Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Rol de Hemo oxigenasa 1 (HO-1) en la progresión ósea del cáncer de próstata

Anselmino, Nicolás

2019

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Anselmino, Nicolás. (2019). Rol de Hemo oxigenasa 1 (HO-1) en la progresión ósea del cáncer de próstata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6574_Anselmino

Cita tipo Chicago:
Anselmino, Nicolás. "Rol de Hemo oxigenasa 1 (HO-1) en la progresión ósea del cáncer de próstata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2019.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6574_Anselmino

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

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

Rol de Hemo oxigenasa 1 (HO-1) en la progresión ósea del cáncer de próstata

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

Lic. Nicolás Anselmino

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

Director asistente: **Dra. Geraldine Gueron**

Consejero de estudios: **Dra. Verónica García**

Laboratorio de Inflamación y Cáncer

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

IQUIBICEN-CONICET

Buenos Aires, 2019

"…La economía global se ha transformado de una economía basada en lo material a una **economía basada en el conocimiento**. En épocas anteriores, las principales fuentes de riqueza eran los activos materiales, tales como minas de oro, campos de trigo y pozos de petróleo. Hoy en día, **la principal fuente de riqueza es el conocimiento**. Y aunque se pueden conquistar campos petrolíferos por medio de la guerra, no es posible adquirir el conocimiento de esta manera. De modo que a medida que el conocimiento se convertía en el recurso económico más importante, la rentabilidad de la guerra se reducía, y las guerras quedaban cada vez más restringidas a aquellas partes del mundo en que las econimías son todavía **economías anticuadas basadas en lo material**." (del libro Homo Deus; de Yuval Noah Harari)

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres. En estadíos avanzados la enfermedad puede diseminarse siendo el hueso el principal sitio de metástasis. Este no es un evento aleatorio, sino que se generan loops regulatorios de retro-alimentación entre las células de CaP y las células del microambiente de la metástasis, interrumpiendo la homeostasis del hueso. El hueso es un tejido dinámico que se somete a una remodelación mediada por el balance de osteoblastos y osteoclastos. La disrupción de este equilibrio por la presencia de células tumorales convierte el nicho óseo normal en un nicho tumoral o metastásico.

Como en otras malignidades la generación de daño oxidativo a macromoléculas y componentes celulares, y el proceso inflamatorio asociado, promueven la carcinogénesis prostática y su progresión. Se ha demostrado que las células óseas producen factores que aumentan el crecimiento y sobrevida de las células tumorales y que esta interacción, a su vez, favorece la progresión metastásica. Sin embargo, la naturaleza molecular de dicha interacción aún no se conoce completamente y existen pocos modelo experimentales apropiados para estudiar dicha interacción.

La inducción de Hemo oxigenasa 1 (HO-1) surge como un proceso de defensa celular fundamental frente a estímulos de estrés e inflamatorios. Previamente demostramos que HO-1 cumple funciones críticas antitumorales en la carcinogénesis prostática.

Nuestra hipótesis se basa en que HO-1 modifica el microambiente tumoral modulando la expresión de factores inflamatorios y angiogénicos alterando la interacción entre la célula prostática y la ósea.

Los objetivos de este trabajo de tesis fueron: evaluar el impacto fisiológico *in vivo* de la carencia de HO-1 en el metabolismo óseo de ratones *Knock-out* (KO) para *Hmox-1* (gen de HO-1); determinar el perfil transcripcional de genes involucrados tanto en la tumorigénesis como en la remodelación ósea en un sistema de co-cultivo donde células de CaP compartían el medio con cultivos primarios de osteoblastos de ratón (PMOs) aislados de ratones BALB/c *Hmox-1 +/+, +/- o -/-;* o en co-cultivo con células precursoras de osteoblastos (MC3T3) u osteoclastos (Raw264.7). También analizamos mediante proteómica el

secretoma en los medios condicionados del co-cultivo de células de CaP con precursores óseos.

El análisis histomorfométrico de los fémures de ratones transgénicos para Hmox-1 reveló una disminución de la densidad ósea concomitante con la pérdida de copias de este gen. En línea con esto se observó un menor número y actividad de osteoblastos y osteoclastos, indicando un metabolismo óseo disminuido. Se observó una correlación entre los niveles de expresión de *Hmox-1* y diferentes genes implicados en la diferenciación de osteoblastos o en la regulación de la fisiología ósea como *Runx2, Col1a1, Csf-1* y *Opg*, coincidiendo no solo con el menor número y actividad de osteoblastos, sino también con la disminución general del metabolismo óseo antes mencionada.

Mediante citometría de flujo se detectaron dos poblaciones de PMOs con diferentes niveles de ROS; la población con niveles altos estaba significativamente reducida en los animales KO, demostrando que estas células presentaban una tolerancia restringida al estrés oxidativo.

En líneas generales, el co-cultivo con células PC3 derivó en un perfil de expresión génica pro-osteolítico en las células óseas, el cual fue parcialmente revertido cuando las células tumorales se encontraban pre-tratadas con Hemina, inductor farmacológico de HO-1. Entre los principales factores alterados se *encuentran PTHrP, OPG, RANKL y RUNX2,* todos ellos fuertemente implicados en el proceso de remodelación ósea.

En resumen, los niveles de HO-1 impactan sobre la expresión de factores osteoblastogénicos y osteoclastogénicos, impactando en el balance óseo y alterando la comunicación entre las células del CaP y las células óseas.

Palabras clave:

Cáncer de Próstata

Metástasis ósea

Hemo oxigenasa 1

Osteoclasto

Osteoblasto

Co-cultivo

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the second leading cause of cancer-associated death in men. Bone is the most common and frequently the unique site of PCa progression. This is not a random event, regulatory feedback loops are generated between PCa cells and the cells in the metastatic microenvironment, interrupting bone homeostasis.

Similar to others malignances the oxidative stress damage in macromolecules and cellular components and the associated inflammatory process, promote prostate carcinogenesis and subsequent progression. It has been demonstrated that bone cells produce factors that increase the growth and survival of tumor cells, and this interaction in turn favors metastatic progression. However the molecular nature of this interaction is not yet fully known and there are scarce experimental models to study such interaction.

Heme oxygenase 1 (HO-1) induction appears as an essential process for cellular defense against inflammatory and stressor stimuli. We have previously demonstrated that HO-1 plays a critical anti-tumoral role in PCa.

Our hypothesis is that HO-1 modifies the tumor microenvironment modulating the expression of inflammatory and angiogenic factors, disrupting the bone and PCa cell interaction.

The aims of this work were: 1) to evaluate *in vivo* the pathophysiologic implications of HO-1 absence in bone metabolism of *Hmox-1* (HO-1 gene) Knock-out (KO) mice; 2) to determine the transcriptional profile of genes involved in tumorigenesis and bone turn over & remodeling, in a co-culture system in which PCa cells share the culture medium with primary mouse osteoblast (PMOs) isolated from BALB/c *Hmox-1 +/+, +/- or -/-* mice; or in co-culture with osteoblast (MC3T3) or osteoclasts (Raw264.7) precursor cell lines; 3) to assess the secretome of the conditioned medium of PCa and bone progenitor co-culture systems.

The histomorphometric analysis of the *Hmox-1* transgenic mice femurs showed significant bone density reduction concomitant with the *Hmox-1* copy loss. A positive significant correlation was observed between *Hmox-1* expression levels and different genes implicated in the osteoblast differentiation or in bone physiology regulation such as *Runx2; Col1a1; Mcsf1* and *Opg*. Accordingly, lower

number and activity of osteoblasts and general decrease in bone metabolism was observed under the same conditions.

Flow cytometry analysis, revealed two PMOs populations with different ROS levels. The population with high levels were significantly reduced in KO animals, showing that these cells have a restricted tolerance to oxidative stress. In summary, co-culture systems of PCa cells with bone cells resulted in a pro-osteolytic gene expression in the bone cells, which was partially reversed when tumor cells were pre-treated with Hemin (HO-1 specific pharmacological inductor). Among the main altered factors are *PTHrP, OPG, RANKL* and *RUNX2*, all of them strongly involved in bone turnover.

Altogether, HO-1 levels critically alters the expression of osteoblastic/osteoclastic factors, affecting bone balance and the communication between bone and prostate tumor cells.

Keywords:

Prostate Cancer

Bone Metastasis

Heme oxygenase 1

Osteoclast

Osteoblast

Co-culture

Publicaciones

Los contenidos de esta Tesis forman parte de los siguientes artículos científicos:

HMOX1 IS A PIVOTAL MODULATOR OF BONE TURN OVER AND REMODELING. MOLECULAR IMPLICATIONS FOR PROSTATE CANCER BONE METASTASIS. Anselmino N; Starbuck M; Labanca E; Cotignola J; Navone N; *Gueron G; *Zenclussen A; *Vazquez E.
Enviado para su publicación a *Bone Research*; **IMPACT FACTOR 2017: 12.354**

CLINICAL RELEVANCE OF ANNEXIN 2 IN PROSTATE CANCER BONE METASTASIS AND ITS ASSOCIATION WITH HEME-OXYGENASE 1. Anselmino N; Páez AV; Ortiz EG; Bizzotto J; Meiss RP; Cotignola J; Gueron G; Vazquez ES.
Manuscrito en preparación.

Además, mi labor como becario ha dado lugar a las siguientes publicaciones de relevancia en el área de carcinogénesis:

HEME OXYGENASE-1 IN THE FOREFRONT OF A MULTI-MOLECULAR NETWORK THAT GOVERNS CELL-CELL CONTACTS AND FILOPODIA-INDUCED ZIPPERING IN PROSTATE CANCER. Paez AV, Pallavicini C, Schuster F, Valacco MP, Giudice J, Ortiz EG, **Anselmino N**, Labanca E, Binaghi M, Salierno M, Martí MA, Cotignola JH, WoloszynskaRead A, Bruno L, Levi V, Navone N, Vazquez ES, Gueron G. *Cell Death and Disease* (2016) doi: 10.1038/cddis.2016.420- **IMPACT FACTOR 2016: 5.965**

GAME-CHANGING RESTRAINT OF ROS-DAMAGED PHENYLALANINE, UPON TUMOR METASTASIS. Gueron G, **Anselmino N**, Chiarella P, Ortiz E, Lage Vickers S, Paez A**,** Giudice J, Contin M, Leonardi D, Jaworski F, Manzano V, Strazza A, Montagna D, Labanca E, Cotignola J, D´accorso N, Wolozsynska-Read A, Navone N, Meiss R, Ruggiero R, Vazquez E. *Cell Death and Disease* (*in press*). Doi: 10.1038/s41419-017-0147-8 CDDIS-17-1570. **IMPACT FACTOR 2016: 5.965**

HEME OXYGENASE 1 IMPAIRS GLUCOCORTICOID RECEPTOR ACTIVITY IN PROSTATE CANCER. Leonardi DB, **Anselmino N**, Brandani JN, Jaworski FM, Páez AV, Mazaira G, Meiss RP, Nuñez M, Nemirovsky SI, Giudice J, Galigniana M, Pecci A, Gueron G, Vazquez E* and Cotignola J*.
Enviado para su publicación a International *Journal of Molecular Sciences*; **IMPACT FACTOR 2017: 3.687**

Agradecimientos

En primera instancia, quisiera agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, a la cual asisto hace 10 años y planeo seguir frecuentándola algún tiempo más, por la calidad y calidez tanto educativa como profesional que me formó durante todos estos años.

Al CONICET por financiar y permitir que transite este proceso. Y a aquellas que me facilitaron los recursos para formarme y nutrirme de experiencias en el exterior (Boehringer Ingelheim; AACR).

A mis directoras de tesis, la Dra. Elba Vazquez y la Dra. Geraldine Gueron, por darme la oportunidad de hacer ciencia en su laboratorio, por la exigencia y la confianza que me permitieron desplegar mis habilidades para transitar este camino.

Al Dr. Javier Cotignola por su constante buena predisposición para colaborar, aportaando su conocimiento y experiencia, siempre.

A la Dra. Verónica García, mi consejera de estudios, y su grupo, con quienes tuve el gusto de colaborar. Por brindarme siempre su apoyo y abrirme las puertas del laboratorio cada vez que lo necesite.

A quienes formaron parte del Comité de Seguimiento de mi tesis, las Dras. Alejandra Chasseing y Virginia Novaro, por su tiempo y sus aportes, más que valiosos, que contribuyeron a dar formato a esta tesis.

A los miembros del Jurado, Dra. Alejandra Chasseing, Dra. Cora Cymeryng y Dr. Alejandro Curino, por dedicar parte de su valioso tiempo para leer, pensar y evaluar mi trabajo. El cual espero no solo que esté a la altura de las circunstancias, sino que sea de su agrado.

A la Dra. Ana Zenclussen, quien me recibió en su laboratorio en Magdeburgo, poniendo a mi disposición infinidad de recursos que me permitieron generar datos muy valiosos, que fueron de gran importancia para esta tesis. También quiero agradecer a su grupo, no solo por su buena predisposición y hacerme sentir muy cómodo a la hora de trabajar, sino también por su buena onda fuera del laboratorio y su amistad.

A la Dra. Nora Navone por su generosidad y su invaluable colaboración. Quiero agradecer también a su grupo de trabajo en el MD Anderson Cancer Center, particularmente a Estefanía Labanca, cuya casilla de mail ya me debe reconocer como *Spam,* y a Michael Starbuck por dedicar su tiempo y experiencia en los estudios histomorfométricos.

Al Dr. Roberto Meiss gracias por su ayuda y dedicación en los análisis inmunihistoquímicos.

A la Dra. Pía Valaco por su colaboración en los estudios proteómicos, pero principalmente por buena predisposición para compartir su conocimiento y disipar todo tipo de dudas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Ale, Mer, Sofi, Daia, Flor, Emi, Javi, Feli y Juan. Más allá de lo académico, la buena onda y el compañerismo del grupo generan un ambiente de trabajo muy agradable, que hace que sea mucho más sencillo afrontar los desafíos de cada día.

A mi familia, especialmente a mis viejos, que siempre me impulsaron a hacer lo que me gusta; y me enseñaron con su esfuerzo constante a no bajar los brazos.

A Juli, que me acompaña, me banca y alienta cada día. Me contagia con su entusiasmo y buen humor, y hace que cada día sea un poco mejor.

A todas las personas que de una u otra manera me enseñaron, haciéndome dudar, cuestionar y cuestionarme, forzándome a ejercitar el pensamiento crítico e impidiendo que caiga en el letargo de la posverdad.

A mis abuelos, infinitamente sabios,
eternamente presentes.

Abreviaciones

Abreviación	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALA-S	Aminolevulínico sintetasa
ALP	Fosfatasa alcalína
ANXA2	Anexina A2
ANXA2R	Receptor de Anexina A2
AP1	Proteína activadora 1
AR	Receptor de andrógenos
ARE	Elementos de respuesta a antioxidantes
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AURKA	Aurora quinasa
Bach1	Proteína con dominio BTB y homólogo CNC 1
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
BMUs	Unidades multicelulares básicas
BRCA1	Proteína de cáncer de mama 1 (Brest Cancer 1)
BSP II	Sialoproteína del hueso II
CaP	Cáncer de próstata
CaSR	Receptores sensores de calcio
CBP2	Proteína de unión a CREB, tipo 2
CCL2/MCP-1	Quimioquina; Proteína quimioatractante de monocitos
cFMS	Receptor de CSF-1
CO	Monóxido de carbono
Col1a1	Colágeno tipo 1 α 1

CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CSF-1	Factor estimulante de colonias de macrófagos1
DCF	Diclorofluoreceína
DCFDA	Diclorofluoreceína diacetato
DHT	Dihidrotestosterona
DKK-1	Proteína 1 relacionada a Dickkopf
Dlx5	Factor de transcripción Distal-Less Homeobox 5
DTCs	Células tumorales diseminadas
ECL	Quimioluminiscencia aumentada (Enhanced Chemiluminescence)
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
ERG	Gen relacionado a ETS
F12	Factor 12 de coagulación
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FoxO	Factor de transcripción *Forkhead box* O
GSH	Glutatión
Het.	Heterocigota
HIF1α	Factor inducible por hipoxia 1 α
HMEC-1	Células endoteliales de la microvasculatura humana
Hmox1	Gen de Hemo-oxigenasa 1
HO-1	Hemo-oxigenasa 1
HPB	Hiperplasia prostática benigna
HR	Tasa de riezgo (Hazard ratio)

HSC	Célula madre hematopoyética
HUVEC	Células endoteliales vasculares umbilicales humanas
IF	Inminofluorescencia
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-1β	Interleuquina 1β
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
kDa	Kilo Dalton
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH tipo kelch
KO	Noqueado (modificado genéticamente para inactivar uno o mas genes)
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MC	Medios condicionados
MIF	Factor inhibidor de migración de macrófagos
MSC	Célula madre mesenquimal
MYCN	proteína protooncogénica N myc
NFκB	Factor nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2, tipo 2
OCN	Osteocalcina
ON	Osteonectina
OPG	Osteoprogeterina

OPN	Osteopontina
Osx/Sp7	Activador transcripcional Osterix
P53	Proteína supresora tumoral p53
PCA3	Antígeno 3 del cáncer de próstata
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PIN	Neoplasia prostática intraepitelial
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLG	Plasminógeno
PLK1	Quinasa tipo Polo 1
PMOs	Osteoblastos primarios murinos
PSA	Antígeno prostático específico (prostate specific antigen)
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTH	Hormona paratiroidea
PTHrP	Proteína relacionada con PTH
RANK	Receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
RB	Proteína del retinoblastoma
RE	Retículo endoplásmico
RNAseq	secuenciación de transcriptoma completo
ROS	Especies reactivas del oxígeno

RT-qPCR	Retro transcripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa
Runx2	Factor de transcripción 2 relacionado a runt
SCID	Inmunodeficiencia combinada grave
SDF-1	Factor derivado del estroma 1
SERPINF2	Miembro de la familia de serpina F 2
SNAP	S-nitroso-acetilpenicilamina
SPP	Peptidasa del péptido señal
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TCGA-PRAD	Siglas del proyecto *"The Cancer Genome Atlas-Prostate Adenocarcinoma"*
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TMA	Microarreglo de tejidos
TMPRSS2	Gen de la Serin-proteasa transmembrana 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
tPA/PLAT	Activador tisular del plasminógeno
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF
TRAP	Fosfatasa ácida resistente a tartrato
uPA/PLAU	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VEGFC	Factor de crecimiento endotelial vascular C
Wnt	Proteína int/Wingless (Sitio de integración relacionado con Wingless)
WT	Tipo salvaje (*Wild type*)

Índice

Resumen……...3

Abstract……..7

Publicaciones……..11

Agradecimientos……13

Abreviaciones……17

Índice……23

Introducción……27

1. La glándula prostática.……..……28

2. El cáncer de próstata.……...……..30

3. Tejído óseo.……...….37

3.1. Generalidades..……...37

3.2. Principales poblaciones celulares...…….……40

3.2.1. Osteoblastos…….40

3.2.2. Osteocitos…….42

3.2.3. Células de “revestimiento” óseo…..……42

3.2.4. Osteoclastos…….43

3.3. Remodelación ósea ……...44

4. Metástasis ósea del cáncer de próstata ……48

4.1. Tropismo de los tumores prostáticos por el hueso.……48

4.2. Etrés oxidativo y HO-1 en la tumorigénesis prostático y el establecimiento de la enfermedad ósea…….……53

5. Hemo oxigenasa 1…….55

5.1. Expresión, localización y función de hemo oxigenasa 1…….55

5.2. Hemo oxigenasa 1 en cáncer……58

Hipótesis y objetivos……...61

Materiales y métodos……..63

1. Cultivo celular……64

1.1. Líneas celulares utilizadas……64

1.2. Condiciones de crecimiento……....64

2. Aislamiento de PMOs ……..64

3. Tratamiento con hemina……..……65

4. Co-cultivo indirecto……..66

4.1. Co-cultivo de células óseas con células PC3. …….66

5. Análisis de la expresión génica a nivel transcripcional. ……67

5.1. Purificación de ARN total. ……67

5.2. Cuantificación de ARN. ……..68

5.3. Preparación de ADN copia (ADNc): Transcripción reversa o retrotranscripción (RT). ……...68

5.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....69

6. Análisis de los niveles de proteínas……..71

6.1. Extracción de proteínas. ……71

6.2. Medición de la concentración de proteínas……..71

6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida y detección por Western blot……..71

7. Ensayo de inmunofluorescencia……..73

8. Determinación de la concentración de Ca2+ en medios condicionados…73

9. Análisis de especies reactivas del oxígeno por citometría de flujo. ……..74

10. Ensayo de inmunohistoquímica……..74

11. Histomorfometría……...75

12. Espectrometría de masa……..77

13. Análisis bioinformático . ……...78

13.1. Meta análisis utilizando múltiples bases de datos de pacientes con CaP. ……78

13.1.1. Análisis de expresión de ANXA2 basado en plataformas en línea: Oncomine……78

13.1.2. Análisis de la expresión de ANXA2 en diferentes tejidos basado en sets de datos públicos……..79

13.1.2.1. The Cancer Genome Atlas……...80

13.1.2.2. Nelson Lab. Fred Hutchinson CRC……80

13.1.3. Análisis de ls sobrevida general y libre de recaída en relación a los niveles de expresión génica…….80

13.1.3.1. Swedish Watchful Waiting Cohort……81

13.1.3.2. Ross-Adams 2015 VALIDATION COHORT…81

13.1.4. Estudio de la expresión proteica en CaP por inmunohistoquímica en bases de datos públicas……82

Resultados……..83

1. Caracterización morfólogica, genética y fisiológica a nivel óseo de animales BALB/c *Hmox1* +/+; +/-; -/-……84

2. Efecto de la deficiencia de *Hmox1* en osteoblastos sobre la interacción con las células de CaP…….....93

3. Interacción entre las células tumorales prostáticas y los precursores óseos……..….103

3.1. Expresión de genes involucrados en la tumorigénesis y/o en la regulación de la remodelación ósea……..103

3.2. Interactores de HO-1 implicados en la colonización del nicho óseo……..109

3.2.1. Rol del eje ANXA2/ANXA2R en la tumorigénesis prostática……....109

3.3. Análisis proteómico: identificación de factores solubles involucrados en la interacción entre las células de CaP y los progenitores óseos……..121

Discusión……127

1. Expresión de genes involucrados en la tumorigénesis y/o en la regulación de la remodelación ósea……128

2. Factores relevantes en la colonización del nicho óseo por las células tumorales prostáticas……135

3. Caracterización morfólogica, genética y fisiológica a nivel óseo de animales BALB/c *Hmox1* +/+; +/-; -/-……139

4. Efecto de la deficiencia de *Hmox1* en osteoblastos sobre la interacción con las células de CaP……142

Bibliografía……149

Anexo I……..165

Anexo II……189

Introducción

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 producción y secreción del antígeno prostático específico (PSA), serin-proteasa que licúa el semen permitiendo que los espermatozoides se muevan libremente[1].

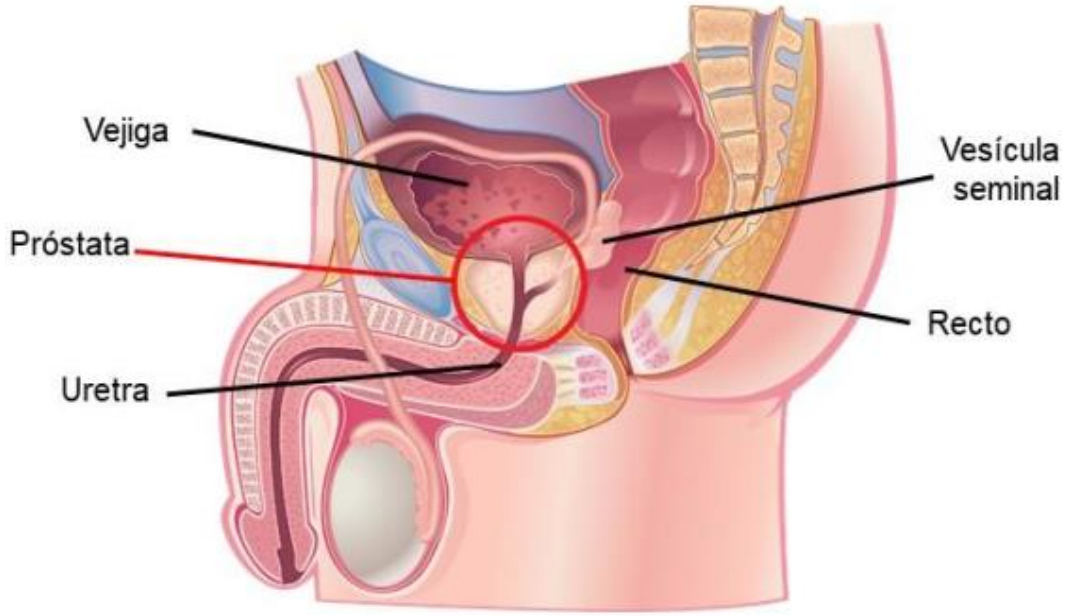


Figura 1- Localización de la próstata. Adaptación[2].

Anatómicamente, la glándula adulta se divide en diferentes 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[3,4].

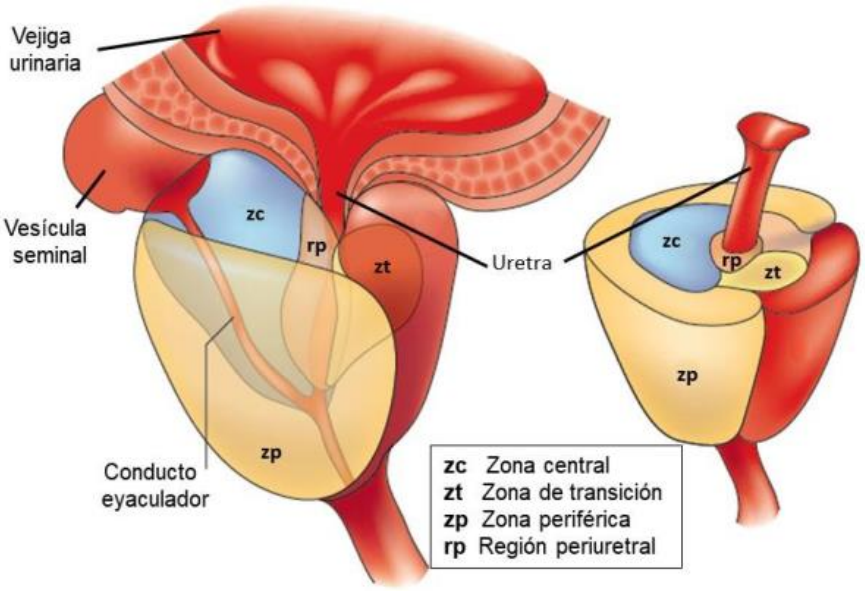


Figura 2- Zonas anatómicas de la próstata. Adaptación[3].

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, como el PSA[5]. El epitelio secretor se encuentra sostenido por una capa de células basales, de tipo epitelial cuboide, y células neuroendócrinas, estas últimas independientes de andrógenos[6]. Las células *stem* que no expresan AR se encuentran en proporción baja. Una membrana basal de matriz extracelular divide las células basales del estroma (Figura 3).

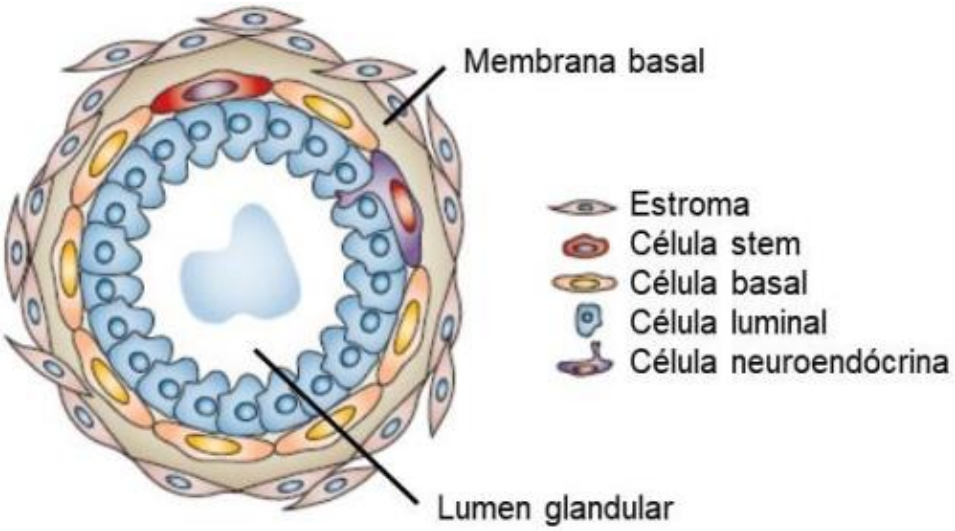


Figura 3- Histología de la próstata. Adaptación[7].

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 5α-reductasa a dihidrotestosterona (DHT), metabolito más activo (Figura 4). La unión de DHT al AR de las células glandulares prostáticas, induce la acción transcripcional del receptor[8].

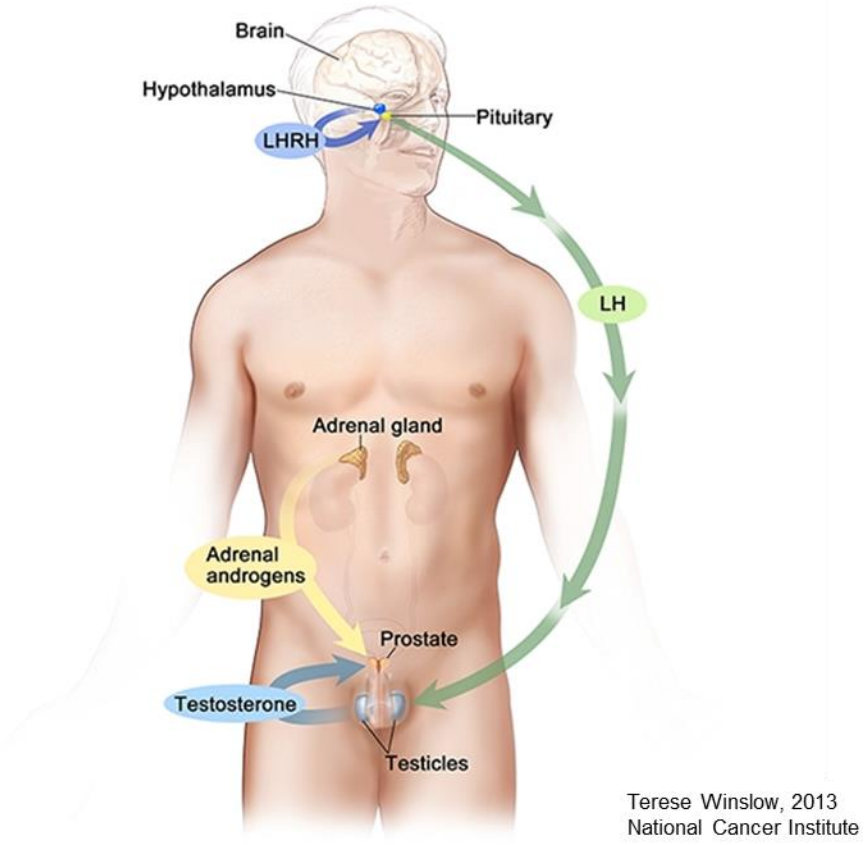


Figura 4- Esquema de la regulación de la síntesis de andrógenos[9].

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 quinta causa de muerte por cáncer en hombres de todo el mundo exceptuando el cáncer de piel[10] (Figura 5). Según el Instituto Nacional del Cáncer (INC), Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta y el CaP es el de mayor incidencia en hombres y el tercero en mortalidad, luego del carcinoma de pulmón y el cáncer colorrectal[11].

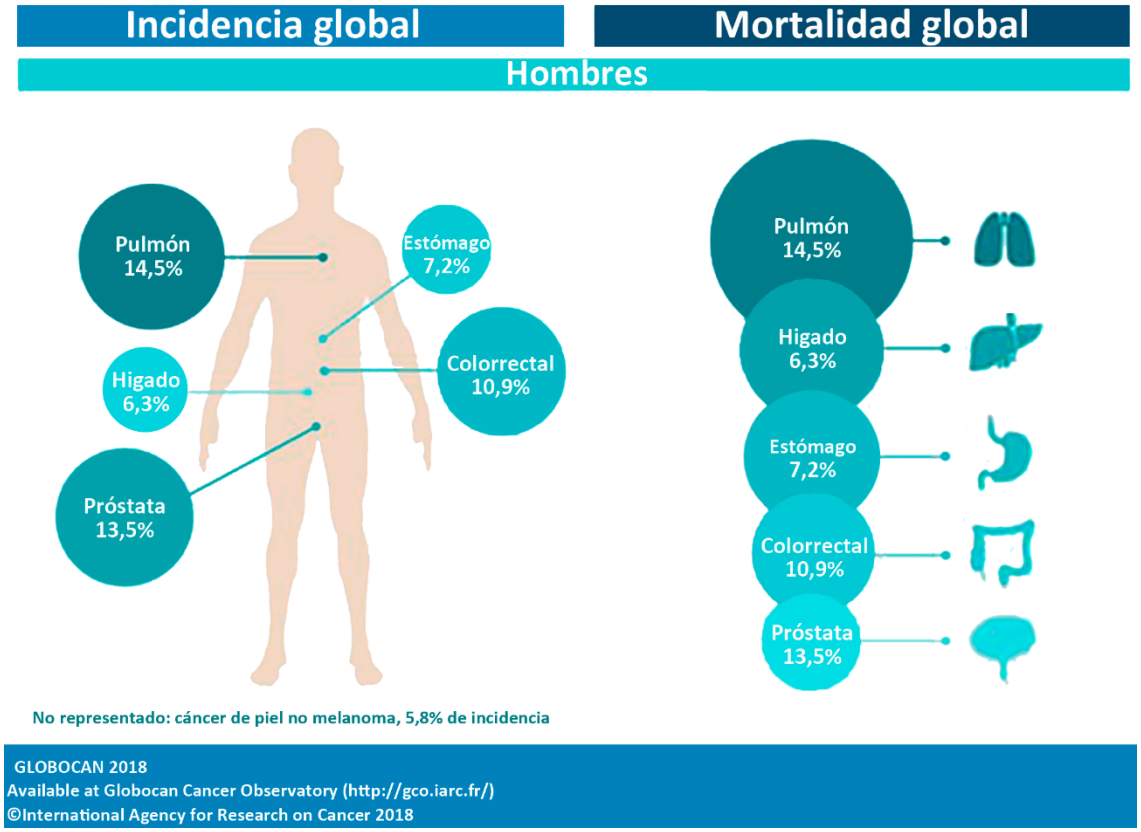


Figura 5 - Incidencia y mortalidad de cáncer en hombres a nivel mundial. Adaptación[10].

Dado que el 95% de estos tumores se desarrolla a partir de una proliferación desmedida de las células luminales (células de la glándula las células que producen el líquido prostático que se agrega al semen) en los ductos prostáticos con ruptura de la membrana basal e invasión del estroma, clasificándose como un adenocarcinoma por su origen glandular. Otros tipos de CaP incluyen: Sarcomas, carcinomas de células pequeñas, tumores neuroendocrinos, carcinomas de células transicionales, siendo todos ellos poco comunes[12,13].

Histopatológicamente, se acepta que la neoplasia prostática intraepitelial (PIN, por sus siglas en inglés) representa la etapa anterior al CaP[6,12,14] (Figura 6). En esta lesión se observan células luminales anormales, con núcleos agrandados, pero se mantiene intacta la membrana basal, sin invasión del estroma. La PIN no produce un aumento de los niveles de PSA y sólo puede ser detectado por análisis histológico[15]. Se reconocen estadios de PIN de bajo grado y alto grado. El vínculo posible entre la PIN de bajo grado y el CaP aún no está claro. Un PIN de alto grado es un marcador de riesgo para el desarrollo de CaP[12,15].

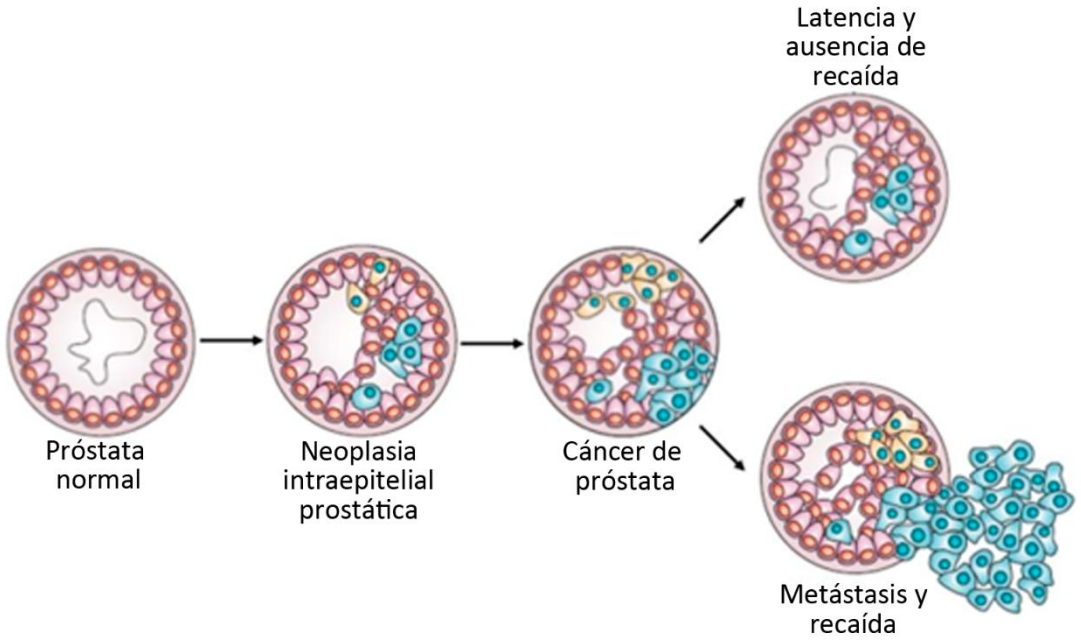


Figura 6- Evolución del cáncer de próstata. Adaptación[16].

El CaP es poco común en los hombres menores de 50 años; la incidencia aumenta rápidamente en cada decenio posterior[17]. Otros factores posibles de riesgo incluyen la raza[18], los antecedentes familiares de CaP[19], el consumo de alcohol y otros hábitos alimentarios[17,20]. Como en muchos otros tipos de cánceres, 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[20].

Los exámenes de detección pueden identificar al CaP en estadios más tempranos. Las pruebas diagnósticas iniciales consisten en la medición mediante un análisis de sangre del PSA y el examen digital a través del recto. El diagnóstico definitivo se determina a través de una biopsia prostática. Otros exámenes diagnósticos que pueden indicarse son la ecografía endorrectal, la tomografía computada o resonancia magnética (para establecer extensión local o a distancia), el centellograma óseo y rutina de laboratorio, incluyendo la medición del PSA[11].

La prueba del PSA sirve además como una herramienta para vigilar la recidiva después del tratamiento inicial y para pronosticar los desenlaces posteriores al tratamiento. Las pruebas del PSA han aumentado la tasa de detección de cánceres en estadio temprano, algunos curables mediante modalidades de terapia local y otros que no requieren tratamiento[17,21,22]. No

obstante, la posibilidad de identificar un número excesivo de falsos positivos como lesiones prostáticas benignas exige que la prueba se evalúe con cautela[17]. Muchos pacientes diagnosticados con un CaP poco agresivo reciben tratamientos que ocasionan efectos adversos sobre su salud, incluso mayores a los que puede provocar la propia enfermedad. Es por este motivo que, actualmente, desde la literatura y las sociedades médicas no se recomienda realizar detección temprana a la población general[11,17]. Si bien los exámenes de detección permiten identificar estadíos iniciales del CaP, pero no queda claro si esta detección más precoz y el consiguiente tratamiento temprano llevan a cambios en la evolución natural de la enfermedad o si reducen la mortalidad por CaP. Los datos probatorios de estudios de observación muestran una tendencia hacia una mortalidad más baja por CaP en algunos países, pero la relación entre estas tendencias y la intensidad de los exámenes de detección no es evidente; además, los vínculos con los modelos de detección son contradictorios[17].

La dificultad para prevenir el tratamiento excesivo es la incapacidad actual de distinguir con suficiente confianza, hombres que cursan una enfermedad indolente de quienes padecen una enfermedad agresiva. El estudio de los niveles de PSA no es lo suficientemente específico, llevando en algunos casos a costosas biopsias innecesarias. Repetir la prueba de PSA, y el ajuste por factores como la edad o el volumen prostático puede ayudar a decidir si hacer una biopsia o no[22]. El Índice de Salud Prostática (Prostate Health Index-PHI) y el *4K Score* son marcadores nuevos que pueden usarse alternativamente como pruebas de segunda línea[22].

Otra opción de *screening* que puede predecir si una repetición de la biopsia de próstata sería recomendable o si es factible evitar dicho procedimiento, es el test del antígeno 3 de CaP (PCA3) en orina[23], en el cual se mide el ARNm de PCA3 y PSA en muestras de la primera orina luego del análisis digito-rectal.

Aunque los métodos de detección se están ampliando, 1 de cada 4 hombres con biopsia negativa tiene CaP[24]. La preocupación de no diagnosticar tumores con relevancia clínica puede llevar a biopsias adicionales, especialmente si los niveles de PSA permanecen elevados. Vale la pena mencionar que cada biopsia puede acarrear potenciales complicaciones, incluidas molestias, hematuria, hemorragia rectal, dificultades urinarias e

infecciones; por lo tanto, es deseable reducir el número de biopsias a realizarse. Sin embargo, todavía hay una necesidad urgente de mejorar significativamente la precisión en los diagnósticos. El principal desafío en este sentido es encontrar nuevos biomarcadores capaces de estratificar el riesgo de tener CaP y de su progresión.

Entre las opciones de tratamiento disponibles para el CaP, está la prostatectomía radical, la radioterapia de haz externo, la braquiterapia, la crioterapia, la ablación focal, la privación de andrógeno con análogos de la hormona liberadora de hormona luteinizante o antiandrógenos, la privación intermitente de andrógenos, los fármacos citotóxicos y la vigilancia activa[17]. En etapas iniciales en donde el cáncer se encuentra limitado dentro de la próstata se puede optar por modalidades de tratamiento localizado, como la intervención quirúrgica (prostatectomía) y/o radioterapia (radio o braquiterapia). Estos tratamientos son equivalentes en cuanto a su efectividad, pero difieren en los efectos colaterales asociados y sus consecuencias, los más comunes son la disfunción eréctil y la incontinencia urinaria. Cuando el tumor se encuentra restringido a la glándula generalmente es dependiente de andrógenos para su crecimiento, por lo cual el bloqueo de la producción de andrógenos constituye el pilar del tratamiento. Sin embargo, se puede volver independiente de esta hormona, estadio que se conoce como resistente a la castración (CRPC)[6,14,17].

La clasificación patológica del CaP está definida por el grado de Gleason, el cual se basa en criterios morfológicos. El grado de Gleason es el método principal para la clasificación tisular del cáncer de próstata[25] y el factor pronóstico más importante para la enfermedad[26]. Un puntaje de Gleason alto predice una progresión más rápida del tumor y sugiere tratamientos más agresivos. Sin embargo, esta clasificación no brinda información sobre la selección de terapias. Como resultado, los pacientes son comúnmente agrupados por estadio clínico o estado de tratamiento[27,28]. Además, el modelo actual de progresión del CaP tampoco tiene en cuenta la observación de que el estado de progresión del cáncer determina la eficacia específica de un determinado fármaco/tratamiento[29]. En 2013 Logothetis y col. propusieron un modelo alternativo en el cual la progresión del CaP ocurre en espiral (Figura 7). Este modelo comprende 3 fases. La primera es la fase dependiente de dihidrotestosterona (DHT), en la cual el tumor responde a los tratamientos que

inhiben la 5-α-reductasa. Cuando el tumor deja de responder a la inhibición de esta enzima, entra entonces en la progresión en espiral, donde múltiples factores, incluidos cambios en la señalización por el receptor de andrógenos (AR), activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumor y cambios del microambiente, afectan la progresión tumoral. Cada giro del espiral está definido por uno o varios marcadores con valor predictivo que pueden ser blancos terapéuticos. La amplitud del giro de cada giro refleja el tiempo que el tumor responde a una terapia específica. Los cambios adaptativos que adquiere el tumor en respuesta a la terapia le brindan resistencia, llevándolo a progresar al siguiente giro del espiral, lo que indica la adquisición de nuevas alteraciones tanto en el tumor como en el microambiente. El proceso de progresión, requiere nuevas terapias específicamente dirigidas a las alteraciones características de ese giro en particular. Los marcadores que reflejan la biología que impulsa cada giro se pueden usar para guiar la aplicación de la terapia a tiempo, anticipándose a la progresión. La salida de la espiral ocurre cuando surgen una serie de mutaciones, incluidas la pérdida de AR, proteína del retinoblastoma (RB) o p53, regulación aumentada de la quinasa tipo Polo 1 (PLK1), Aurora quinasa (AURKA), y amplificación de MYCN. En esta etapa, las células de CaP escapan de la regulación por el microambiente y se vuelven autónomas.

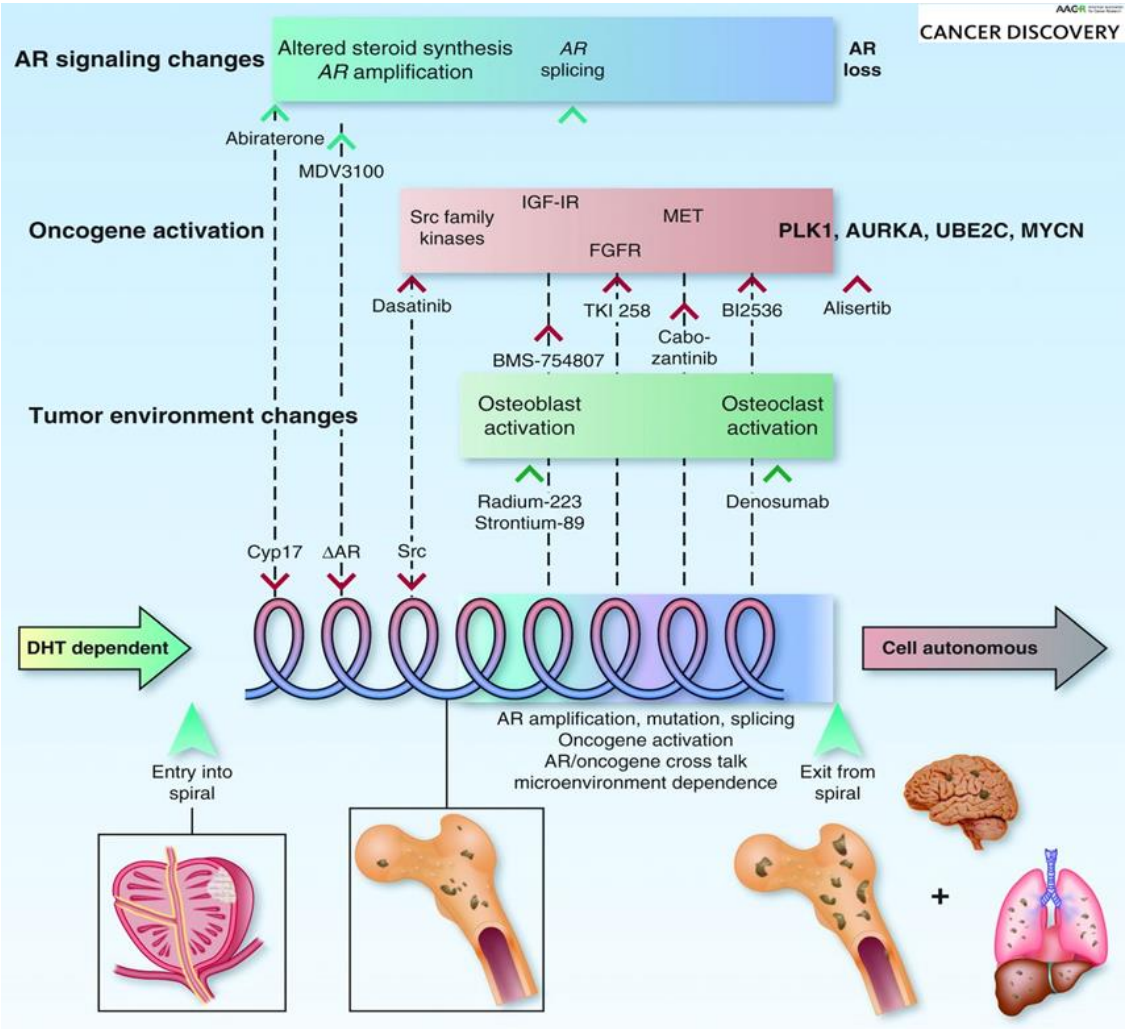


Figura 7- Modelo de progresión en espiral del cáncer de próstata propuesto por Logothetis y colaboradores[29].

Bajo la presión selectiva de la ablación de andrógenos, el CaP pasa de una regulación endócrina (por las hormonas esteroideas gonadales) a una parácrina (por factores presentes en el microambiente tumoral). Esta transición a menudo indica que el tumor se ha diseminado, lo cual representa un estadio incurable con la terapia estándar actual[29]. Durante la etapa dependiente del microambiente, la progresión del CaP está dominada por una constante adaptación por parte del tumor. Estas adaptaciones comprenden ciclos viciosos continuos, en los cuales el microambiente altera al tumor y este a su vez altera al microambiente[29,30].

La metástasis involucra cinco pasos, incluyendo la invasión local y migración a través de la matriz extracelular y entre las células estromales, intravasación a los capilares sanguíneos, supervivencia en la circulación, extravasación, colonización, y proliferación en el tejido distal[31,32]. La adquisición

de resistencia a la deprivación de andrógenos coincide con la progresión ósea del CaP, señalando la presencia de una interacción ósea-epitelial que impulsa la sorprendente progresión órgano-específica. El CaP tiene una relación única con el microambiente en la próstata y el hueso[29,33,34]. La interacción bidireccional entre las células del hueso con las células de CaP sugiere que no solo los factores de crecimiento derivados del tumor pueden afectar las células óseas, sino que las células del microambiente óseo estimulan el crecimiento del tumor metastásico. Numerosos experimentos han dado evidencia de la importancia de dicha interacción[30,35–37].

3. Tejido óseo

3.1. Generalidades

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que presenta cuatro tipos principales de células: osteoblastos, células de “revestimiento” óseo, osteocitos y osteoclastos[38]. Este tejido posee importantes funciones en el cuerpo, tales como la locomoción, soporte y protección de tejidos blandos, reservorio de calcio y fosfato, y albergue de la medula ósea[39,40]. Adicionalmente, estudios recientes se han enfocado en las funciones endócrinas del tejido óseo, el cual es capaz de afectar otros órganos[41,42].

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

La estructura básica de un hueso largo se puede dividir en varias regiones (Figura 8):

- Epífisis: Es la región entre la placa de crecimiento y el extremo del hueso, cubierto por cartílago articular. En una persona adulta, la epífisis consiste en abundante hueso trabecular y una fina capa de hueso cortical. Algunos tumores óseos, como el condroblastoma, tienen una fuerte predilección para crecer en

esta región.

