Una vez dentro de las células, la biodisponibilidad de los mismos depende de la acción opuesta de las enzimas 11 β -HSD 1 y 2 (hidroesteroide deshidrogenasa), que convierten a la hormona de su forma inactiva a la activa y viceversa⁷³.

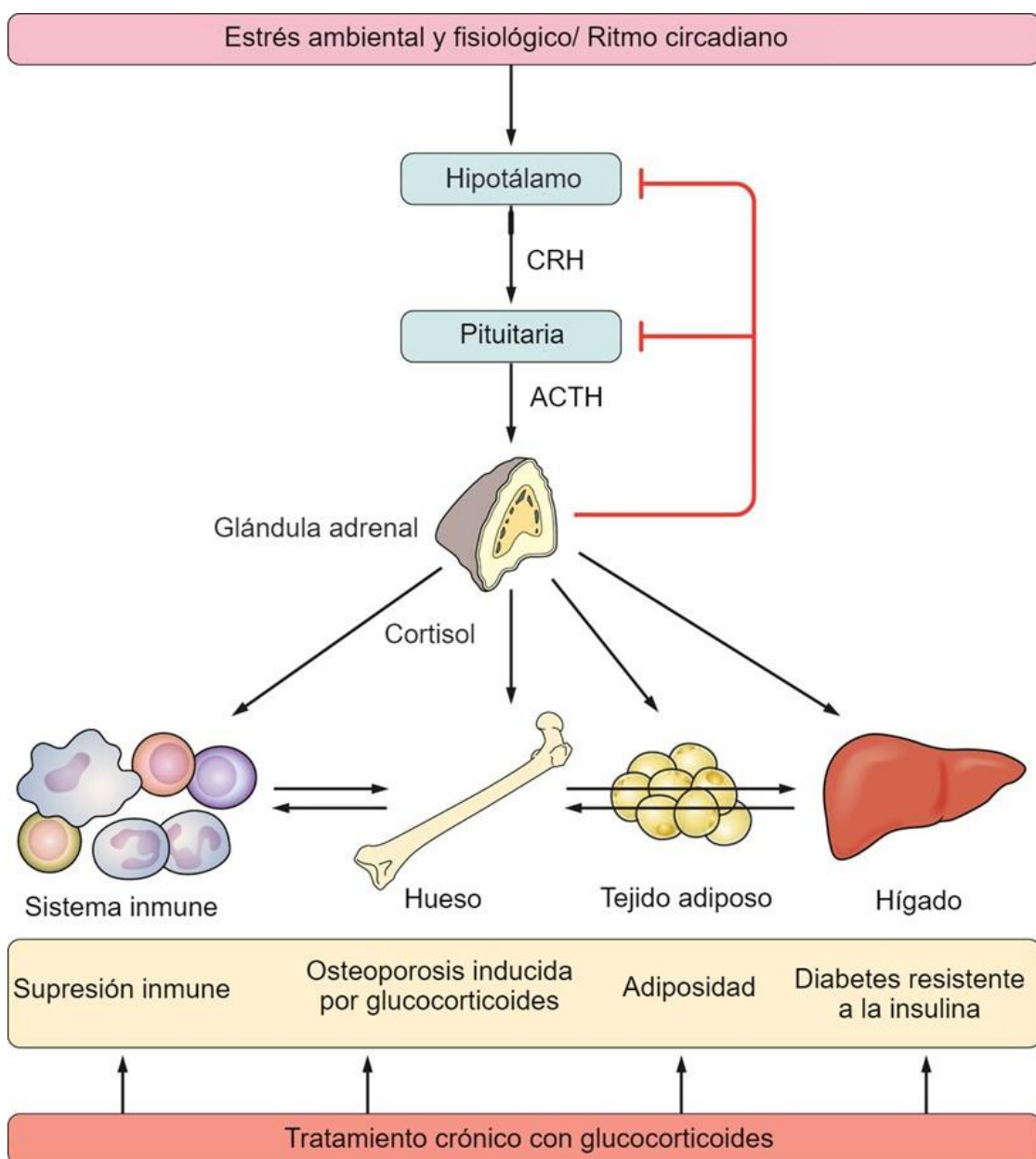


Figura 11: Activación del eje HPA, liberación y efectos sistémicos de GC. Adaptación⁷³.

3.2. Expresión, localización y función del receptor de glucocorticoides.

Los GC regulan diferentes efectos fisiológicos en prácticamente cada órgano del cuerpo. Su efecto es mediado por el receptor de glucocorticoides (GR) que pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares esteroideos, tiroideos y retinoicos. El GR existe en dos isoformas: GR α y GR β , ambas producto del gen *NR3C1*, que consta de 9 exones. La expresión de una u otra isoforma depende del splicing alternativo del exón 9. Por lo tanto, los primeros 727 aminoácidos desde el N-terminal son idénticos, pero luego GR α tiene 50 aminoácidos no homólogos a los 15 restantes de GR β . Aunque estos dos receptores son los más conocidos de la familia, también

existen otras variantes producto del splicing en otros sitios del gen (GR-A, GR-P y GR γ). A su vez, GR α y GR β presentan múltiples sitios de inicio de la traducción. Si bien existe un set de genes regulado por todas las isoformas, cada uno de los receptores muestra distintos patrones de actividad transcripcional⁷⁵ (**Figura 12**). GR α se expresa ubicuamente en todos los tejidos humanos y funciona como un factor de transcripción dependiente de ligando, mientras que GR β , también se expresa en casi todo el organismo aunque en menores niveles, no une GC y ejerce una función como dominante negativo sobre la transcripción génica de GR α ⁷⁴. GR además cumple funciones no genómicas que no requieren la unión de la hormona y es mediada por receptores transmembrana⁷⁶.

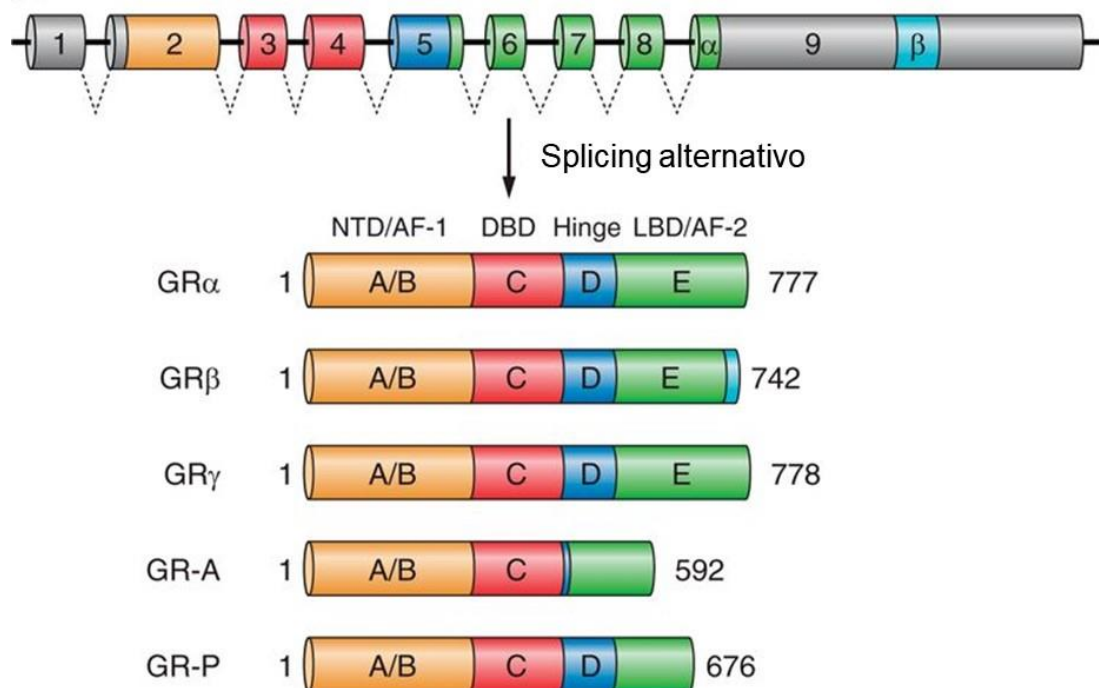


Figura 12: Dominios estructurales de las variantes de splicing de GR. Adaptación⁷³.

GR está compuesto por cuatro dominios diferentes. Comenzando por el extremo N-terminal se encuentra el dominio de transactivación (AF-1), reconocido por remodeladores de la cromatina, polimerasas de ARN y la maquinaria de transcripción. A continuación el dominio de unión al ADN (DBD), que contiene dos motivos de dedos de zinc que reconoce y se une a motivos específicos del ADN (GRE: elementos de respuestas a glucocorticoides) en regiones promotoras. Además, el DBD contiene un dominio de dimerización. A continuación en la estructura de la proteína se encuentra la región bisagra que tiene como principal función permitir la translocación nuclear de este receptor. Por último, el dominio de unión al ligando (LBD) que une GC tanto naturales, como cortisol y corticosterona, o sintéticos, como Dexametasona o prednisolona (**Figura 12**). La

estructura cristalina del GR humano mostró que el LBD contiene hélices α y hojas β que forman un bolsillo hidrofóbico al cual se une el ligando, y luego de esta unión, las hélices cambian de posición cerrando el bolsillo y exponiendo una superficie que favorece la unión de coactivadores⁷⁴.

En ausencia del ligando, GR α se encuentra como monómero en el citoplasma, formando un heterocomplejo con las chaperonas Hsp90, Hsp70 y FKBP51, entre otras, que estabilizan al receptor y favorecen su correcto plegado. La unión del ligando induce cambios conformacionales, desplazando el equilibrio hacia los complejos que contienen FKBP52 en vez de FKBP51 y la formación de dímeros^{77,78} (**Figura 13**). Se postulan al menos dos mecanismos que podrían regular la entrada de GR activo al núcleo: uno dependiente de Hsp90 y los microtúbulos y otro independiente de esta chaperona. La interacción de GR α con los sitios GRE es dinámica y ocurre en segundos o pocos minutos⁷⁹.

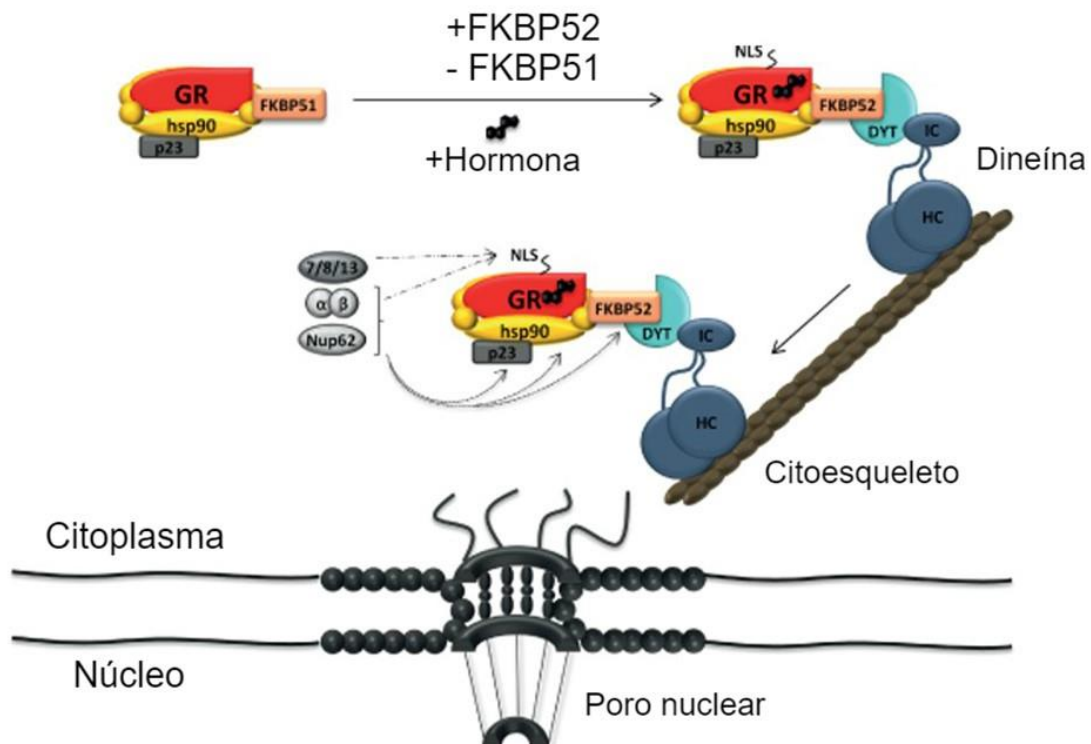


Figura 13: Mecanismo de activación y posterior translocación nuclear de GR. Adaptación⁸⁰.

El receptor unido al ADN puede directa o indirectamente interactuar con la maquinaria de transcripción basal y afectar positiva o negativamente la transcripción dependiendo de la naturaleza de los GRE⁷⁵. Los efectos en *cis* implican una interacción directa del complejo GR/ligando con los GRE en los promotores. Un ejemplo de transactivación en *cis* es la del gen I κ B, cuyo promotor contiene GRE⁸¹, mientras que FasL es un ejemplo de tranrepresión en *cis*

sobre elementos nGRE (elementos negativos)⁸². Además, el GR activo puede interactuar como dímero o como monómero con otros factores de transcripción y favorecer o inhibir su función. Uno de los casos clásicos de transrepresión es el de NFκB, ya que GR activo se une a p65, reduciendo la unión de este factor a los elementos κB e inhibiendo la transcripción de los genes blanco de esa vía⁸³ (**Figura 14**).

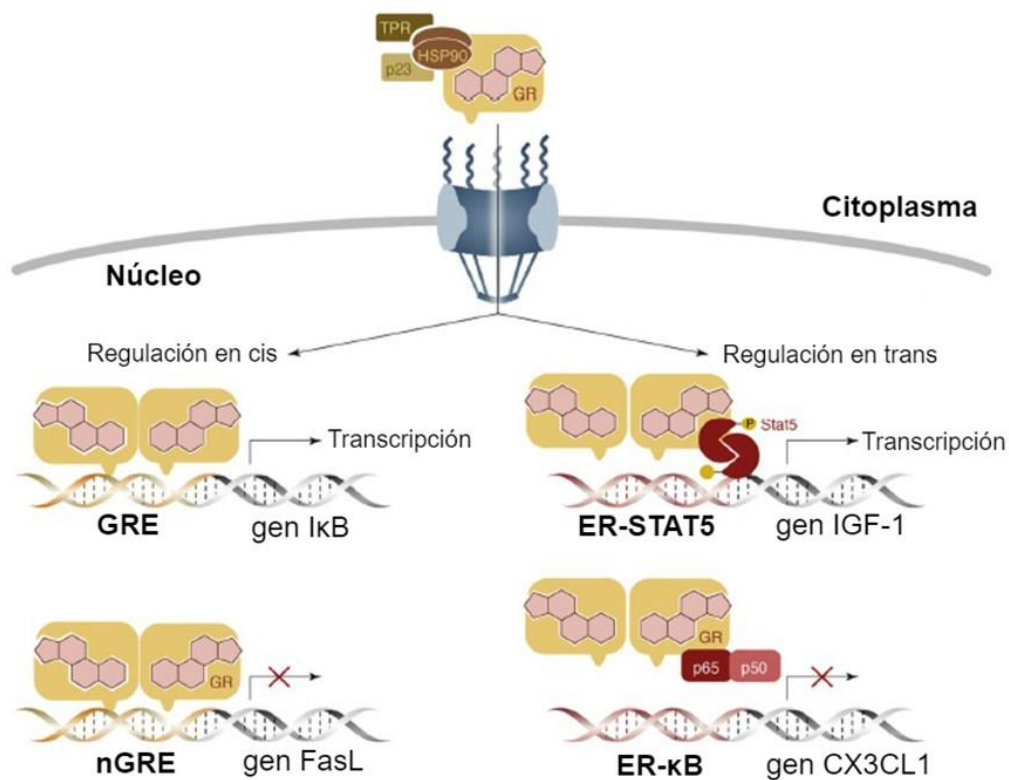


Figura 14: Regulación transcripcional de GR. Adaptación⁸⁴.

Se demostró que GR puede regular su propia expresión y que esta auto-regulación es tejido específica. En la mayoría de los casos, la vía de los GC se retroalimenta negativamente a nivel génico, inhibiendo la expresión de GR⁸⁵, y a nivel proteico por ubiquitinación y degradación del receptor⁸⁶. Además, los GC aumentan la transcripción de FKBP51, desplazando nuevamente el equilibrio hacia los complejos menos activos⁷⁸. Esta regulación negativa permite atenuar la respuesta a los esteroides. Sin embargo, se observó que en algunos tejidos los GC aumentan los niveles de ARNm de GR, que implica una amplificación de la señal promoviendo la diferenciación o la apoptosis⁸⁷.

3.3. El receptor de glucocorticoides en el cáncer de próstata.

Las terapias más comunes en el CaP localizado se basan en el bloqueo de la síntesis de andrógenos o de la señalización de AR, terapia conocida como castración. Actualmente, también se utiliza terapia conjunta con GC (prednisona, hidrocortisona o Dexametasona) debido al conocido *feedback* negativo de estos esteroides sobre el eje HPA, y la consecuente inhibición de la síntesis de andrógenos sobre la glándula adrenal y los testículos⁸⁸. Además, los GC son comúnmente prescritos en CRPC para paliar el dolor, como antieméticos y antiinflamatorios, porque estimulan el apetito y reducen la fatiga en pacientes que reciben quimio o radioterapia⁸⁹.

En cultivos celulares de LNCaP, una línea celular de CaP que no expresa GR, el grupo de Budunova demostró que al reconstituir la expresión del receptor y tratar los cultivos con GC se inhibió la proliferación de las células crecidas en monocapa y se bloqueó el crecimiento independiente de anclaje. Además, estos autores postulan que el tratamiento de pacientes en etapas tempranas de CaP, cuando las células aún expresan GR, puede resultar en una inhibición del crecimiento tumoral y proponen a GR como un supresor tumoral⁹⁰. Yano *et al.* reportan que al tratar xenotransplantes de la línea celular DU145 con Dexametasona, bajan los niveles de VEGF-C y de IL-8 con una consecuente reducción del crecimiento vascular, disminución de la densidad de los vasos y del crecimiento tumoral⁹¹.

Sin embargo, el efecto de los GC en el CaP es controversial⁸⁴. Uno de los motivos que hace pensar que las terapias con GC podrían promover el crecimiento tumoral es la similitud estructural de AR y GR, sus ligandos y la similitud de secuencia de sus elementos de respuesta. Se reportó que estos receptores pueden formar heterodímeros y de esta forma inhibirse la función transcripcional de ambos⁹². Además, dada la similitud en las secuencias consenso, GR puede sustituir a AR y activar un set similar de genes, entre ellos PSA, dependiendo del contexto celular y la expresión de cofactores, y de esta manera favorecer el crecimiento tumoral⁹³. Recientemente se demostró que GR juega un rol fundamental en la resistencia a la terapia con enzalutamide (ENZ, antagonista de AR)⁹⁴. Al estudiar específicamente las células resistentes a la terapia, se observó un aumento significativo en el nivel de expresión de GR comparado a las células parentales. Cuando se silenció la expresión del receptor, se revirtió parcialmente dicha resistencia a la terapia (**Figura 15**).

Por otro lado, los tratamientos a largo plazo con GC tienen efectos dañinos sobre el esqueleto y llevan a la rápida pérdida de hueso, atrofia muscular y aumento de las fracturas por osteoporosis⁹⁶. Dado que el tratamiento hormonal para la castración también causa osteoporosis y fatiga muscular⁹⁷, la combinación de esta terapia con GC puede resultar en un

fuerte agravio para el tejido óseo, teniendo en cuenta que la mayoría de las metástasis del CaP ocurren en dicho tejido. Recientemente, un estudio de fase 2 comparó el efecto de dos GC sintéticos, prednisolona (comúnmente utilizado en pacientes como tratamiento hormonal secundario) y Dexametasona sobre pacientes con CRPC *naive* de quimioterapia⁹⁸. Los autores demostraron que el tratamiento con Dexametasona mejora la respuesta en cuanto al retardo y disminución del valor de PSA, respecto de los pacientes tratados con prednisolona. En base a estos antecedentes se recomendó el uso diario de Dexametasona como monoterapia con corticoides para CRPC⁹⁹.

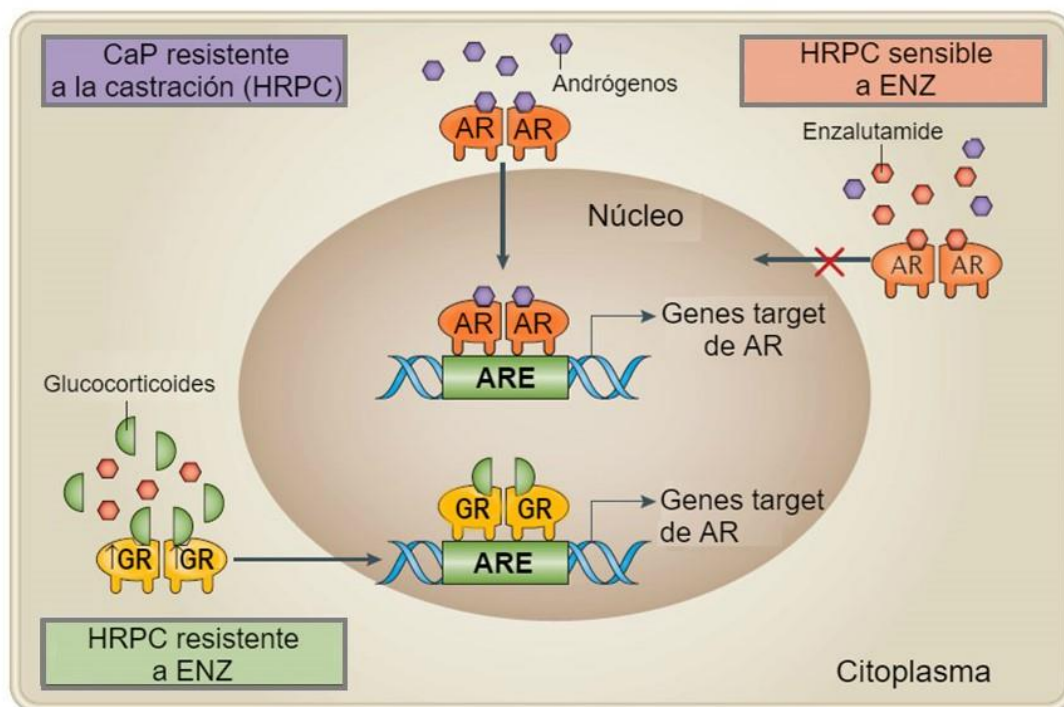


Figura 15: Rol de GR en la terapia con ENZ. Adaptación⁹⁵.

3.4. El receptor de glucocorticoides y hemo oxigenasa 1.

Dada la importancia de GR y HO-1 en la respuesta frente a la inflamación y el estrés, varios grupos han intentado dilucidar si existe una relación entre estas dos proteínas o sus vías de señalización. En 1992, Lutton *et al.* presentaron un trabajo donde estudiaban la expresión de HO-1 frente a varios estímulos en una línea celular de hepatocarcinoma¹⁰⁰. Observaron que, aunque los niveles de HO-1 se inducían por varios estímulos, entre ellos Hemina, LPS y protoporfirinas, al tratar a las células con Dexametasona los niveles de HO-1 disminuían notablemente. En publicaciones posteriores se reportó que el promotor proximal del gen humano de HO-1, posee elementos de respuesta a AP1, IL6, NFκB y AP2¹⁰¹⁻¹⁰³. Además, se

observó que Dexametasona previene la inducción de HO-1 mediada por IL-1¹⁰⁴ e IL-6¹⁰⁵, pero no la inducción mediada por Hemina¹⁰⁶. En 1996, utilizando ensayos reporteros de CAT, Lavrovsky *et al.* demostraron la presencia de sitios GRE entre las bases -180 y -120 del promotor de HO-1¹⁰⁵. Sin embargo, al estudiar el proteoma de células monocíticas cultivadas con Dexametasona y con hemoglobina, se observó un cambio hacia un fenotipo con aumentada endocitosis y procesado de hemo con un aumento considerable en la expresión de HO-1¹⁰⁷. Además, Duzgun *et al.* demostraron que los niveles de HO-1 aumentan significativamente, al igual que otras proteínas del sistema UPR (*unfolded protein response*), al tratar células de carcinoma de laringe con Dexametasona¹⁰⁸. Estos autores sugieren que es el estrés oxidativo causado por Dexametasona lo que favorece el incremento en la expresión de HO-1.

GR es un factor de transcripción inducido por ligando que está involucrado en la regulación del suministro de energía según las necesidades metabólicas de las células con el objetivo de combatir diversos estresores. En 2005, Ki *et al.* proponen un posible mecanismo para explicar la supresión de la vía de Nrf2 por GR¹⁰⁹. GR activo y unido a los GRE en la zona promotora de un gen blanco, lleva al reclutamiento de otros factores de transcripción como puede ser de SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*). Ki *et al.* observaron la formación de complejos formados por GR activo/SMRT/Nrf2 y, el posterior reclutamiento de histonas deacetilasas, sobre la zona promotora de genes regulados por Nrf2 y una disminución en la expresión de estos genes (GSTA2, HO-1, NQO1 entre otros)¹⁰⁹. En concordancia con estos resultados, en 2012 otros autores reportaron que el tratamiento con GC de líneas celulares hepáticas suprime la capacidad antioxidante de las mismas, debido a la regulación negativa sobre la actividad de Nrf2 y la consecuente disminución de expresión de sus genes blanco¹¹⁰, entre ellos HO-1. En base a los antecedentes descritos, podemos concluir que la regulación de HO-1 por GR sigue siendo controversial.

Hipótesis y Objetivos

>> Hipótesis

En base a los antecedentes descriptos, considerando el uso extensivo de los GC como terapia paliativa en las etapas avanzadas del CaP y el rol antiinflamatorio de HO-1 en esta enfermedad, el presente trabajo de tesis propone que la inducción farmacológica de HO-1 modularía la vía de GR *in vitro* e *in vivo* en el desarrollo del CaP.

>> Objetivo general

Estudiar el efecto de la vía de GR y su modulación por HO-1 e identificar los procesos celulares alterados que median la progresión del cáncer de próstata.

>> Objetivos específicos

- 1) Investigar el efecto de los glucocorticoides (GC) sobre la expresión, la funcionalidad y la localización del receptor de glucocorticoides (GR) en líneas humanas de cáncer de próstata (CaP) bajo inducción farmacológica de hemo oxigenasa 1 (HO-1).
- 2) Determinar el impacto de la modulación de las vías de HO-1 y GR sobre tumores derivados de líneas de CaP creciendo como xenotransplantes en ratones inmunosuprimidos.
- 3) Investigar la relación entre GR y HO-1 en la interacción entre las células de CaP y los osteoblastos (OSB), utilizando un sistema de co-cultivo donde ambos tipos celulares comparten factores solubles pero no se encuentran en contacto físico directo.
- 4) Investigar, mediante técnicas bioinformáticas, la relevancia de las vías de GR y HO-1 en el CaP en humanos.

Materiales y Métodos

1. Cultivo de células.

1.1. Líneas celulares utilizadas.

- PC3 (ATCC® CRL-1435™): Línea celular establecida de una metástasis ósea que proviene de un adenocarcinoma de próstata humano¹¹¹. Es insensible a andrógenos y no expresa AR o PSA. Su perfil de crecimiento en hueso es osteolítico. El nivel de expresión de HO-1 endógeno es bajo⁶⁰.
- C4-2B: línea derivada de metástasis ósea al inocular células LNCaP en ratones nude¹¹². Expresan AR y PSA, pero son sensibles a andrógenos, pero independientes de los mismos para crecer. Los niveles basales de HO-1 son similares a los de la línea PC3⁶⁷.
- MC3T3 (ATCC® CRL-2593™): línea de preosteoblastos murina derivada de calvaria de ratón C57BL/6¹¹³.

1.2. Condiciones de crecimiento.

Las células PC3 y C4-2B se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, USA) suplementado con L-glutamina, bicarbonato de sodio 0,2%, suero fetal bovino 10% (SFB) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml).

La línea MC3T3 se cultivó en *Alpha Minimum Essential Medium* (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, USA) con L-glutamina, bicarbonato de sodio 0,2%, SFB 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml).

Todos los cultivos se realizaron en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

1.3. Mantenimiento de las células.

Las líneas celulares se crecieron en placas de 100 mm de diámetro con 7 ml de medio de cultivo. Cuando los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia se repicaron realizando un lavado con 3 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 (líneas PC3, LNCaP y C42B) o tripsina- EDTA 0,25% (línea MC3T3) durante 1-3 minutos 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, se resuspendieron en medio fresco 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 con 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 transferidas a nitrógeno líquido.

2. Tratamiento con Hemina.

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

Solución stock: Se preparó una solución madre 55 mM de Hemina (Sigma-Aldrich, USA) en NaOH 0,5N: Tris-HCl 1M (pH 8): PBS 40:50:10. A continuación se esterilizó mediante filtrado con filtro de 0,22 µm, se alicuotó y se conservó a -20°C. 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.

