



**Universidad de Buenos Aires**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Polimorfismos genéticos y estrategias terapéuticas  
emergentes en cáncer de próstata**

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

**Bioquímico Gastón Mario Pascual**

Directora de Tesis: Dra. Geraldine Gueron

Directora Adjunta: Dra. Ayelén Toro

Consejera de estudios: Dra. Edith Kordon

Laboratorio de Inflamación y Cáncer

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

IQUIBICEN-CONICET

Buenos Aires, 2025

# ÍNDICE

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN                                                                 | 1  |
| PARTE I                                                                 | 1  |
| PARTE II                                                                | 2  |
| ABSTRACT                                                                | 4  |
| PART I                                                                  | 4  |
| PART II                                                                 | 5  |
| PUBLICACIONES                                                           | 7  |
| AGRADECIMIENTOS                                                         | 8  |
| ABREVIATURAS                                                            | 12 |
| INTRODUCCIÓN                                                            | 18 |
| 1. LA PRÓSTATA                                                          | 18 |
| 1.i CARACTERÍSTICAS GENERALES Y FUNCIÓN                                 | 18 |
| 1.ii ANATOMÍA E HISTOLOGÍA                                              | 18 |
| 1.iii REGULACIÓN HORMONAL                                               | 20 |
| 2. CÁNCER DE PRÓSTATA                                                   | 22 |
| 2.i CARACTERÍSTICAS GENERALES                                           | 22 |
| 2.ii EPIDEMIOLOGÍA                                                      | 22 |
| 2.iii ETIOLOGÍA                                                         | 23 |
| 2.iv DIAGNÓSTICO                                                        | 24 |
| 2.v TRATAMIENTO                                                         | 27 |
| 2.vi PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA Y ROL DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS | 29 |
| 2.vii POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA                     | 30 |
| 2.vi.a. POLIMORFISMOS EN EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS                      | 30 |
| 2.vi.b. POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA REPARACIÓN DEL ADN   | 31 |
| 2.viii METÁSTASIS ÓSEA                                                  | 32 |
| 2.ix HALLMARKS DEL CÁNCER Y CÁNCER DE PRÓSTATA                          | 35 |
| 2.ix.a HALLMARKS DEL CÁNCER                                             | 35 |
| 2.ix.b METABOLISMO TUMORAL                                              | 36 |
| 2.ix.b.i METABOLISMO PROSTÁTICO FISIOLÓGICO Y TUMORAL                   | 37 |
| 3. HEMO OXIGENASA-1                                                     | 39 |
| 3.i ACTIVIDAD CANÓNICA DE HEMO OXIGENASA-1                              | 39 |
| 3.ii HO-1 Y SU ROL EN EL CÁNCER                                         | 40 |
| 4. MONÓXIDO DE CARBONO                                                  | 42 |
| 4.i FISIOLÓGÍA DEL MONÓXIDO DE CARBONO                                  | 42 |
| 4.ii MOLÉCULAS LIBERADORAS DE MONÓXIDO DE CARBONO (CO-RMs)              | 44 |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.iii MONÓXIDO DE CARBONO Y CO-RMs COMO AGENTES TERAPÉUTICOS                           | 46 |
| 4.iii.a MONÓXIDO DE CARBONO Y CO-RMs COMO AGENTES TERAPÉUTICOS EN<br>CÁNCER            | 47 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS                                                                  | 49 |
| PARTE I                                                                                | 49 |
| HIPÓTESIS                                                                              | 49 |
| OBJETIVO GENERAL                                                                       | 49 |
| PARTE II                                                                               | 50 |
| HIPÓTESIS                                                                              | 50 |
| OBJETIVO GENERAL                                                                       | 50 |
| MATERIALES y MÉTODOS                                                                   | 51 |
| 1. CULTIVO CELULAR                                                                     | 51 |
| 1.i LÍNEAS CELULARES                                                                   | 51 |
| 1.ii TRATAMIENTOS                                                                      | 51 |
| 1.iii CO-CULTIVO INDIRECTO ENTRE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA Y<br>PROGENITORES ÓSEOS | 52 |
| 2. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE CO                                                          | 53 |
| 2.i ENSAYO DE MIOGLOBINA                                                               | 53 |
| 2.ii ENSAYO DE HEMOCD1                                                                 | 53 |
| 3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA                                                        | 54 |
| 3.i PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL                                                          | 54 |
| 3.ii TRATAMIENTO CON ADNasa                                                            | 55 |
| 3.iii RETROTRANSCRIPCIÓN                                                               | 55 |
| 3.iv PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)                                         | 55 |
| 4. VIABILIDAD CELULAR                                                                  | 57 |
| 5. MEDICIÓN DE ATP                                                                     | 57 |
| 6. ENSAYO DE ADHESIÓN                                                                  | 58 |
| 7. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR                                                         | 58 |
| 8. ACTIVIDAD DE LACTATO DESHIDROGENASA                                                 | 58 |
| 8.i ENSAYO ENZIMÁTICO                                                                  | 58 |
| 8.ii DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES                            | 59 |
| 9. MEDICIÓN DE PARÁMETROS MITOCONDRIALES                                               | 59 |
| 9.i NÚMERO DE COPIAS DE ADN MITOCONDRIAL                                               | 60 |
| 9.i.a EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL                                                          | 60 |
| 9.i.a CUANTIFICACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL MEDIANTE RT-qPCR                             | 60 |
| 9.ii MASA MITOCONDRIAL TOTAL                                                           | 61 |
| 9.iii POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL                                               | 61 |
| 10. ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO                                         | 62 |
| 11. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LACTATO INTRACELULAR                                    | 62 |
| 12. ENSAYO METABÓLICO SEAHORSE                                                         | 63 |

|                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 13. ENSAYO DE HANGING DROP                                                                                                                           | 63  |
| 14. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS                                                                                                                  | 64  |
| 15. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES                                                                                                                | 64  |
| 16. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LÍNEA GERMINAL                                                                                                     | 64  |
| 17. GENOTIPIFICACIÓN                                                                                                                                 | 66  |
| 17.i GENOTIPIFICACIÓN DE AR (CAG) <sub>n</sub>                                                                                                       | 67  |
| 17.ii GENOTIPIFICACIÓN DE APEX1 c.444T>G                                                                                                             | 67  |
| 18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO                                                                                                                             | 68  |
| RESULTADOS                                                                                                                                           | 70  |
| PARTE I: EFECTO DE LAS CO-RMs EN LA CARCINOGENESIS PROSTÁTICA                                                                                        | 70  |
| 1. CONFIRMACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO POR PARTE DE LAS CO-RMs                                                                      | 70  |
| 2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CO-RMs SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA                                                  | 72  |
| 3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CO-RMs SOBRE PROCESOS BIOLÓGICOS RELEVANTES EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA                                         | 73  |
| 3.i PROLIFERACIÓN CELULAR                                                                                                                            | 73  |
| 3.ii ANGIOGÉNESIS                                                                                                                                    | 73  |
| 3.iii ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR                                                                                                                   | 74  |
| 3.iv ESTRÉS OXIDATIVO                                                                                                                                | 77  |
| 3.v METABOLISMO                                                                                                                                      | 79  |
| 3.vi CARACTERÍSTICAS <i>STEM-LIKE</i>                                                                                                                | 86  |
| 4. EFECTOS MOLECULARES DE LAS CO-RMs EN LA COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA Y PROGENITORES ÓSEOS                                     | 88  |
| 4.i. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON CORM-401 SOBRE PROGENITORES ÓSEOS MURINOS                                                                           | 88  |
| 4.ii MODULACIÓN DEL FENOTIPO OSTEOMIMÉTICO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS ÓSEAS POR LA CORM-401                          | 92  |
| 5. CONCLUSIÓN GENERAL – PARTE I: EFECTO DE LAS CO-RMs EN LA CARCINOGENESIS PROSTÁTICA                                                                | 94  |
| PARTE II: POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA                                                                                              | 96  |
| 1. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE PACIENTES ARGENTINOS DIAGNOSTICADOS CON CÁNCER DE PRÓSTATA                                                              | 96  |
| 1.i DISEÑO DE ESTUDIO DE CASO RETROSPECTIVO                                                                                                          | 96  |
| 1.ii CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS                                                                                                              | 96  |
| 1.iii CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS EN AR Y EN APEX1                                                                                              | 98  |
| 2. ASOCIACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS Y LOS POLIMORFISMOS DE LA COHORTE DE PACIENTES ARGENTINOS DIAGNOSTICADOS CON CÁNCER DE PRÓSTATA | 101 |
| 2.i ASOCIACIÓN CON ANTECEDENTES FAMILIARES DE CÁNCER                                                                                                 | 101 |
| 3. POLIMORFISMOS COMO BIOMARCADORES PRONÓSTICOS                                                                                                      | 102 |

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.i RELACIÓN ENTRE AR (CAG) <sub>n</sub> Y APEX1 c.444T>G (p.Asp148Glu) Y RIESGO DE RECAÍDA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA                                               | 102 |
| 3.ii ASOCIACIÓN ENTRE AR (CAG) <sub>n</sub> Y APEX1 c.444T>G (p.Asp148Glu) Y RIESGO DE RECAÍDA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA EN PACIENTES CON VALORES DE PSA INTERMEDIO | 106 |
| 3.iii INTERACCIÓN ENTRE AR (CAG) <sub>n</sub> Y APEX1 c.444T>G (p.Asp148Glu) COMO PREDICTOR DE RECAÍDA EN CÁNCER DE PRÓSTATA                                               | 108 |
| 4. CONCLUSIÓN GENERAL – PARTE II: POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA                                                                                            | 113 |
| DISCUSIÓN                                                                                                                                                                  | 114 |
| PARTE I                                                                                                                                                                    | 114 |
| PARTE II                                                                                                                                                                   | 124 |
| BIBLIOGRAFÍA                                                                                                                                                               | 128 |

## **RESUMEN**

El cáncer de próstata (PCa) es la neoplasia más frecuente en hombres y una de las principales causas de muerte oncológica en el mundo. Esta tesis aporta evidencia experimental y clínica sobre mecanismos moleculares implicados en la progresión de la enfermedad, combinando dos aproximaciones complementarias:

- (1) el estudio del efecto del monóxido de carbono (CO), empleando moléculas liberadoras de CO (CO-RMs), sobre células tumorales y su interacción con el microambiente óseo; y
- (2) el análisis del valor pronóstico de polimorfismos germinales en una cohorte de pacientes argentinos con PCa localizado.

## **PARTE I**

Esta tesis plantea la hipótesis de que el CO, una molécula señalizadora con propiedades antiinflamatorias y citoprotectoras, es capaz de modular funciones clave del fenotipo tumoral prostático. Se propuso que las CO-RMs, específicamente CORM-3, CORM-A1 y CORM-401, ejercen efectos antitumorales sobre células de PCa humano, interfiriendo con vías biológicas asociadas a la progresión tumoral y la colonización ósea. El objetivo de esta primera parte fue evaluar el impacto de las CO-RMs sobre la proliferación celular, la angiogénesis, el estrés oxidativo, el metabolismo energético, la expresión de marcadores de plasticidad celular y *stemness*, así como sus efectos en la interacción de las células tumorales con células óseas, considerando que el hueso es el principal sitio de metástasis del PCa.

Para ello, se utilizó una línea celular prostática tumoral (PC3) y un modelo de co-cultivo indirecto con precursores osteoblásticos murinos (MC3T3). Se definieron concentraciones no citotóxicas de las CO-RMs y se confirmó la liberación efectiva de CO. En las células tumorales el tratamiento promovió la adhesión celular al sustrato y redujo significativamente la capacidad migratoria, evaluada mediante ensayos de adhesión y cierre de herida. Además, se observó una disminución de la expresión del marcador de proliferación *Ki67* y de la expresión de *VEGF*. El tratamiento también promovió la adhesión celular y redujo significativamente la migración.

A nivel metabólico, se registró una reducción en los niveles intracelulares de ATP, en la actividad de LDH y en el lactato intracelular, junto con una baja expresión de *PKM2*, *LDHB*, *ACO2* y *PDHB* en células tratadas con estas moléculas. Complementariamente, mediante el uso del analizador Seahorse XF, se comprobó que la CORM-401 inhibe la glucólisis (disminución de la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR)) lo que evidencia un compromiso funcional del metabolismo glucolítico tumoral.

Además, se observó una disminución de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) en todas las condiciones de tratamiento. En cuanto a plasticidad celular, el tratamiento con CORM-401 afectó propiedades asociadas al fenotipo *stem-like*, al reducir tanto la formación de esferoides como la capacidad clonogénica. En el modelo de co-cultivo, CORM-401 redujo la expresión de genes osteoblásticos (*Runx2*, *Col1a1*, *Col1a2*, *Spp1*) en células MC3T3 y aumentó la expresión del gen *Hmox1* que codifica para la proteína antiinflamatoria HO-1. En células PC3, el tratamiento con CORM-401 incrementó la expresión de *PTHrP*, *OPG*, *IL6* e *IL8*, sugiriendo una respuesta inflamatoria adaptativa del tumor al entorno óseo.

En conjunto, estos resultados demuestran que el CO regula múltiples dimensiones del fenotipo tumoral prostático, incluyendo metabolismo, estrés oxidativo, *stemness* y remodelación ósea, y posicionan a las CO-RMs como agentes multitarget con potencial terapéutico en PCa.

## **PARTE II**

En la segunda parte, la tesis postula que ciertas variantes germinales pueden actuar como biomarcadores pronósticos independientes en pacientes con PCa localizado. En particular, se plantea que el número de repeticiones nucleotídicas (CAG)<sub>n</sub> en el gen del receptor de andrógenos (*AR*) y el polimorfismo c.444T>G en el gen de la endonucleasa de sitiosapurínicos/apirimidínicos (*APEX1*), involucrado en la reparación del ADN permiten predecir el riesgo de recurrencia bioquímica posterior al tratamiento primario. El objetivo de esta sección fue evaluar la asociación de estas variantes con la evolución clínica de una cohorte de pacientes de PCa y determinar su utilidad para mejorar los modelos de estratificación de riesgo actualmente disponibles.

Para ello, se analizó una cohorte retrospectiva de 123 pacientes argentinos con PCa localizado. Se encontró que la combinación de un número intermedio de repeticiones CAG<sub>(20–23)</sub> en el gen *AR* junto con la presencia de los genotipos homocigotas TT o GG en *APEX1* esta asociada con mayor riesgo de recurrencia bioquímica que los no presentaban esta combinación de genotipos. Esta asociación se mantuvo independiente de PSA, edad y estadio patológico, y fue confirmada mediante análisis de regresión de Cox.

En conclusión ambos polimorfismos mantuvieron un valor pronóstico incluso en pacientes con PSA <10 ng/mL, subgrupo clínicamente difícil de estratificar. Por tanto, su incorporación en algoritmos clínicos podría mejorar la toma de decisiones terapéuticas en estadios tempranos.

En resumen, esta tesis ofrece evidencia sólida sobre como los mecanismos moleculares que impactan la progresión del PCa y propone nuevas herramientas terapéuticas (CO-RMs) y pronósticas (*AR* y *APEX1*), abriendo paso a estrategias más precisas y personalizadas para el manejo de esta enfermedad.

**PALABRAS CLAVES:** CÁNCER DE PRÓSTATA; MOLÉCULAS LIBERADORAS DE MONÓXIDO DE CARBONO; POLIMORFISMOS, RECEPTOR DE ANDRÓGENOS; *APEX1*; BIOMARCADORES GENÉTICOS.

## **ABSTRACT**

### **GENETIC POLYMORPHISMS AND EMERGING THERAPEUTIC STRATEGIES IN PROSTATE CANCER**

Prostate cancer (PCa) is the most common malignancy in men and one of the leading causes of cancer-related death in the world. This thesis provides experimental and clinical evidence on molecular mechanisms involved in disease progression, combining two complementary approaches:

- (1) the study of the effects of carbon monoxide (CO), employing CO-releasing molecules (CO-RMs), on tumor cells and their interaction with the bone microenvironment; and
- (2) the analysis of the prognostic value of germline polymorphisms in a cohort of Argentine patients with PCa localized.

## **PART I**

This thesis hypothesizes that CO, a signaling molecule with anti-inflammatory and cytoprotective properties, can modulate key biological traits of the PCa phenotype. Specifically, it is proposed that CO-RMs (CORM-3, CORM-A1, and CORM-401) exert antitumor effects on human PCa cells by interfering with pathways involved in tumor progression and bone colonization. The objective of this section was to assess the effects of CO-RMs on cellular proliferation, angiogenesis, oxidative stress, energy metabolism, expression of stemness and plasticity markers, and interaction with bone cells considering that bone is the primary site of metastasis in PCa.

To this end, the human PCa cell line (PC3) and an indirect co-culture model with murine osteoblastic precursors (MC3T3) were employed. Non-cytotoxic concentrations of each CO-RM were determined, and the effective release of CO was validated. Treatment significantly reduced the expression of the proliferation marker *Ki67* and *VEGF* expression. Treatment also promoted cell adhesion and significantly reduced migration.

At the metabolic level, intracellular ATP content, LDH activity, and intracellular lactate levels were decreased, along with reduced expression of *PKM2*, *LDHB*, *ACO2*, and *PDHB*.

Complementarily, using the Seahorse XF analyzer, it was demonstrated that CORM-401 inhibits glycolysis as evidenced by a decrease in extracellular acidification rate (ECAR) indicating a global functional impairment of tumor glycolytic metabolism.

Furthermore, intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) decreased under all treatment conditions. Regarding cellular plasticity, treatment with CORM-401 affected stem-like features by reducing both spheroid formation and clonogenic capacity. In the co-culture model, CORM-401 reduced the expression of osteoblastic genes (*Runx2*, *Col1a1*, *Col1a2*, *Spp1*) in MC3T3 cells and induced expression of the *Hmox1* gene, which encodes the anti-inflammatory protein HO-1, was increased in this cell line. In PC3 cells, treatment increased the expression of *PTHrP*, *OPG*, *IL6*, and *IL8*, suggesting an adaptive inflammatory response of the tumor to the bone environment.

Altogether, the results demonstrate that CO regulates multiple aspects of the prostate tumor phenotype—including metabolism, oxidative stress, stem-like properties, and bone remodeling—and position CO-RMs as multitarget agents with therapeutic potential in PCa.

## **PART II**

In this second section, the thesis postulates that specific germline variants may serve as independent prognostic biomarkers in patients with localized PCa. In particular, it is proposed that the (CAG)<sub>n</sub> repeat length in the androgen receptor (*AR*) gene and the c.444T>G polymorphism in the gene encoding the apurinic/apyrimidinic site endonuclease (*APEX1*) can predict the risk of biochemical recurrence following primary treatment. The objective was to evaluate the association between these variants and clinical outcomes in a patient cohort, and to assess their potential utility for improving current risk stratification models.

To this end, a retrospective cohort of 123 patients with localized PCa and complete clinical follow-up was analyzed. The results showed that the combination of an intermediate repeat length CAG<sub>(20–23)</sub> in *AR* and the presence of TT or GG genotypes in *APEX1* was significantly associated with increased risk of biochemical recurrence. This association remained independent of baseline PSA, age, and pathological stage, and was confirmed by multivariate Cox regression analysis.

Notably, both polymorphisms retained prognostic significance even in patients with PSA <10 ng/mL, a subgroup in which conventional clinical markers often fail to discriminate risk. These findings support the incorporation of these genetic variants into clinical algorithms to enhance therapeutic decision-making in early-stage disease.

In summary, this work offers solid evidence on molecular mechanisms driving prostate cancer progression and proposes novel therapeutic tools (CO-RMs) and prognostic biomarkers (*AR* and *APEX1*), contributing to the development of more precise and personalized strategies for disease management.

**KEYWORDS:** PROSTATE CANCER; CARBON MONOXIDE-RELEASING MOLECULES; POLYMORPHISMS; ANDROGEN RECEPTOR; *APEX1*; GENETIC BIOMARKERS.

## PUBLICACIONES

Sanchis P, Sabater A, Lechuga J, Rada J, Seniuk R, **Pascual G**, Gatti M, Bizzotto J, Shepherd P, Yang J, Cotignola V, Vazquez E, Mateo J, Valacco P, Labanca E, Logothetis C, Gueron G, Anselmino N. **PKA-Driven SPP1 Activation as a Novel Mechanism Connecting the Bone Microenvironment to Prostate Cancer Progression**. *Oncogene*, in press. 2025.

Toro A, Arévalo AP, Pereira-Gómez M, Sabater A, Zizzi EA, Perbolianachis P, **Pascual G**, Lage-Vickers S, Pórfido JL, Achinelli I, Seniuk R, Bizzotto J, Sanchis P, Olivera A, Leyva A, Moreno P, Costáble A, Fajardo A, Carrión F, Fló M, Olivero-Deibe N, Rodríguez F, Nin N, Anselmino N, Labanca E, Vázquez E, Cotignola J, Alonso DF, Valacco MP, Marti M, Gentile F, Cherkasov A, Crispo M, Moratorio G, Gueron G. **Blood matters: the hematological signatures of Coronavirus infection**. *Cell Death Dis*. 2024 Nov 28;15(11):863. doi: 10.1038/s41419-024-07247-8. PMID: 39609423; PMCID: PMC11605097.

**Pascual G**, Sabater A, Bizzotto J, Seniuk R, Sanchis P, Ledesma-Bazan S, Labanca E, Scorticati C, Mazza O, Vázquez E, Toro A, Prada F, Gueron G, Cotignola J. **AR (CAG)<sub>n</sub> Microsatellite and APEX1 c.444T>G (p.Asp148Glu) Polymorphisms as Independent Prognostic Biomarkers in Prostate Cancer: Insights from an Argentinian Cohort**. *Cancers (Basel)*. 2024 Nov 13;16(22):3815. doi: 10.3390/cancers16223815. PMID: 39594771; PMCID: PMC11592882.

Sabater A, Sanchis P, Seniuk R, **Pascual G**, Anselmino N, Alonso DF, Cayol F, Vazquez E, Marti M, Cotignola J, Toro A, Labanca E, Bizzotto J, Gueron G. **Unmasking Neuroendocrine Prostate Cancer with a Machine Learning-Driven Seven-Gene Stemness Signature That Predicts Progression**. *Int J Mol Sci*. 2024 Oct 22;25(21):11356. doi: 10.3390/ijms252111356. PMID: 39518911; PMCID: PMC11545501.

Toro A, Lage-Vickers S, Bizzotto J, Vilicich F, Sabater A, **Pascual G**, Ledesma-Bazan S, Sanchis P, Ruiz MS, Arevalo AP, Porfido JL, Abbate M, Seniuk R, Labanca E, Anselmino N, Navone NM, Alonso DF, Vazquez E, Crispo M, Cotignola J, Gueron G. **Pin-Pointing the Key Hubs in the IFN- $\gamma$  Pathway Responding to SARS-CoV-2 Infection**. *Viruses*. 2022 Sep 30;14(10):2180. doi: 10.3390/v14102180. PMID: 36298734; PMCID: PMC9610092.

Toro A, Ruiz MS, Lage-Vickers S, Sanchis P, Sabater A, **Pascual G**, Seniuk R, Cascardo F, Ledesma-Bazan S, Vilicich F, Vázquez E, Gueron G. **A Journey into the Clinical Relevance of Heme Oxygenase 1 for Human Inflammatory Disease and Viral Clearance: Why Does It Matter on the COVID-19 Scene?** *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan 29;11(2):276. doi: 10.3390/antiox11020276. PMID: 35204159; PMCID: PMC8868141.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer y dedicar especialmente todo este trabajo a mi familia, a mi mamá, Estela, a mi papá, Jorge y a mi hermana, Carolina. Estoy orgulloso de ustedes. Fueron, son y serán siempre mi ejemplo y mi referencia en esta vida. Fueron ustedes los que siempre hicieron todo lo posible para que pudiera dedicarme a hacer lo que más me gusta. Especialmente a mamá, que luchó toda su vida por nosotros y dejó todo para que siempre estuviésemos bien, un ejemplo para el cual no me alcanzan las palabras para agradecer y transmitir todo el amor y admiración que te tengo, cualquier tipo de agradecimiento se quedaría corto. Gracias por cuidarnos siempre a los tres Ma, te amamos.

Agradezco a la Universidad de Buenos Aires (UBA) por brindarme la posibilidad de realizar mis estudios de doctorado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Al departamento de Química Biológica de la UBA y al IQUIBICEN por haber permitido también que pueda hacer mi doctorado en su establecimiento. También agradezco a la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP) por formarme como Bioquímico. Agradezco al CONICET por haber financiado estos años durante los cuales me encontré realizando mi doctorado. Todas estas instituciones me permitieron hacer lo que más me gusta y sentirme orgulloso de lo que hacemos.

Gracias a mi directora, Geraldine Gueron, en primer lugar por dirigirme y dejarme formar parte de tu equipo. Gracias por tu motivación constante, de hacernos creer que nada es imposible y que es cuestión de tiempo para que las cosas sucedan, una verdadera líder. A su vez agradezco a mi directora adjunta la Ayelén Toro, por permitirme estar codo a codo trabajando en el día a día con ella, de estar todo el tiempo a disposición por más mínimo que sea el problema y también por sostenerme en momentos de dudas. Esto tampoco hubiese sido posible sin la incansable ayuda de Elba Vázquez, gracias por todas las horas que dedicaste a enseñarme millones de cosas y ayudarme con este proyecto. Tres personas que me transmitieron pasión por lo que uno hace y que sin pasión las cosas no se pueden hacer.

Agradezco a Javier Cotignola por todas sus enseñanzas y estar siempre a predisposición de lo que sea que necesitábamos. A todos los miembros del laboratorio con los que compartí todo o parte de este doctorado: Juan, Estefi, Sol, Flor, Dani, Jime, Nacho, Ine, Julia, Lu. Gracias por

ayudarme en los momentos que recurrí a ustedes y también por confiar en mí ante cualquier cosa.

Imposible no agradecer al equipo del Labo 2, Ro, Agus, Sabri, Sofi y Pablo, con los cuales formamos un grupo maravilloso desde la amistad y me hicieron sentir que cada día en el laboratorio era como estar en casa. Millones de anécdotas e historias para contar de los congresos, de los viajes, de las miles de juntadas. Siempre estuvieron cuando los necesité, un placer haber compartido estos años con ustedes, hicieron que el doctorado fuese una experiencia increíble.

Agradezco a mis amigos (a mis hermanos) de siempre, de toda la vida, Nico, Chope, Rulo, Luchito, Chicho, Rama, Facu, Juli, Tato. Me hicieron sentir que nunca me fui de Mar del Plata. Gracias por estar siempre, por ser incondicionales en todo momento.

Agradezco al Dr. Roberto Motterlini y a la Dra. Roberta Foresti, quienes me recibieron como uno más en su laboratorio y me transmitieron, al igual que mis directoras, la pasión y el amor por esto que hacemos. Gracias por la buena predisposición en todo momento ante mis consultas, por dedicar un montón de tiempo a transmitirme todo su conocimiento. Y por supuesto, a todo el equipo de su laboratorio que me hicieron pasar unos tres meses maravillosos en París.

Gracias a Edith Kordon por haber aceptado ser mi consejera de estudios. También a Alejandra Erlejman y Eduardo Cánepa por haber sido miembros de mi comité de seguimiento. Y agradezco también a los miembros del jurado que aceptaron evaluar este trabajo, es para mí un honor, Virginia Novaro, Eduardo Cánepa y Cora Cymeryng.

Gracias a la European Association For Cancer Research y a la American Association For Cancer Research por brindarme las becas para poder hacer la pasantía de investigación en París y por entregarme el Global Scholar in Training Award para asistir al Annual Meeting de la AACR y permitirme así conocer el mundo haciendo ciencia.

Por último, gracias a mi compañera de vida, Karen. Fui muy afortunado de que nuestros caminos se hayan encontrado. Gracias por todas las aventuras que vivimos en este tiempo y

por todas las que nos quedan por vivir. Y gracias por el apoyo constante que hizo que nunca bajara los brazos.

A Mamá

## ABREVIATURAS

| Abreviatura      | Significado                                               |
|------------------|-----------------------------------------------------------|
| $\Delta$ AR      | Variantes truncadas del receptor de andrógenos            |
| $\alpha$ -MEM    | Medio mínimo esencial alfa                                |
| ATP6             | Subunidad 6 de la ATP sintasa mitocondrial                |
| $\mu$ l          | Microlitro                                                |
| $\mu$ M          | Micromolar                                                |
| 5 $\alpha$ -R    | 5-alfa reductasa                                          |
| 6P               | 6-fosfato                                                 |
| ABD              | Dominio de unión a andrógenos                             |
| ACO2             | Aconitasa 2                                               |
| ADN              | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| ADN <sub>c</sub> | Ácido desoxirribonucleico copia                           |
| ADT              | Terapia de privación de andrógenos                        |
| AKT              | Proteína quinasa B                                        |
| AR               | Receptor de Andrógenos                                    |
| ARA70            | Coactivador del receptor de andrógenos                    |
| ARE              | Elementos respondedores a andrógenos                      |
| ARN              | Ácido ribonucleico                                        |
| APE1             | Endonucleasa 1 de sitiosapurínicos/apirimidínicos del ADN |
| APEX1            | Endonucleasa de sitiosapurínicos/apirimidínicos           |
| ATM              | Mutado en ataxia telangiectasia                           |
| ATP              | Adenosín trifosfato                                       |
| AURKA            | Quinasa aurora A                                          |
| BCA              | Ensayo de ácido bicinconínico                             |
| BCR              | Recurrencia bioquímica                                    |
| BCRA             | Gen de cáncer de mama                                     |
| BMP              | Proteína morfogénica ósea                                 |
| BRFS             | Sobrevida libre de recurrencia bioquímica                 |
| BSA              | Albúmina de suero bovino                                  |

|                 |                                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|
| <i>BVR</i>      | <i>Biliverdina reductasa</i>                              |
| <i>cGMP</i>     | <i>Guanosín monofosfato cíclico</i>                       |
| <i>CO</i>       | <i>Monóxido de carbono</i>                                |
| <i>CO-RMs</i>   | <i>Moléculas liberadoras de monóxido de carbono</i>       |
| <i>COX2</i>     | <i>Subunidad 2 de la citocromo c oxidasa mitocondrial</i> |
| <i>CRPC</i>     | <i>Cáncer de próstata resistente a la castración</i>      |
| <i>CSC</i>      | <i>Células madres tumorales</i>                           |
| <i>CTAB</i>     | <i>Bromuro de hexadeciltrimetilamonio</i>                 |
| <i>CTDs</i>     | <i>Células tumorales diseminadas</i>                      |
| <i>CXCL12</i>   | <i>Quimiocina ligando 12 ( SDF-1)</i>                     |
| <i>CXCR4</i>    | <i>Receptor de quimiocinas tipo 4</i>                     |
| <i>CYTB</i>     | <i>Citocromo b mitocondrial</i>                           |
| <i>DBD</i>      | <i>Dominio de unión al ADN</i>                            |
| <i>DCFH-DA</i>  | <i>2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato</i>         |
| <i>deoxi-Mb</i> | <i>deoximioglobina</i>                                    |
| <i>DHT</i>      | <i>Dihidrotestosterona</i>                                |
| <i>DKK1</i>     | <i>Inhibidor Dickkopf-1 de la vía Wnt</i>                 |
| <i>DMEM</i>     | <i>Medio de Eagle modificado de Dulbecco</i>              |
| <i>DMSO</i>     | <i>Dimetilsulfóxido</i>                                   |
| <i>DRE</i>      | <i>Examen dígito-rectal</i>                               |
| <i>dNTPs</i>    | <i>Desoxinucleótidos trifosfato</i>                       |
| <i>DTT</i>      | <i>Ditiotreitol</i>                                       |
| <i>ECM</i>      | <i>Matriz extracelular</i>                                |
| <i>EDTA</i>     | <i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>                    |
| <i>ERG</i>      | <i>Gen relacionado a ETS</i>                              |
| <i>ET-1</i>     | <i>Endotelina 1</i>                                       |
| <i>FACS</i>     | <i>Clasificación celular activada por fluorescencia</i>   |
| <i>FGFs</i>     | <i>Factores de crecimiento de fibroblastos</i>            |
| <i>FGFR</i>     | <i>Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos</i> |
| <i>FH</i>       | <i>Fumarato hidratasa</i>                                 |

|                |                                                                                               |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| FG             | Factor de crecimiento                                                                         |
| G6PD           | Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa                                                              |
| GAPDH          | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa                                                       |
| GAS6           | Proteína específica del arresto del crecimiento 6                                             |
| GLUT           | Transportador de glucosa                                                                      |
| GM-CSF         | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos                                   |
| GTA            | Aparato general de transcripción                                                              |
| GS             | Puntaje de Gleason                                                                            |
| Hb-CO          | Carboxihemoglobina                                                                            |
| HBP            | Vía de biosíntesis de hexosaminas                                                             |
| HIF-1 $\alpha$ | Factor inducible por hipoxia tipo 1 alfa                                                      |
| HMOX1          | Hemo oxigenasa-1                                                                              |
| HO             | Hemo oxigenasa                                                                                |
| HPB            | Hiperplasia benigna prostática                                                                |
| HSC            | Células madre hematopoyéticas                                                                 |
| HSP            | Proteínas de choque térmico                                                                   |
| HR             | Hazard Ratio                                                                                  |
| IC             | Intervalo de Confianza                                                                        |
| IGF-IR         | Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1                                          |
| IGFs           | Factores de crecimiento similares a la insulina                                               |
| IL-1 $\beta$   | Interleuquina 1 beta                                                                          |
| IL-6           | Interleuquina 6                                                                               |
| IL-8           | Interleucina 8                                                                                |
| IL-10          | Interleuquina 10                                                                              |
| ISUP           | Sociedad Internacional de Patología Urológica (International Society of Urological Pathology) |
| ITGA5          | Integrina $\alpha 5\beta 1$                                                                   |
| KOH            | Hidróxido de potasio                                                                          |
| LDH            | Lactato deshidrogenasa                                                                        |
| LH             | Hormona luteinizante                                                                          |

|                         |                                                                                                       |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>LPS</i>              | <i>Lipopolisacárido</i>                                                                               |
| <i>MAPK</i>             | <i>Proteína quinasa activada por mitógeno</i>                                                         |
| <i>Mb-CO</i>            | <i>Carboximioglobina</i>                                                                              |
| <i>Mb-O<sub>2</sub></i> | <i>Oximioglobina</i>                                                                                  |
| <i>MC3T3</i>            | <i>Línea celular murina de precursores osteoblásticos</i>                                             |
| <i>MCT</i>              | <i>Transportador de monocarboxilatos</i>                                                              |
| <i>MEC</i>              | <i>Matriz extracelular</i>                                                                            |
| <i>MET</i>              | <i>Factor de Transición Epitelial Mesenquimal</i>                                                     |
| <i>Mg<sup>+2</sup></i>  | <i>Magnesio</i>                                                                                       |
| <i>Min</i>              | <i>Minutos</i>                                                                                        |
| <i>MIP</i>              | <i>Proteína inflamatoria de macrófagos</i>                                                            |
| <i>miRNAs</i>           | <i>microARNs</i>                                                                                      |
| <i>MMPs</i>             | <i>Metaloproteinasas de matriz</i>                                                                    |
| <i>MSC</i>              | <i>Células madre mesenquimales</i>                                                                    |
| <i>MTS</i>              | <i>Ensayo de reducción de sal de tetrazolio</i>                                                       |
| <i>mTORC1</i>           | <i>Complejo 1 de la diana de rapamicina en mamíferos</i>                                              |
| <i>MW</i>               | <i>Multi-well</i>                                                                                     |
| <i>MYCN</i>             | <i>Oncogén MYCN (Homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén viral de mielocitomatosis v-myc)</i> |
| <i>NADPH</i>            | <i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido</i>                                             |
| <i>NADH</i>             | <i>Nicotinamida adenina dinucleótido reducido</i>                                                     |
| <i>ND1</i>              | <i>Subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa</i>                                                          |
| <i>NFκB</i>             | <i>Factor Nuclear κB</i>                                                                              |
| <i>nm</i>               | <i>Nanómetro</i>                                                                                      |
| <i>NO</i>               | <i>Óxido nítrico</i>                                                                                  |
| <i>NPAS2-BMAL1</i>      | <i>Complejo entre la proteína 2 con dominio PAS neuronal y la proteína 1 similar a ARNT</i>           |
| <i>NRF2</i>             | <i>Factor asociado a factor nuclear eritroide 2</i>                                                   |
| <i>O<sub>2</sub></i>    | <i>Oxígeno</i>                                                                                        |
| <i>OPG</i>              | <i>Osteoprotegerina</i>                                                                               |
| <i>OPN</i>              | <i>Osteopontina</i>                                                                                   |

|                |                                                                               |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>OXPHOS</i>  | <i>Fosforilación oxidativa</i>                                                |
| <i>PBS</i>     | <i>Buffer fosfato salino</i>                                                  |
| <i>PC3</i>     | <i>Línea celular derivada de metástasis ósea de adenocarcinoma prostático</i> |
| <i>PCa</i>     | <i>Cáncer de Próstata</i>                                                     |
| <i>PCA3</i>    | <i>Antígeno 3 del cáncer de próstata</i>                                      |
| <i>PCR</i>     | <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>                                    |
| <i>PDGF</i>    | <i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</i>                            |
| <i>PDHB</i>    | <i>Subunidad B de la piruvato deshidrogenasa</i>                              |
| <i>PI3K</i>    | <i>Fosfoinositol 3-quinasa</i>                                                |
| <i>PIN</i>     | <i>Neoplasia prostática intraepitelial</i>                                    |
| <i>PKM2</i>    | <i>Isoforma M2 de la piruvato quinasa</i>                                     |
| <i>PLK1</i>    | <i>Quinasa tipo polo 1</i>                                                    |
| <i>PMS</i>     | <i>Sistema de administración de partículas</i>                                |
| <i>PPAR</i>    | <i>Receptor activado por proliferador de peroxisoma</i>                       |
| <i>PPIA</i>    | <i>Ciclofilina A</i>                                                          |
| <i>PPP</i>     | <i>Vía de las pentosas fosfato</i>                                            |
| <i>PSA</i>     | <i>Antígeno prostático específico</i>                                         |
| <i>PTEN</i>    | <i>Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa</i>                       |
| <i>PTHrP</i>   | <i>Proteína Relacionada con la Hormona Paratiroidea</i>                       |
| <i>polyQ</i>   | <i>Poliglutamina</i>                                                          |
| <i>RANK</i>    | <i>Receptor Activador del Factor Nuclear <math>\kappa</math>B</i>             |
| <i>RANKL</i>   | <i>Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear <math>\kappa</math>B</i> |
| <i>RB</i>      | <i>Retinoblastoma</i>                                                         |
| <i>REL</i>     | <i>Retículo endoplasmático liso</i>                                           |
| <i>rpm</i>     | <i>Revoluciones por minuto</i>                                                |
| <i>RPMI</i>    | <i>Medio del Instituto Roswell Park Memorial</i>                              |
| <i>ROS</i>     | <i>Especies reactivas de oxígeno</i>                                          |
| <i>RRP</i>     | <i>Prostatectomía radical retropública</i>                                    |
| <i>RT</i>      | <i>Retrotranscripción</i>                                                     |
| <i>RT-qPCR</i> | <i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real</i>                     |

|                        |                                                                                   |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <i>RUNX2</i>           | <i>Factor de transcripción 2 relacionado con RUNX</i>                             |
| <i>sGC</i>             | <i>Guanilato ciclasa soluble</i>                                                  |
| <i>SBMA</i>            | <i>Atrofia muscular bulboespinal</i>                                              |
| <i>SDH</i>             | <i>Succinato deshidrogenasa</i>                                                   |
| <i>SFB</i>             | <i>Suero fetal bovino</i>                                                         |
| <i>SHBG</i>            | <i>Globulina transportadora de hormonas sexuales</i>                              |
| <i>SNV</i>             | <i>Variante de nucleótido único</i>                                               |
| <i>SPP1</i>            | <i>Gen que codifica para Osteopontina</i>                                         |
| <i>Src</i>             | <i>Protooncogén Src</i>                                                           |
| <i>STAT</i>            | <i>Transductor de señal y activador de transcripción</i>                          |
| <i>TCA</i>             | <i>Ciclo del ácido tricarboxílico</i>                                             |
| <i>TGF-β</i>           | <i>Factor de crecimiento transformante beta</i>                                   |
| <i>TMPRSS2</i>         | <i>Proteasa transmembrana, serina 2</i>                                           |
| <i>TMRE</i>            | <i>Tetrametilrodamina éster etílico</i>                                           |
| <i>TNF-α</i>           | <i>Factor de necrosis tumoral alfa</i>                                            |
| <i>TNM</i>             | <i>Clasificación de tumores: Tumor primario (T), ganglios (N), metástasis (M)</i> |
| <i>Tris</i>            | <i>Buffer tris(hidroximetil)aminometano</i>                                       |
| <i>TP53</i>            | <i>Proteína tumoral p53</i>                                                       |
| <i>UBE2C</i>           | <i>Ubiquitina-conjugadora E2 C</i>                                                |
| <i>UBE2L</i>           | <i>Enzima de conjugación de ubiquitina E2L</i>                                    |
| <i>UV</i>              | <i>Ultravioleta</i>                                                               |
| <i>VEGF</i>            | <i>Factor de crecimiento endotelial vascular</i>                                  |
| <i>VEGF-A</i>          | <i>Factor de crecimiento endotelial vascular A</i>                                |
| <i>VEGF-B</i>          | <i>Factor de crecimiento endotelial vascular B</i>                                |
| <i>VEGF-C</i>          | <i>Factor de crecimiento endotelial vascular C</i>                                |
| <i>VSMC</i>            | <i>Células del músculo liso vascular</i>                                          |
| <i>WNT</i>             | <i>Familia de proteínas Wnt</i>                                                   |
| <i>XRCC1</i>           | <i>Proteína 1 de reparación cruzada de complementación del grupo X</i>            |
| <i>ZIP1</i>            | <i>Transportador de Zinc</i>                                                      |
| <i>Zn<sup>+2</sup></i> | <i>Zinc</i>                                                                       |

# INTRODUCCIÓN

## 1. LA PRÓSTATA

### 1.i CARACTERÍSTICAS GENERALES Y FUNCIÓN

La próstata es una glándula perteneciente al sistema reproductivo masculino que está ubicada delante del recto y por debajo de la vejiga rodeando la primera sección uretral (**Figura 1**). En la próstata se producen parte de los componentes del líquido seminal, como el citrato, el  $Zn^{+2}$  y enzimas tales como la fosfatasa ácida, la seminina, el activador de plasminógeno como así también el antígeno prostático específico (PSA), una serin-proteasa cuya función es licuar el semen con el fin de facilitar el movimiento de los espermatozoides (1,2).