- Metáfisis: Es la región de unión entre la placa de crecimiento y la diáfisis. Contiene abundante hueso trabecular y un adelgazamiento en el hueso cortical respecto a la diáfisis. Esta región es un sitio común para muchos tumores óseos primarios.
- Diáfisis: Es el eje de los huesos largos y está localizada entre las metáfisis. Está compuesta principalmente por hueso cortical compacto. Posee un canal medular que contiene la médula y una pequeña cantidad de hueso trabecular.
- Placa de crecimiento: Separa la epífisis de la metáfisis. Es la zona de osificación endocondral en un hueso en crecimiento activo. En un hueso adulto ya desarrollado sólo queda su cicatriz.

El endostio reviste todas las superficies internas del hueso, incluyendo los espacios medulares y conductos vasculares. El periostio es la membrana externa que rodea las partes de los huesos que no están cubiertas por los cartílagos. Tiene dos capas: la externa, que está compuesta por tejido conectivo denso e irregular que contiene vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios y la interna u osteogénica que contiene fibras elásticas, vasos sanguíneas y diferentes tipos de células óseas. Se le llama sistema de Havers (u osteona) a la unidad fisiológica y anatómica del tejido óseo compacto. Está formado por un canal central y por varias laminillas de colágeno a su alrededor, las cuales contienen lagunas con osteocitos. Por el conducto central, llamado conducto de Havers, corren vasos sanguíneos y nervios, encargados de irrigar y enervar las células del tejido óseo compacto. Esto se logra a través de los canalículos calcóforos (disposición radial) que comunican desde el conducto de Havers hacia las lagunas más cercanas del tejido, donde se encuentran las células óseas. Cada osteocito introduce sus prolongaciones citoplasmáticas en dichos canalículos, para contactarse con otros osteocitos y con el conducto de Havers. Los conductos de Volkmann atraviesan totalmente las osteonas poniendo en contacto los conductos de Havers entre sí. Estos conductos, no están rodeados por laminillas y por ellos penetran los vasos desde el periostio y el canal medular conectándolos con las osteonas.

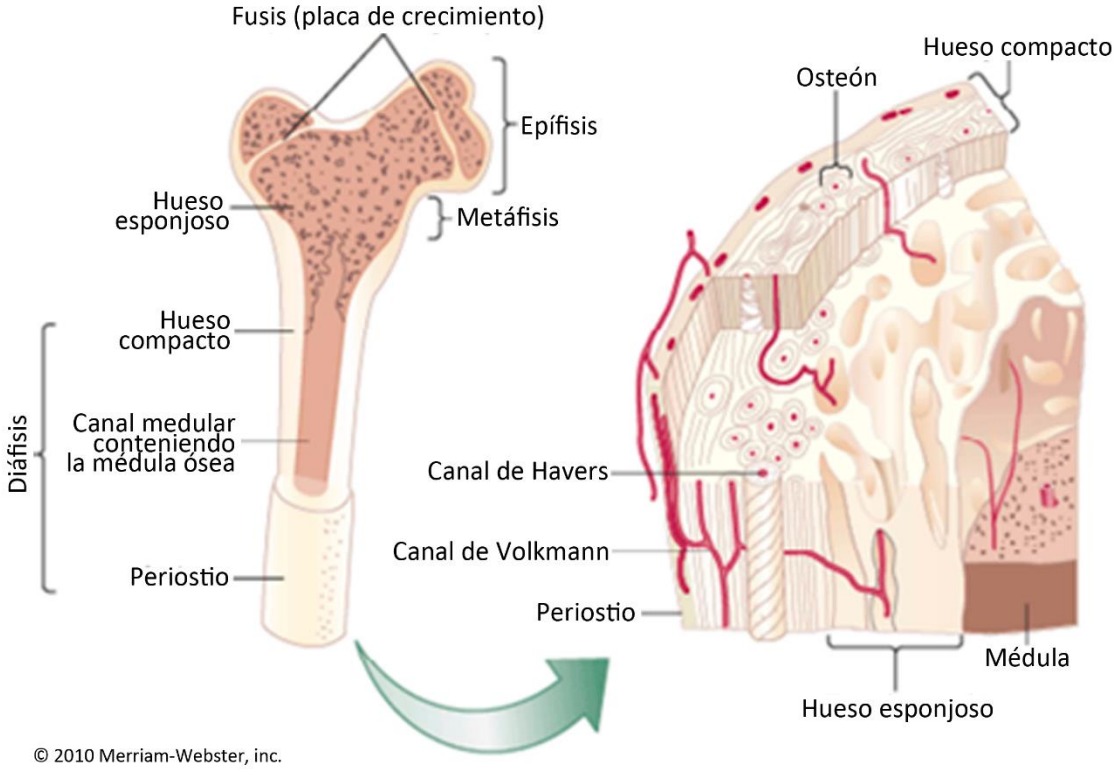


Figura 8- Estructura del hueso. Adaptación[43].

A pesar de su apariencia inerte, el hueso es un órgano altamente dinámico el cual es continuamente degradado por osteoclastos y regenerado por osteoblastos. Existe evidencia de que los osteocitos actúan como mecanosensores y moderadores del proceso de remodelación[44–46]. La función de las células de "revestimiento" óseo no es clara, pero parecen cumplir un papel importante en el acoplamiento de los procesos de resorción y formación ósea[47].

El hueso está compuesto por sales inorgánicas, principalmente en iones calcio y fosfato[38,48], y una matriz orgánica compuesta por proteínas de colágeno (90%), predominantemente colágeno tipo I, y otras proteínas incluidas osteocalcina (OCN), osteonectina (ON), osteopontina (OPN), fibronectina, sialoproteinas de hueso II (BSP II), proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), y factores de crecimiento[49,50]. También contiene proteoglicanos pequeños, ricos en leucina y proteínas séricas[50,51]. Los iones calcio y fosfato se nuclean para formar los cristales de hidroxiapatita, representados por la formula química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Junto con el colágeno, la matriz proteica no colágena forma un soporte para la deposición de la hidroxiapatita, y esta asociación es responsable de la estructura y resistencia del tejido óseo[40].

3.2. Principales poblaciones celulares

3.2.1. Osteoblastos

Los osteoblastos son responsables de la formación de hueso ya que sintetizan y secretan proteínas para formar el osteoide, el cual luego será mineralizado y se convertirá en hueso maduro[42]. Son células cuboides localizadas a lo largo de la superficie ósea y comprenden entre el 4-6 % del total de células residentes del hueso[52].

Derivan de células madre mesenquimales (MSC), las cuales también pueden diferenciarse a otros tipos celulares incluyendo adipocitos y condrocitos[53]. El compromiso de las MSC hacia un linaje de progenitor óseo requiere de la expresión de genes específicos, seguidos de pasos temporalmente programados que incluyen la síntesis de BMPs y miembros de la vía de Wnt (int/Wingless)[54]. La expresión del factor de transcripción 2 relacionado a runt (Runx2), factor de transcripción involucrado en la diferenciación de osteoblastos y la morfogénesis; Distal-Less Homeobox 5 (Dlx5), Factor de transcripción involucrado en el desarrollo del hueso; y el activador transcripcional Osterix (Osx/Sp7), son cruciales para la diferenciación de los osteoblastos[52,55]. Runx2 es un gen maestro para este proceso, como lo demuestra el hecho de que ratones deficientes para esta proteína carecen de osteoblastos[55,56]. Por otro lado, ha sido demostrado que Runx2 es capaz de regular positivamente genes osteoblásticos como colágeno tipo I (Col1a1), fosfatasa alcalina (ALP), BSP, y OCN[57].

Los osteoblastos maduros aparecen como una capa simple de células cuboides con alto contenido de retículo endoplasmático rugoso y grandes complejos de Golgi. Algunos de estos osteoblastos exhiben complejos citoplasmáticos hacia la matriz ósea, alcanzando las prolongaciones de los osteocitos[58]. En este estadio, el osteoblasto maduro puede entrar en apoptosis o derivar en osteocito o célula de “revestimiento” del hueso[59].

La diferenciación de los osteoblastos es contralada por vías de señalización complejas que regulan la expresión de genes tanto a nivel transcripcional como traduccional. Como ya mencionamos previamente Runx-2 (o Cbfa1) es un factor de transcripción crucial para la diferenciación de estas células.

Uno de los primeros marcadores de diferenciación que expresan los osteoblastos inmaduros es ALP. Los marcadores de diferenciación tardíos son los responsables de la deposición de la matriz ósea. Las BMPs juegan un rol importante en la diferenciación, al igual que otros factores como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF-β), ya que estimulan el crecimiento y diferenciación de estas células[60].

Los osteoblastos son además necesarios para la diferenciación de los osteoclastos, las células responsables de la degradación del hueso. Los osteoblastos expresan el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL), el cual se une a su receptor (RANK) en la superficie de los osteoclastos favoreciendo su diferenciación y actividad. A su vez, los osteoblastos también secretan el receptor decoy de RANKL, osteoprogeterina (OPG), que compite con RANK por la unión a RANKL, disminuyendo los niveles de RANKL disponibles para la activación de los osteoclastos. Del balance entre la expresión de RANKL y OPG en los osteoblastos se determinará el efecto neto sobre los osteoclastos (Figura 9)[61].

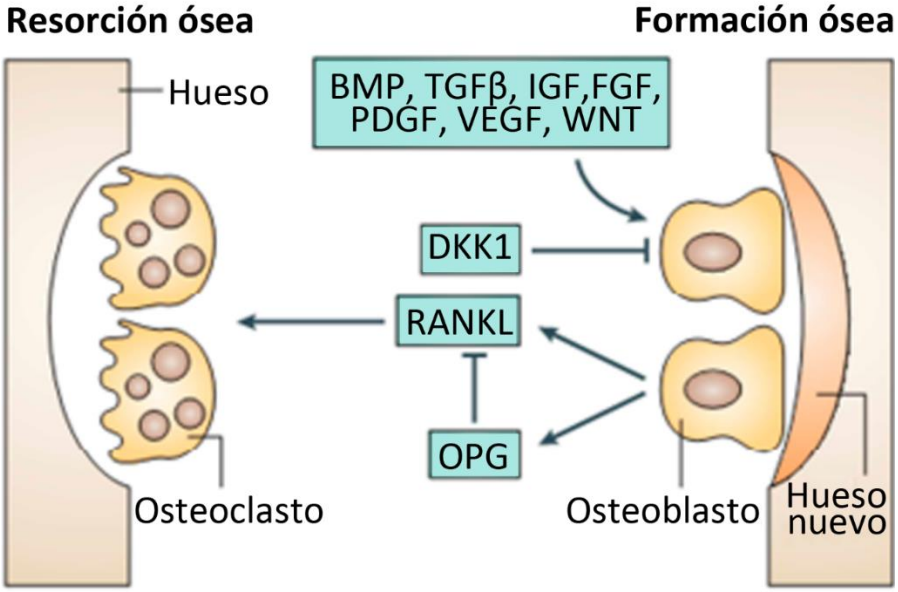


Figura 9- Rol de los osteoblastos y osteoclastos en la remodelación ósea. Los osteoblastos regulan la diferenciación y activación de los osteoclastos a través de la expresión de citoquinas, como RANKL y OPG. Entre los factores que estimulan la diferenciación de los osteoblastos se encuentran BMPs, TGF- β, IGF, FGF, PDGF, VEGF y WNT. DKK1 es antagonista de WNT y bloquea la vía canónica[34].

3.2.2. Osteocitos

Los osteocitos comprenden un 90-95% del total de las células del hueso y son las células más abundantes y longevas, con una vida útil de más de 25 años[62]. Estas células derivan del linaje de MSCs a través de la diferenciación osteoblástica. En este proceso se reconocen cuatro estadios: osteoide-osteocito, preosteocito, osteocito inmaduro y osteocito maduro[62]. Al final del ciclo de formación ósea, una subpoblación de osteoblastos deriva en osteocitos incorporados a la matriz ósea.

Mientras que el cuerpo celular del osteocito está localizado en el interior de las lacunas rodeado de matriz ósea mineralizada[63,64], sus procesos/prolongaciones citoplasmáticos (más de 50 por cada célula) atraviesan pequeños túneles que se originan desde la lacuna, llamados canalículos, formando el sistema lacuno-canalicular del osteocito[65]. Estos procesos proyecciones citoplasmáticos están conectados con las prolongaciones de osteocitos vecinos mediante uniones “gap”, así como a los proyecciones citoplasmáticas de osteoblastos y células de “revestimiento” del hueso en la superficie ósea, facilitando el transporte intracelular de pequeñas moléculas de señalización como prostaglandinas y óxido nítrico entre estas células[42]. A través del sistema lacuno-canalicular, el osteocito actúa como mecanosensor ya que su red tiene la capacidad de detectar presiones y cargas mecánicas, ayudando de ese modo a la adaptación del hueso a las fuerzas mecánicas diarias[64]. En este sentido, los osteocitos parecen actuar como orquestadores de la remodelación ósea, mediante la regulación de la actividad de osteoblastos y osteoclastos[63,66]. Más aún, se vio que la apoptosis en osteocitos puede generar señales quimiotácticas para la resorción ósea por osteoclastos[67,68]. De acuerdo con esto, se ha observado que durante la resorción ósea, los osteocitos apoptóticos son fagocitados por osteoclastos[69].

3.2.3. Células de “revestimiento” óseo

Las células de “revestimiento” del hueso son osteoblastos quiescentes y de forma aplanada que cubren la superficie ósea, donde ni la resorción ni la formación ósea ocurre[70]. La función de estas células no se conoce completamente, pero se ha visto que previenen la interacción directa entre los osteoclastos y la matriz ósea cuando la resorción ósea no debe ocurrir. También

participan en la diferenciación de los osteoclastos produciendo OPG y RANKL[71]. Más aún, las células de “revestimiento” del hueso, junto con otras células, son un componente importante de estructuras anatómicas temporarias denominadas unidades multicelulares básicas (BMUs)[47].

3.2.4. Osteoclastos

Los osteoclastos son células diferenciadas multinucleadas que se originan a partir de células mononucleares del linaje de las células madre hematopoyéticas (HSC), bajo la influencia de varios factores[72]. Entre estos factores están incluidos el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF-1), secretado por células mesenquimales progenitoras óseas y osteoblastos[73,74], y RANKL, secretado por osteoblastos, osteocitos y células estromales[75]. En conjunto, estos factores promueven la activación de factores de transcripción[73,76] y la transcripción de genes en los osteoclastos[77,78].

Estas células se localizan en el endostio y en el periostio y se caracterizan por tener dos formas funcionales. Una es cuando migran desde la médula ósea hacia el sitio de resorción y presentan una forma aplanada y no polarizada. Pero durante la remodelación ósea los osteoclastos se polarizan, exhibiendo cuatro tipos de dominio de membrana: la zona de sellado y el borde rugoso o en forma de “cepillo” que están en contacto con la matriz ósea, y los dominios basolateral y secretor (algunos autores consideran el dominio basolateral dentro del secretor) los cuales no están en contacto con la matriz ósea[79]. Cuando se inicia la resorción ósea, los osteoclastos liberan desde el dominio con forma de “cepillo” vesículas con ácido clorhídrico y proteasas, las cuales disuelven los cristales de hidroxiapatita y a su vez las proteasas degradan la matriz orgánica formando una laguna de resorción. Los productos de la degradación son endocitados, transportados a través de la célula y exocitados en el dominio secretor, permitiéndoles así degradar grandes cantidades de hueso sin alejarse de la superficie de resorción[80].

Los factores necesarios y suficientes para la osteoclastogénesis son CSF-1 y RANKL. CSF-1, producido por los osteoblastos y por las células del estroma, se une a su receptor cFMS, presente en los precursores de osteoclastos, estimulando su proliferación e inhibiendo su apoptosis[76]. RANKL es un factor

crucial para la osteoclastogénesis, expresado por osteoblastos, osteocitos y células estromales. Cuando se une a su receptor RANK en los precursores de osteoclastos, se induce la formación de osteoclastos. Las células comienzan a expresar la fosfatasa ácida resistente al tartrato, un marcador de diferenciación de los osteoclastos, luego se fusionan y comienzan a expresar otros marcadores de diferenciación como el receptor de calcitonina y la catepsina K[81,82]. Por otro lado, varios tipos celulares, incluidos osteoblastos, células estromales y fibroblastos, producen OPG[83–85], el cual se une a RANKL previniendo la interacción RANK/RANKL y, consecuentemente, inhibiendo la osteoclastogénesis[83]. Así, el sistema RANKL/RANK/OPG es el principal mediador este proceso[85].

Se demostró que el potencial osteoclastogénico puede diferir dependiendo del sitio del hueso en consideración. Así, los osteoclastos de medula ósea de huesos largos se forman más rápido que los de la mandíbula. Esta dinámica diferente posiblemente se deba a la composición celular de la médula ósea específica de cada sitio[86].

Existe evidencia de que los osteoclastos cumplen otras funciones. Por ejemplo, se ha visto que los osteoclastos producen factores, llamados clastoquinas, que controlan a los osteoblastos durante el ciclo de remodelación ósea. Otra evidencia indica que los osteoclastos serían capaces de regular directamente el nicho de las HSCs[87].

3.3. Remodelación ósea

El proceso de remodelación ósea es un ciclo altamente complejo que es llevado a cabo por la acción concertada de osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células de “revestimiento” del hueso[39]. La formación, proliferación, diferenciación y actividad de estas células está controlada por factores locales y sistémicos[88] (Figura 10). Los factores locales incluyen moléculas autócrinas y parácrinas tales como factores de crecimiento, citoquinas y prostaglandinas producidas por las células óseas, además de factores de la matriz ósea que son liberados durante el proceso de resorción[58,89]. Los factores sistémicos importantes para el mantenimiento de la homeostasis ósea incluyen a la hormona paratiroidea (PTH), calcitonina, 1,25-dihidroxi vitamina D3 (calcitriol),

glucocorticoides, andrógenos y estrógenos[42]. La proteína relacionada con PTH (PTHrP), que también se une al receptor de PTH, es crítica en la remodelación ósea[90].

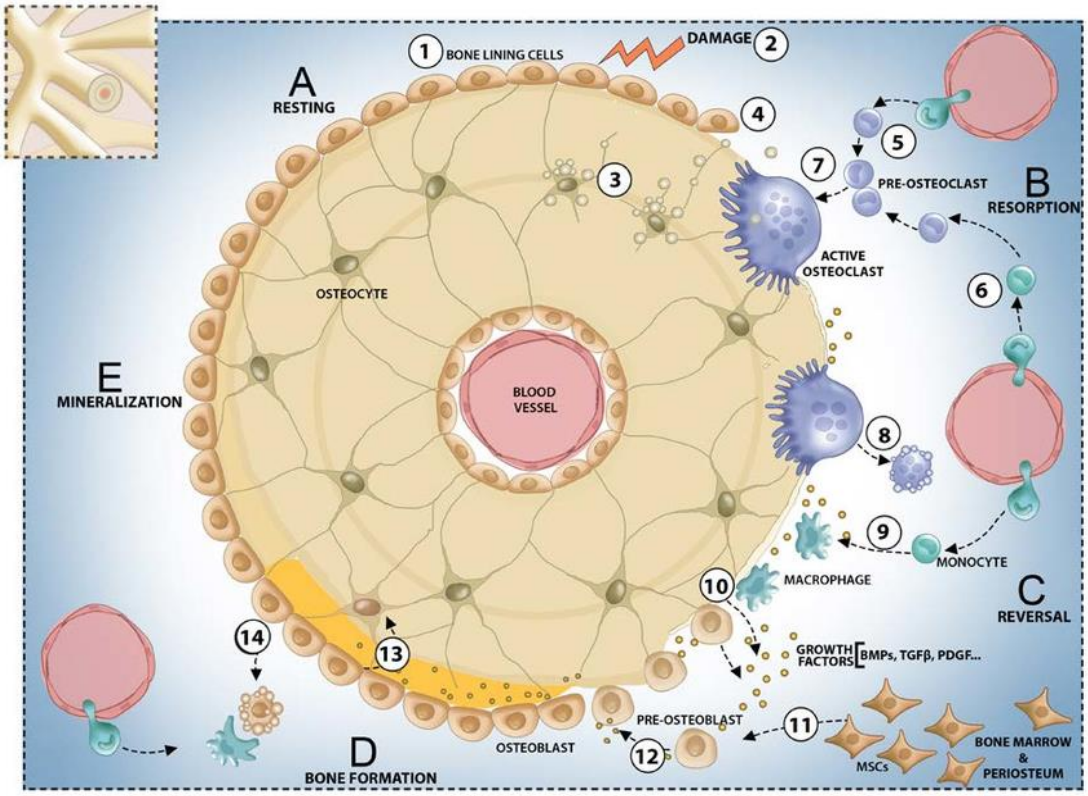


Figura 10- Ciclo de remodelación ósea. Esquema general[91].

El ciclo de remodelación ósea tiene lugar dentro de cavidades que necesitan ser remodeladas en el hueso[92]. En dichas cavidades, se da la formación de las BMU, que están formados por un grupo de osteoclastos que forman el cono de corte y un grupo de osteoblastos que forman el cono de cierre, y asociados con la vasculatura y la inervación periférica. Si bien se lo define como un ciclo, se pueden distinguir las fases de iniciación, transición y terminación del proceso de remodelación (Figura 11)[92,93].

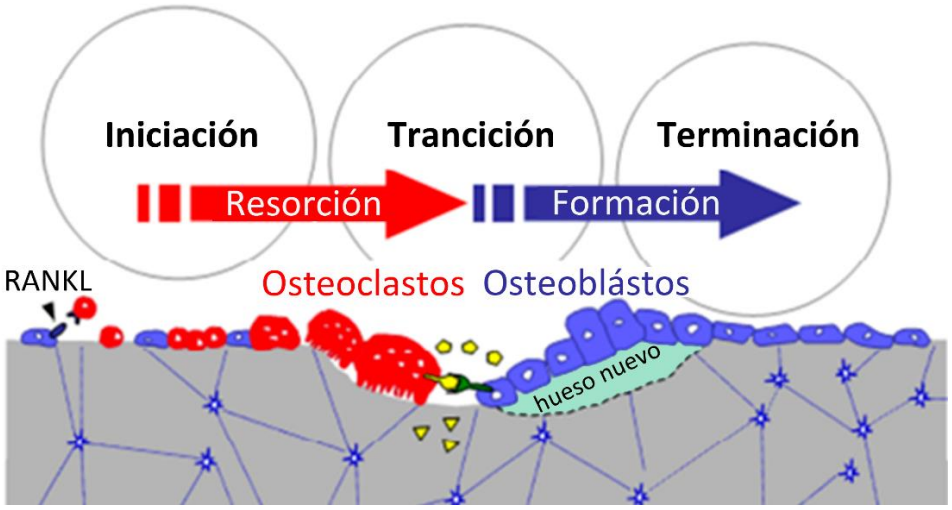


Figura 11- Fases de la remodelación ósea[92].

En la fase de iniciación, los precursores osteoclásticos son reclutados en áreas específicas de la superficie ósea por acción de factores secretados principalmente por osteoblastos y células del estroma adyacentes a la línea de formación de hueso[94,95]. Entre otros, la quimioquina CCL2 (también llamada proteína quimioatractante de monocitos, MCP-1) y el factor derivado del estroma-1 (SDF-1) son los factores más conocidos involucrados en el reclutamiento de osteoclastos. Luego de la acción de factores osteoclastogénicos como CSF-1 y RANKL, los precursores se diferencian en osteoclastos maduros que inician la resorción ósea. Muchos factores pueden aumentar este efecto, como por ejemplo PTHrP, el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y la interleuquina-1β (IL-1β) entre otros[92].

Durante la remodelación, las células óseas se comunican de manera directa e indirecta en un proceso llamado mecanismos acoplados, el cual incluye factores solubles almacenados en la matriz ósea que se liberan luego de la acción de los osteoclastos[96]. Factores como IGFs, TGF-β, BMPs, FGF y PDGF actúan como factores de acoplamiento, dado que son almacenados en la matriz ósea y al ser liberados durante la resorción, activan a los osteoblastos dando comienzo a la fase de transición. En esta fase los osteoblastos comienzan a expresar OPG[92].

En la fase de terminación, los osteoblastos producen hueso nuevo (osteoide), el cual se mineraliza y los osteoblastos entran en un estado de quiescencia. Los osteocitos producen esclerotina, la cual suprime la formación

de hueso y posiblemente contribuye a inactivar a los osteoblastos. El proceso de finalización es más largo ya que la síntesis de hueso nuevo es más lenta que la resorción (Figura 11)[92].

La síntesis de matriz ósea por parte de los osteoblastos ocurre en dos etapas principales: deposición de la matriz orgánica y su posterior mineralización. En el primer paso, los osteoblastos secretan proteínas de colágeno, principalmente Col1a1, otras proteínas (OCN, ON, BSP II y OPN), y proteoglicanos incluidos decorina y biglicano, los cuales forman la matriz orgánica. Luego, la mineralización de la matriz ósea ocurre en dos etapas: las fases vesicular y fibrilar[97,98]. La fase vesicular ocurre cuando porciones de diámetro variable (de 30 a 200 nm), llamadas vesículas de matriz, son secretadas desde la membrana apical de los osteoblastos hacia la matriz ósea recientemente formada, en la cual se unen a los proteoglicanos y otros componentes orgánicos. Debido a su carga negativa, los proteoglicanos sulfatados retienen a los iones calcio que son almacenados en las vesículas de matriz[79,98]. Cuando los osteoblastos secretan enzimas que degradan proteoglicanos, los iones calcio son liberados y se unen a moléculas de unión a calcio concentradas en las vesículas de matriz, entre las que se encuentran las anexinas, las cuales pueden actuar también como canales de calcio trans-membrana[97].

Por otro lado, los compuestos que contienen fosfato son degradados por las ALP secretada por osteoblastos, liberando iones fosfato dentro de las vesículas de matriz. Entonces, los iones fosfato y calcio presentes en el interior de las vesículas se nuclean, formando los cristales de hidroxiapatita[42]. La fase fibrilar ocurre cuando la saturación de iones calcio y fosfato lleva a la ruptura de la vesícula liberando los cristales de hidroxiapatita que se diseminan rodeando la matriz[99,100].

Además de los osteoblastos y osteoclastos, se ha demostrado que los osteocitos cumplen un papel clave durante la remodelación ósea[46]. Bajo la influencia de varios factores, los osteocitos actúan como directores del proceso de remodelación ósea, produciendo factores que influyen sobre la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos[64]. Los factores osteoclastogénicos son también producidos por osteocitos viables que se encuentran cerca de osteocitos

apoptóticos[101]. Hay evidencia de que los osteocitos actúan como la principal fuente de RANKL para promover la osteoclastogénesis[94,95].

4. Metástasis ósea del cáncer de próstata

4.1. Tropismo de los tumores prostáticos por el hueso

El establecimiento de las células tumorales en sitios distales como el microambiente óseo requiere múltiples pasos. Las células tumorales pueden adquirir propiedades que permitan la transición epitelio-mesenquimal (EMT), extravasación y migración[32]. La cascada metastásica implica la secuencia de eventos discretos que comienzan con el desprendimiento de las células cancerígenas desde el tumor primario, la invasión de tejidos adyacentes y la posterior entrada primero en los capilares de la vasculatura del tumor y luego en el sistema circulatorio y linfático general[102]. Una vez en circulación la célula tumoral debe sobrepasar distintos tipos de estrés, incluyendo la evasión del sistema inmune. Luego de su detención en el lecho capilar y posterior extravasación, la célula tumoral colabora en la modificación del microambiente para favorecer su crecimiento en este nuevo sitio (Figura 12).

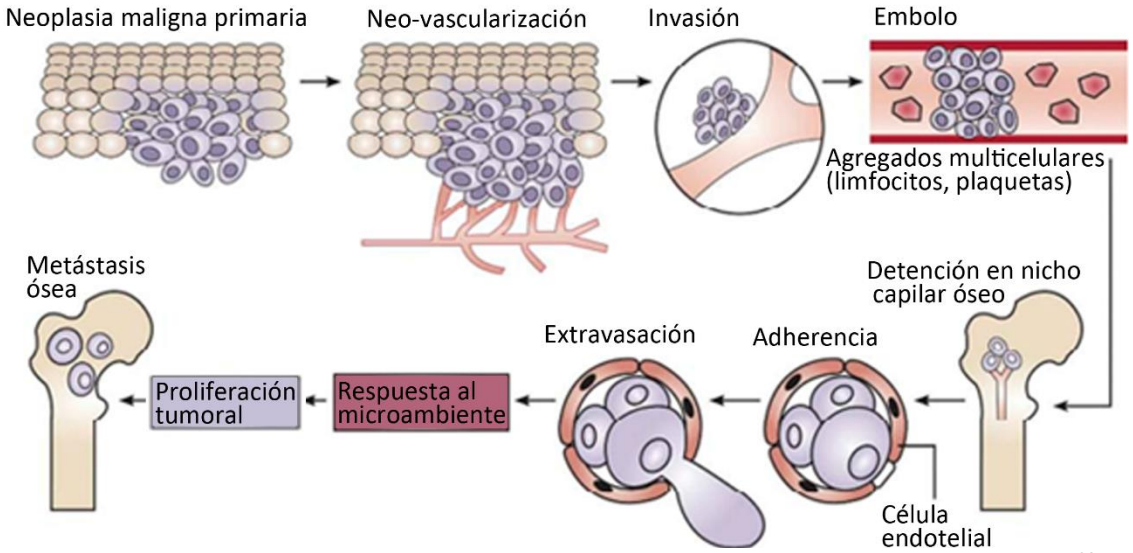


Figura 12- Pasos involucrados en la metástasis ósea desde un tumor primario. Adaptación[103].

La metástasis ósea es una complicación frecuente de los tumores sólidos[104,105]. El establecimiento de la metástasis ósea es una considerable causa de morbilidad, a menudo resultando en dolor, compresión de la médula espinal, hipercalcemia y fracturas patológicas, resultando en última instancia en

la necesidad de cirugía[104,105]. El 80% de los CaP avanzados exhiben diseminación al hueso como sitio de metástasis, presentando una probabilidad del 35% de sobrevida a un año luego de diagnosticada la metástasis ósea, que disminuye al 12 y 6 % a los 3 y 5 años, respectivamente[106]. En la actualidad, las macro-metástasis óseas son incurables y solo se cuenta con tratamientos paliativos. Una mejor comprensión de cómo estos procesos influyen en el inicio temprano de la metástasis ósea puede dar una idea de las terapias potenciales[32].

Las células de CaP tienen una particular afinidad por el hueso: esto puede deberse a la expresión de genes que las predisponen a alojarse en la médula ósea, aunque también es posible que estas células adquieran osteomimetismo luego de localizarse dentro del compartimento óseo. El término osteomimetismo de las células tumorales prostáticas hace referencia tanto a la atracción de las células tumorales por el hueso como a las características fisiomoleculares óseas que adquieren las células prostáticas en contacto con el hueso. Luego de localizarse en el tejido óseo, las células tumorales diseminadas (DTCs) o su progenie pueden tener efectos osteoblásticos, osteoclásticos o ambos[107]. Las lesiones osteoblásticas estimulan la formación de osteoblastos y promueven la formación de hueso, aunque este será un hueso de mala calidad[108]. Las lesiones osteolíticas estimulan la actividad osteoclástica, resultando en una pérdida de masa ósea. En el caso del CaP, se ha observado que el impacto de las DTCs es de naturaleza tanto osteoblástica como lítica[109]. Joseph y colaboradores demostraron que células progenitoras hematopoyeticas (HPCs) de ratones inoculados con la línea celular tumoral prostática C42B, indujeron diferenciación osteoblástica sobre células estromales de médula ósea mediante la producción de BMP-2, cuando crecían en co-cultivo con éstas. Por otro lado, estos autores reportaron que HSCs de ratones inoculados con la línea celular de CaP PC3 indujeron actividad ostoaclástica mediada por IL-6, que resultó en lesiones principalmente osteolíticas[110,111].

Las células tumorales metastásica no son las únicas responsables de la destrucción del hueso. Este proceso involucra principalmente a osteoblastos y osteoclastos, y estos son a su vez esenciales para el establecimiento de las células tumorales metastásicas en el hueso. PTHrP, IL-1, IL-6 y prostaglandina E2 (PGE2) pueden regular la producción de RANKL/OPG por parte de los

osteoblasto y modular la activación de los osteoclastos[102]. Además, se reportó que los osteoclastos son capaces de estimular la expresión de RANKL en osteoblastos en modelos murinos de metástasis ósea de cáncer de mama[112].

Tradicionalmente las metástasis se clasificaban óseas como osteoblásticas u osteoclásticas, siendo factores completamente diferentes los responsables de cada una. Desde este punto de vista, se cree que las metástasis líticas son causadas por factores activadores de osteoclastos liberados por la célula tumoral en el microambiente óseo, siendo PTHrP el más importante. Actualmente sabemos que las lesiones osteoblásticas o líticas son los extremos. Análisis morfológicos han revelado que, en muchos pacientes, las metástasis óseas tienen elementos tanto osteolíticos como osteoblásticos[102]. En el CaP, las metástasis óseas son predominantemente osteoblásticas[105]. Sin embargo, los procesos de resorción y formación ósea generalmente están vinculados o acoplados[102].

Dentro del nicho óseo metastásico, las DTC pueden entrar en un estado de latencia o proliferar para adaptarse y sobrevivir, interactuando con células óseas como las HSC, osteoblastos y osteoclastos. La interacción con el hueso puede alterar las propiedades de la célula tumoral, por otro lado, las células tumorales pueden también adquirir características del microambiente (osteomimetismo). Alternativamente, estas células también expresan genes osteomiméticos que le permiten sobrevivir o favorecen la colonización de la médula ósea[32]. Debido a esta interacción entre las células tumorales y las células del microambiente óseo, se genera lo que se conoce como “ciclo vicioso” (Figura 13), en el cual la resorción ósea promueve la liberación de factores como TGF-β e IGF1, los cuales estimulan la proliferación de la célula tumoral y promueven la liberación de PTHrP, este factor a su vez estimula la resorción ósea y la subsecuente liberación de TGF-β e IGF1[102].

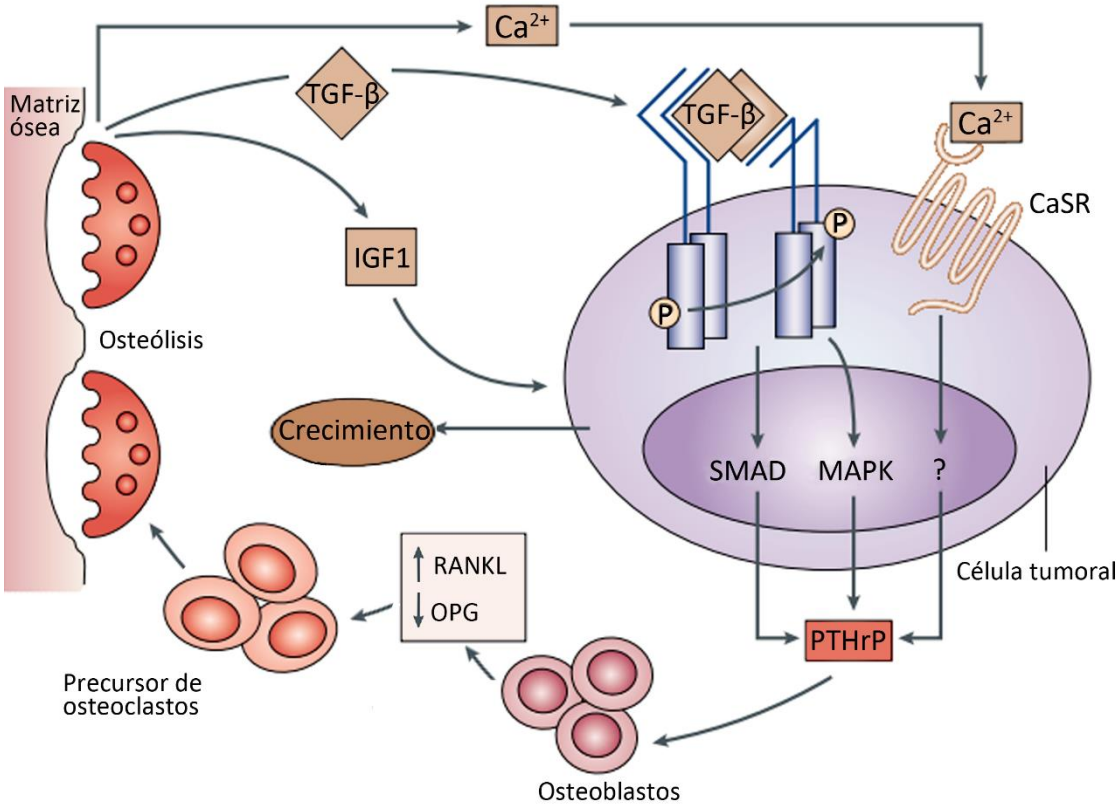


Figura 13- "Ciclo vicioso" entre las células tumorales y las células del microambiente óseo. Adaptación[102].

La migración de las células tumorales puede desencadenarse por quimiotaxis en respuesta a diferentes estímulos. Los mecanismos por los cuales las células tumorales migran y colonizan la medula ósea siguen sin ser completamente comprendidos. En 1989 Paget desarrolló la hipótesis "del suelo y la semilla" para explicar el tropismo de células tumorales hacia tejidos específicos[113], actualmente se reconoce que hay un determinante genético en el tropismo y el proceso de colonización del hueso[114]. Esta firma molecular incluye genes originalmente involucrados en la fisiología ósea, e implicados en el tropismo de las células tumorales al hueso. De hecho, la célula tumoral usa el mismo mecanismo utilizado por las HSC y los leucocitos para migrar al hueso (Figura 14)[32].

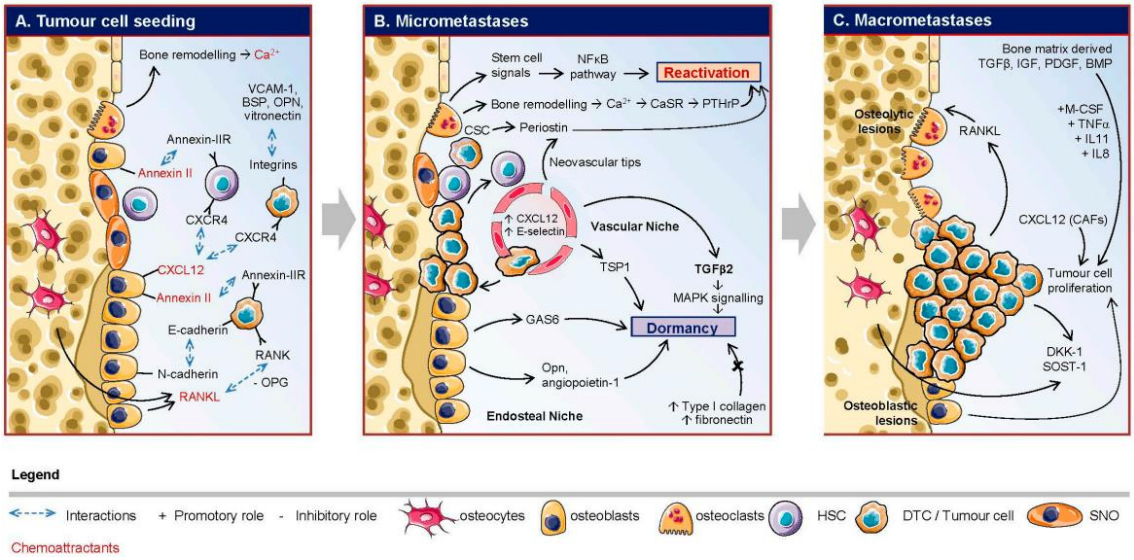


Figura 14- Etapas de la colonización tumoral del microambiente óseo[32].

El desarrollo de un nicho osteoclástico por parte de la célula tumoral crea un cambio en la homeostasis ósea, disparando la liberación de señales de células madre para estimular el crecimiento, posiblemente a través de la vía del factor nulear κB (NFκB)[115]. Por lo tanto, la reactivación de las DTC depende también de factores intrínsecos de la célula tumoral para permitir su auto-renovación, además de los factores ambientales del nicho metastásico. Las células tumorales que se establecen en la médula ósea entran en un estado de latencia en nichos específicos y/o se adaptan al microambiente óseo. Las DTC pueden volverse activas años después a medida que proliferan y alteran la función de los osteoblastos y osteoclastos, irrumpiendo la remodelación ósea fisiológica y promoviendo la destrucción del esqueleto[32,116].

En cáncer de mama, la alta concentración de Ca^{2+}, como resultado de la remodelación ósea normal, funciona como quimioatractante para dichas células tumorales[117], actuando sobre receptores sensores para este ion (CaSR). De manera similar a lo que ocurre en las HSCs, donde estos receptores regulan la localización de estas células en la médula ósea en función de los niveles de Ca^{2+} locales[118]. Esto se relaciona con el "ciclo vicioso" mencionado con anterioridad, mediante el cual las células tumorales interactúan con el microambiente óseo para dirigir la progresión de la enfermedad[102]. Bajo este sistema, la resorción ósea mediada por osteoclastos ocurre cuando el Ca^{2+} se une al CaSR, el cual puede a su vez estimular la síntesis de PTHrP en la célula tumoral generando un

loop de retroalimentación[119]. Un estudio reciente en cáncer de mama demostró que CaSR estimula la señalización intracrina de PTHrP promoviendo la proliferación y supervivencia de la célula tumoral (Kim et al 2016). Adicionalmente, PTHrP estimula la producción de RANKL en los osteoblastos cumpliendo así un rol clave en la diferenciación de los osteoclastos[102,120]. RANK se expresa en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de próstata y mama, y se demostró que es un factor importante en la conducción de la célula tumoral al hueso[121,122]. Jones y colaboradores demostraron que en células tumorales de próstata y mama que expresaban RANK se estimuló la migración al tratarlas con RANKL recombinante, mientras que este efecto fue bloqueado por OPG[122]. Por otra parte, altos niveles de RANKL, el Factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) y OPG en sangre periférica de pacientes pueden modular la intravasación, angiogénesis, supervivencia y la transición epitelio-mesenquimal de las células tumorales circulantes[123]. Cabe destacar que los osteocitos son la principal fuente de RANKL en adultos[94,95], y existe evidencia en la literatura de que los osteocitos contribuyen a la formación de la metástasis ósea, favoreciendo la colonización de la médula ósea por parte de la célula tumoral[94,95]. Los osteoblastos también expresan otros factores importantes en la quimiotaxis como anexina A2 (ANXA2), la cual promueve al tropismo tumoral al hueso. Se demostró que las células de CaP que expresan el receptor de ANXA2 (ANXA2R) migran hacia los sitios óseos donde se expresa ANXA2[124].

4.2. Estrés oxidativo y HO-1 en la tumorigénesis prostática y el establecimiento de la enfermedad ósea

Como se ha mencionado, la tumorigénesis es un proceso que consta de muchas etapas en las que se requiere la acumulación de mutaciones para la transformación de una célula normal a una tumoral. El daño al ADN causado por las especies reactivas del oxígeno (ROS) es la mayor fuente de mutaciones[125].

Se ha sugerido que la inflamación incrementa la tumorigénesis prostática[126]. Citoquinas, quimioquinas y metaloproteinasas de la matriz son parte de la red pro-inflamatoria que contribuye a la progresión maligna[127]. De hecho, factores pro-inflamatorios secretados por las células de CaP y del hueso, y la subsecuente liberación de factores desde la matriz orgánica ósea, median la

interacción parácrina/autócrina entre las células de CaP, osteoblastos y osteoclastos, que determinan finalmente el fenotipo óseo y la progresión del CaP[128,129]. El estrés oxidativo es una consecuencia natural del proceso inflamatorio y actúa como modulador de la función de tejidos mineralizados[130] (Figura 15). Esto afecta la formación de hueso al inhibir la diferenciación de osteoblastos y promover su apoptosis[131]. Este efecto está mediado en parte por ROS, generadas en el contexto de estrés oxidativo.

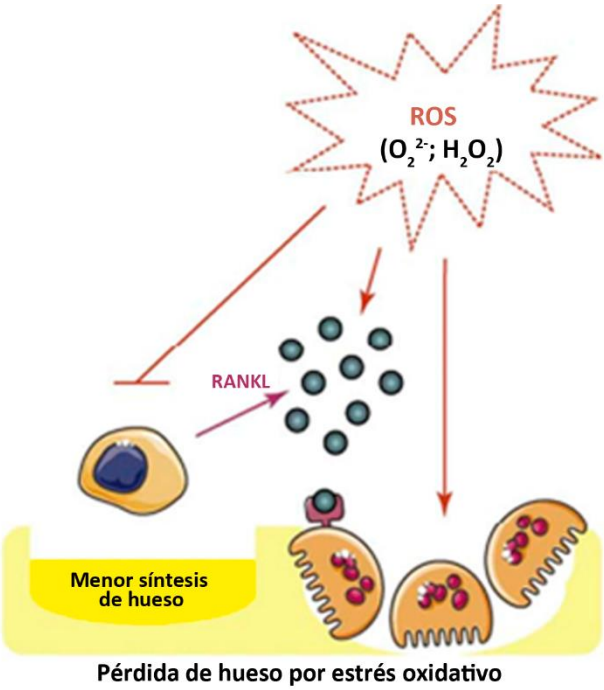


Figura 15- Remodelación ósea y estrés oxidativo. En condiciones de estrés oxidativo, la remodelación del hueso se encuentra desbalanceada: la formación ósea mediada por los osteoblastos se reduce, mientras que la diferenciación y la actividad de los osteoclastos aumenta, ya sea de manera directa por los ROS como de manera indirecta por el aumento de RANKL[130].

Las células contrarrestan los afectos adversos de las ROS activando varios mecanismos de defensa, incluyendo la inducción de enzimas "*scavengers*" de radicales libres como Hemo oxigenasa 1 (HO-1), la enzima limitante en la degradación del hemo, que es capaz de conferir citoprotección frente a la inflamación y al estrés oxidativo[132].

La disminución de HO-1 lleva a un aumento en los niveles de ROS y consecuentemente, a un mayor daño en el ADN[133]. Más aún, el monóxido de carbono (CO) (producto de la degradación del hemo por acción de HO-1) mejora la supervivencia celular luego de ser irradiadas o tratadas con genotoxinas, al

inducir la reparación del ADN[134]. Por lo tanto, un aumento en la expresión de HO-1 previene el daño al ADN y la iniciación de la carcinogénesis en células normales. Sin embargo, en etapas tardías de la tumorigénesis, la sobre-expresión de HO-1 puede promover la proliferación e invasividad de las células tumorales[133,135,136]. HO-1 protege a las células tumorales de la apoptosis inducida por agentes quimiotóxicos o por irradiación, sugiriendo que está involucrada en la resistencia al tratamiento[137,138]. Paradójicamente, estudios en CaP demostraron que CO inhibe el crecimiento tumoral y aumenta la sensibilidad a la quimioterapia al intensificar el agotamiento metabólico[139]. Reportes previos de nuestro laboratorio documentaron por primera vez la localización nuclear de HO-1 en CaP[140]. También documentamos que HO-1 inhibe la proliferación celular, migración e invasión in vitro, y afecta el crecimiento de células de CaP *in vivo*[141]. Además, previamente establecimos que en CaP HO-1 cumple un papel clave como modulador de la angiogénesis[142]. Es ampliamente aceptado que la angiogénesis es un proceso clave no solo para el crecimiento tumoral, sino también para la neo formación de hueso. Más aún, mostramos evidencia de que la función anti-angiogénica de HO-1 está mediada por la represión de la vía de señalización de NFκB[142].

5. Hemo oxigenasa 1.

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

Las ROS pueden causar daño en los tejidos debido a la acumulación de cambios en macromoléculas vitales como lípidos, carbohidratos, proteínas e incluso ADN[143]. 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 de HO, que catabolizan el hemo, es una estrategia muy conservada a lo largo de la evolución[144].

HO-1 es una proteína de 32 kDa, que se expresa en bajos niveles en la mayoría de los tejidos de los mamíferos y es inducible en todas las células por una vasta variedad de estímulos como: su propio sustrato, metales pesados, irradiación UV, ROS, óxido nítrico y citoquinas inflamatorias[145]. La expresión de esta proteína puede ser también modulada por la acción de hormonas[146,147].

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 ácido delta aminolevulínico sintetasa (ALA-S), y su degradación dirigida por HO. Altos niveles de hemo reprimen la síntesis de la enzima ALA-S e inducen la expresión de HO[148].

Existen múltiples factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de HO-1: las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 tipo 2 (Nrf2), la proteína con dominio BTB y homólogo CNC 1 (Bach1)*, el factor de transcripción de cierre leucina básico 1*, las proteínas quinasa A y C (PKA y PKC), la proteína activadora 1 (AP1) y NFκB entre otros[149]. La regulación más ampliamente conocida es la que llevan a cabo Nrf2 junto a Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo kelch). 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 elementos de respuesta a antioxidantes (ARE)[150] (Figura 16).

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)[151]. 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), CO y hierro que es secuestrado por la ferritina[151] (Figura 17). Estos 3 productos de la catálisis presentan capacidades citoprotectoras, mientras que el hemo libre es pro-oxidante[152], pro-inflamatorio[153] y pro-apoptótico[154].

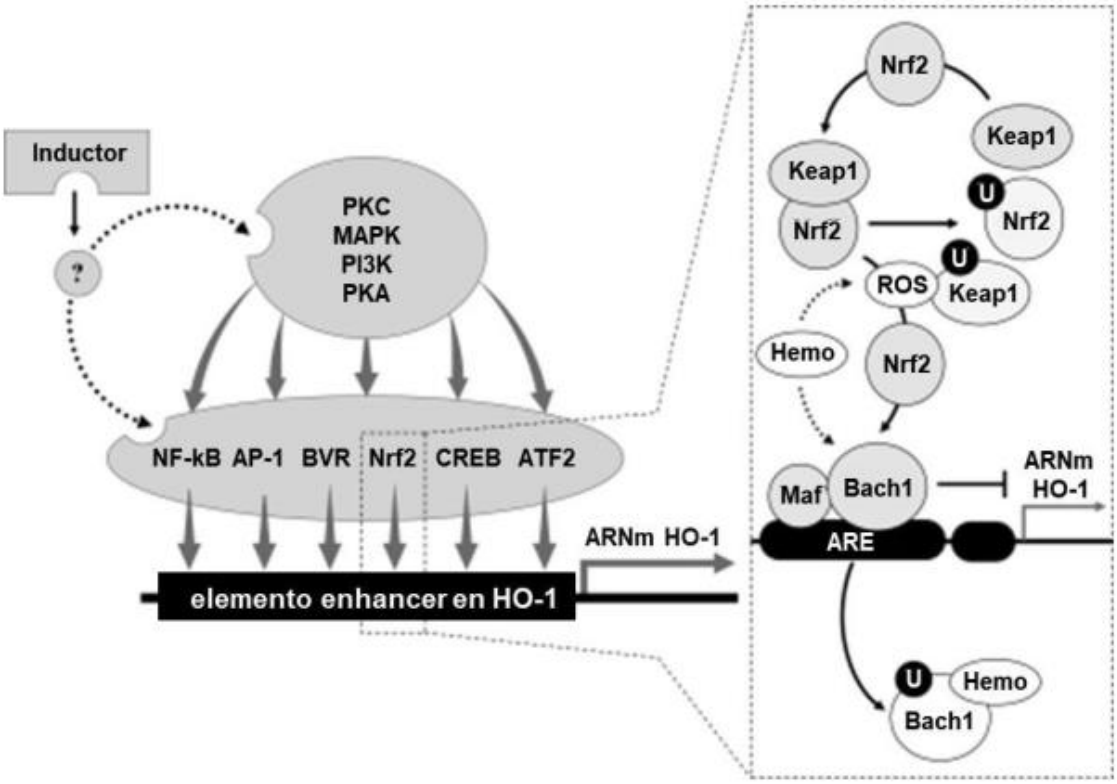


Figura 16- Vías de regulación de la transcripción de HO-1. Adaptación[149].