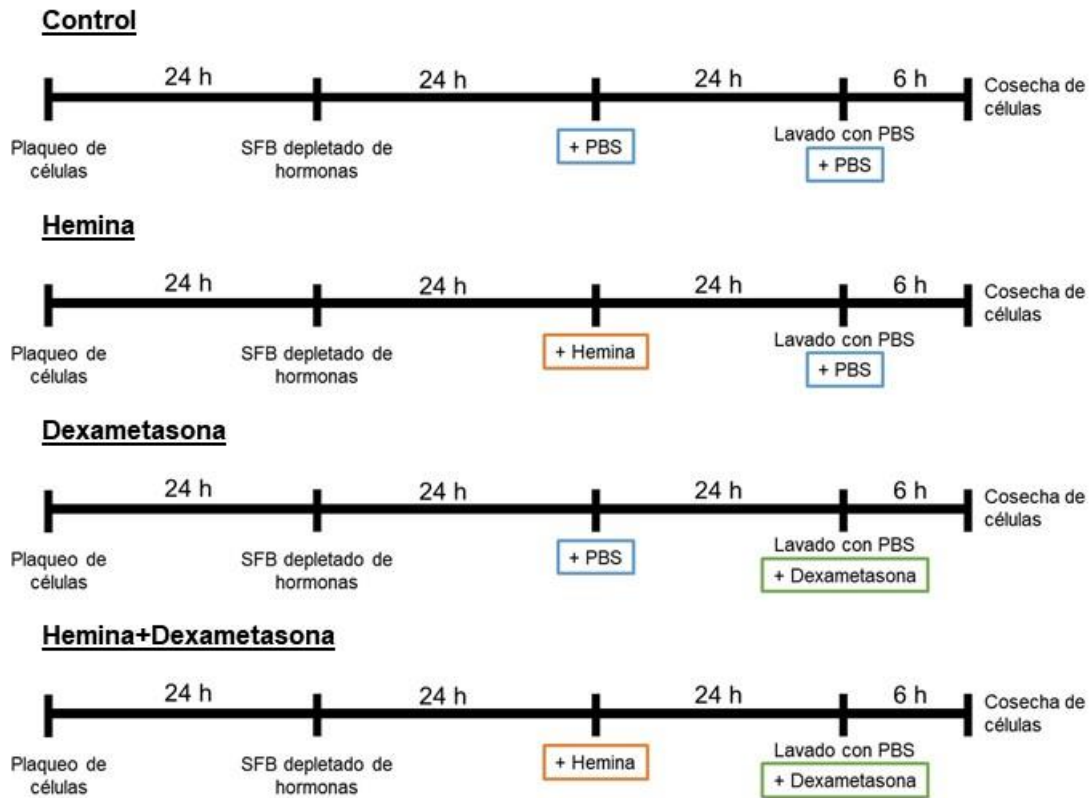
Tratamiento: Se removió el medio de cultivo de las células y se les adicionó el medio completo conteniendo Hemina en una concentración final de 80 µM, durante 24 h (**Figura 16**).

3. Tratamiento con Dexametasona.

Solución stock: Se preparó una solución madre 5×10^{-2} M de Dexametasona (Sigma-Aldrich, USA) en DMSO y se guardó a -80°C. A partir de ésta se preparó la solución stock 1×10^{-4} M en DMSO y se conservó a -20°C.

Tratamiento: se removió el medio de cultivo de las células y se les adicionó medio completo con 10% SFB, depletado de hormonas y adicionado con Dexametasona en una concentración de 1×10^{-8} M. Las células se incubaron durante 6 horas (**Figura 16**).

A) Tratamiento secuencial



B) Tratamiento simultáneo

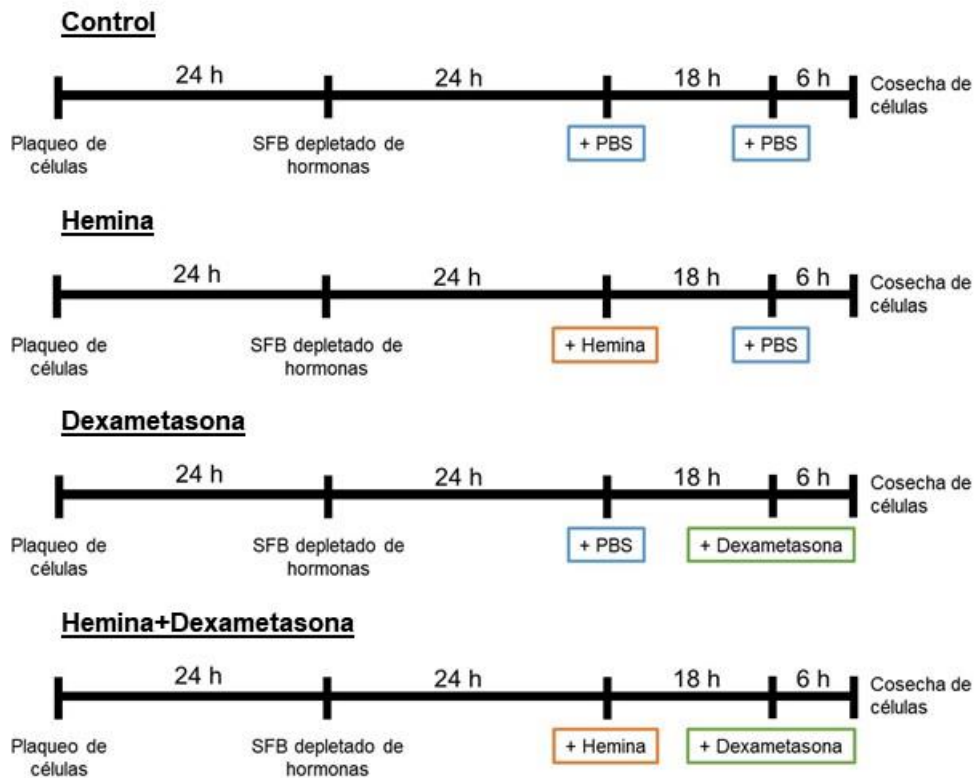


Figura 16: Diagrama del tratamiento con Hemina y Dexametasona.

4. Depleción de hormonas del SFB.

Brevemente, se trató el SFB con carbón dextrano para depletarlo de hormonas como se describió anteriormente¹¹⁴. 5 ml de una solución de carbón dextrano 10X (1,25 g de carbón activado, Merck, Alemania; 0,125 g de dextrano, GE Healthcare, Reino Unido; 0,01 M Tris en 50 ml, pH=7,4) se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min (Sorvall SS-34). Se descartó el sobrenadante y el pellet se diluyó en 50 ml de SFB. La mezcla se incubó 30 min a 56°C y posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se mezcló nuevamente con otro pellet de una solución carbón dextrano 10X y se repitió el procedimiento anterior. Finalmente el sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 µm y luego se esterilizó utilizando un filtro de 0,22 µm. Se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización.

5. Co-cultivo de osteoblastos con células PC3.

En el inicio del experimento (día 1) se sembraron 100.000 células PC3 en insertos para placas de seis pocillos (#353090, Becton Dickinson, USA) los cuales poseen en su base poros de 0,4 µm en una densidad $2,0 \pm 0,2 \times 10^6 / \text{cm}^2$, permitiendo el paso de pequeñas moléculas pero no de células. Al día siguiente (día 2) se trató a estas células con Hemina en una concentración final de 50 µM durante 24 h (hasta el día 3), para inducir la expresión y actividad de HO-1 en las células tumorales, o en condiciones control (sin agregado de Hemina). En el día 2 también se sembraron en otras placas de 6 pocillos las células MC3T3 (100.000 células/pocillo). En el día 3 se removió el medio de cultivo de las MC3T3 y se agregaron 2 ml de medio α MEM 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 las MC3T3 y se les agregó 2 ml de medio α MEM 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 MC3T3 creciendo solas (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 4 se cosecharon las células para realizar distintos ensayos sobre las células tumorales y sobre los progenitores óseos (**Figura 17**).

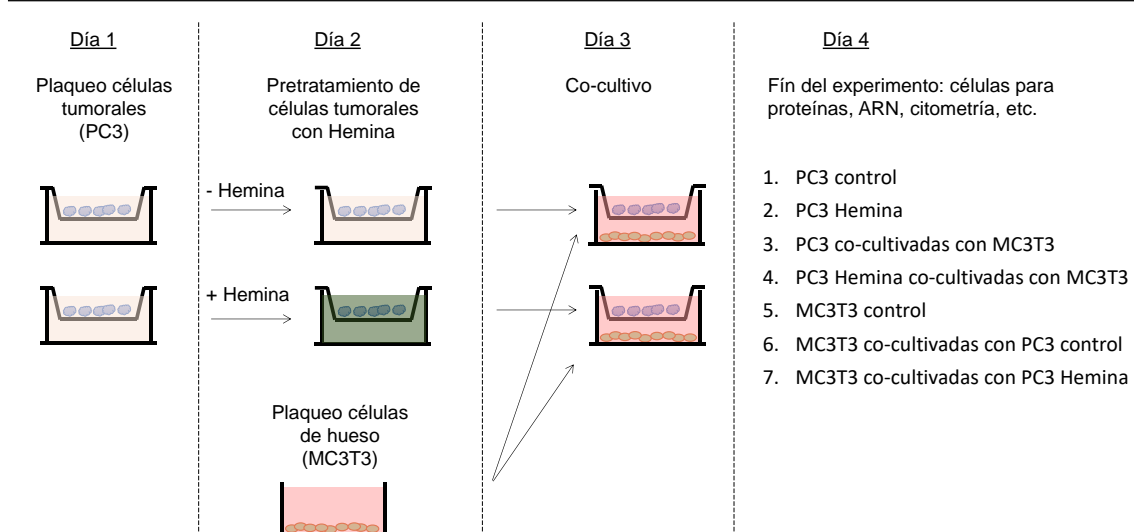


Figura 17: Diseño experimental del co-cultivo.

Esquema de los pasos realizados desde el día 1, cuando se plaquean las células PC3, hasta el día 4, que se cosechan las células.

6. Análisis de la expresión génica a nivel transcripcional.

6.1. Purificación del ARN total.

Para la purificación de ARN total se utilizó el reactivo Quick-Zol (Kalium technologies, Argentina) como lo detalla el fabricante con algunas modificaciones. Las células se crecieron en placas de Petri de 100 mm o 60 mm y se realizaron los tratamientos correspondientes de acuerdo a cada experimento. Al momento de cosechar las células se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con 4 ml de PBS. Luego, se recolectaron las células utilizando una espátula y 500 μ l de Quick-Zol; la suspensión celular se homogeneizó completamente por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se añadieron 100 μ l de cloroformo, se mezcló enérgicamente con vortex durante 15 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Para acelerar la separación de fases se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 15 min. La fase acuosa superior, que contiene el ARN, se transfirió a un nuevo tubo. El ARN se precipitó con 250 μ l de isopropanol por cada 500 μ l de Quick-Zol incubando a -20°C durante 30-40 min. Se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75%. Se centrifugó a 7.500 rpm a 4°C durante 5 min y se removió el sobrenadante. Para eliminar las trazas remanentes de etanol, el pellet se secó a 50°C durante 3 min, se resuspendió en 30 μ l de H₂O libre de RNAsas y se rehidrató incubando 10 min a 55 - 60°C. El ARN total extraído se conservó a -80°C hasta su utilización en reacciones de transcripción reversa.

6.2. Cuantificación del ARN

La concentración del ARN total obtenido se midió mediante absorbancia a 260 y 280 nm utilizando un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Si la concentración del ARN era mayor a 1 µg/µl con una pureza (A260/A280) mayor a 1,7 se procedió a la retro-transcripción para la obtención del ADN copia (ADNc).

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, Thermo Fisher Scientific, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubó 1 - 2 µg de ARN total con Oligo dT y agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 12 µl. Se desnaturalizaron las muestras a 65°C durante 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 1 U/µl y transcriptasa reversa 10 U/µl. Se incubó durante 60 min a 42°C. La reacción se inactivó 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 Pegasus (PBL, Argentina). Se amplificó 1,8 µl de una dilución 1:30 del ADNc obtenido en la RT, en una mezcla de reacción conteniendo el buffer de reacción 1X; MgCl₂ 2 mM; *primers* específicos 0,3 µM (Integrated DNA Technologies Inc., USA); dNTPs 0,2 mM; 1% de SYBR green y Taq DNA polimerasa recombinante 0,03 U/µl en un volumen final de 15 µl.

Los *primers* utilizados se diseñaron con la herramienta web Primer Blast (NCBI, USA), se testearon con el UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). En la **Tabla 1** se encuentran las secuencias de los *primers* específicos para cada gen analizado.

La reacción de PCR se llevó a cabo en el aparato Stratagene MX3000P (Agilent Technologies, USA). El programa de amplificación se detalla a continuación:

- 93°C por 3 min
- 40 ciclos: 93°C 20 seg
- T°annealing 20 seg
- 72°C 20 seg

Lectura de fluorescencia

- Curva de melting: de 65 a 93°C, midiendo fluorescencia cada 0,2°C

Cada reacción de qPCR se realizó por triplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el método¹¹⁵ de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

GEN	PRIMER FW (5'-3')	PRIMER RV (5'-3')	T° annealing
NR3C1	TATCTCGGCTGCGGCGGGAA	AGCGACAGCCAGTGAGGGTGA	60°C
HMOX1	AGCGACAGCCAGTGAGGGTGA	GGGGCAGAATCTTGCACTTT	60°C
IKBA	ACCATGGAAGTGATCCGCCAGG	AGCTCCCAGAAAGTGCCTCAGCAA	60°C
BCLXL	GGTATTGGTGAGTCGGATCG	TTCCACAAAAGTATCCCAGC	65°C
MKI67	GCCAGCACGTCGTGTCTCAAGAT	ACACTGTCTTTTGAGTCATCTGCGG	60°C
IL6	GGTACATCCTCGACGGCATCT	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	60°C
CYPB	CCCATTGCTCGCAGTATCCTAGA	GGCATGGGAGGGAACAAGGAAAAC	60°C
Nr3c1	CAGCAGTGACACCAGGGTAG	CAGTGAAGGACAGCACAAAT	60°C

Tabla 1: Lista de las secuencias de los *primers* empleados para el estudio transcripcional de diferentes genes de interés. En todos los casos se muestra el nombre del gen, las secuencias de cada primer en sentido 5' a 3' y la temperatura de *annealing* para cada reacción.

7. Análisis de la expresión de proteínas.

7.1. Extracción de proteínas.

Luego de los tratamientos, los cultivos celulares se lavaron tres veces con PBS en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa (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 fosfatasa (NaF 0,5 μ M; ortovanadato de sodio 0,8 mM) e inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, USA). 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 hasta su análisis a -80°C.

7.2. Medición de la concentración de proteínas.

Se determinó la concentración proteica usando el método del ácido bicinonínico (BCA; BCA 98% y CuSO₄ 2%; Sigma-Aldrich, USA). Se realizó una curva estándar con un rango de X1-X2 μ g de sero-albúmina bovina (BSA) disuelta en buffer de lisis RIPA. En una placa de 96 pocillos se

sembró 1 µl las diluciones más 200 µl de BCA, y se incubó en oscuridad durante 30 min a 37°C. Se determinó la absorbancia a 560 nm en un lector de placas Glomax Multidetecion System (Promega, USA). La curva de calibración debe mostrar una correlación lineal entre la absorbancia y la concentración de proteínas ($r^2 \geq 0,95$) en el rango de concentraciones analizado para poder determinar con alta certeza la concentración de proteínas en las muestras.

7.3. Western blot.

Una vez determinada la concentración de proteínas de las muestras, éstas se diluyeron con buffer de lisis RIPA a una concentración final de 2 µg/µl y buffer de siembra (Tris-HCl 10 mM pH 8, SDS 1%, Glicerol 4%, Sacarosa 0,146 M, azul de bromofenol y DTT 10 mM ó β- mercaptoetanol 1%). Luego se calentaron durante 5 min a 95°C y una alícuota del lisado que contenía 60 µg de proteínas se resolvió en un gel de poliacrilamida 10%. Los geles se armaron con Tris 0,4 M (pH 8,8); Acrilamida: Bisacrilamida (29: 1) 12%; SDS 0,1%; APS 0,1% y TEMED 0,24% v/v.

Las muestras de proteínas se resolvieron en una cuba de electroforesis (Bio-Rad, USA) en buffer de electroforesis (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%). La corrida se realizó a 80 V hasta que las muestras entraron en el gel concentrador (Tris 0,128 M, pH=6,8; SDS 0,1%; Acrilamida: Bisacrilamida (29: 1) 3,85%; APS 0,1% y TEMED 0,2 % v/v) y luego a 100 V. En la corrida electroforética se incluyó un marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, USA). Luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, 0,45 µM, GE Healthcare, Reino Unido) 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 bloquearon los sitios inespecíficos con leche descremada en polvo 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 40 min. Luego las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron en agitación suave a 4°C durante 16 h con los diferentes anticuerpos primarios específicos diluidos en TBS-T. Se usaron los siguientes anticuerpos: GR monoclonal de conejo (1:1000; cat. #12041, Cell Signaling, USA), HO-1 monoclonal de ratón (1:1000; cat. #13248, Abcam, Reino Unido), β-actina monoclonal de ratón (1:1000; cat. #3700, Cell Signaling, USA), FKBP51 policlonal de ratón (1:500; provisto por el Dr. Mario Galigniana), FKBP52 policlonal de ratón (1:500; UP30, Pharmacia and Upjohn, Inc., USA). Luego, se realizaron 3 lavados durante 10 min con TBS-T y las membranas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios anti conejo (1:5000; cat. #7074, Cell Signaling, USA) o anti ratón (1:5000; cat. #7076S, Cell Signaling, USA) acoplados a peroxidasa HRP, según el anticuerpo primario utilizado, y diluidos en TBS-T. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-T. Para visualizar las

proteínas se utilizó 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 μ l de Tris 1M, pH=6,8) en un volumen final de 20 ml y agregando en el momento de usar 5 μ l de H₂O₂ de 30 volúmenes. La visualización de las bandas se realizó con el analizador de imágenes Phosphoimager (Fuji Photo Film Co., USA). Las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Image J y los resultados se normalizaron a β -actina.

7.4. Co-inmunoprecipitación de proteínas.

Una vez finalizados los tratamientos, las células se lavaron con PBS conteniendo inhibidores de proteasas, se levantaron utilizando una espátula y centrifugaron. El pellet de células se resuspendió en buffer de lisis o IP (20 mM Tris HCl, pH=8; 137 mM NaCl; 10% glicerol; 1% tritón X-100; 2 ml de EDTA 0,5 M; inhibidores de proteasas) y se incubó 20 min en hielo. Luego se sonicó a 10% de amplitud 3 veces por 10 seg, se centrifugó a 12.500 rpm durante 15 min a 4°C y se conservó el sobrenadante. Los extractos fueron cuantificados con BCA como se describió anteriormente. Para realizar el ensayo de inmunoprecipitación se diluyeron 500 μ g de proteínas de los lisados celulares y 8 μ g del anticuerpo específico anti HO-1 en un volumen final de 500 μ l en buffer IP. Como control de especificidad se utilizó un anticuerpo no específico IgG (10 μ g). Todos los tubos se suplementaron con inhibidores de proteasas MPI (Sigma- Aldrich, USA). Las muestras se incubaron 16 h con agitación rotatoria a 4°C. Simultáneamente 250 μ l de esferas de sepharosa (Proteína G-Sepharose, Invitrogen, USA) fueron lavados tres veces con 1 ml de buffer IP y se centrifugaron 3 min a 2.000 rpm. Luego, se resuspendieron en un volumen final de 500 μ l de buffer IP con inhibidores de proteasas. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 1 ml de buffer IP y se centrifugó a 2.000 rpm durante 3 min a 4°C después de cada lavado. Finalmente las esferas de sepharosa se resuspendieron en 4 μ l de buffer de siembra y 16 μ l de buffer de inmunoprecipitación y las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 100°C. Se usaron 50 μ g del lisado proteico como input. Los inmunocomplejos se analizaron por WB. Para todos los experimentos se realizaron tres réplicas independientes.

8. Plásmidos.

8.1. Vectores plasmídicos utilizados.

- MMTV-luc: contiene el LTR del promotor del virus tumoral mamario murino río arriba del gen de la luciferasa (plásmido cedido por la Dra. Adali Pecci).

- NFkB-luc: contiene 5 repeticiones de la secuencia consenso de unión de NFkB río arriba del gen la luciferasa (plásmido cedido por la Dra Mónica Costas).

8.2. Preparación de bacterias competentes.

Se prepararon bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* DH5 α partiendo de un cultivo de 5 ml de medio completo Luria-Bertani (LB / peptona o triptona 1%; extracto de levadura 0,5 % y NaCl 1% pH=7,5), crecido a 37° C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,4 a 0,6 (crecimiento exponencial). Las bacterias fueron centrifugadas a 700 g 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 700 g durante 5 min a 4°C y el pellet se resuspendió en 3 ml de CaCl₂ 50 mM frío y estéril, se conservó en 15% de glicerol a -70°C.

8.3. Transformación de bacterias competentes.

Las bacterias competentes (50 μ l) se transformaron con los plásmidos deseados (1 μ g), incubando durante 30 min en hielo y luego realizando un shock térmico (a 42°C durante 2 min y posteriormente 5 min en hielo) para permeabilizar la pared bacteriana. Se agregaron 450 μ l de LB y se incubó durante 1 h a 37°C. Un alícuota (200 μ l), se rastrilló en una placa con agar LB + antibiótico y se incubó toda la noche en estufa a 37°C. Las colonias aisladas se repicaron en medio líquido LB + antibiótico y a partir de esos cultivos se hicieron stocks en glicerol 15% que fueron conservados a -80°C.

8.4. Purificación del ADN plasmídico.

Tomando las bacterias transformadas con el plásmido de interés, se realizó un cultivo en medio LB líquido con antibiótico crecido por 16 h a 37°C con agitación orbital. Luego se centrifugó a 6.000 g durante 15 min a 4°C. El pellet se resuspendió en buffer de lisis P1 (Tris base 0,606 %; Na₂-EDTA-2H₂O 0,372%, pH=8; 50 μ g/ml de RNasa A). Se agregó buffer P2 (NaOH 0,8%; SDS 20%) durante 5 min para desnaturalizar el ADN y luego buffer P3 (acetato de potasio 29,45%, pH=5,5) frío para renaturalizarlo. Este método se basa en que debido a las diferencias de tamaño del ADN cromosómico y del plasmídico, éste último de menor tamaño, será el único capaz de renaturalizar en las condiciones experimentales. Se procedió a centrifugar a 20.000 g durante 30 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar durante 15 min y luego se precipitó el ADN con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó a 15.000 g durante 30 min a 4°C. El pellet se lavó con etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 15.000 g durante 10 min a 4°C. Se dejó secar y se resuspendió en buffer TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH=8). El plásmido aislado se cuantificó por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm en un Nanodrop.

8.5. Electroforesis en gel de agarosa.

En una cuba de electroforesis horizontal (Bio-Rad, USA) 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 en buffer de siembra (glicerol 50%; EDTA 50 mM pH=8; SDS 10%; orange G 0,2%). También se sembró un marcador de peso molecular de 1Kb (PBL, Argentina). La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 min utilizando una fuente de poder (Bio-Rad, USA). Los plásmidos se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador de luz UV (G:Box, Syngene, Inglaterra).

9. Ensayo de genes reporteros.

9.1. Transfección de células para ensayo de gen reportero.

Las células se crecieron en placas de 12 pocillos hasta una confluencia del 90%. Luego, se preparó la mezcla con 4 µl de PEI (Polietilenimina, Polysciences Inc., USA), 2 µl de plásmido en un volumen de 100 µl de medio RPMI sin antibióticos ni SFB. La mezcla se incubó 8 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS y luego se les agregó 300 µl de medio RPMI (sin antibióticos ni SFB) por pocillo. Finalizada la incubación se agregaron 100 µl de la mezcla PEI/plásmidos gota a gota a cada pocillo y se incubó durante 5 h en estufa a 37°C con atmósfera de CO₂ 5%. Transcurrido ese período, se reemplazó la solución de transfección con medio RPMI 10% SFB fresco.

9.2. Medicion de luciferasa.

Se midió la actividad de luciferasa utilizando el reactivo Steady Glo Luciferase System (Promega, USA) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS, se lisaron por incubación durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad con 40 µl de RPMI sin rojo fenol (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, USA) y 40 µl de reactivo de luciferasa con buffer de lisis. La actividad de luciferasa se determinó en 20 µl de cada lisado en el luminómetro Glomax Multidetecion System (Promega, USA). Los datos se normalizaron con la concentración de proteínas totales realizada por el método colorimétrico de Bradford. Para la normalización de los resultados no se utilizaron métodos que consideren controles internos de transfección, como 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 u hormonas¹¹⁶⁻¹¹⁸. En nuestra experiencia, la mejor manera de normalizar los datos con este tipo de tratamientos es con los valores de proteínas totales, realizando

siempre triplicados de transfección y repitiendo cada experimento por lo menos tres veces de forma independiente.

10. Ensayo de inmunofluorescencia.

Se colocó en los pocillos de placa de 12 wells un cubreobjetos antes de sembrar las células para que las mismas crecieran adheridas a este. Los cultivos se realizaron como fue descrito anteriormente. Una vez finalizado el tratamiento de las células, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y fueron fijados con metanol por 20 min a 4°C. Se realizaron otros 3 lavados y las células se permeabilizaron con tritón 0,2% en PBS por 15 min a temperatura ambiente. El bloqueo se llevó a cabo incubando las muestras con una solución de BSA 1% durante 1 h, a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se colocaron en una cámara húmeda donde se les agregaron los anticuerpos primarios para GR (dilución 1:200, cat. #12041, Cell Signaling, USA) y HO-1 (dilución 1:200; cat. #13248, Abcam, Reino Unido) preparados en la misma solución de bloqueo, y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los controles 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 (Molecular Probe Invitrogen, USA) 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, Japón). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Hamamatsu Orca-ER utilizando el software Andor IQ y procesadas con el software Image J.

11. Análisis de ciclo celular por citometría de flujo.

Para la determinación del porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular por citometría de flujo, se sembraron 5×10^5 células en placas de 100 mm de diámetro. Finalizados los tratamientos, las células se cosecharon por tripsinización. Se resuspendieron en 1,5 ml de PBS y se agregaron 3,5 ml de etanol 70% en pulsos de 700 µl con agitación suave en vortex. Se fijaron durante 2 horas, posteriormente se lavaron con 5 ml de PBS. Se realizó la marcación con yoduro

de propidio resuspendiendo el pellet celular en 1 ml de PBS con 50 µg de ioduro de propidio, 0,2 mg de RNAsa A y 1 µl de Tritón X-100 e incubando 30 min a 37°C. La distribución del ciclo celular se analizó en el citómetro de flujo BD FACS ARIA II (BD Biosciences, USA). Se empleó el programa Cyflogic 1.2.1 software (CyFlo Ltd.) para graficar un histograma de fluorescencia, la cual está correlacionada con la cantidad de ADN; permitiendo determinar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

12. Ensayo de viabilidad celular (MTS).

Para los ensayos de viabilidad celular, se sembraron 1.000 células PC3 o C4-2B por pocillo en una placa de 96 wells y se crecieron en 200 µl de medio de cultivo (RPMI suplementado con antibióticos y SFB 10 %) en estufa a 37°C y CO₂ 5 % durante toda la noche. Luego se realizaron los tratamientos, como se detalla para cada experimento en la sección Resultados. Cada tratamiento se realizó por sextuplicado.

La viabilidad celular se determinó utilizando el reactivo comercial Cell Titer 96 wells Aqueous non Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La solución comercial de MTS (2 ml) se mezcló con la solución comercial PMS (100 µl) y se conservó en alícuotas a - 20°C protegido de la luz.

Al momento de cosechar las células se reemplazó el medio de cultivo de las placas de 96 pocillos con 100 µl de medio de cultivo fresco y se agregaron 20 µl de MTS/PMS por pocillo. Como blanco de reacción se utilizaron 3 pocillos sin células con 100 µl de medio de cultivo. Las placas se incubaron 1-4 h en estufa a 37°C con CO₂ 5 %, en oscuridad y se midió la absorbancia a 490 nm en lector de placas Glomax Multidetecction System (Promega, USA).

La viabilidad celular para cada tratamiento se calculó como el porcentaje de la relación entre el promedio de la absorbancia de los triplicados y el promedio de la absorbancia de los triplicados de las muestras control.

13. *In vivo*: tratamiento de ratones *nu/nu*.

13.1. Inyección subcutánea de células PC3 en ratones *nu/nu*.

36 ratones machos *nu/nu* de seis a ocho semanas de edad y con un peso aproximado de 20-25 g (provistos por la Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio de la Facultad de Ciencias

Veterinarias, UNLP, La Plata, Argentina), se inocularon subcutáneamente (*s.c.*) con $3,6 \times 10^6$ células PC3 en 200 μ l de PBS en el flanco derecho de los animales.

Se supervisó la aparición de tumores palpables y se midió el crecimiento tumoral 3 veces por semana utilizando un calibre. El volumen tumoral se estimó según $(\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$, y los animales fueron sacrificados por dislocación cervical de acuerdo al objetivo de la experiencia, pero siempre antes de alcanzar los 2000 mm^3 , o bien al exhibir úlceras o interferencias con las funciones normales del animal. Se registraron fotográficamente tanto los animales como los tumores. Estos últimos, se montaron en todos los casos sobre una plantilla DispoCut Board White (CellPath, Reino Unido) en el círculo de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro para fotografiarlos.

Los protocolos experimentales llevados a cabo en la presente Tesis fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (protocolo experimental N° 46, CICUAL, FCEN – UBA), a fin de garantizar el uso seguro y ético de animales de laboratorio para tareas de investigación.