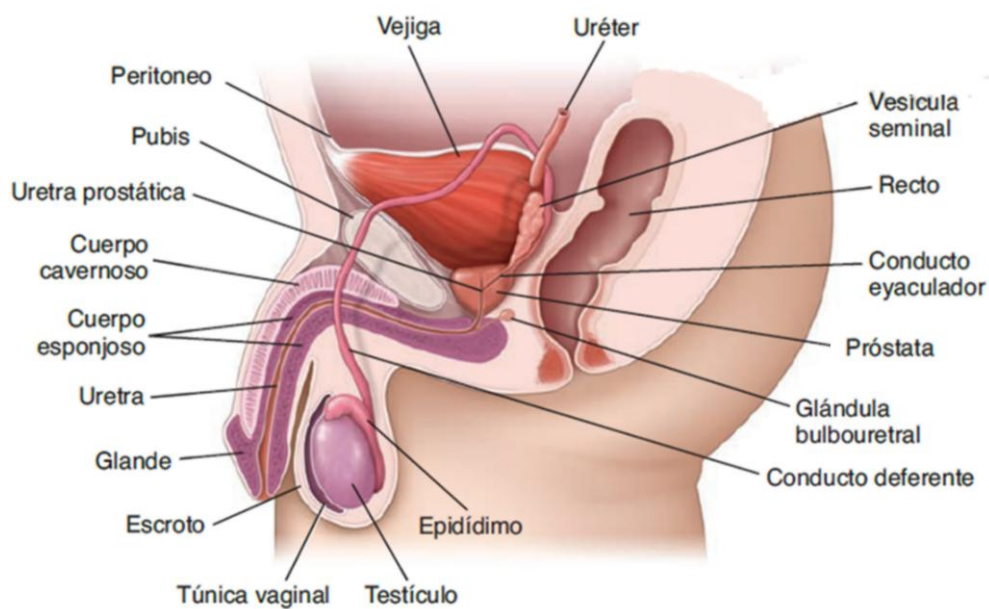


**Figura 1. Anatomía de la próstata.** Glándula exocrina perteneciente al sistema reproductor masculino situada delante del recto, debajo de la vejiga y rodeando la uretra. Figura adaptada de Ross y Pawlina (2002) (1,2).

### 1.ii ANATOMÍA E HISTOLOGÍA

La próstata se puede dividir anatómicamente en cinco secciones: una región central que rodea los conductos eyaculadores y representa un cuarto de la glándula, una zona fibromuscular compuesta de tejido conectivo y fibras musculares, una zona de transición rodeando la uretra,

una zona periférica que comprende el 70% de la glándula y una región periuretral (1) (**Figura 2**).

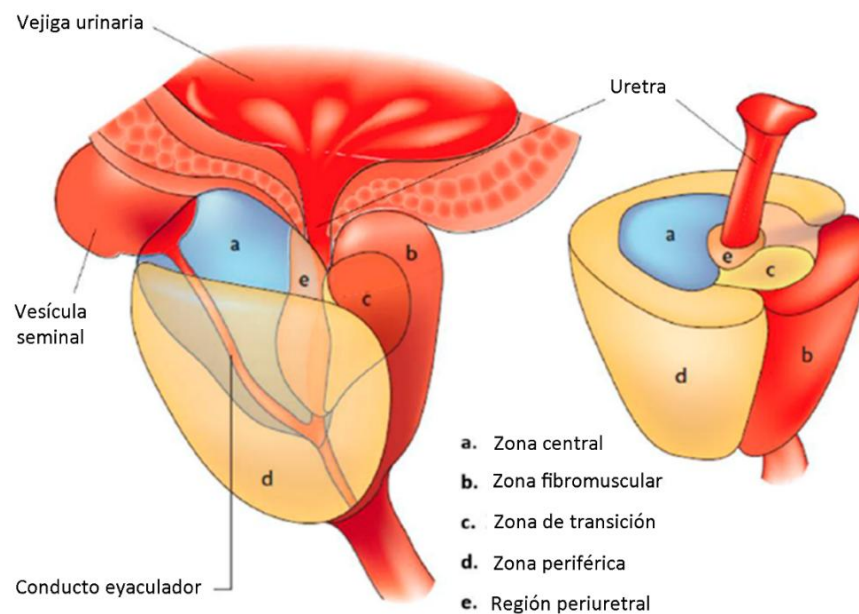


**Figura 2. Secciones anatómicas de la próstata.** La próstata posee una zona central, una zona fibromuscular, una zona de transición, una zona periférica y una región periuretral. Figura adaptada de De Marzo et al. (2007) (3).

A nivel histológico, la próstata está conformada por un epitelio glandular inmerso en un estroma fibromuscular. Este epitelio está compuesto por una capa luminal de células cilíndricas secretoras, cuya función es la producción de enzimas que forman parte del fluido seminal, como el PSA. Dichas células expresan el receptor de andrógenos (AR), razón por la cual están reguladas por dichas hormonas.

El epitelio secretor está sostenido por una capa de células basales de morfología cuboide y por células neuroendócrinas que, a diferencia de las anteriores, no requieren de la presencia de andrógenos para su regulación. Dentro de la población epitelial se encuentra una subpoblación de células madre, las cuales carecen de expresión del AR.

Separando el epitelio del estroma, se encuentra una membrana basal rica en matriz extracelular (ECM). El estroma prostático está compuesto principalmente por fibroblastos y células musculares lisas, además de otros elementos celulares como vasos sanguíneos,

nervios, ganglios periféricos y leucocitos infiltrados, que contribuyen a la estructura y función de la glándula (4–6) (**Figura 3**).

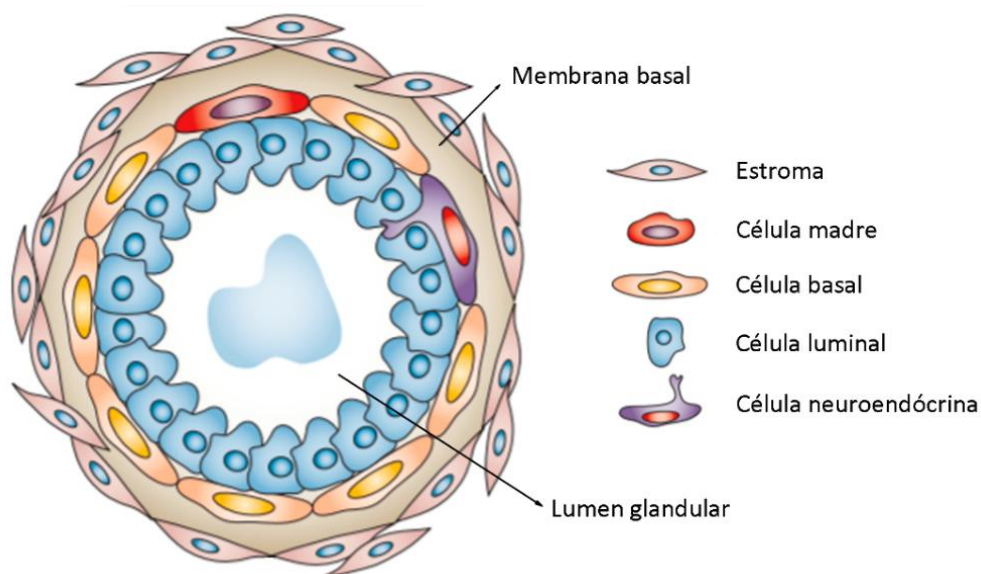


**Figura 3. Histología de la próstata.** La próstata está compuesta por diversos tipos celulares dentro de los cuales se destacan células estromales y epiteliales, como células madre, células basales, células luminales y células neuroendocrinas. Figura adaptada de Rane et al. (2012) (4).

### 1.iii REGULACIÓN HORMONAL

El crecimiento y la función secretora de la próstata están regulados por los andrógenos a través de la acción del AR. La testosterona, principal hormona esteroidea en este proceso, es producida por las células de Leydig en los testículos en respuesta a la estimulación de la hormona luteinizante (LH) liberada por la hipófisis. Una vez en la próstata, la testosterona ingresa a las células glandulares por difusión y es convertida en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 $\alpha$ -reductasa (5 $\alpha$ -R) (7). La DHT, una forma más activa de la hormona, se une al AR, desencadenando su activación. Este receptor, que actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando, sufre cambios estructurales tras la unión con DHT, lo que provoca su disociación de proteínas chaperonas, dimerización y posterior translocación al núcleo. El AR regula la transcripción de genes involucrados en el mantenimiento del epitelio prostático y su actividad funcional mediante la unión a secuencias específicas en el ADN denominadas elementos respondedores a andrógenos (ARE) (8,9) (**Figura 4**).

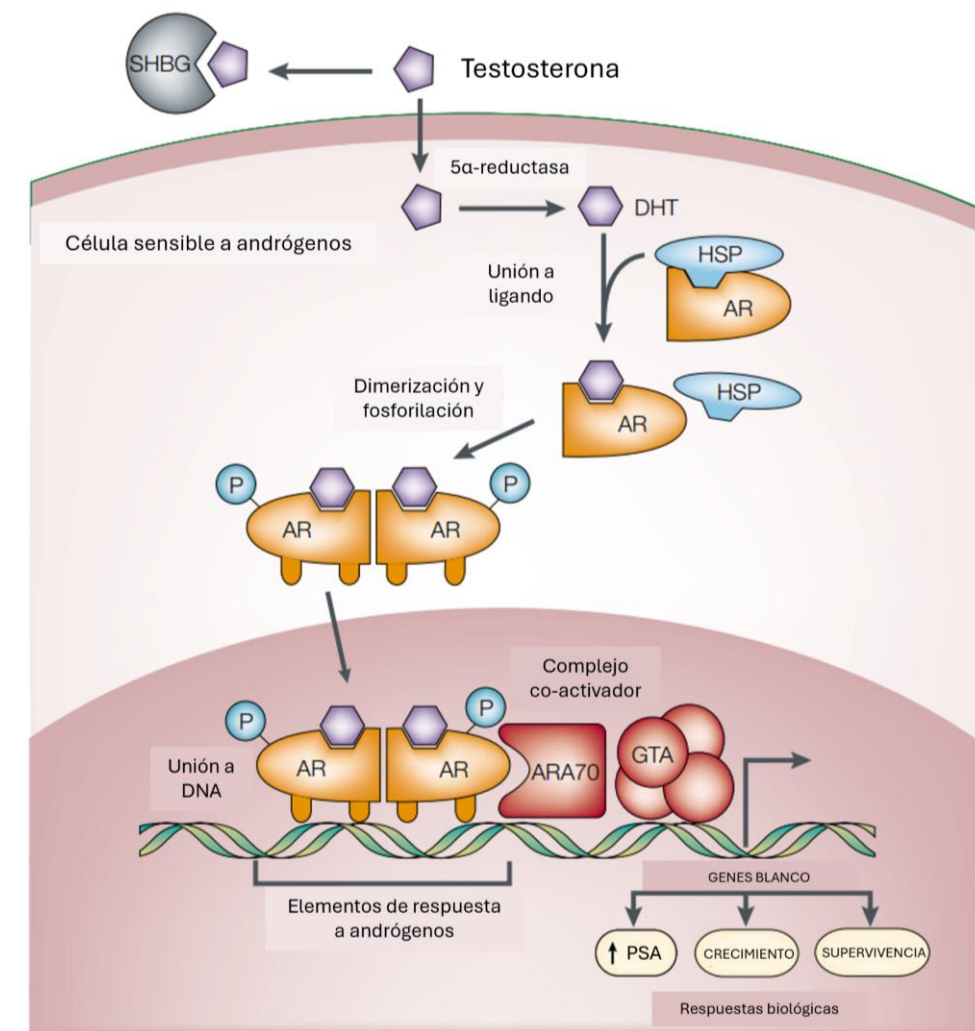


**Figura 4. Mecanismos de acción del AR.** La testosterona circula en la sangre unida a la albúmina y a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La testosterona libre, no unida a proteínas, ingresa a las células prostáticas y es convertida en DHT por la 5α-R. La unión de DHT al AR induce su disociación de las proteínas de choque térmico (HSPs) y la fosforilación del receptor. El AR se dimeriza y puede unirse a los elementos de respuesta a andrógenos en las regiones promotoras de los genes blanco. Los coactivadores (como ARA70) y correpresores también se unen al complejo AR, facilitando o impidiendo, respectivamente, su interacción con el aparato general de transcripción (GTA). La activación o represión de los genes blanco conduce a respuestas biológicas, incluyendo crecimiento, supervivencia y producción del PSA. Figura adaptada de Feldman y Feldman (2001) (9).

## 2. CÁNCER DE PRÓSTATA

### 2.i CARACTERÍSTICAS GENERALES

El cáncer de próstata (PCa) es una clase de adenocarcinoma, dado su origen glandular, caracterizado por un aumento en la proliferación de las células luminales en los ductos prostáticos que genera una ruptura de la membrana basal y la invasión del estroma (10,11). Anatómicamente, alrededor del 80% de los tumores prostáticos se localizan en la región periférica y se propagan fuera de la glándula, mientras que solo entre el 10 y el 20% se desarrolla en la zona de transición (12).

La hiperplasia benigna prostática (HPB) y la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) también son patologías proliferativas siendo esta última considerada un estadio anterior al PCa (6,8,10,13). Estas tres patologías se diferencian tanto en las características que presentan como a nivel celular y en su presentación clínica. En cuanto al PIN, las células luminales presentan anormalidades, tales como núcleos de mayor tamaño, pero conservan intacta la membrana basal, sin invasión del estroma (13). La HPB se desarrolla en la zona de transición de la próstata y se caracteriza por un crecimiento anormal que altera la composición celular. Esta expansión comprime la uretra y dificulta el flujo de orina desde la vejiga (3).

### 2.ii EPIDEMIOLOGÍA

El PCa es el segundo tipo de cáncer más común en hombres y la quinta causa principal de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial (**Figura 5A**). En Argentina, es la neoplasia maligna más frecuente en hombres y la tercera causa de mortalidad por este tipo de cáncer (**Figura 5B**) (14,15).

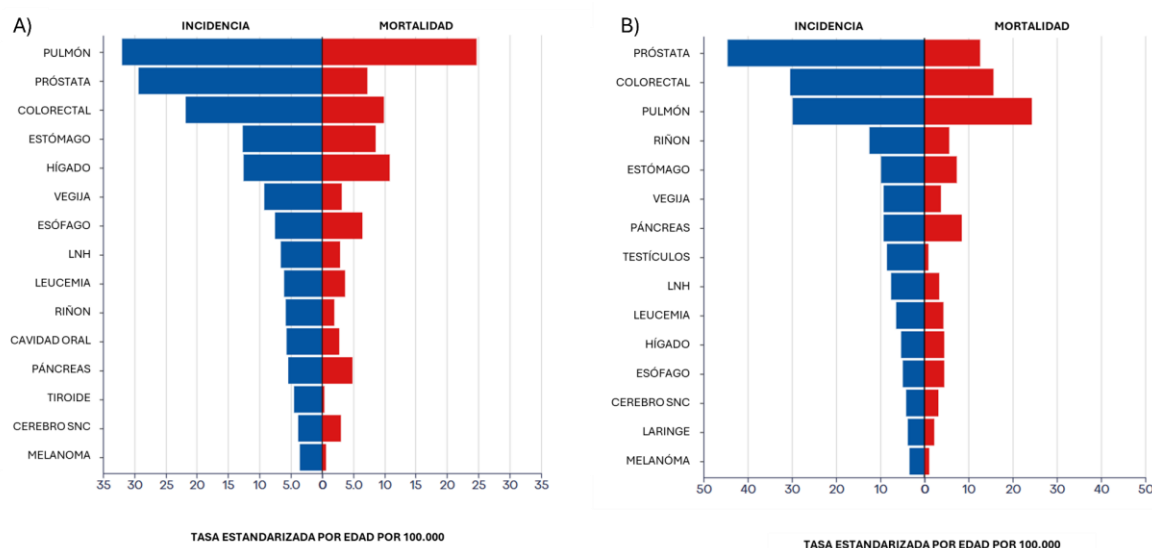


**Figura 5. Epidemiología del PCa a nivel global. A)** Tasa estandarizada por edad a nivel mundial por 100.000 habitantes de incidencia y mortalidad por cáncer en hombres a nivel global en 2022. **B)** Tasa estandarizada por edad por 100.000 habitantes de incidencia y mortalidad por cáncer en hombres en Argentina en 2022. Se muestran los 15 tipos de cáncer más prevalentes en la población masculina. Figura adaptada de Global Cancer Observatory que utiliza datos de GLOBOCAN 2022 (14,15).

## 2.iii ETIOLOGÍA

El PCa es considerado una enfermedad multifactorial con influencia genética, hormonal, ambiental e incluso por agentes infecciosos (16). El desarrollo y la progresión del PCa están influenciados por diversos factores de riesgo que incluyen la ancestría, los antecedentes familiares, la dieta, la inflamación crónica y alteraciones genómicas (17–20). Desde el punto de vista epidemiológico, se ha observado por ejemplo que los hombres afrodescendientes presentan las tasas de incidencia de PCa más altas reportadas a nivel mundial y un riesgo 2,2 veces mayor de morir por esta enfermedad en comparación con otras poblaciones (16,21). Además, el historial familiar juega un papel determinante ya que la presencia de antecedentes en parientes de primer grado aumenta significativamente el riesgo de padecer la enfermedad. El estilo de vida también desempeña un rol clave ya que, por ejemplo, dietas ricas en grasas y carbohidratos se han asociado con una mayor incidencia de PCa, y que el sobrepeso y la obesidad incrementan el riesgo de mortalidad en pacientes diagnosticados con esta enfermedad (16). Por otro lado, la inflamación crónica de la próstata se considera un factor de riesgo relevante, ya que puede contribuir al desarrollo y progresión del tumor (3).

A nivel molecular, se han identificado múltiples alteraciones genómicas asociadas al PCa. Entre ellas, la fusión *TMPRSS2-ERG* (Serinproteasa de transmembrana 2 – fusión con un gen relacionado con ETS), mutaciones en los genes *PTEN* (codificante de la proteína Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) y *TP53* (que codifica la proteína tumoral p53), así como amplificaciones en *c-MYC* (proto-oncogen MYC) y *AR* (22,23).

En conjunto, todos estos factores contribuyen a la heterogeneidad del PCa resaltando la importancia de estrategias preventivas y de detección temprana en poblaciones de alto riesgo.

## 2.iv DIAGNÓSTICO

El diagnóstico en PCa se basa en una combinación de pruebas bioquímicas, clínicas e histopatológicas. Se realiza un primer tamizaje mediante la evaluación de los niveles de PSA séricos y examen dígito-rectal (DRE), mientras que el diagnóstico final se realiza a través de la biopsia prostática. Generalmente, los individuos sanos presentan niveles séricos de PSA bajos, razón por la cual niveles elevados podrían indicar un crecimiento anormal de esta glándula (24). Sin embargo, un aumento en el PSA no necesariamente es indicativo de un cáncer dado que se podrían estar desarrollando patologías benignas tales como lo son la HPB o la prostatitis, provocando la aparición de falsos positivos. A pesar de las limitaciones mencionadas, el PSA sigue siendo una de las primeras herramientas de tamizaje que se utilizan para detectar PCa. Además, dicha determinación sérica es útil para realizar el seguimiento de los pacientes luego del tratamiento, ya que permite obtener información acerca de la respuesta al mismo y detectar recaídas (24). Sumado a estas estrategias diagnósticas existen métodos de apoyo como lo son la ecografía endorrectal, la tomografía computada y la resonancia magnética (19,25). Otra forma de diagnóstico es a través del test del antígeno 3 de PCa (PCA3) en orina, en el cual se mide el ARNm de PCA3 y PSA (26).

Si se detectan niveles altos de PSA y/o anomalías durante el DRE, el siguiente paso es la realización de una biopsia prostática con el fin de confirmar el diagnóstico (27). A nivel histopatológico, el PCa se clasifica en criterios basados en características morfológicas del tejido que determinan un puntaje en la escala de Gleason, donde se clasifica al PCa según su agresividad. Específicamente, un mayor puntaje de Gleason se asocia con un menor grado de

diferenciación, correlacionado con un peor pronóstico de la enfermedad (**Figura 6**) (28). Para la selección de la terapia no solo se utilizan criterios histopatológicos sino que también se toman decisiones en conjunto en base a los criterios clínicos de cada paciente (29–32).

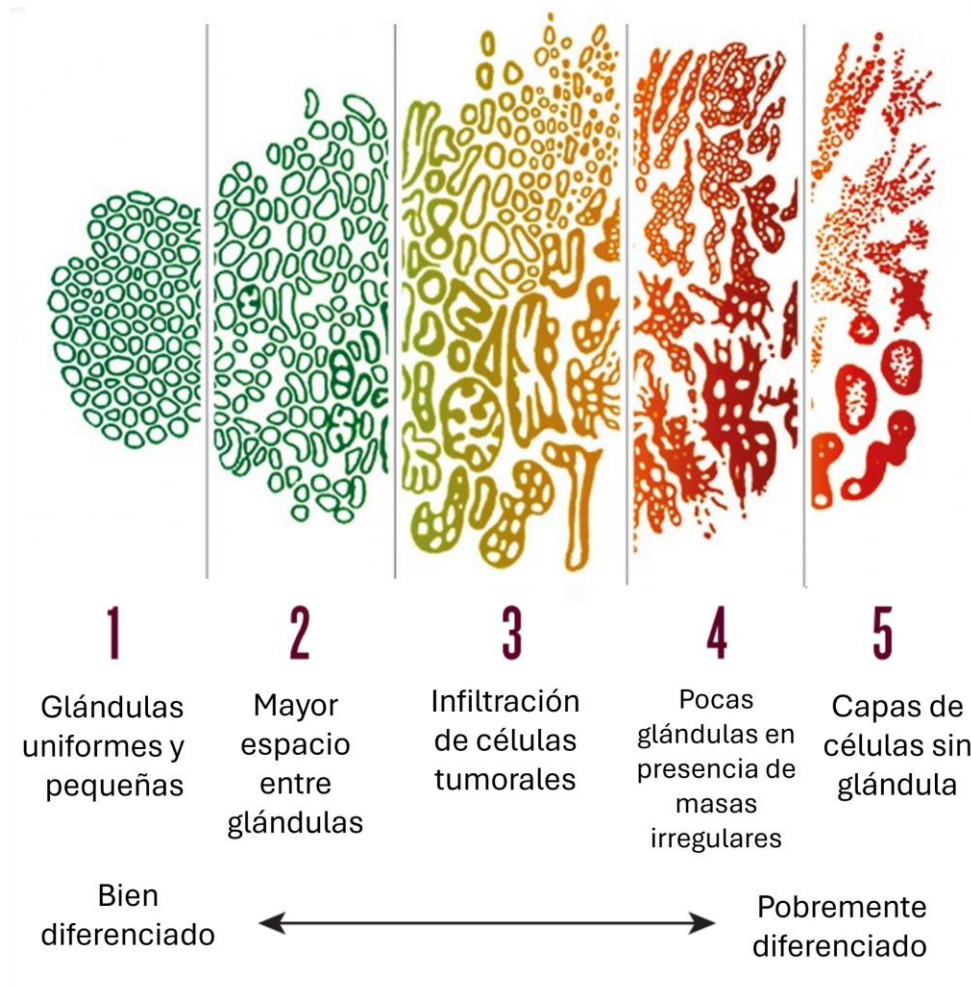


**Figura 6. Clasificación histopatológica del PCa según el Gleason Score.** El PCa se clasifica en cinco grados histológicos según el grado de diferenciación de la glándula prostática, asignándole un valor numérico a cada patrón de Gleason. El patrón de Gleason toma valores del 1, donde el tejido se encuentra bien diferenciado hasta el 5 donde el tejido se encuentra pobremente diferenciado. Figura adaptada de Deweerdt (2015) (28).

A la hora de clasificar un tumor de PCa bajo la escala de Gleason, en primer lugar se observan los dos patrones histológicos mayoritarios y se les asigna un puntaje a cada uno y luego se procede a realizar la suma de los dos patrones mayoritarios que dan como resultado el puntaje de Gleason o *Gleason Score* (GS). El motivo de seleccionar dichos patrones mayoritarios se fundamenta en base a la heterogeneidad de este tipo de tumores. El GS puede tomar valores

entre 2 y 10 pero solo los que se encuentran entre 6 y 10 presentan una relevancia a nivel clínico (29,33–35).

En 2016, con el fin de mejorar la estratificación de los pacientes diagnosticados con PCa basada en los GS original, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) actualizó esta clasificación asociando los puntajes de Gleason a valores de una nueva clasificación llamada ISUP (**Tabla 1**) (29).

**Tabla 1. Clasificación histológica del PCa según la Sociedad Internacional de Urología Patológica (29).**

| <b>Gleason Score</b>                                                                 | <b>Clasificación ISUP</b> | <b>Enfermedad</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------|
| ≤ 6<br>Glándulas bien formadas                                                       | Grado 1                   | No significativa  |
| 3 + 4 = 7<br>Predominantemente glándulas bien formadas y algunas pobremente formadas | Grado 2                   | Significativa     |
| 4 + 3 = 7<br>Predominantemente glándulas mal formadas y algunas bien formadas        | Grado 3                   |                   |
| 4 + 4 = 8<br>Solo glándulas mal formadas o ausencia parcial de glandulas             | Grado 4                   |                   |
| 9 y 10<br>Glándulas ausentes o anormales                                             | Grado 5                   |                   |

Adicionalmente, la *American Joint Committe on Cancer* (AJCC) desarrolló el índice TNM que involucra tanto el grado de diseminación tumoral como el de parámetros bioquímicos e histopatológicos al momento del diagnóstico (**Tabla 2**) (30).

**Tabla 2. Clasificación clínica del PCa según la AJCC (30).**

| <b>Componente</b>         | <b>Descripción</b>                                      |
|---------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>Categoría T</i>        | <i>Tamaño y extensión del tumor primario</i>            |
| <i>Categoría N</i>        | <i>Afectación de los ganglios linfáticos regionales</i> |
| <i>Categoría M</i>        | <i>Presencia de metástasis a distancia</i>              |
| <i>Nivel de PSA</i>       | <i>Valor sérico al momento del diagnóstico</i>          |
| <i>Puntaje de Gleason</i> | <i>Grado de indiferenciación histológica</i>            |

El PCa progresa lentamente y suele ser asintomático en sus primeras etapas, lo que retrasa su diagnóstico y reduce las opciones terapéuticas en estadios avanzados (31). La tasa de supervivencia varía significativamente según el estadio de la enfermedad: es cercana al 100% en tumores localizados, pero desciende al 30% cuando hay metástasis (30). Por esta razón, mejorar la detección temprana y diferenciar con precisión entre tumores agresivos e indolentes resulta fundamental para optimizar el tratamiento y evitar intervenciones innecesarias en pacientes de bajo riesgo. En este contexto, la identificación de biomarcadores capaces de distinguir estos subtipos tumorales es un desafío clave en la investigación del PCa y su manejo clínico (32).

## **2.v TRATAMIENTO**

La elección de la terapia para pacientes con PCa depende tanto de la agresividad del tumor como del estadio en el que se encuentra. Es crucial evitar el sobretratamiento en tumores que no presentan una significancia clínica relevante dado que los efectos adversos de los mismos pueden ser más contraproducentes que el desarrollo de la propia enfermedad. Cuando la enfermedad se detecta en estadios tempranos, se realizan tratamientos localizados como la prostatectomía radical y la radioterapia. En tumores que son dependientes de andrógenos, se utiliza terapia hormonal mediante el bloqueo de esta vía utilizando análogos de la LH o antiandrógenos. Sin embargo, en estadios avanzados, ya sea por un diagnóstico tardío o por la presencia de un tumor resistente a las terapias, los esquemas diagnósticos se complejizan

y se utilizan fármacos o terapias citotóxicas específicas para los distintos tipos de tumores de PCa, como se muestra en el modelo de progresión en espiral (**Figura 7**) (19,25,36).

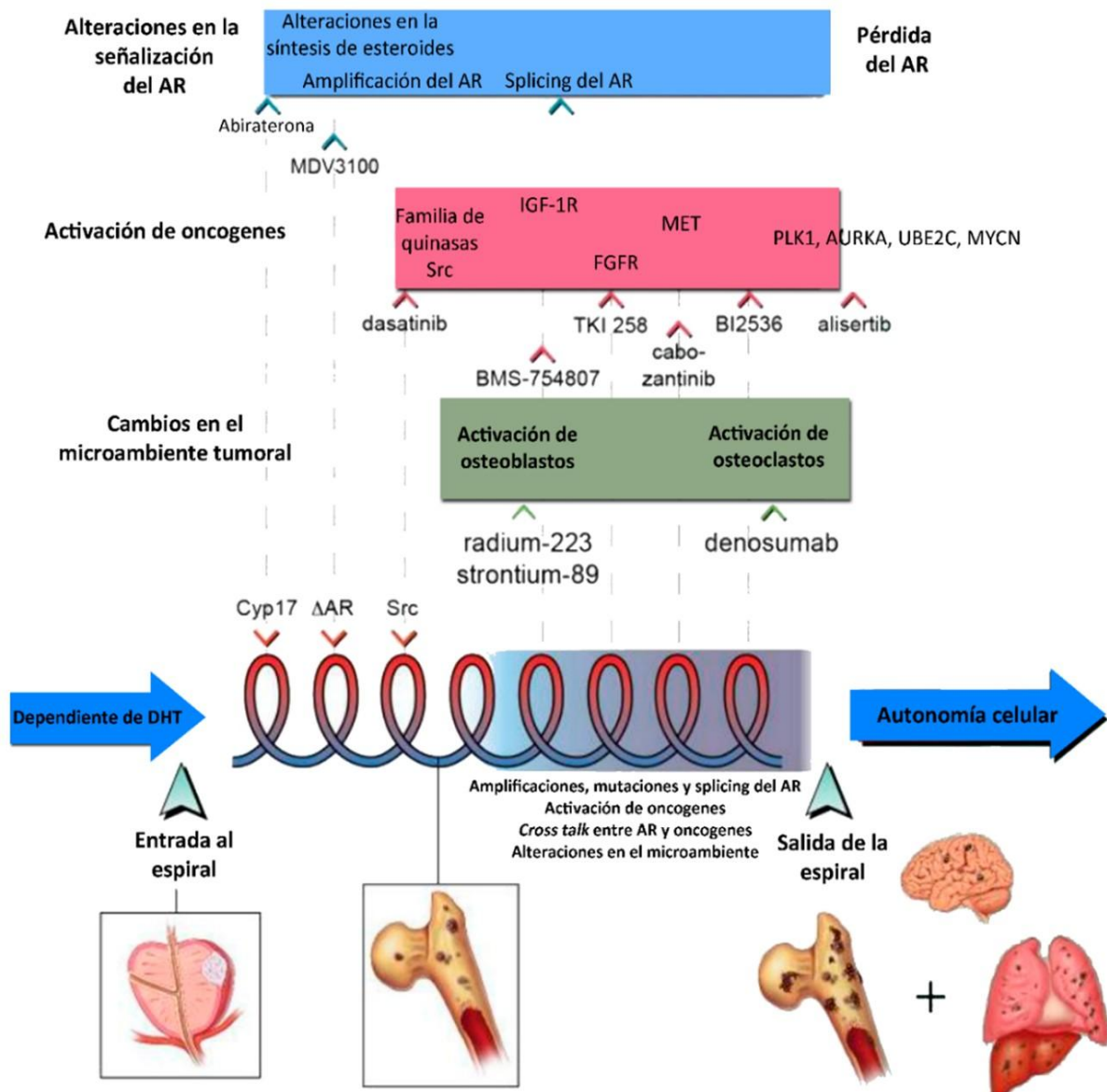


**Figura 7. Modelo de progresión en espiral del PCa.** El PCa comienza siendo dependiente de la DHT y responde a inhibidores de la 5- $\alpha$  reductasa, pero con el tiempo el tumor desarrolla resistencia, entrando en una fase de progresión impulsada por alteraciones en la señalización del AR, oncogenes y la pérdida de genes supresores de tumores. En fases más avanzadas, el tumor acumula mutaciones en AR, Retinoblastoma (RB) y p53, y presenta sobreexpresión de cinasa polo-like 1 (PLK1), aurora quinasa A (AURKA) y amplificación de oncogén MYCN, lo que le confiere autonomía y mayor capacidad invasiva. La terapia de privación androgénica es efectiva al principio, pero el PCa evoluciona hacia una forma resistente a la castración (CRPC), con diseminación preferencial al hueso.  $\Delta$ AR, variantes truncadas del receptor de andrógenos; Cyp17, citocromo P450 17A1; Src, protooncogén Src; IGF-1R, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1; MET, protooncogén MET; FGFR, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos; UBE2C, ubiquitina-conjugadora E2 C. Figura adaptada de Logothetis et al. (2013) (36).

## 2.vi PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA Y ROL DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El modelo de progresión del PCa plantea tres fases principales. En la primera, el tumor depende de la hormona DHT y responde a tratamientos con inhibidores de la 5- $\alpha$ R. Sin embargo, cuando deja de ser sensible a estos fármacos, entra en una fase de progresión caracterizada por una espiral ascendente, donde múltiples factores, como alteraciones en la señalización del AR, activación de oncogenes, reducción de la expresión de genes supresores de tumores y cambios en el microambiente, impulsan su avance. Cada ciclo del espiral está definido por biomarcadores predictivos que pueden ser blanco de terapias específicas. La duración de la respuesta a un tratamiento determina el tiempo que el tumor permanece en cada etapa antes de desarrollar resistencia y avanzar al siguiente nivel, donde surgen nuevas alteraciones que requieren estrategias terapéuticas diferentes. La salida de este espiral ocurre cuando el tumor acumula mutaciones como la pérdida de *AR*, *RB* o *p53*, junto con la sobreexpresión de *PLK1*, *AURKA* y la amplificación del proto-oncogen *MYCN*. En esta última fase, las células tumorales se independizan del microambiente y adquieren autonomía tumoral, lo que marca un estadio avanzado de la enfermedad que demanda enfoques terapéuticos dirigidos a sus características específicas (**Figura 7**) (36) .