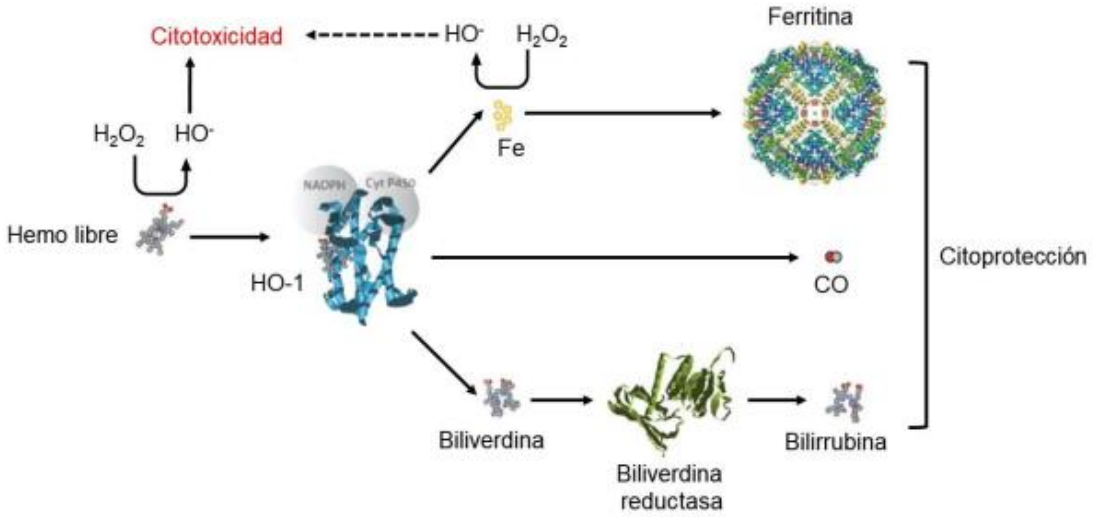


Figura 17- Reacción catalizada por HO-1. Adaptación[151].

HO-1 se encuentra normalmente anclada al retículo endoplásmico (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 oligómeros[155]. Aunque distintos trabajos habían planteado la posible localización nuclear de HO-1[156,157], 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 enzimática[158]. Trabajos de nuestro grupo, el mismo año, demostraron la presencia nuclear de HO-1 en CaP y sugerimos una

función no canónica para esta proteína[140,141]. Posteriormente, se reportó que HO-1 es clivada en su extremo C-terminal dentro de la membrana del RE por una peptidasa tipo SPP (peptidasa del péptido señal)[159] 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 es mediada por esta peptidasa. La sobreexpresión de la forma clivada de HO-1 en células HeLa (de carcinoma cervical) y H1299 (de carcinoma de pulmón) promovió la proliferación celular y la invasión, procesos independientes de su actividad enzimática[159]. Aunque HO-1 no tiene una secuencia consenso para la localización nuclear, se halló una secuencia putativa que sería la responsable de dicha localización[158]. 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 proteínas y consecuentemente activar factores de transcripción involucrados en proliferación celular y protección frente al estrés oxidativo[158,160]. Si bien en nuestro laboratorio, como mencionamos anteriormente, detectamos la presencia nuclear de HO-1 en muestras humanas de CaP y en líneas tumorales prostáticas, no observamos el clivaje de la proteína[140,141]. El grupo del Dr. Curino demostró también la localización nuclear de HO-1 en carcinoma de cabezza y cuello[136], en gliomas[161], en cáncer colorrectal[162] y recientemente en cáncer de mama[163]. Estos autores sugieren que la localización subcelular de HO-1 puede explicar los diferentes efectos ejercidos por esta proteína en los diferentes tipos tumorales[163].

5.2. Hemo oxigenasa 1 en cáncer

Algunos resultados sugieren que HO-1 puede actuar como una enzima protectora, disminuyendo el riesgo a desarrollar determinados tumores. Sin embargo, mucho más se reportó sobre su función pro-tumoral. Los efectos pro-cancerígenos de la enzima están asociados con su actividad citoprotectora[164] y antiapoptótica[154], que resulta en una sobrevida aumentada de las células tumorales y resistencia a las terapias. Además, HO-1 puede actuar como un mediador pro-angiogénico lo que favorece la vascularización tumoral

aumentando el potencial metastásico[165]. Por otro lado, existen numerosos trabajos que demuestran que la acción anti-inflamatoria de HO-1 puede resultar en inmunosupresión, favoreciendo la progresión tumoral. Aunque en general, HO-1 parece facilitar el crecimiento y la metástasis del tumor, los efectos dependen del tipo de cáncer[166–168]. El grupo del Dr. Curino demostró la función anti-tumoral de HO-1 en tumores de mama[163] al igual que en cáncer de pulmón de células no pequeñas[169] y cáncer colorrectal[162]. Sin embargo, estos mismos autores reportaron la acción pro-tumoral de la misma proteína en astrocitoma, glioma, y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello[136]. En nuestro laboratorio, como ya mencionaramos, se reportó por primera vez la expresión nuclear de HO-1 en carcinomas humanos de próstata *naive* de tratamiento y en muestras de hiperplasia prostática benigna (HPB)[140]. 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*[141]. Demostramos que la sobreexpresión de HO-1 en líneas celulares de CaP insensibles a andrógenos disminuye la expresión y actividad de MMP9[141], metaloproteasa que cumple un rol crítico en la invasión y angiogénesis de estos tumores[170]. Por otra parte, reportamos un rol clave de HO-1 como modulador de la angiogénesis en CaP, efecto mediado por la represión de la vía de NFκB[142]. En este último trabajo se observó que al inducir HO-1 disminuye la expresión de un set de genes inflamatorios y pro-angiogénicos como los factores de crecimiento endotelial vascular A y C (VEGFA y VEGFC), el factor inducible por ipoxia 1 α (HIF1α) e integrina α5β1[142]. Así mismo, demostramos que HO-1 modula negativamente la actividad transcripcional del AR interfiriendo con la señalización del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), apoyando la hipótesis que propone un rol adicional para HO-1, más allá de la degradación del hemo[160]. 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 transcripción[160]. Así mismo, 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 CaP[171]. En 2013, demostramos que HO-1 participa en la metástasis ósea del CaP, restaurando la proliferación de osteoblastos inhibida por las células tumorales prostáticas[127].

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 SCID[127].

Más recientemente, reportamos que HO-1 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 epitelial[172]. 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 CaP[173]. Más aún, el pre-acondicionamiento del microambiente tumoral con hemina, retardó el crecimiento de tumores derivados de carcinomas de próstata xenotransplantados en ratones singenéicos[174].

Sin embargo, el rol de HO-1 en el CaP es controversial y distintos grupos han reportado resultados contrarios a los nuestros[175]. 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 HPB 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 muestras[176]. Posteriormente, Alaoui-Jamali y colaboradores, 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 benigno[177]. Además, a través de un estudio clínico se comprobó que existía una diferencia significativa en la expresión de HO-1 epitelial entre la HBP, 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. En este trabajo solo se comprobó que la alta expresión de HO-1 junto con la deleción de PTEN se asociaban con un pronóstico clínico adverso[178]. Cabe resaltar que la deleción de PTEN y la fusión TMPRSS2:ERG son marcadores de evolución desfavorable y/o de recurrencia de la enfermedad[179–181].

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Nuestra hipótesis se basa en que HO-1, una proteína clave para el control de la inflamación, el estrés oxidativo y la angiogénesis, altera la expresión de factores relevantes en la carcinogénesis prostática, impactando sobre la interacción entre las células tumorales y las óseas, y por ende afectando la progresión de la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general

Dilucidar el significado funcional de HO-1 en la progresion y remodelación ósea del cáncer de próstata

Objetivos específicos

Objetivo específico 1. Evaluar la función de HO-1 en la interacción célula prostática - célula progenitora del hueso y en el balance entre osteoblastogénesis / osteoclastogénesis.

- **a)** Caracterizar el efecto de la pérdida de HO-1 en la fisiología del hueso y su influencia en la interacción de las células óseas con las de CaP.
- **b)** Determinar el rol de la inducción farmacológica de HO-1 en células de CaP en su interacción con las células del hueso.

Objetivo específico 2. *Interactores de HO-1 implicados en la colonización del nicho óseo.* Investigar el efecto de la modulación farmacológica de HO1 sobre ANXA2, molécula clave en el proceso de adhesión de células de CaP al microambiente óseo. Analizar la relevancia clínica de ANXA2 en la carcinogénesis prostática.

Objetivo específico 3. Analizar mediante estrategias proteómicas y bioinformáticas el secretoma producido durante el co-cultivo indirecto entre las células de CaP y los progenitores óseos, a fin de identificar factores solubles implicados en dicha interacción.

Materiales y métodos

1. Cultivo de células

1.1. Líneas celulares utilizadas

PC3: Línea celular establecida de una metástasis ósea que proviene de un adenocarcinoma de próstata humano[182]. Es insensible a andrógenos y no expresa PSA. Su perfil de crecimiento en hueso es osteolítico. Posee bajos niveles endógenos de HO-1[141].

MC3T3: Línea celular de precursor osteoblástico derivada de calvaria de ratón C57BL/6[183].

Raw264.7: Línea celular de macrófago murino que tiene la capacidad de crecer indefinidamente como un precursor de osteoclasto o diferenciarse en osteoclastos multinucleados frente al tratamiento con RANKL[184].

1.2. Condiciones de crecimiento

Las células PC3 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con L-glutamina, bicarbonato de sodio 0,2% m/V, suero fetal bovino 10% (SFB) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml) en una atmósfera húmeda con CO_2 5%, a 37°C.

La línea celular MC3T3 se mantuvo en medio α-MEM (Invitrogen) suplementado con SFB 10% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml) en una atmósfera húmeda con CO_2 5%, a 37°C.

La línea celular Raw264.7 se creció en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con SFB 5% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml) en una atmósfera húmeda con CO_2 5%, a 37°C.

2. Aislamiento de PMOs

Se trabajó con cultivos primarios de osteoblastos de ratón (PMO, *Primary Mouse Osteoblasts*). Estos fueron aislados de las calvarias de 3 ratones BALB/c Hmox1$^{+/+}$ (WT), Hmox1$^{+/-}$ (Het) o Hmox1$^{-/-}$ (KO), de 2 meses de edad promedio. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las normas ARRIVE. Tanto los animales WT como los genéticamente modificados fueron provistos por el bioterio de la Universidad Otto-von

Guericke (Magdeburgo, Alemania) y gentilmente cedidos por la Dra. Ana C. Zenclussen (Instituto Obstetricia y Ginecología Experimental de la Facultad de Medicina, Universidad Otto-von Guericke, Magdeburgo, Alemania). Las calvarias fueron diseccionadas y lavadas en PBS estéril y se cortaron en fragmentos de 1-2 mm^2. Los fragmentos se digirieron en un baño en agitación a 37°C, durante 30 min, en 3ml de medio DMEM (Invitrogen) con colagenasa P 2 mg/ml (Roche), estreptomicina y penicilina. Se descartó la suspensión enriquecida en células del tejido conectivo y se repitió este paso. Luego los fragmentos fueron incubados en un baño en agitación a 37°C, durante 30 min, en 4ml de solución de tripsina 0,25% con EDTA 0,1% en PBS. Posteriormente se repitió por tercera vez la digestión con colagenasa P 2mg/ml en medio DMEM (Invitrogen). Por último los fragmentos se lavaron tres veces con medio DMEM (Invitrogen) suplementado con SFB 10% y antibióticos y fueron transferidos a una botella T75 con 10 ml de αMEM (Invitrogen) suplementado con SFB 20% y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml) y se cultivaron en una atmósfera húmeda con CO_2 5%, a 37°C. Luego de una semana se renovó el medio de cultivo, sin quitar los fragmentos de calvaria para permitir que continúe la migración de los PMOs desde los mismos hacia la placa de cultivo. Al cabo de 15 días (en promedio) los PMOs alcanzaron un 80% de confluencia. En ese momento las células fueron resuspendidas incubándolas en tripsina 0,25% con EDTA 0,1% durante 5 min y mediante acción mecánica con la ayuda de un *scraper*. La suspensión de células se diluyó en medio αMEM (Invitrogen) suplementado con SFB 20% y antibióticos para inactivar la tripsina. Luego, la suspensión de células fue tomada cuidadosamente de la botella original de manera de no arrastrar fragmentos de hueso con la suspensión, y fue dividida en dos nuevas botellas T75. Una vez alcanzada la confluencia, los PMOs fueron nuevamente resuspendidos, contados y utilizados en los experimentos pertinentes.

3. Tratamiento con hemina

La hemina es un inductor específico de la actividad y expresión de HO-1. - Para preparar la solución *stock*: Se pesaron 36 mg de cloruro de hemina (SigmaAldrich) y se disolvieron en 0,4 ml de NaOH 0,5N; 0,5 ml de Tris-HCl

1M (pH 8) y 0,1 ml de PBS. A continuación se filtró para esterilizarla, 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 (Invitrogen) hasta obtener una concentración final 50 µM.

- Tratamiento: Se removió el medio de cultivo de las células PC3 y se les adicionó el medio RPMI 1640 (Invitrogen) completo conteniendo hemina en una concentración final de 50 µM, durante 24 h.

4. Co-cultivo indirecto

4.1. Co-cultivo de células óseas con células PC3

En el inicio del experimento (día 0) se sembraron 100.000 células PC3 en insertos para placas de seis pocillos (#353090, Becton Dickinson) los cuales poseen en su base poros de 0,4 µm en una densidad 2,0 ± 0,2 x 106 / cm2, permitiendo el paso de pequeñas moléculas. Al día siguiente (día 1) se trató a estas células con hemina en una concentración final de 50 µM durante 24 h (hasta el día 2), para inducir la expresión y actividad de HO-1, o en condiciones control (sin agregado de hemina). En el día 1 también se sembraron en otras placas de 6 pocillos las células óseas (200.000 células/pocillo para MC3T3 o PMOs; 300.000 células/pocillo para Raw264.7). En el día 2 se removió el medio de cultivo y se agregó 2 ml de medio correspondiente según el tipo de célula ósea (αMEM (Invitrogen) para MC3T3 o PMOs; DMEM (Invitrogen) para Raw264.7) 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 cultivadas las células óseas y se les agregó 2 ml de medio (αMEM (Invitrogen) para MC3T3 o PMOs; DMEM (Invitrogen) para Raw264.7) 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 células óseas 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 3 se cosecharon las células para realizar distintos ensayos (Figura 18).

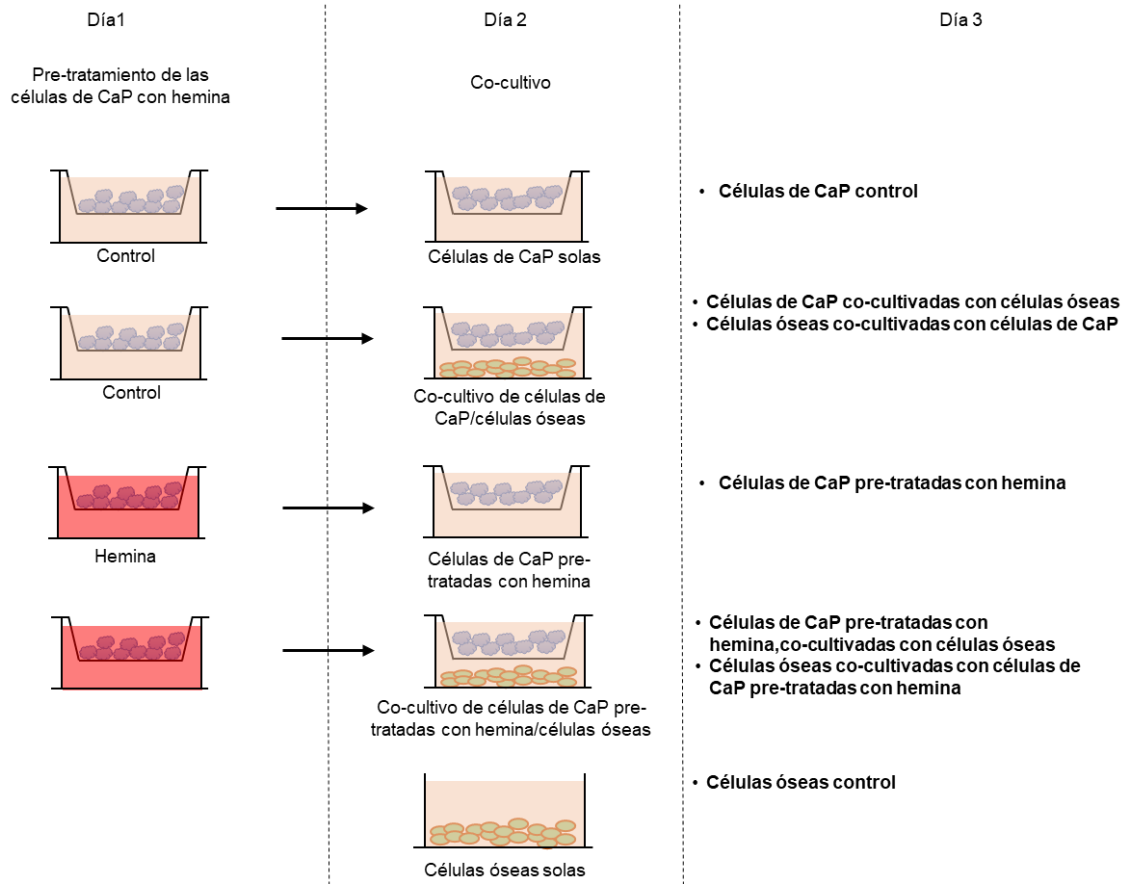


Figura18. Diseño experimental del co-cultivo. Esquema de los pasos realizados desde el día 1 donde se plaquean las células óseas y se realiza el pre-tratamiento con hemina (50µM; 24h) de las células tumorales, hasta el día 3 donde se cosechan las células.

5. Análisis de la expresión génica a nivel transcripcional.

5.1. 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 µl de Quick-Zol®; la suspensión celular se homogeneizó completamente por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se añadieron 100 µl de cloroformo, se mezcló enérgicamente con *vortex* durante 15 s 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 µl de isopropanol por cada 500 µl 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 µl de H_2O 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.

5.2. 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).

5.3. 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).

5.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

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; $MgCl_2$ 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 método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ [185].

Gen	Especie	*Primer Fw* (5'>3')	*Primer Rv* (5'>3')	Tº *an.*
36b4	Murino	AAGCGCGTCCTGGCATTGTCT	CCGCAGGGGCAGCAGTGGT	60ºC
Hmox1	Murino	AAGAGGCTAAGACCGCCTTC	GCATAAATTCCCACTGCCAC	60ºC
Runx2	Murino	CCGCACGACAACCGCACCAT	AGGCATTTCGGAGCTCGGCG	60ºC
Rankl	Murino	ATGGAAGGCTCATGGTTGGATG	AAGAGGACAGAGTGACTTTATGGG	60ºC
Casf1	Murino	CAACAGCTTTGCTAAGTGCTCTA	CACTGCTAGGGGTGGCTTTA	60ºC
Il-6	Murino	CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT	GAAGTAGGGAAGGCCGTCG	60ºC
Opg	Murino	TGCTAATTCAGAAAGGAAATGC	TGGTATAATCTTGGTAGGAACAG	58ºC
Opn	Murino	TCTCTTGGCTGAATTCTGAGG	CTATAGGATCTGGGTGCAGGC	60ºC
Col1a1	Murino	CATGTTCAGCTTTGTGGACCT	GCAGCTGACTTCAGGGATGT	60ºC
Rank	Murino	CACACACTGTCGGAGGTAGGAG	CCAGGAGAGGCATTATGAGCATC	65ºC
Anxa2	Murino	AGGGAGGCTCTCAGCGATAC	TAGGCACTTGGGGGTGTAGA	65ºC
Plau	Murino	CCAAAGAACCTGAAAATGTCCG	ACAGATAAGCGGTCCTCCAGA	60ºC
PPIA	Humano	GGTATAAAAGGGGCGGGAGG	CTGCAAACAGCTCAAAGGAGAC	60ºC
HMOX1	Humano	ACTGCGTTCCTGCTCAACAT	GGGGCAGAATCTTGCACTTT	60ºC
IL8	Humano	CGTGGCTCTCTTGGCAGCCTTC	TGCACCCAGTTTTCCTTGGGGTC	60ºC
IL6	Humano	GGTACATCCTCGACGGCATCT	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	60ºC
PTHrP	Humano	GTCTCAGCCGCCGCCTCAA	GGAAGAATCGTCGCCGTAAA	60ºC
OPG	Humano	GAAGGGCGCTACCTTGAGAT	GCA AACTGTATTTCGCTCTGG	59ºC
ANXA2	Humano	ATATTGCCTTCGCCTACCAG	AGAGAGTCCTCGTCGGTTCCC	65ºC
ANXA2R	Humano	GGCAAAACGGACTCTCTCCT	GAGTCTGTCGGGTTCCTCTG	63ºC
PLAU	Humano	TCTGCCTGCCCTCGATGTAT	GTGGTGACTTCAGAGCCGTAG	62ºC

Tabla 1- listado 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, la especie, las secuencias de cada primer en sentido 5' a 3' y la temperatura de *annealing* empleada. Para referirse a los genes humanos y murinos se siguió la nomenclatura establecida por Guidelines for Human Gene Nomenclature[186] y Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat[187], respectivamente.

6. Análisis de los niveles de proteínas

6.1. Extracción de proteínas

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

6.2. Medición de la concentración de proteínas

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

6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida y detección por Western blot

Una vez determinada la concentración de proteínas de las muestras, éstas se diluyeron con buffer de siembra (Tris-HCl 10 mM pH 8, SDS 1%, Glicerol 4%, Sacarosa 0,146 M, una punta de espátula de azul de bromofenol y DTT 10 mM ó β-mercaptoetanol 1%) y con buffer de lisis RIPA a una concentración final de 2 µg/µl. 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 12%. Los geles se armaron con Tris 0,4 M (pH 8,8); Acrilamida/Bisacrilamida 12%; SDS 0,1%; APS 0,1%

y TEMED 0,24% (v/v). Las muestras de proteínas se resolvieron en una cuba de electroforesis (BIORAD POWERPAC Basic) a 80 V hasta que las uestras entraron en el gel concentrador [Tris 0,128 M (pH 6,8); SDS 0,1%; Acrilamida/Bisacrilamida 3,85%; APS 0,1% y TEMED 0,2 % (v/v)] y luego a 100 V en buffer de electroforesis (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1%). Se corrió en paralelo a las muestras un marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas). Luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BIORAD POWERPAC Basic) durante 1 h a 250 mA en buffer Towbin (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1% pH 8,3) suplementado con 20 % de metanol. Para realizar la detección de las proteínas se comenzó bloqueando los sitios inespecíficos con leche descremada en polvo o BSA 4% en TBS-T (NaCl 150 mM; KCl 2,68 mM; Tris base 24,7 mM; 0,05% de Tween-20; pH 7,4) en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. 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 diluidos en TBS-T y BSA 0,4%: Annexina A2 monoclonal de conejo (1:2000) (#8235; Cell signaling Tech.) o actina-β policlonal de ratón (1:2000) (Sigma-Aldrich). Luego se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-T y las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti conejo (1:5000) o anti ratón (1:5000), según el anticuerpo primario utilizado, acoplados a peroxidasa y diluidos en TBS-T, durante 1 h a temperatura ambiente. Luego las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-T. Para visualizar las proteínas se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. Alternativamente, la detección se realizó con ECL no comercial mezclando 1,5 ml de Reactivo 1 (luminol 29,7 mM; Tris 68,4 mM pH 8), 1 ml de Reactivo 2 (4-iodofenol 18,2 mM; Tris 10,4 mM pH 8), 100 µl de Tris 1M (pH 6,8) en un volumen final de 20 ml y agregando en el momento de usar 5 µl de H_2O_2 de 30 volúmenes. La visualización de las bandas se realizó con el analizador de imágenes Phosphoimager® (Fuji Photo Film Co. Ld., Cypress, CA). Las bandas se

cuantificaron por densitometría utilizando el programa Image J y los resultados de normalizaron con β-actina.

7. Ensayo de inmunofluorescencia

Para realizar el ensayo de inmunofluorescencia en las células Raw264.7, se colocó en los pocillos un cubreobjetos antes de sembrar las células en las placas (previo al co-cultivo) para que las mismas crecieran adheridas a éste. Una vez finalizado el co-cultivo, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y las células fueron fijadas con metanol por 20 min a 4°C. Se realizaron otros 3 lavados y las células se permeabilizadas con tritón 0,1% (V/V) en PBS por 5 min a temperatura ambiente. El bloqueo se llevó a cabo incubando las muestras con una solución de BSA 3% (P/V) durante 1 h, a temperatura ambiente, en cámara humeda. Luego se les agregó el anticuerpo contra Anexina A2 (#8235; Cell signaling Tech.; dilución 1:200 en PBS-BSA 3%; 40µl/vidrio) y se dejaron en cámara húmeda 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 (rojo, Alexa flúor 647, Molecular Probe Invitrogen) en PBS-BSA 1%. Se hicieron 3 lavados con PBS durante 10 min y se montaron usando Mowiol como medio de montaje, mas Dapi (4 ',6-diamino-2-fenilindol) para teñir los núcleos. Las muestras se analizaron en el microscopio Olympus IX71 con un objetivos de inmersión en agua UApo 40XW 1,5 AN (Olympus). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara Hamammatsu Orca-CCD C4742-95 utilizando el software Andor IQ y procesadas con el software Image J.

8. Determinación de la concentración de Ca^{2+} en medios condicionados

Para la determinación de los niveles de Ca^{2+} en los medios condicionados se utilizó el kit Ca-Color AA® (Wiener lab.). En el protocolo empleado, 12,5µl de la muestra (o patrón estándar, o agua) se mezclaron en 500µl de una solución compuesta por partes iguales de los reactivos “A” y “B” en tubos eppendorf® de 1,5ml, y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se sembraron 150µl de cada tubo en pocillos de placa de 96 pocillos, por triplicado, y se midió absorbancia a 570nm. Para la curva estándar se hiecieron 5 diluciones seriadas al ½ a partir de la solución patrón (10mg/dl). Para todos estos ensayos, se realizaron los experimentos de co-cultivo en medio de cultivo sin rojo fenol, ya que interfiere en la medición.

9. Análisis de especies reactivas del oxígeno por citometría de flujo

Una vez finalizado el co-cultivo, los PMOs y las células PC3 se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con la sonda 5,6-clorometil-2´7´-diclorodihidro-fluoresceína diacetato (CM-H2DCFDA, Invitrogen) preparada en medio de cultivo RPMI sin rojo fenol durante 1 h a 37°C en oscuridad (a partir de este momento siempre se trabajó en oscuridad). Luego se lavaron las células, se tripsinizaron y se agregó RPMI sin rojo fenol con SFB10% para detener la tripsinización. Se pasaron las muestras a Eppendorfs, y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min, se lavaron con PBS y se centrifugaron nuevamente a 1.000 rpm otros 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en 300 µl de PBS. La distribución de la población celular se analizó mediante citometría de flujo (Attune™ NxT Flow Cytometer, Thermo Fisher Scientific) en el canal de FITC (Ex/Em: 495 nm/519 nm), y los resultados se analizaron con el software FlowJo 8.7.

10. Ensayos de inmunohistoquímica

El estudio se realizó sobre un microarreglo de tejidos (TMA) de origen comercial (PR8011a; US Biomax inc.), donde están representadas diferentes patologías prostáticas (adenocarcinoma: 32; metástasis: 2; hiperplasia: 26; inflamación crónica: 6; tejido adyacente al tumor: 6; glándula normal: 8). Los cortes se desparafinaron con xileno y con tolueno, se hidrataron con etanol en concentraciones decrecientes y finalmente con agua destilada. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con H2O2 durante 10 min. Luego se realizaron lavados con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con BSA 2% en PBS durante 20 min. La recuperación de antígenos se llevó a cabo con microondas (750W, 3 veces durante 1 min) en buffer citrato de sodio 10 mM (pH 6). Las muestras se incubaron con el anticuerpo específico contra Anexina A2 (#8235; Cell signaling Tech) durante toda la noche a 4ºC

en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron incubando a las muestras con PBS en ausencia del anticuerpo primario. Al día siguiente se lavaron y se detectó la señal del anticuerpo primario utilizando el kit para inmunohistoquímica LSAB + DAKO Peroxidasa (HRP) (Agilent). Las muestras se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG biotinilado por 30 min y por último con estreptavidina conjugada con peroxidasa por otros 30 min. La reacción peroxidasa con el cromógeno 3,3´-diaminobencidina (DAB) formó un precipitado marrón en el sitio de unión del antígeno con el anticuerpo. La contratinción fue realizada con hematoxilina y montados en forma definitiva con bálsamo para su posterior evaluación. Los preparados fueron analizados por el patólogo, Dr. Roberto Meiss (Academia Nacional de Medicina). La evaluación de los resultados se realizó señalando la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de la marcación y en los casos positivos, clasificando la intensidad se clasificó como leve (+), moderada (++) o intensa (+++), especificando la localización celular de la misma y la localización tisular de las células positivas.

11. Histomorfometría

Se diseccionaron los fémures de ratones de la cepa BALB/c *Hmox1*$^{+/+}$, *Hmox1*$^{+/-}$ o *Hmox1*$^{-/-}$ de 2 meses de edad. Los huesos se fijaron en formalina 4% tamponada (pH:7,4) por 24h, luego se lavaron con PBS y fueron guardados en etanol 70% hasta su procesamiento para análisis histomormofétricos (cita paper hueso). Las muestras fueron tratadas siguiendo protocolos estandarizados por el Bone Histomorphometry Core Laboratory, MD Anderson Cancer Center (dirigido por la Dra. Nora Navone y a cargo de Michael Starbuck), donde se realizaron las histomorfometrías. Las muestras fijadas fueron deshidratadas, embebidas en resina plástica de metilmetacrilato, y cortadas en secciones consecutivas de 5 µm de espesor, las cuales fueron teñidas con azul de Toluidina para el estudio de Osteoblastos, o TRAP/Hematoxilina para osteoclastos. Las mediciones se realizaron en dos secciones separadas por una distancia de 40 µm, y los datos fueron agrupados. La región de interés se localizaba en la metáfisis distal del fémur (comenzando aproximadamente a 150 µm del plato de crecimiento y extendiéndose a 1,3 mm hacia la diáfisis. El área de medición

excluyó la región de 150 µm adyacente al hueso cortical. Para las muestras teñidas con azul de Toluidina, todas las longitudes de la superficie endóstica del hueso esponjoso se midieron y clasificaron como superficie osteoide (OS), o superficie con osteoblastos (Ob. S) en presencia o ausencia de osteoide. Para superficies identificadas como Ob. S, los osteoblastos individuales fueron contados y los datos se agruparon. Todas las otras superficies fueron consideradas quiescentes. Para las muestras con tinción para TRAP, tanto la superficie con osteoclastos (Oc. S.) y/o la superficie erosionada (ES) fueron identificadas y se midió su longitud. En las superficies identificadas como Oc. S., se contaron los osteoclastos (células multinucleadas, positivas para TRAP). La superficie que era rugosa y de aspecto festoneado, ya sea con o sin la presencia de osteoclastos, se clasificó como ES. Se obtuvieron una serie de mediciones básicas, tales como número de células, longitudes, áreas y distancias. Estas mediciones se transformaron en parámetros histomorfométricos, los cuales proporcionan información sobre la estructura ósea (parámetros estáticos) (Tabla 2).

Parámetros	Abrevición
Parámetros estructurales	
Volúmen de hueso (%) (Bone volume/Tissue volume (%))	BV/TV
Densidad de la superficie ósea (mm^{-1}) (Bone Surface/Tissue volume (mm^{-1}))	BS/TV
Espesor trabecular promedio (µm) (Trabecular thickness (µm))	Tb.Th
Densidad de hueso trabecular (mm^{-1}) (Trabecular number (mm^{-1}))	Tb.N
Distancia promedio entre trabeculas (mm) (Trabecular separation (mm))	Tb.Sp
Parámetros estáticos de formación	
Superficie de osteoide (%) (Osteoid surface/bone Surface (%))	OS/BS
Superficie con osteoblastos (%) (Osteoblast surface/Bone surface (%)	Ob.S/BS
Núm. de osteoblastos por área analizada total ($\#/mm^2$) (Osteoblasts/Total area ($\#/mm^2$))	N.Ob/T.A
Núm. de osteoblastos por perímetro de hueso (#/mm) (Osteoblasts/Bone perimeter (#/mm))	N.Ob/B.Pm
Núm. de osteoblastos por perímetro de osteoide (#/mm) (Osteoblasts/Osteiod perimeter (#/mm))	N.Ob/O.Pm
Superficie de osteoide con osteoblastos (%) (Osteoid surface lined with osteoblast/Bone surface (%))	Os(Ob+)/BS

Parámetros estáticos de resorción	
Núm. de osteoclastos por área analizada total (#/mm^2) (Osteoclasts/Total area (#/mm^2))	N.Oc/T.A
Núm. de osteoclastos por perímetro de hueso (#/mm) (Osteoclasts/Bone perimeter (#/mm))	N.Oc/B.Pm
Núm. de osceoblastos por perímetro de hueso (#/mm) (Osteoclasts/Bone perimeter (#/mm))	N.Oc/B.Pm
Superficie erosionada (%) (Eroded surface/bone Surface (%))	ES/BS
Superficie con osteoclastos (%) (Osteoclast surface/Bone surface (%)	Oc.S/BS
Superficie erosionada con presencia de osteoclastos (%) (eroded surface lined with osteoclast/Bone surface (%))	ES(Oc+)/BS

Tabla 2- Parámetros histomorfométricos analizados.

12. Espectrometría de masa

Con el fin de analizar/detectar proteínas secretadas tanto por las células tumorales como las óseas hacia el medio de cultivo, realizamos un estudio proteómico de los medios condicionados (MC) provenientes del co-cultivo entre células PC3 y células Raw264.6. Una vez finalizado el experimento de co-cultivo, se colectaron los MC para cada condición experimental, se centrifugaron (10min, 2000 rpm) y se pasaron a un tubo limpio, para limpiarlos de células o residuos celulares remanentes. Luego fueron concentrados por centrifugación en columnas (vivaspin® 20 Polyethersulfone; *cut off* >10 kDa; #VS2001; Sartorius, Argentina). Una vez concentrados, se lavaron con PBS (3 veces) en las mismas columnas, y finalmente se cuantificaron las proteínas por el método de BCA.

Para la identificación de proteínas, los MC se sometieron a digestión protéica y análisis por Espectrometría de Masa, llevado a cabo en el Centro de Proteómica CEQUIBIEM, en la Universidad de Buenos Aires/CONICET de acuerdo con el siguiente protocolo: Las muestras protéicas fueron reducidas con ditiotreitol (DTT) en 50mM de bicarbonato de aminio a una concentración final de 10mM (45 min, 56ºC) y alquiladas con iodoacetamida en el mismo solvente a una concentración final de 20mM (40 min, Tº amb, en oscuridad).

Las muestras digeridas fueron analizadas por nanoLC-MS/MS en un Espectrómetro de Masa QExactive (Thermo Scientific), acoplado a nanoHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). Para el análisis de LC-MS/MS, se inyectaron 2 µg de péptidos en una columna de fase reversa (C18, 2µm, 100A, 50µm x 150mm) Easy-Spray Column PepMap RSLC (P/N ES801) adecuada para separar complejos protéicos con un alto grado de resolución. Se realizó una corrida de 120 minutos, con un flujo de 300 nL/min y un gradiente de 7% B (5min) a 35% (120min). El solvente A fue 0,1% de ácido fórmico en agua mientras que el B fue 0,1% de ácido fórmico en

acetonitrilo. El volumen de inyección fue de 2µL. Se utilizó un voltaje de 3,5 kV para la ionización por Electro Spray (Thermo Scientific, EASY-SPRAY). El equipo de MS posee una celda de disociación de alta colisión (HCD) para fragmentación y un analizador Orbitrap (Thermo Scientific, Q-Exactive).

La adquisición de los datos se realizó usando el *software* XCalibur 3.0.63 (Thermo Scientific) y el equipo se configuró de manera que permita la identificación de péptidos al mismo tiempo de su separación cromatográfica. Los espectros de masas de barrido completo fueron adquiridos en el analizador Orbitrap. El rango de masas escaneado fue 400-1800 m/z, con una resolución de 70000 a 400 m/z, y los doce iones mas intensos en cada ciclo fueron subsecuentemente aislados, fragmentados por HCD y medidos en el analizador Orbitrap. Los péptidos con una carga de +1 o con un estado de carga no asignada se excluyeron de la fragmentación para MS2.

Las muestras obtenidas por MS/MS fueron analizadas utilizando Proteome Discoverer (versión 2.1.1.21; Thermo) que utiliza el motor de búsqueda Sequest, contra proteínas de *Homo Sapiens* y *Mus musculus* presentes en la base de datos proteica de Uniprot , simulando la digestión con tripsina, y como modificaciones post traduccionales se utilizaron la carbamidometilación de cisteínas (fija) y la oxidación de metioninas (variable). La búsqueda se realizó con una tolerancia de masa de fragmento de 0,05 Da y una tolerancia de ion parental de 10 ppm. La identificación de péptidos se realizó con una probabilidad de falsos positivos (false discovery rate o FDR calculado con una base de datos decoy concatenada) menor al 1%.

13. Análisis bioinformático

Las redes de interacción se realizaron utilizando el programa Cytoscape versión 3.2.1.

13.1. Meta análisis utilizando múltiples bases de datos de pacientes con CaP

13.1.1. Análisis de expresión de ANXA2 en diferentes tejidos basado en plataformas el línea: Oncomine

Se utilizó la plataforma Oncomine[188], que contiene 715 sets de datos de microarrays de pacientes con PCa y 68 tipos de tumor, para identificar los microarrays de expresión que compararan la expresión en adenocarcinoma prostático vs. glándula prostática.

Criterios de selección:

i) Provenir de tumores humanos.

ii) Comparar adenocarcinoma prostático vs. glándula prostática normal.

iii) Diferencias en los niveles de expresión entre ambas muestras con un $P<0,05$.

iv) Aumento o disminución en la expresión génica mayor o igual a 1,5 veces (fold change) y/o que el gen estudiado estuviese entre el 10% de los genes con mayor cambio de expresión entre los trabajos considerados (gene rank).

En algunos casos, aquellos trabajos en los cuales el fold change <1,5 o gene rank >10%, fueron incluidos en el análisis siempre que el valor $P<0,05$.

Análisis:

Para cada trabajo se asignó un valor “gene rank” para ANXA2 que corresponde al ranking que ocupa dicho gen en el array analizado de acuerdo a su expresión, y un “median rank” correspondiente a la mediana del “gen rank” del gen estudiado entre todos los arrays estudiados. Los resultados obtenidos en Oncomine fueron validados con la literatura citada en cada resultado.

13.1.2. Análisis de expresión de ANXA2 en diferentes tejidos basado en sets de datos públicos

Para estudiar la expresión de ANXA2 en muestras de tejido provenientes de pacientes con CaP, se seleccionaron dos set de datos de acuerdo al siguiente criterio:

i) Estudios con información de expresión génica en muestras de CaP primario y tejido normal adyacente.

ii) Estudios con información de expresión génica en muestras de CaP primario y metástasis.

iii) Estudios con un número mayor a 60 muestras.

iv) Estudios publicados y disponibles en repositorios públicos.

13.1.2.1. Se utilizó el dataset del Proyecto Adenocarcinoma Prostático de The Cancer Genome Atlas (TCGA-PRAD[189]) que cuenta con información sobre la expresión génica de 500 muestras de CaP y tejido normal adyacente, medido por secuenciación masiva (lluminaHiSeq).

13.1.2.2. Nelson Lab, Fred Hutchinson CRC (GSE74685)[190], que cuenta con información de expresión para 171 muestras de tumor primario o metástasis a diferentes sitios provenientes de 63 pacientes con CaP, medida por *microarray* en la plataforma "Agilent 44K".

Para el análisis estadístico de la expresión de ANXA2 en los diferentes tejidos se utilizaron las herramientas estadísticas "InfoStat" (Versión 2018) o "GraphPad Prism 5". La significancia estadística de la diferencia de expresión entre tejidos se calculó mediante la prueba t de Student. Se consideraron como significativas aquellas diferencias con valor $p<0,05$.

13.1.3. Análisis de la sobrevida general y libre de recaída en relación a los niveles de expresión génica

Para estudiar el impacto de la expresión de ANXA2 y PLAU en la sobrevida general y libre de recaída de pacientes, se seleccionaron dos set de datos de acuerdo al siguiente criterio:

i) Estudios con información de expresión génica en muestras de CaP primario.

ii) Estudios con información de sobrevida (total o libre de recaida) para los pacientes de los cuales provienen las muestras.

iii) Estudios con un número mayor a 60 muestras y con un seguimiento mayor a 5 años.

iv) Estudios publicados y disponibles en el repositorio de datos GEO (Gen Expression Omnibus[191]).

Análisis:

13.1.3.1. Swedish Watchful Waiting Cohort (GSE16560)[192] que cuenta con información de 281 pacientes con CaP libres de tratamiento y seguimiento clínico a 30 años, incluido el tiempo de sobrevida total de los pacientes. Se midió la expresión de 6100 genes a partir de muestras obtenidas por resección transuretral prostática. El set de datos cuenta con la información clínica para cada paciente y su panel de expresión génica medida por *microarray* en la plataforma "Illumina GPL5474 Human 6k".

13.1.3.2. Ross-Adams 2015 VALIDATION COHORT (GSE70769)[193] que cuenta con información de 94 pacientes con CaP sometidos a prostatectomía radical y seguimiento clínico a 6 años, incluida información de recaída (recurrencia bioquímica). Se midió la expresión de 31.000 transcriptos mediante 47.000 sondas utilizando la plataforma "Illumina HumanHT- 2 V4.0" en las muestras tumorales.

Utilizando estos conjuntos de datos, los pacientes se estratificaron en dos grupos según su la alta o baja expresión del gen de interés con la herramienta "cutoff finder"[194], que utiliza el método del valor *p* mínimo para encontrar el punto de corte óptimo en una variable contínua. Se utilizó el *dataset* de Sboner para comparar la sobrevida total entre pacientes con alta o baja expresion para cada gen, y el set de datos de Ross Adams para comparar el tiempo de recaida luego de la prostatectomía.

Utilizando el software de estadística y análisis de datos "STATA", se generaron las curvas de Kaplan-Meier. Para determinar la diferencia estadística entre las curvas generadas se utilizó la prueba de log Rank. Para los análisis univariado y multivariado de los factores pronósticos se aplicó de riesgo proporcional de Cox (*Hazard Ratio*). Se consideraron como significativas aquellas diferencias con valor $p<0,05$.

13.1.4. Estudio de la expresión proteica en CaP por inmunohistoquímica en bases de datos públicas

Utilizamos la base de datos pública "THE HUMAN PROTEIN ATLAS"[195] para analizar los perfiles de expresión de ANXA2, en muestras de tejido de próstata normal y de adenocarcinoma de próstata por medio de inmunohistoquímica (IHQ). Ésta plataforma presenta un mapa basado en inmunohistoquímica de perfiles de expresión proteica en tejidos normales, cáncer y lineas celulares.

14. Análisis estadístico.

Todos los resultados se muestran como la media ± desvío estándar de al menos 3 experimentos independientes. A menos que se especifique lo contrario, la significancia estadística se determino mediante la prueba de hipótesis de análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un análisis de Tukey con un umbral de $p<0.05$ (*), $p<0.01$(**) and $p<0.001$ (***).

Resultados

1. Caracterización morfólogica, genética y fisiológica a nivel óseo de animales BALB/c *Hmox1* $^{+/+}$; $^{+/-}$; $^{-/-}$.

HO-1 cumple un papel importante durante la diferenciación de células madre de médula ósea, regulando la osteoblastogénesis y la resorción ósea. Vanella y colaboradores demostraron que la expresión de HO-1 regula positivamente la diferenciación de osteoblastos, lo cual está asociado con una reducción en los niveles de ROS[196]. Por otro lado, la inducción de HO-1 por hemina hace que los precursores de osteoclastos no respondan a los factores de diferenciación CSF-1 y RANKL al disminuir sus receptores c-fms y RANK respectivamente, regulando negativamente la osteoclastogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*[197].

Previamente en nuestro laboratorio comprobamos mediante el uso de un sistema de co-cultivo de células PC3 con cultivos primarios de osteoblastos de ratón (PMOs), que la disminución de la proliferación de los PMOs inducida por las células tumorales se restauraba cuando éstas eran pre-tratadas con el inductor farmacológico de HO-1 (hemina). El tratamiento con hemina indujo la expresión de la proteína 1 relacionada a Dickkopf (DKK-1; inhibidor de la vía de Wnt/β-catenina crítica en la remodelación ósea) en las células PC3 co-cultivadas, redirigiendo a β-catenina hacia la vía de FoxO en los osteoblastos y activando la transcripción de factores involucrados en la resolución del estrés oxidativo. Además, cabe destacar que la inoculación intra-ósea de células de PCa que sobre-expresan de manera estable HO-1 (PC3HO-1) produjo una robusta remodelación ósea[127,198]. En conjunto, estos hallazgos sugieren que HO-1 es un factor clave para el control de la inflamación, el estrés oxidativo y la angiogénesis, que altera el microambiente tumoral impactando sobre la progresión ósea del PCa.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos evaluar el efecto de la deficiencia de HO-1 sobre: 1) el metabolismo óseo. Para ello utilizamos huesos de de ratones BALB/c *Hmox1* +/+ (WT); +/- (Het); -/- (KO) sobre los que realizamos análisis histomorfométricos; 2) la interacción con las células tumorales prostáticas. Para ello utilizamos PMOs aislados de las calvarias de los mismos animales WT, Het y KO para *Hmox1*, y evaluamos la expresión de genes implicados en la tumorigénesis y remodelación ósea.

En primer lugar se realizó un análisis histomorfométrico de los fémures de los distintos animales, con el fin de caracterizar el modelo de estudio y evaluar si las diferencias genéticas respecto de *Hmox1* se traducían en alteraciones en la fisiología y por ende en la morfología del tejído óseo. Se extrajeron fémures de los animales con los diferentes genotipos, los cuales fueron fijados, embebidos en parafina y cortados en secciones en sentido longitudinal. Sobre los mismos se realizó una tinción con Azul de Toluidina. En la figura 19 se puede obserevar a los osteoblastos (células grandes de forma cúbica azul/púrpura) que recubren la superficie del hueso, y el osteoide (color rosáceo / grisáceo) (Figura 19). También se realizó una tinción para fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) con el objetivo de visualizar a los osteoclastos (color rojo, multinucleados) y a los monocitos (células TRAP+ mononucleadas) (Figura 20).

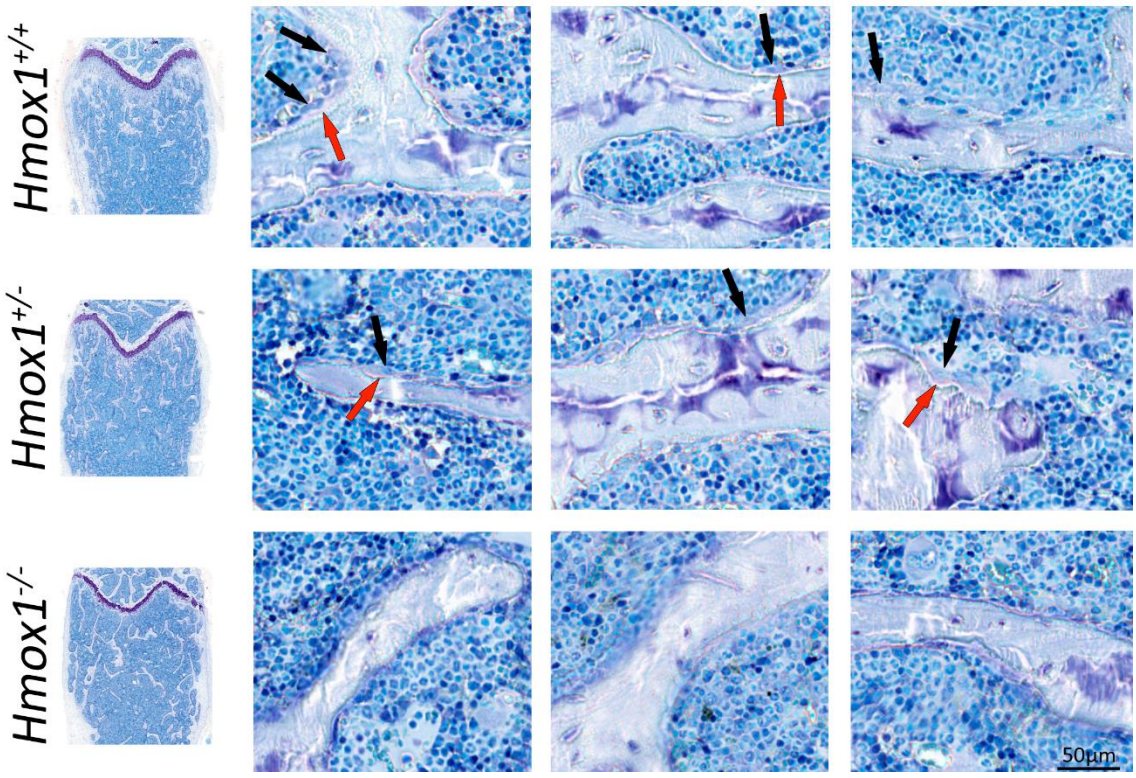


Figura 19- Corte histológico de fémures de animales WT, Het y KO para *Hmox1* teñidos con Azul de Toluidina para el análisis de osteoblastos (flechas negras) y osteoide (flechas rojas).