13.2. Tratamiento de ratones con Hemina+Dexametasona.

Cuando los tumores en los ratones *nu/nu* alcanzaron un volumen aproximado de 150 mm^3 , se comenzó con los distintos tratamientos. Se aplicaron 6 dosis cada 48 h vía intraperitoneal (*i.p.*) de cada droga según se detalla a continuación:

- Hemina: dosis por ratón: 25 mg/kg disuelta en 0,2 ml de solución fisiológica.
- Dexametasona: dosis por ratón: 0,2 mg/kg disuelta en 0,2 ml de solución fisiológica.
- Hemina+Dexametasona: 25 mg/kg de Hemina + 0,2 mg/kg de Dexametasona en 0,2 ml de solución fisiológica.
- Control: 0,2 ml de solución fisiológica.

Transcurridas 24 h de la última dosis, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores separados en cuartos representativos para extracción de ARN (conservado en Quick Zol), proteínas (buffer RIPA con inhibidores de proteasas) o histología e inmunohistoquímica (IHQ) (PFA 4%). Se observaron ganglios y otros tejidos de los animales para descartar metástasis. Para extraer el ARN total y las proteínas del tumor, las muestras se disgregaron mecánicamente con un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turrax, Sigma- Aldrich, USA). Los lisados celulares se procesaron según fue descrito más arriba.

14. Histología e inmunohistoquímica de los tumores.

Los tumores subcutáneos fueron removidos, fijados inmediatamente en paraformaldehído 4% y procesados para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes seriados de 5 µm de espesor, siendo los primeros coloreados con la técnica de hematoxilina-eosina; los restantes se utilizaron para la realización de otras técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el Dr. Roberto P. Meiss, Jefe de la División Patología Experimental de la Academia Nacional de Medicina.

Para la técnica IHQ se utilizó el sistema del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories, USA). Brevemente, los cortes fueron desparafinados con xileno e hidratados con etanol en concentraciones decrecientes (100% a 50%) hasta llegar al agua destilada. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% v/v durante 10 min. Se realizaron varios lavados con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 2% m/v en PBS durante 20 min. La recuperación de antígenos se llevó a cabo con el sistema de microondas (750W, 3x1 min) en buffer citrato de sodio 10 mM; pH 6. Para estudiar la expresión de GR se incubaron con el anticuerpo para GR (dilución 1:250, cat. #12041, Cell Signaling, USA) y anticuerpo para HO-1 (dilución 1:200, cat. #13248, Abcam, Reino Unido) toda la noche a 4^o C en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron incubando a las muestras con PBS en ausencia del anticuerpo primario. Luego los cortes se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG biotinilado por 30 min y por último con estreptavidina conjugada con peroxidasa por 30 min. La reacción de la peroxidasa con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB, Vector Laboratories, USA) formó un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. Se realizó una leve contra-coloración con hematoxilina Mayer's (Zymed Laboratories) al 10% y finalmente los cortes fueron montados con bálsamo, en forma definitiva, para su posterior análisis.

Los preparados fueron evaluados de forma semi-cuantitativa señalando distintos grados de positividad: (+) leve; (++) moderado o (+++) intenso. La ausencia de la marcación se expresó como (0) (negativo). Los casos se definieron como GR núcleo positivo y HO-1 positivo cuando se detectó inmunorreactividad de estas proteínas en más del (10%) de las células del preparado.

15. Análisis bioinformático.

15.1. Análisis *in silico* de secuencias.

El siguiente análisis se realizó en colaboración con el Dr. Sergio Nemirovsky, del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Haciendo uso de la base de datos Ensembl, se generó un archivo con la secuencia promotora de *HMOX1* (-1000 a +200 pb). A continuación, y utilizando la herramienta FIMO del software MEME SUIT, se buscaron los motivos de unión de GR en esa zona promotora.

15.2. Análisis de muestras tumorales de pacientes.

Se utilizó el repositorio público del *European Bioinformatics Institute (EBI)* perteneciente al *European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Wellcome Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, UK (www.ebi.ac.uk/)*. Mediante la herramienta *ArrayExpress* del *EBI* que almacena datos de experimentos genómicos de gran escala (*high-throughput*), se buscaron experimentos de RNAseq realizados en muestras tumorales de pacientes con cáncer de próstata. Como palabras clave se usó la frase "*prostate cancer*" y se utilizaron los siguientes filtros: "*Homo sapiens*" como organismo, y "*RNA assay*" y "*sequencing assay*" como tipos de experimento. La búsqueda arrojó 106 experimentos distintos que cumplieran con los criterios y filtros aplicados. El filtrado continuó con la selección de los estudios que incluyeran al menos 100 muestras con el objetivo de obtener un buen poder estadístico en los análisis posteriores (n=10). Luego, buscamos aquellos estudios que hayan depositado los datos crudos de los RNAseq en la base de datos (n=3). Finalmente, los 3 experimentos que resultaron de aplicar todos los filtros mencionados anteriormente fueron analizados en detalle poniendo especial atención en: i) tipo de muestra incluida en el estudio (tejido tumoral/normal, sangre periférica); ii) cantidad y calidad de los datos clínicos de los pacientes; iii) inclusión de líneas celulares. Como resultado, un único estudio cumplió con todos los criterios de inclusión y exclusión. Es estudio seleccionado para el trabajo de esta tesis fue el estudio "E-GEOD-54460 - RNAseq Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Prostate Cancer Tissues"¹¹⁹.

Se descargaron también los datos clínico-patológicos de las muestras en formato *.txt*. Las variables clínico-patológicas disponibles fueron: presencia de recaída bioquímica (BCR), meses a BCR, meses de seguimiento, cuantificación de PSA pre-quirúrgico, etnia, estadio T patológico (pT), Gleason, y positividad del margen quirúrgico.

Se realizaron análisis de sobrevida libre de enfermedad (SLE) y sobrevida libre de recaída bioquímica (SLR). Se calculó el tiempo desde el diagnóstico hasta la elevación del PSA sérico

post-prostatectomía radical (PSA >0,02 ng/ml) para SLR y SLE. Además, para la SLE se incluyeron 6 pacientes que no presentaron remisión de la enfermedad (el valor de PSA no disminuye luego de la prostatectomía), para estos pacientes se tomó un tiempo de sobrevida igual a cero (0) meses.

Para realizar los análisis de SLR y SLE se categorizaron los pacientes según la expresión de *NR3C1* y *HMOX1*. Para determinar el punto de corte de expresión para cada gen, se realizaron curvas ROC (Receiver Operating Characteristics). A partir de las curvas, se determinó la expresión génica que resultó en la mejor sensibilidad y especificidad para predecir la recaída. Utilizando este valor de corte de expresión génica, los pacientes se dicotomizaron en pacientes con baja o alta expresión para *NR3C1* y *HMOX1*.

Se usaron curvas de Kaplan-Meier para evaluar la asociación de la expresión génica y la SLE o la SLR. La comparación entre los grupos de baja y alta expresión se realizó con el test de Log-rank. También se utilizó el test de riesgo proporcional de Cox univariado y multivariado para estimar el Hazard Ratio (HR), 95%IC y valor *p*. Se consideró que las diferencias fueron significativas si el valor $p \leq 0,05$. Los análisis se hicieron con el programa Stata v14 (StataCorp, USA).

16. Análisis estadístico.

In vitro: Los datos se presentan como el promedio \pm desvío estándar de al menos tres experimentos independientes, a menos que se indique de otro modo. El *software* GraphPad Prism fue usado para el análisis estadístico de los datos. Pruebas t de Student para muestras no pareadas fueron utilizadas para comparar dos grupos experimentales. Para comparaciones múltiples, se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores.

In vivo: El siguiente análisis estadístico se realizó en colaboración con la Dra. Myriam Nuñez de la Cátedra de Matemática de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Se analizaron 36 ratones de dos experimentos independientes, divididos en 4 grupos: control, Hemina, Dexametasona y Hemina+Dexametasona. A su vez cada grupo está dividido en 2 según el experimento al que se asignó a cada ratón. Se excluyeron de los análisis los ratones que tenían múltiples tumores (n=8), pues esto influye en la medida del volumen tumoral.

Como primer paso se realizó una regresión exponencial sobre los volúmenes tumorales para cada tratamiento y cada experimento, y se calcularon las tasas de crecimiento.

Para analizar las diferencias entre los tratamientos y entre experimentos a lo largo del tiempo se realizó un análisis de la Varianza de tres factores con medidas repetidas en un factor (el tiempo). Los factores considerados fueron: los tratamientos, los experimentos y el tiempo.

Como variable dependiente se utilizó el volumen tumoral. Se aplicó la Prueba de Wilcoxon (no paramétrica) con el objetivo de determinar si existen diferencias en el crecimiento tumoral entre los distintos tratamientos. Se consideró nivel de significancia si $p \leq 0,05$.

Resultados

1. Determinación de las condiciones experimentales.

Los GC se han usado en el tratamiento del CaP para retardar la progresión de la enfermedad y controlar el dolor y los efectos colaterales de la quimioterapia y de la ADT. Sin embargo, estos compuestos tienen el potencial de estimular el crecimiento del CaP vía un AR mutado⁸⁸ o el mismo GR, generando resistencia a la terapia con ENZ⁹⁴.

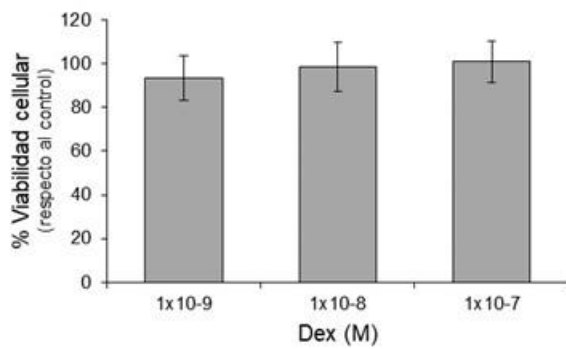
Aunque los GC son una de las pocas opciones para el tratamiento del CRPC, su mecanismo de acción no se conoce claramente. Se cree que la señalización mediada por GR regula la transcripción de varios factores de crecimiento, angiogénicos, apoptóticos y citoquinas, todos asociados a la transición de un crecimiento dependiente a un crecimiento independiente de hormonas⁸⁴.

Reportes previos demostraron que HO-1 tiene actividad anti-tumoral y que, en respuesta a diferentes estímulos, puede translocar hacia el núcleo^{54,55,60}. Por lo tanto, se propone que HO-1 podría actuar como un co-regulador de receptores nucleares y/o modificar el microambiente tumoral mediante la modulación de factores inflamatorios y angiogénicos, generando así un fenotipo tumoral menos agresivo.

Con el objetivo de analizar el efecto de la modulación de la vía de GC/GR y de HO-1 en el CaP, inicialmente se estudió la proliferación celular en las líneas independientes de andrógenos, PC3 (AR-/GR+) y C4-2B (AR+/GR+). El tratamiento con Dexametasona se realizó durante 24 h en medio RPMI con suero depletado de hormonas. Se probaron 3 concentraciones de Dexametasona y se analizó su efecto sobre la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS. Como se observa en la **Figura 18**, las distintas concentraciones de Dexametasona no afectaron la viabilidad de las líneas PC3 y C4-2B.

En base a los antecedentes previamente reportados por otros autores¹²⁰ y debido a que la Dexametasona no afectó la viabilidad celular, se eligió la concentración de Dexametasona 1×10^{-8} M para los ensayos que se realizaron a continuación. Además, se hizo una curva de tiempo en la línea celular PC3 para determinar el efecto de este parámetro sobre el tratamiento hormonal. Posteriormente se analizó la expresión de *NR3C1* y de sus genes blanco a nivel de ARNm por RTqPCR (**Figura 19**) y de GR por WB (**Figura 20**).

A) MTS en PC3



B) MTS en C4-2B

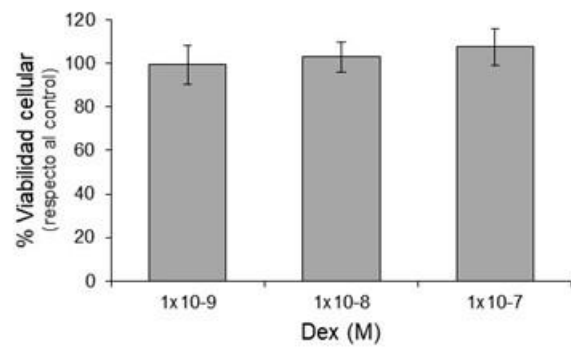


Figura 18: Efecto de la concentración de Dex sobre la viabilidad de las células de CaP.

Se trataron las líneas celulares A) PC3 y B) C4-2B con distintas concentraciones de Dex durante 24 h y se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS. Se calculó el porcentaje de viabilidad considerando como 100% al control en ausencia de Dex. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad en las condiciones analizadas en ninguna de las líneas.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD.

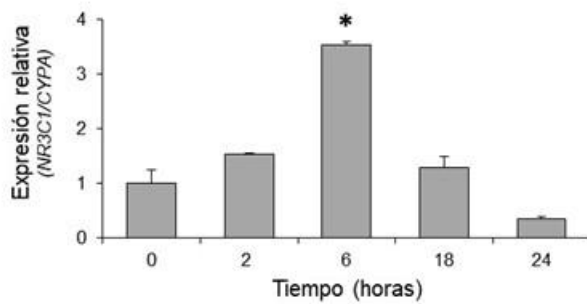
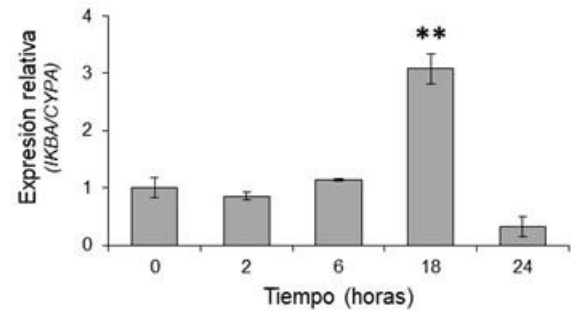
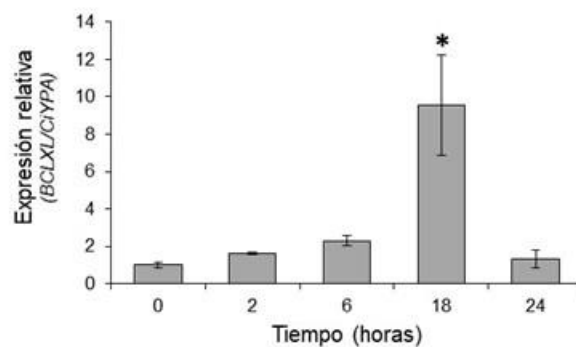
A) RTqPCR *NR3C1*B) RTqPCR *IKBA*C) RTqPCR *BCLXL*

Figura 19: Efecto del tiempo de tratamiento hormonal en la línea celular PC3 sobre la expresión de *NR3C1* y sus genes blanco.

Las células PC3 fueron cultivadas en medio RPMI con suero depletado de hormonas y tratadas con Dex 1x10⁻⁸ M durante distintos tiempos (0, 2, 6, 18 y 24 h). Se extrajo el ARN total y los niveles de ARNm de los genes A) *NR3C1*, B) *IKBA* y C) *BCLXL* se determinaron por RTqPCR. Se utilizó Ciclofilina A (*CYPA*) como gen de referencia. El tratamiento de 6 h con Dex aumentó significativamente la expresión de *NR3C1* y a las 18 h la de sus blancos, respecto a tiempo 0.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD.
* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a tiempo 0.

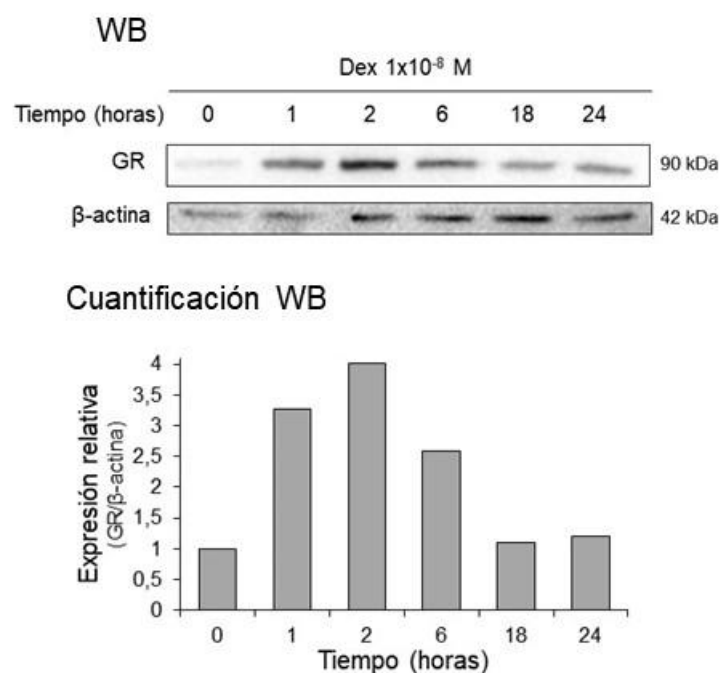


Figura 20: Efecto del tiempo de tratamiento con Dex sobre los niveles proteicos de GR en la línea celular PC3.

Las células PC3 fueron cultivadas en medio RPMI con suero depletado de hormonas y tratadas con Dex 1×10^{-8} M por distintos tiempos (0, 1, 2, 6, 18 y 24 h). Se lisaron las células y se purificaron las proteínas totales. Se analizaron los niveles de GR por WB y se utilizó β -actina como control de carga. La máxima inducción de GR se observó a las 2 h de tratamiento.

Las proteínas se cuantificaron utilizando el *software* ImageJ. Se muestra una figura representativa de dos experimentos independientes con resultados similares.

Al evaluar los niveles del ARNm en la curva de tiempo para el tratamiento con Dexametasona, se observó que la máxima inducción para *NR3C1* se alcanzó a las 6 h, mientras que para sus blancos transcripcionales *IKBA* y *BCLXL*, la máxima inducción se evidenció a las 18 h (**Figura 19**). A nivel de proteínas, el pico de expresión de GR se obtuvo a las 2 h de tratamiento (**Figura 20**).

Continuando con la puesta a punto del sistema, se estudió la actividad transcripcional de GR por inducción con Dexametasona 1×10^{-8} M a lo largo del tiempo. Para ello, las células PC3 fueron transfectadas con el plásmido reportero MMTV-luc que posee sitios de unión para GR río arriba del gen de la luciferasa. Se observó un aumento significativo de la actividad de luciferasa a partir de las 6 h de tratamiento (**Figura 21**) y la inducción se mantuvo hasta las 24 h, demostrando un incremento en la actividad transcripcional del receptor.

MMTV-luc en PC3

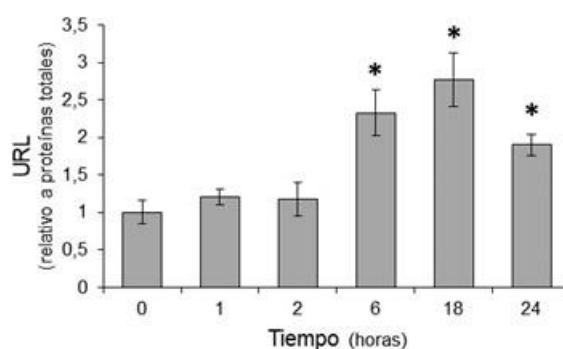


Figura 21: Efecto del tiempo de tratamiento con Dex sobre la actividad transcripcional de GR.

Las células PC3 fueron transfectadas con el plásmido reportero MMTV-luc y posteriormente tratadas con Dex 1×10^{-8} M por distintos tiempos (0, 1, 2, 6, 18 y 24 h). Sobre los lisados celulares se realizó el ensayo de actividad de luciferasa, cuantificado como unidades relativas de luminiscencia (URL) normalizadas a la cantidad de proteínas totales. A partir de las 6 h se indujo significativamente la actividad transcripcional de GR.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD. * $p < 0,05$ respecto a 0 h.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la puesta a punto del sistema, se eligió la siguiente condición para los experimentos subsiguientes: Dexametasona 1×10^{-8} M por 6 h.

2. Ensayos *in vitro*.

2.1. Ensayo de viabilidad en PC3 y C4-2B.

Dados los antecedentes de nuestro laboratorio con el uso de Hemina en la línea celular PC3, las células se cultivaron durante 24 h con Hemina $80 \mu\text{M}$ o PBS^{60,67}. Posteriormente, los cultivos se lavaron y trataron con Dexametasona 1×10^{-8} M o PBS por 6 h adicionales para dar las siguientes condiciones: i) Hemina+Dexametasona, ii) Dexametasona, iii) Hemina, y iv) control (**Figura 16, Materiales y Métodos, página 39**). Se realizaron los tratamientos en células PC3 y C4-2B y, luego se analizó la viabilidad de los cultivos. Se confirmó que la Hemina disminuye significativamente la viabilidad en PC3⁶⁰ (**Figura 22, A**) y también se comprobó este efecto en C4-2B (**Figura 22, B**). Además, esta reducción en la viabilidad celular por efecto de la Hemina ocurrió tanto en presencia como en ausencia de Dexametasona (**Figura 22**). Por otra parte, la Dexametasona no alteró la viabilidad de ninguna de las 2 líneas utilizadas (**Figura 22**).

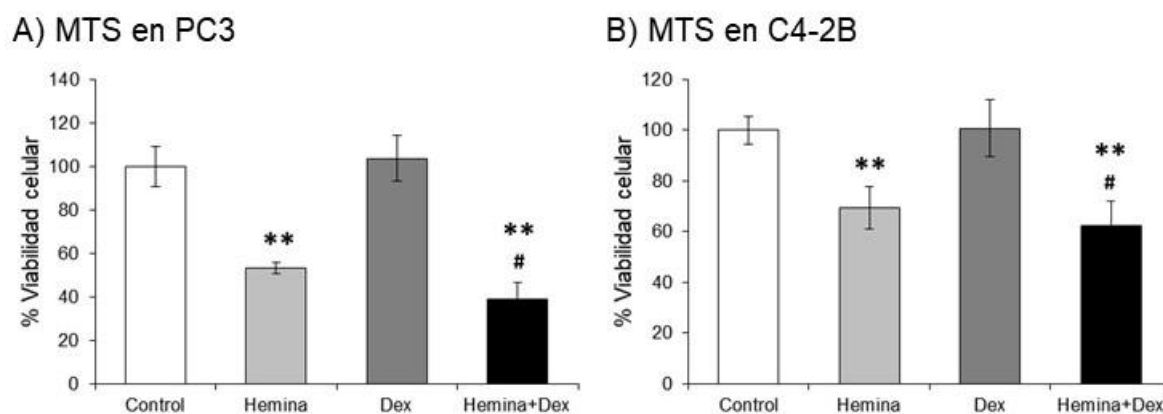


Figura 22: Efecto de Hemina y Dex sobre la viabilidad de células de CaP.

Se trataron las líneas celulares A) PC3 y B) C4-2B con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, y con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Se analizó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTS. Se calculó el porcentaje de viabilidad considerando como 100% a los cultivos control (ausencia de ambas drogas). Se observó que el tratamiento con Hemina y Hemina+Dex disminuye significativamente la viabilidad de ambas líneas.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD.

** $p < 0,01$ respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a Dex.

2.2. Expresión génica de *NR3C1*, *HMOX1* y genes blanco de GR en PC3 y C4-2B.

Con el objetivo de determinar el efecto de los tratamientos con Hemina y Dexametasona en la línea PC3, se analizó por RTqPCR la expresión de *NR3C1*, *HMOX1* y genes que responden a GR (*IKBA*, *BCLXL*, *IL6*). Se observó que los tratamientos con Hemina y Hemina+Dexametasona disminuyeron significativamente la expresión de *NR3C1* (Figura 23, A). A su vez, la presencia de Hemina indujo la expresión de *HMOX1* (Figura 23, B), corroborando resultados anteriores del laboratorio⁶⁰. Al analizar la expresión de los genes blanco de GR, se observó que Dexametasona produjo un aumento significativo de *BCLXL*, mientras que no alteró la expresión de *IKBA* o *IL6* (Figura 23, C-E). Además, los tratamientos con Hemina y Hemina+Dexametasona disminuyeron significativamente los niveles de *IKBA* y *BCLXL* (Figura 23, C y D). En el caso de *IL6*, se observó una menor expresión con Hemina, pero un incremento con Hemina+Dexametasona (Figura 23, E).

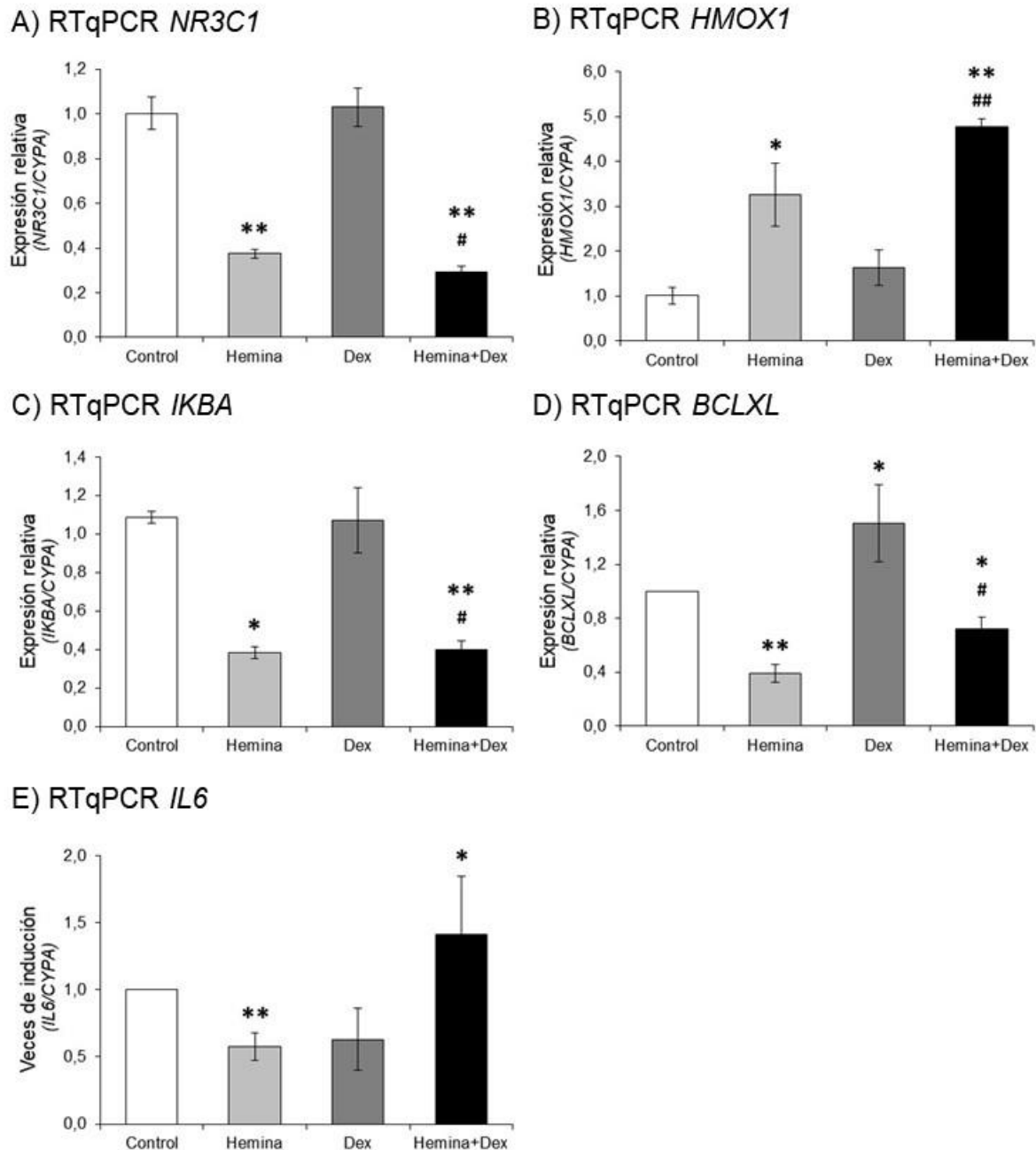


Figura 23: Efecto de los tratamientos con Hemina y/o Dex sobre la expresión génica en células PC3.

Las células PC3 fueron cultivadas en medio RPMI con suero depletado de hormonas con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y tratadas con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Se extrajo el ARN total y los niveles de ARNm de A) *NR3C1*, B) *HMOX1*, C) *IKBA*, D) *BCLXL* y E) *IL6* se determinaron por RTqPCR. Se utilizó Ciclofilina A (*CYPA*) como gen de referencia.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto a Dex.

Se realizaron los mismos experimentos en la línea celular C4-2B. La regulación de la expresión de *NR3C1* y *HMOX1* en C4-2B fue similar a la observada en PC3 (Figura 24, A y B). Cuando se estudiaron los genes blanco transcripcionales de GR, se observó que el tratamiento con

Dexametasona aumentó significativamente la expresión de *IKBA* y *BCLXL*. La presencia de Hemina no alteró la expresión de estos genes (Figura 24, C y D). Además, se comprobó que Hemina fue capaz de inhibir el efecto provocado por Dexametasona cuando se realizó el tratamiento combinado (Figura 24, C y D). No se detectó expresión de *IL6* en ninguna de las condiciones experimentales.