El PCa se desarrolla y mantiene gracias a la acción de los andrógenos, por lo que su tratamiento inicial suele basarse en la terapia de deprivación androgénica (ADT), que busca inhibir la proliferación celular mediante la supresión de estas hormonas. Sin embargo, con el tiempo, el tumor puede adaptarse y evolucionar a una etapa más agresiva denominada PCa resistente a la castración (CRPC), en la cual las células dejan de depender de los andrógenos para su crecimiento. En esta fase, el epitelio luminal de la próstata se deteriora y las células adquieren una mayor capacidad invasiva, favoreciendo la diseminación del tumor. Aunque el PCa puede generar metástasis en órganos como los ganglios linfáticos, el hígado y los pulmones, el tejido óseo es su principal sitio de diseminación (37,38).

## 2.vii POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA

El PCa es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico, histológico y molecular. Más aún, los tumores primarios suelen caracterizarse por ser multifocales y estudios de secuenciación han demostrado que estos focos pueden ser clones independientes sin alteraciones genéticas compartidas, lo que podría sugerir que un mismo paciente puede presentar múltiples tumores primarios con diferencias genéticas y fenotípicas (39). En contraste, el PCa metastásico suele derivar de un solo clon del tumor primario, aunque puede mostrar heterogeneidad subclonal a nivel genómico, epigenético y fenotípico. Esta complejidad molecular representa un desafío para el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad. A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento, el curso clínico del PCa sigue siendo altamente variable, oscilando entre enfermedades indolentes y agresivas con metástasis (39).

### 2.vi.a. POLIMORFISMOS EN EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El AR es una proteína clave durante el desarrollo del PCa, razón por la cual el estudio de sus variantes resulta relevante (40,41). El gen del AR codifica una proteína de 110 kD compuesta por 919 aminoácidos que, al igual que otros receptores de esteroides, se caracteriza por tener un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de unión a ligandos o andrógenos (ABD) conservados, así como un dominio de transactivación N-terminal menos conservado que contiene dos segmentos polimórficos de repeticiones de trinucleótidos. Estos segmentos repetidos, formados por un número variable de repeticiones de poliglutamina (polyQ) y poliglicina, influyen en la actividad transcripcional de este receptor (**Figura 8**) (40,41).

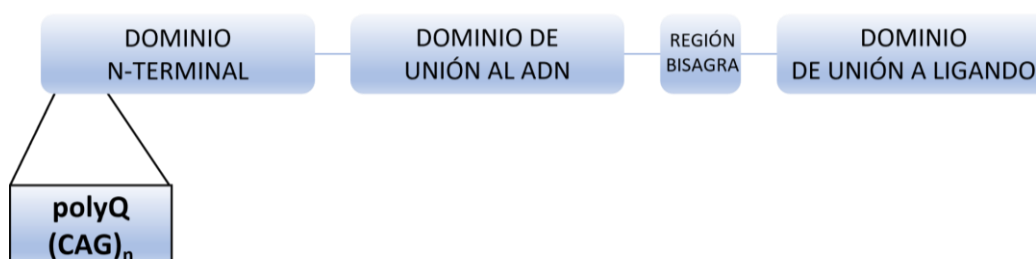


**Figura 8. Estructura del receptor de andrógenos.** El receptor de andrógenos está compuesto por varios dominios funcionales: un dominio N-terminal, un dominio de unión al ADN, una región bisagra y un dominio de unión a ligando. En el dominio N-terminal se encuentra una secuencia de repeticiones CAG,

*que codifican para una cadena de glutaminas (polyQ), cuyo número está relacionado con la capacidad de translocación a núcleo para ejercer su función como factor de transcripción (40,41).*

Se ha reportado que la longitud de esta secuencia se correlaciona inversamente con la actividad de transactivación (7,42–44) y, a su vez, se asocia con diversas patologías. Por ejemplo, en el cáncer de vejiga, los pacientes con alelos (CAG)<sub>n</sub> más cortos mostraron una supervivencia libre de recaídas específicas a 3 años significativamente reducida (45) mientras que en cáncer de mama las repeticiones más cortas en uno o ambos alelos se correlacionaron positivamente con el grado histológico (46). En PCa, se ha evaluado la relación entre la longitud de este microsatélite y el desarrollo de la enfermedad y se ha sugerido que los alelos cortos son factores de riesgo (47). No obstante, los resultados obtenidos difieren según la población analizada, lo que hace que la correlación entre la longitud del microsatélite (CAG)<sub>n</sub> y las características clinicopatológicas varíe entre cohortes (48,49). Esta heterogeneidad destaca la relevancia de los estudios poblacionales y la necesidad de enfoques regionales en el análisis de biomarcadores pronósticos.

## **2.vi.b. POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA REPARACIÓN DEL ADN**

Como se mencionó anteriormente, existe la predisposición genética a desarrollar PCa por la presencia de diversas mutaciones o alteraciones genéticas en genes de reparación del DNA como el gen Mutado en Ataxia Telangiectasia (ATM) o los genes de cáncer de mama (*BRCA1* y *BRCA2*) que predisponen el desarrollo del PCa (50). Así, en cuanto a mecanismos de reparación del ADN se puede destacar a la Endonucleasa 1 de sitios apurínicos/apirimidínicos del ADN (APE1), codificada por el gen *APEX1*, que juega un papel crucial en la vía de reparación por escisión de bases (BER) (51). APE1 y otras enzimas de BER son reclutadas a los elementos de respuesta a andrógenos para modular la transcripción de los genes blanco de AR, un mecanismo desencadenado por daño en el ADN debido a especies reactivas de oxígeno (ROS) (52). El gen *APEX1* presenta una variante de nucleótido único (SNV) que resulta en un cambio de aminoácido en el residuo 148 (c.444T>G; p.Asp148Glu). Se ha reportado que esta variante no afecta las actividades de *APEX1* de endonucleasa ni de unión al ADN (53). Curiosamente, existen reportes que asocian a este polimorfismo con un aumento en el riesgo de desarrollar PCa en una cohorte brasileña (54) y en pacientes de ascendencia asiática y mixta (47). Por otro lado, no se han demostrado asociaciones significativas entre esta SNV y el riesgo de PCa en

hombres caucásicos y afroamericanos (55), ni en pacientes del norte de India (56,57). Además, otros estudios reportaron que no hay asociaciones significativas entre el desarrollo de PCa y el polimorfismo de *APEX1* por sí mismo, pero que la combinación de *APEX1* c.444T>G con la proteína 1 de reparación cruzada de complementación del grupo X (XRCC1) p.399R>Q mostró un mayor riesgo de desarrollar PCa en hombres caucásicos (58).

## 2.viii METÁSTASIS ÓSEA

El hueso es el sitio más frecuente donde se genera metástasis en pacientes con PCa, con el 90% de los PCa metastásicos exhibiendo diseminación en este sitio (59–61). La metástasis ósea del PCa ocurre a través de múltiples etapas que incluyen la transformación celular, la angiogénesis, la invasión del microambiente circundante y la migración de las células tumorales desde el sitio primario hacia tejidos distantes (62–64). Durante este proceso, las células tumorales deben atravesar la ECM y las células estromales (62–64). Posteriormente, ingresan a los capilares sanguíneos mediante intravasación, donde deben sobrevivir bajo condiciones adversas en la circulación. Solo aquellas células que logran sobrevivir pueden extravasar, colonizar el tejido óseo y proliferar en su nuevo microambiente (61–64).

Fisiológicamente, en el hueso ocurren dos procesos: la formación y la resorción ósea. Dichos procesos dependen de un equilibrio preciso entre la actividad de los osteoblastos, que generan nuevo tejido óseo, y los osteoclastos, encargados de su degradación, y están finamente regulados por factores ambientales, señales hormonales, modificaciones epigenéticas y estímulos mecánicos (65).

A nivel molecular, el establecimiento de metástasis óseas está influenciado por gradientes de quimiocinas producidas por el hueso. En particular, las células tumorales diseminadas (CTDs) viajan a través del sistema vascular y se dirigen al hueso gracias a la interacción de sus receptor 4 de quimiocinas (CXCR4) con el ligando 12 de quimiocinas (CXCL12) secretado por células del microambiente óseo (66). Luego de la extravasación, factores osteoblásticos y otras señales exógenas pueden inducir a las CTDs a entrar en un estado de latencia en el nicho osteoblástico o perivascular o favorecer su progresión metastásica (66). Particularmente, la reactivación de las células tumorales latentes puede ocurrir de manera dependiente de osteoclastos. Una vez

activadas, las células tumorales pueden iniciar un remodelado anómalo de la arquitectura ósea, generando el ciclo vicioso de la metástasis ósea (**Figura 9**) (66).

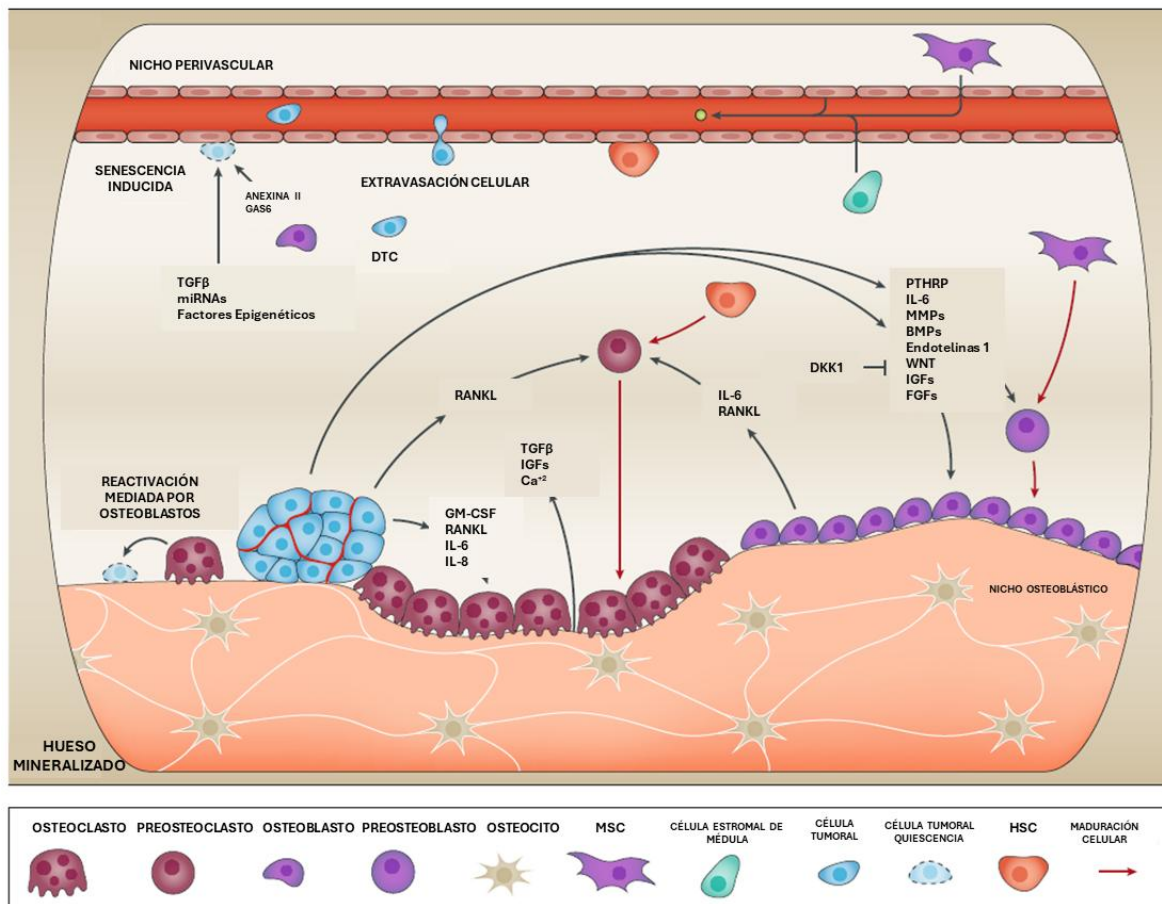


**Figura 9. Mecanismos fisiopatológicos y moleculares involucrados en la metástasis ósea.** Las células tumorales son atraídas por quimiocinas tales como CXCR4 y CXCL12 y, luego de su paso a través de la vasculatura, llegan al nicho óseo. En el microambiente óseo interactúan con osteoblastos y osteoclastos. Una vez establecidas en el nicho óseo, las células tumorales interactúan con las células óseas a través de factores solubles. Ca<sup>2+</sup>, ion calcio; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; GAS6, proteína específica del arresto del crecimiento 6; miRNAs, microARNs; DKK1, inhibidor Dickkopf-1 de la vía Wnt; MSC, células madre mesenquimales; HSC, células madre hematopoyéticas; WNT, familia de proteínas Wnt. Figura adaptada de Berish et al (2018) (66).

Este ciclo vicioso es impulsado por la liberación de factores de crecimiento desde la matriz ósea durante los procesos de remodelación, y sostiene el desarrollo de las metástasis (66). Aproximadamente el 90 % de las proteínas que componen la matriz del hueso corresponde al colágeno, mientras que el 10 % restante incluye una variedad de factores de crecimiento como los IGFs (factores de crecimiento similares a la insulina), TGF-β (factor de crecimiento transformante beta), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), PDGF (factor de crecimiento

derivado de plaquetas) y las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) (**Figura 9**) (67–69). Dentro de estos, el TGF- $\beta$  representa el segundo factor más abundante almacenado en el hueso, y cumple un rol clave en la promoción de factores osteolíticos. En células madre hematopoyéticas y osteoblastos, el TGF- $\beta$  estimula la expresión del ligando RANKL (activador del receptor del factor nuclear kappa B) y suprime la producción de osteoprotegerina (OPG), que normalmente actúa como un receptor señuelo de RANKL (70). La unión de RANKL a su receptor RANK (receptor del factor nuclear kappa B), presente en osteoclastos, activa a estas células, lo que desencadena la resorción ósea y la liberación de factores como TGF- $\beta$ , los cuales retroalimentan el proceso favoreciendo la progresión tumoral. En el microambiente metastásico, caracterizado por niveles elevados de TGF- $\beta$ , OPG pierde su eficacia inhibitoria, perpetuando así el ciclo vicioso de las metástasis óseas (**Figura 9**) (71).

Adicionalmente, el tropismo del PCa hacia el tejido óseo también se ve facilitado por la expresión de integrinas como la  $\alpha v \beta 3$  en células tumorales (62). Esta integrina permite su adhesión a componentes de la matriz ósea tales como colágeno, fibronectina, vitronectina y osteopontina (OPN), favoreciendo el crecimiento tumoral en el hueso (62). La interacción OPN- $\alpha v \beta 3$  activa diversas vías de señalización que involucran a RANKL, a la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) y a la interleuquina 8 (IL-8), todas ellas asociadas al aumento de la resorción ósea (**Figura 9**) (72).

A su vez, los osteoblastos interactúan extensamente con las células tumorales, desempeñando un rol dual, ya que pueden tanto promover la metástasis como inducir la latencia de las células tumorales en el hueso, evitando su proliferación activa (63). Entre las células óseas y las CTDs se establece una comunicación en ambos sentidos que es crítico para el crecimiento del tumor metastásico (73–76). De esta interacción emerge el concepto de osteomimetismo de las células prostáticas provenientes del tumor, que se refiere a los cambios a nivel molecular y fenotípico que experimentan las CTDs al comenzar a expresar proteínas similares a las del hueso y modulan la inducción de osteoclastos y osteoblastos (**Figura 9**) (62,77–79) .

Cabe destacar que la mayoría de las lesiones óseas metastásicas en el PCa presentan un fenotipo osteoblástico (esclerótico), lo que conduce a la formación de hueso reticulado que es mecánicamente inestable. Se postula que este proceso está regulado por un cambio

molecular que inclina el balance hacia una respuesta osteoblástica, predominante en las metástasis óseas del PCa aunque dependiendo el tipo tumoral las lesiones óseas pueden ser mixtas, es decir, tanto osteoblásticas como osteolíticas (66,80–82).

## 2.ix HALLMARKS DEL CÁNCER Y CÁNCER DE PRÓSTATA

### 2.ix.a HALLMARKS DEL CÁNCER

En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron que la progresión tumoral depende de la adquisición de características específicas, denominadas "*hallmarks* del cáncer" (83). Entre ellas se encuentran: la capacidad de proliferar de manera sostenida, evadir señales de inhibición del crecimiento, resistencia a la apoptosis, inducir la formación de vasos sanguíneos, mantener una replicación ilimitada y desarrollar mecanismos para invadir tejidos y generar metástasis (83) (**Figura 10A**).

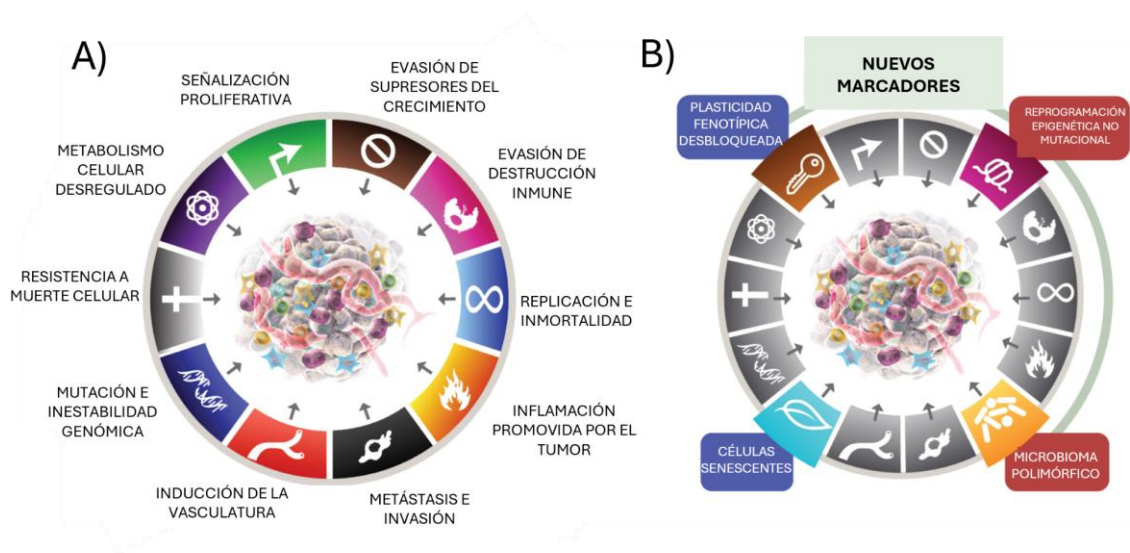


**Figura 10. Hallmarks del cáncer. A)** Características funcionales que adquieren las células tumorales durante la progresión tumoral propuestas por Hanahan y Weinberg. **B)** Ampliación del concepto de hallmarks del cáncer. Figura adaptada de Hanahan (2022) (84).

En 2011, los mismos autores ampliaron este concepto incorporando nuevos elementos que influyen en la biología tumoral. En particular, añadieron la alteración del metabolismo celular y la evasión del sistema inmune como rasgos emergentes del cáncer, junto con la inestabilidad genómica y la inflamación crónica, que facilitan la progresión de la enfermedad al promover

la aparición de otras alteraciones propias del proceso neoplásico (85) (**Figura 10B**).

La transformación de una célula normal en una célula cancerígena implica cambios acumulativos que le otorgan ventajas adaptativas. Estos mecanismos no solo permiten su supervivencia en distintos microambientes, sino que también favorecen su diseminación y la progresión de la enfermedad (85).

## **2.ix.b METABOLISMO TUMORAL**

Uno de los pilares fundamentales en la investigación del metabolismo tumoral fue postulado por Otto Warburg en 1924 y actualmente se conoce como el "efecto Warburg". Este fenómeno describe cómo las células tumorales, a pesar de estar en presencia de oxígeno, favorecen la conversión de glucosa en lactato a través de la glucólisis aeróbica en lugar de utilizar la fosforilación oxidativa (OXPHOS) mitocondrial. Aunque este mecanismo es menos eficiente en términos de generación de adenosin trifosfato o ATP (2 moléculas de ATP por glucólisis vs. 38 en OXPHOS), se ha propuesto que su sobreactivación permite a las células tumorales generar intermediarios metabólicos esenciales para la síntesis de macromoléculas y la producción de poder reductor en forma de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido o NADPH (86,87). Este proceso se acompaña de un aumento en la captación de glucosa, lo que compensa la menor producción de ATP por vía glucolítica (88,89) (**Figura 11**).

Como se mencionó anteriormente, Hanahan y Weinberg identificaron la desregulación del metabolismo energético como uno de los *hallmarks* establecidos del cáncer (85). Las células tumorales con alta tasa de proliferación requieren adaptaciones metabólicas que les permitan: (1) generar ATP de manera rápida para suplir los requerimientos energéticos, (2) incrementar la biosíntesis de macromoléculas esenciales para el crecimiento celular y (3) preservar el equilibrio redox intracelular (87). Para lograr estos objetivos, los tumores reconfiguran el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, permitiendo así su crecimiento descontrolado (**Figura 11**).

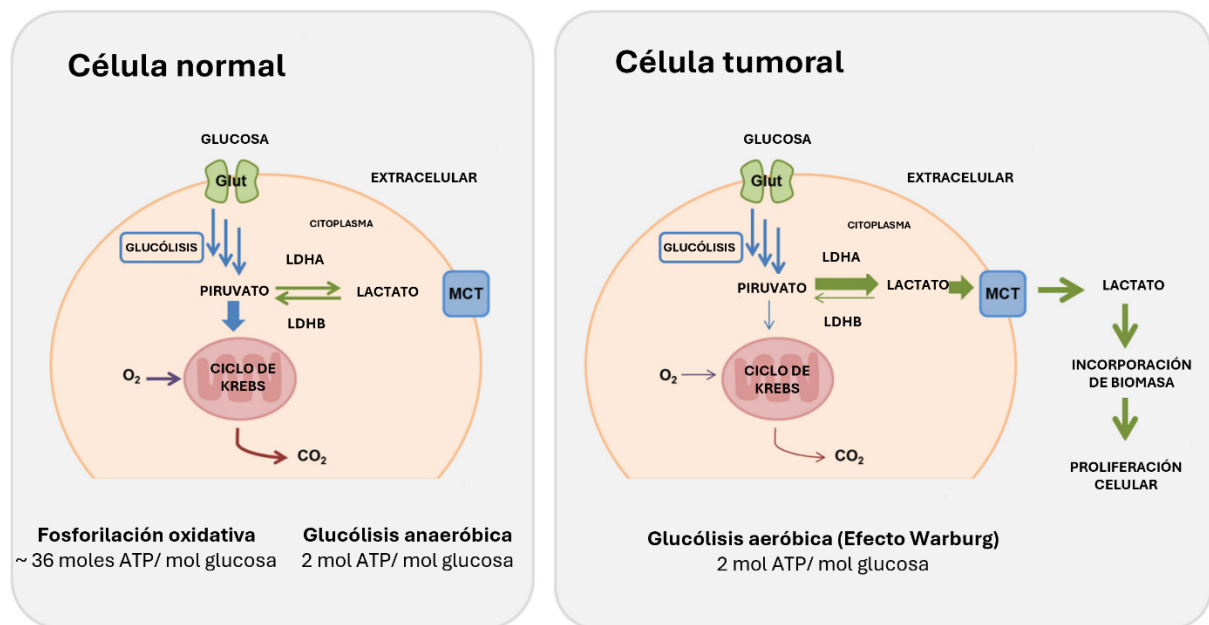


**Figura 11. Efecto Warburg.** Las células tumorales (panel derecho) presentan un metabolismo glucolítico aumentando aún en condiciones aeróbicas, aumentando la producción de lactato a diferencia de una célula no tumoral (panel izquierdo) donde en condiciones aeróbicas la ruta principal para el metabolismo de la glucosa es la fosforilación oxidativa. GLUT: transportador de glucosa; MCT: transportador de monocarboxilatos y LDHA: isoforma A de la enzima lactato deshidrogenasa. Figura adaptada de Kim y Baek (2021) (87,90).

Por otro lado, el microambiente tumoral se caracteriza por presentar condiciones de hipoxia, donde los niveles de oxígeno oscilan entre 0 y 2%. En este contexto, el factor de transcripción inducible por hipoxia tipo 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) desempeña un papel crucial en la adaptación celular, promoviendo la activación de la vía glucolítica bajo condiciones de baja disponibilidad de oxígeno (91). Sin embargo, algunos tumores presentan una activación constitutiva de HIF-1 $\alpha$ , incluso en normoxia, debido a diferentes mecanismos que implican la hiperactivación del complejo 1 del *target* de rapamicina en mamíferos (mTORC1), la pérdida del gen von Hippel-Lindau, la acumulación de ROS y de metabolitos del ciclo de Krebs, producto de mutaciones en las enzimas succinato deshidrogenasa (SDH) y fumarato hidratasa (FH) (92).

## 2.ix.b.i METABOLISMO PROSTÁTICO FISIOLÓGICO Y TUMORAL

La glándula prostática cumple un rol fundamental para mantener la viabilidad de los espermatozoides al producirse en ella el PSA y metabolitos como el citrato. La alta concentración de citrato en la próstata se debe a la inhibición de la enzima aconitasa (ACO2) en el ciclo de Krebs, lo que impide su conversión a isocitrato y su posterior oxidación. Este

mecanismo es posible gracias a los elevados niveles de Zinc ( $Zn^{+2}$ ) presentes en las células prostáticas que inhiben la actividad de ACO2, bloqueando la metabolización del citrato y favoreciendo su acumulación en el fluido prostático (93,94) (**Figura 12A**).

Sin embargo, cuando las células prostáticas adquieren características tumorales, los niveles intracelulares de  $Zn^{+2}$  caen debido a una disminución en los niveles del transportador de  $Zn^{+2}$  (ZIP1), lo que revierte la inhibición sobre ACO2 (95–97). Este cambio metabólico favorece la progresión tumoral, ya que las células neoplásicas pueden recuperar la eficiencia de la OXPHOS y obtener energía de manera más eficiente para sostener su crecimiento descontrolado (95–97). Es importante resaltar que si bien el efecto Warburg no es dominante en estadios iniciales del PCa, sí es observado tanto en el PCa localizado como en la enfermedad avanzada o lesión metastásica. En esta última, también suele observarse una persistencia en la activación del Ciclo de Krebs/ OXPHOS. (**Figura 12B-C**) (95–97) .

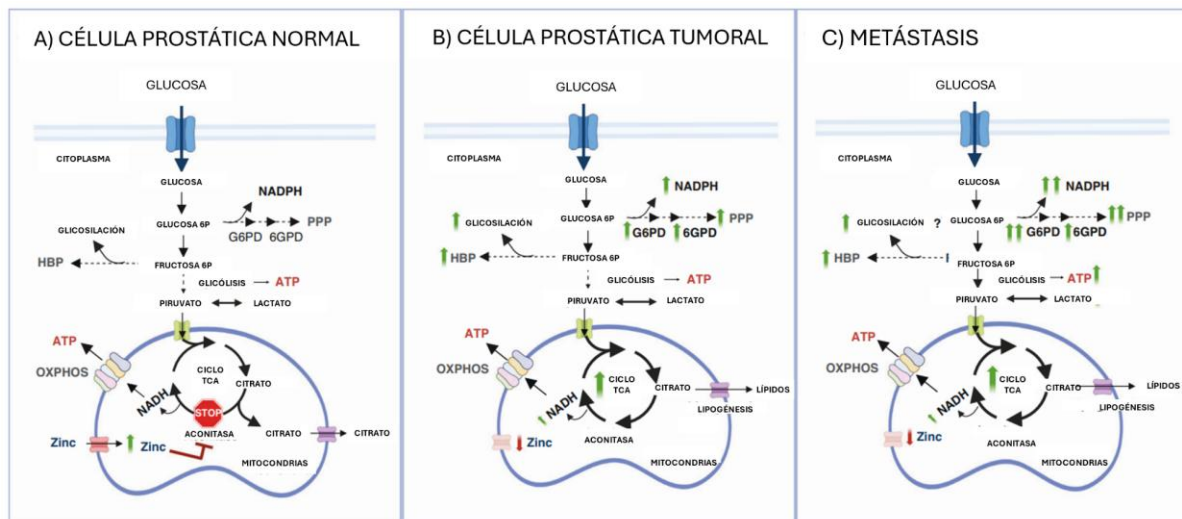


**Figura 12. Reprogramación metabólica en el PCa. A)** Metabolismo de una célula prostática normal donde la enzima ACO2 se encuentra inhibida por la elevada concentración de  $Zn^{+2}$  lo que genera acumulación de citrato. **B)** Célula tumoral prostática donde los bajos niveles de  $Zn^{+2}$  restauran el Ciclo de Krebs mediada por la activación de ACO2. **C)** Célula prostática metastásica donde se exagera tanto la glucólisis como la OXPHOS. PP, vía de las pentosas fosfato; HBP, vía de biosíntesis de hexosaminas; G6PD, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido reducido; TCA, ciclo del ácido tricarboxílico; 6P, 6-fosfato. Figura adaptada de Pujana-Vaquerizo (2024) (96).

### 3. HEMO OXIGENASA-1

La progresión tumoral se produce en el contexto de un microambiente inflamatorio constituido por el infiltrado de células del sistema inmune innato y adaptativo, tales como macrófagos, mastocitos, neutrófilos, células dendríticas y ciertas subpoblaciones de linfocitos T y B (98,99). Este contexto brinda a las células tumorales factores de crecimiento que estimulan su proliferación y supervivencia bajo altos niveles de ROS (85,100–104).

Particularmente, la próstata es considerada un órgano inmunocompetente con bajos niveles de células inmunes (2). La inflamación en esta glándula se asocia con el daño en células epiteliales y estromales y es mediada por citoquinas y factores de crecimiento (2). A su vez, se ha observado que el PCa puede ser producto de la inflamación crónica causada por agentes infecciosos o factores ambientales (105).

#### 3.i ACTIVIDAD CANÓNICA DE HEMO OXIGENASA-1

Hemo oxigenasa-1 (HO-1) es una enzima caracterizada por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (106). Su actividad canónica consiste en la degradación del grupo hemo, catalizando su conversión en biliverdina, monóxido de carbono (CO) y hierro libre. La biliverdina es posteriormente reducida a bilirrubina por la biliverdina reductasa (BVR) y el ion ferroso es captado por la ferritina (106) (**Figura 13**). En cuanto a su localización subcelular, HO-1 se ubica en el retículo endoplasmático liso como una proteína integral de membrana (107).

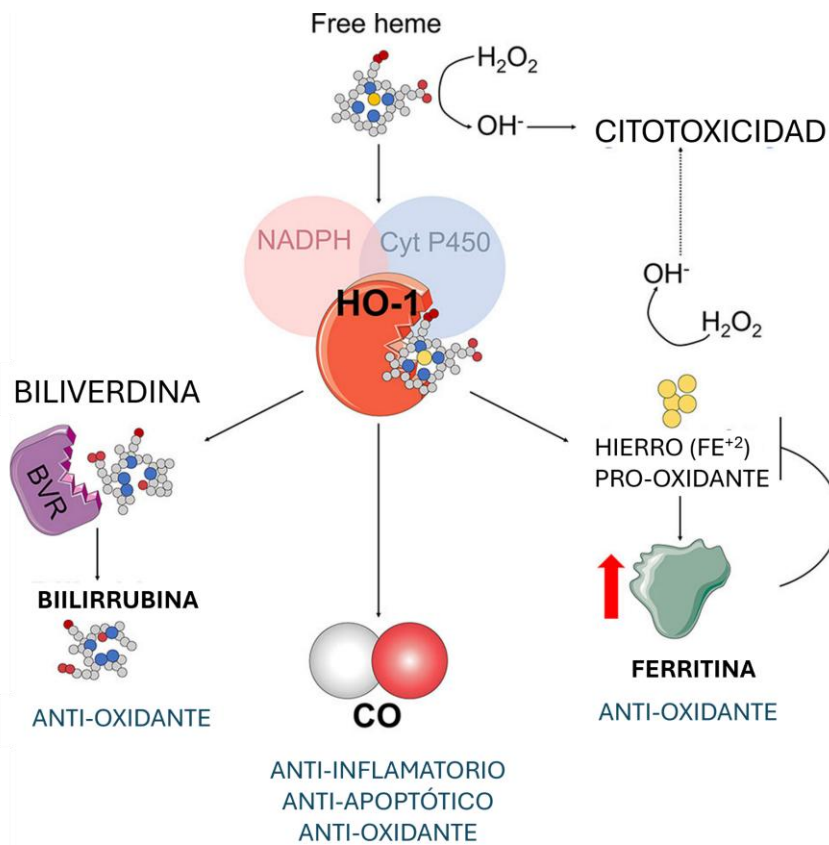


**Figura 13. Hemo oxigenasa-1.** La actividad enzimática de HO-1 consiste en la degradación del grupo hemo en biliverdina (transformada a bilirrubina por la BVR), hierro y monóxido de carbono (CO). Figura adaptada de Di Pietro et al (2020) (108).

La inducción de HO-1 ocurre en respuesta a distintos factores de estrés celular, tales como citoquinas, radiación ultravioleta, hipoxia y exposición a metales pesados, entre otros (109,110). En particular, en condiciones de estrés oxidativo, la liberación del grupo hemo a partir de las hemoproteínas puede generar ROS, contribuyendo al daño celular y la apoptosis. En este contexto, la inducción de HO-1 es un mecanismo citoprotector, degradando el grupo hemo y atenuando el daño oxidativo. Sus productos de degradación, CO y biliverdina, han demostrado poseer propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, respectivamente, desempeñando un papel clave en la homeostasis celular y en la reducción de la injuria oxidativa e inflamatoria (110–113).

### 3.ii HO-1 Y SU ROL EN EL CÁNCER

Diversos estudios han reportado una sobreexpresión de HO-1 en distintos tipos de tumores, incluyendo linfoma, PCa, tumores cerebrales, hepatoma, glioblastoma, melanoma,

sarcoma de Kaposi, cáncer de páncreas y leucemia mieloide crónica (91–94). Sin embargo, el papel de HO-1 en el desarrollo tumoral sigue siendo un tema de debate, ya que su implicancia parece depender del tipo de cáncer y del estado genético de las células tumorales. Mientras que en algunos contextos su actividad citoprotectora puede contribuir a la progresión tumoral y la resistencia a terapias, en otros modelos ha demostrado efectos antitumorales al reducir el daño oxidativo y la inflamación (110). Por lo tanto, comprender las funciones específicas de HO-1 en cada tipo de cáncer es fundamental para evaluar su potencial como un blanco terapéutico en patologías asociadas al estrés oxidativo y la inflamación.

En nuestro laboratorio demostramos la localización nuclear de HO-1 en carcinomas primarios de próstata humanos (114,115). En líneas de PCa confirmamos que la sobreexpresión de HO-1 inhibe la proliferación, invasión y migración celular (114,116). Mediante ensayos *in vivo*, demostramos que HO-1 retarda el crecimiento de tumores xenotransplantados y reprime la expresión de genes asociados a inflamación y angiogénesis (114,116). Por otro lado, constatamos que mayores niveles de *HMOX1* (gen que codifica para HO-1) están asociados a una menor expresión de *VEGFA* (gen que codifica para el factor de crecimiento vascular y endotelial A), *VEGFC* (gen que codifica para el factor de crecimiento vascular y endotelial C), *HIF1 $\alpha$*  e *ITGA5* (gen que codifica para la integrina  $\alpha 5\beta 1$ ), lo cual concuerda con una menor vascularización de los citados tumores (116). A su vez, nuestro grupo ha reportado la interacción física entre HO-1 y STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3), en la que la enzima interferiría en la vía de señalización de este factor de transcripción al retenerlo en el citoplasma tanto *in vitro* como *in vivo* y, en consecuencia, evitaría la actividad transcripcional de genes blanco, como el AR (117). Además, proporcionamos evidencia de un mecanismo novedoso que regula la transcripción de *HMOX1* en PCa, mediado por BRCA1. Dicha proteína, con la cooperación de NRF2 (factor asociado a factor nuclear eritroide 2), se une al promotor de *HMOX1* e induce su expresión en líneas celulares de PCa, demostrando su rol en el mantenimiento de la homeostasis celular en PCa (118). Demostramos que la expresión y la localización sub-celular de E-cadherina y  $\beta$ -catenina son moduladas por HO-1, lo que impacta en la morfología y las propiedades adhesivas de la célula tumoral prostática (119). También observamos que la inducción de HO-1 modifica la expresión de diversos genes relacionados con el citoesqueleto y se vincula con factores clave que promueven la reorganización de los filamentos de actina en los filopodios (120). Esta reorganización

favorece una mayor adhesión entre células tumorales, en lugar de potenciar su capacidad migratoria e invasiva. Nuestros resultados indican que, en contra de lo que se podría suponer, un mayor número de filopodios por célula no se asocia con un fenotipo de mayor movilidad (120). Por otro lado, a nivel metabólico demostramos que el tratamiento con hemina, un inductor específico de HO-1 altera significativamente su perfil metabólico, reduciendo la captación de glucosa, la producción de ATP, la actividad de la LDH y los niveles extracelulares de lactato (121). También comprobamos que el pre-acondicionamiento con hemina impacta significativamente en el desarrollo de tumores prostáticos xenotransplantados en ratones aumentando la latencia tumoral y disminuyendo la tasa inicial de crecimiento (122). Teniendo en cuenta que el PCa muestra graves complicaciones originadas por las metástasis óseas, demostramos por primera vez el efecto directo del gen *Hmox1* y por lo tanto de HO-1 sobre el recambio y remodelamiento óseo, y mostramos que su modulación, tanto en las células tumorales de próstata como en células óseas, cambia su comunicación alterando el nicho tumoral del hueso (123). Todos estos resultados confirman que HO-1 es un partícipe clave en la carcinogénesis y en la progresión tumoral.