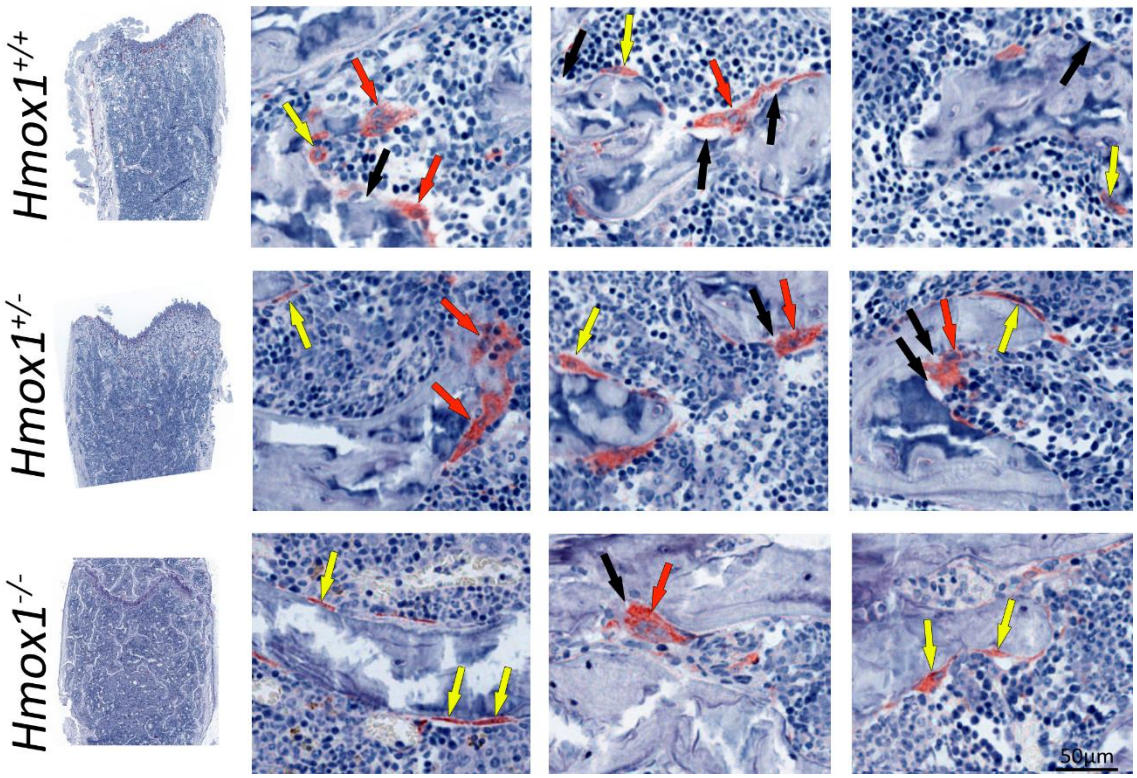


Figura 20- Corte histológico de femures de animales WT Het y KO para *Hmox1* teñidos para TRAP. Las flechas rojas indican osteoclastos maduros, las amarillas señalan monocitos, y las negras las áreas erosionadas.

Este estudio evidenció una disminucón significativa en el volúmen del hueso, en la densidad de la superficie ósea y en la densidad del hueso trabecular, dado por un aumento en la distancia promedio entre trabéculas, en los animales KO respecto de los WT (Figura 21).

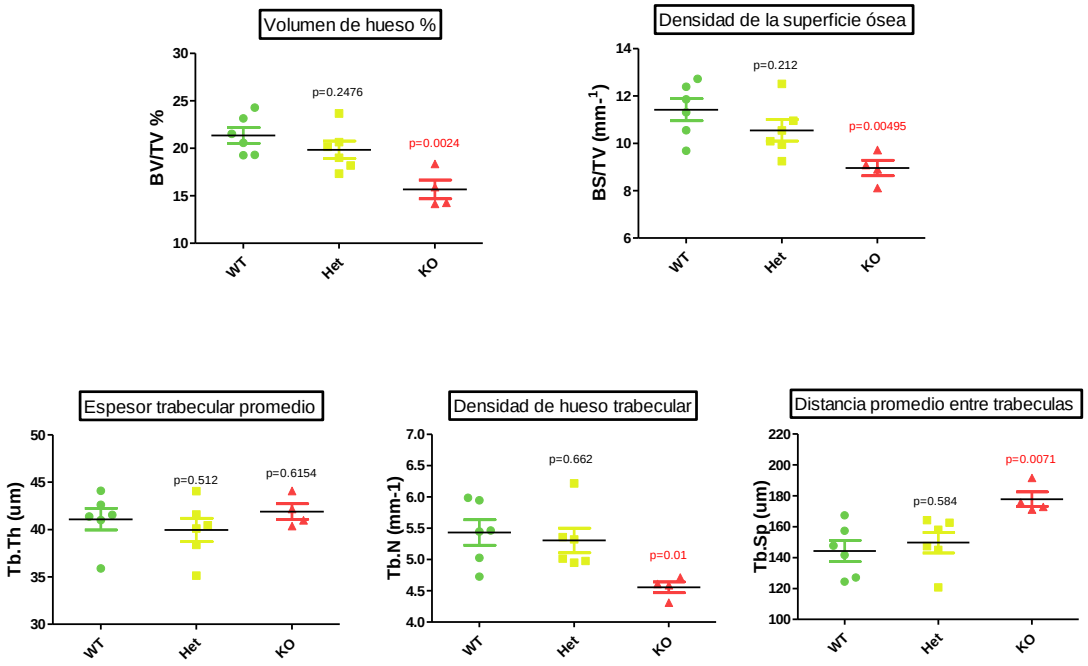


Figura 21- Parámetros estructurales óseos. Representación en forma de “dot-plot” de diferentes parámetros estructurales analizados por histomorfometría en fémures de animales WT Het y KO para *Hmox1*. En cada caso se expresa la significancia estadística (*p*-valor) respecto de los valores obtenidos para los WT. La representación del *p*-valor en color rojo indica diferencias significativas.

En concordancia con estos resultados también se vió una reducción en todos los parametros estáticos de formación, con una pérdida total de la superficie de osteoide (utilizado como parámetro de neoformación ósea), consistente con una reducción en el número de osteoblastos (Figura 22). Del mismo modo se observó una disminución en el número de osteoclastos, y la consecuente reducción de los parámetros estáticos de resorción (Figura 23).

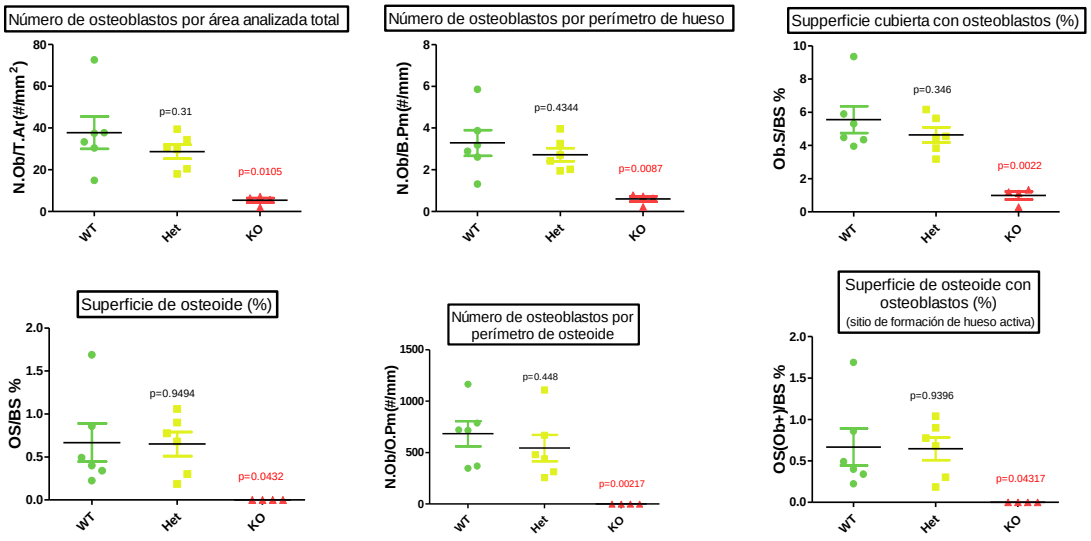


Figura 22- Parámetros estáticos de formación. Representación en forma de "dot-plot" de diferentes parámetros estáticos de formación ósea analizados por histomorfometría en fémures de animales WT Het y KO para *Hmox1*. En cada caso se expresa la significancia estadística (*p*-valor) respecto de los valores obtenidos para los WT. La representación del *p*-valor en color rojo indica diferencias significativas.

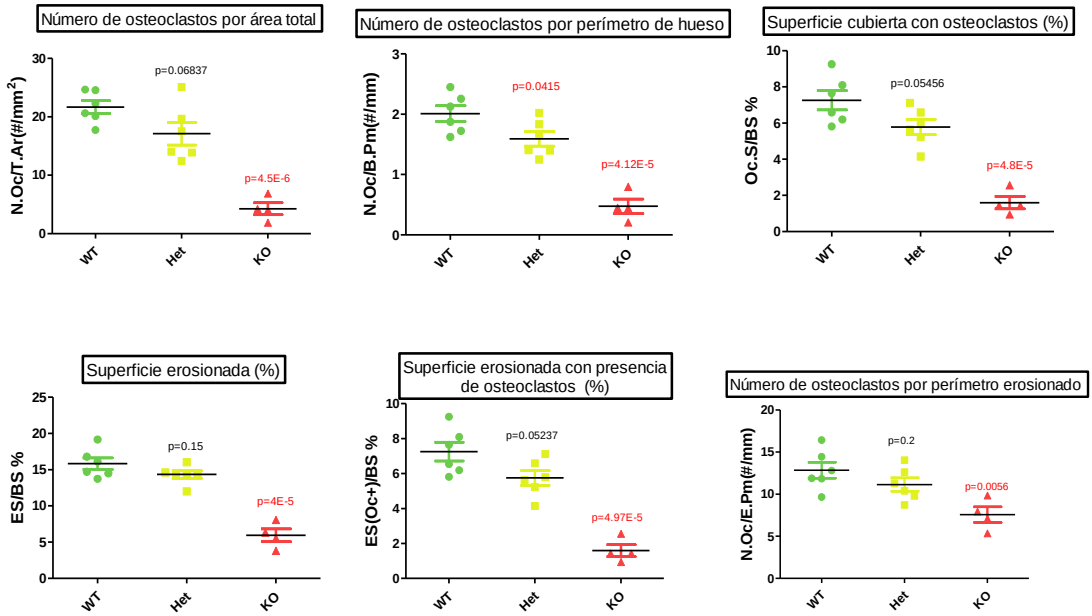


Figura 23- Parámetros estáticos de resorción. Representación en forma de "dot-plot" de diferentes parámetros estáticos de resorción ósea analizados por histomorfometría en fémures de animales WT Het y KO para *Hmox1*. En cada caso se expresa la significancia estadística (*p*-valor) respecto de los valores obtenidos para los WT. La representación del *p*-valor en color rojo indica diferencias significativas.

Considerando las diferencias observadas a nivel morfológico, se decidió evaluar si estas alteraciones podían estar asociadas a cambios en la expresión génica. Para ello, los PMOs fueron aislados a partir de las calvarias de los animales WT, Het y KO para *Hmox1*, y se analizó la expresión de genes involucrados en la fisiología ósea mediante RT-qPCR. Se observó que existe una correlación directa entre los niveles de expresión de *Hmox1* y genes como *Runx2* -gen de diferenciación temprana de osteoblastos- (Figura 24 A); *Col1a1* -involucrado en la deposición de la matriz de colágeno- (Figura 24 B); y *Csf-1*, *Opg, Il-6* -codifican para proteínas de secreción que modulan la diferenciación/activación de osteoclastos- (Figura 24 C-E). Por otro lado, otras moléculas importantes en la activación y función de osteoclastos, como *Opn* -media la adhesión del osteoclasto para la resorción ósea- y *Rankl* –factor de diferenciación de osteoclastos- mostraron un patrón de comportamiento independiente de los niveles de *Hmox1* (Figura 24 F y G).

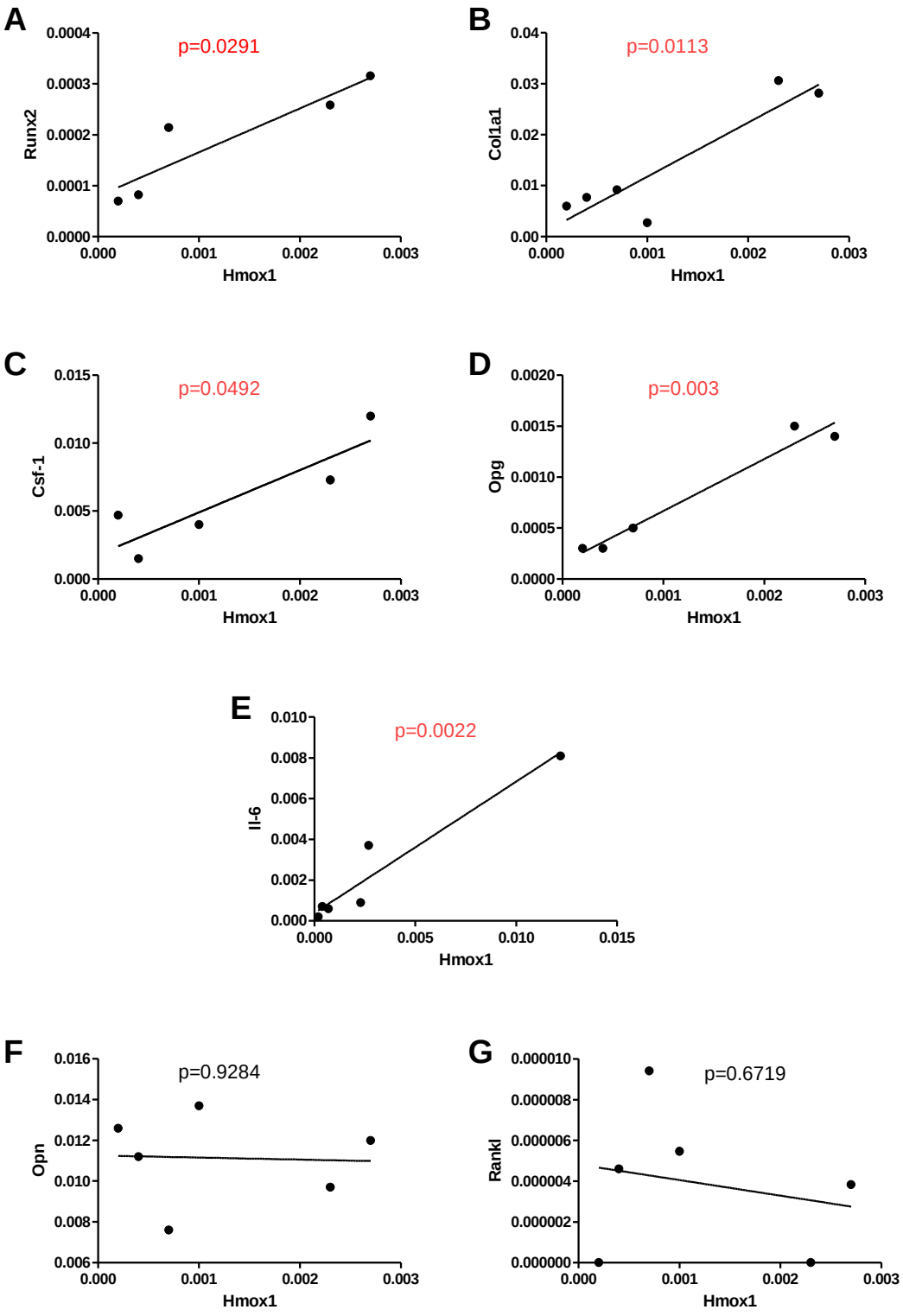


Figura 24- Correlación en la expresión de genes implicados en la remodelación ósea respecto de *Hmox1*. Niveles de la expresión génica (relativos a *36b4*) medidos mediante RT-qPCR de los genes A)*Runx2*; B)*Col1a1*; C)*Csf-1*; D)*Opg*; E)*Il-6*; F)*Opn*; G)*Rankl*, expresados en función de los niveles de *Hmox1* en PMOs aislados de animales WT Het y KO para *Hmox1*. Los datos fueron sometidos a una regresión lineal (recta). En cada caso se expresa la significancia estadística (*p*-valor) para la regresión lineal obtenida. La representación del *p*-valor en color rojo indica diferencias significativas.

Previamente se ha reportado que HO-1 confiere citoprotección contra la inflamación y el estrés oxidativo en varios modelos animales[132]. El estrés oxidativo es una consecuencia natural del proceso inflamatorio y actúa como modulador de la función de los tejidos mineralizados[130]. Esto impacta sobre la formación de hueso por inhibir la diferenciación de los osteoblastos y promover la apoptosis[131]**.** Estos efectos son mediados en parte por ROS generadas en el contexto del estrés oxidativo. Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos analizar los niveles de ROS en PMOs obtenidos de los ratones con los diferentes genotipos (*Hmox1* WT, Het y KO) por citometría de flujo, usando la sonda diclorofluoreceína diacetato (DCFDA) como sonda. En primer lugar evaluamos este parámetro en PMOs cultivados solos (Figura 25) encontrando un menor porcentaje de células DCF+ en los PMOs KO al compararlos con los provenientes de los animales WT o Het (Figura 25 A). Cuando analizamos la distribución de frecuencias para la intensidad de la marca en el canal de FITC (Ex/Em: 495 nm/519 nm) (Figura 25 B), identificamos dos poblaciones (*High* y *Low*). Comparados con los PMOs WT, la población *Low* de las células Het y KO tiene menor intensidad de fluorescencia. Por otro lado, las poblaciones *High* tienen la misma intensidad, pero la frecuencia es mayor en PMOs Het al compararlos con los PMOs WT La frecuencia de células en la población *High* para los PMOs KO se vio fuertemente disminuida, mostrando una fracción pequeña de células con alta intensidad de fluorescencia (Figuras 25, B y C)**.**

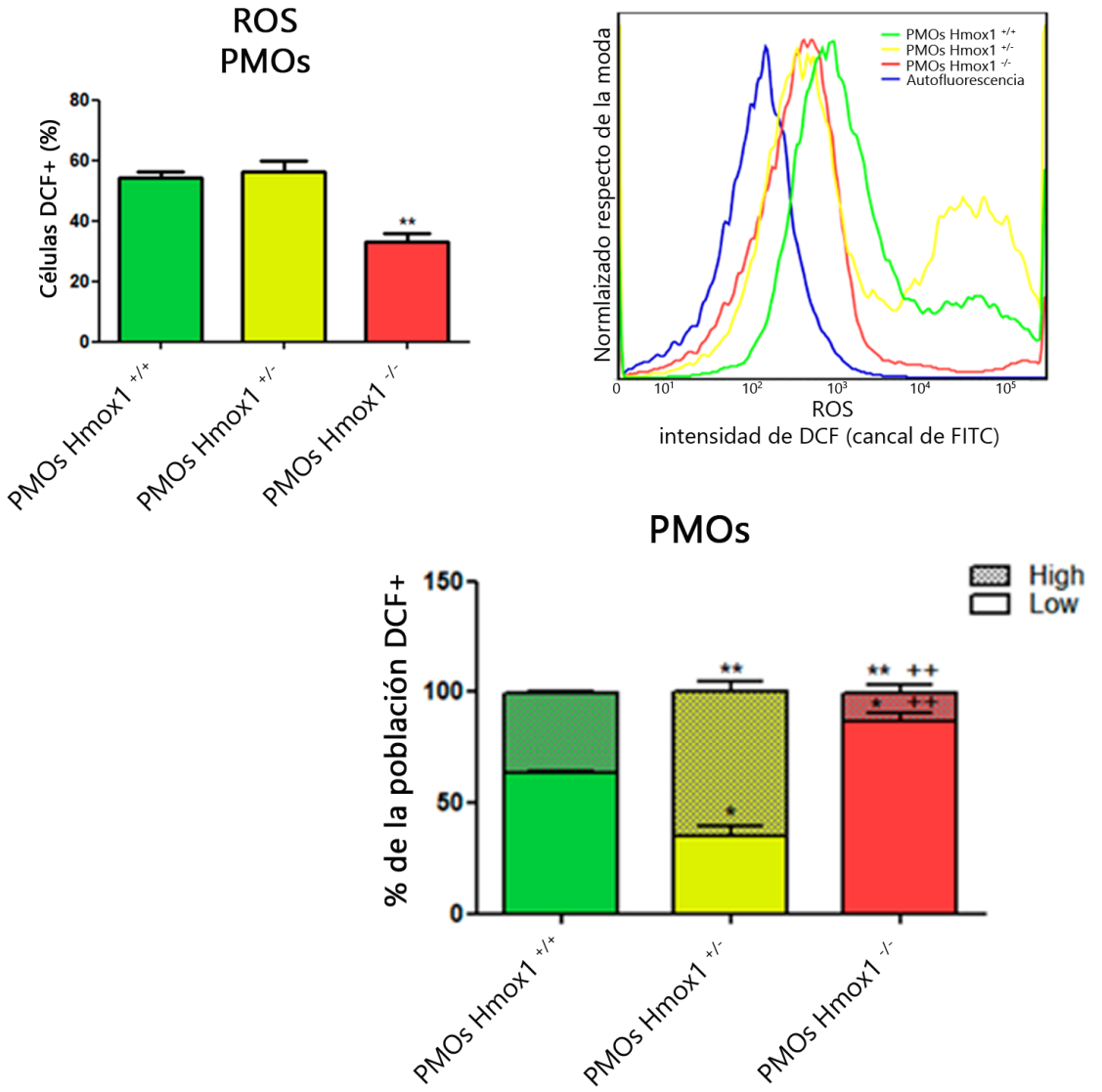


Figura 25- Niveles de ROS en PMOs medidos por citometría de flujo en el canal de FITC, usando DCFDA como sonda. A) Porcentaje de células DCF+ para PMOs *Hmox1* +/+; +/-; -/-. B) Histograma representativo para la intensidad de DCF para PMOs *Hmox1*$^{+/+}$ (Verde), *Hmox1*$^{+/-}$ (Amarillo), *Hmox1*$^{-/-}$ (Rojo), Autofluorescencia (Azul). C) Distribución porcentual de células DCF+ en cada población de intensidad *(High o Low*). * p<0,05; ** p<0,01.

En base a estos resultados hipotetizamos que en los PMOs de animales Het, el incremento en la población *High* se debió a que estas células tienen menos copias de *Hmox1*, y por lo tanto una capacidad disminuida para mantener la homeostasis oxidativa (Figura 25 C). Por otro lado, pensamos que células de animales carentes de HO-1 (PMOs *Hmox1*$^{-/-}$) no son capaces de sobrevivir con altos niveles de ROS, siendo la pérdida de HO-1 un factor de selección que impide la supervivencia de células con altos niveles de ROS.

2. Efecto de la deficiencia de *Hmox1* en osteoblastos sobre la interacción con las células de CaP

Teniendo en cuenta las diferencias morfológicas, fisiológicas y genéticas observadas en los huesos de los animales con los diferentes genotipos respecto de *Hmox1*, y por otro lado el efecto reportado a nivel de la expresión génica causado por la interacción entre las células de CaP y los PMOs mediante factores solubles[127], se decidió evaluar el efecto del co-cultivo de células PC3 (pre-tratadas o no con hemina) con PMOs aislados de los animales WT Het y KO para *Hmox1*.

En primera instancia comparamos los niveles de ROS en PMOs provenientes de animales WT, Het o KO para *Hmox1* entre las diferentes condiciones de co-cultivo (Figura 26 A). Solo los PMOs Het mostraron un incremento en el porcentaje de células DCF+ cuando fueron co-cultivados con células de CaP, ya sea que estén pre-tratadas o no con hemina (Figura 26, B y C).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el efecto estresor generado por la presencia de células de CaP se hizo evidente solo en PMOs Het debido a su capacidad regulatoria disminuida (Figura 26).

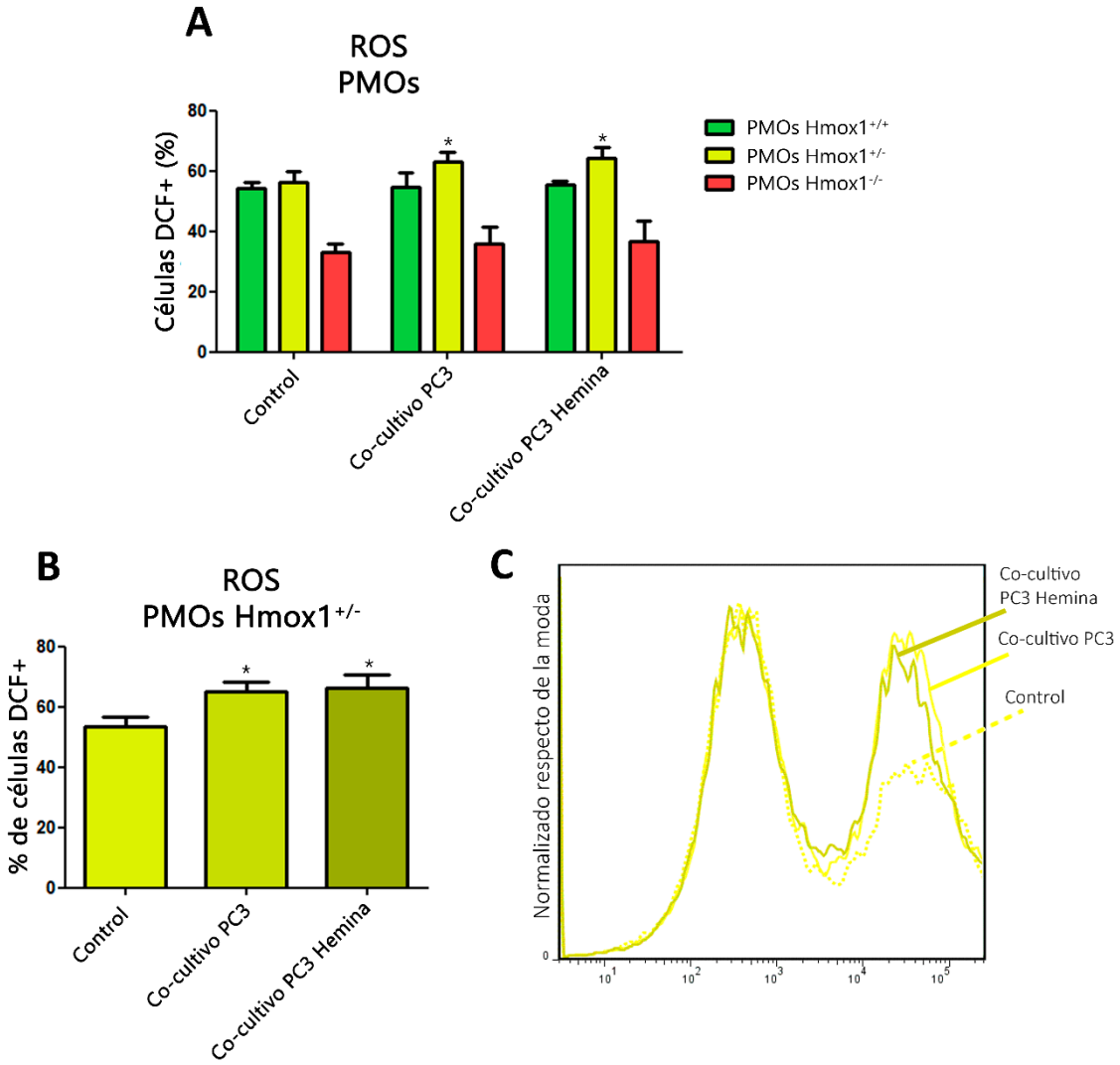


Figura 26- A) Niveles de ROS medidos en PMOs WT Het y KO para *Hmox1,* bajo las diferentes condiciones de co-cultivo, mediante citometría de flujo en el canal de FITC usando una sonda de DCFDA. B) Detalle de células DCF+ en PMOs *Hmox1*$^{+/-}$ cultivadas en las condiciones experimentales detalladas en la figura. C) Histogramas representativos para la intensidad de DCF en PMOs *Hmox1*$^{+/-}$ en las condiciones experimentales de co-cultivo. * p<0,05.

El siguiente paso fue evaluar la expresión génica de *Hmox1* mediante RT-qPCR. En primer lugar se corroboró la diferencia en la expresión de este gen entre los PMOs provenientes de los animales con los distintos genotipos (Figura 27 A). Al analizar el efecto del co-cultivo sobre los PMOs se vio que tanto en los PMOs WT como los Het, la presencia de células PC3 (pre-tratadas o no con hemina) modula negativamente la expresión de *Hmox1* (Figura 27 B y C). En el caso de los PMOs KO, la expresión basal es demasiado baja dificultando la correcta cuantificación mediante RT-qPCR en las diferentes condiciones experimentales.

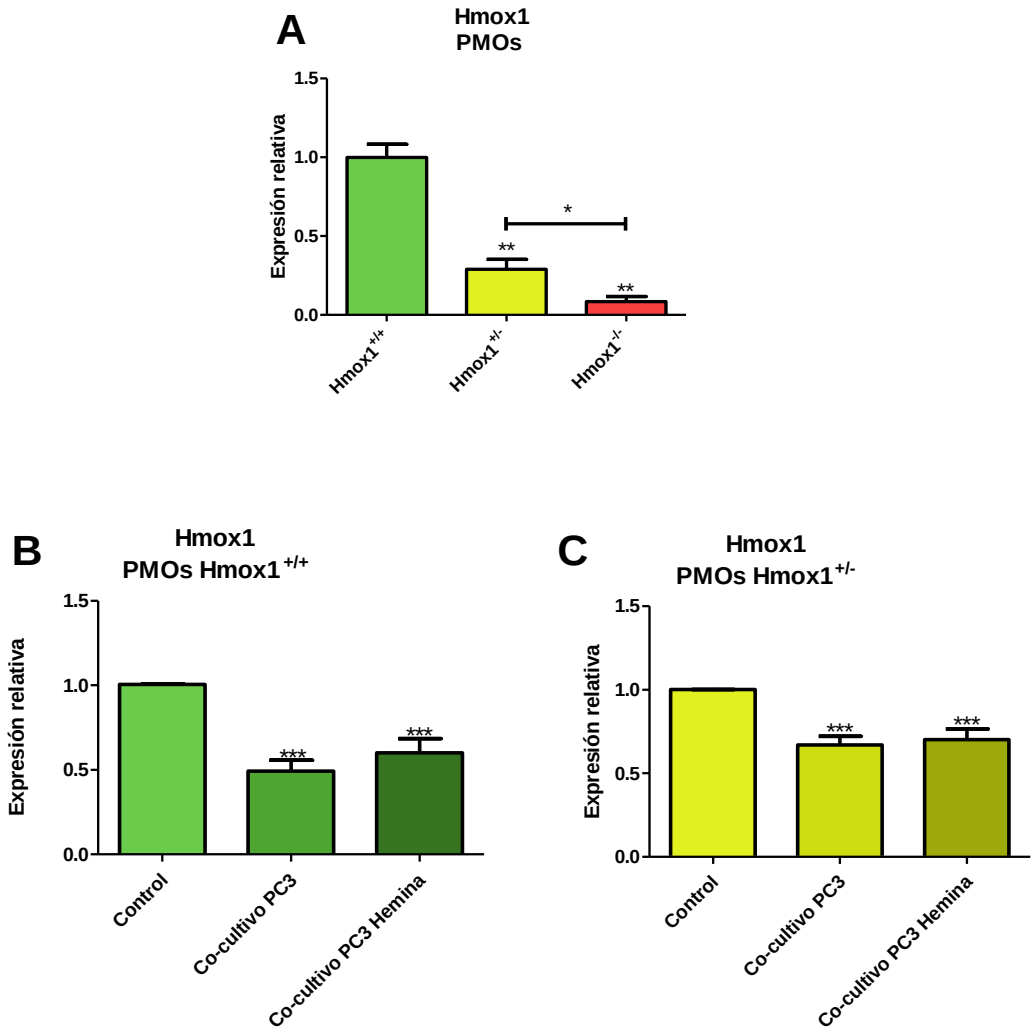


Figura 27- Niveles de expresión de *Hmox1* evaluado mediante RT-qPCR en PMOs. Comparación en los niveles basales de *Hmox1* entre PMOs WT Het y KO para *Hmox1* (A). Efecto del co-cultivo con células PC3 o células PC3 pre-tratadas con hemina sobre la expresión de *Hmox1* en PMOs WT (B) y Het (C). Los valores fueron relativizados utilizando *36b4* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Al analizar en los PMOs WT el efecto del co-cultivo sobre la expresión de los genes implicados en la remodelación ósea hallamos que la presencia de células de la línea PC3 tuvo un efecto negativo sobre la expresión de *Opg* y *Csf-1*, y este efecto se mantuvo cuando las células tumorales fueron pre-tratadas con hemina (Figura 28 A y E), dando una respuesta similar a la de *Hmox1* (Figura 28 B) y en concordancia con la correlación antes mencionada (Figura 24). Por otro lado, la expresión de *Rankl* fue regulada positivamente por efecto del co-cultivo (Figura 28 B). Este aumento sumado a la disminución de *Opg* causarían un desbalance en la relación Rankl/Opg que podrían favorecer la activación de

osteoclastos en el microambiente óseo. Si bien el pre-tratamiento con hemina sobre la célula tumoral no moduló el efecto del co-cultivo sobre la expresión de *Opg* en los PMOs WT, éste fue capaz de prevenir el aumento en la expresión de *Rankl*. En línea con esto, el co-cultivo con células de CaP pre-tratadas con hemina indujo un aumento de la expresión de *Runx2* en los PMOs WT (Figura 28 C), llevando a los osteoblastos hacia un perfil que parecería ser menos pro-osteoclástico y/o mas pro-osteoblástico. Otros genes como *Il-6* sufrieron una pequeña disminución, que solo fue significativa frente al co-cultivo con células PC3 pre-tratadas con hemina (Figura 28 F), mientras que *Col1a1* y *Opn* no se vieron afectados (Figura 28 D y G).

Las condiciones ensayadas sobre la expresión de *Opg*, *Runx2*, *Csf-1* y Opn en los PMOs Het, evidenciaron el mismo efecto observado para los PMOs WT (Figura 29 A, C, E y G), permitiendo pensar que la respuesta no se ve afectada por los niveles basales de *Hmox1* en las células óseas. Mas aún, incluso en los PMOs KO se conservó el efecto de los tratamientos sobre la expresión de *Opg, Runx2* y *Opn* (Figura 30 A, C y G); mientras que la expresión de *Csf-1* solo se vio afectada por la presencia de células tumorales pre-tratadas con hemina (Figura 30 E).

La pérdida de copias de *Hmox1* disipó el efecto del co-cultivo sobre *Il-6*, cuya expresión no evidenció cambios en los PMOs Het y KO en las condiciones ensayadas (Figura 29 F y 30 F). De manera contraria, un aumento en la expresión de *Col1a1* fue evidente en PMOs Het cuando estas células se cultivaron en presencia de células PC3 pre tratadas con hemina (Figura 29 D). Este cambio en la expresión de *Col1a1* podría evidenciarse en los PMOs Het debido a sus niveles basales inferiores respecto de los PMOs WT. En el caso de los PMOs KO, ambas condiciones experimentales condujeron a una disminución de la expresión de *Col1a1* (Figura 30 D), mostrando un cambio en el efecto del co-cultivo a causa de la carencia de HO-1 en los PMOs.

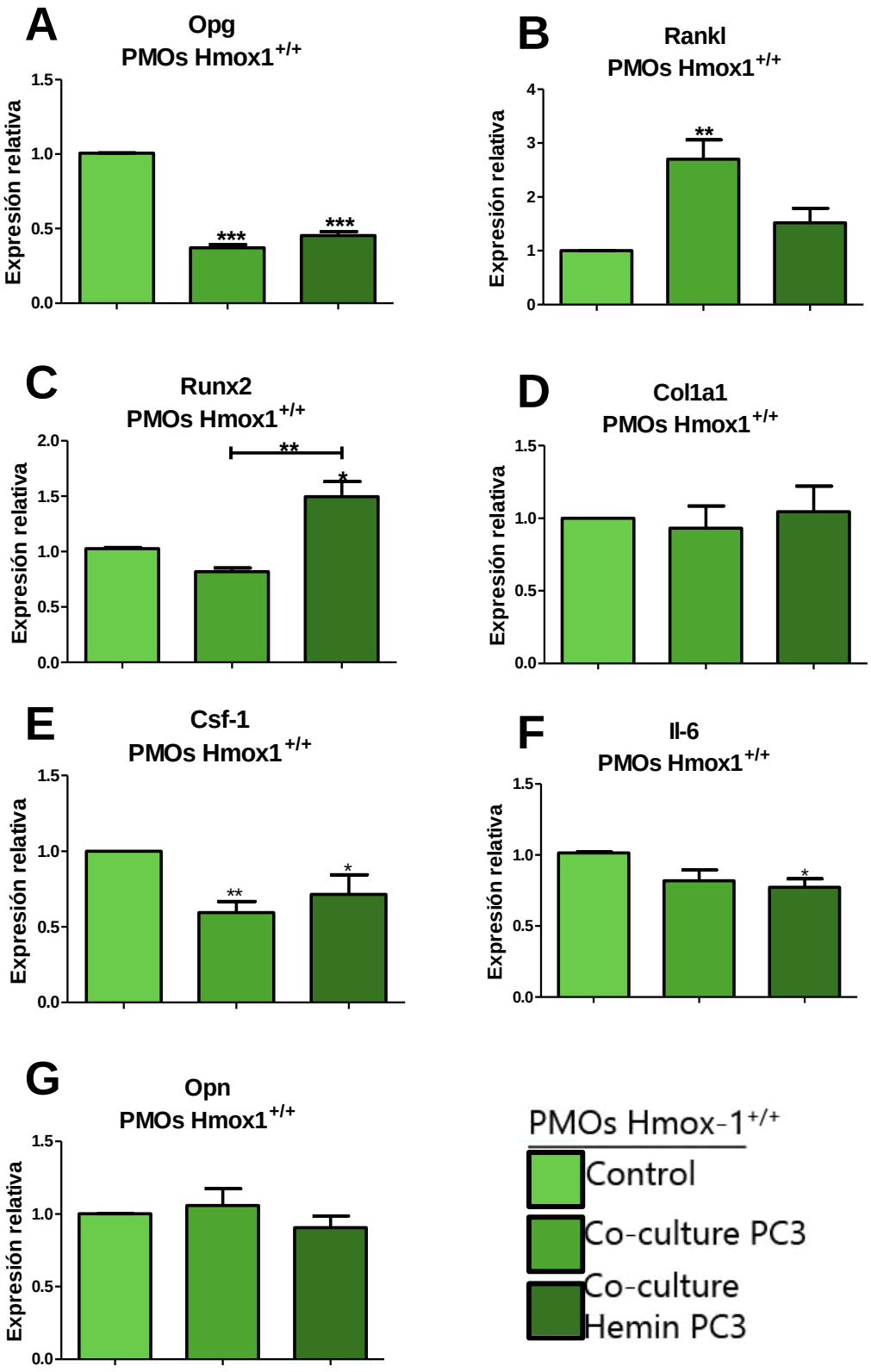


Figura 28- Niveles de expresión de A) *Opg*; B) *Rankl*; C) *Runx2*; D) *Col1a1*; E) *Csf-1*; F) *Il-6* y G) *Opn* evaluados mediante RT-qPCR en PMOs WT, crecidos solos o en co-cultivo con células PC3 o células PC3 pre-tratadas con hemina. Los valores fueron relativizados utilizando *36b4* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

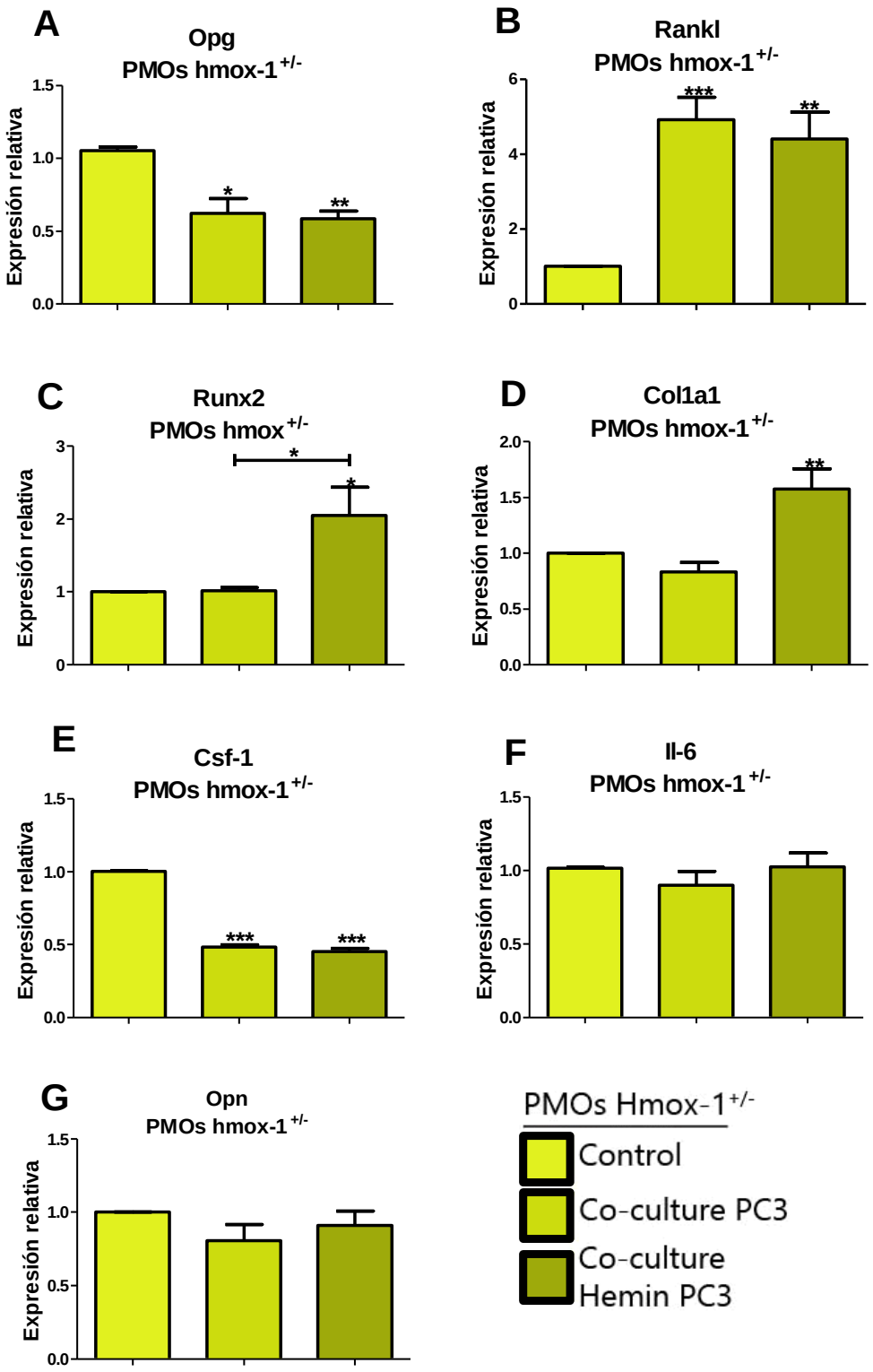


Figura 29- Niveles de expresión de A) *Opg*; B) *Rankl*; C) *Runx2*; D) *Col1a1*; E) *Csf-1*; F) *Il-6* y G) *Opn* evaluados mediante RT-qPCR en PMOs Het crecidos solos o en co-cultivo con células PC3 o células PC3 pre-tratadas con hemina. Los valores fueron relativizados utilizando *36b4* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

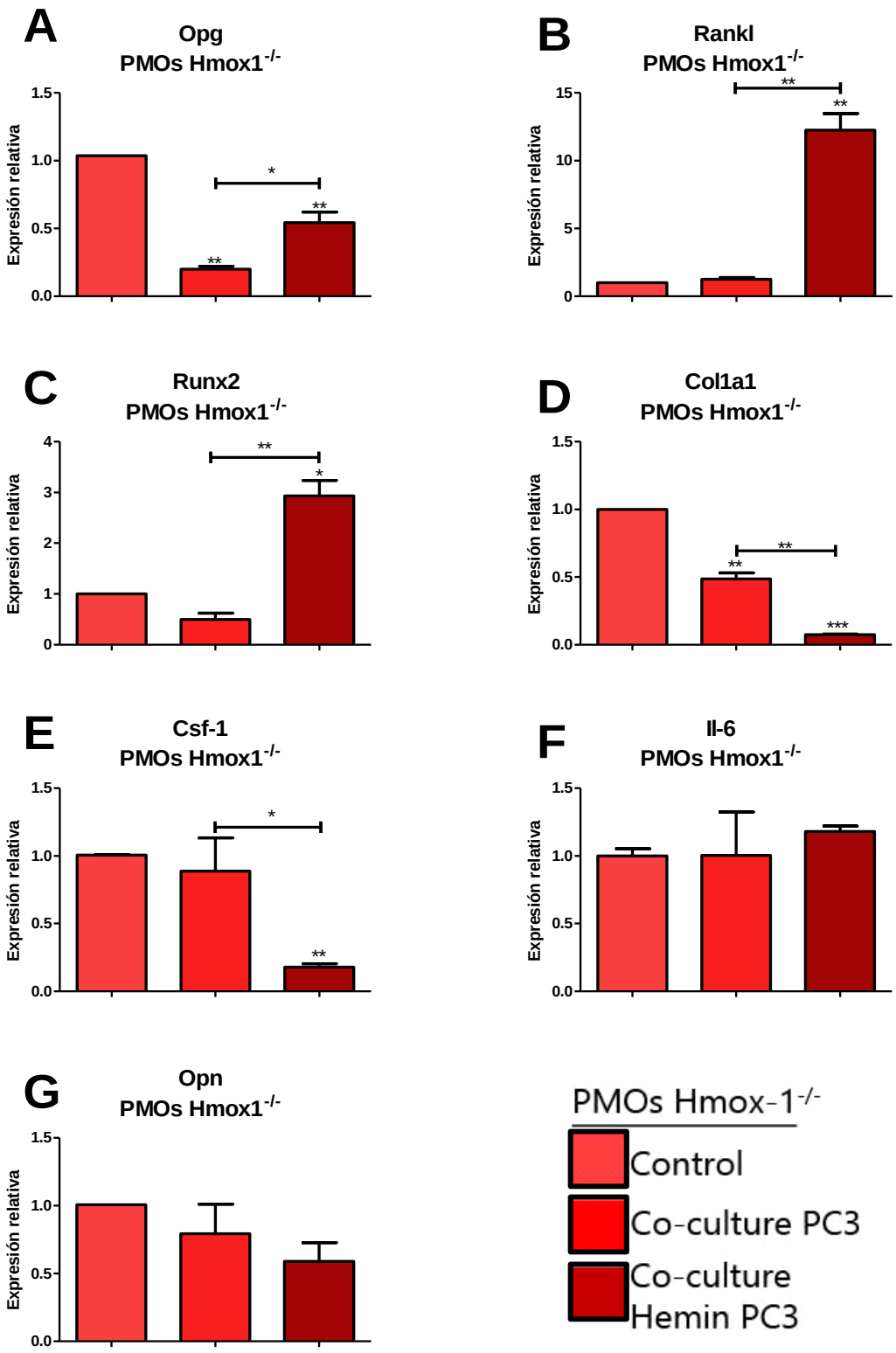


Figura 30- Niveles de expresión de A) *Opg*; B) *Rankl*; C) *Runx2*; D) *Col1a1*; E) *Csf*-1; F) *Il-6* y G) *Opn* evaluados mediante RT-qPCR en PMOs KO crecidos solos o en co-cultivo con células PC3 o células PC3 pre-tratadas con hemina. Los valores fueron relativizados utilizando *36b4* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Si bien el aumento en la expresión de *Rankl* por efecto del co-cultivo con células de CaP se mantiene en los PMOs Het (Figura 29 B), en estas células se pierde el efecto preventivo del pre-tratamiento de la célula tumoral con hemina observado en los PMOs WT. Por otro lado, el co-cultivo con las células de CaP no se capaz de inducir la expresión de *Rankl* en los osteoblastos carentes de *Hmox1*, mientras que la presencia de células tumorales pre-tratadas con hemina provoca una marcada sobreexpresión de *Rankl* en los PMOs KO (Figura 30 B). Estos resultados permiten pensar que el efecto que tuvo el co-cultivo sobre la expresión de *Rankl*, está modulado por los niveles de HO-1 no solo en la célula tumoral, sino que también en el osteoblasto.

Del mismo modo se evaluó el efecto del co-cultivo con los PMOs provenientes de los animales con los distintos genotipos, sobre la expresión de diferentes genes en células PC3 pre-tratadas o no con hemina. En primer lugar se midieron los niveles de *HMOX1*, los cuales no se vieron afectados cuando las células tumorales se co-cultivaron con los PMOs. Cuando las células tumorales fueron pre-tratadas con hemina, la inducción de *HMOX1* se mantuvo frente al co-cultivo con los PMOs WT, mientras que el co-cultivo tanto con los PMOs Het como KO revirtió parcialmente el efecto del pre-tratamiento con hemina sobre los niveles de *HMOX1* en las células de CaP (Figura 31 A).

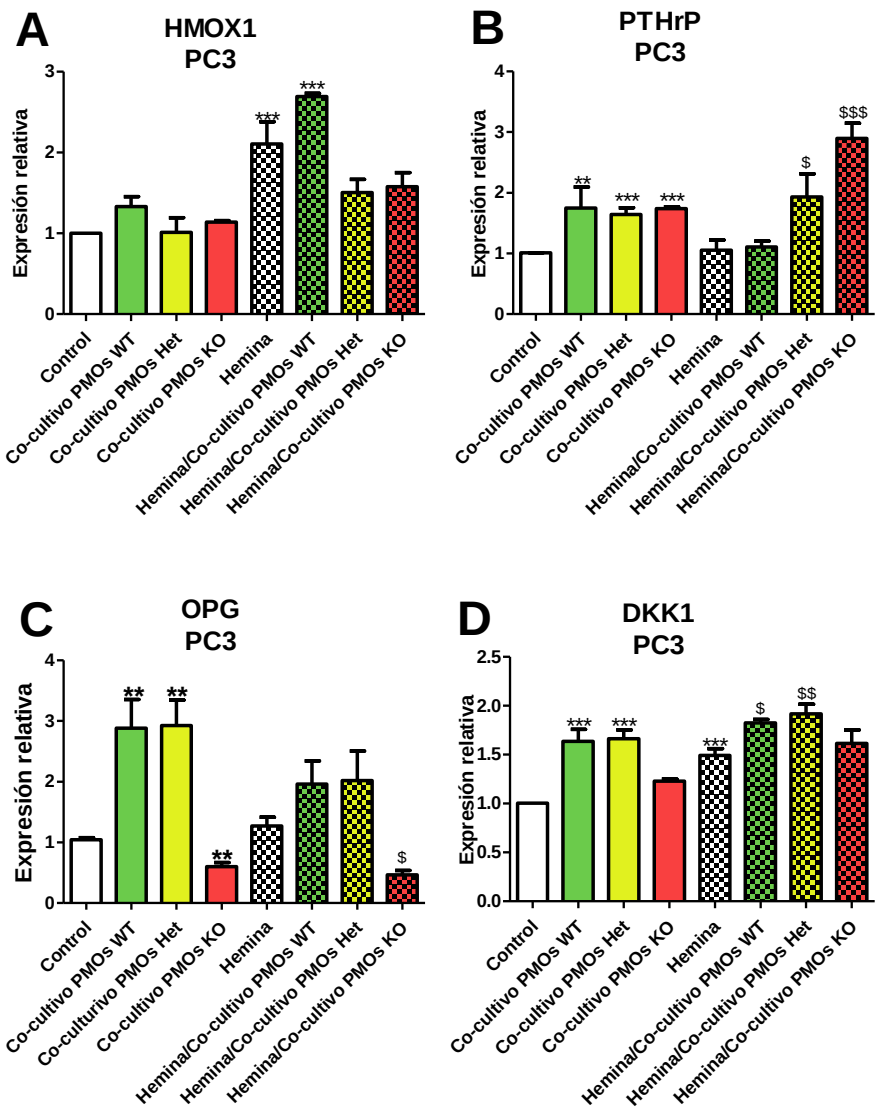


Figura 31- Niveles de expresión de A) *HMOX1*, B) *PTHrP* y C) *OPG*, evaluados mediante RT-qPCR en células PC3 pre-tratadas o no con hemina (50µM; 24h), crecidas solas o en co-cultivo (24h) con PMOs WT Het y KO para *Hmox1.* Los valores fueron relativizados utilizando *PPIA* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. Signnificancia estadística respecto del control: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; y respecto de hemina: $ p<0,05; $$ p<0,01; $$$ p<0,001.