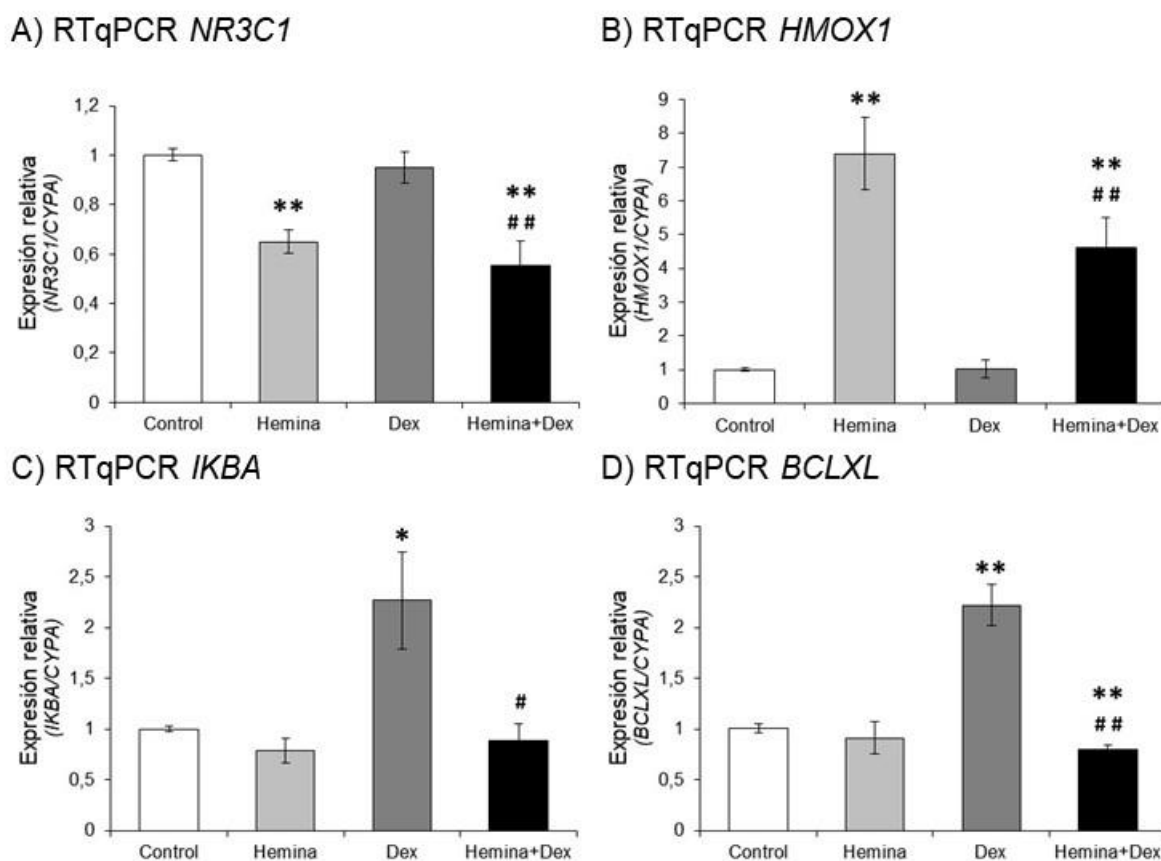


Figura 24: Efecto de los tratamientos con Hemina y/o Dex sobre la expresión génica en células C4-2B.

Las células C4-2B fueron cultivadas en medio RPMI con suero depletado de hormonas con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y tratadas con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Se extrajo el ARN total y los niveles de ARNm de los genes A) *NR3C1*, B) *HMOX1*, C) *IKBA*, y D) *BCLXL* se determinaron por RTqPCR. Se utilizó Ciclofilina A (*CYPA*) como gen de referencia.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto a Dex.

2.3. Expresión proteica de GR y HO-1 en PC3 y C4-2B.

Se evaluó la expresión proteica de GR y HO-1 por WB en las líneas celulares PC3 y C4-2B luego de los tratamientos descritos anteriormente. En ambos tipos celulares se observó que la Dexametasona aumentó al menos 3,5 veces los niveles de GR respecto al control, tanto en presencia como en ausencia de Hemina (Figura 25). Tal como se reportara en resultados previos

del laboratorio, la Hemina incrementó los niveles de HO-1 en PC3 y C4-2B, sin modificar la expresión de GR (Figura 25).

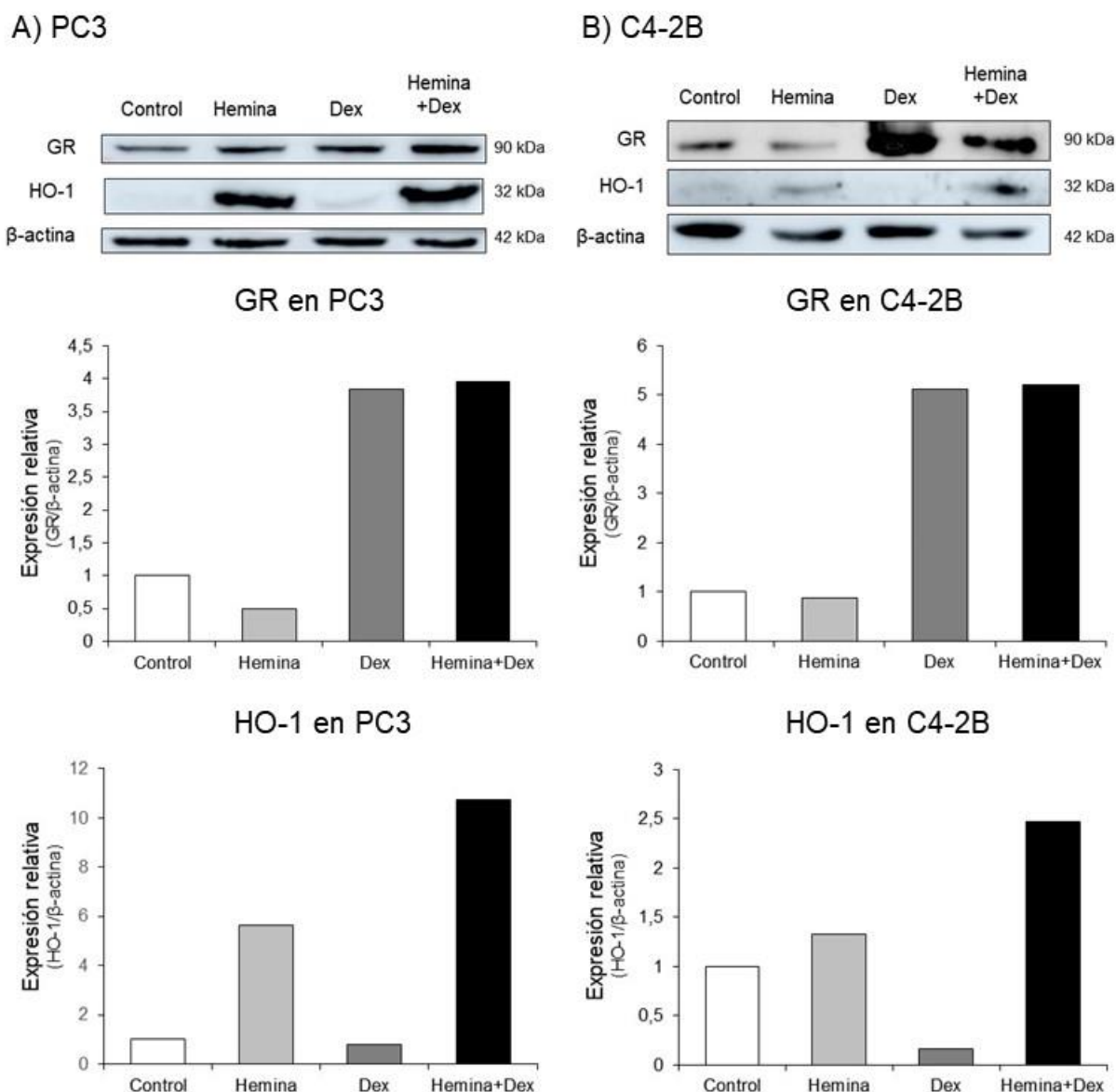


Figura 25: Expresión proteica de GR y HO-1 en células PC3 y C4-2B tratadas con Hemina y/o Dex.

Las células A) PC3 y B) C4-2B fueron cultivadas en medio RPMI con suero depletado de hormonas con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y tratadas con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Se purificaron las proteínas totales y se analizaron los niveles de GR y HO-1 por WB. Se empleó β -actina como control de carga. Las proteínas se cuantificaron utilizando el *software* ImageJ y se representan en los gráficos de barra. Se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes.

2.4. Ensayo de genes reporteros en PC3 y C4-2B.

Con el fin de estudiar la actividad transcripcional de GR en los tratamientos realizados, ambas líneas celulares fueron transfectadas con el plásmido MMTV-luc, reportero para GR, y

posteriormente tratadas con Hemina y/o Dexametasona. Tanto en PC3 como en C4-2B la administración de Dexametasona aumentó significativamente la actividad de luciferasa (**Figura 26, A y B**). Sin embargo, en la línea PC3 el pre-tratamiento con Hemina (tratamiento: 24 h de Hemina, lavado y 6 h adicionales con Dexametasona, **Figura 16, A de Materiales y Métodos, página 39**) inhibió parcialmente la inducción del reportero provocada por Dexametasona (**Figura 26, A**). Para determinar si la presencia de Hemina durante el cultivo altera el efecto de Dexametasona, las células PC3 se trataron en simultáneo con ambos agentes (tratamiento: 24 h de Hemina y las últimas 6 h con agregado de Dexametasona. **Figura 16, B de Materiales y Métodos, página 39**). En este caso también se observó una inhibición parcial por Hemina sobre el efecto de Dexametasona (**Figura 26, C**).

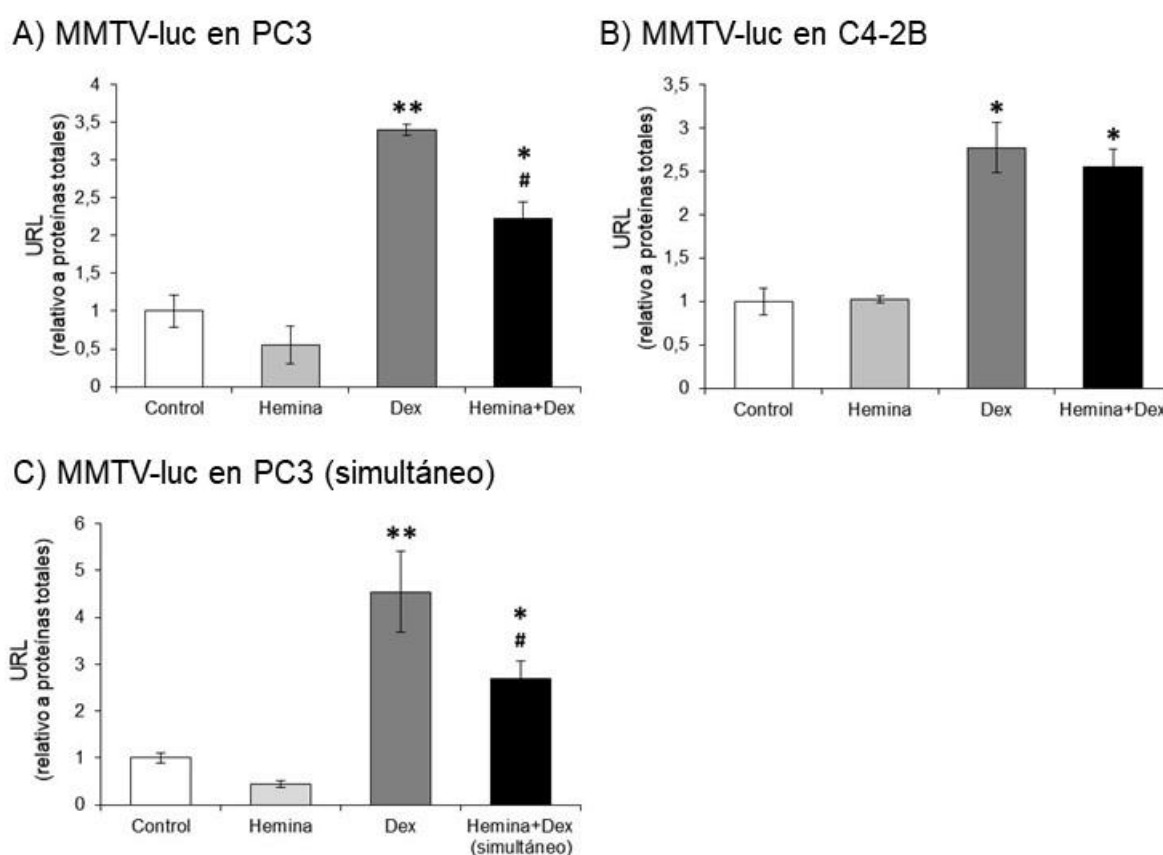


Figura 26: Efecto de los tratamientos con Hemina y/o Dex sobre la actividad transcripcional de GR en células de CaP.

Las células A) PC3 y B) C4-2B fueron transfectadas con el plásmido reportero MMTV-luc y cultivadas con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y tratadas con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Luego las células se lisaron y se realizó el ensayo de actividad de luciferasa, cuantificada como unidades relativas de luminiscencia (URL) normalizadas a la cantidad de proteínas totales. Las células C) PC3 se trataron con Hemina (80 μ M) o PBS durante 24 h y se agregó la Dex durante las últimas 6 h de cultivo.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a Dex.

Como se mencionó antes, el gen *IKBA* es target transcripcional directo de GR. A su vez, la proteína I κ B es inhibidora del factor de transcripción NF κ B. Este último puede heterodimerizar con GR y de esta manera inactivar la función transcripcional de cada uno de ellos, efecto conocido como transrepresión. Además, está reportado que la vía de NF κ B puede ser modulada por HO-1^{62,63}. Teniendo en cuenta estos antecedentes, las células PC3 y C4-2B se transfectaron con un plásmido reportero que posee sitios κ B para la unión de NF κ B río arriba del promotor del gen de la luciferasa. En la línea PC3 se observó una disminución significativa de la actividad de luciferasa en el tratamiento con Dexametasona sola (**Figura 27, A**); lo que sugeriría un aumento de la transrepresión de GR sobre NF κ B en esta condición. En la línea C4-2B no se observó el efecto de transrepresión de GR, pero se detectó una disminución significativa en la actividad del reportero en el tratamiento con Hemina (**Figura 27, B**).

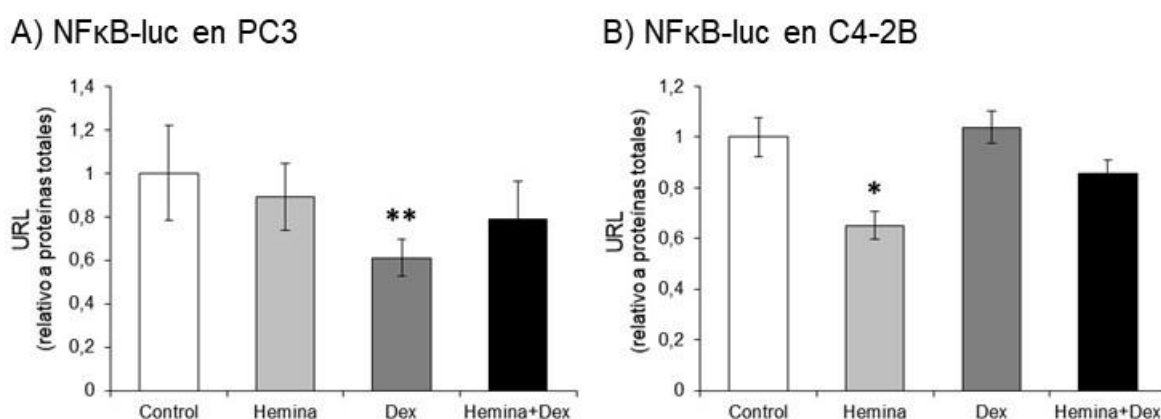


Figura 27: Estudio de la actividad de transrepresión de GR en células de CaP.

Las células A) PC3 y B) C4-2B fueron transfectadas con el plásmido reportero NF κ B-luc y posteriormente tratadas con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Luego las células fueron lisadas y se realizó el ensayo de actividad de luciferasa, cuantificada como unidades relativas de luminiscencia (URL) normalizadas a la cantidad de proteínas totales.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD.

* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control.

2.5. Co-inmunoprecipitación en PC3.

En estudios previos del laboratorio se observó que HO-1 puede interactuar con otras proteínas, como por ejemplo STAT3, proteína involucrada en la señalización de AR, y de esta forma modular la actividad de este receptor⁶³. En los experimentos mostrados anteriormente en este trabajo de tesis, se comprobó que la sobreexpresión de HO-1 redujo significativamente la actividad transcripcional de GR inducida por Dexametasona (**Figura 26**). Para comprobar si esta inhibición se debe a una interacción proteína-proteína, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación en células PC3 pre-tratadas o no con Hemina utilizando un anticuerpo específico anti-HO-1 y

revelando el WB con un anticuerpo anti-GR. Se demostró que existe interacción entre ambas proteínas (**Figura 28, A**). De igual modo, se repitió este ensayo en las mismas condiciones realizando previamente un fraccionamiento núcleo/citoplasma. Nuevamente, en ambos compartimentos celulares se observó interacción entre HO-1 y GR (**Figura 28, B**).

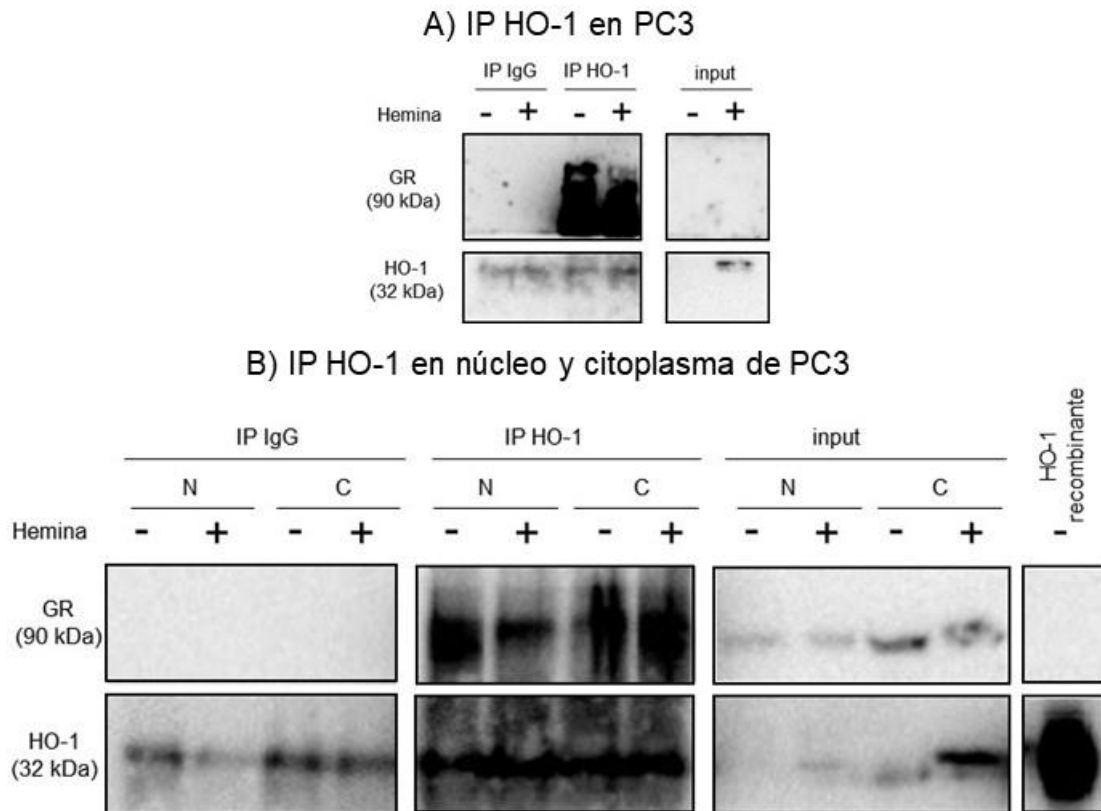


Figura 28: Co-IP de HO-1 y GR en la línea celular PC3.

Las células PC3 fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero deprivado de hormonas y, posteriormente tratadas con Hemina (80 μ M, 24 h) o su vehículo (control). Los extractos celulares se inmunoprecipitaron usando un anticuerpo monoclonal anti-HO-1 o IgG como control negativo. Los inmunocomplejos se analizaron por WB con los anticuerpos indicados. Una fracción de los extractos proteicos (10%) fue revelada para las proteínas estudiadas con el fin de controlar la eficiencia de la técnica (input).

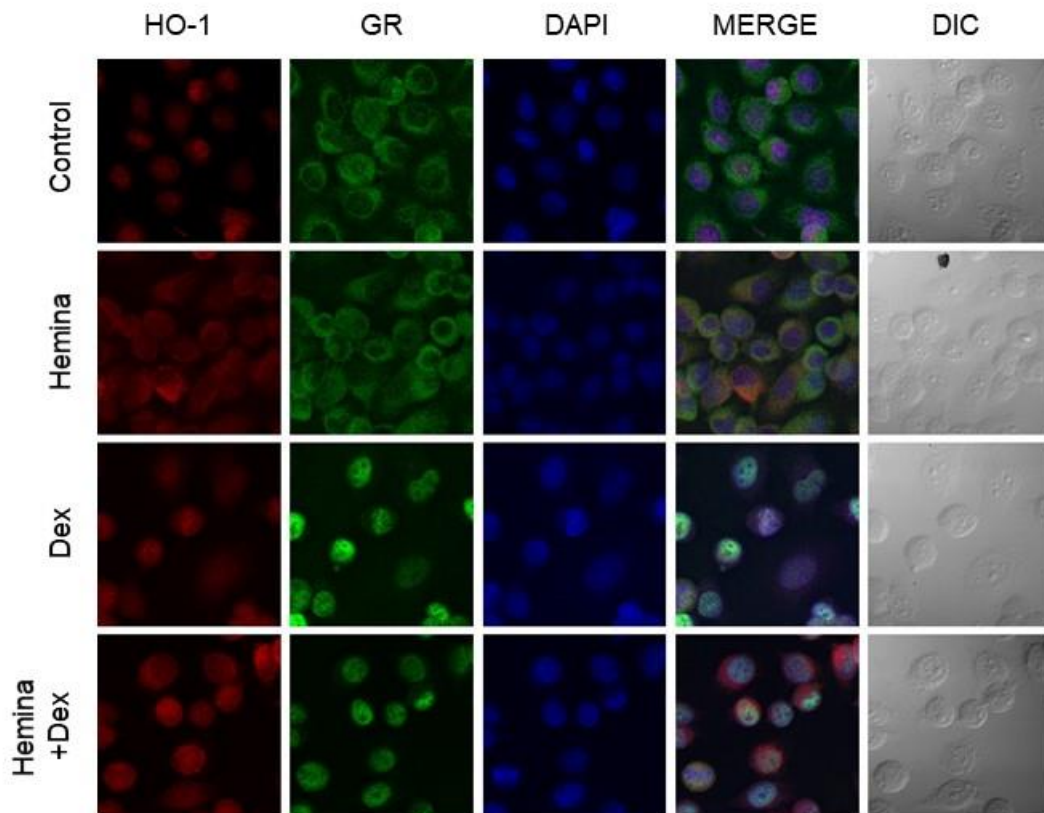
2.6. Localización celular de GR y HO-1 por inmunofluorescencia en PC3.

Conociendo la importancia de GR en el núcleo, habiendo demostrado la interacción física de esta proteína con HO-1 y resultados previos de nuestro laboratorio que indican la capacidad de HO-1 de retener determinados factores en el citoplasma⁶³, decidimos evaluar la localización subcelular de GR bajo inducción de HO-1. Por microscopía confocal de fluorescencia, se analizó la localización de GR y HO-1 en células PC3 tratadas con Hemina y/o Dexametasona. Las imágenes de la **Figura 29 A** muestran un aumento en los niveles de expresión de GR con Dexametasona, al igual que un incremento en la expresión de HO-1 luego del tratamiento con Hemina. La cuantificación de ambas proteínas relativa al tamaño celular demostró un aumento

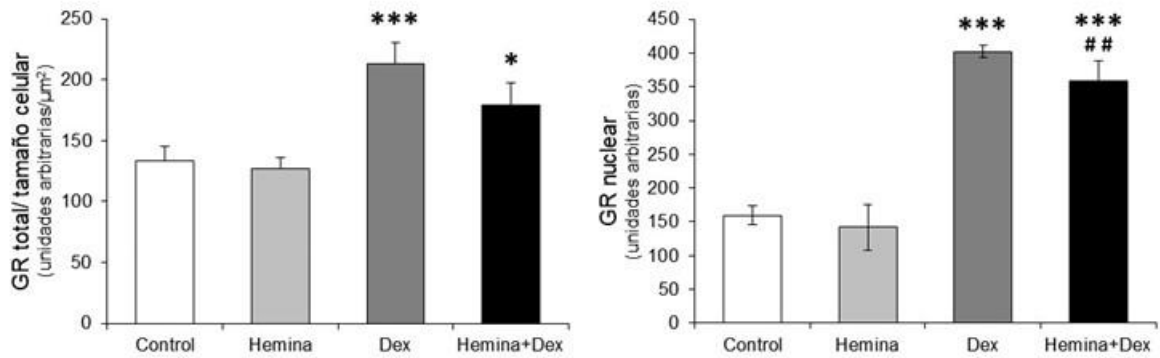
significativo en los niveles de GR y HO-1 en los tratamientos con Dexametasona y Hemina+Dexametasona (**Figura 29, B y C panel izquierdo**). El aumento de HO-1 también fue significativo en el tratamiento con Hemina (**Figura 29, C panel izquierdo**).

Cuando se estudió la localización subcelular de las proteínas, se observó una mayor translocación de GR al núcleo en presencia de Dexametasona (**Figura 29, B panel derecho**). El pre-tratamiento con Hemina redujo parcialmente la cantidad de GR nuclear al comparar Dexametasona vs. Hemina+Dexametasona (**Figura 29, B panel derecho**). En el caso de HO-1, el tratamiento con Hemina y Hemina+Dexametasona aumentó la cuantificación en el núcleo (**Figura 29, C panel derecho**).

A) Inmunofluorescencia para GR y HO-1 en PC3



B) Cuantificación IF: GR en PC3



C) Cuantificación IF: HO-1 en PC3

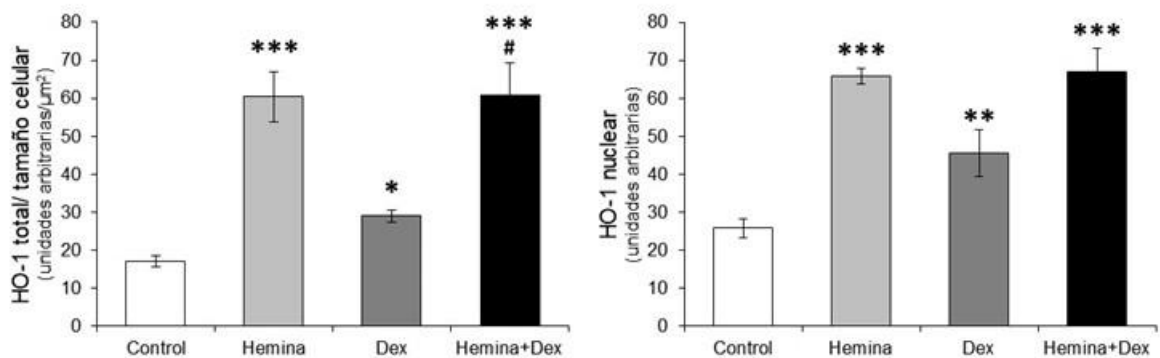


Figura 29: Inmunofluorescencia de GR y HO-1 en células PC3.

Las células fueron tratadas con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y posteriormente tratadas con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Se estudió la expresión y distribución de GR y HO-1 mediante inmunofluorescencia. A) Se muestra una imagen representativa de cada grupo. En los paneles B) y C) a la izquierda se presenta la cuantificación de la marca total de GR y HO-1 en base al tamaño celular. En los paneles de la derecha se encuentra la cuantificación de la marca nuclear, realizada a partir del análisis célula a célula para GR y HO-1 (n=20-25 por tratamiento). Se observó un aumento significativo de GR en ambos tratamientos con Dex comparado al control. Con Hemina+Dex disminuyó la localización nuclear de GR comparado con el tratamiento de Dex.

Se graficó la media \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,0001$ respecto al control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto a Dex.

2.7. Análisis del ciclo celular en PC3 y C4-2B.

Para determinar si los tratamientos con Hemina y/o Dexametasona tienen consecuencias en la progresión del ciclo celular, se estudió la distribución de las poblaciones celulares en las diferentes fases para las líneas PC3 y C4-2B, empleando la marcación con yoduro de propidio y análisis por citometría de flujo.

En células PC3 el tratamiento con Dexametasona disminuyó el número de células en fase G0/G1 respecto al control ($p=0,02$; **Figura 30, A**). El tratamiento con Hemina no alteró significativamente la distribución en las fases del ciclo celular en PC3. En la línea C4-2B, el tratamiento con Dexametasona no tuvo efecto. Sin embargo, la Hemina, sola o en combinación con Dexametasona, disminuyó la población celular en fase S ($p=0,04$; **Figura 30, B**).