## **4. MONÓXIDO DE CARBONO**

### **4.i FISIOLÓGÍA DEL MONÓXIDO DE CARBONO**

El CO fue identificado por primera vez en condiciones fisiológicas en 1923, cuando Sayers y colaboradores detectaron su presencia en individuos sanos utilizando el método de ácido pícrico para la determinación cuantitativa de CO en sangre y aire (124). Posteriormente, en 1968, Tenhunen, Marver y Schmid demostraron que la enzima HO-1 es responsable de la degradación del hemo y la encargada de contribuir con alrededor del 86% de la producción endógena de CO (124). El CO es considerado dentro del grupo de los gasotransmisores, un término introducido en 2002, englobando al CO, el óxido nítrico (NO) y al sulfuro de hidrógeno, por su importancia en la regulación del sistema nervioso (124).

Una de las principales características del CO es que posee una afinidad 245 veces mayor por la hemoglobina, particularmente por el hierro del grupo hemo, que la que posee el oxígeno. Así, el CO compite con el O<sub>2</sub> por la unión a los átomos de hierro de la hemoglobina y forma la

carboxihemoglobina (Hb-CO), interfiriendo con la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre (125).

En condiciones fisiológicas normales, la tasa de producción endógena de CO resulta en concentraciones celulares muy bajas —de picomolares a nanomolares— que pueden aumentar varias veces debido al recambio del hemo. En contraste, el CO exógeno puede incrementar el contenido celular de CO entre 20 y 50 veces (126).

El CO cumple diversas funciones a nivel fisiológico, tales como funciones citoprotectoras, como la inhibición de la apoptosis, la inhibición de la proliferación celular y actividad antiinflamatoria (125). Al igual que el NO, el CO también puede activar la vía Guanilato ciclasa soluble/Guanosín monofosfato cíclico (sGC/cGMP) (125). En algunos casos el CO puede antagonizar la activación mediada por NO de la sGC (125,127). Su capacidad antiinflamatoria se debe, en parte, a la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias, mientras que al mismo tiempo promueve varias citoquinas antiinflamatorias, lo que se asocia con la activación de la vía de señalización independiente de cGMP en las células (126). El efecto directo del CO en la mediación de estas respuestas protectoras es diverso. Se ha demostrado que el CO modula sus efectos sobre la guanilato ciclasa, la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), PI3K–Akt, los transductores de señales y los activadores de transcripción (STAT) y HIF1- $\alpha$  (125,126,128). En macrófagos, tanto *in vivo* como *in vitro*, el CO inhibe la expresión de citoquinas proinflamatorias inducidas por lipopolisacárido (LPS), como el factor de necrosis tumores alfa (TNF $\alpha$ ), interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y la proteína inflamatoria de macrófagos MIP-1 $\alpha$ ), pero aumenta la expresión de la interleuquina antiinflamatoria IL-10 (125). Por otro lado, también se ha implicado al CO en la regulación de factores de transcripción basados en el hemo (129). Más recientemente, se ha propuesto que el CO regula factores de transcripción sensibles a gases, para los cuales la unión de CO al grupo hemo mejora la unión al ADN y activa la transcripción génica. Al menos dos factores de transcripción basados en el hemo han demostrado ser sensibles al CO, como el complejo entre la proteína 2 con dominio PAS neuronal y la proteína 1 similar a ARNT (NPAS2-BMAL1) modulando por ejemplo el ciclo circadiano (126,129).

En el contexto patológico, el CO ha mostrado efectos protectores en modelos de isquemia/reperfusión, trasplante de órganos y enfermedades inflamatorias (125). En el asma,

los niveles de CO exhalado aumentan durante las crisis asmáticas, disminuyendo tras el tratamiento con corticosteroides (130,131). En la anemia falciforme, también se han registrado concentraciones elevadas de CO exhalado, en correlación con la hemólisis y el estrés oxidativo característicos de esta patología (130,132). Estos hallazgos indican que el CO no solo refleja procesos fisiopatológicos subyacentes, sino que también podría utilizarse para monitorear la progresión de la enfermedad y la eficacia de las intervenciones terapéuticas. Además, la posibilidad de medir el CO de forma no invasiva en el aliento lo posiciona como una herramienta clínica prometedora en el seguimiento de pacientes y en estudios que involucren la administración controlada de CO o de moléculas liberadoras de CO (CO-RMs) (130). El CO también bloquea la proliferación celular de varios tipos celulares, incluidas distintas líneas tumorales, las células T y las células musculares lisas vasculares (125).

#### 4.ii MOLÉCULAS LIBERADORAS DE MONÓXIDO DE CARBONO (CO-RMs)

Las CO-RMs son una clase de compuestos organometálicos que se desarrollaron con el fin de liberar cantidades controladas de CO a las células y a los tejidos (130,133–136) (**Figura 14**). A su vez, al liberar uno de los productos de degradación del hemo, han sido utilizadas para mimetizar la función de HO-1 (130,133–136). La presencia de grupos carbonilos o carboxilos unidos a metales de transición facilita la capacidad de las CO-RMs de transferir CO intracelularmente y amplifica las vías de transducción de señales mediadas por CO. Las CO-RMs han surgido por sus sorprendentes propiedades antiinflamatorias, que pueden ser el resultado de las múltiples actividades de los carbonilos metálicos en el control de la señalización redox, el estrés oxidativo y la respiración celular (136). En este contexto, la investigación sobre las actividades químicas y biológicas de las CO-RMs se ha intensificado, posicionándose por su potencial terapéutico frente a diversas afecciones (130,133–136).

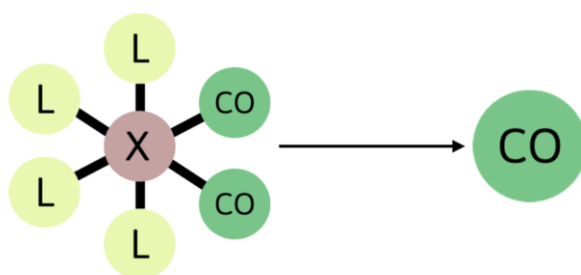
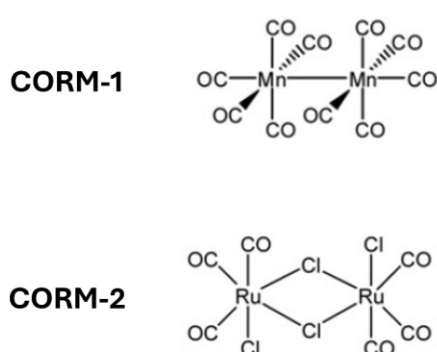


**Figura 14. Estructura de las moléculas liberadoras de monóxido de carbono.** Se esquematiza la estructura de las CO-RMs donde un átomo central (X) que puede ser un metal, metal de transición o metaloide está unido a distintos ligandos (L) y grupos que liberan CO.

Las CO-RMs han cambiado su configuración a lo largo de los años. En un primer momento se desarrollaron CO-RMs conteniendo manganeso (CORM-1 o  $\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}$ ) o rutenio (CORM-2 o  $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ ) como átomo central de coordinación, siendo ambas CO-RMs solubles en dimetilsulfóxido (DMSO) y otros solventes orgánicos como el etanol (137). Posteriormente se desarrollaron CO-RMs solubles en agua como lo son la CORM-3 que es un tricarbonilcloro (glicinato) de rutenio(II) ( $\text{Ru}[\text{CO}]_3\text{Cl}$ -glicinato) (133), la CORM-A1 un borano-carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{H}_3\text{BCO}_2$ ) (134) y la CORM-401 basada en manganeso [ $\text{Mn}(\text{CO})_4\{\text{S}_2\text{CNMe}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})\}$ ] (Figura 15) (135,138,139).

**A) CO-RMs solubles en solventes orgánicos**



**B) CO-RMs solubles en agua**

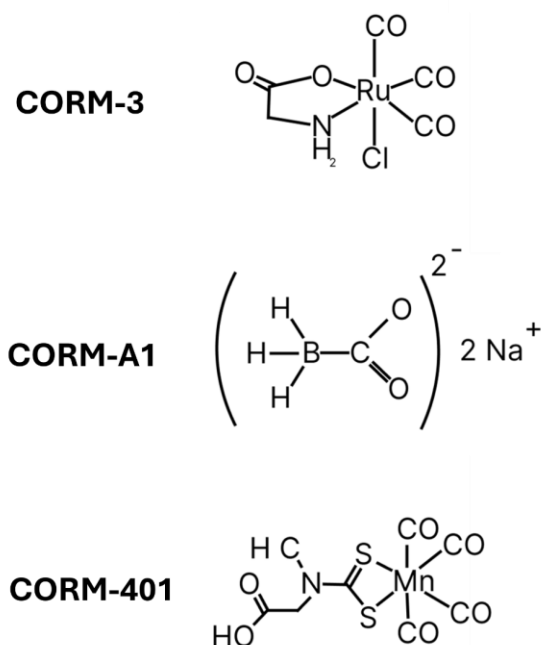


**Figura 15. Moléculas liberadoras de monóxido de carbono.** Se esquematizan las distintas CO-RMs desarrolladas. Las CORM-1 y CORM-2 presentan solubilidad en solventes orgánicos como DMSO y etanol, en cambio, las CORM-3, CORM-A1 y CORM-401 son hidrosolubles (139,140).

Cada CO-RM presenta diferentes características en cuanto a su cinética y la cantidad de CO liberado en solución. La primera CO-RM desarrollada, la CORM-1, tiene una vida media de menos de un minuto y libera un mol de CO por cada mol de molécula (139). La CORM-2, posee una vida media de aproximadamente un minuto, liberando 0,75 moles de CO por mol de

molécula (139). En cuanto a las CO-RMs solubles en agua, la CORM-3 también tiene una vida media de un minuto y libera un mol de CO por mol de molécula (139). La CORM-A1 tiene una vida media de 21 minutos y libera un mol de CO por mol de molécula (139). Por último la CORM-401 presenta una vida media de 21 minutos y libera 3 moles de CO por mol de molécula (138). Como puede observarse, estos compuestos muestran variabilidad tanto en la cantidad de CO liberado como en la vida media, lo que influye en su comportamiento y potencial de liberación de CO (138,139,141).

#### **4.iii MONÓXIDO DE CARBONO Y CO-RMs COMO AGENTES TERAPÉUTICOS**

Tanto el CO como las CO-RMs han sido utilizados para probar sus efectos terapéuticos en un amplio espectro de patologías, incluso están siendo evaluadas en distintos ensayos clínicos (142).

Se han estudiado sus efectos en modelos animales de enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, infecciosas, metabólicas y oncológicas, observándose beneficios significativos en la modulación de la respuesta inmune, la prevención del daño tisular y la mejora de la función orgánica (130,143). En un modelo de colitis crónica en ratones, la administración continua de CO en forma gaseosa (250 ppm) previno la inflamación intestinal (144). De manera similar, en enterocolitis necrotizante en ratas, la exposición a 250 ppm de CO durante una hora diaria en neonatos, en los primeros tres días de vida, evitó la inflamación intestinal (145). En enfermedades infecciosas, se evaluó el efecto del CO en malaria cerebral en ratones, donde la administración de 250 ppm de CO tres días después de la infección previno el daño cerebral asociado a la enfermedad (146). En modelos de infecciones bacterianas en ratones, tanto la administración de CORM-3 como la de CORM-2, incrementó la supervivencia y potenció la respuesta antimicrobiana, mientras que la administración de CO gaseoso (250 ppm) evitó la insuficiencia multiorgánica inducida por infecciones por bacterias Gram positivas y negativas (147–149). En un modelo de asma y de hiperreactividad de las vías aéreas, la exposición a 250 ppm de CO por una hora diaria previno la broncoconstricción y la inflamación de las vías respiratorias (150). En modelos de enfermedades autoinmunes, la administración continua de 450 ppm de CO durante 30 días produjo reversión de la parálisis en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (151). En ratones con anemia falciforme, la administración de CO gaseoso (250 ppm, una hora

al día, tres veces por semana durante 10 semanas) previno la infiltración de leucocitos y la vasooclusión (130,143). En modelos de hipertensión ocular en conejos, se demostró que el tratamiento tópico con CORM-3 reduce la presión intraocular y la hipertensión ocular (152). Se demostró también que la CORM-A1 posee un efecto neuroprotector frente a convulsiones (153). Asimismo, en un modelo de fotocarcinogénesis en ratones, la aplicación tópica de CORM-2 redujo la inflamación aguda y crónica y el desarrollo tumoral (154). Utilizando un modelo de lesión térmica en ratones se ha observado que la administración de CORM-2 se asocia con una disminución en la infiltración de leucocitos y en la inflamación en pulmón, hígado, riñón e intestino delgado (155,156).

Los mencionados estudios resaltan el potencial terapéutico de las CO-RMs y el CO gaseoso en la regulación de la inflamación, la prevención del daño tisular y la modulación de la respuesta inmune en diversas patologías. Sin embargo, a pesar de estos hallazgos prometedores, son necesarios más estudios preclínicos y clínicos para determinar su seguridad y eficacia en humanos (130,139,142,157,158).

#### **4.iii.a MONÓXIDO DE CARBONO Y CO-RMs COMO AGENTES TERAPÉUTICOS EN CÁNCER**

Diversos estudios han demostrado el potencial antitumoral del CO como de las CORMs en distintos tipos de cáncer. En cáncer de mama, la administración de CORM-2 aumenta la expresión de la proteína p53, mientras que la liberación de CO inducida por luz en partículas endocitadas disminuye hasta en un 80% la viabilidad de las células MDA-MB-231 (159). En cáncer de cuello uterino, el CO provocó cambios morfológicos en las células, sugiriendo un estado apoptótico y un posible uso como agente anticancerígeno para cáncer de mama o cervical, con la ventaja de una liberación controlada de CO mediante luz (159). En células de cáncer de páncreas, el tratamiento con CORM-2 como con CO demostró un efecto antiproliferativo dosis dependiente (160,161). Por último, en PCa el uso de CORM-2 se asocia con una disminución en la viabilidad celular con un efecto dosis-dependiente (162).

En resumen, las CO-RMs han demostrado efectos antiproliferativos, proapoptóticos y antiangiogénicos en distintos modelos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, próstata, colon, cuello uterino, gástrico, páncreas, piel, pulmón y linfoma (163). Sin embargo, a pesar

de su mecanismo promotor de acción, su eficacia varía dependiendo del tipo celular y las condiciones experimentales. Por ello, se requieren estudios adicionales para comprender en profundidad su impacto en la progresión tumoral y optimizar su aplicación terapéutica (163).

Esta tesis se propone contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la progresión del PCa mediante una estrategia doble y complementaria. Por un lado, se analizan los efectos del CO liberado por las CO-RMs sobre células tumorales y su interacción con el microambiente óseo, evaluando su potencial como agentes terapéuticos multitarget. Por otro, se investiga el valor pronóstico de variantes genéticas germinales en genes clave como *AR* y *APEX1* en una cohorte de pacientes argentinos con PCa localizado, con el fin de optimizar la estratificación de riesgo clínico. En conjunto, ambos abordajes apuntan a generar evidencia experimental y clínica que favorezca el desarrollo de herramientas de medicina personalizada aplicables tanto al tratamiento como al pronóstico de esta enfermedad.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## PARTE I

### HIPÓTESIS

Uno de los factores principales asociados a la carcinogénesis prostática es la inflamación. En este contexto, la proteína HO-1 emerge como un blanco potencial en el PCa ya que mantiene la homeostasis celular y contrarresta el daño oxidativo e inflamatorio. En nuestro laboratorio demostramos que la inducción genética y farmacológica de HO-1 posee un potente efecto antitumoral en el PCa. Sin embargo, no podemos descartar que parte o la totalidad de los efectos beneficiosos de la inducción de HO-1 sea consecuencia de alguno de los productos de la actividad canónica de dicha enzima. El CO es uno de los productos de la reacción catalizada por HO-1 y se ha demostrado que ejerce numerosas funciones celulares, incluyendo efectos antiinflamatorios, antiapoptóticos y antiproliferativos. Así, en los últimos años se ha prestado especial atención a las CO-RMs, moléculas desarrolladas para suministrar cantidades controladas de CO en células y tejidos *in vivo*, representando una nueva vía terapéutica. Sin embargo, hasta el momento, no se ha evaluado su potencial terapéutico en el contexto del PCa. En base a los antecedentes mencionados hipotetizamos ***que el eje HO-1/CO reprograma a las células de PCa hacia un fenotipo menos agresivo al modificar el microambiente tumoral y modular la expresión de factores inflamatorios, metabólicos y angiogénicos.***

### OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es **evaluar el potencial terapéutico de las CO-RMs en procesos asociados al PCa**. Nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar *in vitro* la capacidad de las CO-RMs de modular procesos asociados a la carcinogénesis prostática.
2. Estudiar la eficacia de las CO-RMs en un modelo *in vitro* de interacción indirecta entre células tumorales prostáticas humanas y precursores óseos murinos.

## PARTE II

### HIPÓTESIS

Diversos factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo y a la progresión del PCa. Entre los determinantes genéticos, se encuentran diversos polimorfismos en genes involucrados en la reparación del ADN que han sido asociados con el riesgo y la evolución del PCa. En particular, el gen que codifica para el AR, factor de transcripción clave en el desarrollo prostático, y el gen *APEX1* que codifica para la Endonucleasa 1 de sitiosapurínicos/apirimidínicos del ADN (APE1), una enzima que participa en la reparación del ADN y en la respuesta al daño genotóxico, han sido ampliamente estudiados en diversas poblaciones. Sin embargo, la evidencia sobre su impacto en la población argentina es limitada. Dado que las variaciones genéticas pueden afectar la eficiencia de la reparación del ADN y la estabilidad genómica, nuestra hipótesis es que los ***polimorfismos en AR y APEX1 están asociados con una mayor susceptibilidad a la progresión del PCa.***

### OBJETIVO GENERAL

El objetivo general es **evaluar la asociación entre polimorfismos en los genes AR y APEX1 y múltiples características clínico-patológicas en pacientes argentinos diagnosticados con PCa.** Nos planteamos como objetivos específicos:

1. Analizar la frecuencia de los polimorfismos seleccionados en AR y APEX1 en una cohorte de pacientes argentinos con PCa.
2. Determinar la relación entre estos polimorfismos y características clínicas del PCa, incluyendo agresividad tumoral y riesgo de recaída.

# MATERIALES y MÉTODOS

## 1. CULTIVO CELULAR

### 1.i LÍNEAS CELULARES

Para el desarrollo del presente trabajo de tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares:

**PC3:** línea celular establecida de una metástasis ósea que proviene de un adenocarcinoma de próstata humano. Presenta insensibilidad a andrógenos. Su perfil de crecimiento en hueso es osteolítico (164). Las células PC3 se cultivaron en Medio del Instituto Roswell Park Memorial (RPMI 1640) (Invitrogen, EE.UU.), suero fetal bovino 10% (SFB, Internegocios, Argentina) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml) en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> 5%, a 37°C.

**MC3T3:** línea celular de precursor osteoblástico derivada de calvaria de ratón C57BL/6 que mantiene la capacidad de diferenciación en osteoblastos y la producción de minerales (165,166). Las células MC3T3 se cultivaron en medio mínimo esencial alfa (α-MEM) (Invitrogen, EE.UU.), suplementado con SFB 10% (Internegocios, Argentina) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml) en una atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> 5%, a 37°C.

### 1.ii TRATAMIENTOS

Se utilizaron tres clases diferentes de CO-RMs solubles en agua: CORM-3, CORM-401 y CORM-A1. Las CO-RMs fueron donadas gentilmente por el Dr. Roberto Motterlini y la Dra. Roberta Foresti (Universidad de Paris Est Créteil, Francia). Las células fueron tratadas con las distintas CO-RMs en un rango de concentración que varió entre 25-150 µM durante 6 h. Para los controles sin tratamiento se administró vehículo (PBS). Para el caso de los co-cultivos, el mismo se llevó a cabo durante 24 h y en las últimas 6 h se realizó el tratamiento con CORM-401 (50 µM). Posteriormente, se cosecharon las células para realizar los distintos ensayos.

### 1.iii CO-CULTIVO INDIRECTO ENTRE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA Y PROGENITORES ÓSEOS

Para el estudio del efecto del tratamiento con CO-RMs se decidió emplear un modelo *in vitro* de metástasis ósea del PCa que consiste en un ensayo de co-cultivo indirecto *in vitro* entre células MC3T3 y PC3, donde las células no están en contacto físico pero comparten el medio de cultivo (**Figura 16**). Las células fueron co-cultivadas durante 24 h y durante las últimas 6 h se realizó el correspondiente tratamiento con CORM-401 (50  $\mu$ M).

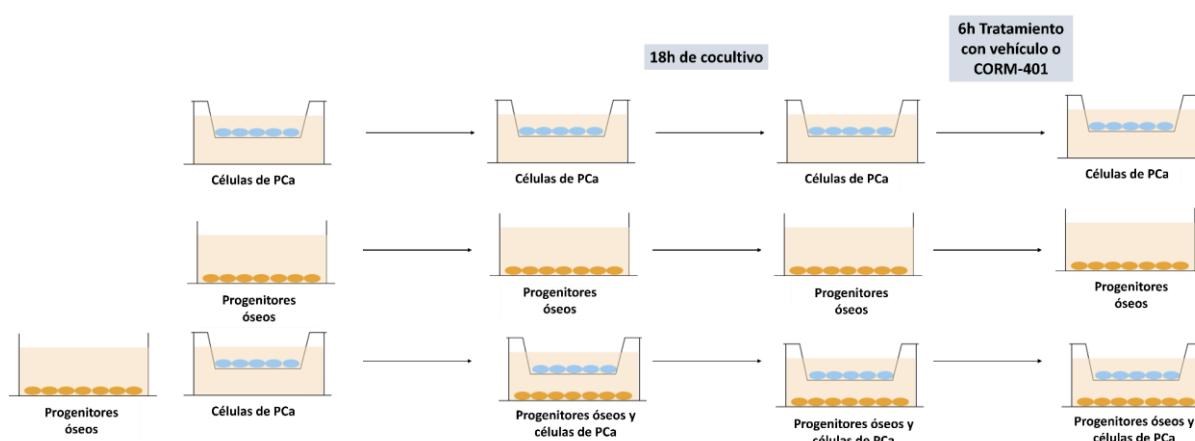


**Figura 16. Esquema de co-cultivos de células de PCa humanas y células pre-osteoblásticas murinas.** La línea celular tumoral humana de próstata (PC3) fue co-cultivada con precursores osteoblásticos murinos (línea MC3T3) durante 24 h, y se realizaron tratamientos con CORM-401 (50  $\mu$ M) o vehículo (PBS) durante las últimas 6 h del experimento. A su vez, se realizaron los controles de células sin co-cultivar tanto de PCa como óseas, tratadas con CORM-401 (50  $\mu$ M) o vehículo (PBS) en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Para realizar el cultivo indirecto, se sembraron 150.000 células PC3 en insertos para placas de seis pocillos (Becton Dickinson #353090, EE.UU.) los cuales poseen en su base poros de 0,4  $\mu$ m en una densidad  $2,0 \pm 0,2 \times 10^6/\text{cm}^2$ , permitiendo el paso de pequeñas moléculas. Por otro lado, se sembraron 200.000 células MC3T3 en placas de seis pocillos. Al día siguiente, se removió el medio de cultivo de las placas y se realizaron 3 lavados con buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente se agregaron 2 ml de medio  $\alpha$ -MEM (Invitrogen, EE.UU.) suplementado con antibióticos y SFB 2% (Internegocios, Argentina) en las placas con las células MC3T3. Luego, los insertos se colocaron en las placas donde estaban cultivadas las células MC3T3 y se les agregaron 2 ml de medio  $\alpha$ -MEM (Invitrogen, EE.UU.) 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 y células MC3T3 creciendo solas en medio  $\alpha$ -MEM (Invitrogen, EE.UU.) con un 2% de SFB. Cada condición experimental se realizó por triplicado.

## 2. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE CO

### 2.i ENSAYO DE MIOGLOBINA

La liberación de CO por parte de las distintas CO-RMs se validó de forma espectrofotométrica midiendo la conversión de deoximioglobina (deoxi-Mb) a carboximioglobina (Mb-CO). Se utilizó una solución de mioglobina de corazón de caballo (66  $\mu\text{mol/l}$ ) (*Sigma Aldrich*, Estados Unidos) disuelta en tampón fosfato (0,04 mol/L, pH 6,8) como fuente de oximioglobina (Mb-O<sub>2</sub>). Se añadió ditionito de sodio (0,1%) como agente reductor para la conversión de Mb-O<sub>2</sub> (pico de absorción a 503 nm) a deoxi-Mb (pico de absorción a 557 nm). Luego del agregado de las distintas CO-RMs se evaluó la formación de Mb-CO en base a la presencia de un doble pico de absorción a 548 nm y 579 nm (**Figura 17**). Se utilizó un espectrofotómetro de barrido (Biochrom Espectrofotómetro UV-Vis Ultrospec 9000, Cambridge, Reino Unido) (137,167–169).



**Figura 17. Ensayo de detección de liberación de CO por parte de las CO-RMs utilizando mioglobina.** Reacción esquemática de la conversión de Mb-O<sub>2</sub> a deoxi-Mb en presencia de un agente reductor (ditionito de sodio) y la posterior formación de Mb-CO debido al CO liberado por las CO-RMs con sus correspondientes máximos de absorción.

### 2.ii ENSAYO DE HEMOCD1

Por otro lado, se evaluó la acumulación intracelular de CO luego del tratamiento con CORM-401 mediante el ensayo de hemoCD1. El fundamento de este ensayo se basa en la interacción del CO con un análogo sintético del grupo Hemo llamado hemoCD1 que genera un desplazamiento espectrofotométrico característico que posibilita su cuantificación precisa en medios biológicos (170,171). Para ello las células fueron recolectadas mediante *scraping* en 1

ml de PBS. A continuación, se añadió 1 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  como agente reductor y hemoCD1 a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$ . Las muestras fueron centrifugadas a 12.500  $\times$  rpm durante 1 min y los sobrenadantes fueron filtrados utilizando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, las soluciones fueron tratadas nuevamente con 1 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  inmediatamente antes de la medición de los espectros de absorbancia. La cuantificación del CO se realizó en base a los coeficientes de extinción previamente reportados para hemoCD1 a 422 nm y 434 nm (170,171). Los resultados se expresaron como cantidad de CO por millón de células, habiéndose cuantificado previamente el número de células para cada muestra. Se utilizó un espectrofotómetro de barrido (Biochrom Espectrofotómetro UV-Vis Ultrospec 9000, Cambridge, Reino Unido).

### 3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

#### 3.i PURIFICACIÓN DE ARN TOTAL

Para la purificación de ARN total se utilizó el reactivo *Quick-Zol* (Kalium technologies, Argentina). Al momento de cosechar las células, se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS. Luego, se recolectaron las células utilizando un *scraper* y 200  $\mu\text{l}$  de *Quick-Zol* (Kalium technologies, Argentina). La suspensión celular se homogeneizó completamente por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Seguidamente se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de cloroformo, se mezcló enérgicamente con *vortex* durante 15 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Para acelerar la separación de fases se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 15 min. La fase acuosa superior, que contiene el ARN, se transfirió a un tubo nuevo. El ARN se precipitó con 250  $\mu\text{l}$  de isopropanol por cada 500  $\mu\text{l}$  de *Quick-Zol* (Kalium technologies, Argentina) incubando a -20°C durante 40 min como mínimo. Se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 400  $\mu\text{l}$  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 37°C durante 3 min, se resuspendió en 10-20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ARNasas y se rehidrató incubando 10 min a 55-60°C. El ARN total extraído se conservó a -80°C hasta su utilización. La concentración y pureza del ARN total obtenido se midió mediante absorbancia a 260, 230 y 280 nm utilizando un *Nanodrop* (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.), y calculando la relación 260/280 y 260/230.

### 3.ii TRATAMIENTO CON ADNasa

Las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasa para la eliminación de ADN genómico utilizando el *kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.). Se prepararon soluciones conteniendo 1 µg de ARN, según la cuantificación previamente realizada, *buffer* de reacción para ADNasa, enzima ADNasa y agua destilada libre de nucleasas, con un volumen final de 10 µl, según lo indicado por el protocolo del fabricante. Éstas fueron incubadas por 15 min a temperatura ambiente. Luego se inactivó la DNasa por adición de 1 µL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) e incubación 10 min a 65°C.

### 3.iii RETROTRANSCRIPCIÓN

Para la obtención de ADN copia (ADNc) a partir del ARN total tratado con ADNasa se realizó una transcripción reversa o retrotranscripción (RT) con el *RevertAid RT kit* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello, se agregó 1 µl de primers oligodTs a las soluciones de 11 µl de ARN libre de ADN y las mismas fueron incubadas por 5 min a 65°C. Posteriormente, se agregaron 8 µl de la *Master Mix*, preparada según indica el protocolo con *buffer*, inhibidor de RNasas, *mix* de dNTPs y enzima retrotranscriptasa. Se incubó a 42°C por una hora y luego se inactivó la enzima por 5 min a 70°C. Como control de retrotranscripción y presencia de ADN genómico, se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente pero reemplazando la enzima transcriptasa reversa en la *Master Mix* por agua destilada libre de nucleasas (control No RT).

### 3.iv PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

El ADNc se amplificó por RT-qPCR utilizando el *kit FastStart Universal SYBR Green Rox* (Roche, EE.UU.). Se utilizaron 1,8 µl de una dilución 1:30 del ADNc obtenido en la RT en una mezcla de reacción conteniendo los *primers* específicos para cada gen de interés (0,2 µM, *Integrated DNA Technologies Inc.*, EE.UU.) en un volumen final de reacción de 15 µl. Se utilizó el termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems, EE.UU.). Se relativizó la expresión del gen de interés a un gen de referencia utilizando el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (172). Se emplearon como genes de referencia la ciclofilina A (*PPIA*) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). El programa de amplificación se detalla a continuación (**Tabla 3**):

**Tabla 3. Programa de ciclado para la RT-qPCR.**

| Etapa                   | Temperatura                                      | Tiempo |
|-------------------------|--------------------------------------------------|--------|
| Desnaturalización       | 95°C                                             | 5 min  |
| Ciclado (40 ciclos)     | 95°C                                             | 20 seg |
|                         | Temperatura de <i>annealing</i>                  | 20 seg |
|                         | 72°C                                             | 30 seg |
|                         | Lectura de fluorescencia                         |        |
| Curva de <i>melting</i> | 65°C a 93°C, lectura de fluorescencia cada 0,2°C |        |

Los *primers* utilizados se diseñaron con la herramienta *web Primer Blast* (NCBI, EE.UU.). En la **Tabla 4** se encuentran las secuencias de los *primers* específicos para cada gen analizado. Cada reacción de RT-qPCR se realizó por triplicado y cada experimento se repitió al menos tres veces.

**Tabla 4. Lista de primers utilizados.** Se detalla la secuencia del primer forward (FW), del primer reverse (RV), la temperatura de *annealing* (°C) y la especie.

| Gen           | Secuencia FW (5'-3')    | Secuencia RV (5'-3')     | Tº de <i>annealing</i> (°C) | Especie |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------|
| <b>ACO2</b>   | ACAGCCTACTGGTGACTCGG    | GCTCAAAGTGGCTCATCGC      | 60                          | Humano  |
| <b>IL-6</b>   | GGTACATCCTCGACGGCATCT   | GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC    | 60                          | Humano  |
| <b>IL-8</b>   | CGTGGCTCTCTTGGCAGCCTTC  | TGCACCCAGTTTTCTTGGGGTC   | 60                          | Humano  |
| <b>KI-67</b>  | GCCAGCACGTCGTGTCTCAAGAT | ACACTGTCTTTGAGTCATCTGCGG | 65                          | Humano  |
| <b>LDHA</b>   | TTGTTGGGGTTGGTGCTGTTG   | TGGTGTTAAGGAAAAGGCTG     | 60                          | Humano  |
| <b>LDHB</b>   | GGTTGAAAGTGCCTATGAAGTC  | TACATGGAAGGCTCAGGAAGA    | 61                          | Humano  |
| <b>OPG</b>    | GAAGGGCGCTACCTTGAGAT    | GCAAACGTATTTCTGCTCTGG    | 59                          | Humano  |
| <b>PPIA</b>   | GGTATAAAAGGGCGGGAGG     | CTGCAACAGCTCAAAGGAGAC    | 60                          | Humano  |
| <b>PDHB</b>   | TCGTTTGGCAGCGGATAGAG    | CCAGCTCCTCATCCATACCC     | 60                          | Humano  |
| <b>PKM2</b>   | TGCAGTGGAGCTCAGAGAGA    | GTCTGAATGAAGGCAGTCCC     | 59                          | Humano  |
| <b>PTHrP</b>  | GTCTCAGCCGCCCTCAA       | GGAAGAATCGTCGCCGTAAA     | 60                          | Humano  |
| <b>SPP1</b>   | AGCCTTCTCAGCCAAACGC     | TGGAAGGGTCTGCTTTTCCTC    | 59                          | Humano  |
| <b>VEGF-A</b> | GCCTTGCTTGCTGCTCTACC    | GTGATGATTCTGCCCTCCTCCT   | 59                          | Humano  |
| <b>Col1a1</b> | CATGTTCACTTTGTGGACCT    | GCAGCTGACTTCAGGGATGT     | 60                          | Murino  |
| <b>Col1a2</b> | GCAGGTTACCTACTCTGTCTCT  | CTTGCCCCATTCAATTGTCT     | 60                          | Murino  |
| <b>Gapdh</b>  | TGCCAAGGCTGTGGCAAGG     | CGAAGGTGGAAGAGTGGG       | 60                          | Murino  |
| <b>Gapdh</b>  | AAGAGGCTAAGACCGCCTTC    | GCATAAATCCCACTGCCAC      | 60                          | Murino  |
| <b>Hmox1</b>  | AAGAGGCTAAGACCGCCTTC    | GCATAAATCCCACTGCCAC      | 60                          | Murino  |
| <b>Spp1</b>   | TCTCTGGCTGAATTCTGAGG    | CTATAGGATCTGGGTGCAGGC    | 60                          | Murino  |
| <b>Runx2</b>  | CCGCACGACAACCGCACCAT    | AGGCATTTCTGGAGCTCGGCG    | 60                          | Murino  |

#### 4. VIABILIDAD CELULAR

Para los ensayos de viabilidad celular, se sembraron 3.500 células PC3 por pocillo en una placa de 96 pocillos. Luego se realizaron los tratamientos correspondientes por triplicado. La viabilidad celular se determinó utilizando el reactivo comercial *Cell Titer 96 wells Aqueous non Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, EE.UU.) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Se mezclaron 2  $\mu$ L de la solución comercial de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) se con 100  $\mu$ L de la solución comercial N-metilfenacinametasulfato (PMS) y se conservó en alícuotas a -20°C protegido de la luz.

Al momento de cosechar las células se reemplazó el medio de cultivo de las placas de 96 pocillos con 100  $\mu$ L de medio de cultivo fresco sin SFB y se agregaron 20  $\mu$ L de MTS/PMS por pocillo. Como blanco de reacción se utilizaron 3 pocillos sin células con 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 3 h en estufa a 37°C con CO<sub>2</sub> 5%, en oscuridad y se midió la absorbancia a 490 nm en intervalos de 1h en lector de placas *Glomax Multidetecction System* (Promega, EE.UU.). La viabilidad celular para se calculó como el porcentaje de la relación entre el promedio de la absorbancia de los triplicados y el promedio de la absorbancia de los triplicados de las muestras control.

#### 5. MEDICIÓN DE ATP

Se sembraron 80.000 células PC3 en una placa de cultivo celular de 12 pocillos. Luego se realizaron los tratamientos correspondientes con las distintas CO-RMs. Posteriormente, luego del tratamiento con tripsina las células fueron centrifugadas a 1600 rpm por 5 min. Se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio RPMI (*Invitrogen*, EE.UU.). 26.500 células fueron resuspendidas en 66  $\mu$ L y se le agrego 66  $\mu$ L del reactivo del *kit CellTiter-Glo* (Promega, EE. UU.) basado en la mono-oxigenación de luciferina catalizada por luciferasa en presencia de Mg<sup>2+</sup>, ATP y O<sub>2</sub>. 40  $\mu$ L de cada condición fueron plaqueados por triplicado en placas de 96 pocillos negras con fondo transparente. Se agitó durante 2 min a temperatura ambiente. Luego se incubó 10 min a temperatura ambiente y se procedió a medir la señal de luciferasa utilizando un lector de placas (*Glomax Multidetecction System*, Promega, EE.UU.). Los niveles de ATP intracelulares se calcularon como el porcentaje de la relación entre el promedio de la señal de los triplicados y el promedio de la absorbancia de los triplicados de las muestras control.

## **6. ENSAYO DE ADHESIÓN**

Para estudiar el efecto de las CO-RMs sobre la adhesión celular se sembraron 80.000 células PC3 en una placa de 12 pocillos y se realizó el tratamiento con las distintas CO-RMs. Luego, se cosecharon las células mediante tratamiento con tripsina y se sembraron 20.000 células PC3 por triplicado en una placa de 96 pocillos tratada previamente con FNC Coating Mix® (AssayCell, Technologies, Avenel, New Jersey, EE.UU) por 30 min. Luego de una hora, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS para remover las células no adheridas. Se fijaron las células adheridas con una solución de metanol 10% y ácido acético 10% en agua durante 20 min a temperatura ambiente y se tiñeron con cristal violeta 0,5% durante 10 min. Tras lavar los pocillos con abundante agua corriente, se extrajo el cristal violeta retenido en las células con 100 µl de ácido acético al 10% en agua por 10 min y se cuantificó la absorbancia a 600 nm utilizando un lector de placas (Glomax Multidetecction System, Promega, EE.UU). La adhesión celular se calculó como el porcentaje de la relación entre el promedio de la absorbancia de los triplicados y el promedio de la absorbancia de los triplicados de las muestras control.