Como mencionado anteriormente la hormona PTHrP puede ser producida por las células tumorales teniendo implicancias no solo sobre la célula tumoral, sino que también puede afectar la fisiología ósea[30,199]. Bajo nuestras condiciones experimentales, la expresión de *PTHrP* se vio aumentada en células PC3 co-cultivadas con PMOs, independientemente del genotipo de los mismos. El pre-tratamiento con hemina fue capaz de prevenir la inducción de *PTHrP* generada por el co-cultivo con PMOs WT. Esta capacidad preventiva del pre-tratamiento con hemina no solo se pierde frente al co-cultivo con PMOs Het, sino que

potencia el efecto del co-cultivo cuando las células tumorales son crecidas en presencia de PMOs KO (Figura 31 B).

Las células PC3 son capaces de expresar OPG, el cual está fuertemente implicado en el proceso de remodelación ósea[200]. Al igual que lo observado para *PTHrP*, la expresión de *OPG* aumentó en las células tumorales que habían sido co-cultivadas con los PMOs WT o Het, y este efecto fue prevenido por el pre-tratamiento con hemina (Figura 31 C). Por otro lado, el co-cultivo con PMOs KO afectó negativamente la expresión de *OPG* en las células tumorales, independientemente de que estas hayan sido o no pre-tratadas con hemina (Figura 31 C).

DKK1 es un factor crítico en la remodelación ósea, actuando como inhibidor de la vía de Wnt/β-catenina[37]. La expresión de *DKK1* sufrió un aumento en las células PC3 como consecuencia del co-cultivo con los PMOs WT o Het, pero no así por el co-cultivo con PMOs KO. El efecto del co-cultivo fue evidente incluso por sobre la inducción generada por el pre-tratamiento con hemina (Figura 31 D).

En líneas generales, el pre-tratamiento de las células tumorales con hemina moduló la respuesta de éstas al co-cultivo con los PMOs, y esta modulación fue diferente dependiendo del genotipo de los PMOs. Esto indicaría que el nivel de *Hmox1* en los PMOs no solo es importante para su fisiología, sino que también tiene implicancias en su interacción con las células tumorales.

El estrés oxidativo se ha asociado con el desarrollo y progresión del CaP debido a un aumento de los niveles de ROS[201]. Por esta razón se decidió también evaluar en las células tumorales los niveles de ROS en las diferentes condiciones de co-cultivo con PMOs (Figura 32). De acuerdo a lo descripto por otros investigadores[201], en nuestras condiciones de ensayo las células de la línea PC3 mostraron altos niveles basales de ROS. Además, comprobamos que tanto el pre-tratamiento con hemina como el co-cultivo con los diferentes PMOs no afectaron el estado oxidativo de las células tumorales (Figura 32).

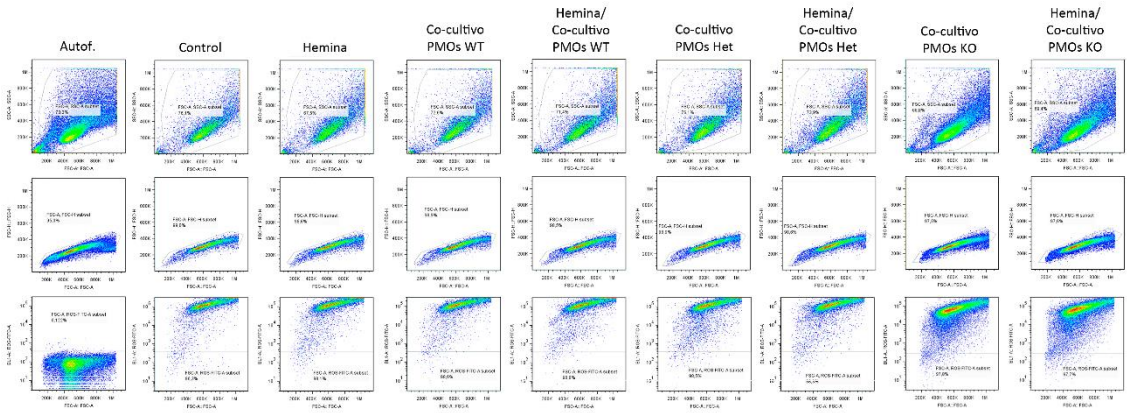


Figura 32- Niveles de ROS en células PC3 pre-tratadas o no con hemina (50µM; 24h) crecidas solas o en co-cultivo con PMOs WT, Het o KO, medidos por citometría de flujo en el canal de FITC, usando DCFDA como sonda.

3. Interacción entre las células tumorales prostáticas y los precursores óseos

3.1 Expresión de genes involucrados en la tumorigénesis y/o en la regulación de la remodelación ósea

Con el fin de ampliar el estudio de la interacción entre las células tumorales prostáticas y las células del microambiente óseo decidimos repetir el experimento de co-cultivo de células PC3 pre-tratadas o no con hemina, pero usando en esta ocasión células murinas de la línea MC3T3 (pre-osteoblásticas) o Raw264.7 (pre-osteoclásticas) en lugar de los PMOs.

En primera instancia se analizaron los niveles de expresión de *HMOX1* en las células PC3. El co-cultivo tanto con las células MC3T3 como con las células Raw264.7 no alteró los niveles del ARNm de HO-1 en las células PC3, ya sea que estas estuvieran o no pre-tratadas con hemina (Figura 33 A y B). Este resultado fue similar al obtenido cuando las células tumorales fueron crecidas en presencia de PMOs *Hmox1*$^{+/+}$ (Figura 31 A).

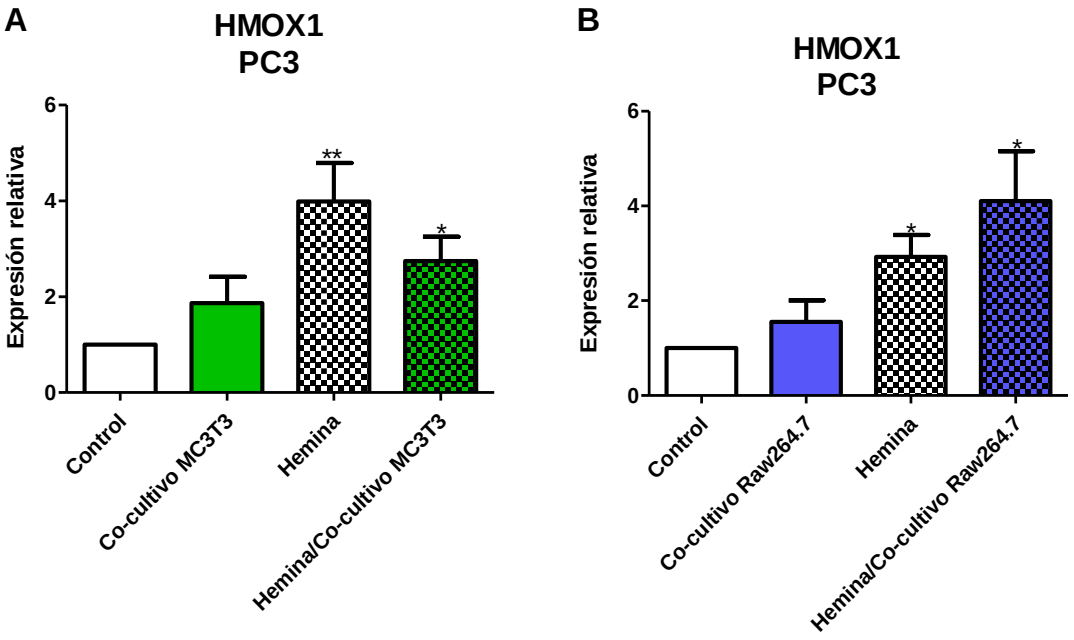


Figura 33- Niveles de expresión de *HMOX1* evaluados mediante RT-qPCR en células PC3 pre-tratadas o no con hemina (50µM; 24h), crecidas solas o en co-cultivo (24h) con células MC3T3 (A) o Raw264.7 (B). Los valores fueron relativizados utilizando *PPIA* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

El paso siguiente fue evaluar en las células tumorales los niveles de expresión de diferentes genes involucrados en la tumorigénesis y/o en la regulación de la remodelación ósea. El análisis por RT-qPCR evidenció primeramente, un efecto del pre-tratamiento con hemina como modulador positivo de la expresión de *IL-6* e *IL-8* en las células tumorales. El co-cultivo con células Raw264.7 no alteró la expresión de estos genes (Figura 34 A y B). No obstante, el co-cultivo con MC3T3 revirtió la inducción del pre-tratamiento con hemina tanto para *IL-6* como para *IL-8* parcial o totalmente respectivamente (Figura 34 C y D).

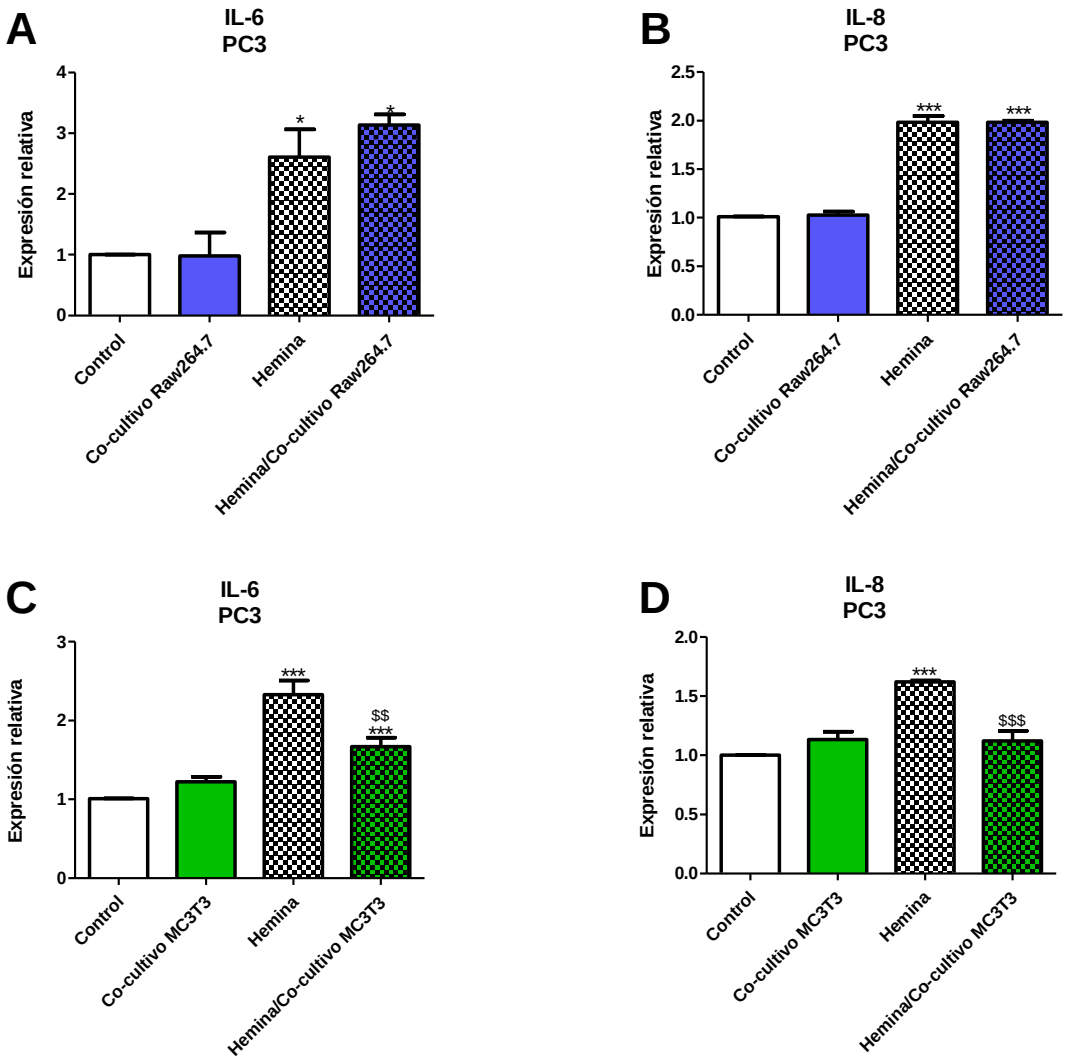


Figura 34- Niveles de expresión de *IL-6* (A y C) e *IL-8* (B y D) evaluados mediante RT-qPCR en células PC3 pre-tratadas o no con hemina (50µM; 24h), crecidas solas o en co-cultivo (24h) con células MC3T3 (A y B) o Raw264.7 (C Y D). Los valores fueron relativizados utilizando *PPIA* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. Significancia estadística respecto del control: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; y respecto de hemina: $ p<0,05; $$ p<0,01; $$$ p<0,001.

Por otro lado, genes como PTHrP y OPG sufrieron un incremento en su expresión como consecuencia del co-cultivo tanto con células MC3T3 como con células Raw264.7. Si bien estos genes no mostraron cambios en su expresión debido al pre-tratamiento con hemina, éste previno el aumento generado por el co-cultivo (Figura 35).

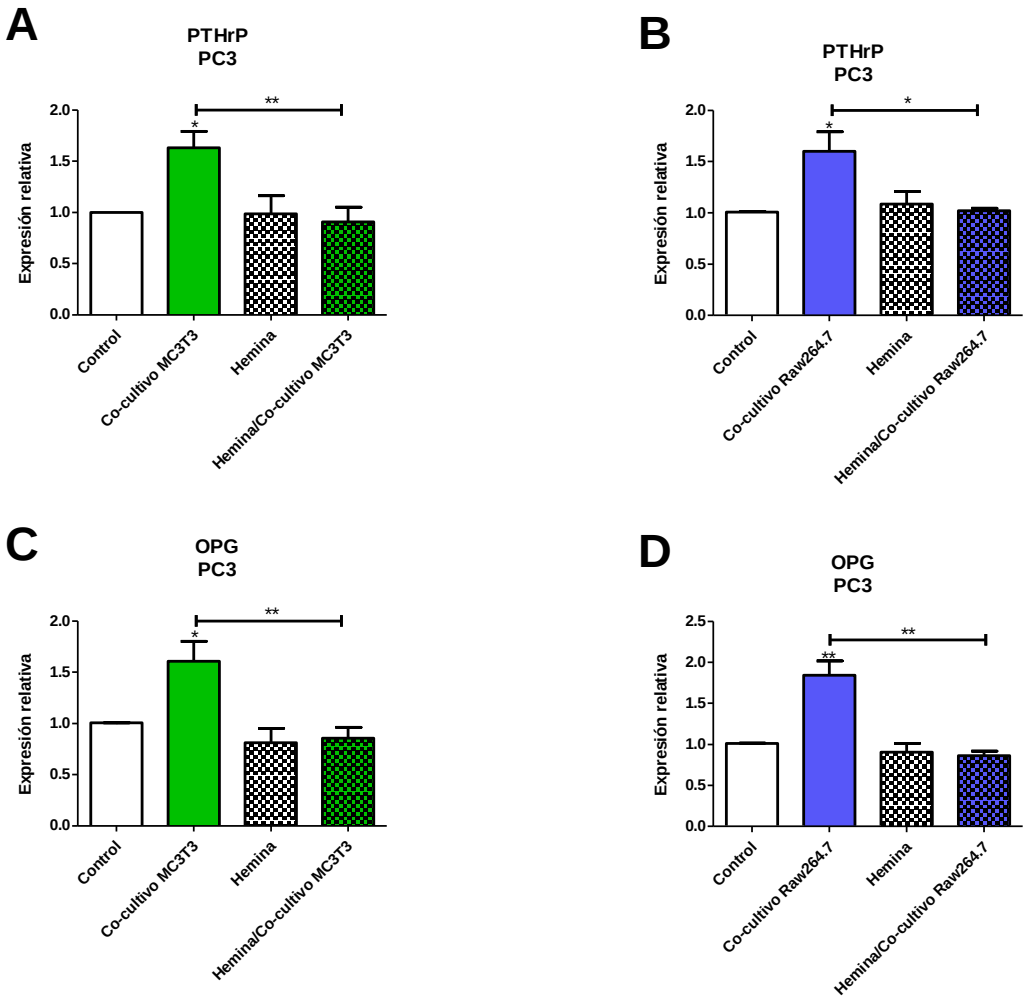


Figura 35- Niveles de expresión de PTHrP (A y B) y OPG (C y D) evaluados mediante RT-qPCR en células PC3 pre-tratadas o no con hemina (50µM; 24h), crecidas solas o en Co-cultivo (24h) con células MC3T3 (A y C) o Raw 264.7 (B Y D). Los valores fueron relativizados utilizando PPIA como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Tal y como se demostró para el co-cultivo con PMOs WT, el co-cultivo con los progenitores óseos incrementó la expresión de PTHrP y OPG en PC3, efecto que fue atenuado por el pre-tratamiento con hemina. Por otro lado, cabe resaltar que cuando las células tumorales fueron pre-tratadas con el inductor farmacológico de HO-1 y cultivadas solas se detectó una inducción significativa de la expresión de *IL-6* e *IL-8*. Si bien peviamente reportamos que la sobrexpresión de HO-1 reprimía los niveles de ARNm de estas interleuquinas, las condiciones experimentales de ese estudio donde se utilizó inducción génica de *HMOX1*, fueron sustancialmente diferentes[141].

A continuación se analizó la expresión de *Hmox1* y de genes que participan del metabolismo óseo en las células MC3T3 y Raw264.7 co-cultivadas con células PC3 pre-tratadas o no con hemina. De manera interesante, se vio un efecto antagónico en los niveles de ARNm de HO-1 dependiendo del tipo de progenitor óseo. Por un lado, el co-cultivo con células PC3 pre-tratadas o no con hemina causó una disminución en los niveles de *Hmox1* en las células MC3T3 (Figura 36 A). Las células Raw264.7 mostraron un aumento significativo en la expresión de *Hmox1*, solo cuando fueron co-cultivadas con las células tumorales que habían sido pre-tratadas con hemina (Figura 36 B).

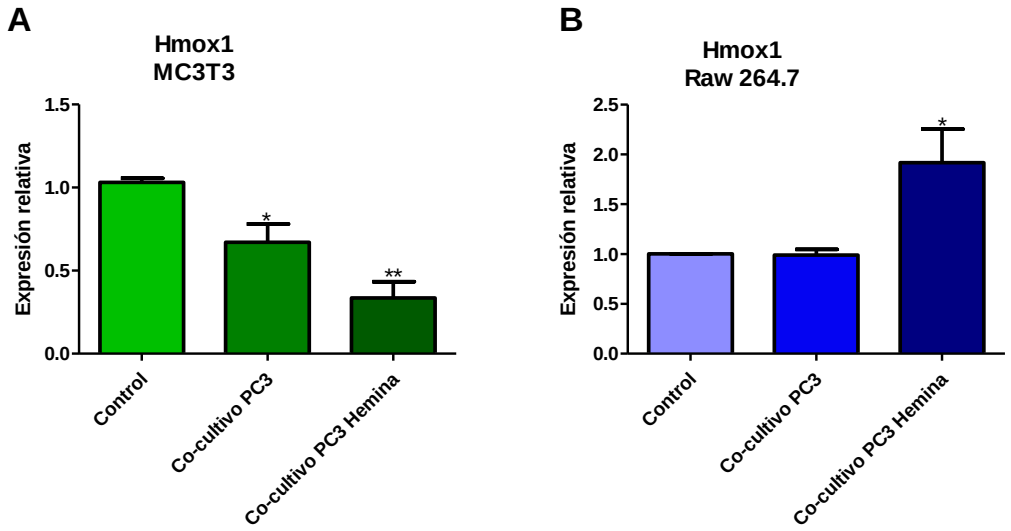


Figura 36- Niveles de expresión de *Hmox1* evaluados mediante RT-qPCR en células MC3T3 (A) o Raw264.7 (B) crecidas solas o en Co-cultivo (24h) con células PC3 pre-tratadas o no con hemina (50µM; 24h). Los valores fueron relativizados utilizando *36b4* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Estos resultados evidencian que el co-cultivo con células tumorales tiene un efecto modulatorio sobre la expresión de *Hmox1* en los progenitores óseos, y el perfil de esta modulación es diferente dependiendo del tipo de progenitor.

Del mismo modo se evaluaron diferentes genes involucrados en la remodelación ósea sobre las células de hueso crecidas o no en co-cultivo: *Runx2* y *Col1a1*, marcadores de diferenciación de osteoblastos; *Opg* y *Rank*, factores implicados en la regulación de la activación de osteoclastos (Figura 37). En las células MC3T3 se observó un aumento significativo en la expresión de *Runx2* por efecto del co-cultivo con células PC3 pre-tratadas con hemina (Figura 37 A), mientras que la expresión de *Col1a1* aumentó en ambas condiciones

experimentales (Figura 37 B). Por último, *Opg* en células MC3T3 y *Rank* en células Raw264.7 (ambos receptores de RANKL) sufrieron una disminución en su expresión cuando los precursores óseos fueron co-cultivados con las células tumorales pre-tratadas con hemina (Figura 37 C y D).

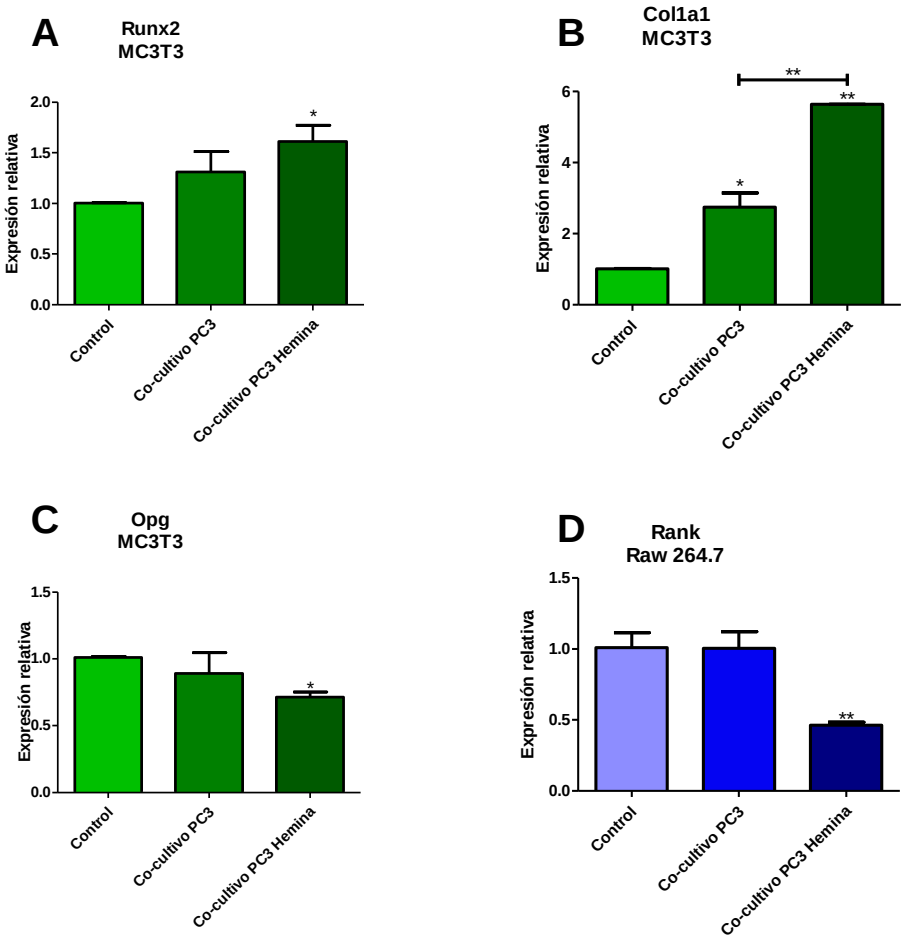


Figura 37- Niveles de expresión de A) *Runx2*; B) *Col1a1*; C) *Opg* y D) *Rank*, evaluados mediante RT-qPCR en células MC3T3 (A; B; C) o Raw264.7 (D) crecidas solas o en co-cultivo (24h) con células PC3 pre-tratadas o no con hemina (50µM; 24h). Los valores fueron relativizados utilizando *36b4* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Estos datos refuerzan nuestra hipótesis que sostiene que la interacción mediante factores solubles entre las células de CaP y los precursores óseos puede modular la expresión de genes involucrados tanto en la progresión tumoral como en la fisiología del hueso. En particular se vio que el co-cultivo con células tumorales es capaz de regular de manera diferencial la expresión de *Hmox1* en los distintos tipos de células de hueso, lo cual resulta interesante teniendo en cuenta el rol dual de HO-1 en la fisiología ósea.

3.2 Interactores de HO-1 implicados en la colonización del nicho óseo.

3.2.1 Rol del eje ANXA2/ANXA2R en la tumorigénesis prostática.

Previamente en nuestro laboratorio, mediante un abordaje proteómico, generamos el "interactoma de HO-1" en células de CaP[173]. Entre las 56 proteínas encontradas se hallaba Anexina A2 (ANXA2), la cual está fuertemente implicada en la fisiología del hueso, como así también en la progresión ósea del CaP[32,202].

Shiozawa y colaboradores demostraron en modelos de metástasis ósea, que el CaP humano se dirige a nichos de las HSCs y compite directamente con éstas[124]. La expresión de las moléculas de adhesión ANXA2 y CXCL12 en células del nicho de las HSCs intra-óseo permite la unión de las HSCs y las células de CaP a través de CXCR4 y el receptor de ANXA2 (ANXA2-R), facilitando el asentamiento de las células tumorales en la médula ósea[124,203].

ANXA2 es producida por varios tipos celulares en la médula ósea[204]. Esta proteína existe como monómero o hetero-tetrámero compuesto por dos moléculas ANXA2 (p36) y dos moléculas S100A10 (p11)[203,205]. ANXA2 es secretada por los osteoclastos, actuando como factor autócrino/parácrino que estimula la resorción ósea[203,206]. A través de la subunidad p11 se une a su receptor en las células estromales de médula e induce la producción de RANKL y CSF-1, los cuales favorecen la activación de osteoclastos y la mineralización de osteoblastos[124].

El eje ANXA2/ANXA2-R cumple un papel importante en el establecimiento de las metástasis óseas de CaP, actuando como un quimioatractante y regulando la migración y adhesión de las células tumorales[124,203]. Por lo tanto, ANXA2 está implicado tanto en la fisiología ósea, como en el asentamiento y crecimiento de las células tumorales en el tejido óseo.

Teniendo en cuenta la relevancia de ANXA2 y la de su receptor en relación al crecimiento de los tumores prostáticos en el hueso, nos propusimos analizar su expresión en el sistema de co-cultivos descripto anteriormente, donde las células de CaP pre-tratadas o no con el inductor farmacológico de HO-1 (hemina, 50μM; 24h) crecen con las células pre-osteoclásticas Raw264.7 compartiendo el medio pero sin estar en contacto físico.

Mediante la técnica de RT-qPCR encontramos que los niveles de expresión génica de *ANXA2* como así también de su receptor, estaban aumentados en células PC3 luego del co-cultivo con los precursores de osteoclastos (Figura 38 A y B).

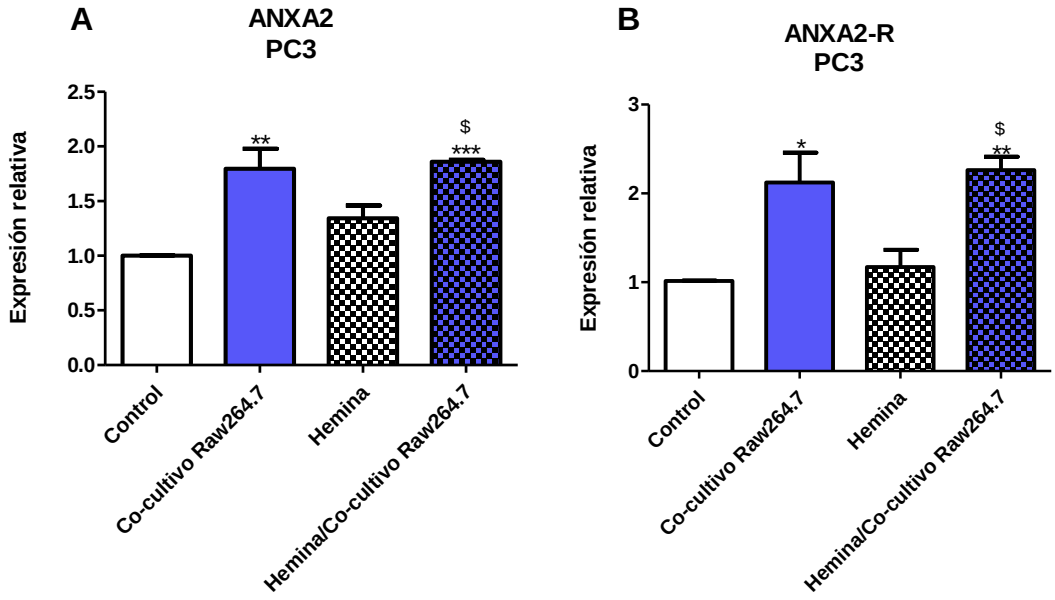


Figura 38- Niveles de expresión evaluados mediante RT-qPCR, de A) *ANXA2* y B) *ANXA2-R* en células PC3 pre-tratadas o no con hemina (50µM; 24h), crecidas solas o en co-cultivo (24h) con células Raw264.7. Los valores fueron relativizados utilizando *PPIA* como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. Signnificancia estadística respecto del control: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; y respecto de hemina: $ p<0,05.

Del mismo modo analizamos los niveles relativos de expresión de *Anxa2* en células Raw264.7 luego del co-cultivo. En este caso el co-cultivo, tanto con células PC3 como con PC3 pre-tratadas con hemina, provocó una disminución en la expresión de *Anxa2* en las células progenitoras óseas, el cual fue evidente tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico (Figura 39 A y B).

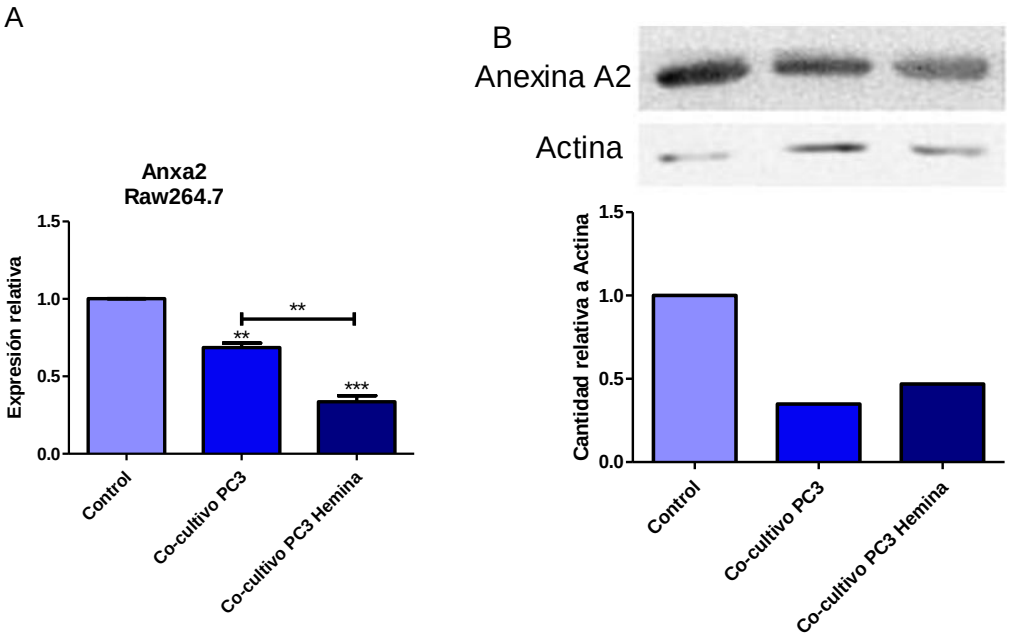


Figura 39- Niveles de Anxa2 en células Raw264.7 crecidas solas o en co-cultivo (24h) con células PC3 o PC3 pre-tratadas con hemina (50µM; 24h), evaluados mediante A) RT-qPCR. Los valores fueron relativizados utilizando 36B4 como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. Diferencias significativas: ***p*<0,01; ****p*<0,001. B) Western Blot, usando Actina como control de carga y relativizando los valores respecto de la condición control (se muestra un ejemplo representativo).

Por último, decidimos evaluar la disposición subcelular de ANXA2 en los precursores de osteoclastos. Para ello realizamos una inmunofluorescencia (IF) usando anticuerpos específicos contra ANXA2. Encontramos que en condición control ANXA2 se localiza principalmente en la membrana de las células pre-osteoclásticas, mientras que al ser éstas co-cultivadas con células PC3 la marcación pasa a ser intracelular. Por otro lado, el pre-tratamiento de la célula tumoral con hemina previene parcialmente el efecto del co-cultivo sobre la translocación de ANXA2 en las células Raw264.7 (Figura 40 A y B).

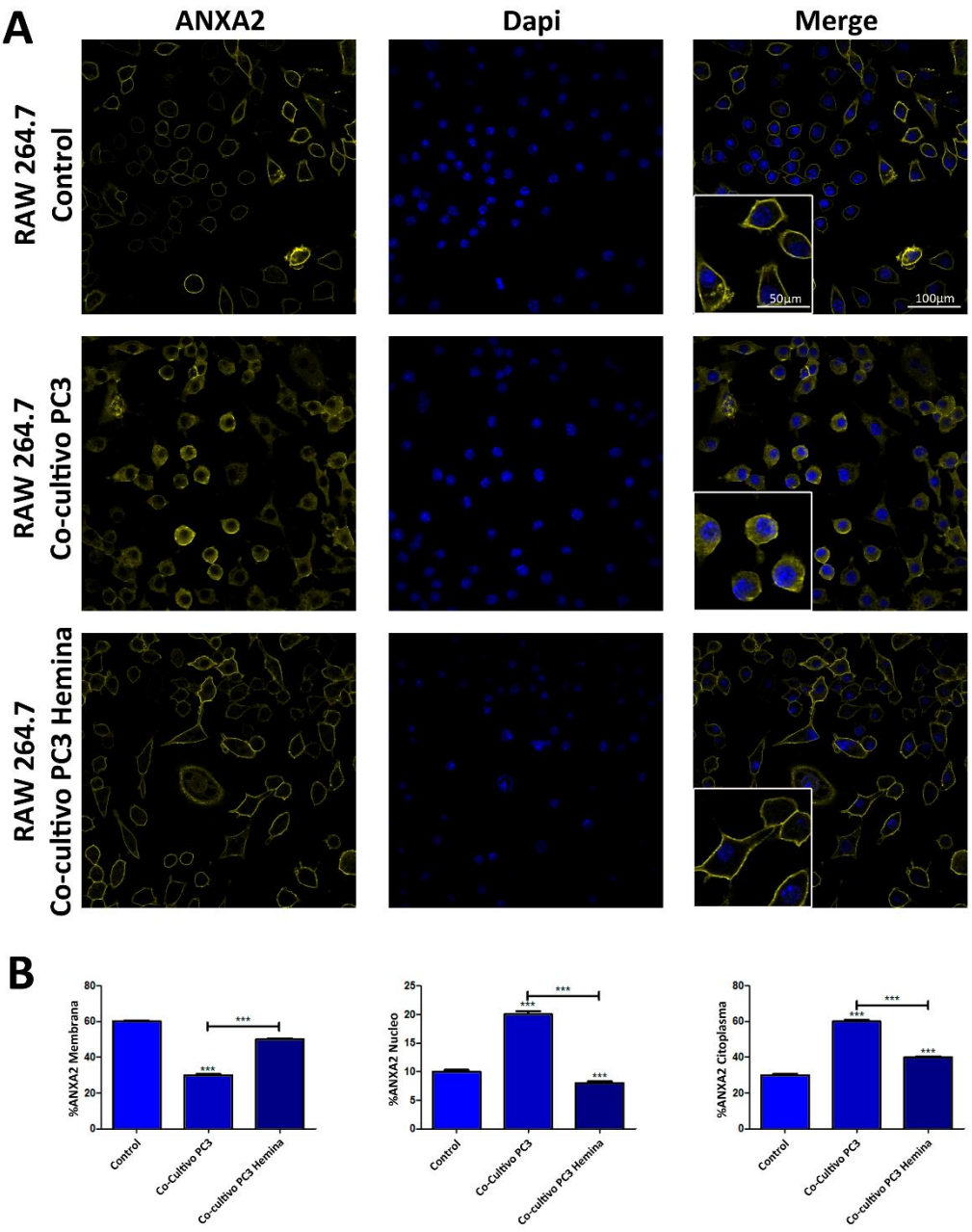


Figura 40- A) Células Raw264.7 provenientes del experimento de co-cultivo fueron fijadas e incubadas con un anticuerpo primario anti-Anexina A2 (ANXA2) y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647. B) Usando el software ImageJ se midió la intensidad de fluorescencia tanto en el total de cada célula, como en núcleo (DAPI) y compartimento intra-celular. Los valores fueron normalizados respecto del tamaño celular. Posteriormente se calculó el porcentaje de marca en membrana, citoplasma y núcleo (n≥180 células para cada condición). Diferencias significativas: ***p<0,001.

Si bien los mecanismos por los cuales actúa ANXA2 están poco descriptos, como se ha mencioando anteriormente, que es capaz de localizarse en la membrana formando un heterotetrámero con la proteína S100A10 y que este proceso es dependiente de la disponibilidad de Ca^{2+} [203,205]. Por esta razón se decidió evaluar la concentración de este ion en los medios condicionados

(MC) en las distintas condiciones de co-cultivo. La concentración de Ca^{2+} disminuyó leve pero significativamente en los MC de las células PC3 crecidas solas al compararlas con el medio control (DMEM®), y este efecto no fue apreciable bajo el pre-tratamiento con hemina. No se detectó ninguna alteración en los MC de las Raw264.7 respecto del medio control (DMEM®). En el MC proveniente del co-cultivo se observó una reducción en la concentración de Ca^{2+}, indicando que el efecto sobre la reducción en los niveles de este ion fue provocado por la presencia de las células tumorales (Figura 41). Esta alteración fue parcialmente prevenida por el pre-tratamiento con hemina (Figura 41). Teniendo en cuenta lo reportado por Benaud y colaboradores[207], la disminución en la concentración de Ca^{2+} como consecuencia del co-cultivo con las células tumorales es consistente con la internalización de la marca para ANXA2 en los precursores osteoclásticos; pudiendo ser, al menos en parte, la causa de la relocalización de ANXA2. Mientras que en el co-cultivo con células tumorales pre-tratadas con hemina tanto la concentración de Ca^{2+} en los medios condicionados, como la distribución de la marca de ANXA2 en la membrana de las células Raw264.7 no se vieron alterada respecto de la condición en que los precursores osteoclásticos crecieron solos.

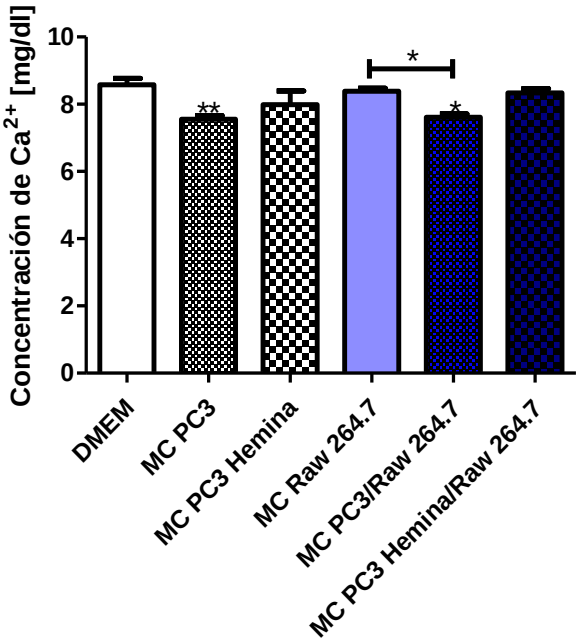
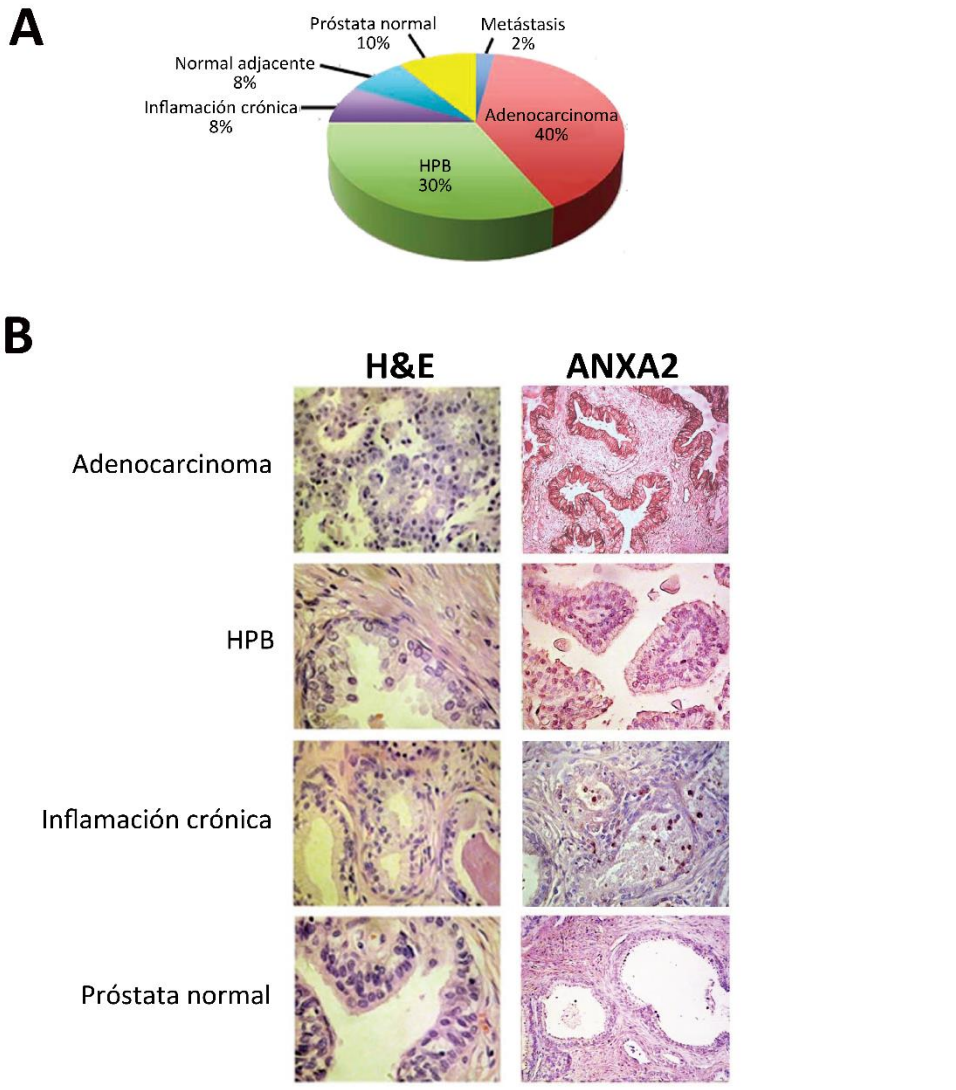


Figura 41-Niveles de concentración de Ca^{2+} en los medios condicionados de las distintas condiciones de co-cultivo entre células PC3 y células Raw264.7. Las significancias estadísticas corresponden a la comparación con el medio DMEM (sin condicionar), a menos que se señalen otras comparaciones con una línea. Diferencias significativas: *p<0,05; **p<0,01.

Previamente hemos mostrado que la inducción farmacológica de HO-1 en las células tumorales puede modificar el microambiente óseo y subsecuentemente tener algún efecto sobre la metástasis del CaP[127]. En este contexto, los cambios en la expresión y/o localización de ANXA2 en células tumorales y precursores osteoclásticos podrían tener consecuencias tanto en el direccionamiento, pegado y colonización del nicho óseo por parte de las células tumorales, como así también sobre la diferenciación/activación de osteoclastos y sobre el balance entre células progenitoras formadoras y degradadoras del hueso.

Como se mencionó ANXA2 es una molécula que participa de la adhesión, proliferación, invasión, metástasis y neo-vascularización, desempeñando un papel crucial en al crecimiento y progresión tumoral. Ha sido reportado que su expresión está alterada en una gran variedad de tumores incluido el CaP, donde la pérdida o disminución en la expresión de ANXA2 parece ser característico de la enfermedad[124,205].

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos analizar ANXA2 en muestras de pacientes usando anticuerpos específicos en un microarreglo de tejidos (TMA) de origen comercial (US Biomax inc.), donde están representadas diferentes patologías prostáticas (Figura 42 A y B). Mediante éste análisis observamos un menor número de muestras de CaP con inmunomarcación positiva para ANXA2 comparado con la glándula normal (Figura 42 C). Por otro lado, las muestras de inflamación crónica mostraron un 100% de marca positiva para ANXA2 (Figura 42 C).



	Adenocarcinoma	HPB	Inflamación crónica	Proóstata normal
% de muestras ANXA2+	71,875	69,231	100	85,714

Figura 42: -A) Microarreglo de tejido (TMA) (marca) conteniendo muestras de diferentes patologías prostáticas: 32 casos de adenocarcinoma, 2 de metástasis, 26 de hiperplasia prostática benigna (HPB), 6 de inflamación crónica, 6 de tejido adyacente al tumor y 8 de tejido normal. Para cada caso se usó un único "core". El gráfico de torta muestra la proporción correspondiente a cada tipo de muestra en el TMA. B) Imágenes representativas de cada tipo de muestra para la tinción H&E y la inmunomarcación de ANXA2. C) Representación gráfica del porcentaje de inmunomarcación positiva para ANXA2 en los diferentes tipos de muestra.

Con el fin de validar estos resultados y profundizar el análisis, se realizó un análisis bioinformático de la expresión ANXA2 en pacientes de CaP tanto a nivel de ARNm como de proteínas.

En primer lugar, se utilizó la base de datos de *microarrays* de pacientes "Oncomine 4.3 research edición"[188]. Evaluamos la expresión de *ANXA2* en adenocarcinoma prostático comparado con glándula normal, en 16 set de datos que cumplían con nuestro criterio de selección detallados en la sección materiales y métodos, permitiéndonos analizar un total de 973 muestras de pacientes. Encontramos una disminución significativa (p<0.05) en la expresión génica de *ANXA2* en el adenocarcinoma prostático respecto de la glándula normal (Figura 43 A).

En paralelo estudiamos la expresión de *ANXA2* en muestras de pacientes provenientes del proyecto de adenocarcinoma prostático de "The cancer genome atlas" (TCGA-PRAD[189]). Este trabajo cuenta con información de RNAseq del tumor y del tejido normal adyacente de 500 pacientes. Se encontró una disminución significativa (p<0.001) de la expresión de *ANXA2* en el tumorcomparado con el tejido normal adjacente (Figura 43 B).

Posteriormente se utilizó la plataforma "The Human Protein Atlas"[195] para estudiar la expresión proteica de ANXA2 mediante análisis inmunohistoquímicos de muestras provenientes de tumores prostáticos. Se observó la consecuente reducción de los niveles de la proteína en las muestras de adenocarcinoma prostático en comparación con la glándula normal (Figura 43 C). Trabajos previos documentaron resultados similares provenientes de estudios *in vitro*[208] o de un set reducido de muestras de pacientes[124,209].