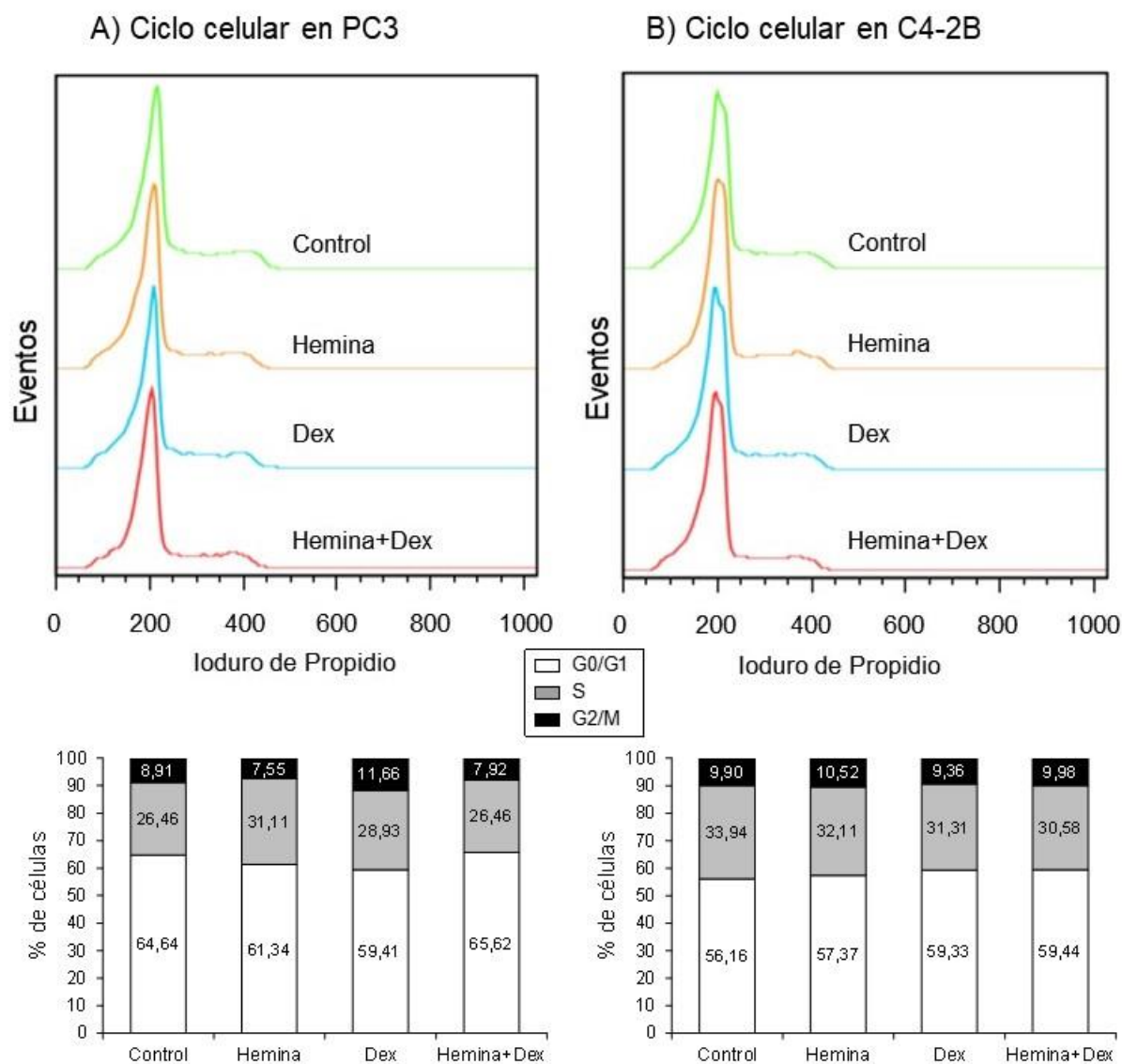


Figura 30: Análisis del ciclo celular por incorporación de ioduro de propidio y citometría de flujo.

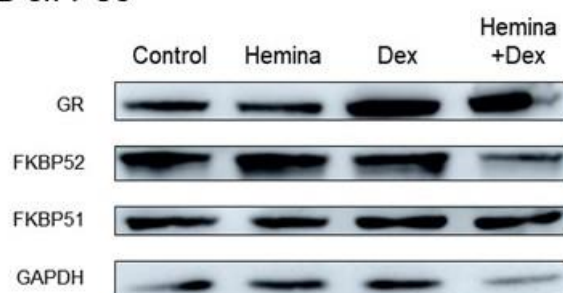
Células A) PC3 y B) C4-2B tratadas con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y posteriormente tratadas con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h, fueron incubadas con ioduro de propidio. En el panel superior se representan las distribuciones de las poblaciones graficadas como el número de eventos según la intensidad de marcación. En el panel inferior se grafica la cuantificación del porcentaje de células en las distintas etapas del ciclo celular. Se muestra la media de al menos tres experimentos independientes.

2.8. Expresión de FKBP51 y FKBP52 en PC3.

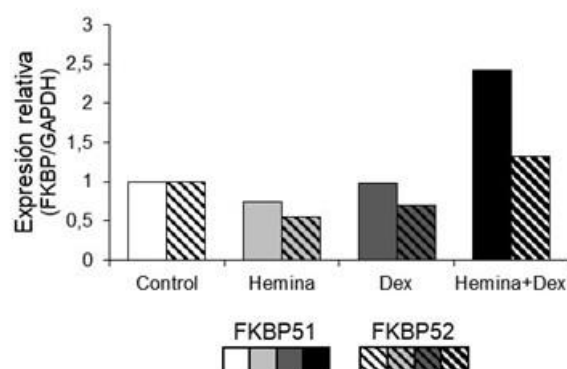
En ausencia del ligando, GR reside en citoplasma unido a distintas chaperonas, entre ellas la inmunofilina FKBP51, reteniendo al receptor en este compartimento. Cuando los GC se unen al receptor, FKBP51 se intercambia por FKBP52 y esta última se une a la dineína favoreciendo el transporte del complejo activo hacia el núcleo⁸⁰. Con el objetivo de estudiar si dichas inmunofilinas están involucradas en la retención citoplasmática parcial del complejo GC/GR

cuando las células son tratadas con Hemina+Dexametasona, se realizó un WB utilizando extracto de proteínas totales de células PC3 sometidas a los diversos tratamientos. El tratamiento con Hemina+Dexametasona incrementó significativamente la expresión de FKBP51 respecto al control, mientras que con Dexametasona no hubo modificaciones (**Figura 31**). Además, calculamos la relación FKBP51/FKBP52. Observamos que en el tratamiento Hemina+Dexametasona la relación se incrementa a favor de FKBP51 (**Figura 31**); justificando, al menos en parte, la retención citoplasmática de GR descrita en los ensayos anteriores.

WB en PC3



Cuantificación WB: FKBP51 y FKBP52



Relación FKBP51/52

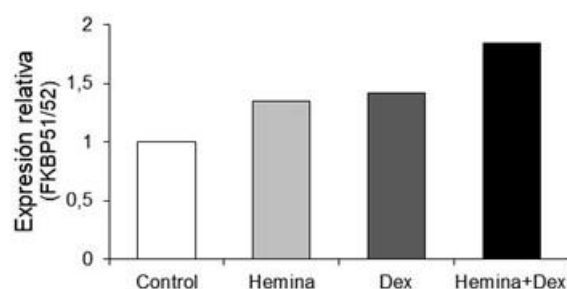


Figura 31: Expresión proteica de FKBP51 y FKBP52 en células PC3 tratadas con Hemina y/o Dex.

Las células PC3 fueron cultivadas en medio RPMI con suero depletado de hormonas y tratadas con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y posteriormente tratadas con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Se obtuvieron las proteínas totales y se analizó por WB la expresión de las proteínas GR, FKBP51 y FKBP52. Se utilizó GAPDH como control de carga. La cuantificación se realizó utilizando el *software* ImageJ.

Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

2.9. Estudio de células PC3 y preosteoblastos murinos en co-cultivo.

Es conocido el tropismo de las células de CaP por el hueso. Entre las células de CaP y las células del microambiente de la metástasis se generan *loops* regulatorios que interrumpen la homeostasis entre los osteoblastos, los osteoclastos, las células endoteliales y otros elementos del estroma. Además, la terapia con GC causa osteoporosis, por estimulación de la osteoclastogénesis e inhibición de la formación de nuevo hueso¹²¹.

2.9.1. Ensayo de genes reporteros en MC3T3.

Se decidió evaluar la actividad transcripcional de GR en la línea preosteoblástica murina MC3T3 transfectada con el plásmido MMTV-luc, reportero para GR, y luego sometida a los tratamientos con Hemina y/o Dexametasona en presencia de suero depletado de hormonas. Se observó que el tratamiento con Dexametasona aumentó significativamente la actividad de luciferasa en presencia y ausencia de Hemina. Sin embargo, el pre-tratamiento con Hemina inhibió en parte la inducción provocada por Dexametasona (**Figura 32**).

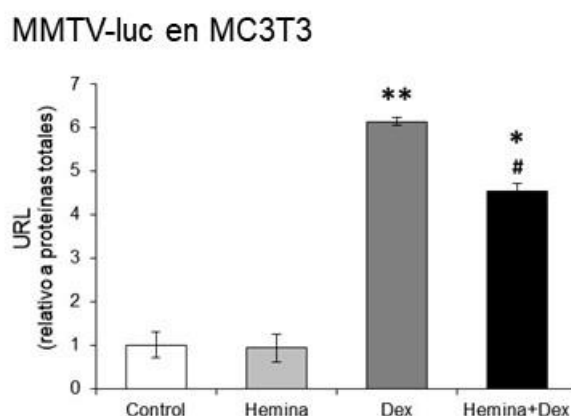


Figura 32: Efecto de los tratamientos con Hemina y/o Dex sobre la actividad transcripcional de GR en células MC3T3.

Células MC3T3 fueron transfectadas con el plásmido reportero MMTV-luc y posteriormente sometidas a los tratamientos con Hemina (80 μ M) o PBS por 24 h, lavadas y tratadas con Dex (1×10^{-8} M) o PBS durante 6 h adicionales. Luego, fueron lisadas y se realizó el ensayo de actividad de luciferasa, cuantificada como unidades relativas de luminiscencia (URL) normalizadas a la cantidad de proteínas totales.

La figura muestra el resultado de tres experimentos independientes. Se graficó la media \pm SD. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a Dex.

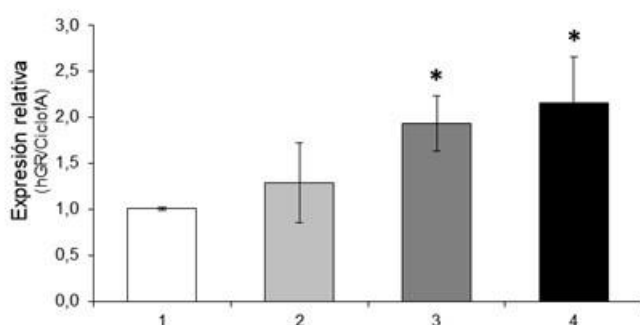
2.9.2. Expresión génica y proteica de GR en PC3 y MC3T3 en co-cultivo.

Se realizaron ensayos de co-cultivo de PC3 con la línea preosteoblástica MC3T3 para estudiar la modulación de GR bajo la inducción de HO-1 en las células tumorales. Este sistema permite que ambos tipos celulares compartan el medio de cultivo pero no estén en contacto físico directo. Los cultivos de PC3 se pre-trataron con Hemina o PBS (control) durante 24 h. Posteriormente se

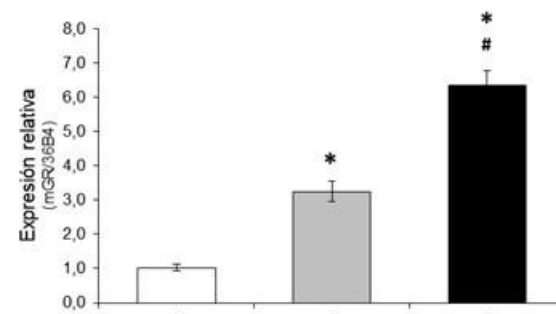
lavar con PBS y se co-cultivar con células MC3T3 por otras 24 h en medio α MEM con 2% de SFB en ausencia de Hemina (**Figura 17, Materiales y Métodos, página 41**).

Mediante RTqPCR utilizando *primers* específicos humanos y murinos, se observó un aumento significativo en la expresión del ARNm de GR tanto en PC3 como en MC3T3 por efecto del co-cultivo, sin observarse alteraciones por la presencia de Hemina (**Figura 33, A y B**). Al estudiar la expresión proteica de GR, se observó un aumento sólo en PC3 cuando fueron co-cultivadas con MC3T3 (**Figura 33, C**).

A) RTqPCR *NR3C1* en PC3



B) RTqPCR *Nr3c1* en MC3T3



C) WB en PC3 y MC3T3

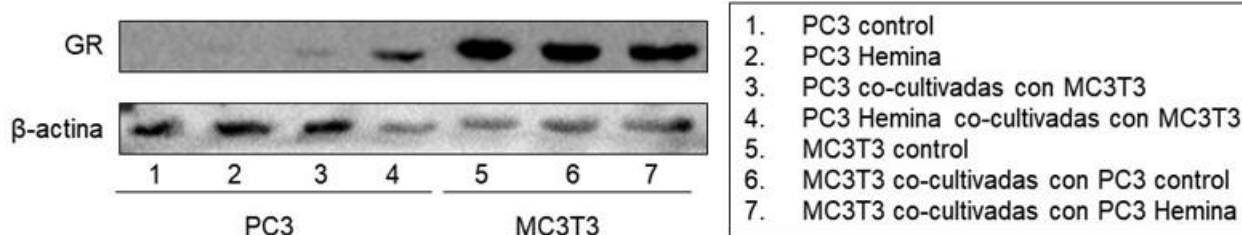


Figura 33: Expresión de GR en células PC3 pre-tratadas con Hemina y co-cultivadas con MC3T3.

Las células PC3 fueron cultivadas en medio RPMI y tratadas con Hemina (24 h, 50 μ M; PC3 Hemina) o con PBS (PC3 control). Posteriormente fueron co-cultivadas o no con MC3T3 en medio α MEM con 2% de SFB (**Figura 17, Materiales y Métodos, página 41**). Se analizó por RTqPCR la expresión del gen A) *NR3C1* y B) *Nr3c1*. Se graficó la media \pm SD. * p <0,05 respecto al control; # p <0,05 respecto al co-cultivo control.

C) Se extrajeron las proteínas totales y se analizó por WB la expresión de GR. Se utilizó β -actina como control de carga. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

El co-cultivo aumentó los niveles de expresión de GR en ambos tipos celulares.

2.9.3. Análisis del ciclo celular en co-cultivo.

Con el objetivo de estudiar las etapas del ciclo celular en ambas líneas sometidas a co-cultivo, las células fueron marcadas con yoduro de propidio y posteriormente se analizó su incorporación por citometría de flujo. El tratamiento con Hemina alteró la distribución del ciclo celular en PC3

respecto al control, observándose una disminución de la población celular en la fase G0/G1 a expensas del aumento en la fase S y G2/M ($p < 0,05$; **Figura 34, A**). Sin embargo, no se vieron modificaciones en el ciclo celular por efecto del co-cultivo tanto en células tumorales pre-tratadas o no con Hemina (**Figura 34, A**). En el caso de las células MC3T3, se observó que el co-cultivo disminuyó el número de células en fase G0/G1 ($p < 0,05$), y este cambio fue revertido por el co-cultivo con Hemina (**Figura 34, B**).

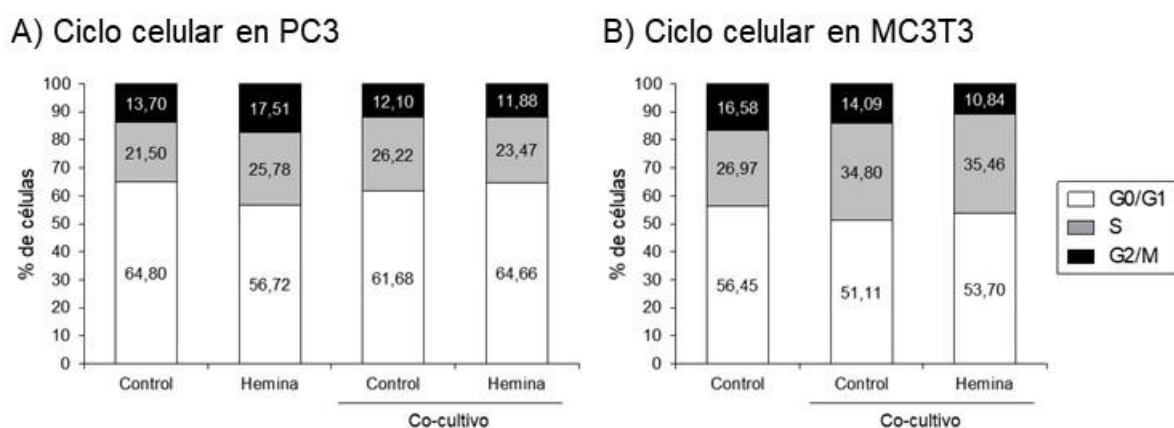


Figura 34: Análisis de la progresión del ciclo celular por incorporación de yoduro de propidio.

Distribución de las poblaciones de A) PC3 y B) MC3T3 en los distintos tratamientos, graficadas como el número de eventos según la intensidad de marcación en las distintas etapas del ciclo celular.

3. Análisis *in silico*.

Raju *et al.* describieron la presencia de un elemento de respuesta a GR funcional en la zona promotora del gen *HMOX2*¹²². Es por ello que, utilizando la metodología descrita en la sección 15.1. de Materiales y Métodos (página 52), se analizó la secuencia promotora (-1000 a +200 pb) de *HMOX1* buscando elementos de respuesta a GR. Resultaba de particular interés el estudio de dicho gen, para evaluar una posible regulación del mismo por el receptor esteroideo.

En la **Tabla 2** se muestran los resultados obtenidos. Aunque se hallaron varios sitios con secuencias que podrían corresponder a sitios de unión de GR, el alto valor de q indica que existe una alta probabilidad de que los resultados se deban al azar (falsos positivos) y no sean verdaderos elementos de respuesta a GR.

Gen	Inicio	Fin	Hebra	Score	p-value	q-value	Secuencia hallada
HMOX1	885	900	-	10,89	3,99E $\times 10^{-5}$	0,663	GGCACATTCAGGTCTG
HMOX1	320	337	-	11,29	5,05 $\times 10^{-5}$	0,919	AAAAAAAAAACTTCCTGG
HMOX1	256	273	+	10,59	7,20 $\times 10^{-5}$	0,919	AGGATGATCCTTTCCAAT
HMOX1	885	900	+	10,79	7,20 $\times 10^{-5}$	0,685	CAGACCTGAATGTGCC
HMOX1	1003	1018	-	10,53	8,54 $\times 10^{-5}$	0,695	GAGGAGACTAAGTCCC

Tabla 2: Predicción de sitios de unión de GR en la región promotora de *HMOX1*.

Se presentan las secuencias de *HMOX1* donde podría unirse GR. Inicio y fin indican el comienzo y fin de la secuencia congruente con el motivo de reconocimiento, respectivamente. Hebra indica sobre qué hebra del ADN fue hallado el motivo de unión de GR.

4. Ensayos *in vivo*.

El tratamiento con Dexametasona es frecuentemente utilizado como paliativo en pacientes con CaP. Con el objetivo de evaluar los efectos de Hemina y/o Dexametasona sobre el crecimiento tumoral, se inyectaron $3,6 \times 10^6$ células PC3 s.c. en el flanco izquierdo de ratones atímicos machos *nu/nu* (**Figura 35**) para generar un modelo animal de trasplante heterólogo (xenotransplantes; cantidad total de animales=36). Todos los ratones inoculados desarrollaron tumores y cuando alcanzaron un volumen aproximado de 150 mm^3 , se comenzó con la administración *i.p.* de Hemina (25 mg/kg), Dexametasona (0,2 mg/kg) o ambas drogas simultáneamente. Los animales control se inyectaron con PBS. Cada ratón recibió 1 dosis de tratamiento cada 48 h, y un total de 6 dosis. Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados. Los tumores extirpados fueron procesados para su posterior análisis de expresión génica por RTqPCR, y expresión proteica por WB e IHQ.

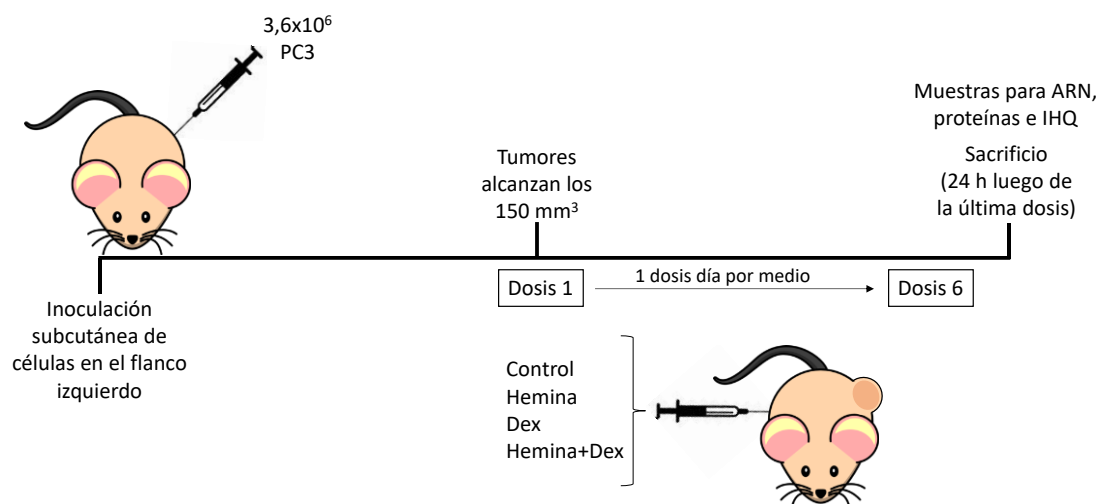


Figura 35: Esquema de generación de tumores a partir de células PC3 en ratones *nu/nu* y tratamientos.

Ratones macho de la cepa *nu/nu* fueron inoculados *s.c.* en el flanco izquierdo con células humanas PC3. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 150 mm^3 , se aplicaron 6 inyecciones *i.p.* de Hemina (25 mg/kg), Dex (0,2 mg/kg) o ambas drogas simultáneamente cada 48 h. Los animales control recibieron PBS. Concluido el tratamiento, los animales fueron sacrificados y los tumores removidos para su posterior análisis.

4.1. Evaluación del crecimiento tumoral.

Con el objetivo de determinar el bienestar de los animales durante los experimentos (alimentación, estrés, presencia de tumor, toxicidad de los tratamientos), se registró el peso de todos los animales desde la inoculación de las células tumorales hasta el momento del sacrificio. Como puede observarse en la **Figura 36**, se comprobó que no hubo grandes cambios en el peso de los animales durante el período que duró el experimento; y en general se observó un aumento gradual en el peso reflejando el bienestar de los ratones y la ausencia de efectos tóxicos. Este análisis nos permitió descartar que los resultados observados se deban a una mala condición del estado de los animales.

Peso corporal

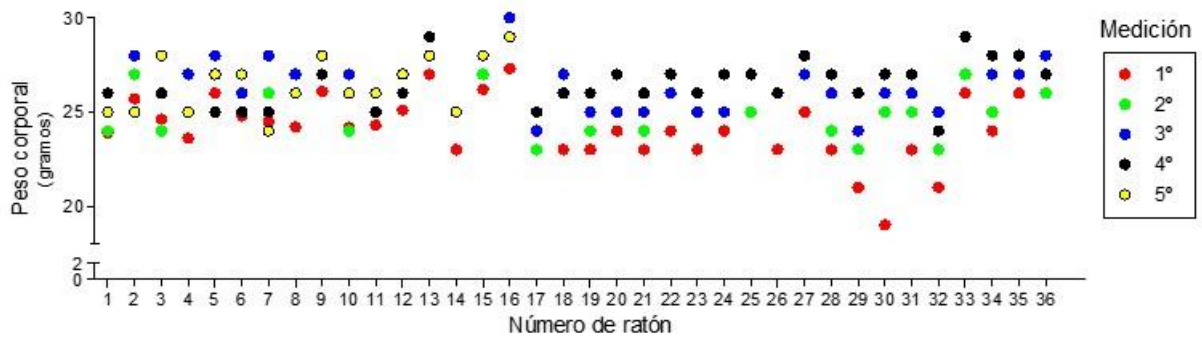


Figura 36: Peso corporal de los ratones *nu/nu* con tumores xenotransplantados.

En distintos puntos del experimento, se registró el peso corporal de los ratones inoculados s.c. con células PC3 y sometidos a los tratamientos con Hemina, Dex, Hemina+Dex y control. No se observaron cambios significativos, y en general se produjo un aumento del peso a lo largo del experimento, evidenciando el bienestar de los animales y la ausencia de toxicidad por el tratamiento.

Por otro lado, se midió el crecimiento tumoral utilizando un calibre y se calculó el volumen de los tumores como se describió en la sección 13.1. de Materiales y Métodos (página 49). Se excluyeron de los análisis posteriores a 8 ratones que tenían múltiples tumores. Para cada tratamiento ($n=7$) se graficó la curva de regresión exponencial del volumen tumoral en función del tiempo y se calculó el tiempo de duplicación en cada condición (**Figuras 37**). Se puede observar que la curva de Dexametasona presenta una pendiente menor que las correspondientes a los otros tratamientos y que consecuentemente el tiempo de duplicación es mayor en dicha condición (**Figura 37, recuadro**).

Al analizar la media del volumen tumoral en función del tiempo para cada tratamiento, se observó que a partir del día 25, el grupo tratado con Dexametasona tuvo un menor crecimiento comparado al grupo control que se hizo más notorio a tiempos más largos (**Figura 38**). Además, los grupos Hemina y Hemina+Dexametasona mostraron un mayor crecimiento en el mismo lapso (**Figura 38**).

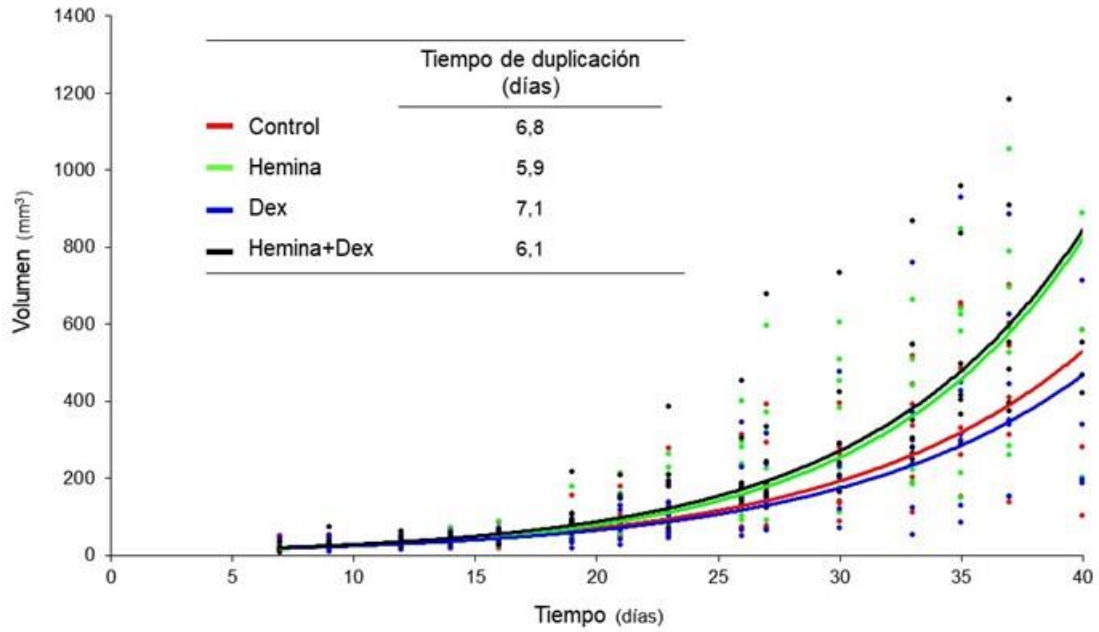


Figura 37: Curvas de crecimiento tumoral y tiempos de duplicación.

La figura representa la regresión exponencial para el crecimiento tumoral en función del tiempo (n=7 para cada tratamiento). En el recuadro se muestra el tiempo de duplicación (en días) para cada tratamiento.