## **7. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR**

Se evaluó la migración celular mediante el ensayo de cierre de herida o “*wound healing*”. Se utilizaron insertos comerciales (Commercial Culture-Inserts, IBIDI, Germany) para la formación de la herida plaqueando 26.000 células por inserto dispuestos en placas de 24 pocillos. Luego de 24 h, los insertos fueron retirados y se trataron las células con las distintas CO-RMs. Se tomaron imágenes al tiempo 0 y a las 6 h post-tratamiento (Microscopio invertido Leica DMI1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania)). La cuantificación de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) calculando el porcentaje de cierre de herida con respecto al tamaño inicial de la herida a tiempo 0.

## **8. ACTIVIDAD DE LACTATO DESHIDROGENASA**

### **8.i ENSAYO ENZIMÁTICO**

Para estudiar el efecto de las CO-RMs sobre la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) se

sembraron 80.000 células PC3 en una placa de cultivo celular de 12 pocillos y se realizó el tratamiento con las distintas CO-RMs durante 6h. Luego, se levantaron las células, se centrifugaron 5 min a 4600 rpm a 4°C, se lavaron con PBS y se volvieron a centrifugar 5 min a 4.600 rpm a 4°C. Para la lisis, se resuspendieron las células en 75 µl de PBS-Tritón 9%. Se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron 4 min a 1.200 rpm. Se tomaron 10 µl del sobrenadante y se incubaron durante 2 min a 37°C con 500 µl del Reactivo A del Kit LDH-P UV AA (técnica con reactivos separados a 30–37 °C; *Wiener*, Rosario, Argentina) y se adicionaron 12,5 µl del Reactivo B. Se realizaron lecturas espectrofotométricas cada 30 seg durante 3 min a 340 nm (Biochrom Espectrofotómetro UV-Vis Ultrospec 9000, Cambridge, Reino Unido). Los valores de actividad obtenidos se normalizaron al contenido total de proteínas y al control sin tratamiento.

## **8.ii DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES**

Se determinó la concentración proteica utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA, BCA 98% y CuSO<sub>4</sub> 2%; *Sigma-Aldrich*, EE.UU.). La curva estándar se realizó utilizando concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA). En una placa de 96 pocillos se sembraron 10 µl de distintas diluciones de concentración conocida para realizar la curva patrón. Se utilizaron 10 µl de las muestras para la determinación de la concentración. Para ello, se agregaron 200 µl de BCA y se incubó en oscuridad durante 30 min a 37°C. Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Biorad Microplate Reader, Benchmark, EE.UU.).

## **9. MEDICIÓN DE PARÁMETROS MITOCONDRIALES**

Para estudiar el efecto de las CO-RMs sobre las mitocondrias se sembraron 80.000 células PC3 en una placa de cultivo celular de 12 pocillos y se realizaron los tratamientos con las distintas CO-RMs. A continuación se detallan los métodos mediante los cuales se determinó la masa y la integridad mitocondrial.

## 9.i NÚMERO DE COPIAS DE ADN MITOCONDRIAL

### 9.i.a EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL

El aislamiento de ADN fue realizado a partir de células tratadas o no con CORM-401. Posteriormente, luego del tratamiento con tripsina las células se centrifugaron a 1600 rpm por 5 min. Se agregaron 200 µl de *buffer* de lisis (bromuro de hexadeciltrimetilamonio -CTAB- 2%; NaCl 1,4M; Buffer tris(hidroximetil)aminometano -TRIS- 100mM; EDTA 20mM; β-mercaptoetanol 0,2% v/v) y se incubó a 60°C durante 1 h con agitación intermitente. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción con 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) saturado con agua, centrifugando a 12.000 rpm por 10 min. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN con 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente por 5 min. Luego, se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min, se lavó el pellet con 200 µl de etanol 70% y se centrifugó nuevamente a 12.000 rpm durante 5 min. Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, se lo resuspendió en 30 µl de agua libre de nucleasas y se lo rehidrató incubándolo a 65°C por 30 min. La concentración y pureza del ADN obtenido se midieron en un *Nanodrop* (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).

### 9.i.a CUANTIFICACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL MEDIANTE RT-qPCR

Se cuantificó la proporción ADN mitocondrial respecto de ADN nuclear para cada condición. Para ello, teniendo como moldes las muestras de ADN total en una concentración de 50 ng/µl, se realizaron RT-qPCR en un termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems, EE.UU.) utilizando *primers* (**Tabla 5**) para genes mitocondriales (*ND1*, *CYTB*, *COX2* y *ATP6*) y para un gen nuclear (*OGG1*). Se relativizó cada gen mitocondrial al gen de referencia nuclear utilizando el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (172). El programa de amplificación fue el mismo al mencionado anteriormente (**Tabla 3**).

**Tabla 5. Lista de primers utilizados para la cuantificación de ADN mitocondrial.** Se detalla la secuencia del primer forward (FW), del primer reverse (RV), la temperatura de annealing (°C) y la especie.

| <i>Gen</i>  | <i>Secuencia FW (5'-3')</i> | <i>Secuencia RV (5'-3')</i> | <i>Tº de annealing (°C)</i> | <i>Especie</i> |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| <b>ATP6</b> | GAAGCGCCACCCTAGCAATA        | GCTTGGATTAAGGCGACAGC        | 60                          | Humano         |
| <b>COX2</b> | TCCTAGTCCTCATCGCCCTC        | AAGGGAGGGATCGTTGACCT        | 60                          | Humano         |
| <b>CYTB</b> | CCCACCCCATCCAACATCT         | GATGAAAAGGCGGTTGAGGC        | 60                          | Humano         |
| <b>ND1</b>  | ACTACAACCCCTCGCTGACG        | GATGGTAGATGTGGCGGGTT        | 60                          | Humano         |
| <b>OGG1</b> | CCACCCCTGTCCAACCCCA         | TGGGGGTGCCTGGCCTTTGA        | 61                          | Humano         |

## 9.ii MASA MITOCONDRIAL TOTAL

Para determinar la masa mitocondrial, luego del tratamiento las células se incubaron con MitoTracker Green FM (100 nM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 30 min a 37 °C, se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS. La tinción con MitoTracker Green se midió mediante citometría de flujo (citómetro BD FACS Aria II, BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.) y se analizó con el software FlowJo 7.6 (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.). Por otro lado, se obtuvieron imágenes por microscopía confocal de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus Fluoview FV1000, con un objetivo 60X de inmersión en aceite (Centro de Microscopía de Fluorescencia Gregorio Weber, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires). El rango de absorción y emisión de la sonda utilizada es: Ex/Em = 490/516 nm. La cuantificación de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.).

## 9.iii POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

La integridad mitocondrial se estimó mediante el análisis del potencial de membrana mitocondrial. Las células se incubaron con tetrametilrodamina éster etílico (TMRE; 100 nM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 20 min a 37 °C, se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS. La tinción con TMRE se evaluó mediante citometría de flujo (citómetro BD FACS Aria II, BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.) y se analizó con el software FlowJo 7.6 (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.). Para determinar la línea de base, las células control fueron tratadas con el desacoplante FCCP (20 µM; Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 10 min antes de la tinción. Por otro lado, se obtuvieron imágenes por microscopía

confocal de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus Fluoview FV1000, con un objetivo 60X de inmersión en aceite (Centro de Microscopía de Fluorescencia Gregorio Weber, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires). El rango de absorción y emisión de la sonda utilizada es: Ex/Em = 549/ 574 nm. La cuantificación de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, EE. UU.).

## **10. ANÁLISIS DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO**

Para estudiar el efecto de las CO-RMs sobre las ROS intracelulares se sembraron 80.000 células PC3 en una placa de cultivo celular de 12 pocillos y se realizaron tratamientos con las distintas CO-RMs. Las células se levantaron con tripsina, se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron durante 3 min a 2.600 rpm y se incubaron con la sonda 2',7'-Dicloro dihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA, 10  $\mu$ M, *Merck*, Alemania) durante una hora a 37°C en oscuridad (a partir de este momento siempre se trabajó en oscuridad). Luego se lavaron las células dos veces con PBS centrifugando 3 min a 2600 rpm y se resuspendieron en PBS. Se obtuvieron imágenes por microscopía confocal de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus Fluoview FV1000, con un objetivo 60X de inmersión en aceite (Centro de Microscopía de Fluorescencia Gregorio Weber, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires). El rango de absorción y emisión de la sonda es: Ex/Em = 504/524 nm. La cuantificación de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, EE. UU.). Los valores se relativizaron al control sin tratamiento.

## **11. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LACTATO INTRACELULAR**

Para estudiar el efecto de las CO-RMs sobre los niveles de lactato intracelular se sembraron 80.000 células PC3 en una placa de cultivo celular de 12 pocillos y se realizaron los tratamientos con las distintas CO-RMs. Se levantaron las células y se lavaron con PBS centrifugando durante 5 min a 2600 rpm. Se resuspendió el pellet obtenido en un buffer comercial (*Lactate Assay Buffer*, *Abcam*, EE.UU.). Se homogeneizó con pipeta y se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min a 4°C. Posteriormente se procedió a realizar la desproteinización de la muestra, para ello, se agregó al sobrenadante anterior ácido

perclórico (PCA, 1M) y se realizó una incubación de 5 min en hielo. Se homogeneizó vigorosamente y centrifugó a 10.500 rpm durante 2 min a 4°C. Se agregó un volumen de hidróxido de potasio (KOH, 2M) correspondiente al 34% del volumen total. Se vortexeó y se ajustó el pH a 6,5-8. Por último, se centrifugó a 10.500 rpm durante 15 min a 4°C y se adicionaron 50 µl de mix de reacción (compuesto por Lactate Assay Buffer, OxiRed Probe y Enzyme Mix) a 50 µl de muestra. Se realizó un control siguiendo el mismo procedimiento anterior pero omitiendo el agregado de la enzima. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz y se midió la fluorescencia Lector de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania). El rango de absorción y emisión de la sonda es: Ex/Em: 535/587 nm. Los valores se relativizaron al control sin tratamiento.

## **12. ENSAYO METABÓLICO SEAHORSE**

Se utilizó el equipo Seahorse Bioscience XF24 Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU) para medir la función mitocondrial y la acidificación extracelular en células de PCa. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos Seahorse XF aproximadamente 24 horas antes del experimento, siguiendo el protocolo de Seahorse. Se seleccionó una densidad de 50.000 células por pocillo. Un día antes del experimento, los cartuchos con los respectivos sensores se hidrataron en líquido calibrador XF y se mantuvieron a 37 °C en aire sin CO<sub>2</sub>. El día del experimento, las células se lavaron una vez y se incubaron durante una hora a 37 °C en ausencia de CO<sub>2</sub> con un medio de cultivo bajo buffer sin bicarbonato (glucosa 1 g/l, pH ajustado con NaOH), previo al inicio del ensayo. Se evaluaron cambios en la respiración celular a lo largo del tiempo cuantificando los niveles de consumo de O<sub>2</sub> y de acidificación extracelular.

## **13. ENSAYO DE HANGING DROP**

Para estudiar el efecto de las CO-RMs sobre la formación de esferoides se sembraron 80.000 células PC3 en una placa de cultivo celular de 12 pocillos y se realizaron los pre-tratamientos con las distintas CO-RMs. Las células se cosecharon mediante el agregado de tripsina y se plaquearon gotas de 50 µL conteniendo 1000 células en una placa de cultivo p100 de forma invertida. Luego de diez días, se obtuvieron fotos de cada condición (Microscopio invertido Leica DMI1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania)) y se cuantificó el tamaño del esferoide

utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.). Los valores se relativizaron al control sin tratamiento.

#### **14. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS**

Para estudiar el efecto de las CO-RMs sobre la formación de colonias se sembraron 80.000 células PC3 en una placa de cultivo celular de 12 pocillos y se realizaron los pre-tratamientos con las distintas CO-RMs. Las células se cosecharon mediante el agregado de tripsina y se sembraron 2000 células en placas de 6 pocillos. Luego de siete días, se obtuvieron fotos de cada condición (Amersham Imager 600) y se cuantificó el número de colonias utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.). Los valores se relativizaron al control sin tratamiento.

#### **15. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PACIENTES**

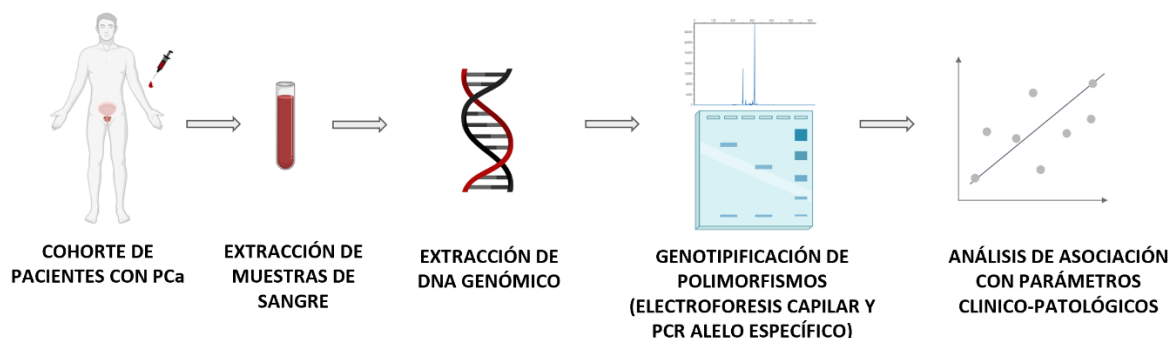
Se diseñó un estudio de casos para determinar la asociación entre los polimorfismos de *AR* y *APEX1* y los parámetros clinicopatológicos del PCa. Se reclutaron retrospectivamente 123 pacientes diagnosticados con PCa entre agosto de 2008 y noviembre de 2010 en el Hospital de Clínicas "José de San Martín" (Buenos Aires, Argentina). Todos los pacientes fueron sometidos a prostatectomía radical retropúbica (RRP) como estrategia terapéutica primaria (fecha de RRP entre diciembre de 1998 y julio de 2010). La selección de pacientes, el seguimiento y la actualización de los registros médicos fueron realizados por onco-urólogos capacitados. Todos los pacientes eran ciudadanos argentinos y fueron clasificados como hispanicos. La mayoría tenía ascendencia predominantemente caucásica, aunque, como se ha reportado para esta población, es esperable cierto grado de mestizaje con ascendencia amerindia y africana (173). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional y siguió los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes que aceptaron participar firmaron un consentimiento informado por escrito.

#### **16. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LÍNEA GERMINAL**

El ADN germinal total se extrajo de sangre periférica durante el seguimiento del PCa utilizando el método de CTAB. Para ello, se tomaron 4 ml de sangre periférica y se realizaron dos lavados

con un volumen de TRIS 10 mM – EDTA 10 mM, centrifugando 10 min cada vez. Luego, se resuspendió el precipitado en un volumen de solución de CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, TRIS 100 mM, EDTA 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%) con agitación enérgica y se incubó de 1 a 2 h a 60°C, agitando cada 15-30 min. A continuación, se realizó una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) saturado con agua y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo. Se agregó un volumen de isopropanol o dos volúmenes de etanol 100%; si no se observaba el pellet, se dejó durante toda la noche a -20°C. Posteriormente, se recuperó el pellet de ADN, se transfirió a un eppendorf con etanol 70% y se centrifugó a máxima velocidad por 3-5 min. Se retiró el etanol con un tip y se dejó secar al aire o en un bloque térmico, evitando que el pellet se secase en exceso. Finalmente, se resuspendió en agua destilada o TRIS 10 mM – EDTA 10 mM para reducir la hidrólisis del DNA a largo plazo. Al día siguiente se centrifugó a 4°C a 12.500 rpm en un eppendorf para recolectar el pellet y se resuspendió en 50-100  $\mu$ l de agua destilada o en el buffer TRIS-EDTA. El ADN germinal se cuantificó utilizando *Nanodrop* (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y se utilizó una concentración final de 50 ng/ $\mu$ l (**Figura 18**).

A) FLUJO DE TRABAJO DE LA GENOTIPIFICACIÓN DE COHORTE DE PACIENTES ARGENTINOS DIAGNOSTICADOS CON PCa



B) REPRESENTACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE AR (CAG)<sub>n</sub> Y APEX1 c.444T>G

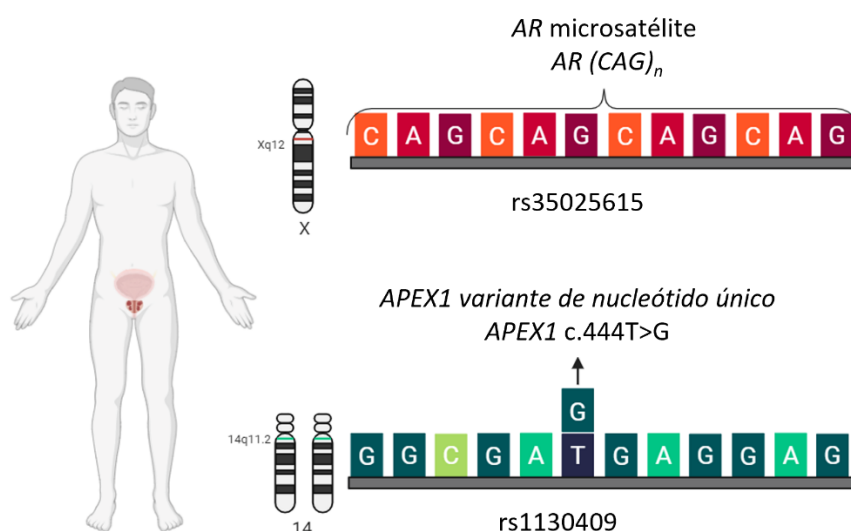


**Figura 18. Esquema del flujo de trabajo para la genotipificación y representación de los polimorfismos estudiados. A)** Flujo de trabajo para la genotipificación de la cohorte de pacientes argentinos diagnosticados con PCa: Se reclutaron 123 pacientes argentinos con PCa (Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Buenos Aires, Argentina) y se obtuvieron muestras de sangre periférica. Se extrajo ADN germinal y se genotipificaron AR (CAG)<sub>n</sub> y APEX1 c.444T>G mediante electroforesis capilar y PCR específica de alelo, respectivamente. Posteriormente, se realizaron estudios de asociación entre los polimorfismos y las características clinicopatológicas. **B)** Representación esquemática de los dos polimorfismos estudiados: el microsatélite AR (CAG)<sub>n</sub> (rs3032358, panel superior) y APEX1 c.444T>G (rs1130409, panel inferior).

## 17. GENOTIPIFICACIÓN

Se emplearon métodos basados en PCR para genotipificar los polimorfismos AR (CAG)<sub>n</sub> (rs3032358; NC\_000023.11:g.67545317GCA[n]) y APEX1 (rs1130409;

NM\_001641.4:c.444T>G; NP\_001632.2:p.Asp148Glu) (**Figura 18**). Cabe destacar que, aunque la nomenclatura actual para el microsatélite *AR* es  $(GCA)_n$ , la mayoría de la literatura se refiere a este polimorfismo como  $(CAG)_n$ , ya que este codón codifica para glutamina (Q). Para evitar confusión con otros estudios, utilizaremos la nomenclatura más común  $(CAG)_n$  (**Figura 18**).

### 17.i GENOTIPIFICACIÓN DE *AR* $(CAG)_n$

La amplificación por PCR de *AR*  $(CAG)_n$  se realizó con un primer *forward* marcado fluorescentemente en un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™, Waltham, MA, EE.UU.) utilizando las siguientes condiciones de reacción: 1,5–2,5 ng/μl de ADN genómico, 1× buffer de reacción para PCR (Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina), 200 μM dNTP (Genbiotech SRL, Buenos Aires, Argentina), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina), 0,05 U/μl Taq polimerasa (Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina) y 0,3 μM de cada primer (*forward*: 5'-HEX-GAC CTA CCG AGG AGC TTT CC-3' y *reverse*: 5'-AGA ACC ATC CTC ACC CTG CT-3', IDT, Coralville, IA, EE.UU.). El protocolo de termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 59°C por 30 seg y 72°C por 20 seg, con una extensión final a 72°C por 5 min. El tamaño de los amplicones se determinó mediante electroforesis capilar (Applied Biosystems ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer, Macrogen, Seúl, República de Corea) utilizando el marcador de tamaño *GeneScan*™ 400HD ROX™ y se analizaron con el software *Peak Scanner*™ v1.0 (Applied Biosystems™, Waltham, MA, EE.UU.). Para determinar el número exacto de repeticiones  $(CAG)_n$ , se secuenciaron cuatro muestras mediante el método de Sanger (Macrogen, Seúl, República de Corea) y se incluyeron como referencias internas en todos los análisis.

### 17.ii GENOTIPIFICACIÓN DE *APEX1* c.444T>G

El polimorfismo *APEX1* c.444T>G se genotipificó mediante PCR alelo-específica, según lo descrito previamente (174). Brevemente, la PCR se realizó con una mezcla de cuatro primers: *forward* compartido, 5'-CTT ACG GCA TAG GTG AGA CC-3'; *reverse* compartido, 5'-GTC AAT TTC TTC ATG TGC CA-3'; *forward* específico para T, 5'-TCT GTT TCA TTT CTA TAG GCG AT-3'; y *reverse* específico para G, 5'-TCC TGA TCA TGC TCC TCC-3'. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción mencionadas anteriormente y un termociclador Veriti™ (Applied Biosystems™, Waltham, MA, EE.UU.). El ciclado consistió en una desnaturalización de 1

minuto a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto, con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Las muestras que no amplificaron o presentaron genotipos poco claros se re-procesaron una o dos veces según fuera necesario. Los resultados de genotipificación fueron revisados por dos miembros independientes del laboratorio y entre el 10–12% de las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente para ser re-analizadas en un procedimiento ciego como control de calidad. Los resultados solo fueron incluidos en los análisis finales cuando hubo un 100% de concordancia entre los revisores independientes y entre las muestras y sus repeticiones a ciegas. Además, se secuenciaron muestras seleccionadas aleatoriamente (Applied Biosystems ABI 3730xl 96-capillary DNA Analyzer, Macrogen, Seúl, República de Corea) para corroborar los genotipos y validar los experimentos.

## 18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los experimentos *in vitro* se realizaron al menos 3 experimentos independientes. Las pruebas estadísticas utilizadas para evaluar las diferencias en la expresión génica fueron el *t-Test* en aquellos casos donde se analizaron dos condiciones, ANOVA de un factor seguido de la prueba de Dunnett en aquellos casos donde se analizaron más de dos condiciones pero que sólo interesaban las comparaciones contra el control del experimento, o ANOVA de un factor seguido de la prueba de Tukey cuando se analizaron más de dos condiciones, y se realizaron todas las comparaciones entre sí. Se consideraron significativas las diferencias con un  $p < 0,05$ .

A la hora de analizar la asociación entre los distintos parámetros clinicopatológicos y la genotipificación de polimorfismos de línea germinal se realizaron pruebas de chi-cuadrado, exacta de Fisher, Kruskal–Wallis o Wilcoxon según correspondiera para analizar la asociación entre los genotipos y parámetros tales como edad al diagnóstico, niveles de PSA al diagnóstico, antecedentes familiares de PCa, cáncer de ovario o cáncer de mama en parientes de primer grado, compromiso de márgenes quirúrgicos, recaída bioquímica y grupo ISUP. El tiempo hasta la recaída bioquímica se calculó desde la fecha de la PRR hasta la fecha en que el nivel de PSA superó los 0,2 ng/ml. Para estudiar la supervivencia libre de recaída bioquímica (BRFS) a 6 años, se consideró el tiempo hasta la recaída bioquímica o el tiempo hasta la última

consulta (pacientes censurados). Los pacientes con tiempos de seguimiento superiores a 6 años o aquellos que recayeron después de ese período fueron censurados a los 72 meses. Se utilizaron gráficos de Kaplan–Meier para evaluar la asociación entre los genotipos y la BRFS, y la comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de log-rank. Se realizaron análisis univariantes y multivariantes utilizando modelos de riesgos proporcionales de Cox para estudiar la asociación entre el genotipo y la recaída bioquímica del PCa, y para estimar razones de riesgo (HR) e intervalos de confianza del 95% (IC 95%). Los modelos multivariantes incluyeron las siguientes covariables: compromiso de márgenes en la próstata resecada, grupo ISUP patológico, terapia neoadyuvante (terapia de privación androgénica o radioterapia), estadio pT y PSA sérico al diagnóstico. Todos los análisis estadísticos se realizaron en R (175) utilizando la plataforma RStudio (RStudio, PBC, Boston, MA, EE.UU., versión 2024.04.1) (176).

## RESULTADOS

### PARTE I: EFECTO DE LAS CO-RMs EN LA CARCINOGENESIS PROSTÁTICA

Las CO-RMs fueron desarrolladas con el objetivo de administrar CO de forma controlada en sistemas biológicos, aprovechando sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antiproliferativas (125). En el contexto del PCa, se postula que el CO podría modular procesos celulares clave como la proliferación, migración y metabolismo tumoral. Para explorar este potencial, en este trabajo se utilizaron tres CO-RMs con diferentes características químicas y cinéticas de liberación de CO: CORM-3, CORM-401 y CORM-A1. A continuación, se presentan los resultados que validan su capacidad de liberar CO y su impacto funcional sobre células de PCa.

#### 1. CONFIRMACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE MONÓXIDO DE CARBONO POR PARTE DE LAS CO-RMs

Antes de analizar el efecto biológico de las CO-RMs sobre células de PCa, se verificó su capacidad efectiva para liberar CO. Para ello, se utilizó un ensayo basado en la formación de Mb-CO (137,167–169). El agregado de las CO-RMs a una solución de deoxi-Mb generó espectros de absorción característicos con picos a 548 nm y 579 nm, confirmando la formación de Mb-CO y, por ende, la liberación de CO por parte de las moléculas ensayadas (**Figura 19**).

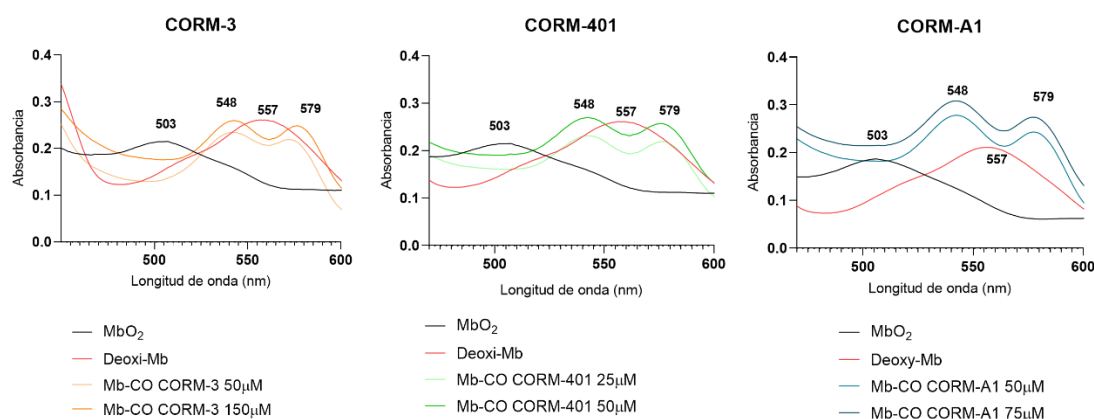


**Figura 19. Validación de la liberación de CO por parte de las CO-RMs.** Espectros de absorción obtenidos para evaluar la formación de Mb-CO por el agregado de las distintas CO-RMs: **A)** CORM-3 (50 y 150  $\mu$ M) (líneas naranjas), **B)** CORM-401 (25 y 50  $\mu$ M) (líneas verdes) y **C)** CORM-A1 (50 y 75  $\mu$ M) (líneas celestes) a una solución que contenía deoxi-Mb (línea roja). El espectro de absorción de la Mb-O<sub>2</sub> (línea negra) se muestra en forma comparativa.

Asimismo, se cuantificaron los niveles intracelulares de CO en células PC3 tratadas con CORM-401 (50  $\mu$ M) durante 1, 3 y 6 h, mediante el empleo del sistema hemoCD1, un complejo hemo sintético que permite la detección específica de CO debido a la alta afinidad de este gas por el centro ferroso del complejo. La interacción con CO genera un desplazamiento espectrofotométrico característico que posibilita su cuantificación precisa en medios biológicos (170,171). Los resultados evidenciaron una acumulación intracelular significativa de CO a partir de la primera hora de tratamiento ( $p < 0,01$ ), manteniéndose niveles elevados también a las 3 h ( $p < 0,01$ ) y 6 h ( $p < 0,001$ ) post-tratamiento, en comparación con las células no tratadas (Figura 20).

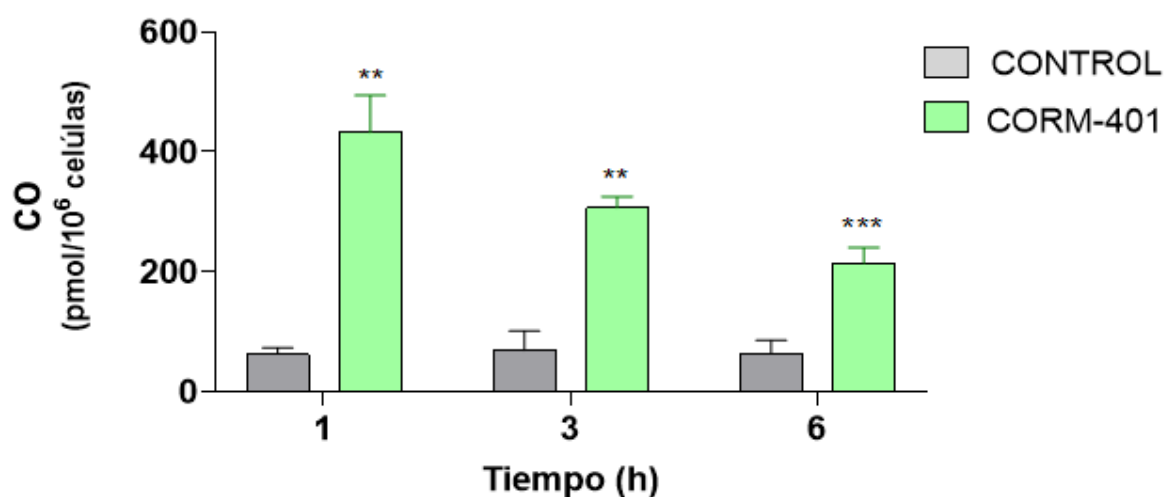


**Figura 20. Cuantificación de los niveles intracelulares de CO en células de PCa.** Las células PC3 fueron tratadas durante 1, 3 y 6 h con CORM-401 50  $\mu$ M (verde) o vehículo (gris). Los niveles del complejo CO-HemoCD1 se midieron a 422 nm mediante espectroscopía. Los resultados fueron relativizados al número total de células. Los resultados se muestran como media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

## 2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CO-RMs SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

Una vez validada la liberación de CO, se examinó el impacto de las CO-RMs (CORM-3, CORM-401 y CORM-A1) sobre la viabilidad de células PC3 mediante un ensayo MTS. Las células fueron tratadas durante 6 h con concentraciones que oscilaron entre 25  $\mu$ M y 150  $\mu$ M.

Los resultados indicaron que ni CORM-3 (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M) ni CORM-A1 (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 150  $\mu$ M) (**Figura 21**) alteraron significativamente la viabilidad celular en las concentraciones evaluadas. En cambio, la CORM-401 redujo la viabilidad sólo a su concentración más alta (150  $\mu$ M,  $p < 0,05$ ) (**Figura 21**).

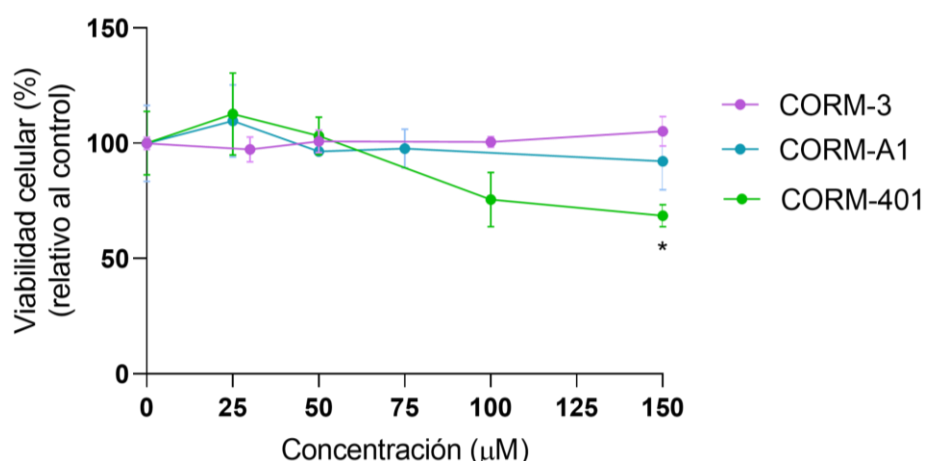


**Figura 21. Evaluación del efecto de las CO-RMs sobre la viabilidad en células de PCa.** Células PC3 fueron tratadas durante 6 h con CORM-3, CORM-401 o CORM-A1 en un rango de concentraciones entre 25-150  $\mu$ M o con vehículo (control). La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTS. Los resultados se muestran como media  $\pm$  S.E.M y las comparaciones se realizaron respecto al control. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo \* $p < 0,05$ .

En base a estos resultados, se seleccionaron para los siguientes ensayos concentraciones no citotóxicas, a fin de evitar que posibles efectos observados en otros procesos celulares fueran consecuencia de una pérdida general de viabilidad. Las concentraciones elegidas fueron: CORM-3 a 50 y 150  $\mu$ M, CORM-401 a 25 y 50  $\mu$ M, y CORM-A1 a 50 y 75  $\mu$ M.

### 3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CO-RMs SOBRE PROCESOS BIOLÓGICOS RELEVANTES EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA

#### 3.i PROLIFERACIÓN CELULAR

Se evaluó el efecto de las CO-RMs sobre la expresión del antígeno de proliferación *Ki67*. Se observó que tanto el tratamiento con CORM-401 a 25  $\mu$ M ( $p<0,001$ ) y 50  $\mu$ M ( $p<0,01$ ) como con CORM-3 a 50  $\mu$ M ( $p<0,05$ ) disminuyó la expresión de *Ki67* (**Figura 22**). Cuando se estudió el efecto de la CORM-A1 sobre *Ki67* no se detectaron cambios a nivel de expresión transcripcional (**Figura 22**).

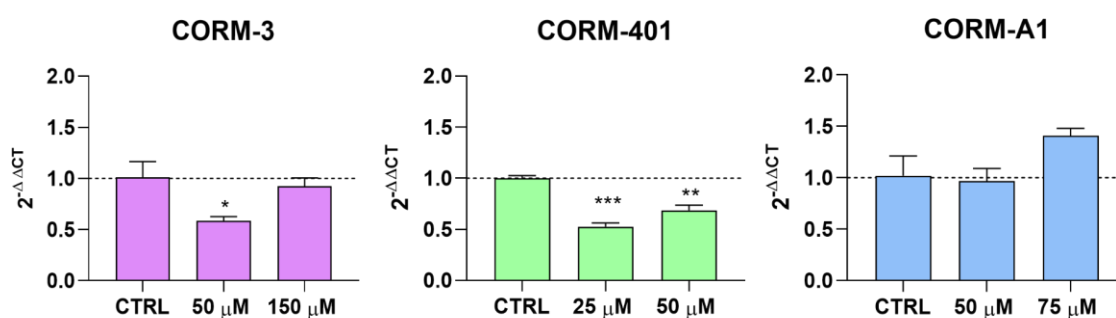


**Figura 22. Evaluación del efecto de CO-RMs sobre la proliferación en células de PCa.** Análisis de la expresión génica de *Ki67* en células PC3 tratadas con CORM-3 (50  $\mu$ M y 150  $\mu$ M), CORM-401 (25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) y CORM-A1 (50  $\mu$ M y 75  $\mu$ M) o con vehículo (control) durante 6 h. Los niveles de expresión génica se evaluaron mediante RT-qPCR. Los resultados se presentan como gráficos de barras. La línea punteada representa la media del control. Los valores se normalizaron utilizando PPIA como gen de referencia y son relativos a los controles. Los resultados se muestran como media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p<0,05$  siendo \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  y \*\*\* $p<0,001$ .

Estos resultados sugieren que el tratamiento con CO-RMs, especialmente con CORM-401, disminuye la proliferación celular en las células de PCa.

#### 3.ii ANGIOGÉNESIS

Posteriormente, se analizó si el tratamiento con CO-RMs modulaba los niveles de expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*) mediante RT-qPCR. Se observó que la CORM-401 a 25 ( $p<0,05$ ) y 50  $\mu$ M ( $p<0,001$ ) disminuyó la expresión de *VEGF*, como también se observó con la CORM-3 a 50  $\mu$ M ( $p<0,05$ ) y la CORM-A1 a 50  $\mu$ M ( $p<0,05$ ) (**Figura 23**).

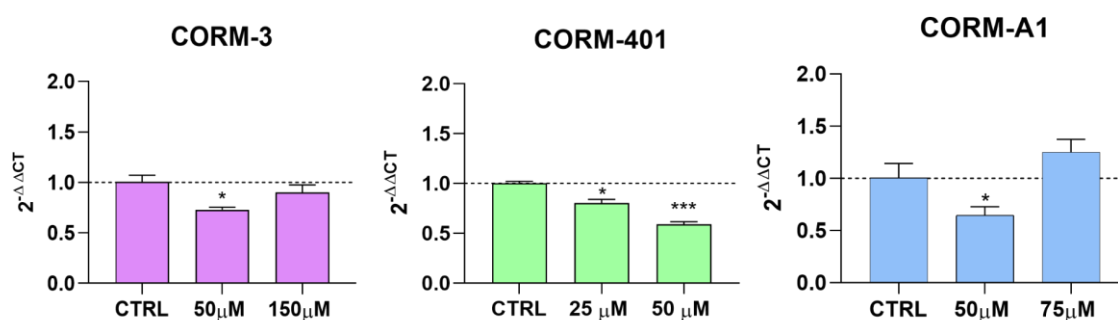


**Figura 23. Evaluación del efecto de CO-RMs sobre la angiogénesis en células de PCa.** Análisis de la expresión génica de VEGF en células PC3 tratadas con CORM-3 (50  $\mu$ M y 150  $\mu$ M), CORM-401 (25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) y CORM-A1 (50  $\mu$ M y 75  $\mu$ M) o con vehículo (control) durante 6 h. Los niveles de expresión génica se evaluaron mediante RT-qPCR. Los resultados se presentan como gráficos de barras. La línea punteada representa el control. Los valores se normalizaron utilizando PPIA como gen de referencia y son relativos a los controles. Los resultados se muestran como media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

La reducción en la expresión de VEGF provocada por las CO-RMs sugiere que estas moléculas podrían actuar como inhibidores del proceso angiogénico, interfiriendo con un mecanismo clave para el crecimiento y la diseminación tumoral (177,178).