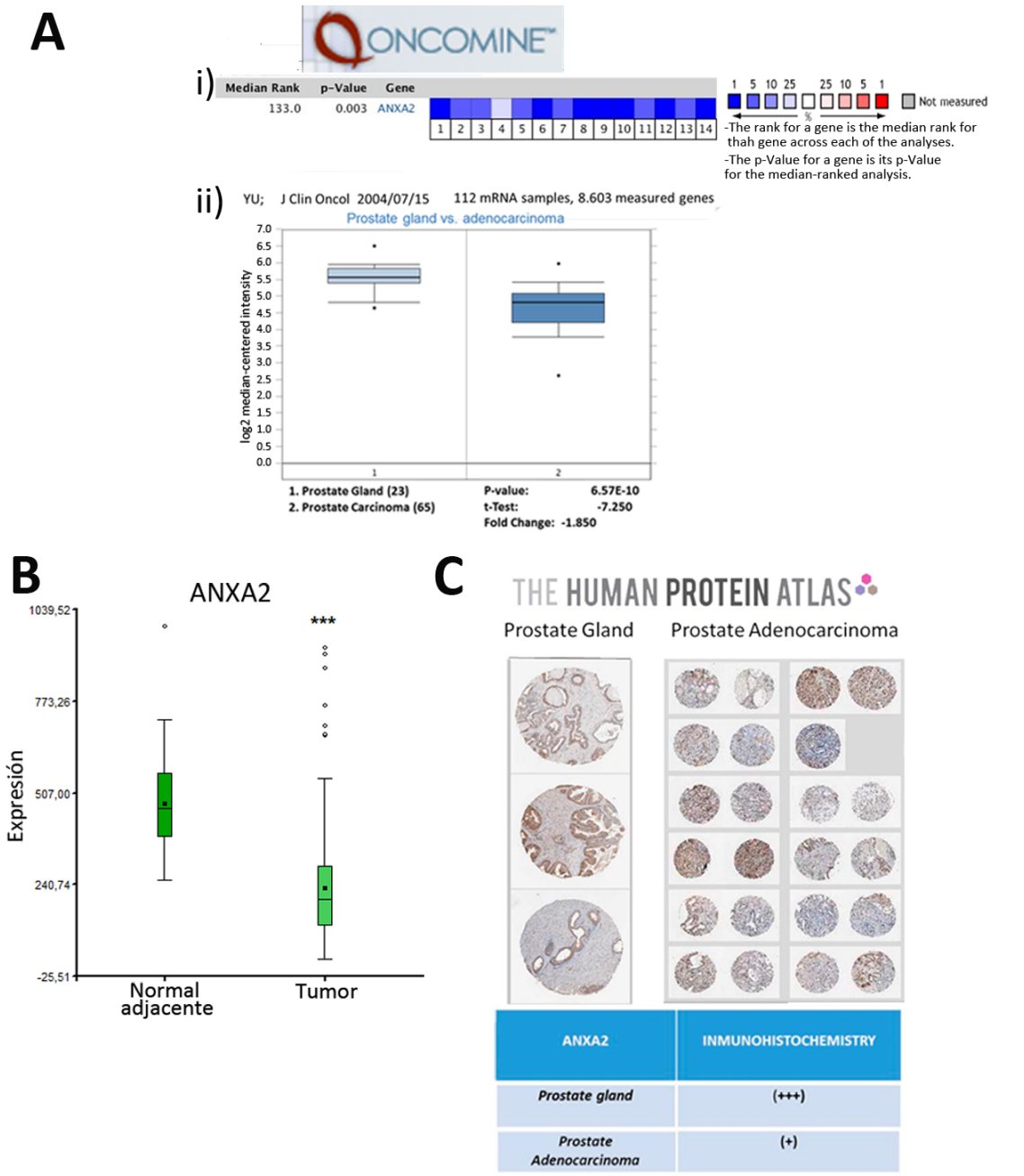


Figura 43-A) Análisis bioinformático utilizando “Oncomine”. Se realizó un análisis de expresión génica con la plataforma “Oncomine” donde se observa el grado de sub-expresión de *ANXA2* para adenocarcinoma de próstata respecto de la glándula normal. I) El meta-análisis de múltiples sets de datos de microarrays de expresión en CaP, muestra que *ANXA2* aparece sub-expresado significativamente en 14 de los 16 datasets ii) Esquema que resume el perfil de expresión de *ANXA2*; el boxplot corresponde a un trabajo representativo. B) Niveles de expresión de *ANXA2* en tumor y tejido adyacente utilizando el dataset de TCGA-PRAD, con información de RNAseq de 500 pacientes con CaP. Diferencias significativas: ***p<0,001. C) Análisis de la expresión de ANXA2 a nivel protéico utilizando la plataforma “The Human Protein Atlas”: i) Tinción para ANXA2 en muestras de tejido de próstata normal y de adenocarcinoma de próstata mediante la técnica de inmunohistoquímica. ii) Tabla que resume los perfiles intensidad de marca para ANXA2 en próstata normal vs. adenocarcinoma prostático.

Adicionalmente, para estudiar la relación entre los cambios en la expresión génica y el fenotipo de la enfermedad prostática, se utilizó la plataforma “Gene Expression Omnibus” (GEO[191]).

Al analizar el set de datos de Ross Adams (GSE70769[193]), que cuenta con la información de expresión génica en 93 pacientes sometidos a prostatectomía radical, y su correlato clínico, vimos que la sobrevida libre de recaída era menor en aquellos pacientes con tumores que expresaban bajos niveles de *ANXA2* (HR: 0,4; *p*=0,00097) (Figura 44 A). Esta correlación se mantuvo incluso frente al análisis multivariado de la expresión de *ANXA2* junto con el grado de Gleason (factor pronóstico más importante para la enfermedad) y los niveles de PSA (marcador sérico de la enfermedad) (HR: 0,45;*p*=0,006), indicando que la correlación entre los bajos niveles de expresión de *ANXA2* y una menor sobrevida libre de recaída es independiente de las otras variables analizadas.

Posteriormente, se utilizó el set de datos de Sboner (GSE 16550[192]) que cuenta con información de expresión génica de 281 pacientes de CaP *naive* de tratamiento y la información clínica para cada paciente (hasta 30 años de seguimiento), para estudiar la sobrevida general de los pacientes. Los diferentes niveles de expresión de *ANXA2* parecen no alterar la sobrevida general cuando se analizó toda la cohorte de pacientes (HR: 1,23; *p*=0,19) (Figura 44 B). Sin embargo, cuando el análisis se realizó distinguiendo los pacientes entre bajo y alto Gleason encontramos, que si bien en pacientes con tumores de Gleason bajo no había diferencias en la sobrevida en relación a la expresión de *ANXA2* (HR: 1,75; *p*=0,26), pacientes con tumores con Gleason alto mostraron una menor sobrevida cuando presentaban bajos niveles de *ANXA2* (HR: 0,47; *p*=0,023) (Figura 44 B). Este resultado se mantuvo (HR: 0,48; *p*=0,031) incluso al realizar un análisis multivariado en el que se incluyeron la expresión de *ANXA2*, la edad (principal factor de riesgo) y el grado de Gleason de los pacientes al momento del diagnóstico.

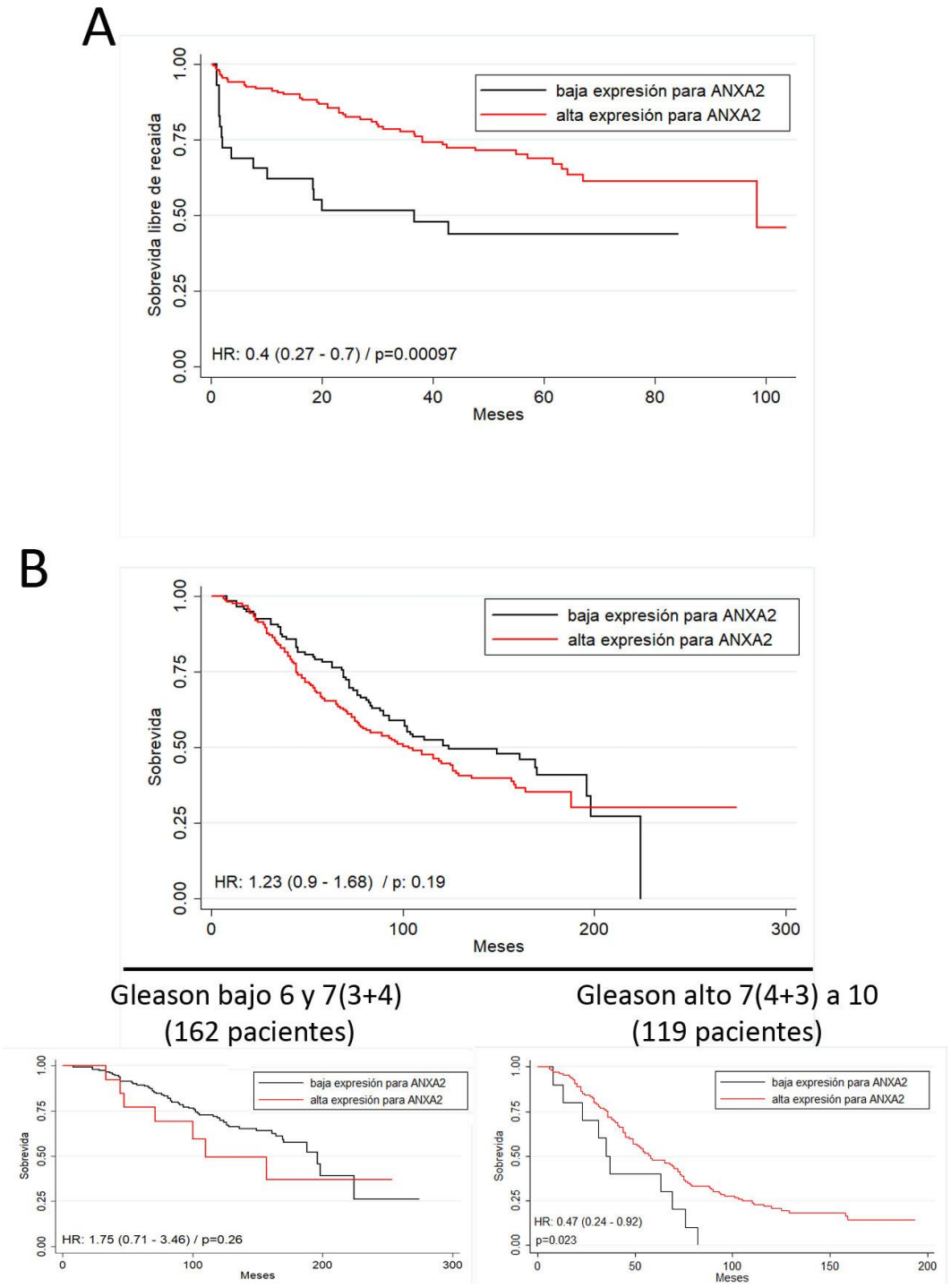


Figura 44- A) Sobrevida libre de recaída (meses), en pacientes con alta (rojo) o baja (negro) expresión para *ANXA2*, en el *dataset* de Ross-Adams (n=93) HR= *Hazard ratio* (intervalo de confianza 95%). Se toma al grupo de baja expresión como grupo de referencia. Los resultados muestran que los pacientes con baja expresión de *ANXA* tienen una menor sobrevida libre de recaída (significativo). B) Sobrevida general, por meses, en pacientes con alta (rojo) o baja (negro) expresión para *ANXA2*, en el *dataset* de Sboner (n=281) HR= *Hazard ratio* (intervalo de confianza 95%). Se toma al grupo de baja expresión como grupo de referencia. Panel superior: El análisis de sobrevida general en toda la cohorte, muestra que no hay diferencias significativas en la sobrevida de los pacientes, entre los grupos de alta y baja expresión de *ANXA2*. Panel inferior: Al analizar la sobrevida en los pacientes con alto grado de Gleason (entre 7(4+3) y 10) se observa que la baja expresión de *ANXA2* tiene una correlación significativa con una baja sobrevida.

Dada la implicancia reportada para esta proteína en el proceso metastásico, decidimos comparar sus niveles de expresión entre muestras de CaP primario y metástasis (Figura 45). Para ello utilizamos un set de datos que cuenta con información de microarreglos de expresión para 171 muestras de tumor primario o metástasis provenientes de 63 pacientes con CaP[190]. Este análisis evidenció que la expresión de *ANXA2* era significativamente mayor en las muestras de metástasis comparadas con las de tumor primario (Figura 45 A), y este aumento fue aún más evidente cuando se consideraron solo aquellas muestras correspondientes a metástasis a hueso (Figura 45 B). Otros autores han propuesto que la disminución de *ANXA2* en el tumor primario podría favorecer no solo el desprendimiento de células del tumor primario, sino también la migración hacia nichos metastásicos ricos en *ANXA2*[124]. Este resultado se condice con el aumento de *ANXA2* observado en células PC3 cuando fueron crecidas en presencia de células óseas, reforzando el modelo de co-cultivo como modelo de metástasis *in vitro*, y demostrando que el nicho óseo modula la expresión de *ANXA2* en la célula tumoral prostática, lo cual podría favorecer la progresión del tumor en el nicho metastásico.

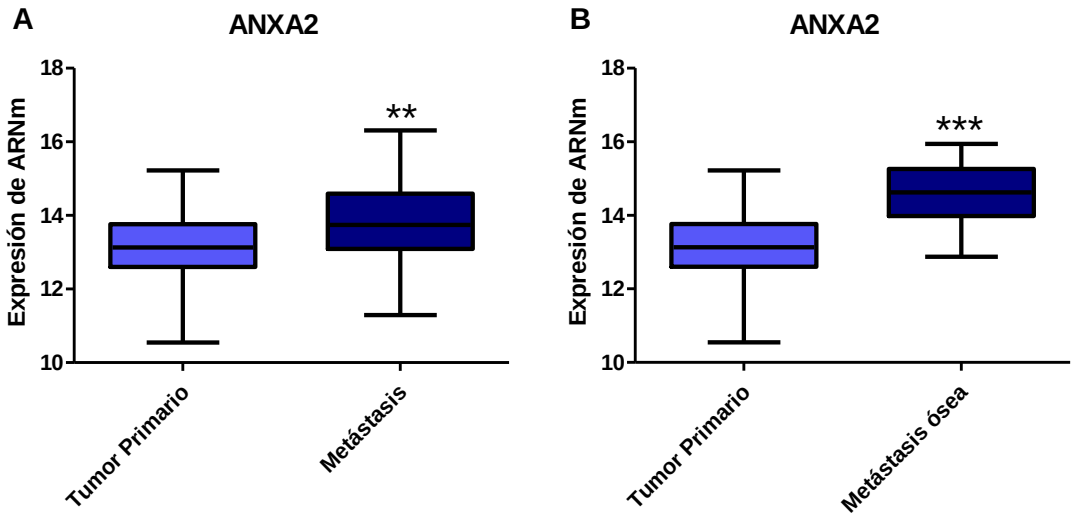


Figura 45- Niveles de expresión de *ANXA2* en A) tumor primario y metástasis en cualquier sitio, y B) tumor primario y metástasis ósea; utilizando el dataset de Kumar y col.[190], con información de microarreglos de expresión de 149 muestras de metástasis (20 metástasis óseas) y 22 de tumor primario provenientes de 63 pacientes con CaP. Diferencias significativas: ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

3.3. Análisis proteómico: identificación de factores solubles involucrados en la interacción entre las células de CaP y los progenitores óseos.

Con el fin de tener una mejor comprensión del modelo de estudio, y tratar de hallar factores novedosos implicados en la interacción entre las células de CaP y las células óseas, llevamos adelante un estudio proteómico in vitro en los MC (secretoma) tanto de células PC3 o células Raw264.7 creciendo solas, como proveniente del co-cultivo de las mismas. Para ello los MC se concentraron por centrifugación en columnas (cut off >10 kDa), y fueron analizados por espectrometría de masa (Figura 46 A). Los péptidos detectados en cada muestra fueron cotejados contra bases de datos de proteínas humanas o murinas, y las listas obtenidas (Anexo I) se contrastaron entre sí para identificar las proteínas diferenciales (Figura 46 B, C y D).

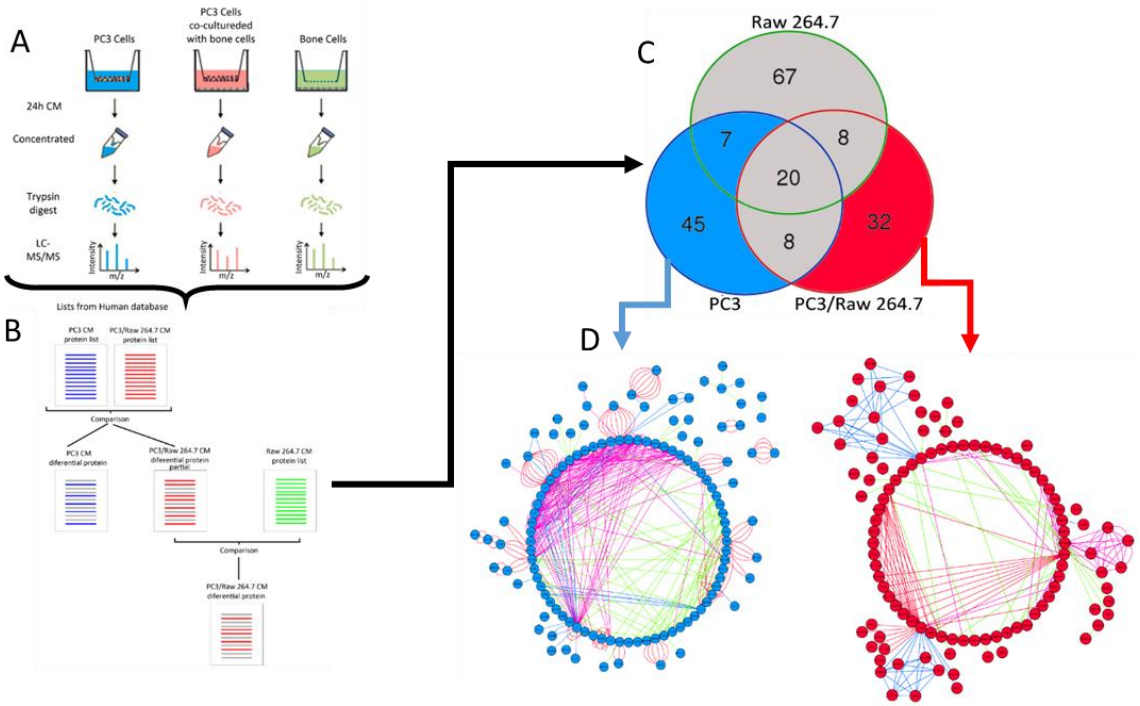
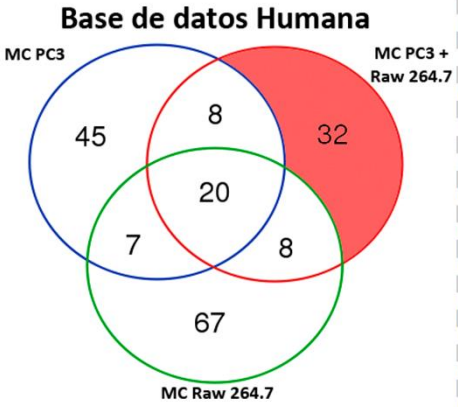


Figura 46- Esquema representativo de los pasos empleados en el análisis proteómico. A) obtención y procesamiento de los medios condicionados (MC) para su análisis por espectrometría de masa. B) Ejemplo del criterio de comparación empleado para las listas de proteínas encontradas por espectrometría de masa para cada condición experimental. C) Ejemplo del criterio de exclusión/inclusión para conformar las listas de proteínas diferenciales representado como diagrama de Venn, donde las áreas coloreadas con azul o rojo corresponden a las proteínas diferenciales de los MC de PC3 o del co-cultivo PC3-Raw264.7 respectivamente y las áreas en gris corresponden a proteínas compartidas, excluidas de las listas diferenciales. D) Representación de proteínas diferenciales junto con las diferentes interacciones entre ellas, generado con el software Cytoscape.

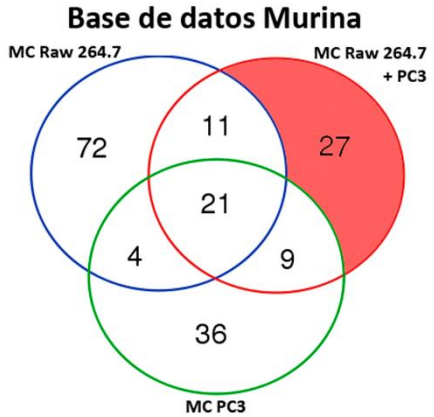
El objetivo de generar listas de proteínas que están presentes de manera exclusiva en una u otra condición fue debido a nuestra intención de tratar de encontrar factores cuya expresión pueda estar siendo estimulada en la célula tumoral debido a la presencia de los precursores osteoclásticos o viceversa. De esta manera se hallaron 32 proteínas diferenciales humanas y 27 murinas en los MC del co-cultivo de células PC3 y células Raw264.7 (Figura 47).

A



Nombre de la proteína	Simbolo	Masa molecular teórica(Da)	Covertura %
Importin subunit alpha-3	KPNA4	57.9	5.56621881
Retinoic acid-induced protein 3	GPRC5A	40.2	10.6442577
Immunoglobulin heavy variable 3-53	IGHV3-53	12.8	40.51724138
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase U	PTPRU	162.3	2.14384509
Urokinase-type plasminogen activator	PLAU	48.5	3.016241299
Elongation factor 1-alpha 2	EEF1A2	50.4	2.375809935
Fibrinogen gamma chain	FGG	52.3	1.952277657
Alkylglycerol monooxygenase	AGMO	51.5	9.213483146
Coiled-coil domain-containing protein 191	CCDC191	110.5	4.38034188
Neuronal-specific septin-3	SEPT3	40.7	12.29050279
Ethanolamine-phosphate phospho-lyase	ETNPPL	55.6	8.817635271
Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	EML4	110.1	3.830645161
SCO-spondin	SSPO	547.5	0.796116505
Dystonin (Fragment)	DST	190.2	2.329749104
Thioredoxin domain-containing protein 11	TXNDC11	110.5	3.147208122
Obscurin	OBSCN	972.4	0.302588815
Syntabulin	SYBU	73	5.239520958
Protein KIAA0100	KIAA0100	253.5	1.744966443
Lamin tail domain-containing protein 2	LMNTD2	70.3	5.205047319
E3 ubiquitin-protein ligase RNF34	RNF34	4.7	77.77777778
Ankyrin repeat domain-containing protein 36B	ANKRD36B	153.5	2.36511456
Cullin-3	CUL3	88.9	5.078125
Coiled-coil domain-containing protein 65	CCDC65	57.3	2.066115702
Keratin, type I cytoskeletal 27	KRT27	49.8	8.932461874
Zinc finger protein 585A	ZNF585A	87.9	5.201560468
V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform	ATP6V1B1	56.8	6.237816764
DDB1- and CUL4-associated factor 5	DCAF5	103.9	4.564755839
Baculoviral IAP repeat-containing protein 1	NAIP	159.5	2.352102637
BMP/retinoic acid-inducible neural-specific protein 2	BRINP2	88.9	4.342273308
ATP-dependent RNA helicase DDX18	DDX18	75.4	5.820895522
Olfactory receptor 8D2	OR8D2	34.8	12.86173633
Metabotropic glutamate receptor 2	GRM2	95.5	4.243119266

B



Nombre de la proteína	Simbolo	Masa molecular teórica(Da)	Covertura %
CapZ-interacting protein	Rcsd1	44.1	10.4368932
Protein Ift140	Ift140	165.8	3.073770492
Keratin, type II cytoskeletal 5	Krt5	61.7	8.448275862
Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial	Coq4	30.1	5.263157895
Elongation factor 1-alpha 2	Eef1a2	50.4	2.375809935
Fibrinogen gamma chain	Fgg	50.3	2.031602709
Enolase-phosphatase E1	Enoph1	28.6	16.34241245
E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	Herc2	527.1	0.992555831
Transmembrane protein 184A	Tmem184a	46.8	9.411764706
GTP-binding nuclear protein Ran	1700009N14Rik	24.3	19.90740741
Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	Opa1	113.2	4.294478528
Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	Eml4	109.9	3.846153846
Thymic stromal cotransporter protein	Slc46a2	52	8.977035491
Protein Gm9923	Gm9923	67.4	6.209150327
Striatin-4 (Fragment)	Strn4	23.9	16.88888889
DEP domain-containing protein 5	Depdc5	180.3	2.011313639
Protein KIAA0100	Kiaa0100	254.3	1.745747538
Cullin-3	Cul3	88.9	5.078125
Transcription factor Dp-2	Tfdp2	42.9	11.39896373
Chloride channel protein	Clcn6	97.1	4.925544101
Contactin-associated protein 1	Cntnap1	156.2	2.454873646
Serine/threonine-protein kinase PINK1, mitochondrial	Pink1	63.1	6.896551724
Ribonuclease P protein subunit p40	Rpp40	41.5	9.917355372
ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit B1	Atp6v1b1	56.8	6.237816764
Espin	Espn	154.4	1.921708185
Cornifin-A	Sprr1a	15.8	25
GRIP1-associated protein 1	Gripap1	95.9	3.464755078

Figura 47- Proteínas diferenciales en medios condicionados del co-cultivo entre PC3 y Raw264.7. A) Diagrama de Venn y lista de proteínas diferenciales para la condición co-cultivo PC3-Raw 264.7 cuando los resultados de espectrometría de masa se compararon contra una base de datos de proteínas humanas. B) Diagrama de Venn y lista de proteínas diferenciales para la condición co-cultivo PC3-Raw264.7 cuando los resultados de espectrometría de masa se compararon contra una base de datos de proteínas murinas.

Debido a la alta homología entre las proteínas humanas y murinas, se observa que las dos bases de datos son muy similares, lo cual puede generar dificultades a la hora de discernir si la fuente de una proteína es humana o murina, en una muestra compleja como los MC del co-cultivo. Si bien esto fue considerado en el tratamiento de los datos analizando MC de células PC3 contra bases de datos murinas (Figura 47 B Circulo verde del diagrama de Venn) y MC de células Raw264.7 contra bases de datos humanas (Figura 47 A Circulo verde del diagrama de Venn), esto solo contempla aquellas proteínas liberadas cuando las células crecen solas. En los MC de co-cultivo, se observan poteínas como Culin-3, que aparece en las listas diferenciales al comparar contra las base de datos tanto humana como murina, ejemplificando la dificultad para discernir qué tipo de célula dio origen a esta proteína.

Entre esas 32 proteínas diferenciales humanas halladas en los MC del co-cultivo de células PC3 y células Raw264.7 se encontraba el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (PLAU). Está descripto que PLAU facilita la migración e invasión del CaP, y que su sobreexpresión está asociada a tumores más agresivos. Además, su expresión es mayor en metástasis óseas que en metástasis a hígado o médula[210].

Al estudiar el efecto de la expresión de *PLAU* en la sobrevida libre de recaída de los pacientes (Ross Adams, n=93) no se apreciaron diferencias significativas entre aquellos con tumores que mostraban alta o baja expresión de *PLAU* (HR: 0,66; *p*=0,1) (Figura 48 A). Sin embargo, encontramos que la sobrevida general (Sboner, n=281) fue significativamente menor en aquellos pacientes con tumores prostáticos que expresaban altos niveles de *PLAU* (HR: 1,81; *p*=0,00018) (Figura 48 B, panel superior). Por otro lado, se realizó un análisis multivariado en el que se incluyeron la expresión de *PLAU*, la edad y el grado de Gleason de los pacientes al momento del diagnóstico. Aun considerando todas estas variables, se mantiene una correlación significativa entre la alta expresión de *PLAU* en los tumores y una menor sobrevida general de los pacientes (HR: 1,46; *p*=0,021) (Figura 48 B panel inferior). Esto significa, que los cambios en la expresión de *PLAU* son independientes de la edad del paciente y del grado de Gleason, permitiendo pensar que el análisis clínico de los niveles de PLAU podría brindar información complementaria, a fin de mejorar

el diagnóstico y/o la estratificación de los pacientes.

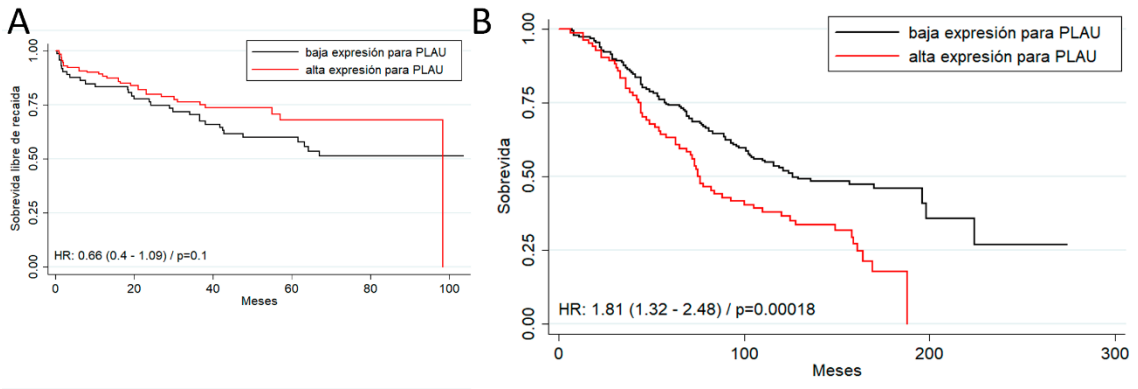


Figura 48- A) Sobrevida libre de recaída (meses), en pacientes con alta (rojo) o baja (negro) expresión para *PLAU*, en el *dataset* de Ross-Adams (n=93); HR= *Hazard ratio* (intervalo de confianza95%). Se toma al grupo de baja expresión como grupo de referencia. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre la expresión de *PLAU* y la sobrevida libre de recaída. B) I) Sobrevida general (meses), en pacientes con alta (rojo) o baja (negro) expresión de *PLAU*, en el *dataset* de Sboner (n=281); HR= *Hazard ratio* (intervalo de confianza95%). Se toma al grupo de baja expresión como grupo de referencia. El análisis de sobrevida general, muestra que la alta expresión de *PLAU* está asociado significativamente a una menor sobrevida. II) TABLA: Análisis del *Hazard ratio* asociado a la expresión de *PLAU*. Univariado: HR y su intervalo de confianza, en base a la expresión de *PLAU* (se toma al grupo de baja expresión como referencia). Multivariado: HR y su intervalo de confianza, en base a la expresión de *PLAU*, ajustado por edad (grupos de edad: 50-70; 70-80; 90-100) y Gleason score (6; 7(3+4); 7(7+4); 8-10) (se toma al grupo de baja expresión como referencia).

Teniendo en cuenta que PLAU cumple su función en el espacio extracelular, los efectos beneficiosos para la progresión tumoral podrían ser consecuencia de la acción tanto del PLAU proveniente de las células tumorales como del producido por otras células del microambiente. En relación con esto, el análisis de la expresión génica por RT-qPCR reveló que los niveles de ARNm de *PLAU* no se vieron modificados en células PC3 cuando crecieron en co-cultivo con los precursores osteoclásticos (Figura 49 A), mientras que fue evidente un aumento de la expresión de *Plau* en células Raw264.7, cuando éstas crecieron en presencia de las células tumorales (Figura 49 B). En base a este resultado consideramos prudente no descartar la posibilidad de que haya un aporte de PLAU por parte de las células óseas a los MC. Teniendo en cuenta esto, decidimos hacer un análisis más detallado del péptido de PLAU. Se analizaron los espectros de fragmentación teóricos esperados en ambas especies para el péptido identificado (Anexo II, tablas 1 y 2), y se compararon entre si, y con el espectro experimental que el Proteome Discoverer asignó a la proteína PLAU humana (Anexo II, espectro 1). Encontramos que las series de iones *y* y *b* son

muy parecidas en ambas especies, y que en la sección en la que difieren, la serie no se cubre con el espectro experimental obtenido. Sin embargo, las masas de los péptidos parentales son diferentes, indicando que el péptido hallado se corresponde con PLAU de origen humano ya que su masa condice con la hallada experimentalmente.

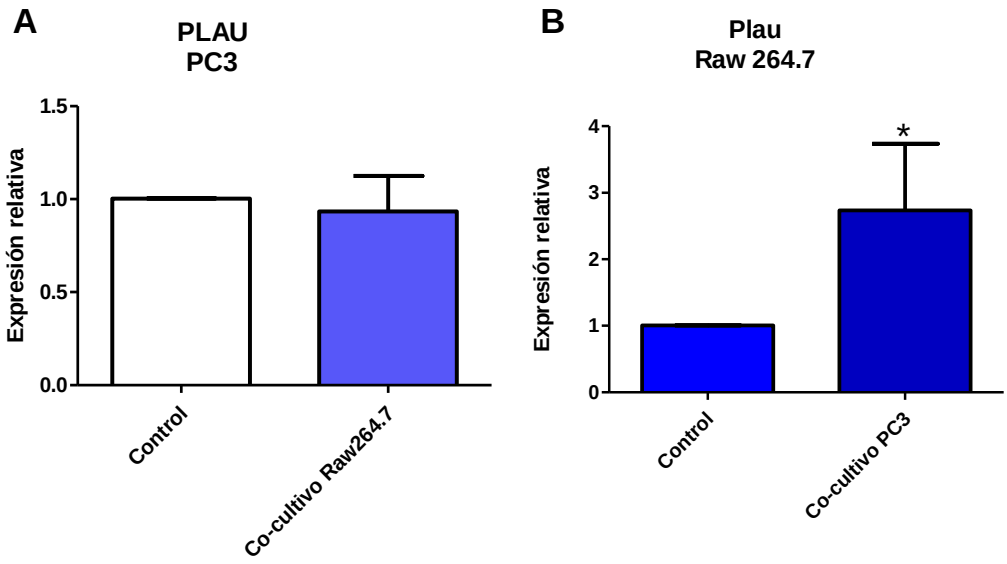


Figura 49- Niveles de expresión evaluados mediante RT-qPCR, de: A) *PLAU* en células PC3 crecidas solas o en co-cultivo (24h) con células Raw264.7. B) *Plau* en células Raw264.7 crecidas solas o en co-cultivo (24h) con células PC3. Los valores fueron relativizados utilizando *PPIA* (para muestras de PC3) o *36b4* (para muestras de Raw264.7) como gen estándar y se normalizaron respecto de la condición control. Significancia estadística respecto del control: * $p<0,05$.

Discusión

1. Expresión de genes involucrados en la tumorigénesis y/o en la regulación de la remodelación ósea

El cáncer es la segunda causa de muerte en Argentina, siendo el CaP el tumor con mayor incidencia en hombres y el tercero en mortalidad[11]. Aunque hay un gran número de individuos con CaP, la mayoría de los que reciben este diagnóstico no mueren por la enfermedad[12,17]. Aun así, se ubica cuarto entre los tumores con mayor mortalidad en varones en la población argentina[11]. Estadísticas similares fueron reportadas en EE.UU. donde la tasa de supervivencia relativa a 5 años informada en 2017 para los hombres con diagnóstico de enfermedad local o regional fue de 100%, mientras que cayó a un 29% para la enfermedad a distancia[12].

Los exámenes de detección pueden identificar el CaP en estadios tempranos. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia suficiente que demuestre que el diagnóstico precoz de esta enfermedad en hombres sin síntomas, reduzca la mortalidad de forma clínicamente significativa. Aún no se ha comprobado que las pruebas de tamizaje para el CaP tengan mayores beneficios que riesgos. Por lo tanto, muchos pacientes diagnosticados con CaP poco agresivo reciben tratamientos que ocasionan efectos adversos sobre su salud, incluso mayores a los que puede provocar la propia enfermedad[11].

Los tumores son generalmente incurables una vez que se diseminan al hueso[211]. Considerando que en muchos casos la enfermedad puede permanecer indolente mientras está confinada a la glándula prostática y que los efectos adversos del tratamiento pueden ser más perjudiciales que la propia enfermedad, una mejor comprensión del proceso metastásico del CaP hacia el hueso puede ayudar a encontrar nuevos biomarcadores o blancos moleculares que permitan predecir y/o prevenir esta etapa de la enfermedad, en la cual el tumor se vuelve altamente agresivo y la mortalidad aumenta drásticamente.

El concepto de nicho pre-metastásico ha surgido como un medio a través del cual un tumor primario es capaz de preparar sitios de metástasis. Un tumor primario puede condicionar la médula ósea a través de la producción de factores circulantes que tienen como blanco células en el microambiente óseo, y de esta manera hacerlo propicio para la localización y colonización por parte de las células tumorales. Estudios pre-clínicos demostraron que la resorción ósea puede regular la movilización y el *homing* de las HSCs. Los tumores que hacen

metástasis óseas pueden usar los mismos mecanismos fisiológicos que usan las HSCs para alojarse en el hueso, compitiendo con estas por la ocupación de su nicho en la médula ósea[211].

La interacción bidireccional entre las células del hueso y las de CaP sugieren que no solo factores derivados de las células tumorales afectan a las células óseas, sino que también las células del microambiente óseo pueden estimular el crecimiento del tumor metastásico[37]. Numerosos experimentos han respaldado la importancia de esta interacción. La comunicación entre las células de CaP y las células del microambiente del hueso es comúnmente llamada el "ciclo vicioso", en el cual el crecimiento del tumor afecta el remodelamiento óseo y éste a su vez afecta el desarrollo tumoral. Diversas vías de señalización contribuyen a este ciclo[30].

Con el objetivo de abordar experimentalmente la hipótesis sobre la comunicación que se establece entre las células tumorales y los precursores óseos en el nicho metastásico, utilizamos un sistema in vitro de co-cultivo el cual permite evaluar los cambios mediados por los factores solubles secretados en ausencia de contacto directo entre la célula tumoral y la célula ósea.

El papel de factores solubles en la modificación de respuestas celulares es un tema recurrente de estudio en todos los tejidos y sistemas. En un intento de simplificar la compleja relación entre los varios subtipos celulares que componen un organismo multicelular, se han desarrollado técnicas *in vitro* para ayudar a los investigadores a adquirir una comprensión detallada de las poblaciones de células individuales. Una de estas técnicas es el uso de insertos con membranas permeables que permiten la difusión de los factores solubles secretados. De esta manera, una población de células que crecen en insertos puede ser co-cultivada en un pocillo que contenga un tipo celular diferente con el objetivo de evaluar cambios celulares en respuesta a la señalización parácrina en la ausencia de contacto directo entre las células. Tales sistemas de co-cultivo ofrecen varias ventajas sobre otras técnicas similares, como la señalización bidireccional, la polaridad celular conservada y la detección de cambios específicos a nivel celular de cada población[212]. Además de ser utilizado en el campo de la inflamación, el cáncer, la angiogénesis y la diferenciación, estos sistemas de co-cultivo son de importancia primordial en el estudio de las relaciones complejas que existen entre los diferentes subtipos celulares

presentes en el sistema nervioso central, particularmente en el contexto de la neuroinflamación[213].

La eficacia de esta metodología permitió identificar factores claves en la metástasis ósea del CaP como DKK1[36], FGF9[37], FGFR1[35], etc. Mediante el uso de este sistema de co-cultivo *in vitro* se exploró además la asociación entre las células tumorales y las células endoteliales y se comprobaron los cambios coordinados en los perfiles de expresión génica y en las propiedades fenotípicas de las células endoteliales en distintas condiciones de co-cultivo[214,215]. Recientemente se reportó la importancia de los cambios metabólicos que ayudarían al direccionamiento de las células endoteliales hacia la invasión y la metástasis en el microambiente metastásico heterogéneo de los tumores prostáticos[216].

En este trabajo de tesis corroboramos que existe una interacción mediada por factores solubles entre las células de CaP y diferentes células óseas tanto de linaje osteoclástico (línea celular Raw264.7) como de linaje osteoblástico (PMOs y línea celular MC3T3), la cual se evidenció por la alteración en la expresión de diferentes genes, tanto en las células tumorales como en las células óseas cuando se encontraban en co-cultivo.

Genes como *PTHrP* y *OPG* mostraron un aumento en su expresión en células PC3 cuando estas células tumorales fueron co-cultivadas con los progenitores óseos, tanto con células Raw264.7 como con células MC3T3. Estos datos indican claramente que la comunicación con las células óseas provoca un aumento significativo de estos factores en las células tumorales independientemente del linaje de procedencia de los progenitores.

La producción de PTHrP por tumores prostáticos primarios está asociada con el incremento del tamaño tumoral y la velocidad de crecimiento, como se comprobó en modelos animales[200], sugiriendo que PTHrP actúa mediante mecanismos autócrinos e intrácrinos para promover el crecimiento tumoral. Por el contrario, en este mismo modelo y en un modelo de inyección intracardíaca de CaP, PTHrP no se encontró asociado con un incremento del potencial metastásico[200]. Esto sugiere que PTHrP parecería poco relevante en la progresión ósea del tumor, pero dentro del microambiente óseo, donde las células blanco (osteoblastos) y sus receptores están presentes, puede jugar un papel crítico en la respuesta del hueso al carcinoma prostático[200]. Se propuso

que el PTHrP derivado del tumor cumple una función determinante en la metástasis esquelética a través de un ciclo vicioso en el cual PTHrP aumenta la remodelación del hueso y la liberación de numerosos factores biológicos, promoviendo de esta forma un nicho fértil para el crecimiento tumoral[199].

Es bien conocida la función de OPG debido a su capacidad para unirse a RANKL y funcionar como un receptor señuelo (*decoy)*, cumpliendo una función crítica en la osteoclastogénesis. El balance preciso de la interacción entre RANK/RANKL/OPG es responsable del mantenimiento de la homeostasis de la resorción ósea[217]. En cuanto a su función en las células tumorales, se han reportado efectos antiapoptóticos en células PC3 al funcionar como receptor *decoy* de TRAIL[218].

En conclusión, el aumento en los niveles del ARNm de *PTHrP* y *OPG* en las células PC3 en respuesta al co-cultivo con los progenitores óseos, serían mecanismos implementados por las células tumorales para favorecer su crecimiento frente a señales derivadas de factores solubles que median la comunicación entre los diferentes tipos celulares.

El pre-tratamiento con hemina previno el efecto sobre la expresión de *PTHrP* y *OPG* en las células tumorales cuando estas fueron co-cultivadas con los precursores óseos. De esta manera, el pre-tratamiento con este compuesto estaría impidiendo la activación de mecanismos pro-tumorales en las células PC3 durante la interacción de éstas con las células óseas.

Por otro lado, ciertos efectos del pre-tratamiento con hemina fueron a su vez modulados por el co-cultivo con células MC3T3. En particular, se observó que la inducción de la expresión de *IL-6* e *IL-8* por efecto de la hemina se perdía cuando las células tumorales eran co-cultivadas con los precursores de osteoblastos. Esta modulación no se apreció frente al co-cultivo de las células tumorales con los precursores osteoclásticos.

El aumento de *IL-6* podría favorecer el crecimiento de las células tumorales[211]. En carcinomas de próstata avanzados, STAT3 se encuentra constitutivamente activo y el aumento de pSTAT3 en muestras de tumores de pacientes se correlaciona con la severidad de la enfermedad y el menor tiempo de sobrevida[219,220]. Se cree que esta inducción de STAT3 es consecuencia de los niveles circulantes aumentados de IL-6 en los individuos con CaP refractario a hormonas[221]. No obstante, se describió que la inducción de HO-1 es capaz de

inhibir la activación de STAT3, uno de los eventos de señalización mediados por IL-6 mejor descriptos[160,222]. En este contexto, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que HO-1 bloquea la actividad trascripcional de STAT3 inducida por IL-6, provocando la retención citoplasmática de este factor de transcripción cuando las células tumorales prostáticas son tratadas con hemina. Asimismo, en tumores PC3HO-1 xenotransplantados en ratones *nude* se comprobó que STAT3 se encontraba predominantemente en el citoplasma en comparación con los tumores controles[160].

Cuando las células tumorales llegan al hueso producen factores pro-osteolíticos (por ejemplo, RANKL, IL-6, PTHrP, DKK-1). A causa de la resorción ósea se liberan factores de crecimiento que estaban inmovilizados en la matriz alterando el microambiente y el fenotipo de las células tumorales[223]. En el microambiente óseo IL-6 estimula el crecimiento de osteoblastos y la diferenciación de osteoclastos[224]. Se reportó que IL-6 y TNF producidos por las células tumorales pueden conducir a un aumento en la expresión de RANKL en los osteoblastos y en las células estromales de la médula ósea[225]. Además, IL-6 es capaz de inhibir la ontogénesis mediada por Wnt a través de la estimulación de DKK1 en las células tumorales, causando un desbalance en la homeostasis del hueso y una degradación ósea aumentada[31].

Respecto a IL-8, esta citoquina puede estimular la migración basal del CaP de manera autócrina[226]. Además, esta interleuquina está involucrado en la proliferación y supervivencia de las células tumorales en el microambiente de la médula ósea[31].

La angiogénesis tumoral juega un papel importante en la diseminación del tumor. Tumores con alto grado de angiogénesis tienen lugar *in vivo* en asociación con la metástasis[227]. En el cáncer de mama, desde el momento en que las células tumorales se localizan en el microambiente óseo, pueden liberar factores que estimulan la resorción y la angiogénesis llevando al crecimiento de metástasis óseas y el subsecuente aumento selectivo de la atracción de nuevas células tumorales al hueso[228]. Se ha comprobado que la síntesis del mediador pro-angiogénico IL-8 también puede ser modulada por HO-1 en diversos tipos celulares. El tratamiento de células HUVEC (células endoteliales vasculares umbilicales humanas) con S-nitroso-acetilpenicilamina (SNAP), un donante de NO, resultó en un aumento de la expresión de HO-1 y de los niveles de VEGF e

IL-8[229]. La disminución en los niveles de HO-1, mediante la transfección con un siRNA específico o con oligonucleótidos antisentido, provocó una caída en la inducción de VEGF e IL-8 por tratamiento con SNAP. Más aún, la síntesis de IL-8 se redujo en presencia de anticuerpos neutralizantes de VEGF, mientras que los niveles de este último factor no se modificaron cuando se usaron anticuerpos neutralizantes anti-IL-8. De esta manera, los autores propusieron la existencia de una cascada molecular NO/HO-1/VEGF/IL-8 en las células endoteliales[229]. Por el contrario, otros resultados sugieren que la producción de IL-8 es independiente de la inducción de HO-1 en células HMEC-1 (células endoteliales de la microvasculatura humana)[230]. La deficiencia de HO-1 en humanos y ratones resulta en injuria oxidativa severa en las células endoteliales[165]. Es así que la marcada inducción de la expresión de HO-1 en condiciones de estrés oxidativo, sugiere que esta proteína puede estar particularmente involucrada en la angiogénesis asociada a condiciones inflamatorias. De hecho, el aumento de vascularización en tumores que sobre- expresan HO-1[135], el nexo entre HO-1 y la angiogénesis en la artritis reumatoidea[231] y su importancia en la cicatrización de heridas[232] confirman dicha hipótesis.

Sin embargo, el rol de HO-1 puede variar en distintas condiciones y se propuso que esta proteína cumpliría una función dual *in vivo*. Bussolati y colaboradores[165], demostraron que la inducción de la angiogénesis mediada por VEGF requiere la actividad de HO-1 mientras que, en condiciones inflamatorias, la formación de nuevos vasos sanguíneos se atenúa por la sobreexpresión de HO- 1. De esta manera, la influencia positiva o negativa de HO-1 en la angiogénesis depende de las diferentes condiciones tisulares[230]. En nuestro laboratorio demostramos que la sobreexpresión de HO-1 en células tumorales prostáticas regula negativamente la expresión de genes angiogénicos e inhibe este proceso *in vivo*[142]. Recientemente, también demostramos que el pre-acondicionamiento con hemina en el sitio de inyección del tumor en animales inmunocompetentes retarda el crecimiento tumoral afectando la respuesta inmune e impidiendo la neo vascularización[174].

En cuanto a la expresión de las citoquinas *IL-6* e *IL-8* los resultados de este trabajo indican que el tratamiento con hemina podría favorecer el desarrollo tumoral, sin embargo, el efecto inhibitorio de la inducción de HO-1 sobre la señalización de STAT3 atenuaría los efectos pro-tumorales de IL-6.

Estos resultados en conjunto con la atenuación por parte de la hemina del efecto del co-cultivo sobre *PTHrP* y *OPG*, anteriormente mencionada, permiten pensar que la inducción de HO-1 en las células tumorales podría alterar la interacción con el nicho óseo dificultando de esta forma la progresión de la enfermedad.

Se reportó que HO-1 juega un papel importante durante la diferenciación de las células madre de médula ósea, regulando de esta manera la osteoblastogénesis y la resorción ósea[196].

El análisis de los niveles de expresión de *Hmox1* en los precursores óseos reveló que en células MC3T3 el co-cultivo con células PC3 pre-tratadas o no con hemina produjo una disminución en la expresión del ARNm de HO-1. Por otro lado, el co-cultivo con las células tumorales generó un aumento sobre la expresión de *Hmox1* en las células Raw264.7, solo cuando fueron co-cultivadas con las células de CaP pre-tratadas con hemina.

HO-1 regula positivamente la diferenciación de osteoblastos. Se reportó que el aumento en los niveles de HO-1 incrementa el direccionamiento hacia el linaje osteoblástico de las MSC en detrimento de la diferenciación a adipocitos[196,233]. En cuanto a su efecto sobre la resorción ósea, la inducción de HO-1 bloquea la formación de osteoclastos así como la formación de hoyos de resorción *in vitro*, y es capaz de interferir con la formación de osteoclastos *in vivo*[197], actuando como un agente bloqueante de la resorción reduciendo la degradación del hueso[234,235].

Una vez diferenciado, el osteoblasto comienza a secretar Col1a1, una proteína de matriz extra celular. En general, Runx2, ALP, BSP y Col1a1 son marcadores tempranos de la diferenciación de osteoblastos[236]. Si bien el análisis de los niveles ARNm de *Col1a1* evidenció un aumento en su expresión en las células MC3T3, durante el co-cultivo con células PC3 pre-tratadas o no con hemina, la expresión de *Runx2* solo se vio aumentada en presencia de las células tumorales pre-tratadas con hemina. Este resultado podría sugerir que el pre-tratamiento con esta droga de las células de CaP modula su interacción con las células MC3T3 cuando están en co-cultivo, favoreciendo la diferenciación osteoblastica.

La regulación de la osteoclastogénesis por parte de las células del linaje osteoblástico es mediada a través del receptor RANK, su ligando RANKL y OPG [71]. RANK se expresa en la superficie de los precursores y de los osteoclastos maduros, mientras que OPG y RANKL son sintetizados por los osteoblastos y las células estromales, y han sido identificados como las dos principales citoquinas de la diferenciación y activación de osteoclastos[237]. Luego del inicio de la mineralización, la expresión de OPG aumenta en cultivos de osteoblastos comparados con cultivos menos maduros[71].

Bajo las condiciones experimentales ensayadas en esta tesis, la expresión de *Opg* no presentó cambios respecto del control en células MC3T3 cuando estas fueron co-cultivadas con células PC3, mientras que el co-cultivo con las células de CaP pre-tratadas con hemina provocó una disminución en la expresión de este gen.

Si bien la disminución de la expresión de *Opg* en células MC3T3 co-cultivadas con PC3 pre-tratadas con hemina podría favorecer la diferenciación y activación de osteoclastos en el contexto del microambiente óseo, la expresión de Rank en las células Raw264.7 también sufrió una disminución solo cuando fueron co-cultivadas con las células tumorales pre-tratadas con el inductor de HO-1. Esto podría conducir a una menor sensibilidad a la señalización vía RANKL por parte de estas células, en detrimento de la diferenciación y activación de osteoclastos.

2. Factores relevantes en la colonización del nicho óseo por las células tumorales prostáticas

Como se mencionó en la sección de resultados, ANXA2 y su receptor facilitan el asentamiento de las células tumorales en la médula ósea[124], y a través de RANKL y CSF1 favorecen la formación de osteoclastos, cumpliendo así un rol importante en la fisiología del hueso y en el crecimiento de las células tumorales en este tejido[238].

Dado los efectos antitumorales ejercidos por HO-1 en la carcinogénesis prostática demostrado por los trabajos de nuestro laboratorio[140–142,160,171–174], uno de los objetivos de nuestro grupo en los últimos años ha sido tratar de identificar las proteínas que interactúan con HO-1, las cuales podrían estar implicadas en

la regulación de los eventos biológicos claves de la tumorigénesis. Así, mediante estudios proteómicos, hemos construido lo que denominamos el "interactoma de HO-1"[173]. Del análisis de este interactoma identificamos a ANXA2 y decidimos profundizar el análisis de esta proteína dada su importancia en el CaP y en la fisiología del hueso.