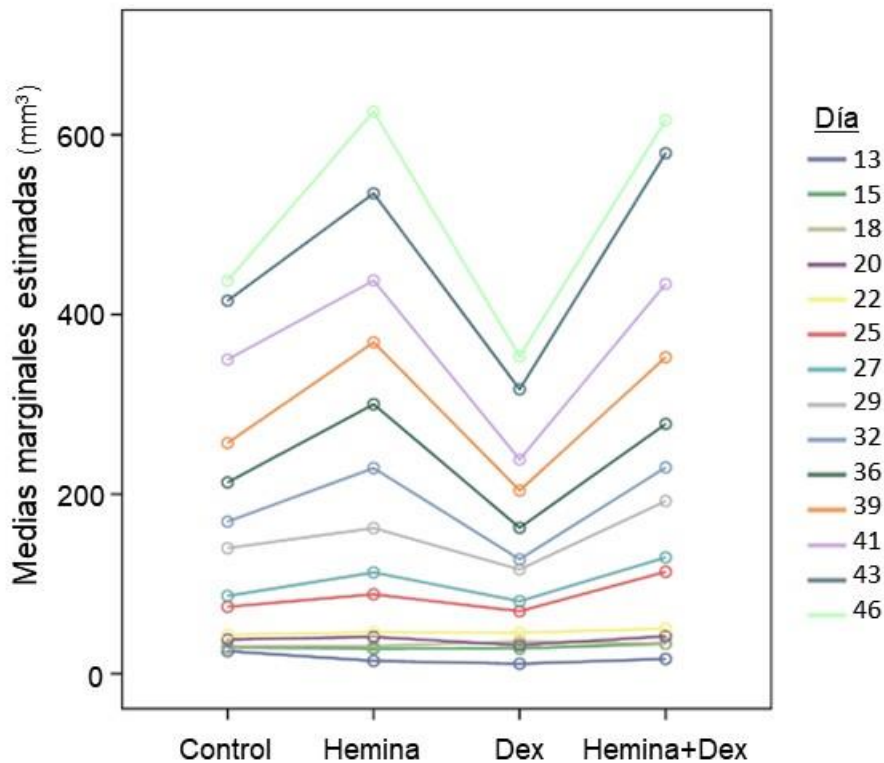


Figura 38: Medias tumorales estimadas para cada tratamiento a lo largo del tiempo.

Se presenta la superposición de las medias tumorales para cada tratamiento en función de los días de medición.

Utilizando los volúmenes tumorales, se calculó la tasa de crecimiento para cada tratamiento en cada uno de los experimentos realizados. Se observó que la tasa de crecimiento para Dexametasona es menor que para los otros tratamientos, cuyos símbolos se solapan (**Figura 39**). En la **Figura 40** se muestran fotos representativas de los tumores para cada grupo.

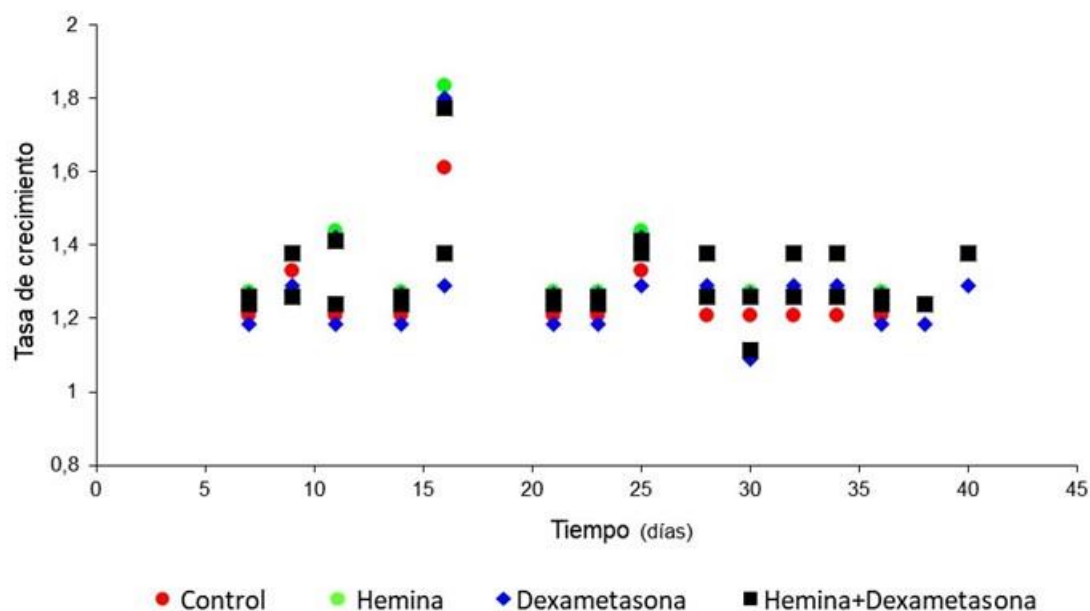


Figura 39: Tasas de crecimiento tumoral en función del tiempo.

Se muestran las tasas de crecimiento tumoral para cada tratamiento.

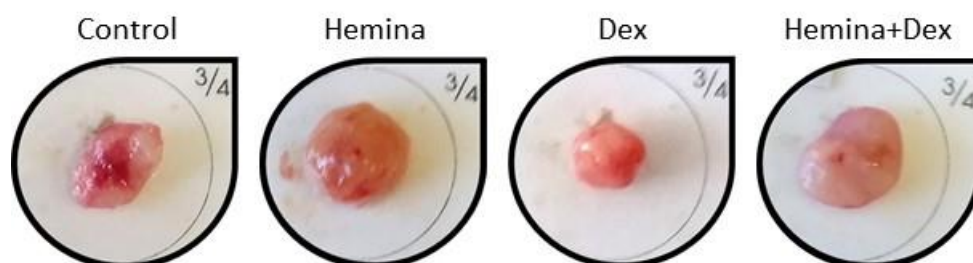


Figura 40: Imágenes representativas de tumores PC3 bajo los distintos tratamientos.

Una vez concluidos los tratamientos según se describen en la Figura 35, los animales se sacrificaron, se extrajeron los tumores, y se montaron en todos los casos sobre una plantilla *DispoCut Board White* (CellPath, Reino Unido) en el círculo de $\frac{3}{4}$ de pulgada de diámetro para fotografiarlos. Se muestra una imagen representativa de un tumor para cada tratamiento.

Cabe destacar que todas las alteraciones observadas y descritas previamente respecto a los parámetros de crecimiento de los tumores representan tendencias pero no alcanzan la significancia estadística. Probablemente, sea consecuencia de la gran dispersión de las mediciones obtenidas entre animales, la cual podría disminuirse aumentando el número por grupo.

4.2. Expresión génica y proteica *in vivo*.

A fin de determinar el efecto de Hemina, Dexametasona o ambos en la expresión génica, se analizaron los niveles de ARNm de diferentes genes usando *primers* específicos para humanos, de manera que los genes murinos no interfirieran en la cuantificación. Se determinó la expresión de *HMOX1* para evaluar si la administración de Hemina *i.p.* modulaba sus niveles intratumorales. Además, se midió la expresión de *NR3C1* y sus blancos transcripcionales *IKBA*, *IL6*, *BCLXL* para comprobar el efecto de la Dexametasona administrada de forma sistémica. Asimismo, se estudió la expresión de *MKI67* como marcador de proliferación.

Mediante RTqPCR, se observó una disminución significativa de *NR3C1* en aquellos tumores de los animales tratados sólo con Dexametasona y la administración combinada con Hemina revirtió esta disminución. El tratamiento sólo con Hemina no produjo cambios en los niveles de *NR3C1* (**Figura 41, A**).

Además, no se detectaron variaciones en la expresión de *HMOX1* en los distintos grupos, sugiriendo que la Hemina administrada *i.p.* no actuó como inductor farmacológico a nivel transcripcional de este gen en los tumores (**Figura 41, B**). Tampoco se detectaron variaciones en las cantidades de ARNm de *HMOX1* por efecto de la Dexametasona *in vivo*.

Por otro lado, no se observaron alteraciones significativas en la expresión de los otros genes para los diferentes tratamientos (**Figura 41, C-F**).

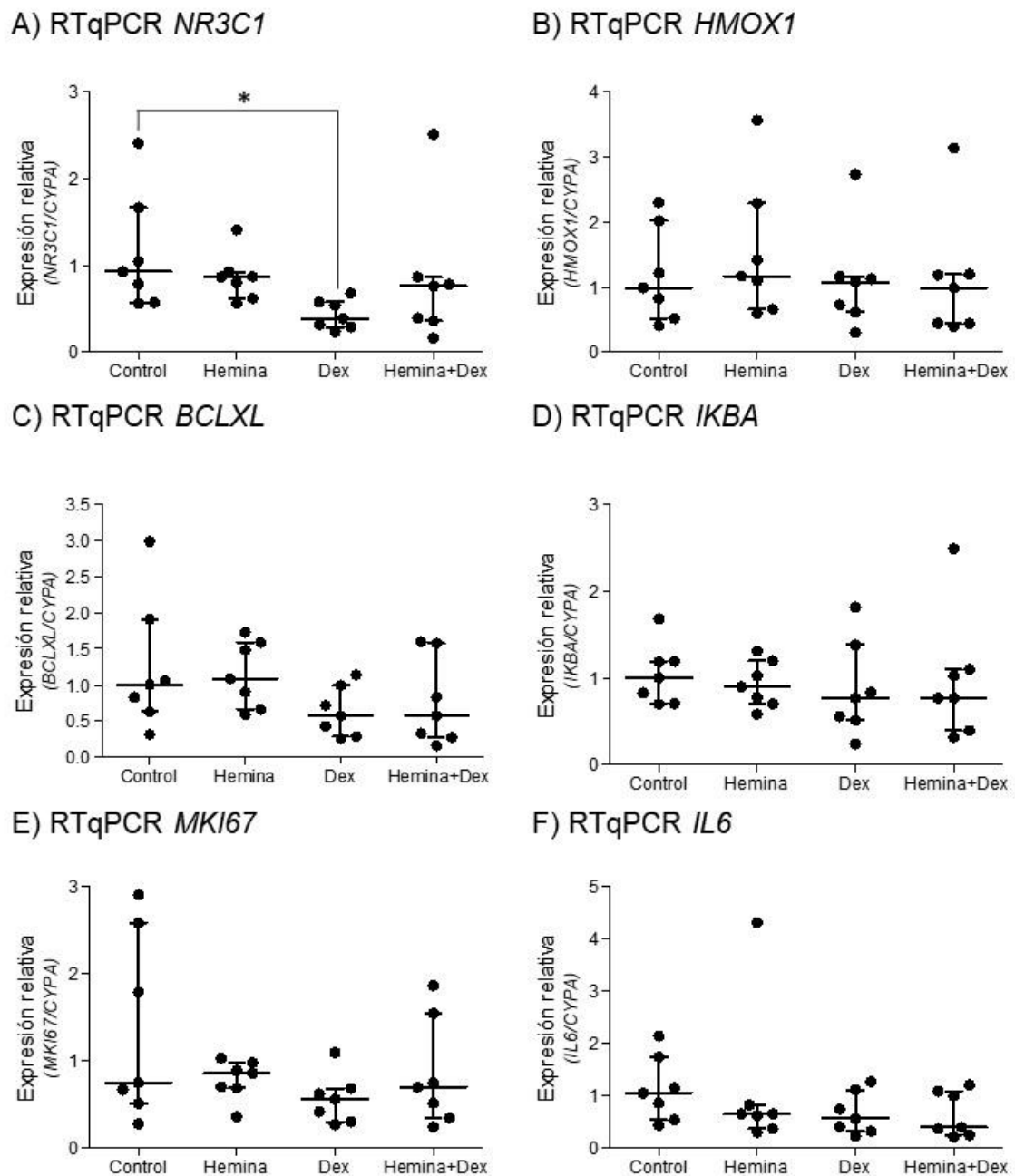


Figura 41: Expresión génica en los xenotransplantes de células PC3.

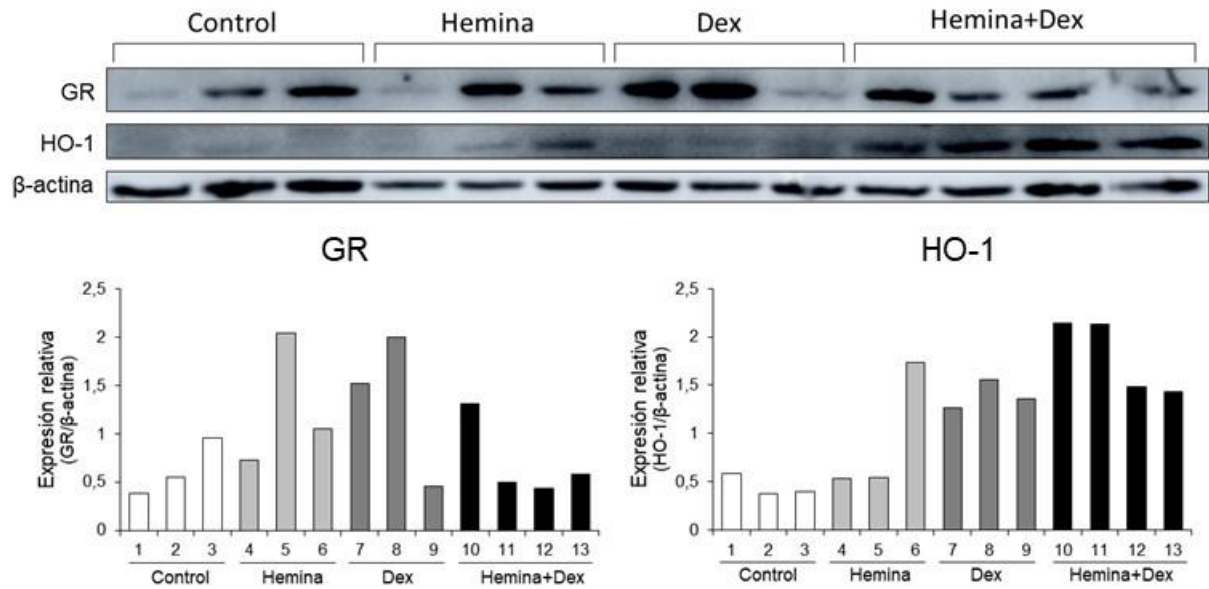
Se analizó por RTqPCR la expresión de los genes A) *NR3C1*, B) *HMOX1*, C) *BCLXL*, D) *IKBA*, E) *MKI67* y F) *IL6* en los tumores de células PC3 inyectadas *s.c.* en ratones *nu/nu* y sometidos a los diferentes tratamientos ($n=7$ para cada grupo). En aquellos animales tratados con Dex disminuyó significativamente la expresión de *GR*.

Se graficó la mediana \pm rango intercuartil. * $p<0,05$ respecto al control.

Utilizando las proteínas totales extraídas de los tumores, se analizó la expresión de GR y HO-1 por WB (Figura 42). A pesar de la dispersión observada entre los animales de cada grupo (Figura 42, A), se detectó un aumento significativo de la expresión de HO-1 en los ratones tratados con Dexametasona y Hemina+Dexametasona respecto al control (Figura 42, B panel derecho). No

se encontraron diferencias significativas en los niveles de GR entre los grupos (**Figura 42, B panel izquierdo**).

A) WB en tumores



B) Cuantificación

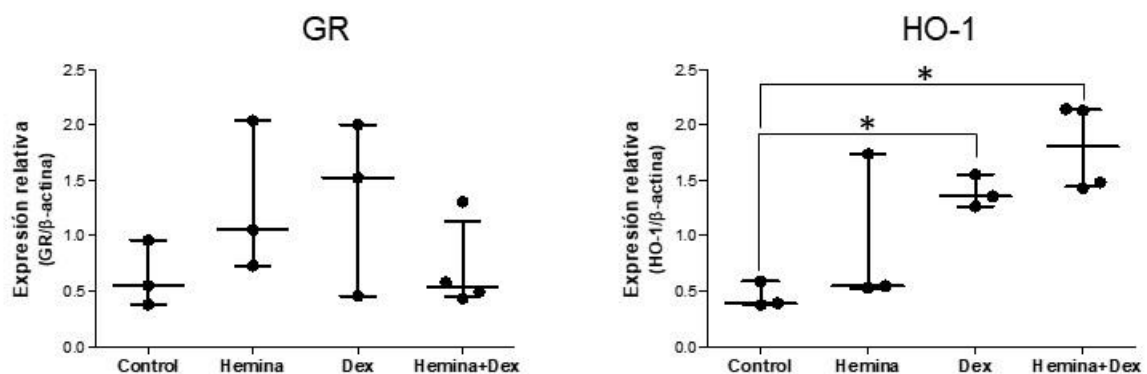


Figura 42: Expresión de GR y HO-1 en xenotransplantes de células PC3.

Se analizaron los niveles proteicos de GR y HO-1 por WB en lisados tumorales derivados de células PC3 inyectadas *s.c.* en ratones *nu/nu* sometidos a los diferentes tratamientos. En A) se muestra el WB y los gráficos de barras representan la cuantificación de la expresión de GR y HO-1 para cada animal relativizado a los valores de β -actina (control de carga). B) Se representa la mediana \pm rango intercuartil para GR y HO-1 para cada tratamiento. Las imágenes se cuantificaron utilizando el *software* ImageJ. Se muestra una figura representativa de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto al control.

4.3. Análisis histológico e inmunohistoquímico de los tumores.

El análisis histopatológico de los tumores determinó que los mismos presentaban características epiteliales poco diferenciadas, núcleos irregulares, nucléolos prominentes e imágenes mitóticas aberrantes (**Figura 43**).

Con el objetivo de evaluar la expresión y la localización tumoral de HO-1 y GR, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas en secciones consecutivas de los tumores. Al analizar los niveles de HO-1, se observó ausencia de marcación en las células tumorales en todos los tratamientos. Sin embargo, se evidenció marcación positiva para HO-1 en los macrófagos intra y peritumorales en todas las condiciones ensayadas, con mayor inmunoreactividad en los grupos Hemina, Dexametasona y Hemina+Dexametasona (**Figura 43 y Tabla 3**). Respecto a GR, se observó inmunomarcación nuclear en todos los tratamientos, con expresión heterogénea y mayor porcentaje de células inmunorreactivas en el caso de Dexametasona (**Figura 43**). Además, en el tratamiento combinado disminuyó la intensidad de la tinción de GR.

Histología e inmunohistoquímica para HO-1 y GR en tumores PC3

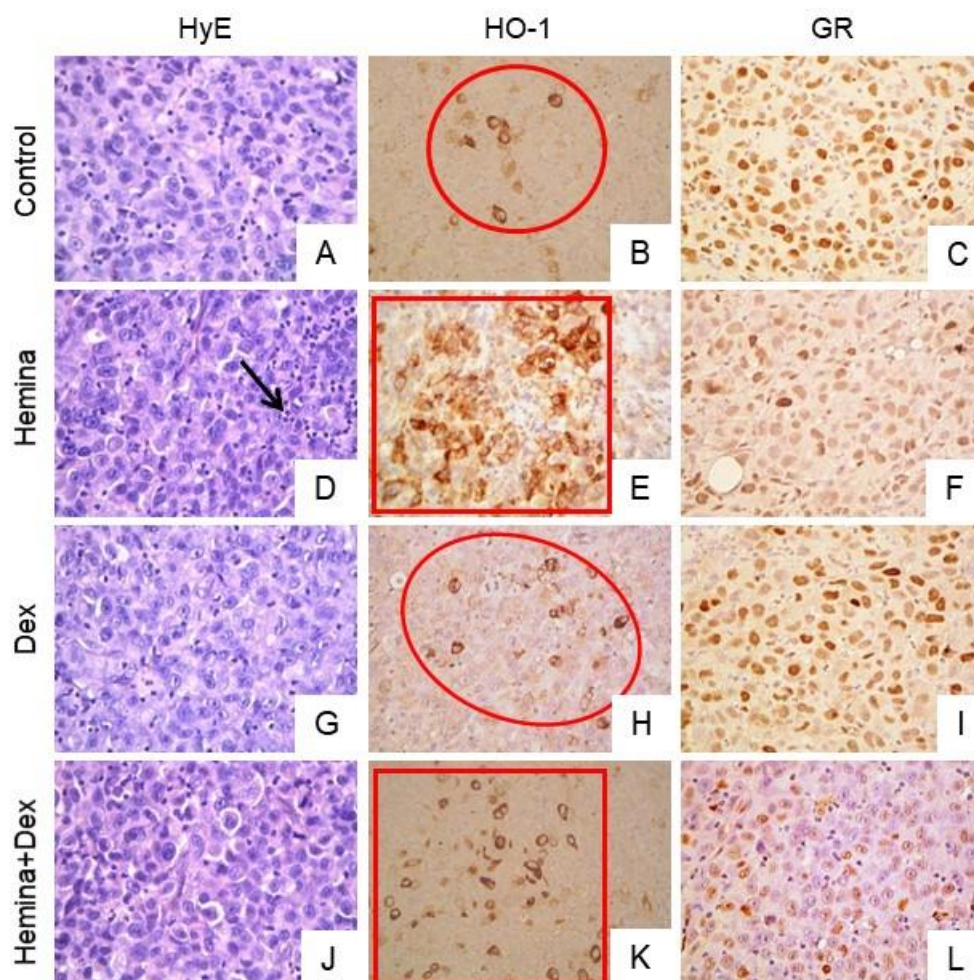


Figura 43: Inmunomarcación de HO-1 y GR en tumores de células humanas PC3 inyectadas s.c. en ratones *nu/nu* sometidos a diferentes tratamientos.

Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados, los tumores extirpados y analizados por IHQ. Se realizó la detección de HO-1 (panel central, aumento x250) y GR (panel derecho, aumento x100) utilizando anticuerpos específicos. También se muestran (panel izquierdo, aumento x250) secciones histológicas teñidas con Hematoxilina y Eosina

(HyE) de los tumores generados en los ratones y sometidos a cada uno de los tratamientos detallados.

A) El grupo control corresponde a un carcinoma cilíndrico (adenocarcinoma) poco diferenciado con B) infiltración de escasos macrófagos intratumorales con marcación citoplasmática positiva para HO-1 (círculo) y C) marcación nuclear positiva heterogénea para GR. D) En el grupo tratado con Hemina se ve un carcinoma cilíndrico (adenocarcinoma) poco diferenciado con infiltración leucocitaria intratumor (flecha), E) con numerosos macrófagos con intensa marcación para HO-1 (cuadrado) e F) inmunomarcación heterogénea entre leve e intensa para GR. G) En el grupo de Dexametasona el carcinoma cilíndrico indiferenciado muestra H) escasos macrófagos intratumorales con marcación intensa para HO-1 (círculo) y I) marcación nuclear entre moderada a intensa en el mayor porcentaje de células para GR. J) El grupo de Hemina+Dexametasona el carcinoma cilíndrico indiferenciado muestra K) regular cantidad de macrófagos intratumorales con marcación intensa para HO1 (cuadrado) y L) escasa marcación nuclear leve para GR.

	HO-1	GR
Control		
1	Tumor (-); citoplasma macrófagos positivos +	Tumor positivo núcleos ++ Heterogéneo. 50%
2	Tumor (-); citoplasma macrófagos positivos +	Tumor positivo núcleos + Heterogéneo. 50%
3	Tumor (-); citoplasma macrófagos positivos +	Tumor positivo núcleos + Heterogéneo.
4	Tumor (-); citoplasma macrófagos peritumor positivos +	Tumor positivo núcleos ++ Heterogéneo. 50-75%
5	Tumor (-); citoplasma macrófagos peritumor positivos +	Tumor positivo núcleos ++ Heterogéneo. 50%
6	Tumor (-); citoplasma macrófagos intra y peritumor positivos +++	Tumor positivo núcleos ++ Heterogéneo.
7	Tumor (-); citoplasma macrófagos intra y peritumor positivos +	Tumor positivo núcleos + Heterogéneo.
Hemina		
8	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos ++	Tumor positivo núcleos + 25%
9	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos ++	Tumor positivo núcleos +++ . 100%
10	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos ++	Tumor positivo núcleos ++/+++.
11	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos ++/+++ . 100%
12	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos + 25%
13	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos ++/+++.
14	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos ++	Tumor positivo núcleos +/++ < 25%
Dexametasona		
15	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++ = ctrl	Tumor positivo núcleos +/++ . 75%
16	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++ = ctrl	Tumor positivo núcleos +/++ . 50-75%
17	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos ++ < ctrl	Tumor positivo núcleos ++/+++ 75-100%
18	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos ++ = ctrl	Tumor positivo núcleos < 25-50%
19	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++ = ctrl	Tumor positivo núcleos +/++ . 75%
20	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos ++ < ctrl	Tumor positivo núcleos < 25-50%
21	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos ++ = ctrl	Tumor positivo núcleos ++/+++ 75-100%
Hemina+Dexametasona		
22	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos + < 25%
23	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos + < 50%
24	Tumor (-); citoplasma escasos macrófagos intratumor +++	Tumor positivo núcleos 0/+ 25-50%
25	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos 0/+ 25%
26	Tumor (-); citoplasma macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos 0/+ 25%
27	Tumor (-); citoplasma escasos macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos 0/+ 25-50%
28	Tumor (-); citoplasma escasos macrófagos intratumor positivos +++	Tumor positivo núcleos 0/+ 25-50%

Tabla 3: Resultados de IHQ de HO-1 y GR en los tumores.

Se muestran los resultados obtenidos del análisis de cortes histológicos para cada uno de los animales de los 4 tratamientos (n=7). Intensidad semicuantitativa de la marcación positiva: (+) leve; (++) moderada o (+++) intensa. La ausencia de la marcación se expresó como negativo (-) o 0. Ctrl: control. Porcentaje (%) significa cantidad estimada de células con marca positiva por campo microscópico de mediano aumento (25x).

5. Análisis de muestras tumorales de pacientes obtenidas de repositorios públicos.

5.1. Análisis por RNAseq.

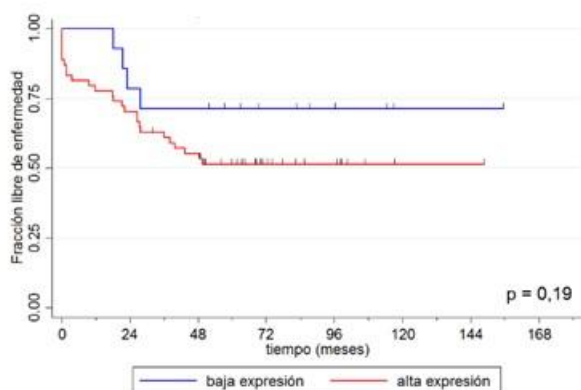
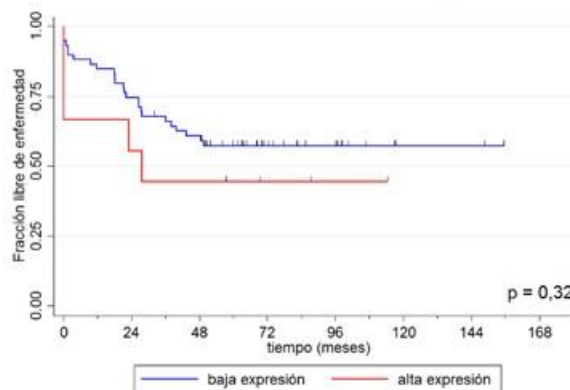
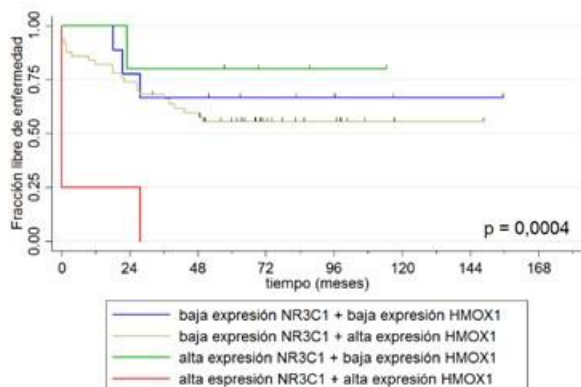
Se seleccionaron y descargaron datos de RNAseq de un repositorio público según se describió en Materiales y Métodos (sección 15.2., página 52). A continuación, se analizaron los datos clínico-patológicos de las 106 muestras con el objetivo de corroborar que estuviesen completos. En el trabajo original, como control de calidad de los experimentos, se analizaron 6 pacientes por duplicado; por lo tanto, una de las réplicas de cada paciente fue descartada de nuestro análisis. Para las 100 muestras restantes se hicieron los controles de calidad de las secuencias, descartándose 32 por ser consideradas de baja calidad¹²³. Por lo tanto, el análisis final incluyó 68 pacientes de las que se muestran los datos demográficos en la **Tabla 4**.

Datos clínico patológicos		n	%
PSA pre-quirúrgico	<4	4	6,0
	4-10	41	61,2
	>10	22	32,8
	Sin datos	1	
Gleason	6	9	13,2
	7 (3+4)	35	51,5
	7 (4+3)	14	20,6
	8	7	10,3
	9	3	4,4
	Sin datos	0	
pT	T1/2	56	82,4
	T3/4	12	17,6
	Sin datos	0	
Margen	Negativo	35	53,8
	Positivo	30	46,2
	Sin datos	3	
Recaída bioquímica	No	38	55,9
	Si	30	44,1
	Sin datos	0	

Tabla 4: Datos demográficos del grupo de pacientes estudiados.

Se analizó la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y la sobrevida libre de recaída bioquímica (SLR) según la expresión de NR3C1 y HMOX1 (**Figuras 44 y 45**). No se encontraron diferencias significativas cuando se evaluó la sobrevida según la expresión de cada gen por separado (**Figura 44, A y B**). Sin embargo, se observó que aquellos pacientes con la combinación de alta expresión

de NR3C1 y de HMOX1 presentaron una SLE significativamente menor que los demás individuos (Figura 44, C). El hazard ratio (HR) para SLE fue 9 veces más alto para pacientes con alta expresión de NR3C1 y de HMOX1 comparados con los pacientes con baja expresión de ambos genes (Figura 44, D). No se encontraron diferencias significativas entre la expresión de estos genes y SLR (Figura 45).