### 3.iii ADHESIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR

Adicionalmente, se realizaron ensayos funcionales con el fin de evaluar la capacidad de las CO-RMs de modular la adhesión a un sustrato de las células tumorales prostáticas. Para ello, se pre-trataron células PC3 con las distintas CO-RMs y se sembraron en placas revestidas con Coating Mix®, un producto comercial compuesto por una mezcla de proteínas de matriz extracelular que simulan el microambiente fisiológico. Esta mezcla incluye componentes como colágeno y fibronectina los cuales facilitan la interacción célula-matriz y promueven una adhesión más eficiente y específica. El uso de este tipo de recubrimiento permite evaluar con mayor sensibilidad las posibles alteraciones en los mecanismos de adhesión celular inducidas por los tratamientos.

Bajo estas condiciones, se observó un aumento significativo en el número total de células adheridas tras el tratamiento con todas las CO-RMs evaluadas: CORM-3 a 150  $\mu$ M ( $p < 0,01$ ), CORM-401 a 25  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ) y 50  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ), y CORM-A1 a 50  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ) y 75  $\mu$ M ( $p < 0,01$ ) (**Figura 24A**). Estos resultados sugieren que la exposición a las CO-RMs podría

potenciar la capacidad de las células de PCa para adherirse a componentes de la matriz extracelular.

Por otro lado, se analizó el efecto de las CO-RMs sobre la capacidad migratoria de las células tumorales mediante un ensayo de cierre de herida (*wound healing assay*), una técnica que permite evaluar la motilidad celular en un entorno bidimensional. Las células PC3 fueron tratadas con las distintas CO-RMs, y se cuantificó el porcentaje de cierre de dicha herida en la monocapa celular. En todos los casos, se observó una disminución en la migración celular tras la exposición a las CO-RMs. Específicamente, el tratamiento con CORM-3 a 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) y 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ), con CORM-401 a 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ), y con CORM-A1 a 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) y 75  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,01$ ) redujo de manera significativa el cierre de la herida en comparación con las condiciones control (**Figura 24B-C**).

Estos resultados sugieren que las CO-RMs no sólo favorecen la adhesión celular, sino que también interfieren negativamente con la movilidad de las células tumorales, lo cual podría estar relacionado con un fenotipo menos invasivo.

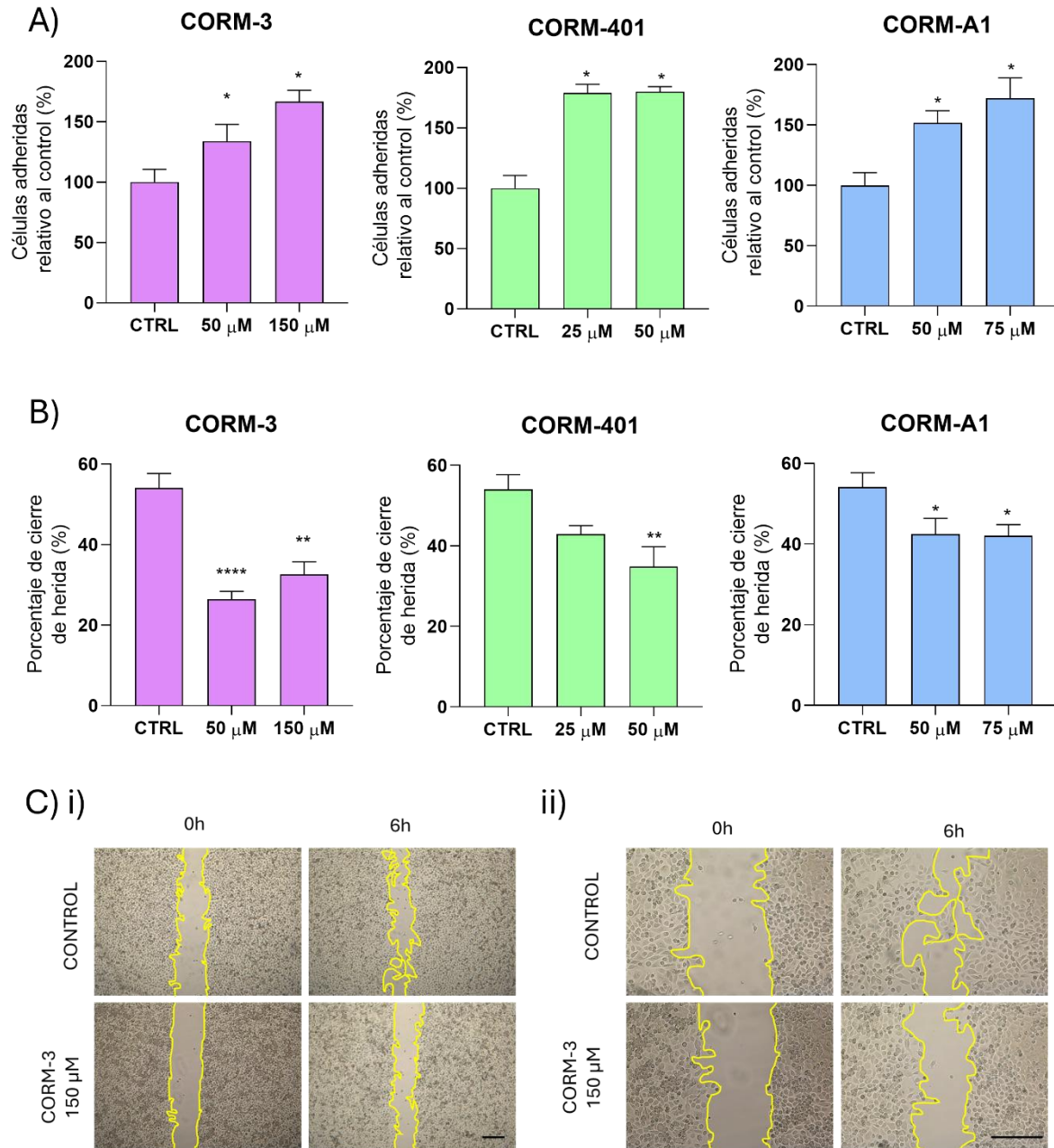


**Figura 24. Efecto del tratamiento con CO-RMs en la adhesión celular y la migración en células de PCa.** Las células PC3 fueron pre-tratadas **(A)** o tratadas **(B-C)** durante 6 h con CORM-3 (50  $\mu$ M y 150  $\mu$ M) (verde), CORM-401 (25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) (violeta) y CORM-A1 (50  $\mu$ M y 75  $\mu$ M) (azul) o con vehículo (control). **A)** Luego del pre-tratamiento las células fueron plaqueadas durante 30 minutos para analizar la adhesión celular mediante una posterior tinción con Cristal Violeta y cuantificación de las células adheridas. Se muestra la cuantificación de la adhesión celular relativizando cada tratamiento al control sin tratar. **B)** Ensayo de herida en placa para evaluar la migración celular bajo tratamiento con CO-RMs. Gráfico de barras representando el porcentaje de cierre de herida. El área no cubierta por células fue cuantificada al inicio y luego de 6 h relativizando el porcentaje de cierre de herida al tiempo 0 h. **C)** Imágenes representativas tomadas con aumento de 4X **(i)** y 10X **(ii)** del ensayo de migración a tiempo 0 y 6 h de la condición control y del tratamiento con CORM-3 (150  $\mu$ M). Barra de escala: 500  $\mu$ m. Las

diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$  y  $****p < 0,0001$ .

### 3.iv ESTRÉS OXIDATIVO

Considerando que el aumento en el estrés oxidativo se asocia a la carcinogénesis y que tanto las CO-RMs como el CO poseen efectos antioxidantes (160,163), se evaluaron los niveles de ROS luego del tratamiento de las células PC3 con las distintas CO-RMs. Mediante microscopía confocal utilizando la sonda DCFH-DA, se observó que el tratamiento con las tres CO-RMs disminuyó significativamente los niveles de ROS intracelulares totales (CORM-3 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ), CORM-401 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) y 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) y CORM-A1 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ) y 75  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ )) (**Figura 25**).

Estos resultados indican que las CO-RMs ejercen un efecto antioxidante directo sobre las células tumorales prostáticas. Esta reducción del estrés oxidativo podría contribuir a los efectos observados previamente sobre la adhesión y la migración celular, ya que el balance redox intracelular regula múltiples vías asociadas a la dinámica del citoesqueleto y al comportamiento migratorio de las células tumorales (179).

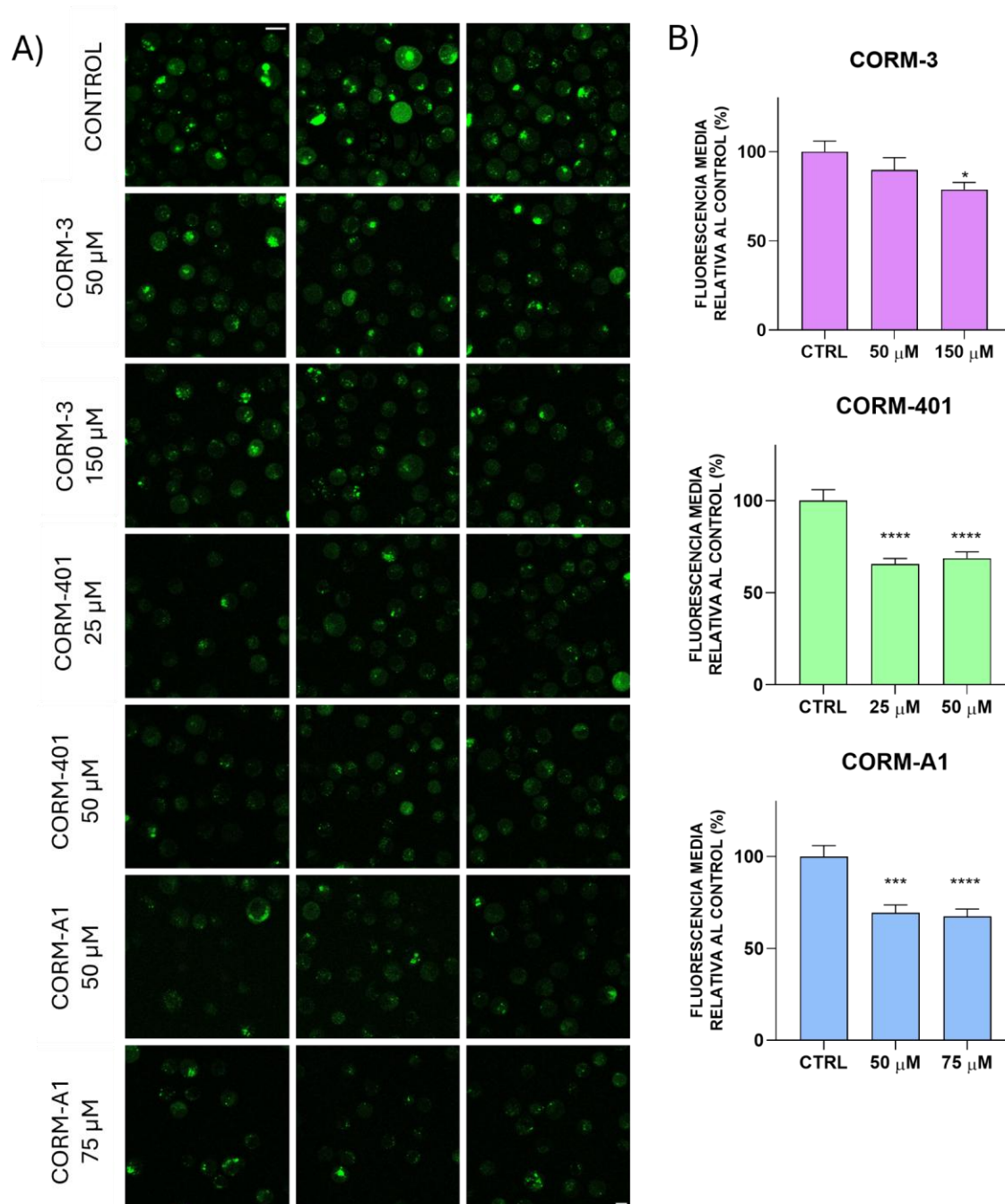


**Figura 25. Efecto del tratamiento con CO-RMs en la producción de ROS en células de PCa. A)** Evaluación de los niveles de ROS en células PC3 tratadas con CO-RMs y posterior tinción con 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA, 10  $\mu$ M). Mediante microscopía confocal se cuantificó la intensidad media de fluorescencia. **A)** Imágenes representativas de la microscopía de fluorescencia en las distintas condiciones. **B)** Gráfico de barras representando la media de fluorescencia. Se trató durante 6 h con CORM-3 (50  $\mu$ M y 150  $\mu$ M) (violeta), CORM-401 (25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) (verde) y CORM-A1 (50  $\mu$ M y 75  $\mu$ M) (azul) o con vehículo (control). Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60X. Barra de escala: 10  $\mu$ m. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 3.v METABOLISMO

Dado que el CO tiene afinidad por hemo-proteínas tales como hemoglobina, mioglobina y citocromo oxidasa (130) se decidió investigar si las CO-RMs tenían efectos sobre el metabolismo. Con el fin de estudiar dichos efectos se procedió a analizar los niveles intracelulares de ATP como parámetro de los niveles energéticos celulares. El tratamiento con CORM-3 150  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) y con CORM-401 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) y 50  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) produjo una disminución significativa en los niveles de ATP totales intracelulares (**Figura 26A**). Posteriormente, se evaluó el efecto de las CO-RMs sobre la actividad de la LDH, una enzima clave en el metabolismo glucolítico tumoral, que cataliza la conversión reversible de piruvato a lactato. Esta enzima suele encontrarse sobreactivada en células cancerosas, promoviendo la glucólisis aeróbica característica del denominado efecto Warburg (86,89). Se observó que solo la CORM-401 50  $\mu\text{M}$  disminuyó la actividad de dicha enzima ( $p < 0,01$ ) (**Figura 26B**).

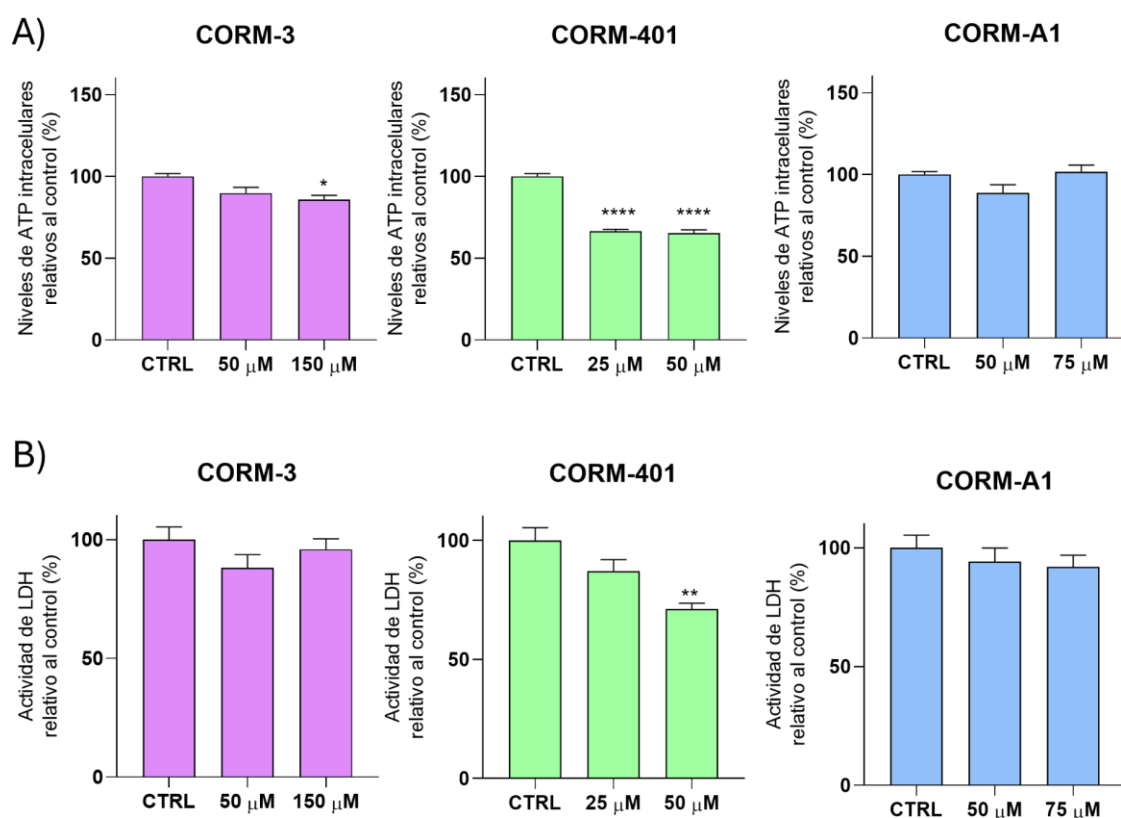


**Figura 26. Efecto del tratamiento con CO-RMs en el metabolismo celular en células de PCa.** Células PC3 fueron tratadas durante 6 h con CORM-3 (50  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$ ) (violeta), CORM-401 (25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) (verde) y CORM-A1 (50  $\mu\text{M}$  y 75  $\mu\text{M}$ ) (azul) o con vehículo (control). **A)** Se midieron los niveles de ATP totales mediante un ensayo de luciferasa. **B)** Se midió la actividad de la enzima LDH mediante un

*ensayo de actividad enzimática. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  y  $****p < 0,0001$ .*

Estos resultados sugieren que el tratamiento con CO-RMs, especialmente con CORM-401, compromete el estado energético de las células tumorales prostáticas. La disminución de ATP y la inhibición de la actividad de LDH, una enzima clave en la glucólisis aeróbica, indican una interferencia directa con las rutas metabólicas que sostienen la alta demanda energética típica del fenotipo tumoral (96,180,181).

A continuación, se profundizó el análisis de los efectos de la CORM-401 sobre parámetros metabólicos y mitocondriales. En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión génica de otras enzimas glucolíticas como la piruvato quinasa isoforma M2 (*PKM2*) y subunidad beta de la piruvato deshidrogenasa (*PDHB*), encargadas de la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato y de piruvato a acetil-CoA (182), respectivamente. El tratamiento con CORM-401 50  $\mu$ M disminuyó la expresión de ambas enzimas ( $p < 0,01$  en ambos casos) (**Figura 27**). No se detectaron cambios en la expresión génica de la isoforma *LDHA* asociados al tratamiento con CORM-401. Sin embargo, se observó que el tratamiento con CORM-401 50  $\mu$ M genera una disminución de la expresión la isoforma de *LDHB* ( $p < 0,05$ ) (**Figura 27**). Mediante un ensayo fluorométrico se cuantificaron los niveles de lactato intracelulares y se observó que el tratamiento con CORM-401 50  $\mu$ M generó una disminución significativa en los niveles de lactato ( $p < 0,001$ ) (**Figura 27**), consistente con la disminución de la actividad de LDH descrita previamente en dichas condiciones (**Figura 26B**). Por último, se profundizó el análisis incluyendo a *ACO2*, una enzima clave en el metabolismo prostático y, a su vez, relacionada al Ciclo de Krebs, que se encuentra inhibida en células prostáticas normales (93,94). El tratamiento con CORM-401 50  $\mu$ M disminuyó los niveles de expresión génica de la enzima *ACO2* ( $p < 0,05$ ) (**Figura 27**).

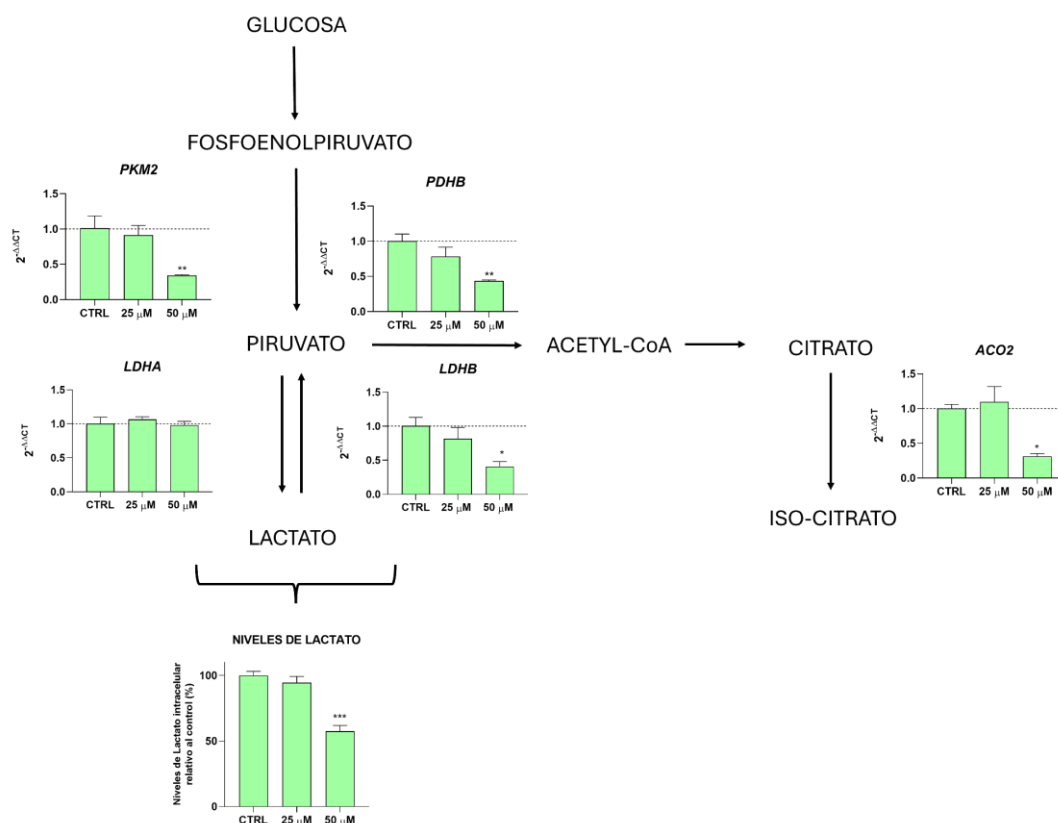


**Figura 27. Efectos del tratamiento con CO-RMs sobre el metabolismo de células de PCa.** Las células de PCa fueron tratadas durante 6 h con CORM-401 (25 μM y 50 μM) o con vehículo (control). Se cuantificaron los niveles de expresión génica de PKM2, PDHB, ambas isoformas de la lactato deshidrogenasa (LDHA y LDHB), y ACO2. Los valores fueron normalizados utilizando PPIA como gen de referencia para la expresión génica y se expresaron en relación con los controles sin tratamiento. Los niveles de lactato se midieron mediante un ensayo enzimático fluorométrico y se relativizaron al control sin tratamiento. Los resultados se presentan como media ± S.E.M. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  siendo \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ .

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la evidencia de que CORM-401 impacta negativamente la maquinaria metabólica de las células tumorales. La disminución en la expresión de PKM2, PDHB y LDHB —junto con la reducción en los niveles intracelulares de lactato— sugiere una inhibición de la conversión eficiente de glucosa en energía y precursores biosintéticos. Además, la reducción de ACO2, una enzima clave del metabolismo prostático y del Ciclo de Krebs, apunta a una desregulación más amplia del metabolismo intermediario, tanto glucolítico como mitocondrial (183).

En paralelo, se cuantificó el número de copias de ADN mitocondrial mediante la medición de cuatro genes pertenecientes a dicho genoma: la subunidad 6 de la ATP sintasa mitocondrial (ATP6), la subunidad 2 de la citocromo c oxidasa (COX2), el citocromo b (CYTB) y la subunidad

1 de la NADH deshidrogenasa (*ND1*). Se detectó una disminución en el número de ADN mitocondrial luego del tratamiento con CORM-401 25  $\mu$ M para *ATP6* ( $p<0,01$ ), *COX2* ( $p<0,0001$ ), *CYTb* ( $p<0,0001$ ), *ND1* ( $p<0,0001$ ) y para CORM-401 50  $\mu$ M para *ATP6* ( $p<0,001$ ), *COX2* ( $p<0,0001$ ), *CYTb* ( $p<0,0001$ ), *ND1* ( $p<0,0001$ ) (**Figura 28**).

Estos resultados indican que el tratamiento con CORM-401 compromete la integridad del genoma mitocondrial en células de PCa. La disminución significativa en el número de copias de genes esenciales para la función mitocondrial sugiere una afectación directa de la viabilidad mitocondrial. Esta pérdida podría representar un mecanismo clave mediante el cual las CO-RMs alteran el metabolismo energético y reducen la capacidad respiratoria de las células tumorales.

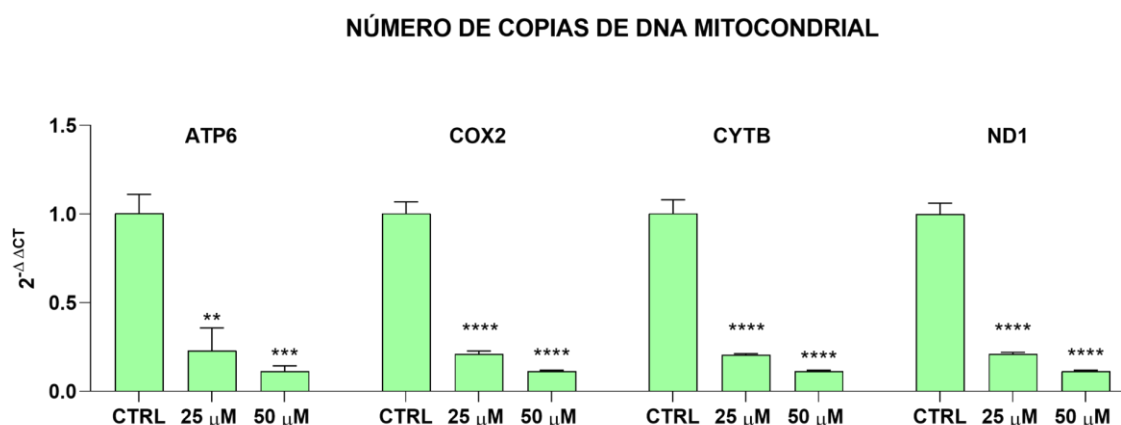


**Figura 28. Efectos del tratamiento con CO-RMs sobre el número de copias de ADN mitocondrial en células de PCa.** Las células de PCa fueron tratadas durante 6 h con CORM-401 (25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) o con vehículo (control). Se cuantificó el número de copias de ADN mitocondrial mediante RT-qPCR, evaluando los genes *ATP6*, *COX2*, *CYTb* y *ND1*. Los valores fueron normalizados utilizando ADN genómico y se expresaron en relación a los controles sin tratamiento. Los resultados se presentan como media  $\pm$  S.E.M. La significancia estadística se estableció en  $p<0,05$  siendo \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  y \*\*\*\* $p<0,0001$ .

Por último, se analizaron los efectos del tratamiento con CORM-401 50  $\mu$ M sobre la masa e integridad mitocondrial. Mediante citometría de flujo y microscopía confocal se cuantificaron los niveles de masa mitocondrial utilizando la sonda MitoGreen. A su vez, se analizó la integridad mitocondrial mediante el uso de la sonda TMRE. El tratamiento con CORM-401 50  $\mu$ M se asoció con un aumento en la masa mitocondrial total ( $p<0,05$ , **Figura 29A, Bi-ii**) y una disminución en el número de mitocondrias viables ( $p<0,05$ , **Figura 29A, Biii-iv**).

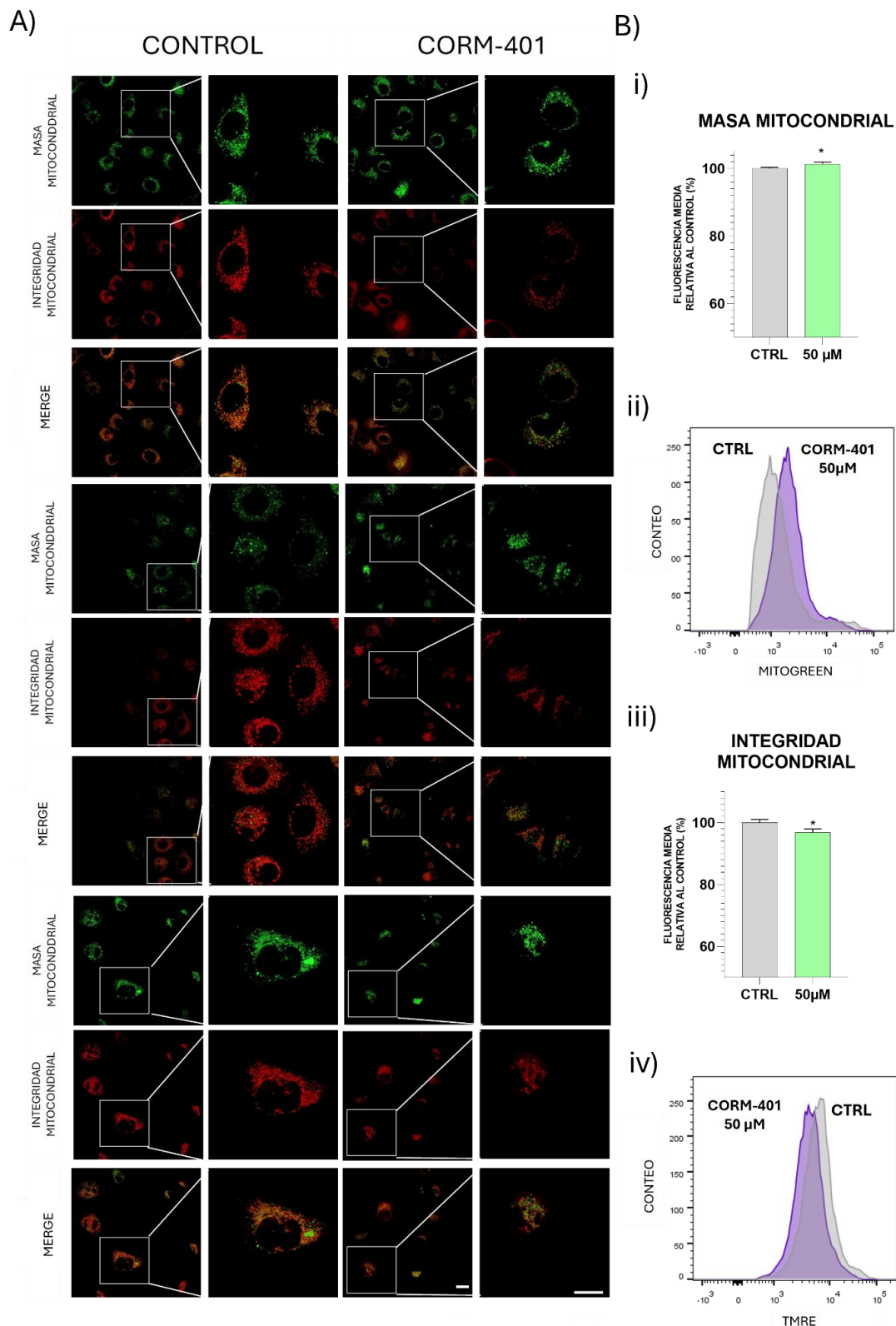


**Figura 29. Efectos del tratamiento con CO-RMs sobre distintos parámetros mitocondriales en células de PCa.** Las células de PCa fueron tratadas durante 6 h con CORM-401 (50  $\mu$ M) o con vehículo (control) y se evaluó la integridad mitocondrial mediante el uso de la sonda TMRE y la masa mitocondrial utilizando la sonda Mitogreen **A)** Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia

en las distintas condiciones. **B)** Gráfico de barras representando la fluorescencia media para la masa (i) e integridad mitocondrial (iii) cuantificado mediante microscopía confocal e histograma de frecuencia representando la fluorescencia para la masa (ii) e integridad mitocondrial (iv) cuantificada por citometría de flujo. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 60X (zoom de 2,7 veces). Barra de escala: 10  $\mu$ m. Los resultados se presentan como media  $\pm$  S.E.M. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  siendo  $*p < 0,05$ .

Estos hallazgos evidencian que CORM-401 induce una disfunción mitocondrial caracterizada por una pérdida de la integridad mitocondrial observada por una alteración en el potencial de membrana junto con un aumento compensatorio en la masa mitocondrial. Esta respuesta podría reflejar un intento de la célula por restaurar su capacidad bioenergética ante la pérdida del potencial de membrana. En conjunto, los datos respaldan la hipótesis de que el CO liberado por CORM-401 compromete la funcionalidad mitocondrial, afectando tanto la calidad como la cantidad de estas organelas clave para la homeostasis energética.

Con el objetivo de evaluar el impacto del tratamiento con CORM-401 sobre el flujo glucolítico y en la respiración mitocondrial de células de PCa, se utilizó el analizador Seahorse XF. Para ello, se cuantificaron las tasas de acidificación extracelular (ECAR) y de consumo de oxígeno (OCR) durante una hora, luego de la inyección de PBS (control) o CORM-401 a una concentración de 50  $\mu$ M.

Se observó una disminución significativa en el ECAR tras el tratamiento con CORM-401 ( $p < 0,0001$ ), evidenciando una inhibición del metabolismo glucolítico respecto al control (**Figura 30A**). Por otro lado, el tratamiento con CORM-401 aumentó la OCR ( $p < 0,0001$ ), lo cual representa un mecanismo compensatorio ante la disminución de la glucólisis (**Figura 30B**). Estos resultados indican que CORM-401 tiene un efecto inhibitorio directo sobre la glucólisis en células PC3, comprometiendo así una de las vías principales de obtención de energía en las células tumorales.

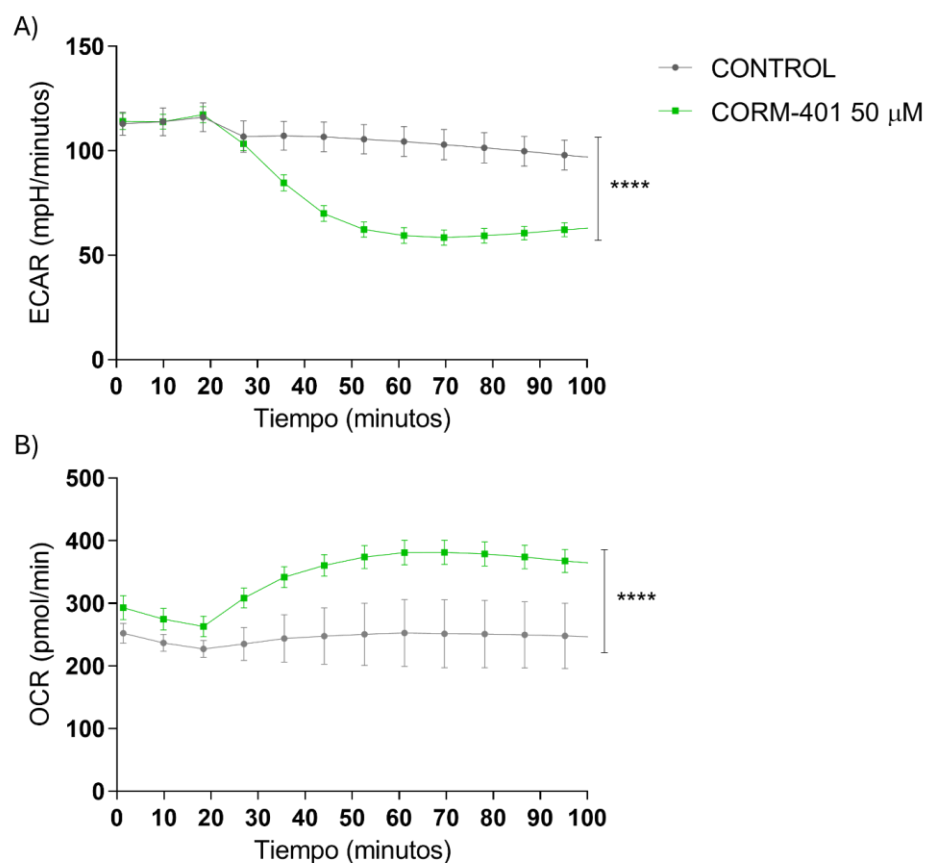


**Figura 30. Efecto del tratamiento con CORM-401 sobre el flujo glucolítico basal y la respiración mitocondrial en células de PCa.** Se midió en tiempo real la ECAR (A) y la OCR (B) en células PC3 tras la inyección de vehículo (línea gris) o CORM-401 50  $\mu$ M (línea verde) a los 20 minutos de iniciado el experimento. Las mediciones fueron realizadas utilizando el analizador Seahorse XF. Los resultados representan la media  $\pm$  S.E.M. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  siendo \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

En conjunto, estos resultados demuestran que las CO-RMs, en particular la CORM-401, inducen una alteración profunda del metabolismo energético en células de PCa. La disminución de los niveles de ATP, la reducción de la actividad de enzimas clave del metabolismo glucolítico como la LDH y la menor expresión de genes involucrados en la producción de energía sugieren una disrupción del flujo metabólico basal. Asimismo, el compromiso del metabolismo mitocondrial evidenciado por la reducción de copias de ADN mitocondrial, la pérdida de integridad mitocondrial y la inhibición de la glucólisis (ECAR) refuerza la hipótesis de que el CO liberado por las CO-RMs actúa como un modulador negativo de la bioenergética tumoral. Esta interferencia metabólica podría constituir un mecanismo relevante en el potencial antitumoral de estas moléculas.