Utilizando el modelo de co-cultivo encontramos un aumento significativo en la expresión de *ANXA2* y su receptor en las células PC3 cuando crecían en presencia de los precursores osteoclásticos. El hallazgo más sorprendente de estos experimentos es el que obtuvimos al analizar la localización de esta proteína en las células Raw264.7. Comprobamos que ANXA2 sufre una internalización translocándose desde la membrana hacia el interior del precursor óseo, cuando éstos fueron co-cultivados con células PC3. Este efecto podría explicarse, al menos en parte, por la disminución en la concentración de Ca^{2+} detectada en el medio condicionado para dicha condición experimental. De acuerdo a la literatura y como se describió previamente, ANXA2 se localiza en la membrana formando un heterotetrámero con la proteína S100A10 y este proceso es dependiente de la disponibilidad de Ca^{2+} [207]. Nuestros resultados además demostraron que frente al co-cultivo con las células tumorales pre-tratadas con hemina, este cambio en la localización de ANXA2 en las células Raw264.7 no se evidenció, siendo esto consistente con el mantenimiento de la concentración de Ca^{2+} en niveles similares a los de la condición control.

Previamente hemos reportado que la inducción farmacológica de HO-1 en las células tumorales puede modificar el microambiente óseo y subsecuentemente afectar la metástasis del CaP[127]. En línea con estos hallazgos, los cambios en la expresión y/o localización de ANXA2 en células tumorales y precursores osteoclásticos podrían tener consecuencias tanto en el direccionamiento, pegado y colonización del nicho óseo por parte de las células tumorales, como así también sobre la diferenciación/activación de osteoclastos y consecuentemente sobre el balance entre células progenitoras formadoras y degradadoras del hueso.

En base a estos datos decidimos investigar si los niveles de ANXA2 tienen valor predictivo para la progresión de la enfermedad. El análisis bioinformático de datos de RNAseq de muestras de pacientes de repositorios públicos mediante la plataforma Oncomine[188] y en el set de datos de TCGA-PRAD[189], reveló que

ANXA2 está significativamente sub-expresada en el CaP comparado con la próstata normal. Además, este gen se encuentra entre el 10% de los genes más consistentemente sub-expresados en CaP respecto de la gándula normal, en los trabajos analizados utilizando Oncomine, reflejando su importancia en la carcinogénesis prostática. Esta reducción también se corroboró a nivel de proteína por IHQ mediante el análisis de los datos de la plataforma pública THE HUMAN PROTEIN ATLAS[195] para muestras de carcinoma próstatico. Así mismo pudimos corroborar estos resultados en nuestro laboratorio mediante ensayos de inmunohistoquímica realizados sobre un TMA de origen comercial, donde estaban representadas diferentes patologías protáticas (US Biomax Inc. #pR8011a).

Por otro lado, menores niveles de expresión de *ANXA2* se correlacionaron con un tiempo libre de recaída disminuido (Ross Adams; GSE70769[193]), siendo este resultado independiente tanto del grado de Gleason como de los niveles de PSA. El análisis de datos de sobrevida (Sboner; GSE 16550[192]) evidenció un tiempo de sobrevida general más prolongado en pacientes con tumores con alta expresión de *ANXA2*, solo cuando éstos se correspondían con grados de Gleason altos. Si bien, esto nos lleva a pensar que el estudio de los niveles de expresión de *ANXA2* no brindaría información que complemente a la clasificación dada por el grado histopatológico, el análisis multivariado de estos datos indicó que las diferencias en la sobrevida respecto de los niveles de expresión de *ANXA2* eran independientes tanto de la edad como del grado de Gleason, dentro del grupo de alto Gleason (7:4+3 a 10). Por lo tanto los niveles de ANXA2 podrían tener valor diagnóstico/pronóstico para el CaP avanzado.

No obstante, teniendo en cuenta las propiedades de ANXA2 como molécula de adhesión y quimioatractante de las células de CaP[124,205], Shiozawa y col. han propuesto que la falta de ANXA2 en el tumor primario podría ejercer una presión selectiva sobre los cánceres prostáticos favoreciendo no solo el desprendimiento de células del tumor primario, sino también la migración hacia el hueso, un nicho rico en ANXA2 donde además podría favorecer el anclaje de la célula tumoral[124]. Considerando esto, decidimos profundizar el estudio analizando repositorios de datos que contaban con información de metástasis[190] con el fin de tener una mejor comprensión del rol de ANXA2 en la tumorigénesis prostática y su progresión ósea. Lo que encontramos fue que los niveles de esta

proteína eran mayores en muestras de CaP metastásico respecto de muestras de tumores prostáticos primarios, y esta diferencia fue aún más significativa cuando solo fueron consideradas las muestras provenientes de metástasis óseas. Este resultado es consistente con el aumento de *ANXA2* observado en células PC3 como consecuencia del co-cultivo con células óseas, indicando que el nicho óseo modula la expresión de *ANXA2* en la célula tumoral prostática, probablemente favoreciendo de esta manera el anclaje y progresión de la célula tumoral en el nicho metastásico.

La función de ANXA2 mejor descripta es su interacción con el activador tisular del plasminógeno (tPA/PLAT) así como su sustrato, el plasminógeno (PLG), promoviendo la conversión de este último en la serin-proteasa activa plasmina por el cual regula la fibrinólisis, facilita la remodelación de tejidos, activa MMPs, degrada matriz extracelular y participa en la angiogénesis cuando se localiza en la superficie extracelular tanto de células endoteliales como tumorales[205]. La activación del PLG también puede estar mediada por uPA/PLAU, contribuyendo al desarrollo tumoral y metastásico[209]. En línea con esto, el análisis bioinformático de repositorios de datos de pacientes reveló que altos niveles de expresión de PLAU en tumores prostáticos correlacionaba con una menor sobrevida de dichos individuos. También observamos que esta relación era independiente de la edad del paciente, considerado como el principal factor de riesgo, y del grado de Gleason del tumor que es el factor pronóstico más importante para la enfermedad con el que se cuenta actualmente.

Mediante el análisis proteómico de los MC, hemos sido capaces de encontrar la presencia de PLAU como proteína diferencial en los MC del co-cultivo entre células PC3 y células Raw264.7. Como se mencionó, el PLAU hallado en los medios condicionados fue liberado por las células tumorales ya que la masa del péptido detectado se condice con la masa teórica del péptido humano. Sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que las células óseas también aporten a los niveles de PLAU en el medio condicionado del co-cultivo, dado que en esta condición experimental se detectó modulación en los niveles de *Plau* solo en las células Raw264.7, aumentando su expresión respecto de la condición control.

De esta manera podría pensarse en PLAU como un posible biomarcador que brinde información complementaria a los factores pronóstico/diagnóstico usados actualmente. Además, dado que es una proteína de secreción, los cambios en su concentración en el microambiente tumoral podrían traducirse en cambios en sus niveles en sangre, que le permitirían actuar como biomarcador sérico de la enfermedad.

En trabajos previos demostramos que la inducción de HO-1 produce una disminución de la expresión de los componentes de la vía de PLG (*PLAU, PLAUR, PLAT*), mientras que aumenta la expresión de los inhibidores de la vía (*CBP2, SERPINF2, F12*) en células de CaP, con una concomitante disminución de PLAU en los medios condicionados de las mismas[173,239]. Esto indicaría que HO-1 regula negativamente esta vía, modulando la expresión de los componentes de la misma. Por otro lado, como ya se mencionó, una de las funciones mejor descriptas de ANXA2 es su translocación a la membrana y participación en la activación del PLG. Además, ANXA2 fue hallada en el interactoma de HO-1[173]. Teniendo esto en consideración, podemos sugerir que frente a la inducción de HO-1, ésta podría unirse a ANXA2 reteniéndola en citoplasma e impidiendo su acción en la activación del PLG. El fundamento de esta hipótesis se basa en la capacidad de HO-1, previamente demostrada por nuestro laboratorio, de retener en citoplasma factores como STAT3 y NFkB, apagando estas vías de señalización e impidiendo que actúen como factores de transcripción nucleares[142,160]. La capacidad de unirse a proteínas con estructuras tan disímiles podría explicar los efectos pleiotrópicos de HO-1.

3. Caracterización morfólogica, genética y fisiológica a nivel óseo de animales BALB/c *Hmox1* +/+; +/-; -/-.

El hueso es un tejido dinámico que se somete a una remodelación homeostática mediada por las actividades balanceadas de osteoblastos y osteoclastos[234]. La disrupción de este balance por la presencia de células tumorales convierte el nicho óseo normal en un nicho tumoral o metastásico[240,241]. HO-1 juega un papel crítico en la fisiología de este proceso[242]. Se reportó que la ausencia de HO-1 lleva a una masa ósea disminuida en ratones[234].

El análisis histomorfométrico de los fémures de ratones de la cepa BALB/c *Hmox1* +/+; +/- y -/- reveló una disminución del volumen óseo concomitante con la pérdida de *Hmox1*. En línea con estos hallazgos, se observó un menor número de osteoblastos, con la consecuente reducción de los parámetros osteogénicos. Estos resultados son consistentes con las funciones descriptas para HO-1. Se reportó que la expresión y la actividad de HO-1 son esenciales para la diferenciación de las MSCs hacia el linaje osteoblástico, como así también son necesarias para el crecimiento de los mismos[243]. Además, se comprobó que la inhibición de HO-1 favorece la diferenciación de las MSCs hacia la formación de adipocitos, con la consecuente disminución en la formación de osteoblastos[196,243,244]. Cabe destacar que, a pesar de la menor densidad ósea, los huesos de los animales KO tenían una mayor longitud, en concordancia con el aumento observado en la vasculogénesis, al compararlos con los de los animales WT o Het (datos no mostrados). Esta observación es consistente con los efectos anti-angiogénicos reportados previamente para HO-1[142,174].

Como ya se ha mencionado, la inducción de HO-1 regula de manera negativa la diferenciación de osteoclastos, a la vez que la pérdida de su expresión parecería ser un evento necesario para la diferenciación y activación de este tipo celular[197]. En el presente estudio, al analizar los fémures de los animales genéticamente modificados, se observó que la inactivación del gen de *Hmox1* tuvo un efecto negativo sobre el número y la actividad de los osteoclastos. Si bien estos resultados contrastan con las funciones de HO-1 descriptas para estas células, debe considerarse que en el contexto fisiológico las células de linaje osteoblástico son las principales moduladoras de la diferenciación y activación de osteoclastos, y que el menor número y actividad de osteoblastos observada en los animales KO para *Hmox1*, podría explicar la disminución observada tanto en el metabolismo óseo, como en la diferenciación y activación de osteoclastos. Por otro lado, recientemente se ha reportado que la inactivación del gen *Hmox1* o el silenciamiento de HO-1 en cultivos primarios de macrófagos disminuyó la diferenciación hacia osteoclastos inducida por RANKL, y se demostró que HO-1 es prescindible cuando la osteoclastogénesis ya fue inducida (osteoclastos en etapa temprana)[245]. Además, se comprobó que no solo las HSCs (células que dan origen al linaje mieloide, a partir del cual se generan los osteoclastos) provenientes de animales *Hmox1*$^{-/-}$ exhibían un

envejecimiento prematuro, con la consecuente pérdida de su potencial regenerativo, sino que el mismo fenómeno se hacía evidente al transplantar HSCs *Hmox1*$^{+/+}$ en animales *Hmox1*$^{-/-}$; mientras que HSCs *Hmox1*$^{-/-}$ transplantadas en animales WT recuperaban su poder regenerativo, indicando el rol de HO-1 extrínseca en la prevención del envejecimiento prematuro de las HSCs[246].

El análisis de la expresión génica en los PMOs aislados de los animales con diferentes números de copias para el gen de HO-1 evidenció una correlación entre los niveles de expresión de *Hmox1* y diferentes genes implicados en la diferenciación de osteoblastos o en la regulación de la fisiología ósea como *Runx2*, *Col1a1*, *Csf1*, *Opg* e *Il-6*, coincidiendo no solo con el menor número y actividad de osteoblastos, sino también con la disminución general del metabolismo óseo antes mencionada.

Es bien conocido el efecto antioxidante de HO-1, debido a su capacidad de degradar el hemo (compuesto pro-oxidante, proveniente de las hemoproteínas desestabilizadas) produciendo biliverdina que es rápidamente transformada en bilirrubina, compuesto con potentes propiedades antioxidantes[243]. Aunque parece existir una asociación entre HO-1 y la modulación de la apoptosis, los mecanismos específicos permanecen poco claros. Se ha propuesto que parte del papel antiapoptótico de HO-1 se basa en su función antioxidante. Esta asociación entre la reducción en los niveles de ROS, con un aumento en la expresión de *Hmox1*, ha sido demostrada por el tratamiento de MSCs con CoPP, un potente inductor de HO-1. Se reportó que la reducción en los niveles de ROS permitió la restauración de marcadores osteoblásticos [243,244].

Los PMOs aislados de las calvarias de los animales utilizados en este estudio mostraron niveles heterogéneos de ROS dentro de cada genotipo, identificándose una población con bajos niveles de ROS ("*Low*") y una con altos niveles ("*High*"). El análisis de estos datos reveló que, comparados con los PMOs WT, hubo un aumento en la fracción de células "*High*" con la consecuente disminución en la población "*Low*". Este cambio no alteró el porcentaje total de células positivas para ROS. En el caso de los PMOs KO se observó una llamativa disminución en el porcentaje total de células positivas para ROS como

consecuencia de una disminución, prácticamente total, de la población "*High*". Esto parecería indicar que la carencia de HO-1 podría establecer un límite máximo en los niveles de ROS que estas células pueden tolerar, actuando como factor de selección positivo sobre células con bajos niveles de estrés oxidativo y por ende, con un metabolismo oxidativo disminuido. De este modo este resultado concuerda con los parámetros observados por histomorfometría reflejando un metabolismo óseo general disminuido en estos animales.

4. Efecto de la deficiencia de *Hmox-1* en osteoblastos sobre la interacción con las células de CaP

Como ha sido mencionado anteriormente, HO-1 tiene fuertes implicancias en la diferenciación de células madre de médula ósea[247,248]. La diferenciación de osteoblastos está regulada positivamente por la expresión de HO-1, la cual está asociada con una reducción en los niveles de ROS[196]. Tanto la expresión como la actividad de HO-1 son esenciales para la diferenciación de las MSCs en osteoblastos. Si bien niveles basales de HO-1 son necesarios para el crecimiento de los osteoblastos, un aumento de HO-1 incrementa la diferenciación de estas células. Este aumento en la expresión de HO-1 precede un incremento en los niveles de ARNm de *ALP*, *BMP*, Osteonectina y *Runx2*[196].

Teniendo en cuenta la implicancia de HO-1 en la diferenciación de osteoblastos y considerando que la interacción mediante factores solubles entre las células de CaP y los precursores óseos es capaz de modular la expresión de *Hmox1* en estas últimas, resultó interesante estudiar el efecto del co-cultivo entre las células PC3 (pre-tratadas o no con Hemina) y los PMOs provenientes de los animales con los diferentes genotipos para *Hmox1*.

Al evaluar los niveles de ROS se encontró que el co-cultivo con las células tumorales, pre-tratadas o no con Hemina, tiene un efecto estresor solo sobre los PMOs Het. Estas células mostraron un incremento en la fracción positiva para ROS cuando fueron co-cultivadas con células PC3 o con células PC3 pre-tratadas con hemina. En particular este aumento está dado por un incremento en la población "High", fracción que en los PMOs Het ya se encontraba basalmente aumentada respecto de los PMOs WT. De manera consistente con los resultados discutidos previamente, el efecto estresor generado por la

presencia de células de CaP se hizo evidente solo en PMOs Het, posiblemente debido a su capacidad regulatoria disminuida, mientras que no tuvo efecto sobre los PMOs WT, ya que éstos serían capaces de compensar el efecto del co-cultivo y mantener estable su estado oxidativo. Por otro lado, como ha sido mencionado, los PMOs KO no serían capaces de tolerar altos niveles de ROS. Es así que la presencia de las células tumorales no generó cambios en los niveles de ROS de los PMOs KO, ya sea porque en estas células no aumentan los niveles de ROS (favoreciendo su supervivencia ante la carencia de HO-1), o porque aquellas células donde los niveles de ROS pudieron haber aumentado por efecto del co-cultivo, no fueron capaces de sobrevivir debido a la falta de HO-1.

Mediante el análisis de la expresión génica, en primer lugar, se corroboró la diferencia en los niveles de ARNm de *Hmox1* en los PMOs aislados de los diferentes animales. Con respecto al efecto del co-cultivo, se observó tanto para los PMOs WT como para los Het que la interacción mediante factores solubles con células PC3 modula negativamente la expresión de *Hmox1*, y este efecto no se ve modificado por el pre-tratamiento de la célula tumoral con hemina. Este resultado es similar al obtenido en células MC3T3 bajo las mismas condiciones.

El mismo patrón de modulación de la expresión por efecto del co-cultivo se observó para *Opg* en los PMOs con los diferentes genotipos, mientras que para *Csf-1* el comportamiento de la expresión del gen se mantuvo para las células provenientes de animales WT y Het. En el caso de los KO, no se detectó la disminución de *Csf-1* por efecto del co-cultivo con las células PC3, pero si fue evidente cuando las células tumorales fueron pre-tratadas con hemina. Teniendo en cuenta la correlación observada entre los niveles de estos genes y *Hmox1* en las células óseas, podría pensarse en principio que el efecto del co-cultivo sobre su expresión estaría dado por la disminución en la expresión de *Hmox1*.

El análisis de la expresión de *Rankl* mostró un aumento por efecto del co-cultivo con las células PC3, tanto en PMOs WT como Het. Por otro lado, cuando las células tumorales fueron pre-tratadas con Hemina no se detectó este aumento la expresión de *Rankl* en los PMOs WT, pero si sobre los PMOs Het y KO. El hecho de que no se haya encontrado ninguna correlación entre la expresión de *Rankl* y *Hmox1* en los PMOs (como se describió anteriormente) permitiría pensar que el aumento en la expresión de Rankl en los PMOs WT por

efecto del co-cultivo con las células PC3 y la pérdida de este efecto por el pre-tratamiento con hemina son independientes de los niveles de *Hmox1* en el osteoblasto. Sin embargo, los cambios observados en la respuesta al co-cultivo como consecuencia de las diferencias en el número de copias de *Hmox1*, permiten pensar que HO-1 podría estar implicada en modulación de *Rankl* en los PMOs.

La expresión de *Runx2* se vio aumentada en los osteoblastos cuando estos crecieron junto con las células PC3 pre-tratadas con hemina. Cabe resaltar que este efecto generado por el co-cultivo con células tumorales pre-tratadas con hemina se observó tanto sobre los PMOs WT, Het y KO, así como en los ensayos realizados con la línea pre-osteoblástica MC3T3.

Se reportó que la expresión de *Runx2* aumenta durante la diferenciación *ex vivo* de PMOs de calvarias y en líneas celulares osteoblásticas establecidas[52,249]. *Runx2* regula la expresión de muchos genes osteoblásticos incluidos *Col1a1*, *Opn* y *Bmp* entre otros[250]. Si bien, en base a estos datos podría esperarse que la expresión de *Col1a1* y *Opn* se comporte de manera similar a la de *Runx2*, es posible que los tiempos ensayados no sean suficientes para que se generen cambios apreciables en los niveles de ARNm de estos genes en los PMOs WT. Sin embargo, para los PMOs Het la expresión de *Col1a1* sufre un aumento bajo el co-cultivo con células PC3 pre-tratadas con hemina, siguiendo el mismo patrón de regulación que *Runx2*. Al ser la expresión basal de *Col1a1* en los PMOs Het menor que la correspondiente en los PMOs WT, el mismo cambio neto en los niveles del ARNm del gen se traducen en cambios relativos mayores en los PMOs Het que en los WT. Esto permitiría explicar las diferencias para *Col1a1* entre PMOs WT y Het frente al co-cultivo con células PC3 pre-tratadas con hemina. Por último, en el caso de los PMOs KO, los niveles de *Col1a1* sufrieron una disminución por efecto del co-cultivo con las células PC3, el cual fue aún mayor cuando las células tumorales fueron pre-tratadas con hemina. Si bien en estas células se evidenció un aumento del factor de diferenciación *Runx2*, al igual que en los PMOs WT y Het, la caída en los niveles de *Col1a1* podría indicar una deficiencia en la diferenciación de estas células, consistente con los resultados obtenidos mediante el análisis histomorfométrico de los fémures de los animales KO y en concordancia con lo que fuera

previamente descripto[196,243,244].

En líneas generales, el co-cultivo con las células de CaP de la línea PC3 alteró la expresión de genes en los PMOs, llevándolos hacia un perfil que podría favorecer la diferenciación y activación de osteoclastos por sobre la función osteoblástica. Por otro lado, el pre-tratamiento de las células tumorales con hemina podría estar modulando la interacción mediante factores solubles entre las células tumorales y los PMOs, llevando a estos últimos hacia un perfil más pro-osteoblástico y menos pro-osteoclástico. Cabe destacar que tanto para la expresión de *Rankl* como *Col1a1* el efecto del co-cultivo con células PC3 pre-tratadas con hemina fue diferente entre los PMOs WT, Het y KO, remarcando la importancia de los niveles de *Hmox1* en las células óseas en estos procesos.

El análisis sobre las células PC3 mostró que, de manera similar a lo observado con MC3T3, el co-cultivo con PMOs WT no alteró los niveles basales de *HMOX1* en las células tumorales, ni los inducidos por hemina. Sin embargo, cuando el co-cultivo se realizó con PMOs Het o KO, la inducción de *HMOX1* por el pre-tratamiento con hemina no fue evidente. Estos resultados indican que la pérdida de copias de *Hmox1* en los PMOs modula el efecto inductor de esta droga sobre *HMOX1* en las células de CaP cuando crecen en co-cultivo.

El co-cultivo con los PMOs WT o Het fue capaz de inducir la expresión de *DKK1* en las células tumorales, incluso por sobre el aumento en los niveles de ARNm de este gen provocado por el pre-tratamiento con hemina. Sin embargo, este efecto estaría condicionado por el número de copias de *Hmox1* en los PMOs, ya que el co-cultivo con los PMOs KO no fue capaz de inducir la expresión de *DKK1* en las células tumorales. El aumento en los niveles de *DKK1* podría tener un efecto sobre los osteoblastos, afectando su diferenciación al inhibir la vía de Wnt/β-cat, favoreciendo la diferenciación a adipocitos [243,251].

OPG (receptor *decoy* de RANKL), está fuertemente implicado en el proceso de remodelación ósea[102,237]. Los niveles de expresión de este gen sufrieron un aumento en células PC3 como consecuencia del co-cultivo con PMOs WT o Het, al igual que lo observado frente al co-cultivo con los precursores óseos. De igual manera, el pre-tratamiento de las células tumorales con hemina previno el efecto del co-cultivo sobre *OPG*. Por otro lado, el co-cultivo con los PMOs KO tuvo el efecto contrario, disminuyendo los niveles de este gen en las

células tumorales. Más allá de su función ósea, los cambios observados en los niveles de OPG en las células malignas podrían tener implicancias directas sobre el tumor dado que, como ha sido mencionado anteriormente, OPG puede actuar también como receptor *decoy* de TRAIL disminuyendo la apoptosis mediada por este factor[218].

Por último, y en concordancia con los resultados obtenidos en los ensayos con la línea celular pre-osteoblástica MC3T3 y la línea pre-osteoclástica Raw264.7, el co-cultivo con los PMOs WT, Het o KO llevó a un aumento en la expresión de *PTHrP*. En línea con lo observado anteriormente, el pre-tratamiento de las células tumorales con hemina previno el aumento de la expresión de *PTHrP* como consecuencia del co-cultivo con los PMOs WT. Sin embargo, el efecto preventivo del pre-tratamiento con el inductor farmacológico de HO-1 no solo se perdió frente al co-cultivo con los PMOs Het, sino que aumentó aún más la expresión de este gen cuando las células tumorales se crecieron junto a los PMOs KO.

Estos resultados remarcan la implicancia del HO-1 de las células óseas en la modulación de la comunicación mediante factores solubles entre los PMOs y las células de CaP, siendo incluso posible que diferentes niveles de *Hmox1* en los PMOs genere en las células tumorales efectos opuestos frente al pre-tratamiento de las mismas con hemina.

En resumen, el aumento en los niveles de *PTHrP* en las células tumorales por efecto del co-cultivo podría estar actuando sobre los PMOs (WT y Het), estimulando la expresión de *Rankl*. Este mecanismo favorecería la diferenciación y activación de osteoclastos en el microambiente óseo, tal y como ha sido descripto para tumores mamarios[102]. El pre-tratamiento con hemina de la célula de CaP interfiere en la interacción de ésta con las células óseas, impidiendo la estimulación de *PTHrP* en la célula tumoral y el consecuente cambio en los niveles de *Rankl* en los PMOs WT, llevándolos hacia un perfil más pro-osteoblástico y menos pro-osteoclástico. Este efecto modulatorio se pierde frente al co-cultivo con los PMOs Het, donde a pesar del pre-tratamiento con hemina la inducción de *PTHrP* se mantiene en la célula tumoral y por ende aumenta *Rankl* en los PMOs Het. Por último, este mecanismo parecería ser menos sensible en los PMOs KO, ya que es necesario un mayor aumento en los niveles de *PTHrP*

en la célula tumoral para que sea evidente un aumento en los niveles de *Rankl* en los PMOs KO (Figura 50).

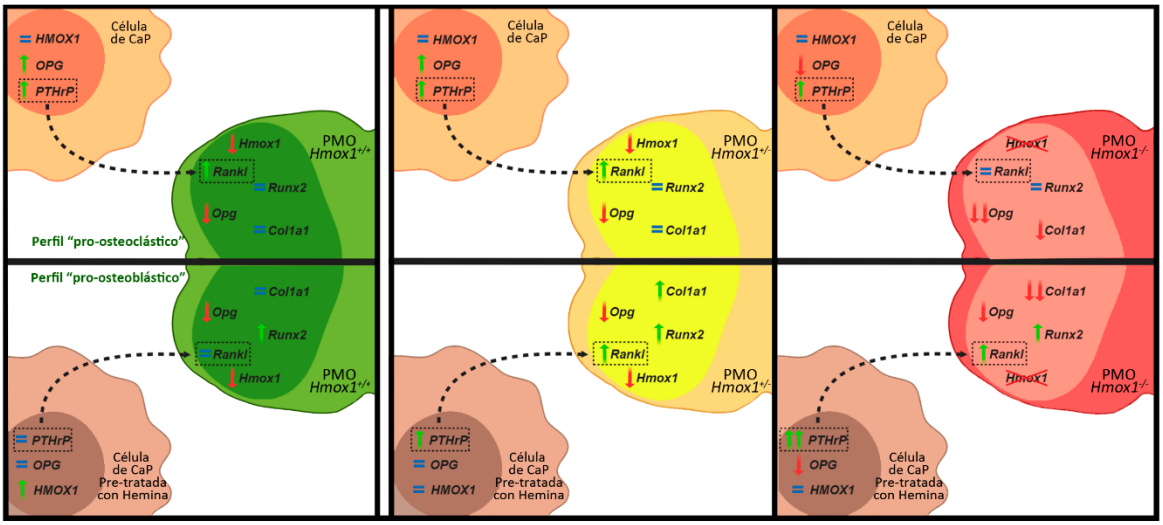


Figura 50- Representación esquemática del modelo propuesto para los genes asociados al metabolism óseo afectados por la interacción mediante factores solubres entre las células de CaP de la línea PC3 y PMOs *Hmox1*$^{+/+}$, *Hmox1*$^{+/-}$ *y Hmox1*$^{-/-}$.

El estrés oxidativo se ha asociado con el desarrollo y la progresión del CaP debido al aumento en las ROS. Sin embargo, el mecanismo por el cual las ROS y el sistema antioxidante participan en la progresión del cáncer no está claro. Las células de la línea PC3 muestran altos niveles basales de producción de ROS, pero también altos niveles de glutatión (GSH) y de actividad glutatión reductasa que posiblemente contribuyan a la tolerancia al estrés oxidativo[201]. La acumulación intracelular de niveles relativamente altos de ROS induce daño oxidativo en el ADN, el cual puede causar la transformación maligna de una célula. Además, el estrés oxidativo puede estimular la expansión clonal de células mutadas y por ende promover la tumorigénesis activando el sistema de señales de crecimiento en respuesta a *redox*[252]. Si bien podría pensarse que la inducción de HO-1 disminuiría la tumorigénesis por reducir los niveles de oxidantes intracelulares[253,254] existen reportes que indican que la actividad citoprotectora de HO-1 está asociada con la progresión del tumor[255]. Más aun, la radioterapia usada como tratamiento estandar del CaP, se basa en la generación de ROS para producir daño oxidativo[201]. Sin embargo, células de CaP metastásico pueden resistir a la radioterapia, sugiriendo que el sistema

antioxidante puede jugar un papel importante para eludir la citotoxicidad de la radiación[256].

En coincidencia con lo reportado por Freitas y col.[201], nuestros resultados mostraron que los niveles basales de ROS en células PC3 eran altos en toda la población celular. Estos niveles no se vieron modificados ni por el pre-tratamiento con hemina, ni por el co-cultivo con los diferentes PMOs. Estos datos indican, en primer lugar, que el pre-tratamiento con hemina de las células PC3 no tendría un efecto citoprotector asociado a una disminución del estrés oxidativo en la célula tumoral, al menos en las condiciones ensayadas. De este modo, los mecanismos por los cuales la inducción de HO-1 favorecería el desarrollo tumoral no parecen ser funcionales en nuestro modelo. Por otro lado, los cambios en la expresión génica en las células tumorales estarían ocurriendo por mecanismos independientes de los niveles de ROS. Asimismo, los cambios en la modulación de la expresión de genes sobre los PMOs en las diferentes condiciones del co-cultivo no serían consecuencia de los niveles de ROS en la célula tumoral, aunque no se descarta que el estado oxidativo de la célula de CaP pueda estar involucrado en la señalización de la interacción con las células óseas.

Bibliografía

1. Balk, S. P., Ko, Y.-J. & Bubley, G. J. Biology of prostate-specific antigen. *J. Clin. Oncol.* **21**, 383–391 (2003).

2. Prostate Cancer Center. Disponible en: http//www.prostatecancercentre.ca/prostate-cancer/about-the-prostate/.

3. De Marzo, A. M. *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 256–269 (2007).

4. Verze, P., Cai, T. & Lorenzetti, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat. Rev. Urol.* **13**, 379–386 (2016).

5. Liu, A. Y. *et al.* Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10705–10710 (1997).

6. Abate-Shen, C. & Shen, M. M. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* **14**, 2410–2434 (2000).

7. Rane, J. K., Pellacani, D. & Maitland, N. J. Advanced prostate cancer--a case for adjuvant differentiation therapy. *Nature reviews. Urology* **9**, 595–602 (2012).

8. Heinlein, C. A. & Chang, C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr. Rev.* **25**, 276–308 (2004).

9. Winslow, T. https://www.teresewinslow.com/.

10. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).

11. Instituto Nacional del Cáncer. INC. (2016). Disponible en: http://www.msal.gov.ar/inc/.

12. American Cancer Society. ACS. Available at: https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata.html.

13. Udensi, U. K. & Tchounwou, P. B. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 139 (2016).

14. Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* **24**, 1967–2000 (2010).

15. 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).

16. Witte, J. S. Prostate cancer genomics: towards a new understanding. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 77–82 (2009).

17. National Institute of Health. NIH. (2018). Disponible en://www.cancer.gov/.

18. Etzioni, R. D. *et al.* Long-term effects of finasteride on prostate specific antigen levels: results from the prostate cancer prevention trial. *J. Urol.* **174**, 877–881 (2005).

19. Matikainen, M. P., Schleutker, J., Morsky, P., Kallioniemi, O. P. & Tammela, T. L. Detection of subclinical cancers by prostate-specific antigen screening in asymptomatic men from high-risk prostate cancer families. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1275–1279 (1999).

20. Cotignola J, V. E. Biología Molecular del Receptor Androgénico. in *Cáncer de Próstata* 19–29 (Panamericana, 2014).

21. Loeb, S., Lilja, H. & Vickers, A. Beyond prostate-specific antigen. *Curr. Opin. Urol.* **26**, 459–465 (2016).

22. Loeb, S. Biomarkers for Prostate Biopsy and Risk Stratification of Patients with Newly Diagnosed Prostate Cancer. *Urol. Pract.* **4**, 315–321 (2017).

23. Filella, X. *et al.* PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. *Tumor Biol.* **34**, 1337–1347 (2013).

24. Roehl, K. A., Antenor, J. A. V. & Catalona, W. J. Serial biopsy results in prostate cancer screening study. *J. Urol.* **167**, 2435–2439 (2002).

25. Gleason, D. F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. reports* **50**, 125–128 (1966).

26. Gleason, D. F. & Mellinger, G. T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.* **111**, 58–64 (1974).

27. Ryan, C. J. *et al.* Persistent prostate-specific antigen expression after neoadjuvant androgen depletion: an early predictor of relapse or incomplete androgen suppression. *Urology* **68**, 834–839 (2006).

28. McKenney, J. K. *et al.* The potential impact of reproducibility of Gleason grading in men with early stage prostate cancer managed by active surveillance: a multi-institutional study. *J. Urol.* **186**, 465–469 (2011).

29. Logothetis, C. J. *et al.* Molecular classifi cation of prostate cancer progression: Foundation for marker-driven treatment of prostate cancer. *Cancer Discov.* **3**, 849–861 (2013).

30. Jin, J. K., Dayyani, F. & Gallick, G. E. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *Int. J. Cancer* **128**, 2545–2561 (2011).

31. Rahim, F. *et al.* Molecular Regulation of Bone Marrow Metastasis in Prostate and Breast Cancer. **2014**, (2014).

32. Kan, C., Vargas, G., Le Pape, F. & Clézardin, P. Cancer cell colonisation in the bone microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).

33. Loberg, R. D., Gayed, B. A., Olson, K. B. & Pienta, K. J. A paradigm for the treatment of prostate cancer bone metastases based on an understanding of tumor cell-microenvironment interactions. *J. Cell. Biochem.* **96**, 439–446 (2005).

34. Logothetis, C. J. & Lin, S.-H. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 21–28 (2005).

35. Wan, X. *et al.* Prostate cancer cell-stromal cell crosstalk via FGFR1 mediates antitumor activity of dovitinib in bone metastases. *Sci. Transl. Med.* **6**, 252ra122 (2014).

36. Li, Z. G. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mediates the prostate cancer-induced formation of new bone. *Oncogene* **27**, 596–603 (2008).

37. Li, Z. G. *et al.* Androgen receptor–negative human prostate cancer cells induce osteogenesis in mice through FGF9-mediated mechanisms. *J. Clin. Invest.* **118**, 2697–2710 (2008).

38. Downey, P. A. & Siegel, M. I. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. *Phys. Ther.* **86**, 77–91 (2006).

39. Robling, A. G., Castillo, A. B. & Turner, C. H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 455–498 (2006).

40. Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P. & Varanasi, S. S. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.* **61**, 577–587 (2008).

41. Guntur, A. R. & Rosen, C. J. Bone as an endocrine organ. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* **18**, 758–762 (2012).

42. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 421746 (2015).

43. Merriam-Webster.-Disponible en: http://www.sciencelearn.org.nz/Contexts/Ceramics/Sci-Media/Images/Human-bone-structure.

44. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3 Suppl 3**, S131-9 (2008).

45. Karsenty, G., Kronenberg, H. M. & Settembre, C. Genetic control of bone formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 629–648 (2009).

46. Bonewald, L. F. The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 229–238 (2011).

47. Everts, V. *et al.* The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 77–90 (2002).

48. Boskey, A. L. Bone composition: relationship to bone fragility and anti-osteoporotic drug effects. *Bonekey Rep.* **4**, 1–11 (2015).

49. Boskey, A. L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S. B. & McKee, M. D. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif. Tissue Int.* **71**, 145–154 (2002).

50. Aszodi, A., Bateman, J. F., Gustafsson, E., Boot-Handford, R. & Fassler, R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Struct. Funct.* **25**, 73–84 (2000).

51. Yagami, K. *et al.* Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J. Cell Biol.* **147**, 1097–1108 (1999).

52. Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.* **561**, 3–12 (2014).

53. Alford, A. I., Kozloff, K. M. & Hankenson, K. D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **65**, 20–31 (2015).

54. Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N. & Aubin, J. E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* **106**, 2139–2151 (1988).

55. Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**, 747–754 (1997).

56. Komori, T. *et al.* Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).

57. Fakhry, M., Hamade, E., Badran, B., Buchet, R. & Magne, D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J. Stem Cells* **5**, 136–148 (2013).

58. Manolagas, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and

implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**, 115–137 (2000).

59. Dallas, S. L. & Bonewald, L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 437–443 (2010).

60. Roodman, G. D. Mechanisms of bone metastasis. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1655–64 (2004).

61. Glass, D. A. 2nd & Karsenty, G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* **148**, 2630–2634 (2007).

62. Franz-Odendaal, T. A., Hall, B. K. & Witten, P. E. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* **235**, 176–190 (2006).

63. Dallas, S. L., Prideaux, M. & Bonewald, L. F. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr. Rev.* **34**, 658–690 (2013).

64. Rochefort, G. Y., Pallu, S. & Benhamou, C. L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos. Int.* **21**, 1457–1469 (2010).

65. Manolagas, S. C. “Choreography from the tomb: an emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of bone remodeling”. *BoneKEy-Osteovision* **3**, 5–14 (2006).

66. BONEWALD, L. F. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1116**, 281–290 (2007).

67. Plotkin, L. I. Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. *Curr. Osteoporos. Rep.* **12**, 121–126 (2014).

68. Bellido, T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif. Tissue Int.* **94**, 25–34 (2014).

69. Faloni, A. P. S., Sasso-Cerri, E., Katchburian, E. & Cerri, P. S. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J. Periodontal Res.* **42**, 193–201 (2007).

70. Miller, S. C., de Saint-Georges, L., Bowman, B. M. & Jee, W. S. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc.* **3**, 951–953 (1989).

71. Andersen, T. L. *et al.* A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am. J. Pathol.* **174**, 239–247 (2009).

72. Suda, T., Takahashi, N. & Martin, T. J. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr. Rev.* **13**, 66–80 (1992).

73. Boyce, B. F., Hughes, D. E., Wright, K. R., Xing, L. & Dai, A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab. Invest.* **79**, 83–94 (1999).

74. Boyce, B. F. Advances in osteoclast biology reveal potential new drug targets and new roles for osteoclasts. *J. bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **28**, 711–722 (2013).

75. Crockett, J. C., Mellis, D. J., Scott, D. I. & Helfrich, M. H. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos. Int.* **22**, 1–20 (2011).

76. Yavropoulou, M. & Yovos, J. Osteoclastogenesis - Current knowledge and future perspectives. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **8**, 204–216 (2008).

77. Takayanagi, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 292–304 (2007).

78. Kim, K., Lee, S.-H., Ha Kim, J., Choi, Y. & Kim, N. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Mol. Endocrinol.* **22**, 176–185 (2008).

79. Arana-Chavez, V. E. & Bradaschia-Correa, V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 446–450 (2009).

80. Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. & Halleen, J. M. The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 3**, 377–381 (2000).

81. Sodek, J. & McKee, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol. 2000* **24**, 99–126 (2000).

82. Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M. & Xu, J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin. Biochem.* **45**, 863–873 (2012).

83. Boyce, B. F. & Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 139–146 (2008).

84. Longhini, R., de Oliveira, P. A., de Souza Faloni, A. P., Sasso-Cerri, E. & Cerri, P. S. Increased apoptosis in osteoclasts and decreased RANKL immunoexpression in periodontium of cimetidine-treated rats. *J. Anat.* **222**, 239–247 (2013).

85. Longhini, R., Aparecida de Oliveira, P., Sasso-Cerri, E. & Cerri, P. S. S. Cimetidine Reduces Alveolar Bone Loss in Induced Periodontitis in Rat Molars. *J. Periodontol.* **85**, 1115–1125 (2014).

86. de Souza Faloni, A. P. *et al.* Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. *Calcif. Tissue Int.* **88**, 63–74 (2011).

87. Charles, J. F. & Aliprantis, A. O. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol. Med.* **20**, 449–459 (2014).

88. Phan, T. C. A., Xu, J. & Zheng, M. H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol. Histopathol.* **19**, 1325–1344 (2004).

89. Negishi-Koga, T. & Takayanagi, H. Bone cell communication factors and Semaphorins. *Bonekey Rep.* **1**, 183 (2012).

90. Calvi, L. M. *et al.* Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *J. Clin. Invest.* **107**, 277–286 (2001).

91. Matsumoto, M. A., Biguetti, C. C. & Fonseca, A. C. Bone Tissue Healing Dynamics : From damage to reconstruction Bone Tissue Healing Dynamics : From Damage to Reconstruction. (2016).

92. Matsuo, K. & Irie, N. Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**, 201–209 (2008).

93. Elefteriou, F. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 231–236 (2008).

94. Nakashima, T. *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.* **17**, 1231–1234 (2011).

95. Xiong, J. *et al.* Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat. Med.* **17**, 1235–

1241 (2011).

96. Howard, G. A., Bottemiller, B. L., Turner, R. T., Rader, J. I. & Baylink, D. J. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 3204–3208 (1981).

97. Anderson, H. C. Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* **5**, 222–226 (2003).

98. Yoshiko, Y., Candeliere, G. A., Maeda, N. & Aubin, J. E. Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4465–4474 (2007).

99. Boivin, G. & J Meunier, P. The Degree of Mineralization of Bone Tissue Measured by Computerized Quantitative Contact Microradiography. *Calcif. Tissue Int.* **70**, 503–511 (2002).

100. Boivin, G. *et al.* The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone* **43**, 532–538 (2008).

101. Gu, G., Mulari, M., Peng, Z., Hentunen, T. A. & Väänänen, H. K. Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 1095–1101 (2005).

102. Mundy, G. R. Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 584–593 (2002).

103. Fidler, I. J. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 1588–1592 (1995).

104. Macedo, F. *et al.* Bone metastases: An overview. *Oncol. Rev.* **11**, (2017).

105. Silvestris, F., Oronzo, S. D. & Lovero, D. *Bone Metastases from Solid Tumors : In Search of Predictive Biomarkers for Clinical Translation*. *Oncogenomics* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-811785-9.00010-7

106. Svensson, E., Christiansen, C. F., Ulrichsen, S. P., Rørth, M. R. & Sørensen, H. T. Survival after bone metastasis by primary cancer type: A Danish population-based cohort study. *BMJ Open* **7**, 1–7 (2017).

107. Suva, L. J., Washam, C., Nicholas, R. W. & Griffin, R. J. Bone metastasis: mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Endocrinol.* **7**, 208–218 (2011).

108. Sturge, J., Caley, M. P. & Waxman, J. Bone metastasis in prostate cancer: emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 357–368 (2011).

109. Sottnik, J. L., Dai, J., Zhang, H., Campbell, B. & Keller, E. T. Tumor-induced pressure in the bone microenvironment causes osteocytes to promote the growth of prostate cancer bone metastases. *Cancer Res.* **75**, 2151–2158 (2015).

110. Joseph, J. *et al.* Disseminated prostate cancer cells can instruct hematopoietic stem and progenitor cells to regulate bone phenotype. *Mol. Cancer Res.* **10**, 282–292 (2012).

111. Decker, A. M., Jung, Y., Cackowski, F. & Taichman, R. S. The role of hematopoietic stem cell niche in prostate cancer bone metastasis. *J. Bone Oncol.* **5**, 117–120 (2016).

112. Brown, H. K., Ottewell, P. D., Evans, C. A. & Holen, I. Location matters: osteoblast and osteoclast distribution is modified by the presence and proximity to breast cancer cells in vivo. *Clin. Exp. Metastasis* **29**, 927–938 (2012).

113. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* **8**, 98–101 (1989).

114. Kang, Y. *et al.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**, 537–549 (2003).

115. Lu, X. *et al.* VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging alpha4beta1-positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell* **20**, 701–714 (2011).

116. Croucher, P. I., Parker, B. S., Corcoran, N. & Rogers, M. J. Bone Turnover Markers and Prostate Cancer: Not Just a Measure of Bone Disease? *European urology* **68**, 51–52 (2015).

117. Saidak, Z. *et al.* Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Exp. Cell Res.* **315**, 2072–2080 (2009).

118. Adams, G. B. *et al.* Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**, 599–603 (2006).

119. Sanders, J. L. *et al.* Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* **141**, 4357–4364 (2000).

120. Edwards, J. R. & Mundy, G. R. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 235–243 (2011).

121. Santini, D. *et al.* Receptor activator of NF-kB (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS One* **6**, e19234 (2011).

122. Jones, D. H. *et al.* Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* **440**, 692–696 (2006).

123. Martinez, L. M. *et al.* Changes in the peripheral blood and bone marrow from untreated advanced breast cancer patients that are associated with the establishment of bone metastases. *Clin. Exp. Metastasis* **31**, 213–232 (2014).

124. Shiozawa, Y. *et al.* Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* **105**, 370–380 (2008).

125. Chau, L. Y. Heme oxygenase-1: Emerging target of cancer therapy. *Journal of Biomedical Science* **22**, 1–7 (2015).

126. Gueron, G., De Siervi, A. & Vazquez, E. Advanced prostate cancer: Reinforcing the strings between inflammation and the metastatic behavior. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* **15**, 213–221 (2012).

127. Ferrando, M. *et al.* Heme oxygenase-1 (HO-1) expression in prostate cancer cells modulates the oxidative response in bone cells. *PLoS One* **8**, 1–14 (2013).

128. Guise, T. A. *et al.* Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6213–6217 (2006).

129. Feller, L., Kramer, B. & Lemmer, J. A short account of metastatic bone disease. *Cancer Cell Int.* **11**, 24 (2011).

130. Wauquier, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J. & Wittrant, Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol. Med.* **15**, 468–477 (2009).

131. Almeida, M., Han, L., Ambrogini, E., Bartell, S. M. & Manolagas, S. C. Oxidative Stress Stimulates Apoptosis and Activates NF-κB in Osteoblastic Cells via a PKCβ/p66 shc Signaling Cascade: Counter Regulation by Estrogens or Androgens. *Mol. Endocrinol.* **24**, 2030–2037 (2010).

132. Grochot-Przeczek, A., Dulak, J. & Jozkowicz, A. Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin. Sci. (Lond).* **122**, 93–103 (2012).

133. Lin, P.-H., Lan, W.-M. & Chau, L.-Y. TRC8 suppresses tumorigenesis through targeting heme oxygenase-1 for ubiquitination and degradation. *Oncogene* **32**, 2325–2334 (2013).

134. Otterbein, L. E. *et al.* Heme oxygenase-1 and carbon monoxide modulate DNA repair through ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14491–14496 (2011).

135. Was, H. *et al.* Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *Am. J. Pathol.* **169**, 2181–2198 (2006).

136. Gandini, N. A. *et al.* Nuclear localization of heme oxygenase-1 is associated with tumor progression of head and neck squamous cell carcinomas. *Exp. Mol. Pathol.* **93**, 237–245 (2012).

137. Nuhn, P. *et al.* Heme oxygenase-1 and its metabolites affect pancreatic tumor growth in vivo. *Mol. Cancer* **8**, 37 (2009).

138. Furfaro, A. L. *et al.* HO-1 up-regulation: A key point in high-risk neuroblastoma resistance to bortezomib. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842**, 613–622 (2014).

139. Wegiel, B., Chin, B. Y. & Otterbein, L. E. Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation. *Cell Cycle* **7**, 1379–1384 (2008).

140. Sacca, P. *et al.* Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. *Br. J. Cancer* **97**, 1683–1689 (2007).

141. 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**, 1745–1755 (2009).

142. Ferrando, M. *et al.* Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer. *Angiogenesis* **14**, 467–479 (2011).

143. 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).

144. 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).

145. Ryter, S. W., Alam, J. & Choi, A. M. K. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* **86**, 583–650 (2006).

146. Astort, F. *et al.* Nitric oxide sets off an antioxidant response in adrenal cells: Involvement of sGC and Nrf2 in HO-1 induction. *Nitric Oxide* **37**, 1–10 (2014).

147. Astort, F. *et al.* Role of CREB on heme oxygenase-1 induction in adrenal cells: involvement of the PI3K pathway. *J. Mol. Endocrinol.* **57**, 113–124 (2016).

148. Abraham, N. G. & Kappas, A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol. Rev.* **60**, 79–127 (2008).

149. Kim, Y.-M. *et al.* Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 137–167 (2011).

150. Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **284**, 13291–13295 (2009).

151. Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 323–354 (2010).

152. Stocker, R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic. Res. Commun.* **9**, 101–112 (1990).

153. 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).

154. 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**, L312-9 (2000).

155. 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).

156. 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).

157. Suttner, D. M. *et al.* Protective effects of transient HO-1 overexpression on susceptibility to oxygen toxicity in lung cells. *Am. J. Physiol.* **276**, L443-51 (1999).

158. 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).

159. 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).

160. Elguero, B. *et al.* Unveiling the Association of STAT3 and HO-1 in Prostate Cancer: Role beyond Heme Degradation. *Neoplasia* **14**, 1043–1056 (2012).

161. Gandini, N. A. *et al.* Heme oxygenase-1 expression in human gliomas and its correlation with poor prognosis in patients with astrocytoma. *Tumor Biol.* **35**, 2803–2815 (2014).

162. Andrés, N. C. *et al.* Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: Involvement of p53. *Exp. Mol. Pathol.* **97**, 321–331 (2014).

163. Gandini, N. A. *et al.* Heme Oxygenase-1 Has an Antitumor Role in Breast Cancer. *Antioxid. Redox Signal.* ars.2018.7554 (2019). doi:10.1089/ars.2018.7554

164. Tertil, M., Jozkowicz, A. & Dulak, J. Oxidative stress in tumor angiogenesis- therapeutic targets. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3877–3894 (2010).

165. Bussolati, B. & Mason, J. C. Dual role of VEGF-induced heme-oxygenase-1 in angiogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1153–1163 (2006).

166. Jozkowicz, A., Was, H. & Dulak, J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2099–2117 (2007).

167. Chiang, S.-K., Chen, S.-E. & Chang, L.-C. A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 39 (2018).

168. Waza, A. A., Hamid, Z., Ali, S., Bhat, S. A. & Bhat, M. A. A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil. *Inflamm. Res.* **67**, 579–588 (2018).

169. Degese, M. S. *et al.* Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data. *Lung Cancer* **77**, 168–175 (2012).

170. Dong, Z. *et al.* Matrix metalloproteinase activity and osteoclasts in experimental prostate cancer bone metastasis tissue. *Am. J. Pathol.* **166**, 1173–1186 (2005).

171. 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).

172. Gueron, G. *et al.* Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget* **5**, 4087–4102 (2014).

173. 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–e2570 (2016).

174. Jaworski, F. M. *et al.* In Vivo Hemin Conditioning Targets the Vascular and Immunologic Compartments and Restrains Prostate Tumor Development. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5135–5148 (2017).

175. Nitti, M. *et al.* HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. *Antioxidants* **6**, 29 (2017).

176. 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).

177. 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).

178. Barbagallo, I. *et al.* Potential Therapeutic Effects of Natural Heme Oxygenase-1 Inducers in Cardiovascular Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 507–521 (2013).

179. Grasso, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239–243 (2012).

180. Robinson, D. *et al.* Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell* **161**, 1215–1228 (2015).

181. Mehra, R. *et al.* Association of ERG/PTEN status with biochemical recurrence after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *Med. Oncol.* **35**, 152 (2018).

182. 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).