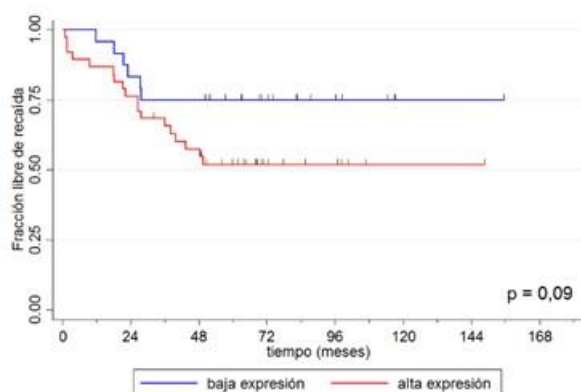
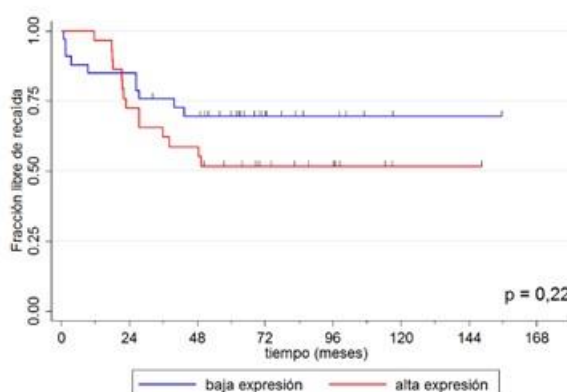
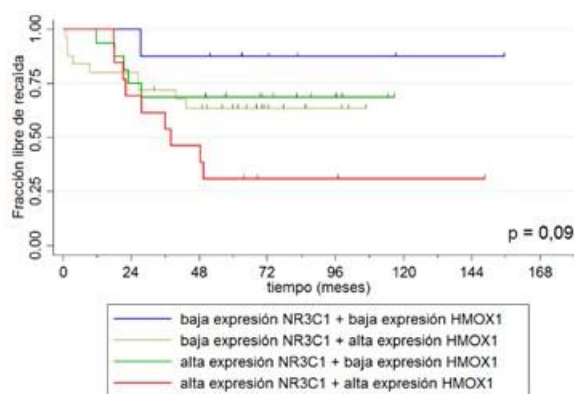
A) Kaplan Meier según expresión de *HMOX1*B) Kaplan Meier según expresión de *NR3C1*C) Kaplan Meier según expresión de *NR3C1* y *HMOX1*

D) Tabla de Hazard Ratios

Expresión génica	HR (95% IC)	p value	HR (95% IC) ^{aj}	p value ^{aj}
<i>NR3C1</i> bajo	1 (referencia)			
<i>NR3C1</i> alto	1,608 (0,615 - 4,206)	0,333	1,604 (0,342 - 7,525)	0,549
<i>HMOX1</i> bajo	1 (referencia)			
<i>HMOX1</i> alto	1,987 (0,693 - 5,697)	0,201	1,148 (0,380 - 3,466)	0,806
<i>NR3C1</i> bajo/ <i>HMOX1</i> bajo	1 (referencia)			
<i>NR3C1</i> bajo/ <i>HMOX1</i> alto	1,450 (0,434 - 4,846)	0,546	1,048 (0,299 - 3,667)	0,941
<i>NR3C1</i> alto/ <i>HMOX1</i> bajo	0,554 (0,058 - 5,328)	0,609	0,904 (0,087 - 9,428)	0,933
<i>NR3C1</i> alto/ <i>HMOX1</i> alto	9,270 (2,003 - 42,913)	0,004	8,395 (0,719 - 97,952)	0,0896

Figura 44: Análisis de SLE según la expresión de *HMOX1* y *NR3C1*.

Curvas de Kaplan-Meier donde se agruparon las muestras según alta y/o baja expresión de *NR3C1* y *HMOX1*, calculado por curvas ROC. A) y B) corresponden al análisis individual de *HMOX1* y *NR3C1*, respectivamente, y C) muestra el análisis de la expresión combinada de *HMOX1* y *NR3C1*. La comparación entre los grupos se realizó mediante el test de Log-rank. Las marcas verticales corresponden a los pacientes censurados. Aquellos pacientes con alta expresión de *NR3C1* y de *HMOX1* presentan una supervivencia libre de enfermedad significativamente menor que los otros grupos. D) Tabla de HR para SLE según la expresión de los genes *HMOX1* y *NR3C1*. ^{aj}Modelo ajustado por margen quirúrgico, PSA, Gleason y pT como covariables.

A) Kaplan Meier según expresión de *HMOX1*B) Kaplan Meier según expresión de *NR3C1*C) Kaplan Meier según expresión de *NR3C1* y *HMOX1*

D) Tabla de Hazard Ratios

Expresión génica	HR (95% IC)	p value	HR (95% IC) ^{aj}	p value ^{aj}
<i>NR3C1</i> bajo	1 (referencia)		1	
<i>NR3C1</i> alto	1,654 (0,734 - 3,729)	0,224	1,709 (0,638 - 4,582)	0,286
<i>HMOX1</i> bajo	1 (referencia)		1	
<i>HMOX1</i> alto	2,178 (0,864 - 5,491)	0,0989	1,946 (0,659 - 5,744)	0,228
<i>NR3C1</i> bajo/ <i>HMOX1</i> bajo	1 (referencia)		1	
<i>NR3C1</i> bajo/ <i>HMOX1</i> alto	3,614 (0,458 - 28,539)	0,223	1,849 (0,186 - 18,333)	0,599
<i>NR3C1</i> alto/ <i>HMOX1</i> bajo	2,923 (0,341 - 25,037)	0,327	1,743 (0,188 - 16,096)	0,624
<i>NR3C1</i> alto/ <i>HMOX1</i> alto	7,277 (0,919 - 57,564)	0,059	4,129 (0,497 - 34,283)	0,189

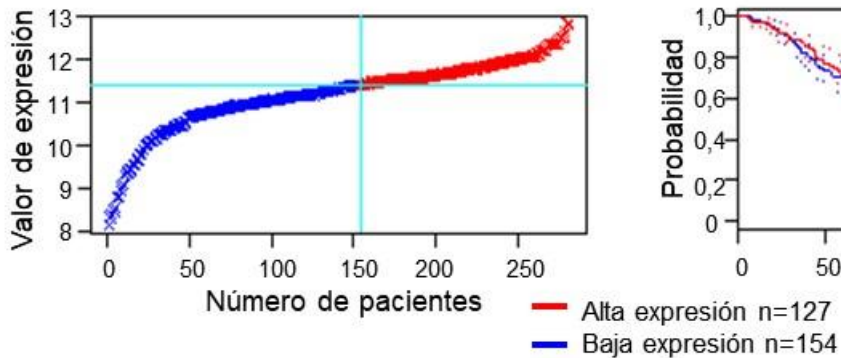
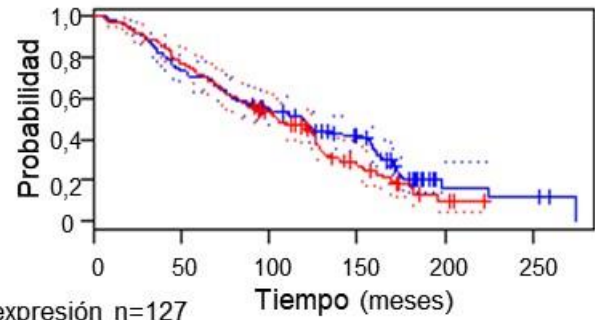
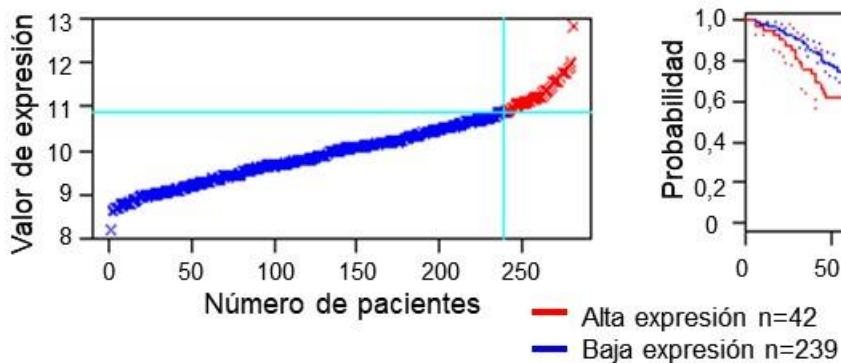
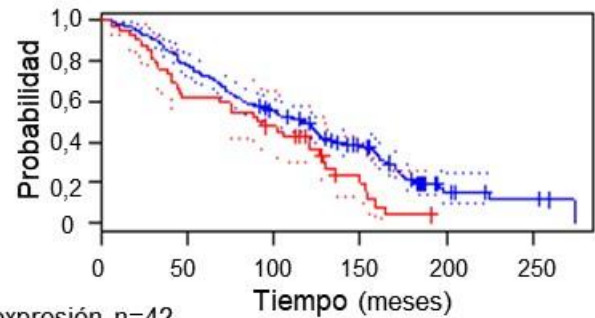
Figura 45: Análisis de SLR según la expresión de *HMOX1* y *NR3C1*.

Curvas de Kaplan-Meier donde se agruparon las muestras según alta y/o baja expresión de *NR3C1* y *HMOX1*, calculado por curvas ROC. A) y B) corresponden al análisis individual de *HMOX1* y *NR3C1*, respectivamente, y C) muestra el análisis de la expresión combinada de *HMOX1* y *NR3C1*. La comparación entre los grupos se realizó mediante el test de Log-rank. Las marcas verticales corresponden a los pacientes censurados. D) Tabla de HR para SLR según la expresión de los genes *HMOX1* y *NR3C1*. ^{aj}Modelo ajustado por margen quirúrgico, PSA, Gleason y pT como covariables.

5.2. PrognoScan

El software *PrognoScan*, de uso libre y gratuito *online*, utiliza *microarrays* de cáncer y permite el análisis entre la expresión génica y la supervivencia de los pacientes. Haciendo uso de esta herramienta se estudió la supervivencia en pacientes con CaP dependiendo del nivel de expresión de *NR3C1* y de *HMOX1*. Como se observa en la **Figura 46**, para cada gen el *cutoff* para alta y baja expresión se eligió en el punto de inflexión de la curva (mostrado en líneas turquesas) y en base a ello se obtuvieron las curvas de Kaplan-Meier. El HR para *NR3C1* es de 1,03 (95%IC=0,87-1,21) con valor $p=0,77$ y para *HMOX1* es de 1,17 (95%IC=0,99-1,39) con $p=0,062$.

Según este análisis, el nivel de expresión de estos genes no altera significativamente la supervivencia total de los pacientes con CaP (**Figura 46, B y D**).

A) Curva de expresión de *NR3C1*B) Kaplan Meier según expresión de *NR3C1*C) Curva de expresión de *HMOX1*D) Kaplan Meier según expresión de *HMOX1***Figura 46: Análisis de la expresión de *NR3C1* y *HMOX1* en pacientes con CaP.**

Utilizando la base de datos pública *Prognoscan*, se analizó la expresión de *NR3C1* y *HMOX1* en pacientes con CaP. Teniendo en cuenta el punto de corte entre baja y alta expresión definida por el punto de inflexión de la curva (A y C, línea turquesa), se graficó la supervivencia global (B y D, respectivamente).

Discusión

El CaP es la tercera causa de muerte por cáncer en hombres de nuestro país⁹. Esta enfermedad inicialmente responde a la terapia de deprivación hormonal (ADT). Sin embargo, transcurrido suficiente tiempo, la resistencia a la ADT resulta en la progresión hacia un fenotipo potencialmente letal conocido como CRPC. La aprobación reciente de las terapias antiandrogénicas de segunda generación (abiraterona y ENZ) representa los mayores avances en el tratamiento del CRPC, aunque incluso en estos casos emergen resistencias. Por ello, es de suma importancia comprender los mecanismos responsables para la respuesta y resistencia a las terapias, con el objetivo de desarrollar estrategias que mejoren el manejo de los pacientes.

Los dos grandes mecanismos involucrados en el desarrollo del CRPC son: 1) progresión hacia la completa independencia de AR, y 2) reactivación de la señalización por la amplificación del receptor, mutación del mismo, sobreexpresión de la variante de splicing V7 o intercambio de AR por GR.

Los GC se utilizan habitualmente en el CaP junto con terapias antiandrogénicas dado su acción inhibiendo el eje HPA, con la consecuente supresión de la síntesis de andrógenos en los testículos y la glándula adrenal. Además, la terapia con GC disminuye los efectos tóxicos de la quimioterapia como anti-nauseoso y anti-emético, y reduce la frecuencia de edemas producidos por los taxanos⁸⁸. Sin embargo, múltiples factores de crecimiento, factores angiogénicos y citoquinas son modulados por GR, y a su vez, este receptor puede regular un set similar aunque distinguible de genes blanco de AR, promoviendo el crecimiento tumoral⁹⁴. Por estos motivos el rol molecular de los GC en el CaP es aún controversial.

Con el fin de estudiar el eje GC/GR en el CaP, inicialmente evaluamos los efectos de distintas concentraciones de Dexametasona sobre la viabilidad de las líneas celulares PC3 (AR-/GR+) y C4-2B (AR+/GR+). Observamos que la Dexametasona en las concentraciones analizadas, entre ellas 1×10^{-8} M, no alteraba la viabilidad de estas líneas (**Figura 18**). Hallazgos de otros autores demostraron que esa dosis era suficiente para estimular la actividad transcripcional del receptor¹²⁰. Al evaluar la duración del tratamiento con Dexametasona en la línea PC3, observamos que los niveles de ARNm de *NR3C1* aumentaron significativamente a las 6 h (**Figura 19**), así como también su actividad transcripcional medida por un ensayo de genes reporteros (**Figura 21**).

Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro laboratorio con el uso de Hemina, y sabiendo que HO-1 puede regular la actividad de AR interfiriendo en la vía de STAT3⁶³ y NFκB⁶², decidimos realizar tratamientos combinados con Hemina y Dexametasona. Una vez más, verificamos que el tratamiento con Hemina disminuye la viabilidad celular en la línea PC3⁶⁰. Además,

comprobamos este mismo efecto en la línea C4-2B. La Dexametasona no afectó este parámetro en ninguna de las dos líneas celulares (**Figura 22**).

Cuando se analizó la expresión génica en la línea C4-2B, se observó que el pre-tratamiento con Hemina indujo significativamente la expresión de *HMOX1* y reprimió los niveles de *NR3C1* (**Figura 24, A y B**). Respecto a los blancos transcripcionales de GR, Dexametasona aumentó significativamente la expresión de *IKBA* y de *BCLXL*, mientras que el pre-tratamiento con Hemina revirtió este efecto (**Figura 24, C y D**).

Por RTqPCR, en la línea PC3 se corroboró que la Hemina induce la expresión de *HMOX1*⁶⁰ y, al igual que en la línea C4-2B, disminuyó los niveles de *NR3C1* (**Figura 23, A y B**). Hemina redujo significativamente la expresión de *IKBA* y de *BCLXL* (**Figura 23, C y D**). De la misma manera que en la línea C4-2B, Dexametasona incrementó la expresión de *BCLXL*, efecto que fue revertido al pre-tratar con Hemina (**Figura 23, D**). Dado que *BCLXL* es un inhibidor de la apoptosis, una menor expresión indicaría un aumento de la apoptosis y presumiblemente una disminución de la viabilidad celular. Estos resultados estarían en concordancia con la reducción de la viabilidad celular provocada por Hemina (**Figura 22**). En conclusión, en ambas líneas celulares Hemina interfiere en la expresión de *NR3C1* y en la señalización de GR activada por Dexametasona.

Si bien en ambas líneas celulares la expresión de *NR3C1* y *HMOX1* se vio regulada de la misma manera por los tratamientos, esto no ocurrió con los blancos transcripcionales de GR. Cabe destacar que estas líneas no tienen un origen común. Las PC3 derivan de una metástasis ósea a partir de un adenocarcinoma humano, mientras que las C4-2B se establecieron a partir de una metástasis ósea de la línea LNCaP, la cual fue originalmente derivada de una metástasis linfática humana¹²⁴. Además, las PC3 son insensibles a andrógenos, no expresan AR, PSA o la enzima 5 α -reductasa. Por otro lado, las C4-2B expresan un AR mutado, que les confiere cierta sensibilidad a los andrógenos y expresan 5 α -reductasa. Esto podría explicar la diferencia en la sensibilidad a los tratamientos y las distintas respuestas en la expresión génica, sumado al hecho de que ningún gen es regulado por un único factor de transcripción.

Cuando se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la expresión proteica, se observó que Hemina indujo los niveles de HO-1 tanto en PC3 como en C4-2B, tal como se esperaba teniendo en cuenta que la degradación de esta hierro protoporfirina activa el sistema anti-inflamatorio y anti-oxidante⁵³.

Por otra parte, tanto en PC3 como en C4-2B se observó que Dexametasona aumentó los niveles de GR luego de un tratamiento de 6 h (**Figura 25**). Estos resultados son contrastantes con la bibliografía que reporta que existe una regulación negativa de los niveles proteicos de GR por

GC para evitar la señalización exacerbada de la vía¹²⁵. En 2001, Nishimura *et al.* demostraron que tanto en células PC3 como en otra línea de CaP (DU145), los niveles proteicos de GR decayeron de forma dosis dependiente luego del tratamiento con Dexametasona 1×10^{-8} M¹²⁶. Sin embargo, en ese trabajo los autores realizaron tratamientos de 48 h. Cabe resaltar que en nuestras condiciones experimentales (**Figura 20**) la expresión proteica de GR cae a tiempos mayores de incubación (a partir de las 6 h). El proceso de regulación negativa, permite a los organismos protegerse frente a efectos deletéreos que ocurren luego de la prolongada estimulación hormonal¹²⁵, como por ejemplo en el síndrome de Cushing. Aunque la autorregulación negativa de GR es la respuesta más frecuentemente reportada luego del tratamiento con GC, se sabe que la respuesta es específica para cada tejido. Denton *et al.* demostraron por primera vez la regulación positiva de GR en células T humanas⁸⁷. Otro grupo de investigación reportó la existencia de 3 mecanismos involucrados en esta regulación positiva¹²⁷.

La actividad transcripcional de GR evaluada por ensayos de genes reporteros aumentó significativamente con Dexametasona en ambas líneas celulares (**Figura 26, A y B**). Sin embargo, en PC3 el pre-tratamiento con Hemina revirtió parcialmente el efecto de la Dexametasona. Para corroborar que este efecto no se debía al tratamiento secuencial de Hemina y Dexametasona, se realizó un tratamiento en simultáneo en el que las células se incubaron con Dexametasona en presencia de Hemina (**Figura 26, C**), obteniéndose los mismos resultados. En conclusión, la Hemina en PC3 inhibe parcialmente la inducción de la actividad transcripcional de GR provocada por Dexametasona. Sin embargo, en C4-2B no se observó esta reversión por Hemina. Teniendo en cuenta que el plásmido reportero MMTV-luc también puede ser activado por AR¹²⁸, lo observado en las células C4-2B podría ser el resultado de la actividad de GR y AR (constitutivamente activo), ya que este último podría estar uniéndose a los sitios del plásmido reportero y activarlo.

El factor de transcripción NFκB cumple un rol fundamental en la expresión de genes pro-inflamatorios. El rol anti-inflamatorio de los GC se debe en parte a la transrepresión de GR sobre la actividad de NFκB. Con el fin de analizar si esta transrepresión está ocurriendo en nuestro sistema experimental, se utilizó el plásmido reportero NFκB-luc que posee sitios de unión para NFκB río arriba del gen de luciferasa. El tratamiento con Dexametasona en PC3 disminuyó significativamente la actividad de luciferasa, evidenciando un aumento en la transrepresión ejercida por GR sobre NFκB (**Figura 27, A**). Este resultado es consistente con el rol anti-inflamatorio de la Dexametasona y lo reportado por Wilson *et al.* utilizando la misma línea celular en iguales condiciones de cultivo¹²⁹. Por otra parte, en C4-2B no se observó la

transrepresión provocada por Dexametasona. Sin embargo, Hemina causó una disminución de la actividad de luciferasa aunque con Dexametasona se recuperaron los niveles basales (**Figura 27, B**). Las diferencias entre las líneas podrían ser explicadas, una vez más, por la presencia o ausencia del AR. Se ha reportado que los receptores esteroideos, de nuestro interés AR y GR, pueden formar heterodímeros e inactivarse⁹². La presencia de AR en C4-2B podría favorecer la formación de dímeros AR/GR en vez de aquellos NFκB/GR, y de esta manera que haya más moléculas de NFκB libres para activar la transcripción del plásmido reportero. Sin embargo, se deberían hacer otros estudios que permitieran determinar la veracidad de estas hipótesis. Resultados previos de nuestro laboratorio⁶² muestran una disminución de la actividad de luciferasa en células PC3 tratadas con Hemina, mientras que en el presente trabajo no se observaron diferencias respecto al control. Esta discrepancia podría explicarse por el uso de suero fetal bovino depletado de hormonas, ya que Ferrando *et al.* utilizaron suero completo⁶².

Utilizando ensayos de co-inmunoprecipitación, observamos que HO-1 y GR interactúan tanto en núcleo como en citoplasma en presencia y ausencia de Hemina (**Figura 28**). Al evaluar por microscopía confocal de fluorescencia la localización subcelular de ambas proteínas en los distintos tratamientos, observamos que Hemina efectivamente induce los niveles de HO-1 total (**Figura 29**), tal como lo demostramos por WB (**Figura 25**) y se reportó en bibliografía⁵⁴. Además, con Dexametasona se inducen los niveles y la localización nuclear de GR (**Figura 29**). Sin embargo, el pre-tratamiento con Hemina causa una retención parcial de GR en citoplasma que nos permite explicar la disminución significativa de la actividad del MMTV-luc bajo el mismo tratamiento (**Figura 29**).

La translocación nuclear de GR está parcialmente regulada por las proteínas FKBP51 y FKBP52^{77,78}. Observamos que el tratamiento con Hemina+Dexametasona incrementó significativamente la expresión de FKBP51 respecto al control, mientras que con Dexametasona no hubo modificaciones (**Figura 31**). Teniendo en cuenta que FKBP51 es blanco transcripcional directo de GR, se esperaría que aumente la expresión de esta inmunofilina en las condiciones Dexametasona y Hemina+Dexametasona. El notable incremento de FKBP51 en la condición Hemina+Dexametasona podría dar cuenta de la retención parcial de GR en el citoplasma que observamos por microscopía confocal (**Figura 29**). Okamoto *et al.* reportaron que en las células CHO_{pMTGR} la translocación nuclear de GR es sensible al estado redox de las células y que este efecto se debió, en parte a la inhibición de la disociación del complejo de GR y sus chaperonas¹³⁰. Además, en cultivos primarios de linfocitos de pacientes con asma severa, donde los niveles de estrés oxidativo son elevados, se demostró que la insensibilidad a los GC está ligada a la menor importación nuclear de GR¹³¹. Aunque, el estado redox de las células podría ser una explicación

a las divergencias observadas en la localización nuclear y actividad transcripcional de GR en los distintos tratamientos, no podemos asegurar que la diferencia de estrés oxidativo sea la causante de la retención de GR en citoplasma debido a que el estado redox de las células no se midió. Si la Hemina ejerciese un efecto antioxidante debería favorecer la importación de GR al núcleo. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, en presencia de Hemina+Dexametasona hay aumento de la relación FKBP51/FKBP52 (**Figura 31**) y la consecuente retención de GR en citoplasma (**Figura 29**).

El perfil de diseminación metastásico del CaP muestra tendencia a desarrollarse en el hueso como único sitio de progresión. Las metástasis al hueso del CaP son principalmente osteoblásticas¹³². Por ello, decidimos evaluar la actividad transcripcional de GR utilizando una línea celular de preosteoblastos murinos (MC3T3) transfectada con el MMTV-luc. Al igual que en la línea prostática PC3, en células MC3T3 observamos que Dexametasona aumentó significativamente la actividad de luciferasa y el pretratamiento con Hemina revirtió parcial pero significativamente este efecto (**Figura 32**).

Para analizar la interrelación entre las células tumorales, el hueso y la expresión de GR, realizamos ensayos de co-cultivo de células PC3 y MC3T3 (**Figura 17**). En este sistema de *transwell*, las células no se encuentran en contacto directo, sino que sólo comparten el medio de cultivo. Teniendo en cuenta la plétora de factores que son liberados por las células tumorales y que varios de ellos son pro-angiogénicos y pro-inflamatorios, la modulación de la expresión de genes en las células de CaP origina un microambiente diferente al que se encuentran expuestas las células óseas. Así, el cambio ocasionado por la exposición a Hemina de las células de CaP, impactará sobre la formación/resorción del hueso. Observamos que, en ambas líneas celulares, el co-cultivo incrementó significativamente la expresión de GR a nivel de ARNm y proteína (**Figura 33, A y C**) tanto en las células tumorales como en las progenitoras óseas. En las células MC3T3 la expresión de este gen fue aún mayor cuando se co-cultivaron con las células tumorales pre-tratadas con Hemina (**Figura 33, B**). Considerando que la terapia con GC causa osteoporosis, por estimulación de la osteoclastogénesis e inhibición de la formación de hueso nuevo¹²¹, nuestros resultados sugieren que la Hemina en las condiciones experimentales podría tener efectos sobre la resorción ósea, que serían perjudiciales para la metástasis del CaP. Sin embargo, resultados previos de nuestro grupo demostraron que la disminución de la proliferación de cultivos primarios de osteoblastos (PMOs) inducida por el co-cultivo con PC3⁶⁵ se restauraba cuando las células tumorales eran pre-tratadas con Hemina⁶⁵, sin modificarse la expresión de genes involucrados en diferenciación y resorción ósea.

Considerando la importancia de la terapia con GC en pacientes con CaP, decidimos evaluar el efecto de Hemina y Dexametasona *in vivo*, utilizando un modelo de xenotransplante por inoculación de células PC3 en ratones *nu/nu*. Cuando los tumores alcanzaron el volumen deseado, los animales recibieron dosis *i.p.* de Hemina, Dexametasona, ambas drogas o PBS como control. Se observó un aumento gradual en el peso de los animales a lo largo de la experiencia, reflejando la ausencia de efectos tóxicos en las condiciones en las que se realizaron los experimentos (**Figura 36**). Al evaluar el crecimiento tumoral, no observamos diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento (**Figuras 37 y 38**). Sin embargo, se observó una tendencia no significativa hacia un mayor crecimiento tumoral en aquellos animales tratados con Hemina sola o combinada con Dexametasona (**Figuras 37 y 38**). Resultados previos de nuestro grupo mostraron que tumores generados a partir de células PC3 con inducción genética de HO-1 crecían menos que los tumores en el grupo control, debido a una disminución de la vascularización y al bloqueo de vías de señalización críticas como la de STAT3^{60,62,63}. Estos hallazgos muestran que el efecto de retardo en el crecimiento tumoral es mediado por HO-1 y ocurre cuando las células tumorales sobreexpresan dicha proteína. Esto nos lleva a plantear la hipótesis de que HO-1 puede ejercer su función antitumoral en etapas tempranas del crecimiento tumoral. En el presente trabajo de tesis el diseño experimental se basó en administrar el inductor farmacológico de HO-1 como una opción que pudiese llevarse a la clínica. Sin embargo, la administración *i.p.* de esta droga no logró inducir la expresión de HO-1 en los tumores (**Figura 41**) y por ende no se pudieron observar sus efectos antitumorales. Por otro lado, recientemente demostramos que el pre-acondicionamiento con Hemina inyectada *s.c.* en el sitio donde luego se van a inocular las células tumorales, retarda el crecimiento de carcinomas prostáticos murinos (TRAMP-C1) en ratones inmunocompetentes¹³³. Este efecto fue mediado por Galectina-1 afectando la vascularización y la respuesta inmune¹³³.

Además en esta tesis, comprobamos que la administración de Dexametasona *i.p.* no afectó el crecimiento tumoral (**Figura 37**). Estos resultados concuerdan con lo observado por Tuttle *et al.*, que reportaron que tumores de células PC3 tratados con Dexametasona (1 mg/kg) no presentaron un crecimiento significativamente diferente a los tumores control¹³⁴. Sin embargo, otros autores observaron que en ratones *nu/nu* con tumores subcutáneos generados a partir de células de CaP DU145 (AR-/GR+), el tratamiento peritumoral con Dexametasona disminuyó significativamente el crecimiento y la vasculatura de los tumores, respecto al grupo control¹³⁵. Estos autores realizaron un tratamiento más prolongado utilizando una dosis de Dexametasona menor que la empleada en esta tesis (0,04 mg/kg vs. 0,2 mg/kg). Se ha reportado que los

tratamientos con bajas dosis de GC pueden ser beneficiosos en la terapia del CRPC^{136,137}, ya que altas dosis pueden disminuir la expresión de GR y causar osteoporosis^{134,138-140}.

Por RTqPCR, observamos que la expresión de *NR3C1* disminuyó significativamente en el grupo de animales tratados con Dexametasona (**Figura 41**). Estos resultados concuerdan con la regulación negativa que ejercen los GC sobre el ARNm de GR en terapias prolongadas, a modo de evitar la exacerbación de la vía¹⁴¹. No se observaron diferencias en los niveles de ARNm de *HMOX1* entre los distintos grupos (**Figura 41**).

Por medio de WB realizados a partir de lisados tumorales, observamos que los tratamientos con Dexametasona incrementaron significativamente los niveles proteicos de HO-1 (**Figura 42**). Esto parecería ser opuesto a los resultados de IHQ (**Figura 43 y Tabla 3**) donde únicamente se observó marcación positiva para HO-1 en los macrófagos intratumorales pero no en las células tumorales. Sin embargo, vale aclarar que los lisados tumorales, a partir de los que se extrajeron las proteínas, corresponden a secciones completas de los tumores y, por lo tanto, no podría precisarse si la proteína revelada pertenece a los macrófagos, las células epiteliales tumorales o a algún otro componente celular. Duzgun *et al.* demostraron que, al tratar células de carcinoma de laringe con Dexametasona, los niveles de HO-1 aumentan significativamente¹⁰⁸. Estos autores sugieren que es el estrés oxidativo causado por Dexametasona lo que favorece el incremento en la expresión de HO-1.