### 3.vi CARACTERÍSTICAS STEM-LIKE

Las células con características *stem-like* representan una subpoblación dentro del tumor con alta capacidad de autorrenovación, plasticidad fenotípica y resistencia a tratamientos, lo que las convierte en un componente clave en la progresión, recaída y metástasis del cáncer (184–186). En el caso del PCa, estas células pueden contribuir al mantenimiento del tumor y a la aparición de fenotipos más agresivos (184–186). Para evaluar si el tratamiento con CORM-401 impacta sobre este subgrupo celular, se realizó un ensayo de formación de esferoides en suspensión (*hanging drop*), técnica ampliamente utilizada para seleccionar poblaciones con propiedades de células madre (*stem-like*) (187). Las células PC3 pre-tratadas con CORM-401 (25  $\mu$ M y 50  $\mu$ M) durante 6 h fueron cultivadas en condiciones no adherentes durante 10 días y luego se analizó el tamaño de los esferoides formados. Se observó que el pre-tratamiento con CORM-401 (50  $\mu$ M) redujo significativamente el tamaño de los esferoides en comparación con el control ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 31**).

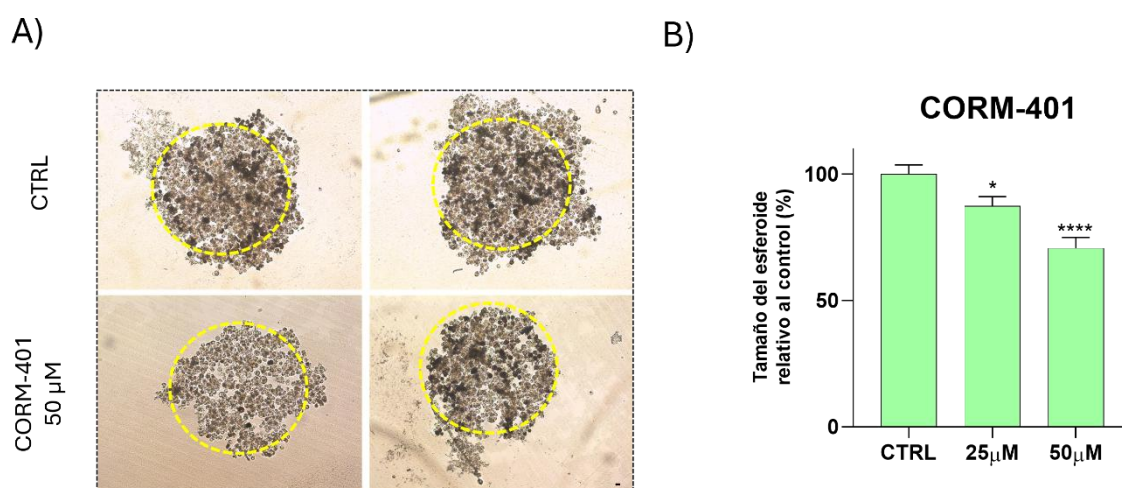


**Figura 31. Ensayo de hanging drop.** Células PC3 fueron pre-tratadas con CORM-401 (25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M) o con vehículo (control) durante 6 h. Luego de 10 días, se evaluó el tamaño de los esferoides desarrollados. **A)** Imágenes representativas de los resultados obtenidos en el ensayo de hanging drop. Se muestra una línea punteada amarilla como referencia del tamaño del esferoide. Aumento: 10x. Barra de escala: 10  $\mu$ m. **B)** Cuantificación del tamaño de los esferoides estimado utilizando el programa Image J. Los resultados se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  siendo \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo clonogénico para evaluar la capacidad de formación de colonias luego del pre-tratamiento con 25  $\mu$ M o 50  $\mu$ M de CORM-401. Transcurridos siete días, se cuantificó el número de colonias obtenido mediante tinción con

Cristal Violeta. Se observó que el tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  CORM-401 disminuyó significativamente el número de colonias desarrolladas ( $p < 0,01$ ) (**Figura 32**).

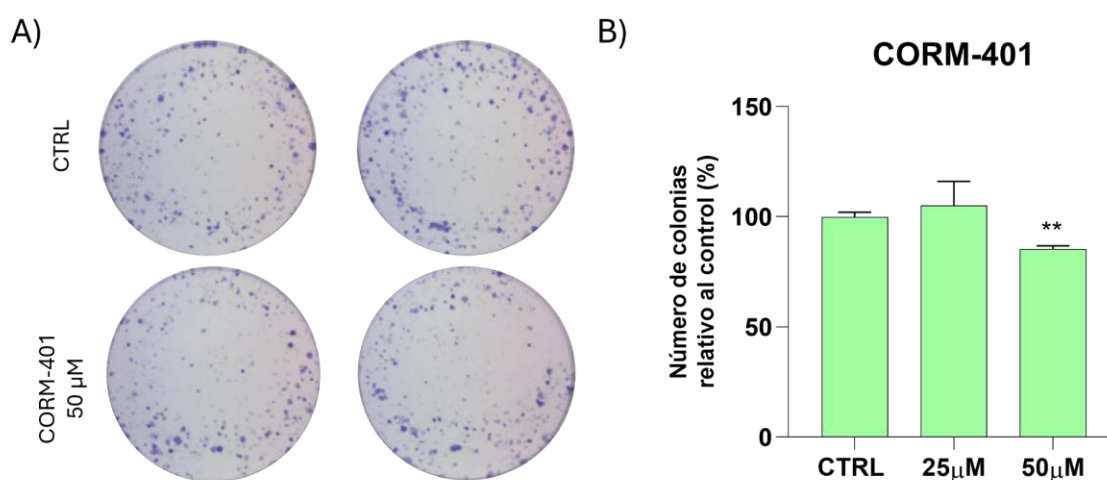


**Figura 32. Ensayo clonogénico.** Células PC3 fueron pre-tratadas con CORM-401 (25  $\mu\text{M}$  o 50  $\mu\text{M}$ ) o con vehículo (control) durante 6 h. Se evaluó la capacidad de formación de colonias mediante un ensayo clonogénico plaqueando las células sobre un medio sólido. Transcurridos siete días se evaluó el número de colonias formadas. **A)** Imágenes representativas de los resultados obtenidos en el ensayo de formación de colonias para células PC3 sembradas en baja densidad (2000 células/well) pre-tratadas o no con CORM-401 (50  $\mu\text{M}$ ). **B)** Gráfico de barras que representa el número de colonias (%) para células PC3 pre-tratadas o no con CORM-401 (50  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  S.E.M. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$  siendo  $**p < 0,01$ .

En conjunto, los resultados obtenidos en los ensayos de formación de esferoides y clonogénico sugieren que el tratamiento con CORM-401 compromete significativamente las propiedades *stemness* de las células de PCa. La disminución en el tamaño de los esferoides formados en condiciones no adherentes, junto con la reducción en la capacidad de generar colonias tras el pre-tratamiento, indica que esta CO-RM podría interferir con subpoblaciones celulares con fenotipo *stem-like*, las cuales están asociadas a la autorrenovación, iniciación tumoral y resistencia terapéutica (184–186). Estos hallazgos refuerzan el potencial de CORM-401 como agente capaz de actuar sobre características funcionales críticas del PCa avanzado.

## 4. EFECTOS MOLECULARES DE LAS CO-RMs EN LA COMUNICACIÓN ENTRE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA Y PROGENITORES ÓSEOS

### 4.i. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON CORM-401 SOBRE PROGENITORES ÓSEOS MURINOS

Dado que el hueso constituye el principal sitio de diseminación metastásica en el PCa avanzado, comprender cómo las células tumorales interactúan con el microambiente óseo resulta fundamental para identificar nuevas estrategias terapéuticas (66). En particular, la comunicación entre células de PCa y células del linaje osteoblástico puede promover la colonización ósea y favorecer un entorno propicio para el crecimiento tumoral (66). Con el objetivo de explorar si el tratamiento con CORM-401 modula estas interacciones, se llevaron a cabo ensayos de co-cultivo indirecto entre células PC3 y células pre-osteoblásticas MC3T3 para estudiar a nivel transcripcional la expresión de diferentes factores solubles que intervienen en este proceso (**Figura 33**).

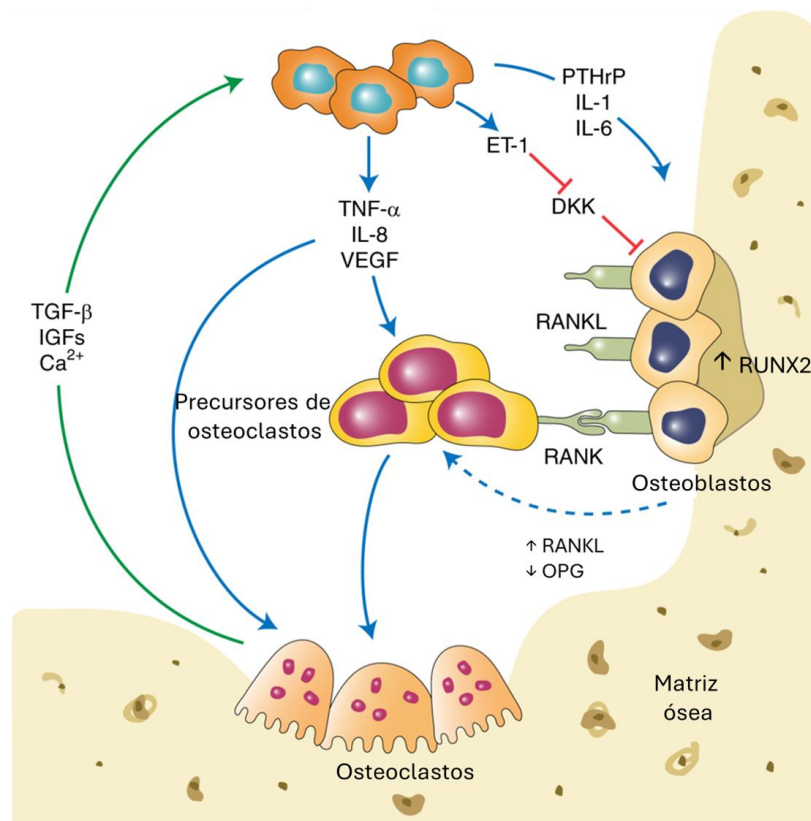


**Figura 33. Interacción entre células tumorales y el microambiente óseo.** Las células tumorales liberan factores como PTHrP, IL-6, IL-8 y endotelina 1 (ET-1) que estimulan a los osteoblastos a expresar RANKL

y suprimir la producción de OPG, un receptor señuelo que inhibe la señalización de RANKL al unirse competitivamente a RANK en los precursores osteoclasticos. Esto favorece la activación de la vía RANK/RANKL y la diferenciación de los precursores hacia osteoclastos maduros, promoviendo la resorción ósea. La degradación de la matriz ósea libera factores como TGF- $\beta$  e IGF-1 que retroalimentan el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales. A su vez, la activación de osteoblastos está regulada por factores como RUNX2, un factor de transcripción clave en la diferenciación osteoblástica, que también puede estar influenciado por señales tumorales. Figura adaptada de Wang (2020) (188).

Se co-cultivaron las células durante 24 h y durante las últimas 6 h del experimento las células fueron tratadas con CORM-401 (50  $\mu$ M) (**Figura 16 y Figura 34A**). En primer lugar, se evaluó la expresión de *Runx2*, un factor de transcripción clave en la diferenciación osteoblástica (189), en las células MC3T3. Se observó que el tratamiento con CORM-401 en condiciones de co-cultivo disminuyó significativamente los niveles de expresión de dicho gen ( $p < 0,01$ ) (**Figura 34Bi**). Cabe destacar que el co-cultivo en ausencia de tratamiento (condición control) no produjo alteraciones en la expresión de este marcador, lo que sugiere que la modulación observada se debe específicamente al efecto del CO liberado por la CORM-401 (**Figura 34Bi**).

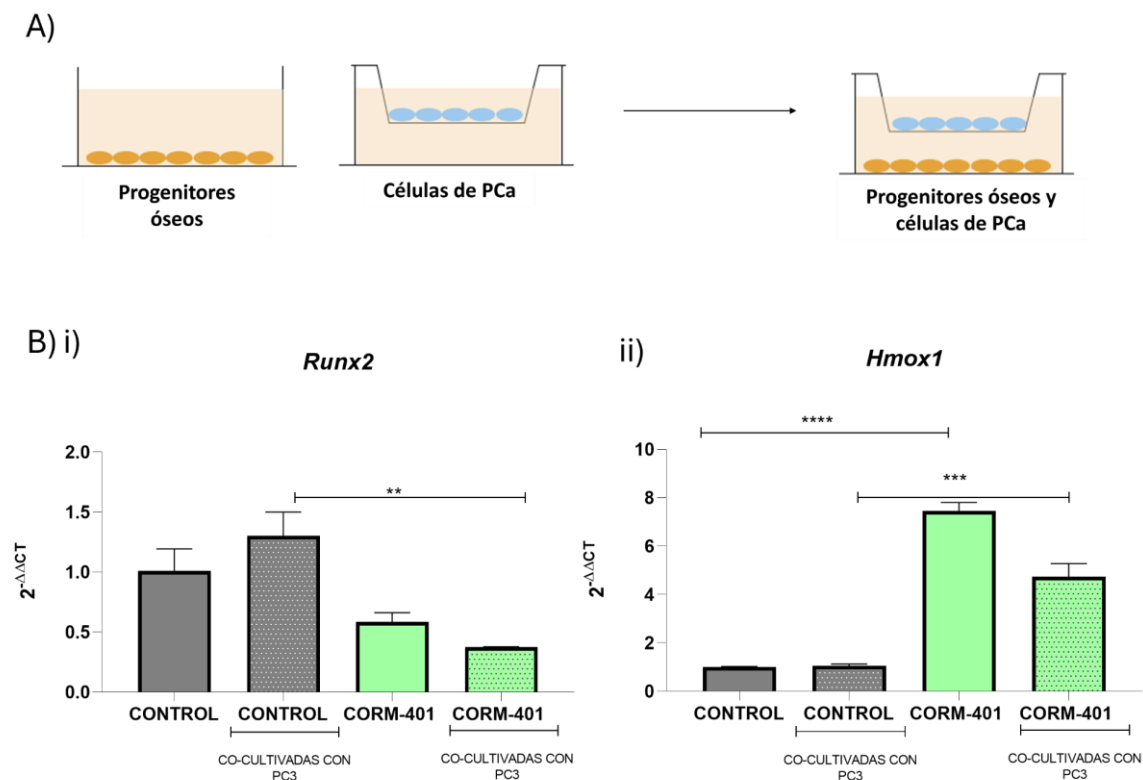


**Figura 34. Efecto del tratamiento con CORM-401 sobre la expresión de marcadores de diferenciación ósea e inflamatorios en células MC3T3 (precursores osteoblásticos) co-cultivadas con PC3 (células de PCa). A) Esquema del modelo de co-cultivo indirecto de células PC3 con MC3T3. B) Los niveles de**

expresión génica de *Runx2* (i) y *Hmox1* (ii) se evaluaron mediante RT-qPCR en células MC3T3 co-cultivadas (barras punteadas) o no (barras lisas) con células PC3 durante 24 h y tratadas con CORM-401 (50µM) (barras verdes) o con vehículo (barras grises) durante las últimas 6 h. Los valores de expresión de *Hmox1* se normalizaron utilizando *Gapdh* como gen de referencia y son relativos a los controles. Los resultados se muestran como media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ .

Considerando que diversos estudios han señalado un rol antitumoral de la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1) en la carcinogénesis prostática, especialmente en el contexto de la interacción entre células tumorales y óseas (123,190), y teniendo en cuenta que el monóxido de carbono (CO) es uno de los productos bioactivos generados por su actividad enzimática (130), se decidió analizar si el tratamiento con CORM-401 afectaba la expresión de *Hmox1* en el modelo de co-cultivo. Los resultados mostraron que CORM-401 (50 µM) induce significativamente la expresión de *Hmox1* tanto en células óseas cultivadas en monocapa ( $p < 0,0001$ ) como en aquellas sometidas a co-cultivo con células PC3 ( $p < 0,001$ ) (**Figura 34Bii**).

Esta inducción sugiere que el tratamiento con CO-RMs podría activar respuestas endógenas antioxidantes y antiinflamatorias en el compartimento óseo, lo que podría contribuir a modular la comunicación entre las células tumorales y el microambiente metastásico.

Además de los factores relacionados con la diferenciación osteoblástica, se evaluó si CORM-401 también afectaba la expresión de genes asociados a la composición y mineralización de la matriz ósea. Se observó una disminución en los niveles de expresión génica de la cadena alfa 1 del colágeno tipo 1 (*Col1a1*) ( $p < 0,001$ , **Figura 35A**), en la cadena alfa 2 del colágeno tipo 1 (*Col1a2*) ( $p < 0,0001$ , **Figura 35B**) y de osteopontina (*Spp1*, gen que codifica para OPN) ( $p < 0,0001$ , **Figura 35C**) en células MC3T3 tratadas con CORM-401 (50 µM) sin co-cultivar. Al co-cultivar las células se observó el mismo efecto de la CORM-401 (50 µM) sobre la expresión de los tres genes: *Col1a1* ( $p < 0,0001$ , **Figura 35A**), *Col1a2* ( $p < 0,0001$ , **Figura 35B**) y *Spp1* ( $p < 0,0001$ , **Figura 35C**).

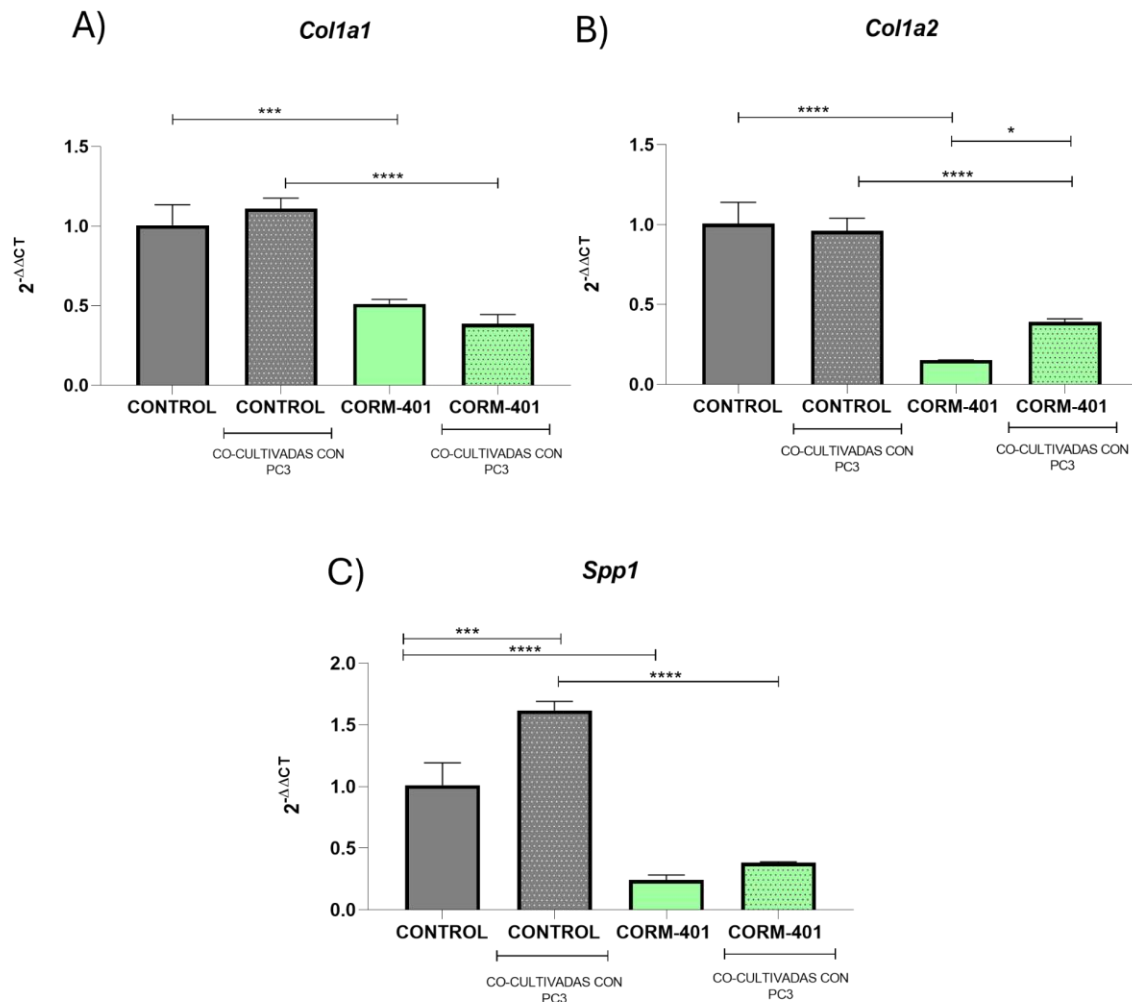


**Figura 35. Efecto del tratamiento con CORM-401 sobre la expresión de marcadores de mineralización ósea en células MC3T3 (precursores osteoblásticos) co-cultivadas con PC3 (células de PCa).** Los niveles de expresión génica de *Col1a1* (A), *Col1a2* (B) y *SPP1* (C) se evaluaron mediante RT-qPCR en células MC3T3 co-cultivadas (barras punteadas) o no (barras lisas) con células PC3 durante 24 h y tratadas con CORM-401 (50  $\mu$ M) (barras verdes) o con vehículo (barras grises) durante las últimas 6 h. Los valores se normalizaron utilizando *Gapdh* como gen de referencia y son relativos a los controles sin tratamiento. Los resultados se muestran como media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$  y  $****p < 0,0001$ .

Estos resultados indican que el tratamiento con CORM-401 no solo afecta la diferenciación osteoblástica, sino que también reduce la expresión de componentes clave de la matriz ósea como el *Col1a1* y *Col1a2* y la *Spp1*, tanto en condiciones de monocultivo como de co-cultivo con células tumorales. Dado que estos genes están estrechamente vinculados al proceso de mineralización y al establecimiento de un nicho favorable para la colonización tumoral, su modulación sugiere que el CO liberado por CORM-401 podría contribuir a desestabilizar el microambiente óseo y dificultar la progresión metastásica del PCa (191–193).

#### 4.ii MODULACIÓN DEL FENOTIPO OSTEOMIMÉTICO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA EN CO-CULTIVO CON CÉLULAS ÓSEAS POR LA CORM-401

Para evaluar los efectos de la CORM-401 sobre las células de PCa co-cultivadas con progenitores óseos se procedió a estudiar la expresión de genes relacionados a las propiedades osteomiméticas que presentan las células de PCa (**Figura 33**) (188). En primer lugar, se observó que el tratamiento con CORM-401 (50  $\mu$ M) durante el co-cultivo aumenta la expresión de *PTHrP* ( $p < 0,001$ , **Figura 36A**) y de *OPG* ( $p < 0,01$ , **Figura 36B**). Respecto a *SPP1*, el co-cultivo se asoció con un aumento en la expresión de dicho gen ( $p < 0,05$ ) (**Figura 36C**). No se observaron cambios generados por el tratamiento con CORM-401 (50  $\mu$ M) (**Figura 36C**).

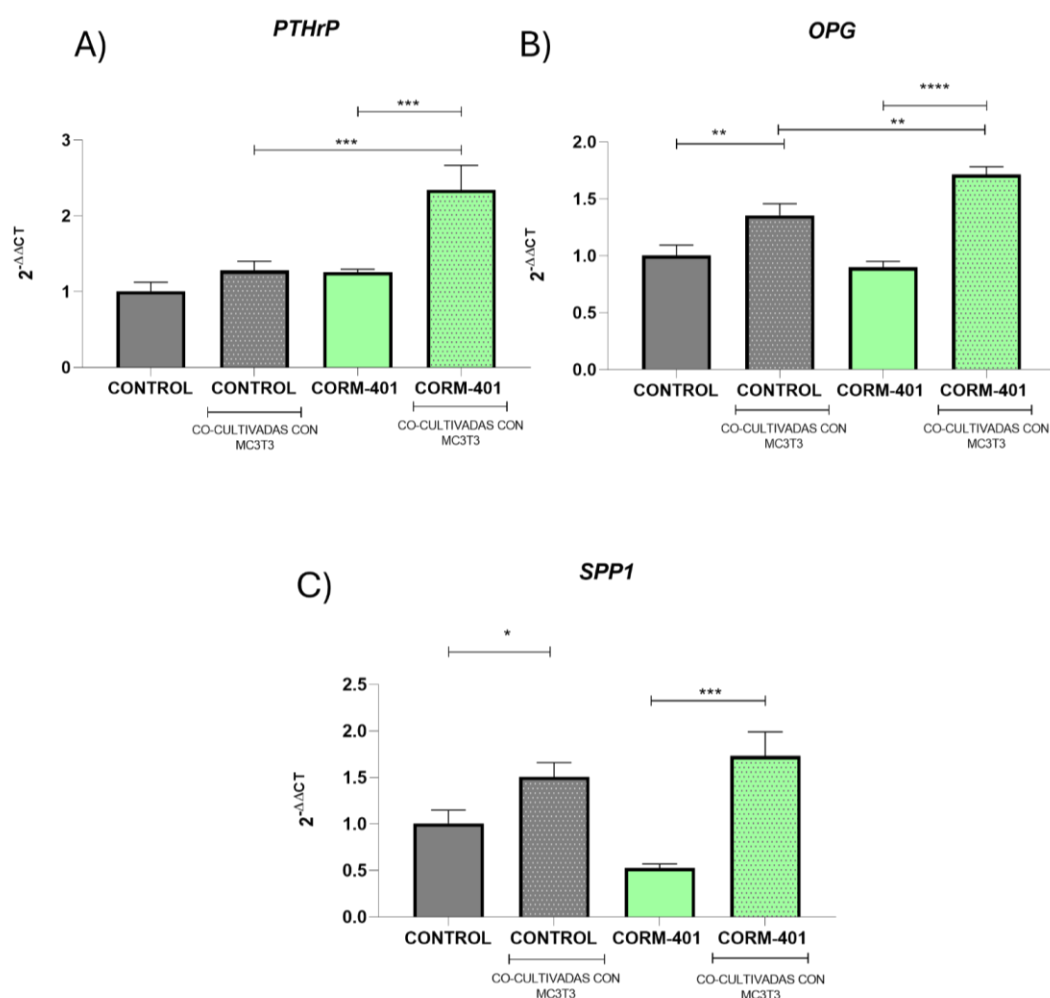


**Figura 36. Efecto del tratamiento con CO-RMs sobre la expresión de marcadores de osteomimetismo en células PC3 (células de PCa) co-cultivadas con MC3T3 (precursores osteoblásticos).** Los niveles de expresión génica de *PTHrP* (**A**), *OPG* (**B**) y *SPP1* (**C**) se evaluaron mediante RT-qPCR en células PC3 co-cultivadas (barras punteadas) o no (barras lisas) con células MC3T3 durante 24 h y tratadas con CORM-

401 (50 $\mu$ M) (barras verdes) o con vehículo (barras grises) durante las últimas 6 h. Los valores se normalizaron utilizando PPIA como gen de referencia y son relativos a los controles sin tratamiento. Los resultados se muestran como media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

A continuación, se estudió el efecto de la CORM-401 sobre la expresión de genes relacionados a la inflamación en células tumorales. Se observó un aumento en los niveles de ARN mensajero de interleuquinas pro-inflamatorias como *IL-8* ( $p < 0,0001$ ) e *IL-6* ( $p < 0,001$ ) como consecuencia del tratamiento con CORM-401 (50  $\mu$ M) en el co-cultivo (**Figura 37**).

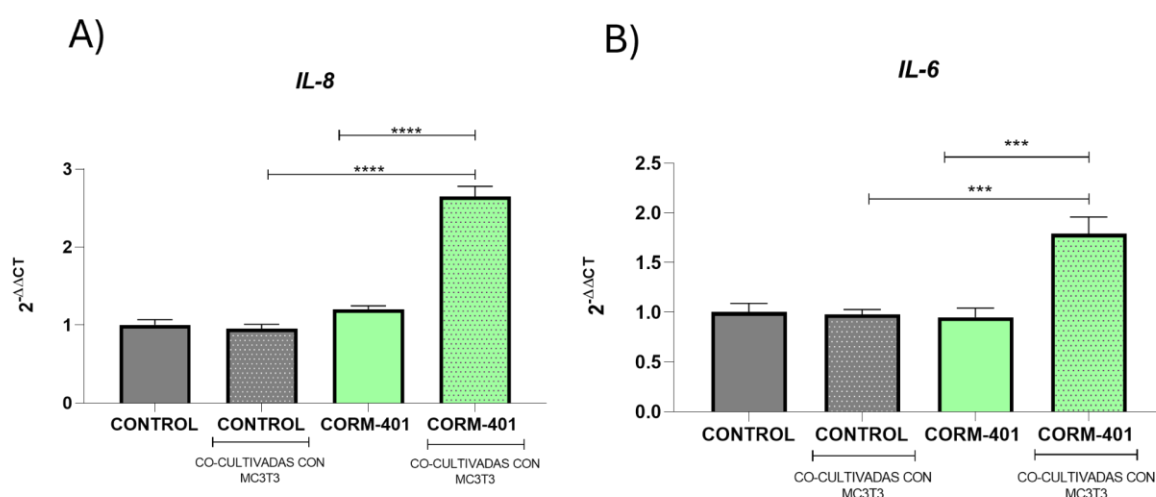


**Figura 37. Efecto del tratamiento con CO-RMs sobre la expresión de marcadores de inflamación en células PC3 (células de PCa) co-cultivadas con MC3T3 (precursores osteoblásticos).** Los niveles de expresión génica de *IL-8* (A) y *IL-6* (B) se evaluaron mediante RT-qPCR en células PC3 co-cultivadas (barras punteadas) o no (barras lisas) con células MC3T3 durante 24 h y tratadas con CORM-401 (50 $\mu$ M) (barras verdes) o con vehículo (barras grises) durante las últimas 6 h. Los valores se normalizaron utilizando PPIA como gen de referencia y son relativos a los controles sin tratamiento. Los resultados se muestran como media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0,05$  siendo \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con CORM-401 modula la expresión de genes vinculados al fenotipo osteomimético y a la respuesta inflamatoria en células de PCa co-cultivadas con progenitores óseos. Por un lado, se observó un aumento en la expresión de *PTHrP* y *OPG*, dos mediadores asociados a la interacción tumor-hueso que intervienen en el ciclo vicioso que se desarrolla en las metástasis óseas, como consecuencia del co-cultivo y el tratamiento con CORM-401 (66,81,193,194). Por otro lado, el tratamiento con dicha molécula promovió la expresión de las citoquinas proinflamatorias *IL-6* e *IL-8*, lo que sugiere una activación del eje inflamatorio tumoral (195–199). Estas observaciones destacan la

complejidad del efecto del CO en el contexto del microambiente óseo metastásico y subrayan que su impacto puede diferir según el tipo celular y el tipo de señalización evaluada.

## 5. CONCLUSIÓN GENERAL – PARTE I: EFECTO DE LAS CO-RMS EN LA CARCINOGENÉISIS PROSTÁTICA

En esta primera parte del trabajo se abordó el impacto de diferentes CO-RMs sobre células de PCa, con especial énfasis en la caracterización funcional y molecular de la CORM-401. En primer lugar, se confirmó experimentalmente la capacidad de liberación de CO por parte de las CO-RMs y su acumulación intracelular luego del tratamiento. Se seleccionaron concentraciones subcitotóxicas para garantizar que los efectos observados no fueran consecuencia de pérdida de viabilidad celular.

Desde el punto de vista funcional, el tratamiento con CORM-401 promovió una disminución en la expresión del marcador de proliferación *Ki67* y de *VEGF*, un aumento en la adhesión celular al sustrato sin potenciar la migración y redujo significativamente los niveles intracelulares de ROS, evidenciando un efecto antioxidante. A nivel metabólico, se observó una reducción en los niveles de ATP, lactato intracelular y actividad de lactato deshidrogenasa, acompañada por una menor expresión de enzimas clave de la glucólisis (*PKM2*, *LDHB*) y del ciclo de Krebs (*PDHB*, *ACO2*). Estos hallazgos se vieron reforzados por una disminución del contenido de ADN mitocondrial y una pérdida de integridad mitocondrial, junto con una inhibición de la glucólisis evaluada mediante análisis funcional con el sistema Seahorse XF.

Adicionalmente, se demostró que CORM-401 afecta negativamente propiedades asociadas al fenotipo *stem-like*, como la formación de esferoides en suspensión y la capacidad clonogénica, lo que sugiere un impacto sobre subpoblaciones celulares de relevancia en la progresión tumoral y la resistencia terapéutica. Finalmente, mediante un modelo de co-cultivo con células pre-osteoblásticas, se exploró la influencia del tratamiento sobre la comunicación tumor–hueso. Se observó una disminución en la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica (*Runx2*), de matriz ósea (*Col1a1*, *Col1a2*, *Spp1*), así como una inducción de *Hmox1* en las células óseas. En las células tumorales, se registró un aumento en la expresión de genes relacionados al fenotipo osteomimético (*PTHrP*, *OPG*) y de citoquinas proinflamatorias (*IL-6*, *IL-8*).

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la CORM-401 ejerce un efecto multifactorial sobre las células de PCa, afectando diversos procesos como la proliferación, migración y metabolismo, entre otros, así como su interacción con el microambiente óseo al cual también modula. Estos resultados posicionan al CO como un modulador relevante de procesos clave en la carcinogénesis prostática y respaldan la exploración de las CO-RMs como potenciales herramientas terapéuticas en estadios avanzados de la enfermedad.

## **PARTE II: POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA**

### **1. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE PACIENTES ARGENTINOS DIAGNOSTICADOS CON CÁNCER DE PRÓSTATA**

#### **1.i DISEÑO DE ESTUDIO DE CASO RETROSPECTIVO**

La complejidad biológica del PCa se refleja en su marcada heterogeneidad a nivel molecular, histopatológico y clínico, lo que dificulta su diagnóstico, pronóstico y manejo terapéutico (25). Esta variabilidad puede atribuirse, en parte, a diferencias en el trasfondo genético de los pacientes, incluyendo polimorfismos germinales que influyen en la susceptibilidad al desarrollo tumoral y en la evolución de la enfermedad (25). Si bien se han identificado múltiples variantes genéticas asociadas al PCa, su relevancia puede estar condicionada por factores étnicos y geográficos, lo que subraya la necesidad de estudios poblacionales específicos (25).

En este contexto, se llevó a cabo un estudio retrospectivo en una cohorte de 123 pacientes argentinos con diagnóstico confirmado de PCa, con el objetivo de caracterizar la frecuencia de dos polimorfismos germinales de interés: el número de repeticiones  $(CAG)_n$  en el gen del *AR* y la variante *c.444T>G (p.Asp148Glu)* en el gen *APEX1*, codificante de una endonucleasa central en la reparación de ADN por escisión de bases. Se analizaron además las asociaciones entre estos polimorfismos y variables clínico-patológicas relevantes, tales como la edad al diagnóstico, el valor de PSA basal, el puntaje de Gleason, el estadio tumoral y la presencia de metástasis. Para ello, se extrajo ADN genómico total a partir de sangre periférica, se realizó la genotipificación de ambas variantes y se llevó a cabo el análisis estadístico correspondiente (**Figura 18**).

#### **1.ii CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS**

Las características clinicopatológicas de los pacientes involucrados en el estudio se presentan en la **Tabla 6**. La mediana de edad al momento del diagnóstico fue de 64 años, con un PSA medio de 9,85 ng/ml (mediana: 7,5; rango: 0,77-84,1 ng/ml). Cabe destacar que 12 pacientes (9,76%) diagnosticados con PCa presentaban un PSA sérico  $\leq 4$  ng/ml, valor ubicado dentro de los valores de referencia para individuos sanos (200,201). La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados con tumores de riesgo bajo o intermedio favorable (ISUP 1 o 2; 78,87%). La

mayoría de las prostatectomías tenían márgenes libres de tumor (76,67%) y el 49,14% de los pacientes fueron diagnosticados con tumores en estadio pT2 (clasificación de tumores según TNM, donde a mayor estadio pT mayor tamaño y diseminación tumoral) (30). 27 pacientes (25%) desarrollaron una recaída bioquímica (BCR), es decir, tuvieron un aumento del PSA luego de la prostatectomía >0,2 ng/ml en dos determinaciones consecutivas. La mediana de tiempo hasta la recaída fue de 31 meses (rango: 8-129 meses). La mediana de seguimiento fue de 83 meses (rango: 14-152 meses), con una mediana de 86,5 meses (rango: 27-149 meses) para los pacientes con BCR y de 80,5 meses (rango: 14-152 meses) para aquellos libres de BCR (**Tabla 6**).

En un primer lugar, se estudió la relación entre las variables clinicopatológicas mencionadas y la recurrencia del PCa. Como era de esperar, el grado ISUP y el compromiso de los márgenes quirúrgicos estuvieron significativamente asociados con el riesgo de recaída bioquímica (log-rank  $p=0,014$  y log-rank  $p=0,012$ , respectivamente; **Tabla 6**). No se observó ninguna asociación con las otras tres variables (p-T, terapia neoadyuvante y PSA sérico al diagnóstico). En general, la cohorte siguió los criterios clínicos actuales utilizados para evaluar el riesgo de recaída bioquímica en PCa.