183. 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).

184. Walker, J. M. *Bone Research Protocols*. **816**, (Humana Press, 2012).

185. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

186. Wain, H. M. *et al.* Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* **79**, 464–470 (2002).

187. Eppig, J. T., Blake, J. A., Bult, C. J., Kadin, J. A. & Richardson, J. E. The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Res.* **43**, D726-36 (2015).

188. Oncomine. -. Disponible en: http://www.oncomine.org.

189. The Cancer Genome Atlas. TCGA. Disponible en: http://cancergenome.nih.gov/.

190. Kumar, A. *et al.* Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat. Med.* **22**, 369–378 (2016).

191. Gene Expression Omnibus. GEO. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/.

192. Sboner, A. *et al.* Molecular sampling of prostate cancer: a dilemma for predicting disease progression. *BMC Med. Genomics* **3**, 8 (2010).

193. Ross-Adams, H. *et al.* Integration of copy number and transcriptomics provides risk stratification in prostate cancer: A discovery and validation cohort study. *EBioMedicine* **2**, 1133–1144 (2015).

194. Budczies, J. *et al.* Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* **7**, e51862 (2012).

195. The Human Protein Atlas. Disponible en: https://www.proteinatlas.org/.

196. Vanella, L. *et al.* HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblast. *Bone* **46**, 236 (2010).

197. Zwerina, J. *et al.* Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.* **19**, 2011–2013 (2005).

198. Ferrando, M. HO-1 en la progresión ósea del cáncer de próstata. Tesis (2013).

199. Isowa, S. *et al.* PTHrP regulates angiogenesis and bone resorption via VEGF expression. *Anticancer Res.* **30**, 2755–2767 (2010).

200. Keller, E. T. *et al.* Prostate carcinoma skeletal metastases: Cross-talk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev.* **20**, 333–349 (2001).

201. Freitas, M. *et al.* Oxidative stress adaptation in aggressive prostate cancer may be counteracted by the reduction of glutathione reductase. *FEBS Open Bio* **2**, 119–128 (2012).

202. Christensen, M. V, Høgdall, C. K., Umsen, K. M. J. & Høgdall, E. V. S. Annexin A2 and cancer: A systematic review. *Int. J. Oncol.* **52**, 5–18 (2018).

203. Roodman, G. D. Genes associate with abnormal bone cell activity in bone metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 569–578 (2012).

204. D'Souza, S. *et al.* Annexin II interactions with the annexin II receptor enhance multiple myeloma cell adhesion and growth in the bone marrow microenvironment. *Blood* **119**, 1888–1896 (2012).

205. Xu, X. H., Pan, W., Kang, L. H., Feng, H. & Song, Y. Q. Association of Annexin A2 with cancer development (review). *Oncology Reports* **33**, 2121–2128 (2015).

206. Niroshani Surangika Soysa, Neil Alles1, Kazuhiro Aoki & Keiichi Ohya. Osteoclast formation and differentiation: An overview. *J. Med. Dent. Sci.* **59**, 65–74 (2012).

207. Benaud, C. *et al.* AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell

membrane cytoarchitecture. *J. Cell Biol.* **164**, 133–144 (2004).

208. Liu, J. W. *et al.* Annexin II expression is reduced or lost in prostate cancer cells and its re-expression inhibits prostate cancer cell migration. *Oncogene* **22**, 1475–1485 (2003).

209. Lokman, N. A., Ween, M. P., Oehler, M. K. & Ricciardelli, C. The Role of Annexin A2 in Tumorigenesis and Cancer Progression. *Cancer Microenviron.* **4**, 199–208 (2011).

210. Hudson, B. D., Kulp, K. S. & Loots, G. G. Prostate cancer invasion and metastasis: Insights frommining genomic data. *Brief. Funct. Genomics* **12**, 397–410 (2013).

211. Weilbaecher, K. N., Guise, T. A. & Mccauley, L. K. Cancer to bone : a fatal attraction. *Nat. Publ. Gr.* **11**, 411–425 (2011).

212. Navone, N. & Labanca, E. *Patient-Derived Xenograft Models of Human Cancer*. (2017). doi:10.1007/978-3-319-55825-7

213. Renaud, J. & Martinoli, M.-G. Development of an Insert Co-culture System of Two Cellular Types in the Absence of Cell-Cell Contact. *J. Vis. Exp.* (2016). doi:10.3791/54356

214. Khodarev, N. N. *et al.* Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells. *J. Cell Sci.* **116**, 1013–1022 (2003).

215. Wang, X., Zhao, X., Wang, K., Wu, L. & Duan, T. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. *Cancer Sci.* **104**, 516–523 (2013).

216. Jayaraman, A. *et al.* Untargeted metabolomics reveals distinct metabolic reprogramming in endothelial cells co-cultured with CSC and non-CSC prostate cancer cell subpopulations. *PLoS One* **13**, e0192175 (2018).

217. Dougall, W. C. Molecular pathways: Osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis. *Clinical Cancer Research* **18**, 326–335 (2012).

218. Holen, I., Croucher, P. I., Hamdy, F. C. & Eaton, C. L. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **62**, 1619–1623 (2002).

219. Mora, L. B. *et al.* Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* **62**, 6659–6666 (2002).

220. Tam, L. *et al.* Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer. *Br. J. Cancer* **97**, 378–383 (2007).

221. Xu, L. *et al.* Inhibition of IL-6-JAK/Stat3 signaling in castration-resistant prostate cancer cells enhances the NK cell-mediated cytotoxicity via alteration of PD-L1/NKG2D ligand levels. *Mol. Oncol.* **12**, 269–286 (2018).

222. Zhang, B. *et al.* Heme oxygenase-1 induction attenuates imiquimod-induced psoriasiform inflammation by negative regulation of Stat3 signaling. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).

223. Hall, C. L., Kang, S., MacDougald, O. A. & Keller, E. T. Role of wnts in prostate cancer bone metastases. *J. Cell. Biochem.* **97**, 661–672 (2006).

224. Liu, X. H., Kirschenbaum, A., Yao, S. & Levine, A. C. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E2signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-κB (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* **146**, 1991–1998 (2005).

225. Patel, L. R., Camacho, D. F., Shiozawa, Y., Pienta, K. J. & Taichman, R. S. Mechanisms of cancer cell metastasis to bone. *Futur. Oncol.* **7**, 1285–1297 (2011).

226. Reiland, J., Furcht, L. T. & McCarthy, J. B. CXC-chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the CXCR2 receptor. *Prostate* **41**, 78–88 (1999).

227. Bielenberg, D. R. & Zetter, B. R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J.* **21**, 267–273 (2015).

228. Pluijm, G. va. der, Löwik, C. & Papapoulos, S. Tumour progression and angiogenesis in bone metastasis from breast cancer: new approaches to an old problem. *Cancer Treat. Rev.* **26**, 11–27 (2000).

229. Pae, H.-O., Oh, G.-S., Choi, B.-M., Kim, Y.-M. & Chung, H.-T. A molecular cascade showing nitric oxide-heme oxygenase-1-vascular endothelial growth factor-interleukin-8 sequence in human endothelial cells. *Endocrinology* **146**, 2229–2238 (2005).

230. Loboda, A. *et al.* Heme Oxygenase-1 and the Vascular Bed: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1767–1812 (2008).

231. Devesa, I. *et al.* Influence of heme oxygenase 1 modulation on the progression of murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **52**, 3230–3238 (2005).

232. Deshane, J. *et al.* Stromal cell–derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1–dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 605–618 (2007).

233. Herroon, M. K., Rajagurubandara, E., Diedrich, J. D., Heath, E. I. & Podgorski, I. Adipocyte-Activated oxidative and ER stress pathways promote tumor survival in bone via upregulation of Heme Oxygenase 1 and Survivin. *Sci. Rep.* **8**, 1–16 (2018).

234. Ke, K. *et al.* Hemeoxygenase-1 maintains bone mass via attenuating a redox imbalance in osteoclast. *Mol. Cell. Endocrinol.* **409**, 11–20 (2015).

235. Bak, S. U. *et al.* Heme oxygenase-1 (HO-1)/carbon monoxide (CO) axis suppresses RANKL-induced osteoclastic differentiation by inhibiting redox-sensitive NF-κB activation. *BMB Rep.* **50**, 103–108 (2017).

236. Huang, W. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front. Biosci.* **12**, 3068 (2007).

237. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, F. Y. IL-6 , RANKL , TNF-alpha / IL-1 : interrelations in bone resorption. *Cytokine and Growth Factor* **15**, 2004 (2004).

238. Li, F. *et al.* Annexin II stimulates RANKL expression through MAPK. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 1161–1167 (2005).

239. Paez, A. V. Decodificación del interactoma de HO-1 y su impacto en la arquitectura celular en cáncer de próstata. Tesis (2018).

240. Chiang, A. C. & Massagué, J. Molecular Basis of Metastasis. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2814–2823 (2008).

241. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* **127**, 679–695 (2006).

242. Cunnington, A. J., de Souza, J. B., Walther, M. & Riley, E. M. Malaria impairs resistance to Salmonella through heme- and heme oxygenase–dependent dysfunctional granulocyte mobilization. *Nat. Med.* **18**, 120–127 (2012).

243. Vanella, L., Sanford, C., Kim, D. H., Abraham, N. G. & Ebraheim, N. Oxidative stress and heme oxygenase-1 regulated human mesenchymal stem cells differentiation. *Int. J. Hypertens.* **2012**, 890671 (2012).

244. Barbagallo, I. *et al.* Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J. Bone Miner. Metab.* **28**, 276–288 (2010).

245. Florczyk-Soluch, U. *et al.* Various roles of heme oxygenase-1 in response of bone marrow macrophages to RANKL and in the early stage of osteoclastogenesis. *Sci. Rep.* **8**, 1–15 (2018).

246. Szade, K. *et al.* Heme oxygenase-1 deficiency affects bone marrow niche and triggers premature exhaustion of hematopoietic stem cells. *bioRxiv Prepr.* (2018).

247. Abraham, N. G., Lutton, J. D. & Levere, R. D. Heme metabolism and erythropoiesis in abnormal iron states: role of delta-aminolevulinic acid synthase and heme oxygenase. *Exp. Hematol.* **13**, 838–843 (1985).

248. Abraham, N. G. Molecular regulation--biological role of heme in hematopoiesis. *Blood Rev.* **5**, 19–28 (1991).

249. Wei, J., Shimazu, J., Makinistoglu, M. P., Maurizi, A. & Karsenty, G. Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **161**, 1576–1591 (2015).

250. Ducy, P. Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology. *Developmental Dynamics* **219**, 461–471 (2000).

251. Niida, A. *et al.* DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the β-catenin/TCF pathway. *Oncogene* **23**, 8520–8526 (2004).

252. Na, H. K. & Surh, Y. J. Oncogenic potential of Nrf2 and its principal target protein heme oxygenase-1. *Free Radical Biology and Medicine* **67**, 353–365 (2014).

253. Lin, C.-W., Shen, S.-C., Hou, W.-C., Yang, L.-Y. & Chen, Y.-C. Heme oxygenase-1 inhibits breast cancer invasion via suppressing the expression of matrix metalloproteinase-9. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1195–1206 (2008).

254. Liny, C. W., Shen, S. C., Ko, C. H., Lin, H. Y. & Chen, Y. C. Reciprocal activation of macrophages and breast carcinoma cells by nitric oxide and colony-stimulating factor-1. *Carcinogenesis* **31**, 2039–2048 (2010).

255. Lee, W. Y. *et al.* The induction of heme oxygenase-1 suppresses heat shock protein 90 and the proliferation of human breast cancer cells through its byproduct carbon monoxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **274**, 55–62 (2014).

256. Suzuki, Y. *et al.* Role of antioxidant systems in human androgen-independent prostate cancer cells. *Prostate* **43**, 144–149 (2000).

Anexo I

Anexo I- Listas de las proteínas detectadas por espectrometría de masa en los distintos MC, indicando el código y nombre de la proteína, número de péptidos detectados (#Péptidos), el porcentaje de cobertura que representan los péptidos detectados para cada proteína y el número de coincidencias del espectro peptídico (*Peptide spectrum match*; PSMs).

MC de PC3 contra base de datos de proteínas humanas				
Código	**Nombre**	**Cobertura**	**#Péptidos**	**# PSMs**
P60709	Actin, cytoplasmic 1	15.2	3	4
Q9C0C7	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	3.081664099	1	1
A0A1B0GUM2	ADAMTS-like protein 1 (Fragment)	33.07086614	1	2
P08697	Alpha-2-antiplasmin	2.240325866	1	2
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	7.084468665	3	4
P01023	Alpha-2-macroglobulin	0.678426052	1	1
J3KMX3	Alpha-fetoprotein	3.697749196	2	4
B0YIW2	Apolipoprotein C-III	13.67521368	1	1
Q9Y223	Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase	6.232686981	1	1
Q9NYQ7	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	1.268115942	1	1
P39060	Collagen alpha-1(XVIII) chain	2.394526796	1	1
P05997	Collagen alpha-2(V) chain	3.53569046	1	1
P01024	Complement C3	1.322910403	2	2
C9JPR7	C-type lectin domain family 5 member A	16.77419355	1	6
E5RIG2	CUB and sushi domain-containing protein 1	0.897615708	1	1
Q96JH7	Deubiquitinating protein VCIP135	3.273322422	1	1
Q12882	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	4	1	1
P38935	DNA-binding protein SMUBP-2	2.014098691	1	1
Q96M86	Dynein heavy chain domain-containing protein 1	0.547022933	1	1
A8MZ36	Envoplakin-like protein	8.970099668	1	2
A0A087WUF6	Fibroblast growth factor	15.625	1	3

P23142	Fibulin-1	1.706970128	1	1
P09972	Fructose-bisphosphate aldolase C	12.08791209	1	1
Q96RW7	Hemicentin-1	0.124223602	1	1
P69905	Hemoglobin subunit alpha	31.69014085	4	6
P02042	Hemoglobin subunit delta	6.802721088	1	3
Q9Y294	Histone chaperone ASF1A	20.09803922	1	1
A0A0U1RRH7	Histone H2A	5.294117647	1	1
Q96L73	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific	0.704747774	1	2
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	5.708245243	3	4
P15260	Interferon gamma receptor 1	7.566462168	1	1
P13232	Interleukin-7	20.33898305	1	1
Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial	4.150197628	1	1
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	1.444622793	1	1
Q9ULI4	Kinesin-like protein KIF26A OS=Homo sapiens GN=KIF26A PE=1 SV=3	1.753453773	1	4
P01042	Kininogen-1	1.397515528	1	1
P02788	Lactotransferrin	2.957746479	2	3
P02788	Lactotransferrin OS=Homo sapiens GN=LTF PE=1 SV=6	1.267605634	1	1
Q6ZRR7	Leucine-rich repeat-containing protein 9	2.615278734	1	1
Q496Y0	LON peptidase N-terminal domain and RING finger protein 3	6.060606061	1	4
P13640	Metallothionein-1G	19.35483871	1	1
O75121	Microfibrillar-associated protein 3-like	9.7799511	1	1
Q9UKN1	Mucin-12	3.431909456	1	1
Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	7.855626327	1	1
O75376	Nuclear receptor corepressor 1	1.639344262	1	1
Q9Y4A9	Olfactory receptor 10H1	12.89308176	1	1
O43511	Pendrin	6.025641026	1	2
Q15063	Periostin	2.272727273	1	1

P36955	Pigment epithelium-derived factor	3.349282297	1	1
P00747	Plasminogen	3.209876543	1	2
Q96KK3	Potassium voltage-gated channel subfamily S member 1	6.653992395	1	1
P20742	Pregnancy zone protein	0.809716599	1	1
Q9Y6V0	Protein piccolo	0.17769003	1	1
A0A075B6Z2	Protein TRAJ56 (Fragment)	38.0952381	1	1
A0A1B0GUI2	Protein ZC3H11B	5.061728395	1	11
P00734	Prothrombin	1.446945338	1	1
Q9Y5H5	Protocadherin alpha-9	1.263157895	1	1
M0QZ15	Ras and Rab interactor-like protein (Fragment)	66.66666667	1	1
Q9NQL2	Ras-related GTP-binding protein D	4.25	1	1
Q92766	Ras-responsive element-binding protein 1	2.311796088	1	1
O75679	Ret finger protein-like 3	11.35646688	1	1
Q16799	Reticulon-1	5.025773196	1	1
O94788	Retinal dehydrogenase 2	5.405405405	1	1
P02753	Retinol-binding protein 4	4.975124378	1	1
Q96D59	RING finger protein 183	23.4375	1	1
Q7Z7L1	Schlafen family member 11	4.10654828	1	1
P02768	Serum albumin	8.866995074	6	23
A0A0J9YW36	Stathmin-3 (Fragment)	12.13389121	1	1
Q7RTR8	Taste receptor type 2 member 42	10.82802548	1	2
Q96N46	Tetratricopeptide repeat protein 14	3.506493506	1	1
Q9BUZ4	TNF receptor-associated factor 4	8.085106383	1	1
Q15361	Transcription termination factor 1	1.988950276	1	1
O94876	Transmembrane and coiled-coil domains protein 1	3.675344564	1	3
Q9Y6G1	Transmembrane protein 14A	28.28282828	1	1
Q9H330	Transmembrane protein 245	3.073545554	1	1

E7ETY2	Treacle protein	1.948924731	1	1
A0A140T9Z0	UDP-glucuronosyltransferase 2A1	5.483405483	1	1
P47901	Vasopressin V1b receptor	7.075471698	1	1
D6RF35	Vitamin D-binding protein	13.44537815	6	8
O95789	Zinc finger MYM-type protein 6	2.113207547	1	2
F8VY43	Zinc finger protein 385A (Fragment)	39.36170213	1	1

MC de Raw264.7 contra base de datos de proteínas humanas				
Código	Nombre	Cobertura	#Péptidos	# PSMs
O95264	5-hydroxytryptamine receptor 3B	8.616780045	1	1
F8WEY1	5'-nucleotidase domain-containing protein 2	21.62162162	1	1
P62736	Actin, aortic smooth muscle	13.52785146	5	6
P43353	Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1	8.760683761	1	1
H7C3J0	All-trans-retinol 13,14-reductase (Fragment)	11.02756892	1	1
P04217	Alpha-1B-glycoprotein	1.414141414	1	2
P08697	Alpha-2-antiplasmin	2.240325866	1	1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	6.811989101	3	3
P01023	Alpha-2-macroglobulin	2.917232022	4	8
J3KMX3	Alpha-fetoprotein	7.234726688	4	6
P01008	Antithrombin-III	3.448275862	2	2
B0YIW2	Apolipoprotein C-III	13.67521368	1	1
P61221	ATP-binding cassette sub-family E member 1	5.175292154	1	1
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	6.086956522	2	2
Q9H6W3	Bifunctional lysine-specific demethylase and histidyl-hydroxylase NO66	5.928237129	1	1
Q9NSI6	Bromodomain and WD repeat-containing protein 1	1.594827586	1	1
P49747	Cartilage oligomeric matrix protein	3.038309115	2	2
H0Y853	Cilia- and flagella-associated protein 44 (Fragment)	1.210898083	1	1
P53621	Coatomer subunit alpha OS=Homo sapiens GN=COPA PE=1 SV=2	2.532679739	1	1
Q6ZP82	Coiled-coil domain-containing protein 141	2.206896552	1	2
G5E971	Collagenase 3	8.588957055	1	1
P01024	Complement C3	2.224894768	4	5
C9JPR7	C-type lectin domain family 5 member A	16.77419355	1	6
Q9Y697	Cysteine desulfurase, mitochondrial	9.409190372	1	1

Q5TB30	DEP domain-containing protein 1A	5.548705302	1	1
Q5KSL6	Diacylglycerol kinase kappa OS=Homo sapiens GN=DGKK PE=1 SV=1	3.068450039	1	1
Q9BWF2	E3 ubiquitin-protein ligase TRAIP	5.330490405	1	1
P63132	Endogenous retrovirus group K member 113 Pol protein	3.765690377	1	1
P43004	Excitatory amino acid transporter 2	6.097560976	1	1
Q9NPI8	Fanconi anemia group F protein	9.893048128	1	1
Q96RD9	Fc receptor-like protein 5	4.298874104	1	1
P02751	Fibronectin	0.335289187	1	1
B1AHL2	Fibulin-1	5.963938974	3	3
O60353	Frizzled-6	4.249291785	1	1
Q9HCC8	Glycerophosphoinositol inositolphosphodiesterase GDPD2	8.163265306	1	3
H3BT70	Group XV phospholipase A2	54.65116279	1	1
K7ELA5	HEAT repeat-containing protein 6 (Fragment)	35.83333333	1	1
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	5.909797823	1	1
P69905	Hemoglobin subunit alpha	36.61971831	6	10
P02042	Hemoglobin subunit delta	6.802721088	1	3
P01344	Insulin-like growth factor II	5	1	1
P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	1.317233809	1	1
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	5.919661734	4	8
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	2.134831461	2	2
P13232	Interleukin-7	20.33898305	1	1
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	1.242236025	1	1
P01042	Kininogen-1	1.397515528	1	1
P02788	Lactotransferrin	7.323943662	3	6
Q6PKG0	La-related protein 1	1.277372263	1	1
J3QTJ5	Leucine-rich repeat-containing protein 37A3	5.186170213	1	1
Q496Y0	LON peptidase N-terminal domain and RING finger protein 3	6.060606061	1	4

P51884	Lumican	5.621301775	2	2
P13640	Metallothionein-1G	19.35483871	1	1
E7EVA0	Microtubule-associated protein	0.478885503	1	1
P80192	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9	1.992753623	1	1
P02686	Myelin basic protein	9.210526316	1	1
H0YA93	NEDD4-binding protein 2 (Fragment)	2.714285714	1	1
Q5JWQ4	Neuropilin-1	4.355108878	1	1
P14543	Nidogen-1	3.448275862	1	1
Q8NH51	Olfactory receptor 8K3	12.17948718	1	1
O43511	Pendrin	6.025641026	1	2
I1E4Y6	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	0.681302044	1	1
A6NMN0	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform	3.064516129	1	1
P36955	Pigment epithelium-derived factor	3.827751196	2	2
A0A1B0GW72	Pleckstrin homology domain-containing family G member 4B	1.10633067	1	1
Q9ULC8	Probable palmitoyltransferase ZDHHC8	4.836601307	1	1
Q9Y2G3	Probable phospholipid-transporting ATPase IF	3.398470688	1	1
Q0P651	Protein ABHD18	4.589371981	1	1
Q96I34	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 16A	4.356060606	1	1
Q9Y6V0	Protein piccolo	0.17769003	1	1
A0A1B0GUI2	Protein ZC3H11B	5.061728395	1	6
Q14289	Protein-tyrosine kinase 2-beta	0.89197225	1	1
P00734	Prothrombin	1.446945338	1	2
Q9Y5H5	Protocadherin alpha-9	1.263157895	1	1
Q58FF7	Putative heat shock protein HSP 90-beta-3	6.867671692	1	1
A0A087WT09	Putative pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 7	10.3286385	1	1
O75679	Ret finger protein-like 3	11.35646688	1	2
P02753	Retinol-binding protein 4	4.975124378	2	3

E7EV07	Rho guanine nucleotide exchange factor 4	0.495594714	1	1
Q9NZJ4	Sacsin	0.78619786	1	1
Q7Z7L1	Schlafen family member 11	4.10654828	1	1
A0A0U1RQQ9	SCY1-like protein 2	1.92926045	1	1
F8WBA3	Serine/threonine-protein kinase	4.347826087	1	1
Q9Y5S2	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	0.935125658	1	1
Q96PY6	Serine/threonine-protein kinase Nek1	2.861685215	1	1
Q96C45	Serine/threonine-protein kinase ULK4	2.980392157	1	1
P02768	Serum albumin	11.33004926	7	27
Q96N87	Sodium-dependent neutral amino acid transporter B(0)AT3	6.847133758	1	1
A4IF30	Solute carrier family 35 member F4	9.021113244	1	2
Q96L92	Sorting nexin-27	7.024029575	1	1
Q15772	Striated muscle preferentially expressed protein kinase	0.244872972	1	1
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	1.982097187	1	1
Q8WY91	THAP domain-containing protein 4	7.798960139	1	1
P07996	Thrombospondin-1	2.393162393	2	2
O75962	Triple functional domain protein	0.87181143	1	1
Q8NBM4	Ubiquitin-associated domain-containing protein 2	2.325581395	1	1
D6RF35	Vitamin D-binding protein	13.44537815	6	7
P04004	Vitronectin	3.765690377	1	1
O75717	WD repeat and HMG-box DNA-binding protein 1	3.277236492	1	1
Q9P2Y4	Zinc finger protein 219	6.094182825	1	1
F8WD42	Zinc finger protein 564	53.62318841	1	1
K7ERJ6	Zinc finger SWIM domain-containing protein 4 (Fragment)	5.122494432	1	1

MC de co-cultivo PC3/Raw264.7 contra base de datos de proteínas humanas				
Código	Nombre	Cobertura	#Péptidos	# PSMs
P62736	Actin, aortic smooth muscle	10.87533156	3	4
A0A1B0GUM2	ADAMTS-like protein 1 (Fragment)	33.07086614	1	3
Q6ZNB7	Alkylglycerol monooxygenase	9.213483146	1	2
P08697	Alpha-2-antiplasmin	2.240325866	1	1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	7.084468665	3	4
P01023	Alpha-2-macroglobulin	0.678426052	1	2
J3KMX3	Alpha-fetoprotein	7.234726688	5	6
Q8N2N9	Ankyrin repeat domain-containing protein 36B	2.36511456	1	1
P01008	Antithrombin-III	1.50862069	1	1
Q9NVP1	ATP-dependent RNA helicase DDX18	5.820895522	1	1
A0A0G2JS53	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1	2.352102637	1	1
Q9C0B6	BMP/retinoic acid-inducible neural-specific protein 2	4.342273308	1	1
Q8NCU4	Coiled-coil domain-containing protein 191	4.38034188	1	1
Q8IXS2	Coiled-coil domain-containing protein 65	2.066115702	1	1
C9JPR7	C-type lectin domain family 5 member A	16.77419355	1	3
E5RIG2	CUB and sushi domain-containing protein 1	0.897615708	1	1
Q13618	Cullin-3	5.078125	1	2
Q96JK2	DDB1- and CUL4-associated factor 5	4.564755839	1	1
A0A0U1RQJ2	Dystonin (Fragment)	2.329749104	1	1
G3V566	E3 ubiquitin-protein ligase RNF34	77.77777778	1	2
B5MBZ0	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	3.830645161	1	1
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2	2.375809935	1	1
Q8TBG4	Ethanolamine-phosphate phospho-lyase	8.817635271	1	1
C9JC84	Fibrinogen gamma chain	1.952277657	1	1

B1AHL2	Fibulin-1	1.248266297	1	1
O60353	Frizzled-6 OS=Homo sapiens GN=FZD6 PE=1 SV=2	4.249291785	1	1
Q9HCC8	Glycerophosphoinositol inositolphosphodiesterase GDPD2	8.163265306	1	3
P69905	Hemoglobin subunit alpha	31.69014085	4	5
P02042	Hemoglobin subunit delta	6.802721088	1	2
A0A0U1RRH7	Histone H2A	5.294117647	1	1
Q96L73	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific	0.704747774	1	1
P01767	Immunoglobulin heavy variable 3-53	40.51724138	1	1
O00629	Importin subunit alpha-3	5.56621881	1	1
P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	1.317233809	1	1
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	5.708245243	3	3
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	3.146067416	1	1
Q7Z3Y8	Keratin, type I cytoskeletal 27	8.932461874	1	1
P01042	Kininogen-1	1.397515528	1	1
P02788	Lactotransferrin	2.957746479	2	3
Q8IXW0	Lamin tail domain-containing protein 2	5.205047319	1	1
Q496Y0	LON peptidase N-terminal domain and RING finger protein 3	6.060606061	1	4
P51884	Lumican	4.437869822	1	1
Q14416	Metabotropic glutamate receptor 2	4.243119266	1	1
P13640	Metallothionein-1G	19.35483871	1	1
Q9UH03	Neuronal-specific septin-3	12.29050279	1	1
A6NGQ3	Obscurin	0.302588815	1	1
Q9GZM6	Olfactory receptor 8D2	12.86173633	1	1
O43511	Pendrin	6.025641026	1	3
P00747	Plasminogen	3.209876543	1	1
Q14667	Protein KIAA0100	1.744966443	1	1
A0A1B0GUI2	Protein ZC3H11B	5.061728395	1	4

P00734	Prothrombin	1.446945338	1	1
Q9Y5H5	Protocadherin alpha-9	1.263157895	1	1
Q92766	Ras-responsive element-binding protein 1	2.311796088	1	1
Q92729	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase U	2.14384509	1	1
Q8NFJ5	Retinoic acid-induced protein 3	10.6442577	1	1
P02753	Retinol-binding protein 4	4.975124378	1	1
A0A096LNW2	SCO-spondin	0.796116505	1	1
P02768	Serum albumin	8.866995074	6	18
A0A0C4DG86	Syntabulin	5.239520958	1	1
Q96N46	Tetratricopeptide repeat protein 14	3.506493506	1	1
Q6PKC3	Thioredoxin domain-containing protein 11	3.147208122	1	1
P07996	Thrombospondin-1	2.393162393	2	2
O94876	Transmembrane and coiled-coil domains protein 1	3.675344564	1	1
P00749	Urokinase-type plasminogen activator	3.016241299	1	1
D6RF35	Vitamin D-binding protein	12.81512605	4	5
P15313	V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform	6.237816764	1	1
Q6P3V2	Zinc finger protein 585A	5.201560468	1	1

MC de PC3 contra base de datos de proteínas murinas				
Código	**Nombre**	**Cobertura**	**#Péptidos**	**# PSMs**
P60710	Actin, cytoplasmic 1	15.2	3	4
G3X920	Armadillo repeat containing 8, isoform CRA_b	3.863298663	1	1
B2RY50	Armadillo repeat-containing protein 4	3.085824494	1	1
Q9CXJ4	ATP-binding cassette sub-family B member 8, mitochondrial	3.905160391	1	1
Q6PAL0	BEN domain-containing protein 3	4.727272727	1	2
A8DUK4	Beta-globin	6.802721088	1	2
Q3UW64	Bifunctional UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase	5.976095618	1	1
B2RQC6	CAD protein	2.06741573	1	1
Q91ZI0	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	1.272341715	1	1
P10287	Cadherin-3	4.622871046	1	2
F8WHE1	Calcium-binding protein 8	12.64367816	1	1
Q8K389	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2	1.427003293	1	1
Q6ZQ06	Centrosomal protein of 162 kDa	0.712758375	1	1
Q08EB6	CLIP associating protein 2	3.651903652	1	1
E9Q1U1	Coiled-coil domain-containing protein 171	2.265861027	1	1
Q6PDM4	Coiled-coil domain-containing protein 36	5.574912892	1	1
K3W4R4	Collagen alpha-1(XIV) chain	2.057842047	1	1
Q923L3	CUB and sushi domain-containing protein 1	0.897867565	1	1
Q6ZPV2	DNA helicase INO80	2.501603592	1	1
Q9WVF7	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	1.620674551	1	2
Q8BFV3	Dual specificity protein phosphatase 4	10.30150754	1	1
Q3TQC7	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	8.185840708	1	1
Q08879	Fibulin-1	1.70212766	1	1
P63080	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-3	8.033826638	1	1
Q9D8T2	Gasdermin-D	8.41889117	1	1

Q9DCZ1	GMP reductase 1	11.88405797	1	1
D3YXG0	Hemicentin-1	0.124245651	1	1
P01942	Hemoglobin subunit alpha	14.08450704	2	4
Q9CQE6	Histone chaperone ASF1A	20.09803922	1	1
P27661	Histone H2AX	6.293706294	1	1
O35085	Homeobox protein ARX	5.496453901	1	1
G3X977	Inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	2.842105263	3	4
E9Q0J3	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	6.220095694	1	1
Q9D140	Kallikrein 1-related peptidase b5	7.508532423	1	1
A0A0R4J038	Kininogen-1	1.361573374	1	1
F7CPA3	Long-chain fatty acid transport protein 3 (Fragment)	5.845181675	1	1
Q9Z1R9	MCG124046	8.130081301	1	1
P02798	Metallothionein-2	19.67213115	1	1
Q9D3X9	Microfibrillar-associated protein 3-like	9.7799511	1	1
Q99K48	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	7.822410148	1	1
Q9ERH4	Nucleolar and spindle-associated protein 1	3.044496487	1	1
F7CWV4	Olfactory receptor	2.388059701	1	1
Q8R2Y8	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	17.12707182	1	1
Q62009	Periostin	2.267303103	1	1
P97298	Pigment epithelium-derived factor	3.357314149	1	1
P20918	Plasminogen	3.201970443	1	2
Q3UZ24	Protein Apol7e	10.29810298	1	1
E9Q035	Protein Gm20425	0.920245399	1	1
A0A0N4SUS7	Protein Gm35549	22.69503546	1	2
V9GX81	Protein Mroh6	1.108033241	1	1
Q9QYX7	Protein piccolo	0.177584846	1	1
Q811G0	Protein PTHB1	4.858757062	1	1

E9PX29	Protein Sptbn4	1.483795392	1	1
A0A0G2JGV5	Protein Tcrg-V5 (Fragment)	20.3539823	1	1
B1AWT3	Ras-related GTP-binding protein D	3.744493392	1	1
Q9D4G9	RecQ-mediated genome instability protein 1	4.707792208	1	3
A0A0R4J0H3	Retinol-binding protein 3	3.808752026	1	1
P07724	Serum albumin	7.236842105	2	11
P52633	Signal transducer and transcription activator 6	5.13739546	1	1
Q80TE4	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2	2.032520325	1	3
G3X909	Slit homolog 2 protein	3.642773208	1	1
F7D5X7	snRNA-activating protein complex subunit 4 (Fragment)	2.755905512	1	1
E9QMN8	Solute carrier family 15 member 2	6.081081081	1	1
Q3UHA3	Spatacsin	1.687242798	1	1
G3UVU5	TBC1 domain family member 14	5.882352941	1	1
Q8BKI2	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein	1.546961326	1	1
P38585	Tubulin--tyrosine ligase	7.427055703	1	1
O54818	Tumor protein D53	19.60784314	1	1
Q9WU02	Vasopressin V1b receptor	7.125890736	1	1
P21614	Vitamin D-binding protein	1.680672269	1	1

MC de Raw264.7 contra base de datos de proteínas murinas				
Código	**Nombre**	**Cobertura**	**#Péptidos**	**# PSMs**
Q3TXS7	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	4.616998951	1	4
G5E8U5	28S ribosomal protein S10, mitochondrial	7.960199005	1	1
P62737	Actin, aortic smooth muscle	13.52785146	5	6
E9Q921	AF4/FMR2 family member 1	3.181076672	1	1
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	2.028985507	1	1
Q6GQT1	Alpha-2-macroglobulin-P	0.881953867	1	1
P00687	Alpha-amylase 1	8.219178082	1	1
Q3V0J4	Ankyrin repeat domain-containing protein 53	3.822937626	1	1
P32261	Antithrombin-III	2.150537634	1	1
B2RY50	Armadillo repeat-containing protein 4	3.085824494	1	2
Q9CXJ4	ATP-binding cassette sub-family B member 8, mitochondrial	3.905160391	1	1
P61222	ATP-binding cassette sub-family E member 1	5.175292154	1	1
Q6PAL0	BEN domain-containing protein 3	4.727272727	1	2
A8DUK4	Beta-globin	6.802721088	1	2
P20722	Bone morphogenetic protein 6	8.039215686	1	1
P10287	Cadherin-3	4.622871046	1	1
F8WIS9	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	5.112474438	1	1
Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein	3.046357616	2	2
P10605	Cathepsin B	8.849557522	2	2
Q8CB62	Centrobin	5.186020293	1	1
Q6ZQ06	Centrosomal protein of 162 kDa	0.712758375	1	4
Q8BT07	Centrosomal protein of 55 kDa	5.411255411	1	1
Q58A65	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	3.028009084	1	1
K3W4R4	Collagen alpha-1(XIV) chain	2.057842047	1	4
P01027	Complement C3	1.322910403	2	2

P01029	Complement C4-B	2.47410817	1	1
Q6A070	Crescerin-1	1.689189189	1	1
P12790	Cytochrome P450 2B9	8.757637475	1	1
A2A9M4	Dedicator of cytokinesis protein 7	0.751173709	1	1
Q9QXT1	Dual adapter for phosphotyrosine and 3-phosphotyrosine and 3-phosphoinositide	13.92857143	1	1
Q9WV66	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH7	6.493506494	1	1
Q8BHR2	Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1	6.220839813	1	1
Q3UFM6	Expressed sequence 2 embryonic lethal, isoform CRA_a	2.5	1	1
P11276	Fibronectin	0.322971336	1	1
Q08879	Fibulin-1	4.397163121	2	2
E9PUU4	Gem-associated protein 5	0.465735196	1	1
Q6PAR5	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1	2.743484225	1	1
Q9R0C8	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	1.889020071	1	1
P01942	Hemoglobin subunit alpha	19.01408451	3	6
O88904	Homeodomain-interacting protein kinase 1	1.73553719	1	1
E9QLW5	Insulin-like growth factor II	4.712041885	1	1
G3X977	Inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	6.421052632	6	8
Q61704	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	3.149606299	3	3
E9Q0J3	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	6.220095694	1	1
B9EKS2	Jumonji domain containing 1B	2.043132804	1	1
Q99PS0	Keratin, type I cytoskeletal 23	8.767772512	1	1
A0A0R4J038	Kininogen-1	1.361573374	1	1
Q3YAB3	Kv channel-interacting protein 2	9.62962963	1	1
P51885	Lumican	5.621301775	2	2
Q9Z1R9	MCG124046	8.130081301	1	1
P02798	Metallothionein-2	19.67213115	1	1
P10404	MLV-related proviral Env polyprotein	1.248049922	1	1

P10810	Monocyte differentiation antigen CD14	4.918032787	1	1
Q9EQA0	Olfactory receptor	12.33766234	1	1
F8WIP8	Osteopontin	8.13559322	2	2
Q9Z0K8	Pantetheinase	2.5390625	1	2
Q8R2Y8	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	17.12707182	1	1
Q99LC9	Peroxisome assembly factor 2	3.873598369	1	1
Q6Y7W8	PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2	0.697134005	1	1
P55065	Phospholipid transfer protein	7.505070994	1	1
Q6DFW5	Phospholipid-transporting ATPase	3.404255319	1	1
A2AI87	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform	3.062046737	1	1
P97298	Pigment epithelium-derived factor	5.755395683	2	2
B2RXA1	PI-PLC X domain-containing protein 2	12.35294118	1	1
Q61838	Pregnancy zone protein	0.602006689	1	1
Q9DBA8	Probable imidazolonepropionase	11.03286385	1	1
Q6PEB4	Probable tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase, mitochondrial	5.555555556	1	2
P70398	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X	1.524032825	1	1
B8JJE0	Protein Adgrv1	0.651000318	1	1
E9Q6D8	Protein C6	4.726100967	1	1
G3UZ45	Protein Gm19684	35.04273504	1	2
E9Q035	Protein Gm20425	0.920245399	1	2
A0A0N4SVU1	Protein Gm7298	0.54200542	1	1
A0A0A6YY69	Protein Ighv2-5 (Fragment)	7.75862069	1	1
V9GX81	Protein Mroh6	1.108033241	1	1
Q8CGA0	Protein phosphatase 1F	9.07079646	1	1
Q9QYX7	Protein piccolo	0.177584846	1	1
E9PZ36	Protein Pkhd1	0.83764474	1	1
Q811G0	Protein PTHB1	4.858757062	1	3

E9Q6E5	Protein Srsf11	7.436399217	1	1
E9Q6R7	Protein Utrn	1.137026239	1	1
K7N608	Protein Vmn1r78	13.09904153	1	1
E9PY92	Protein Vmn2r106	4.75638051	1	1
Q9QVP9	Protein-tyrosine kinase 2-beta	0.89197225	1	1
Q91W97	Putative hexokinase HKDC1	2.513661202	1	1
P52480	Pyruvate kinase PKM	5.27306968	1	1
Q99NF8	Ran-binding protein 17	3.584558824	1	1
A0A0R4J0H3	Retinol-binding protein 3	3.808752026	1	4
H3BLA9	Sentrin-specific protease 6 (Fragment)	12.74509804	1	1
Q7TT50	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	0.934033859	1	1
Q9QY01	Serine/threonine-protein kinase ULK2	3.953712633	1	3
P07724	Serum albumin	7.236842105	3	9
Q99MR3	Solute carrier family 12 member 9	4.266958425	1	1
Q8VC69	Solute carrier family 22 member 6	8.073394495	1	1
A0A1B0GRL6	Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (Fragment)	51.85185185	1	1
E9QQ25	Striated muscle-specific serine/threonine-protein kinase	0.245248314	1	1
Q5SS91	SUN domain-containing protein 3	11.875	1	1
G3UVU5	TBC1 domain family member 14	5.882352941	1	4
Q80YQ1	Thrombospondin 1	2.391118702	2	2
Q9Z1T2	Thrombospondin-4	1.973001038	2	2
Q9R1C0	Transcription initiation factor TFIID subunit 7	10.26392962	1	1
Q32NZ6	Transmembrane channel-like protein 5	1.344364012	1	1
Q0KL02	Triple functional domain protein	0.87040619	1	1
P38585	Tubulin--tyrosine ligase	7.427055703	1	1
Q8R1K1	Ubiquitin-associated domain-containing protein 2	2.31884058	1	1
Q6GQU0	UPF0524 protein C3orf70 homolog	11.69354839	1	1

Q8VHI5	Vitrin	4.769230769	1	1
O88939	Zinc finger and BTB domain-containing protein 7A	4.569420035	1	1

MC de co-cultivo PC3/Raw264.7 contra base de datos de proteínas murinas				
Código	Nombre	Cobertura	#Péptidos	# PSMs
P62737	Actin, aortic smooth muscle	10.87533156	3	4
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	2.028985507	1	1
P32261	Antithrombin-III	1.505376344	1	1
G3X920	Armadillo repeat containing 8, isoform CRA_b	3.863298663	1	1
Q91YH6	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit B1	6.237816764	1	1
Q6PAL0	BEN domain-containing protein 3	4.727272727	1	2
A8DUK4	Beta-globin	6.802721088	1	3
B2RQC6	CAD protein	2.06741573	1	1
P10287	Cadherin-3	4.622871046	1	1
Q3UZA1	CapZ-interacting protein	10.4368932	1	1
Q6ZQ06	Centrosomal protein of 162 kDa	0.712758375	1	2
A2A7F6	Chloride channel protein	4.925544101	1	1
K3W4R4	Collagen alpha-1(XIV) chain	2.057842047	1	2
P01027	Complement C3	0.962116657	1	1
O54991	Contactin-associated protein 1	2.454873646	1	1
Q62266	Cornifin-A	25	1	1
Q923L3	CUB and sushi domain-containing protein 1	0.897867565	1	1
Q9JLV5	Cullin-3	5.078125	1	2
P61460	DEP domain-containing protein 5	2.011313639	1	1
Q9WVF7	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A	1.620674551	1	1
G5E911	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 176, expressed, isoform CRA_f	12.14574899	1	1
H7BX01	Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial	4.294478528	1	1
Q4U2R1	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	0.992555831	1	1
F8WJ93	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	3.846153846	1	1

Q3TQC7	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	8.185840708	1	1
Q3TQC7	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	8.185840708	1	1
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	2.375809935	1	1
Q8BGB7	Enolase-phosphatase E1	16.34241245	1	1
A0A140LJB0	Espin OS=Mus musculus GN=Espn PE=1 SV=1	1.921708185	1	1
Q3UER8	Fibrinogen gamma chain	2.031602709	1	1
E9PUU4	Gem-associated protein 5	0.465735196	1	1
A2AEW8	GRIP1-associated protein 1 OS=Mus musculus GN=Gripap1 PE=1 SV=1	3.464755078	1	1
Q14AA6	GTP-binding nuclear protein Ran	19.90740741	1	1
P01942	Hemoglobin subunit alpha	14.08450704	2	4
P27661	Histone H2AX	6.293706294	1	1
G3X977	Inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2	3.894736842	3	3
Q61704	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	4.161979753	2	2
E9Q0J3	Interferon-induced GTP-binding protein Mx1	6.220095694	1	2
Q922U2	Keratin, type II cytoskeletal 5	8.448275862	1	1
A0A0R4J038	Kininogen-1	1.361573374	1	1
P51885	Lumican	4.437869822	1	1
Q9Z1R9	MCG124046	8.130081301	1	1
P02798	Metallothionein-2	19.67213115	1	1
Q9ERH4	Nucleolar and spindle-associated protein 1	3.044496487	1	1
Q8VFW9	Olfactory receptor	13.37579618	1	1
Q9Z0K8	Pantetheinase	2.5390625	1	1
Q8R2Y8	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	17.12707182	1	1
P97298	Pigment epithelium-derived factor	2.398081535	1	1
P20918	Plasminogen	3.201970443	1	1
Q9DBA8	Probable imidazolonepropionase	11.03286385	1	1
E9Q035	Protein Gm20425	0.920245399	1	1

J3KMK0	Protein Gm9923	6.209150327	1	1
E9PY46	Protein Ift140	3.073770492	1	1
Q5SYL3	Protein KIAA0100	1.745747538	1	1
V9GX81	Protein Mroh6	1.108033241	1	1
Q811G0	Protein PTHB1	4.858757062	1	1
A0A0R4J0H3	Retinol-binding protein 3	3.808752026	1	4
Q8R1F9	Ribonuclease P protein subunit p40	9.917355372	1	1
Q99MQ3	Serine/threonine-protein kinase PINK1, mitochondrial	6.896551724	1	1
P07724	Serum albumin	2.138157895	1	9
F7D5X7	snRNA-activating protein complex subunit 4 (Fragment)	2.755905512	1	1
Q8VC69	Solute carrier family 22 member 6	8.073394495	1	1
V9GXT1	Striatin-4 (Fragment)	16.88888889	1	1
G3UVU5	TBC1 domain family member 14	5.882352941	1	4
Q80YQ1	Thrombospondin 1	2.391118702	2	2
Q8CA03	Thymic stromal cotransporter protein	8.977035491	1	1
F6QG91	Transcription factor Dp-2	11.39896373	1	1
Q3UFJ6	Transmembrane protein 184A	9.411764706	1	1
P38585	Tubulin--tyrosine ligase	7.427055703	1	1
Q8BGB8	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial	5.263157895	1	1

Anexo II

GC(Carbamidomethyl)ALKDKPGVYTR					
MH^{+1}(av)	MH^{+1}(mono)	MH^{+2}(av)	MH^{+2}(mono)	MH^{+3}(av)	MH^{+3}(mono)
1465.7249	1464.7628	733.3662	732.885	489.2466	488.9258

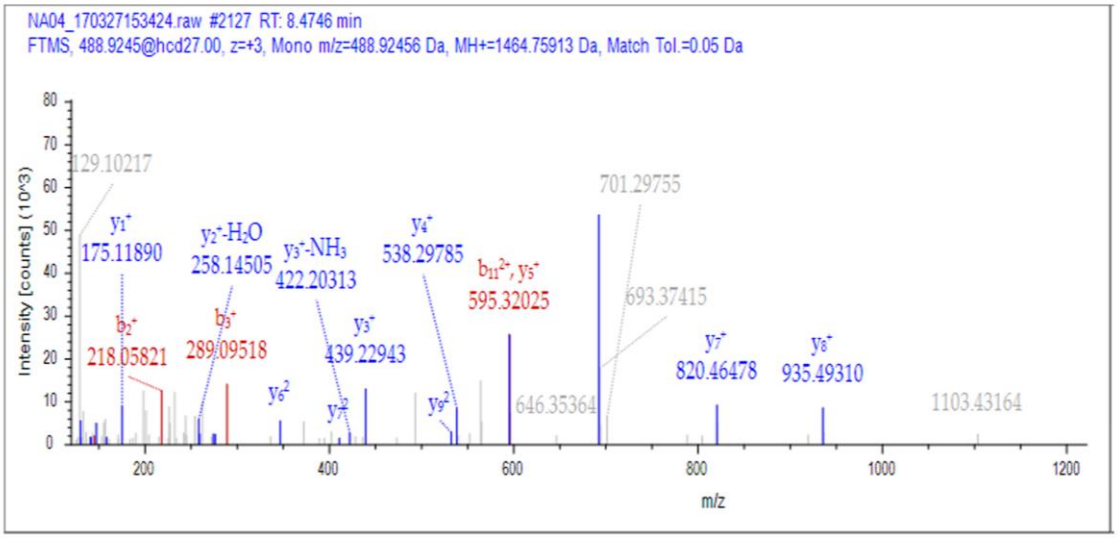
#1	b^{-}	b^{2-}	Seq.	y^{-}	y^{2-}	#2
1			G			13
2	218.05939		C-Carbamidomethyl	1407.74130	704.37429	12
3	289.09650		A	1247.71065	624.35896	11
4	402.18057		L	1176.67353	588.84040	10
5	530.27553	265.64140	K	1063.58947	532.29837	9
6	645.30247	323.15487	D	935.49451	468.25089	8
7	773.39744	387.20236	K	820.46756	410.73742	7
8	870.45020	435.72874	P	692.37260	346.68994	6
9	927.47166	464.23947	G	595.31984	298.16356	5
10	1026.54008	513.77368	V	538.29837	269.65282	4
11	1189.60341	595.30534	Y	439.22996	220.11862	3
12	1290.65108	645.82918	T	276.16663	138.58695	2
13			R	175.11895	88.06311	1

Tabla 1- Espectro de fragmentación teórico para el péptido humano (en color se marcan los fragmentos que se observan experimentalmente)

GC(Carbamidomethyl)AEKNKPGVYTR			
MH^{+1}(av)	MH^{+1}(mono)	MH^{+2}(av)	MH^{+2}(mono)
1480.6959	1479.7373	740.8517	740.3723

#1	b^{-}	b^{2-}	Seq.	y^{-}	y^{2-}	#2
1	---	---	G	---	---	13
2	218.0594	---	C(Carbamidomethyl)	1422.7158	711.8615	12
3	289.0965	---	A	1262.6852	631.8462	11
4	418.1391	---	E	1191.648	596.3277	10
5	546.2341	273.6207	K	1062.6055	531.8064	9
6	660.277	330.6421	N	934.5105	467.7589	8
7	788.3719	394.6896	K	820.4676	410.7374	7
8	885.4247	443.216	P	692.3726	346.6899	6
9	942.4462	471.7267	G	595.3198	298.1636	5
10	1041.5146	521.2609	V	538.2984	269.6528	4
11	1204.5779	602.7926	Y	439.23	220.1186	3
12	1305.6256	653.3164	T	276.1666	138.587	2
13	---	---	R	175.119	88.0631	1

Tabla 2- Espectro de fragmentación teórico para el péptido murino (en color se marcan los fragmentos que se observan experimentalmente)



Espectro 1- Espectro experimental que coincide con péptido de PLAU humana. Se pintan en rojo y azul los fragmentos de las series y y b que coinciden con los teóricos esperados