Al analizar cortes histológicos de los tumores, en ninguno de los tratamientos se observó marcación positiva para HO-1 en las células tumorales (**Figura 43 y Tabla 3**). Dado que las células inoculadas (PC3) presentan niveles basales bajos de HO-1, no se esperaba hallar marcación positiva en los tumores de los grupos control y Dexametasona. Sorpresivamente, tampoco se observó inmunorreactividad en los grupos Hemina y Hemina+Dexametasona. Esto podría deberse a que la dosis y/o el modo de administración de Hemina no logró inducir la expresión de HO-1 intratumoral.

Por otra parte, en todos los tratamientos se observó inmunomarcación positiva para HO-1 en macrófagos intratumorales (**Tabla 3**), observándose mayor inmunorreactividad en los grupos tratados. Estudios recientes sugieren que los macrófagos podrían jugar un rol fundamental en la progresión del CaP. En muestras clínicas se demostró acumulación de macrófagos HO-1 positivos en los frentes invasivos de los tumores casi exclusivamente en los tumores de alto grado, sugiriendo que los macrófagos extratumorales HO-1⁺ pueden cumplir un rol importante en esta enfermedad⁶⁵. Se sabe que HO-1 se expresa en un subtipo de macrófagos y que está involucrada en la maduración de los mismos y en la polarización hacia un fenotipo M2¹⁴². Estos

autores sugieren que los macrófagos extratumorales que expresan HO-1 estarían involucrados en la agresividad y capacidad metastásica de las células cancerosas¹⁴². El grupo de Wegiel demostró que la expresión de E-caderina modulada por HO-1 en células tumorales cultivadas en presencia de macrófagos es dependiente de la actividad mitocondrial de las células tumorales, asociando de esta manera la expresión de HO-1 a la transición epitelio mesenquimal. Además estos autores sugieren que el monóxido de carbono derivado de la actividad de HO-1 de los macrófagos asociados al tumor, influencia la expresión de E-caderina impactando sobre la iniciación y progresión tumoral¹⁴³. Analizando la expresión de HO-1 en muestras humanas de CaP e hiperplasia prostática benigna (HPB), al igual que trabajos anteriores de nuestro grupo confirmaron que HO-1 se expresa en las células tumorales (resaltando su localización nuclear)⁵⁵, estromales y en las células inmunes infiltrantes¹⁴³.

Respecto al análisis IHQ observamos tinción nuclear para GR en los tumores de los 4 grupos experimentales (**Figura 43 y Tabla 3**). Los tumores tratados con Hemina+Dexametasona presentaron menor inmunorreactividad respecto al grupo control (**Tabla 3**). Es interesante resaltar que, tal como se demostró *in vitro* por inmunofluorescencia (**Figura 29**), *in vivo* también se observó una disminución en la localización nuclear de GR en los tumores tratados con Hemina+Dexametasona comparados con los del grupo de Dexametasona. En conjunto estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que la presencia de Hemina de alguna manera estaría favoreciendo la retención parcial del complejo GC/GR en citoplasma.

Dado que nuestros resultados sugieren que existe una posible modulación bidireccional entre GR y HO-1, y conociendo que HO-1 no posee en su estructura dominios de unión al ADN, decidimos analizar, por análisis *in silico*, si en la secuencia promotora de *HMOX1* existen GRE. Aunque se observaron sitios putativos para la unión de GR, los valores de q obtenidos indican que probablemente dicha unión sería al azar (Tabla 2). Sin embargo, se ha reportado que GR se une mayormente a intrones y regiones intergénicas, más que a los promotores^{144,145}. Por lo tanto, no se puede descartar que GR esté regulando la expresión de *HMOX1* por unión a estas otras regiones.

Con el objetivo de extender nuestros estudios sobre la interacción entre las vías GR/HO-1, se realizó un estudio de minería de datos de muestras de tumores prostáticos humanos utilizando bases de datos públicas. Se observó que aquellos pacientes con alta expresión de *NR3C1* y *HMOX1* presentan menor SLE, comparados con los pacientes con baja expresión de ambos genes (**Figuras 44**). Estos resultados sugieren que la asociación entre GR y HO-1 podría ser

relevante en la clasificación de los tumores de próstata, aunque se necesitan más estudios para validar estos datos.

En base a los resultados obtenidos *in vitro*, proponemos un modelo molecular simplificado que se detalla en la **Figura 47**.

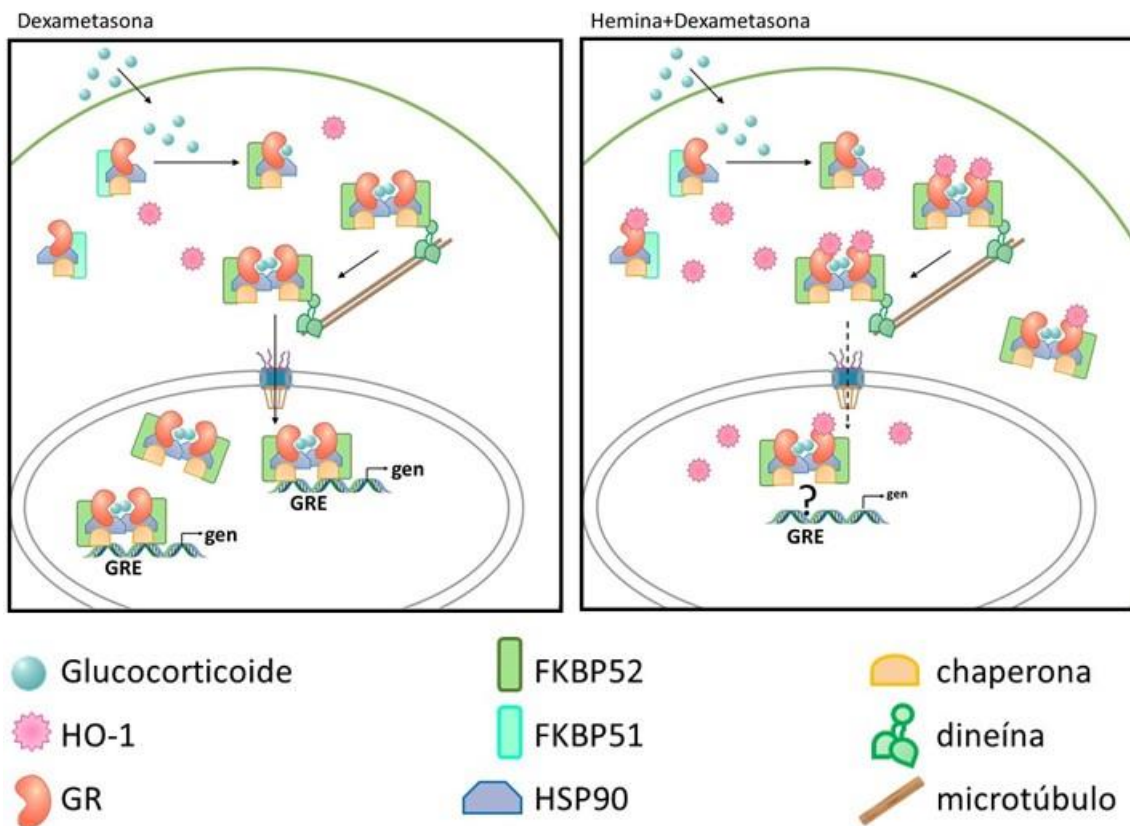


Figura 47: Modelo propuesto para la interacción entre HO-1 y GR.

En presencia de GC (Dexametasona), se forma el complejo GC/GR. GR activo se disocia de FKBP51 que se intercambia por FKBP52, y esta última se une a la dineína permitiendo el transporte del complejo activo hacia el núcleo donde se modula la transcripción de genes que responden a GR (GRE). Al tratar a las células con Hemina+Dexametasona, se observa un aumento de HO-1 tanto en núcleo como en citoplasma. Aunque la activación del receptor también ocurre, existe una retención parcial del mismo en citoplasma y una disminución de la transcripción génica.

Bibliografía

1. Balk, S. P., Ko, Y.-J. & Bubley, G. J. Biology of prostate-specific antigen. *J. Clin. Oncol.* **21**, 383–391 (2003).
2. De Marzo, A. M. *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 256–269 (2007).
3. Verze, P., Cai, T. & Lorenzetti, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat. Rev. Urol.* **13**, 379–386 (2016).
4. Liu, A. Y. *et al.* Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10705–10 (1997).
5. Abate-Shen, C. & Shen, M. M. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes and Development* **14**, 2410–2434 (2000).
6. Rane, J. K., Pellacani, D. & Maitland, N. J. Advanced prostate cancer—a case for adjuvant differentiation therapy. *Nat. Rev. Urol.* **9**, 595–602 (2012).
7. Heinlein, C. A. & Chang, C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews* **25**, 276–308 (2004).
8. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M. & Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **25**, 16–27 (2016).
9. Instituto Nacional del Cáncer. Boletín de Vigilancia Epidemiológica. (2016).
10. Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* **24**, 1967–2000 (2010).
11. Montironi, R., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Cheng, L. & Scarpelli, M. Mechanisms of Disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **4**, 321–332 (2007).
12. Udensi, U. K. & Tchounwou, P. B. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 139 (2016).
13. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359–386 (2015).
14. Witte, J. S. Prostate cancer genomics: towards a new understanding. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 77–82 (2009).
15. Cotignola, J. & Vazquez, E. Biología Molecular del Receptor Androgénico. in *Cáncer de Próstata* (eds. Montes de Oca, L. & Scorticati, C.) 19–29 (Editorial Médica Panamericana, 2014).
16. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
17. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Ha1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74. llmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
18. Mantovani, A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* **457**, 36–37 (2009).
19. Datta, D., Aftabuddin, M., Gupta, D. K., Raha, S. & Sen, P. Human Prostate Cancer Hallmarks Map. *Sci. Rep.* **6**, 30691 (2016).
20. Nakazawa, M., Antonarakis, E. S. & Luo, J. Androgen Receptor Splice Variants in the Era of Enzalutamide and Abiraterone. *Hormones and Cancer* **5**, 265–273 (2014).
21. Chen, C. D. *et al.* Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat.*

- Med.* **10**, 33–39 (2004).
22. Visakorpi, T. *et al.* In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat. Genet.* **9**, 401–406 (1995).
 23. Steinkamp, M. P. *et al.* Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res.* **69**, 4434–4442 (2009).
 24. Chen, T., Wang, L. H. & Farrar, W. L. Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* **60**, 2132–2135 (2000).
 25. Ueda, T., Mawji, N. R., Bruchoovsky, N. & Sadar, M. D. Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 38087–38094 (2002).
 26. Matsuda, T. *et al.* Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 179–187 (2001).
 27. Ottewill, P. D. *et al.* Castration-induced bone loss triggers growth of disseminated prostate cancer cells in bone. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, 769–781 (2014).
 28. Autio, K. A. & Morris, M. J. Targeting bone physiology for the treatment of metastatic prostate cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **11**, 134–143 (2013).
 29. Sun, Y. X. *et al.* Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J. Cell. Biochem.* **89**, 462–473 (2003).
 30. Logothetis, C. J. & Lin, S.-H. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 21–28 (2005).
 31. Street, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 9656–9661 (2002).
 32. Liu, W. & Zhang, X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Mol. Med. Rep.* **11**, 3212–3218 (2015).
 33. Chantrain, C. F., Feron, O., Marbaix, E. & Declerck, Y. A. Bone marrow microenvironment and tumor progression. *Cancer Microenvironment* **1**, 23–35 (2008).
 34. Turner, C. J. & Edwards, C. M. The Role of the Microenvironment in Prostate Cancer-Associated Bone Disease. *Current Osteoporosis Reports* **14**, 170–177 (2016).
 35. Ryter, S. W. & Choi, A. M. K. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 80–91 (2005).
 36. Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A. & Dulak, J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 3221–3247 (2016).
 37. McCoubrey, W. K., Ewing, J. F. & Maines, M. D. Human heme oxygenase-2: Characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 13–20 (1992).
 38. Maines, M. D., Trakshel, G. M. & Kutty, R. K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* **261**, 411–419 (1986).

39. McCoubrey, W. K., Huang, T. J. & Maines, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* **247**, 725–732 (1997).
40. Alam, J., Shibahara, S. & Smith, A. Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 6371–6375 (1989).
41. Keyse, S. M. & Tyrrell, R. M. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 99–103 (1989).
42. Foresti, R., Clark, J. E., Green, C. J. & Motterlini, R. Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells: Involvement of superoxide and peroxynitrite anions. *J. Biol. Chem.* **272**, 18411–18417 (1997).
43. Terry, C. M., Clikeman, J. A., Hoidal, J. R. & Callahan, K. S. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **274**, H883-91 (1998).
44. Abraham, N. G. & Kappas, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol. Rev.* **60**, 79–127 (2008).
45. Kim, Y.-M. *et al.* Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 137–67 (2011).
46. Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **284**, 13291–5 (2009).
47. Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M. P. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 323–354 (2010).
48. Stocker, R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun* **9**, 101–112 (1990).
49. Willis, D., Moore, a R., Frederick, R. & Willoughby, D. a. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat. Med.* **2**, 87–90 (1996).
50. Petrache, I., Otterbein, L. E., Alam, J., Wiegand, G. W. & Choi, a M. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **278**, L312–L319 (2000).
51. Hwang, H. W. *et al.* Oligomerization is crucial for the stability and function of heme oxygenase-1 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **284**, 22672–22679 (2009).
52. Li Volti, G. *et al.* Immunocytochemical localization and expression of heme oxygenase-1 in primary astroglial cell cultures during differentiation: Effect of glutamate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 517–524 (2004).
53. Suttner, D. M. *et al.* Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells. *Am. J. Physiol.* **276**, L443–L451 (1999).
54. Lin, Q. *et al.* Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **282**, 20621–20633 (2007).
55. Sacca, P. *et al.* Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *Br. J. Cancer* **97**, 1683–1689 (2007).
56. Hsu, F.-F. *et al.* Signal peptide peptidase-mediated nuclear localization of heme oxygenase-1 promotes cancer cell proliferation and invasion independent of its

- enzymatic activity. *Oncogene* **34**, 2360–2370 (2015).
57. Tertilt, M., Jozkowicz, A. & Dulak, J. Oxidative stress in tumor angiogenesis- therapeutic targets. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3877–94 (2010).
 58. Bussolati, B. & Mason, J. C. Dual role of VEGF-induced heme-oxygenase-1 in angiogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1153–1163 (2006).
 59. Jozkowicz, Alicja; Was, Halina; Dulak, J. Oxygenase-1 in Tumors : Is It a False Friend? *Antioxid Redox Signal.* **9**, 2099–2117 (2007).
 60. Gueron, G. *et al.* Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Mol. cancer Res.* **7**, 1745–55 (2009).
 61. Dong, Z. *et al.* Matrix metalloproteinase activity and osteoclasts in experimental prostate cancer bone metastasis tissue. *Am. J. Pathol.* **166**, 1173–86 (2005).
 62. Ferrando, M. *et al.* Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer. *Angiogenesis* **14**, 467–479 (2011).
 63. Elguero, B. *et al.* Unveiling the Association of STAT3 and HO-1 in Prostate Cancer: Role beyond Heme Degradation. *Neoplasia* **14**, 1043–1056 (2012).
 64. Labanca, E. *et al.* Association of HO-1 and BRCA1 Is Critical for the Maintenance of Cellular Homeostasis in Prostate Cancer. *Mol. Cancer Res.* **13**, 1455–1464 (2015).
 65. Ferrando, M. *et al.* Heme oxygenase-1 (HO-1) expression in prostate cancer cells modulates the oxidative response in bone cells. *PLoS One* **8**, (2013).
 66. Gueron, G. *et al.* Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget* **5**, 4087–4102 (2014).
 67. Paez, A. V *et al.* Heme oxygenase-1 in the forefront of a multi-molecular network that governs cell-cell contacts and filopodia-induced zippering in prostate cancer. *Cell Death Dis.* **7**, e2570 (2016).
 68. Nitti, M. *et al.* HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. *Antioxidants* **6**, 29 (2017).
 69. Maines, M. D. & Abrahamsson, P. A. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: Normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology* **47**, 727–733 (1996).
 70. Alaoui-Jamali, M. A. *et al.* A novel experimental heme oxygenase-1-targeted therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* **69**, 8017–8024 (2009).
 71. Blann, A. D., Balakrishnan, B., Ryan, P. & Lip, G. Y. H. Increased levels of plasma haemoxygenase-1 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **14**, 114–117 (2011).
 72. Li, Y. *et al.* PTEN deletion and heme oxygenase-1 overexpression cooperate in prostate cancer progression and are associated with adverse clinical outcome. *J. Pathol.* **224**, 90–100 (2011).
 73. Hartmann, K. *et al.* Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy. *Physiol. Rev.* **96**, 409–447 (2016).
 74. Duma, D., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **102**, 11–21 (2006).
 75. Lu, N. Z. & Cidlowski, J. A. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal

- glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol. Cell* **18**, 331–342 (2005).
76. Qi, D. & Rodrigues, B. Glucocorticoids produce whole body insulin resistance with changes in cardiac metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**, E654–67 (2007).
77. Galigniana, M. D., Radanyi, C., Renoir, J. M., Housley, P. R. & Pratt, W. B. Evidence that the Peptidylprolyl Isomerase Domain of the hsp90-binding Immunophilin FKBP52 is Involved in Both Dynein Interaction and Glucocorticoid Receptor Movement to the Nucleus. *J. Biol. Chem.* **276**, 14884–14889 (2001).
78. Galigniana, N. M. *et al.* Regulation of the glucocorticoid response to stress-related disorders by the Hsp90-binding immunophilin FKBP51. *Journal of Neurochemistry* **122**, 4–18 (2012).
79. Presman, D. M. & Hager, G. L. More than meets the dimer: What is the quaternary structure of the glucocorticoid receptor? *Transcription* **8**, 32–39 (2017).
80. Vandevyver, S., Dejager, L. & Libert, C. On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. *Traffic* **13**, 364–374 (2012).
81. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Haegeman, G. & Vanden, B. W. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr.Rev.* **24**, 488–522 (2003).
82. Gross, K. L. & Cidlowski, J. A. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **19**, 331–339 (2008).
83. Vanden Berghe W., De Bosscher K., Vermeulen L., De Wilde G., H. G. Induction and Repression of NF- κ B-Driven Inflammatory Genes. in *Recent Advances in Glucocorticoid Receptor Action*. **40**, (Ernst Schering Research Foundation Workshop, 2002).
84. Kassi, E. & Moutsatsou, P. Glucocorticoid receptor signaling and prostate cancer. *Cancer Letters* **302**, 1–10 (2011).
85. Okret, S., Dong, Y., Brönnegård, M. & Gustafsson, J. A. Regulation of glucocorticoid receptor expression. *Biochimie* **73**, 51–9 (1991).
86. Garside, H. *et al.* Ubch7 interacts with the glucocorticoid receptor and mediates receptor autoregulation. *J. Endocrinol.* **190**, 621–629 (2006).
87. Denton, R. R., Eisen, L. P., Elsasser, M. S. & Harmon, J. M. Differential autoregulation of glucocorticoid receptor expression in human T- and B-cell lines. *Endocrinology* **133**, 248–256 (1993).
88. Montgomery, B., Cheng, H. H., Drechsler, J. & Mostaghel, E. A. Glucocorticoids and prostate cancer treatment: friend or foe? *Asian J. Androl.* **16**, 354–8 (2014).
89. Dorff, T. B. & Crawford, E. D. Management and challenges of corticosteroid therapy in men with metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Annals of Oncology* **24**, 31–38 (2013).
90. Yemelyanov, A. *et al.* Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate. *Oncogene* **26**, 1885–1896 (2007).
91. Yano, A. *et al.* Glucocorticoids suppress tumor lymphangiogenesis of prostate cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6012–6017 (2006).
92. Chen, S. Y., Wang, J., Yu, G. Q., Liu, W. & Pearce, D. Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation: A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 14087–14092 (1997).

93. Sahu, B. *et al.* FoxA1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells. *Cancer Res.* **73**, 1570–1580 (2013).
94. Arora, V. K. *et al.* Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell* **155**, 1309–1322 (2013).
95. Narayanan, S., Srinivas, S. & Feldman, D. Androgen–glucocorticoid interactions in the era of novel prostate cancer therapy. *Nat. Rev. Urol.* **13**, 47–60 (2015).
96. Henneicke, H., Gasparini, S. J., Brennan-Speranza, T. C., Zhou, H. & Seibel, M. J. Glucocorticoids and bone: Local effects and systemic implications. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **25**, 197–211 (2014).
97. Skolarus, T. A., Caram, M. V. & Shahinian, V. B. Androgen-deprivation-associated bone disease. *Curr. Opin. Urol.* **24**, 601–607 (2014).
98. Venkitaraman, R. *et al.* A randomised phase 2 trial of dexamethasone versus prednisolone in castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* **67**, 673–679 (2015).
99. Holder, S. L., Drabick, J., Zhu, J. & Joshi, M. Dexamethasone may be the most efficacious corticosteroid for use as monotherapy in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.* **16**, 207–209 (2015).
100. Lutton, J. D. *et al.* Differential induction of heme oxygenase in the hepatocarcinoma cell line (Hep3B) by environmental agents. *J. Cell. Biochem.* **49**, 259–265 (1992).
101. Rizzardini, M., Terao, M., Falciani, F. & Cantoni, L. Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver. Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem. J.* **290** (Pt 2, 343–7 (1993).
102. Alam, J. & Zhining, D. Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 21894–21900 (1992).
103. Lavrovsky, Y., Schwartzman, M. L., Levere, R. D., Kappas, A. & Abraham, N. G. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5987–91 (1994).
104. Cantoni, L., Rossi, C., Rizzardini, M., Gadina, M. & Ghezzi, P. Interleukin-1 and tumour necrosis factor induce hepatic haem oxygenase. Feedback regulation by glucocorticoids. *Biochemical Journal* **279**, 891–894 (1991).
105. Lavrovsky, Y., Drummond, G. S. & Abraham, N. G. Downregulation of the human heme oxygenase gene by glucocorticoids and identification of 56b regulatory elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 759–65 (1996).
106. Deramaudt, T. B., da Silva, J. L., Remy, P., Kappas, A. & Abraham, N. G. Negative regulation of human heme oxygenase in microvessel endothelial cells by dexamethasone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **222**, 185–93 (1999).
107. Vallelian, F. *et al.* Glucocorticoid treatment skews human monocyte differentiation into a hemoglobin-clearance phenotype with enhanced heme-iron recycling and antioxidant capacity. *Blood* **116**, 5347–5356 (2010).
108. Duzgun, A. *et al.* Effect of dexamethasone on unfolded protein response genes (MTJ1, Grp78, Grp94, CHOP, HMOX-1) in HEp2 cell line. *Indian J. Biochem. Biophys.* **50**, 505–510 (2013).
109. Ki, S. H., Cho, I. J., Choi, D. W. & Kim, S. G. Glucocorticoid Receptor (GR)-Associated

- SMRT Binding to C/EBP β TAD and Nrf2 Neh4/5: Role of SMRT Recruited to GR in GSTA2 Gene Repression. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 4150–4165 (2005).
110. Kratschmar, D. V. *et al.* Suppression of the Nrf2-dependent antioxidant response by glucocorticoids and 11 β -HSD1-mediated glucocorticoid activation in hepatic cells. *PLoS One* **7**, (2012).
 111. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. & Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17**, 16–23 (1979).
 112. Wu, H. *et al.* Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: Role of bone stromal cells. *Int. J. Cancer* **57**, 406–412 (1994).
 113. Wang, D. *et al.* Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res.* **14**, 893–903 (1999).
 114. Lippman, S. M. *et al.* Designing the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *J. Natl. Cancer Inst.* **97**, 94–102 (2005).
 115. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 116. Sims, R. J., Liss, A. S. & Gottlieb, P. D. Normalization of luciferase reporter assays under conditions that alter internal controls. *Biotechniques* **34**, 938–940 (2003).
 117. Mulholland, D. J., Cox, M., Read, J., Rennie, P. & Nelson, C. Androgen Responsiveness of Renilla Luciferase Reporter Vectors Is Promoter, Transgene, and Cell Line Dependent. *Prostate* **59**, 115–119 (2004).
 118. Thavathiru, E. & Das, G. M. Activation of pRL-TK by 12S E1A oncoprotein: Drawbacks of using an internal reference reporter in transcription assays. *Biotechniques* **31**, 528–532 (2001).
 119. Long, Q. *et al.* Global transcriptome analysis of formalin-fixed prostate cancer specimens identifies biomarkers of disease recurrence. *Cancer Res.* **74**, 3228–3237 (2014).
 120. Kim, H. J., Park, Y. I. & Dong, M. S. Comparison of prostate cancer cell lines for androgen receptor-mediated reporter gene assays. *Toxicol. Vitro.* **20**, 1159–1167 (2006).
 121. Canalis, E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone: Implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 3441–3447 (1996).
 122. Raju, V. S., McCoubrey, W. K. & Maines, M. D. Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: Characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1351**, 89–104 (1997).
 123. Cantor, F. Estudio de ADN mitocondrial y genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. (Universidad de Buenos Aires, 2017).
 124. Russell, P. & Kingsley, E. Human Prostate Cancer Cell Lines. in *Prostate Cancer Methods and Protocols. Methods in Molecular Medicine* (Springer, Totowa, NJ, 2003).
 125. Burnstein, K. L., Bellingham, D. L., Jewell, C. M., Powell-Oliver, F. E. & Cidlowski, J. A. Autoregulation of glucocorticoid receptor gene expression. *Steroids* **56**, 52–58 (1991).
 126. Nishimura, K. *et al.* Potential Mechanism for the Effects of Dexamethasone on Growth of Androgen-Independent Prostate Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 1739–1746

- (2001).
127. Pedersen, K. B., Geng, C. D. & Vedeckis, W. V. Three mechanisms are involved in glucocorticoid receptor autoregulation in a human T-lymphoblast cell line. *Biochemistry* **43**, 10851–10858 (2004).
 128. Iguchi, K. *et al.* Antiandrogenic Activity of Resveratrol Analogs in Prostate Cancer LNCaP Cells. *J. Androl.* **33**, 1208–1215 (2012).
 129. Wilson, C. *et al.* Dexamethasone potentiates the antiangiogenic activity of docetaxel in castration-resistant prostate cancer. *Br. J. Cancer* **99**, 2054–64 (2008).
 130. Okamoto, K. *et al.* Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 10363–71 (1999).
 131. Matthews, J. G., Ito, K., Barnes, P. J. & Adcock, I. M. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 1100–1108 (2004).
 132. Logothetis, C. J., Navone, N. M. & Lin, S.-H. Understanding the biology of bone metastases: key to the effective treatment of prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1599–602 (2008).
 133. Jaworski, F. M. *et al.* *In Vivo* Hemin Conditioning Targets the Vascular and Immunologic Compartments and Restrains Prostate Tumor Development. *Clin. Cancer Res.* (2017). doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-0112
 134. Tuttle, R. M. *et al.* Effect of 5-alpha-reductase inhibition and dexamethasone administration on the growth characteristics and intratumor androgen levels of the human prostate cancer cell line PC-3. *Prostate* **24**, 229–236 (1994).
 135. Yano, A., Fujii, Y., Iwai, A., Kageyama, Y. & Kihara, K. Glucocorticoids suppress tumor angiogenesis and in vivo growth of prostate cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3003–3009 (2006).
 136. Storlie, J. A. *et al.* Prostate specific antigen levels and clinical response to low dose dexamethasone for hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *Cancer* **76**, 96–100 (1995).
 137. Nishimura, K. *et al.* Low doses of oral dexamethasone for hormone-refractory prostate carcinoma. *Cancer* **89**, 2570–2576 (2000).
 138. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **3**, 63–88 (1993).
 139. Fukawa, E. *et al.* Homologous down-regulation of the glucocorticoid receptor down-modulates cellular hormone responsiveness in human histiocytic lymphoma U937 cells. *Endocr J* **41**, 623–630 (1994).
 140. Komiya, A. *et al.* Oral low-dose dexamethasone for androgen-independent prostate cancer patients. *Oncol. Lett.* **1**, 73–79 (2010).
 141. Silva, C. M. *et al.* Regulation of the human glucocorticoid receptor by long-term and chronic treatment with glucocorticoid. *Steroids* **59**, 436–442 (1994).
 142. Nemeth, Z. *et al.* Heme oxygenase-1 in macrophages controls prostate cancer progression. *Oncotarget* **6**, 33675–33688 (2015).
 143. Halin Bergström, S. *et al.* Extratumoral heme oxygenase-1 (HO-1) expressing macrophages likely promote primary and metastatic prostate tumor growth. *PLoS One* **11**, (2016).

144. Ogara, M., Soronellas, D., Nacht, S., Pecci, A. & Vicent, G. Interacción funcional entre los receptores de glucocorticoides (GR) y de progestágenos (PR) en células epiteliales mamarias. in *LIX Reunion Anual de SAIC* (2014).
145. Ogara, M., Rodriguez Seguí, S Soronellas, D., Nacht, A., Vicent, G. & A, P. Functional crosstalk between progesterone and glucocorticoid receptors in breast cancer cells. in *SISTAM* (2015).