**Tabla 6. Características clinicopatológicas de los 123 pacientes argentinos con PCa incluidos en la cohorte del estudio.** <sup>1</sup> Mediana (Rango) y <sup>2</sup> n (%). \* Log-Rank  $p < 0.05$ .

| CARACTERÍSTICAS                            | n = 123           | BRFS asociada a 6 años (log-rank p) |
|--------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Edad al diagnóstico <sup>1</sup>           | 64 (49-73)        | 0,475                               |
| Historia familiar de cáncer <sup>2</sup>   |                   | 0,345                               |
| No                                         | 85 (69,67%)       |                                     |
| Si                                         | 37 (30,33%)       |                                     |
| NA                                         | 1                 |                                     |
| Compromiso de margen <sup>2</sup>          |                   | 0,012*                              |
| No                                         | 92 (76,67%)       |                                     |
| Si                                         | 28 (23,33%)       |                                     |
| NA                                         | 3                 |                                     |
| PSA al diagnóstico (ng/ml) <sup>1,2</sup>  | 7,51 (0,77-84.10) | 0,7                                 |
| ≤ 4                                        | 12 (9,76%)        |                                     |
| 4-10                                       | 68 (55,28%)       |                                     |
| ≥ 10                                       | 43 (34.96%)       |                                     |
| Recaída bioquímica <sup>2</sup>            |                   | -                                   |
| No                                         | 82 (75,45%)       |                                     |
| Si                                         | 27 (24.55%)       |                                     |
| NA                                         | 14                |                                     |
| Tiempo de seguimiento (meses) <sup>1</sup> |                   | -                                   |
| Sin BCR                                    | 80,5 (14-152)     |                                     |
| Con BCR                                    | 86,5(27-149)      |                                     |

|                                            |              |        |
|--------------------------------------------|--------------|--------|
| <b>Tiempo a la BCR (meses)<sup>1</sup></b> | 31 (8-129)   | -      |
| <b>Grado ISUP<sup>2</sup></b>              |              | 0,014* |
| 1                                          | 58 (47,16%)  |        |
| 2                                          | 39 (31,71%)  |        |
| 3                                          | 17 (13,82%)  |        |
| 4                                          | 8 (6,5%)     |        |
| 5                                          | 1 (0,81%)    |        |
| <b>Estadío pT<sup>2</sup></b>              |              | 0,082  |
| 2                                          | 57 (49,14%)  |        |
| 3a                                         | 53 (45,69%)  |        |
| 3b                                         | 6 (5,17%)    |        |
| NA                                         | 7            |        |
| <b>Terapia neoadyuvante<sup>2</sup></b>    |              | 0,4    |
| No                                         | 114 (92,68%) |        |
| Si                                         | 9 (7,32%)    |        |

### 1.iii CARACTERIZACIÓN DE POLIMORFISMOS EN AR Y EN APEX1

La genotipificación de AR (CAG)<sub>n</sub> se realizó mediante PCR con éxito en 111 de los 123 pacientes (90,24%). Sin embargo, 12 genotipificaciones fueron consideradas como fallidas tras realizar tres repeticiones de la PCR, asumiendo que la calidad del ADN no era la suficiente.

Dado que el gen de AR está localizado en Xq12, los hombres son hemicigotas y, por lo tanto, presentan un único alelo (41). Para la cohorte en estudio el número de repeticiones de (CAG)<sub>n</sub> varió entre 12 y 31, con una mediana de 22 repeticiones, siendo los alelos más frecuentes los de 19 y 24 repeticiones (**Figura 38A**).

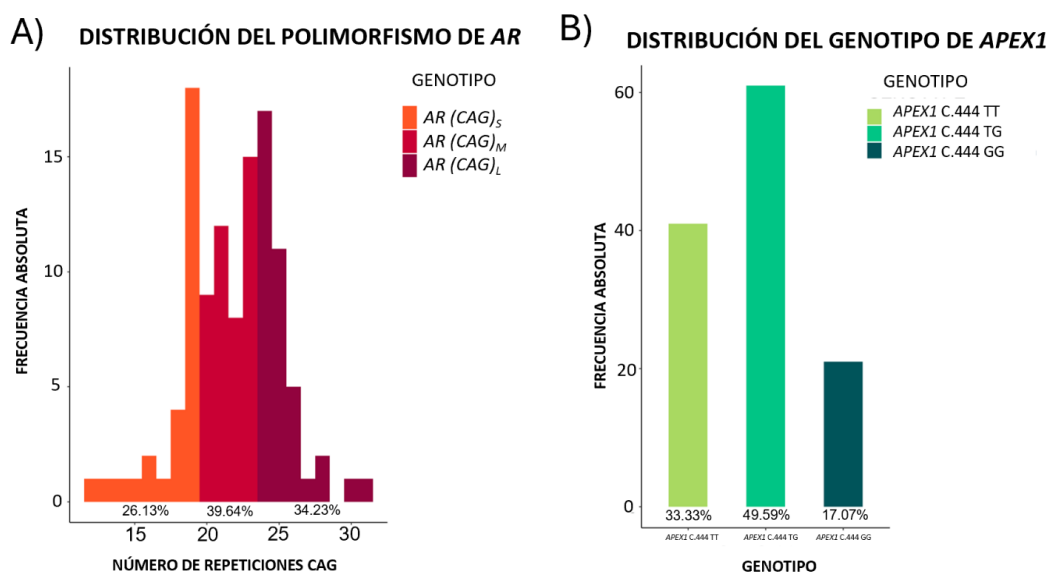


**Figura 38. Distribución de los genotipos AR (CAG)<sub>n</sub> y APEX1 c.444T>G en la cohorte de pacientes argentinos diagnosticados con PCa. A)** Histograma que muestra la distribución continua y las frecuencias absolutas de la longitud de (CAG)<sub>n</sub> en AR. Los pacientes fueron clasificados según la longitud del polimorfismo en alelos de longitud corta (AR (CAG)<sub>S</sub>: <20 repeticiones, n=29, naranja), alelos de longitud media (AR (CAG)<sub>M</sub>: 20-23 repeticiones, n=44, rojo) y alelos de longitud larga (AR (CAG)<sub>L</sub>: >23 repeticiones, n=38, rojo oscuro). **B)** Gráfico de barras que muestra la frecuencia de los genotipos APEX1 c.444TT (n=41, verde), APEX1 c.444TG (n=61, verde claro) y APEX1 c.444GG (n=21, verde oscuro).

Posteriormente, se categorizaron a los pacientes según el número de repeticiones de (CAG)<sub>n</sub> de la siguiente manera: AR (CAG)<sub>S</sub> (alelos de longitud corta: <20 repeticiones), AR (CAG)<sub>M</sub> (alelos de longitud media: 20-23 repeticiones) y AR (CAG)<sub>L</sub> (alelos de longitud larga: >23 repeticiones), con frecuencias del 26,13%, 39,64% y 34,23%, respectivamente (**Figura 38A**). Esta categorización se definió en función de la distribución por tertiles, estableciendo los puntos de corte en <20 y >23 repeticiones. Estos puntos de corte concuerdan con la literatura, aunque varían entre estudios (47,202,203).

Por otro lado, el genotipificado de APEX1 c.444T>G fue exitoso en los 123 pacientes analizados (100%). Las frecuencias genotípicas fueron 33,33% c.444TT, 49,59% c.444TG y 17,07% c.444GG, con frecuencias alélicas de 58% c.444T y 42% c.444G (**Figura 38B**).

Se detalla a continuación la distribución de los genotipos de AR y APEX1 dentro de cada variable clinicopatológica (**Tabla 7**). Cabe destacar que los genotipos de APEX1 estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg y las frecuencias fueron similares a las reportadas para poblaciones globales y latinoamericanas en dbSNP (204).

**Tabla 7. Características clinicopatológicas de los 123 pacientes argentinos con PCa incluidos en la cohorte del estudio distribuidos por los genotipos de AR (CAG)<sub>n</sub> y APEX1 c.444T>G.** <sup>1</sup> Mediana (Rango).

<sup>2</sup> n (%). <sup>3</sup> Test de rank sum Kruskal-Wallis/Wilcoxon rank sum ; Test de Pearson's Chi cuadrado; Fisher's.

\*  $p < 0.05$ .

|                                                  | AR (CAG) <sub>n</sub> |                  |                  |                      | APEX1 c.444T>G   |                |                 |                      |
|--------------------------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------------|
| Características                                  | S<br>(n = 29)         | M<br>(n = 44)    | L<br>(n = 38)    | p-valor <sup>3</sup> | TT<br>(n = 41)   | TG<br>(n = 61) | GG<br>(n = 21)  | p-valor <sup>3</sup> |
| <b>Edad al diagnóstico<sup>1</sup></b>           | 65 (50-71)            | 64.0 (49-72)     | 63,5 (55-73)     | 0,37                 | 64.0 (49-73)     | 64 (49-72)     | 63 (53-70)      | 0,4                  |
| <b>Historia familiar de cáncer<sup>2</sup></b>   |                       |                  |                  | 0,047*               |                  |                |                 | 0,7                  |
| No                                               | 25 (86,21%)           | 34 (79,07%)      | 37 (97,37%)      |                      | 29 (70,73%)      | 43 (71,67%)    | 13 (61,9%)      |                      |
| Si                                               | 4 (13,79%)            | 9 (20,93%)       | 1 (2,63%)        |                      | 12 (29,27%)      | 17 (28,33%)    | 8 (38,1%)       |                      |
| NA                                               | 0                     | 1                | 0                |                      | 0                | 1              | 0               |                      |
| <b>Compromiso de margen<sup>2</sup></b>          |                       |                  |                  | 0,7                  |                  |                |                 | 0,7                  |
| No                                               | 23 (82,14%)           | 31 (73,81%)      | 30 (78,95%)      |                      | 29 (72,5%)       | 47 (79,66%)    | 16 (76,19%)     |                      |
| Si                                               | 5 (17,86%)            | 11 (26,19%)      | 8 (21,05%)       |                      | 11 (27,5%)       | 12 (20,34%)    | 5 (23,81%)      |                      |
| NA                                               | 1                     | 2                | 0                |                      | 1                | 2              | 0               |                      |
| <b>PSA (ng/ml)<sup>1,2</sup></b>                 | 7,1 (0,77-28,9)       | 6,67 (0,90-84.1) | 7,80 (3,06-20,3) | 0,6                  | 7,80 (0,77-28,9) | 6,9 (2,66-27)  | 8,4 (4.52-84.1) | 0,3                  |
| ≤ 4                                              | 5 (17,24%)            | 3 (6,82%)        | 4 (10,53%)       |                      | 6 (14,63%)       | 6 (9,84%)      | 0 (0%)          |                      |
| 4-10                                             | 13 (44,83%)           | 27 (61,36%)      | 21 (55,26%)      |                      | 22 (53,66%)      | 31 (50,82%)    | 15 (71,43%)     |                      |
| ≥ 10                                             | 11 (37,93%)           | 14 (31,82%)      | 13 (34,21%)      |                      | 13 (31,71%)      | 24 (39,34%)    | 6 (28,57%)      |                      |
| <b>Recaída bioquímica<sup>2</sup></b>            |                       |                  |                  | 0,5                  |                  |                |                 | 0,093                |
| No                                               | 21 (77,78%)           | 29 (67,44%)      | 24 (77,42%)      |                      | 23 (63,89%)      | 45 (83,33%)    | 14 (73,68%)     |                      |
| Si                                               | 6 (22,22%)            | 14 (32,56%)      | 7 (22,58%)       |                      | 13 (36,11%)      | 9 (16,67%)     | 5 (26,32%)      |                      |
| NA                                               | 2                     | 1                | 7                |                      | 5                | 7              | 2               |                      |
| <b>Tiempo de seguimiento (meses)<sup>1</sup></b> |                       |                  |                  |                      |                  |                |                 |                      |
| Sin BCR                                          | 81 (14-122)           | 73 (19-137)      | 82,5 (22-152)    | 0,72                 | 83 (19-152)      | 75 (14-137)    | 82 (35-114)     | 0,69                 |
| Con BCR                                          | 88 (65-112)           | 83 (27-119)      | 101 (64-149)     | 0,23                 | 83 (27-1129)     | 95,5 (34-146)  | 88 (51-149)     | 0,48                 |
| <b>Tiempo a la BCR (meses)<sup>1</sup></b>       | 31 (12-73)            | 20 (10-80)       | 44.5 (8-129)     | 0,17                 | 20 (10-56)       | 43(8-120)      | 37 (14-129)     | 0,14                 |

|                                         |             |             |             |     |             |             |             |     |
|-----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----|-------------|-------------|-------------|-----|
| <b>Grado ISUP<sup>2</sup></b>           |             |             |             | 0,3 |             |             |             | 0,6 |
| 1                                       | 14 (48,28%) | 22 (50%)    | 20 (52,63%) |     | 22 (53,66%) | 26(42,62%)  | 10 (47,62%) |     |
| 2                                       | 12 (41,38%) | 9 (20,45%)  | 11 (28,95%) |     | 10 (24,39%) | 23 (37,7%)  | 6 (28,57%)  |     |
| 3                                       | 1 (3,45%)   | 10 (22,73%) | 5 (13,16%)  |     | 7 (17,07%)  | 7 (11,48%)  | 3 (14,29%)  |     |
| 4                                       | 2 (6,89%)   | 3 (6,82%)   | 2 (5,26%)   |     | 1 (2,44%)   | 5 (8,2%)    | 2 (9,52%)   |     |
| 5                                       | 0 (0%)      | 0 (0%)      | 0 (0%)      |     | 1 (2,44%)   | 0 (0%)      | 0 (0%)      |     |
| <b>Estadío pT<sup>2</sup></b>           |             |             |             | 0,5 |             |             |             | 0,5 |
| 2                                       | 13 (46,43%) | 19 (47,5%)  | 20 (54,05%) |     | 20 (54,05%) | 26 (44,83%) | 11 (52,38%) |     |
| 3a                                      | 13 (46,43%) | 20 (50%)    | 15 (40,54%) |     | 15 (40,54%) | 30 (51,72%) | 8 (38,1%)   |     |
| 3b                                      | 2 (7,14%)   | 1 (2,5%)    | 2 (5,41%)   |     | 2 (5,41%)   | 2 (3,45%)   | 2 (9,52%)   |     |
| NA                                      | 1           | 4           | 1           |     | 4           | 3           | 0           |     |
| <b>Terapia neoadyuvante<sup>2</sup></b> |             |             |             | 0,3 |             |             |             | 0,8 |
| No                                      | 28 (96,55%) | 42 (95,45%) | 33 (86,84%) |     | 37 (90,24%) | 57 (93,44%) | 20 (95,24%) |     |
| Si                                      | 1 (3,45%)   | 2 (4,55%)   | 5 (13,16%)  |     | 4 (9,76%)   | 4 (6,56%)   | 1 (4,76%)   |     |

## 2. ASOCIACIÓN ENTRE LAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS Y LOS POLIMORFISMOS DE LA COHORTE DE PACIENTES ARGENTINOS DIAGNOSTICADOS CON CÁNCER DE PRÓSTATA

### 2.i ASOCIACIÓN CON ANTECEDENTES FAMILIARES DE CÁNCER

A continuación, se estudió la asociación entre los grupos de AR ( $CAG$ )<sub>n</sub> y las distintas características clinicopatológicas (**Tabla 7**). Se encontraron diferencias significativas en la distribución de los genotipos AR ( $CAG$ )<sub>n</sub> entre pacientes con y sin antecedentes de cáncer de mama/ovario en familiares de primer grado ( $p=0,047$ ; **Figura 39A**). Se observó que ( $CAG$ )<sub>L</sub> fue el alelo más frecuente entre los pacientes con PCa sin antecedentes familiares de cáncer (38,54% vs. 7,14% en pacientes con antecedentes familiares), mientras que la frecuencia de ( $CAG$ )<sub>M</sub> fue mayor en pacientes con antecedentes familiares (64,29% vs. 35,42% en pacientes sin antecedentes familiares de cáncer). Estos hallazgos sugieren que el genotipo AR ( $CAG$ )<sub>M</sub> podría estar asociado con una mayor predisposición genética al PCa. No se encontraron asociaciones significativas entre los genotipos *APEX1* c.444T>G y las características clinicopatológicas (**Figura 39B y Tabla 6**).

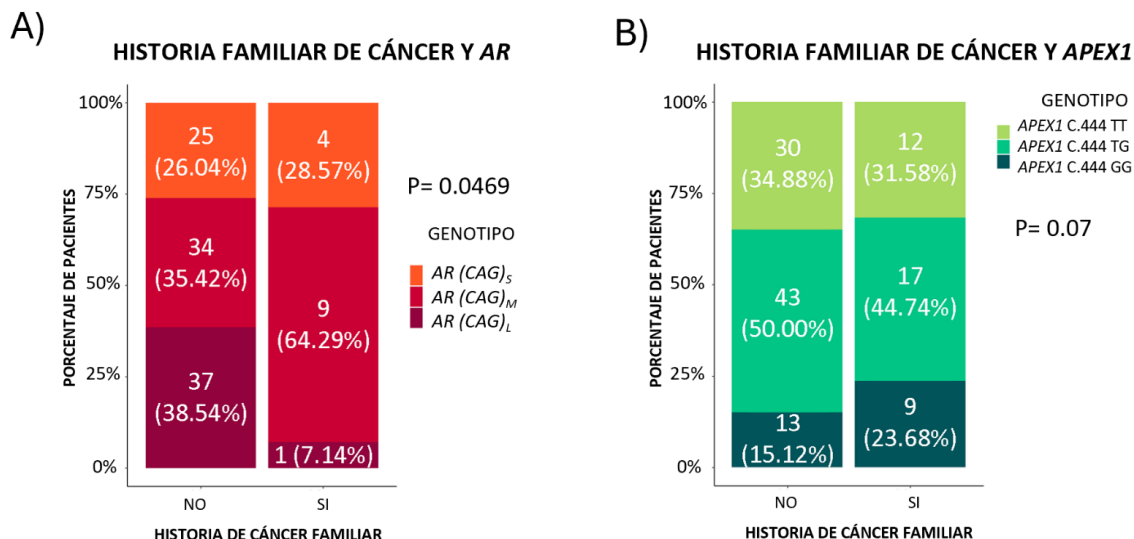


**Figura 39. Distribución de genotipos AR (CAG)<sub>n</sub> y APEX1 c.444T>G y su asociación con antecedentes familiares de cáncer.** **A)** Análisis de la distribución de (CAG)<sub>n</sub> en AR entre pacientes con y sin antecedentes familiares de cáncer de mama/ovario. **B)** Análisis de las frecuencias de APEX1 c.444T>G en pacientes con y sin antecedentes familiares de PCa/mama/ovario. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba de Chi-cuadrado estableciéndose significativo  $p < 0,05$ .

### 3. POLIMORFISMOS COMO BIOMARCADORES PRONÓSTICOS

#### 3.i RELACIÓN ENTRE AR (CAG)<sub>n</sub> Y APEX1 c.444T>G (p.Asp148Glu) Y RIESGO DE RECAÍDA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA

Adicionalmente, se realizó un análisis de supervivencia para estudiar la asociación con la sobrevida libre de recaída bioquímica (BRFS). Cuando se analizaron los tres genotipos de AR de forma independiente, no se encontraron diferencias significativas (log-rank  $p = 0,299$ ; **Figura 40**). En particular, dado que se observó una supervivencia similar entre los alelos (CAG)<sub>s</sub> y (CAG)<sub>L</sub> (**Figura 40**), se los agrupó en una nueva categoría, (CAG)<sub>s+L</sub>. Aunque esta nueva agrupación puede parecer poco intuitiva a primera vista, está respaldada por otros estudios que sugieren que tanto los alelos cortos como los largos reducen la actividad de AR al interferir en la interacción con los correguladores (202,205).

## GENOTIPOS DE AR

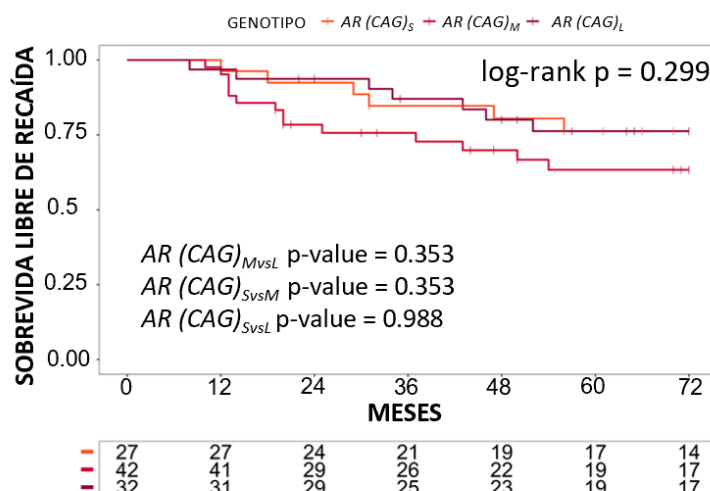


**Figura 40. BRFS en pacientes argentinos con PCa según los genotipos AR.** Curvas de Kaplan-Meier para la BRFS en pacientes argentinos con PCa estratificados por: AR (CAG)<sub>n</sub>. Los p valores fueron calculados mediante el test de comparaciones múltiples de log-rank. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

Cuando se analizó la BRFS a 6 años en base a los polimorfismos de AR (CAG)<sub>M</sub> y (CAG)<sub>S+L</sub>, se encontró que los pacientes con un alelo de longitud media presentaron una menor BRFS y casi el doble de riesgo de recaída bioquímica, aunque sin significancia estadística (HR=1,81, IC95%=0,85-3,85,  $p=0,125$ ; **Figura 41A**). Finalmente, se construyó un modelo predictivo multivariado que incluyó el genotipo de AR y como covariables otros marcadores pronósticos utilizados en la clínica como el grado ISUP y el compromiso de los márgenes quirúrgicos (**Figura 41B**) (29,206). Se encontró un aumento marginalmente significativo en el riesgo de recaída bioquímica en pacientes con alelos de longitud media en comparación con aquellos con alelos de longitud corta/larga en el modelo multivariable (HR=2,01, IC95%=0,93-4,30,  $p=0,074$ ; **Figura 41B**).

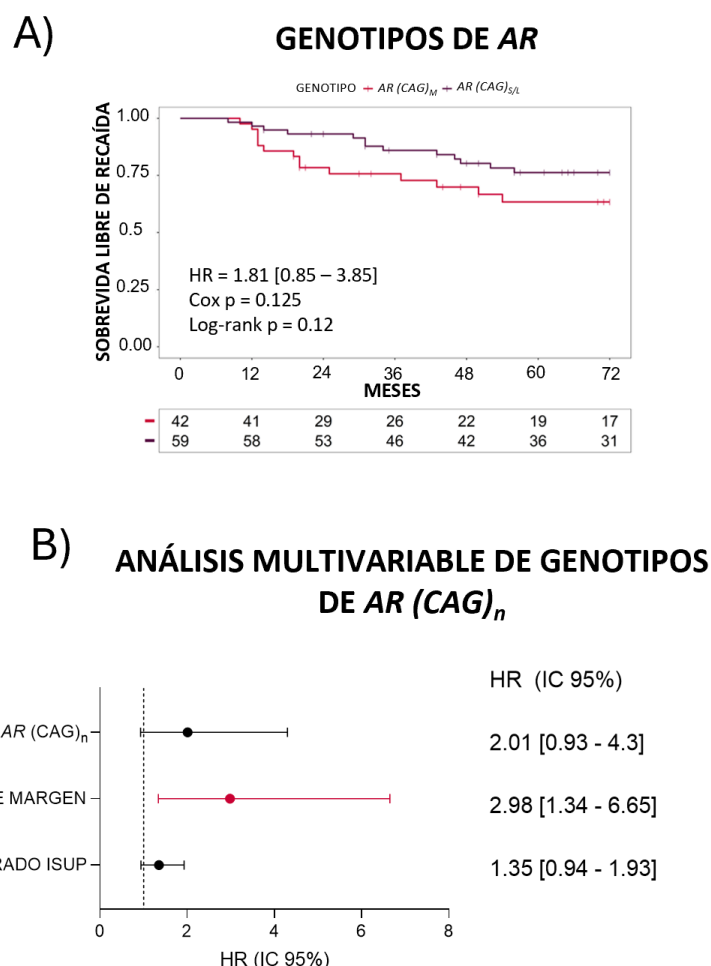


**Figura 41. BDFS en pacientes argentinos con PCa según los genotipos AR. A)** Curvas de Kaplan-Meier para la BDFS en pacientes estratificados por genotipos agrupados: i) AR (CAG)<sub>S+L</sub> vs. AR (CAG)<sub>M</sub> (genotipo de referencia). **B)** Diagrama de Forest que muestran la estimación del HR en análisis multivariados que incluyen parámetros histopatológicos (afectación de los márgenes quirúrgicos y grado ISUP) y AR (CAG)<sub>n</sub> como covariables. Los p valores fueron calculados mediante regresión de Cox. HR (IC 95%) = Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%). Cox p = valor de p del modelo de riesgos proporcionales de Cox. La significancia estadística se estableció en p del log-rank o p de Cox < 0,05 donde \*\* p < 0.01.

Por otro lado, para el caso de APEX1 al analizar la BDFS a 6 años, no se encontraron diferencias marginalmente significativas entre los grupos (log-rank p=0,099; **Figura 42**). Dado que los pacientes heterocigotas mostraron una mejor supervivencia, aunque no significativa, se agruparon a los pacientes homocigotas T y G en un solo grupo. Esta nueva clasificación se respaldó en estudios previos donde el modelo genotípico heterocigota se asoció con el desarrollo y desenlace de la enfermedad (54,207).

## GENOTIPOS DE APEX1

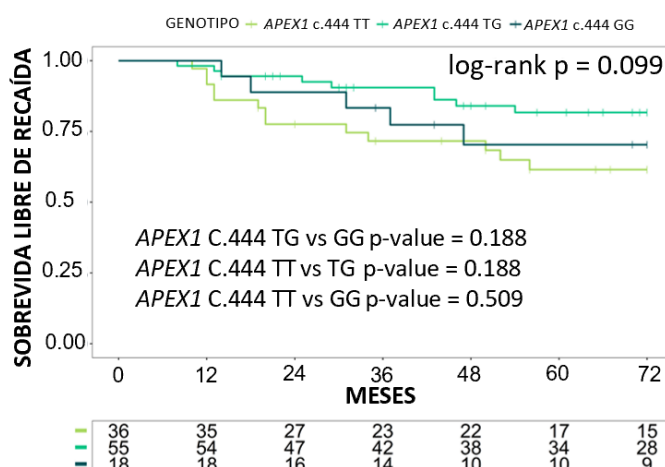


**Figura 42. BRFs en pacientes argentinos con PCa según los genotipos APEX1.** Curvas de Kaplan-Meier para la BRFs en pacientes argentinos con PCa estratificados por APEX1 c.444T>G (p.Asp148Glu). Los p valores fueron calculados mediante el test de comparaciones múltiples de log-rank. La significancia estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

Del mismo modo que para AR, se analizó el genotipo de APEX1 donde se encontró que los pacientes c.444TG presentaron una BRFs significativamente mejor en comparación con los pacientes c.444TT+GG, con un riesgo 2 veces mayor de recaída para el grupo de pacientes homocigotas TT+GG en comparación con los heterocigotas (HR=2,21, IC 95%=0,99-4,93,  $p=0,052$ ; **Figura 43A**). El modelo multivariado que incluyó el grado ISUP y el compromiso de los márgenes quirúrgicos como covariables mostró que APEX1 c.444T>G era un factor de riesgo independiente (HR=2,33, IC 95%=1,03-5,26,  $p=0,042$ ; **Figura 43B**).

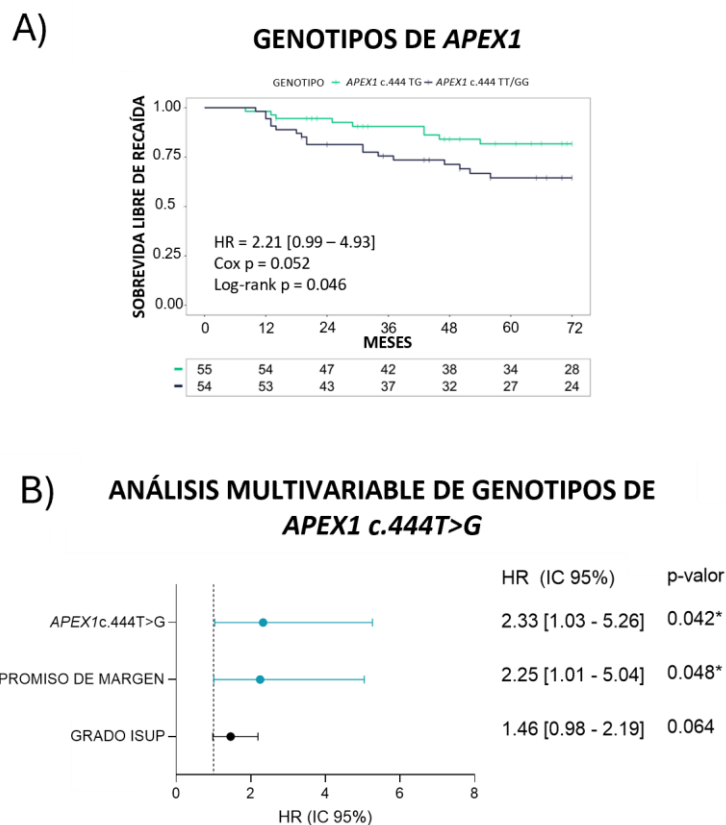


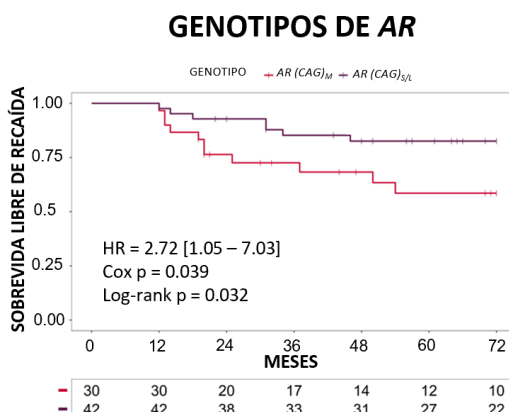
**Figura 43. BRFS en pacientes argentinos con PCa según los genotipos de APEX1. A)** Curvas de Kaplan-Meier para la BRFS en pacientes estratificados por genotipos agrupados por APEX1 c.444TT+GG vs. APEX1 c.444TG (genotipo de referencia). **B)** Diagrama de Forest que muestran la estimación del HR en análisis multivariados que incluyen parámetros histopatológicos (afectación de los márgenes quirúrgicos y grado ISUP) y APEX1 c.444T>G como covariables. Los p valores fueron calculados mediante regresión de Cox. HR (IC 95%) = Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%). Cox p = valor de p del modelo de riesgos proporcionales de Cox. La significancia estadística se estableció en p del log-rank o p de Cox < 0,05 donde\* p < 0.05.

### 3.ii ASOCIACIÓN ENTRE AR (CAG)<sub>n</sub> Y APEX1 c.444T>G (p.Asp148Glu) Y RIESGO DE RECAÍDA BIOQUÍMICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA EN PACIENTES CON VALORES DE PSA INTERMEDIO

Dada la heterogeneidad del PCa y la mayor incertidumbre en la evolución de la enfermedad en pacientes con PSA <10 ng/ml, el análisis se profundizó en este grupo de pacientes (200,201). Para el polimorfismos de AR los pacientes con el alelo (CAG)<sub>M</sub> tuvieron una peor BRFS a 6 años (p=0,032), con un riesgo de recaída 2,7 veces mayor (HR=2,72, IC 95%=1,05-7,03, p=0,039; **Figura 44A**). El análisis multivariado que incluyó los grados ISUP y el compromiso de los márgenes quirúrgicos mostró que AR (CAG)<sub>n</sub> era un factor de riesgo

independiente, con un riesgo de recaída superior a 3 veces para los alelos de longitud media (HR=3,37, IC 95%=1,24-9,11, p=0,017; **Figura 44B**).

A)



B)

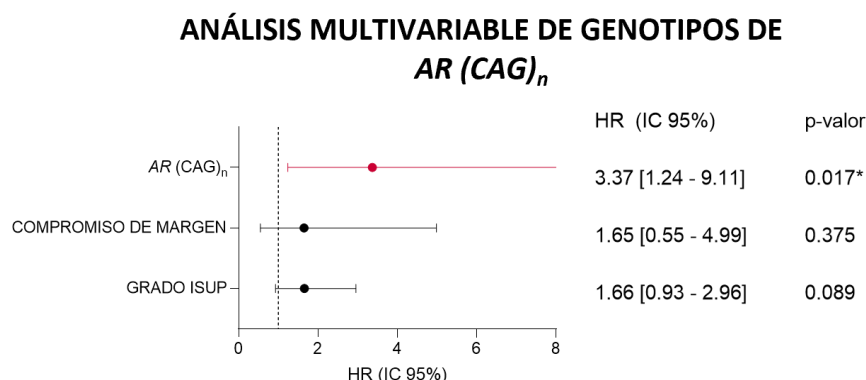
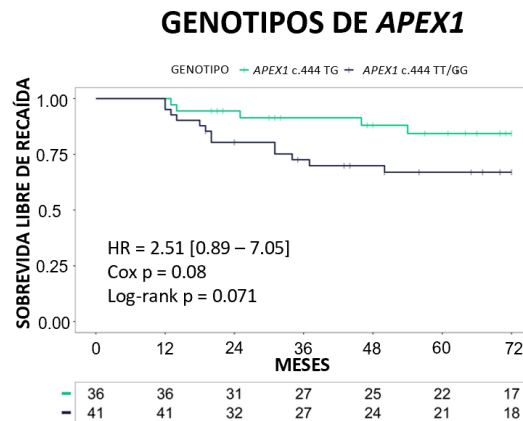


**Figura 44. Impacto de los genotipos AR en la BRFS en pacientes argentinos con PCa con PSA sérico <10 ng/ml. A)** Curvas de Kaplan-Meier para la BRFS en pacientes argentinos con PCa con PSA sérico <10 ng/ml clasificados por AR (CAG)<sub>SL</sub> vs. AR (CAG)<sub>M</sub> (genotipo de referencia). **B)** Diagrama de Forest mostrando la estimación del HR en análisis multivariados que incluyen parámetros histopatológicos (compromiso de los márgenes quirúrgicos y grado ISUP) y AR (CAG)<sub>n</sub>. Los p valores fueron calculados mediante regresión de Cox. HR (IC 95%) = Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%). Cox p = valor de p del modelo de riesgos proporcionales de Cox. La significancia estadística se estableció en p del log-rank o p de Cox < 0,05 donde \* p<0.05

En cambio para la SNV de APEX1 no se encontró una asociación significativa en pacientes con PSA <10 ng/ml; sin embargo, se observó una tendencia marginalmente significativa como biomarcador de recaída en PCa tanto en el modelo univariable (HR=2,51, IC 95%=0,89-7,05, p=0,08; **Figuras 45A**) como en el multivariable (HR=2,47, IC 95%=0,88-6.96, p=0,087; **Figura 45B**).

A)



B)

**ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE GENOTIPOS DE  
APEX1 c.444T>G**

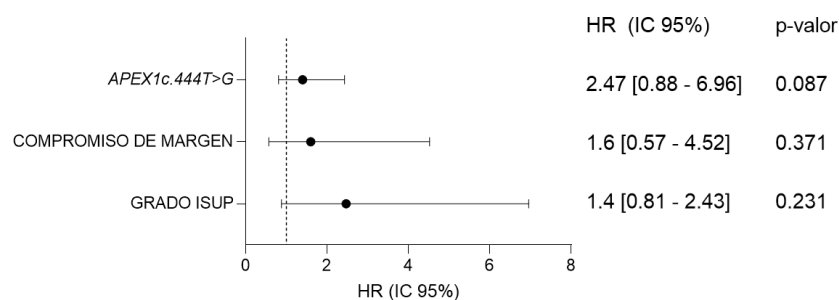


**Figura 45. Impacto de los genotipos AR y APEX1 en la BRFs en pacientes argentinos con PCa con PSA sérico <10 ng/ml. A)** Curvas de Kaplan-Meier para la BRFs en pacientes argentinos con PCa con PSA sérico <10 ng/ml clasificados por APEX1 c.444TT+GG vs. APEX1 c.444TG (genotipo de referencia). **B)** Diagrama de Forest mostrando la estimación del HR en análisis multivariados que incluyen parámetros histopatológicos (compromiso de los márgenes quirúrgicos y grado ISUP) y APEX1 c.444T>G. Los p valores fueron calculados mediante regresión de Cox. HR (IC 95%) = Hazard Ratio (Intervalo de Confianza del 95%). Cox p = valor de p del modelo de riesgos proporcionales de Cox. La significancia estadística se estableció en p del log-rank o p de Cox < 0,05.

### 3.iii INTERACCIÓN ENTRE AR (CAG)<sub>n</sub> Y APEX1 c.444T>G (p.Asp148Glu) COMO PREDICTOR DE RECAÍDA EN CÁNCER DE PRÓSTATA

En último lugar, se evaluó si la combinación de los genotipos AR (CAG)<sub>n</sub> y APEX1 c.444T>G tenía una asociación combinatoria con el riesgo de recaída en esta enfermedad. Se consideró la combinación AR (CAG)<sub>M</sub> + APEX1 c.444TT/GG como genotipos de riesgo y se comparó con AR (CAG)<sub>S/L</sub> + APEX1 c.444TG (Tabla 8).

**Tabla 8. Características clinicopatológicas estratificadas según los genotipos combinados de AR y APEX1.** <sup>1</sup>Mediana (Rango). <sup>2</sup>n (%). <sup>3</sup>Test de rank sum Kruskal-Wallis/Wilcoxon rank sum ; Test de Pearson's Chi cuadrado; Fisher's. \*  $p < 0.05$ .

| Características                                     | AR (CAG) <sub>M</sub> +<br>APEX1 c.444<br>TT/GG<br>(n = 23) | no [AR (CAG) <sub>M</sub> +<br>APEX1 c.444<br>TT/GG]<br>(n = 88) | p-valor <sup>3</sup> |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Edad al diagnóstico <sup>1</sup>                    | 64 (49-71)                                                  | 64 (50-73)                                                       | 0,95                 |
| Historia familiar de cáncer <sup>2</sup>            |                                                             |                                                                  | 0,036*               |
| No                                                  | 12 (52,17%)                                                 | 65 (74,71%)                                                      |                      |
| Si                                                  | 11 (47,83%)                                                 | 22 (25,29%)                                                      |                      |
| NA                                                  | 0                                                           | 1                                                                |                      |
| Compromiso quirúrgico de márgen <sup>2</sup>        |                                                             |                                                                  | 0,1                  |
| No                                                  | 15 (65,22%)                                                 | 69 (81,18%)                                                      |                      |
| Si                                                  | 8 (34,78%)                                                  | 16 (18,82%)                                                      |                      |
| NA                                                  | 0                                                           | 3                                                                |                      |
| PSA (ng/mL) <sup>1,2</sup>                          | 8,2 (3,15-84.1)                                             | 7 (0,77-28,9)                                                    | 0,11                 |
| ≤ 4                                                 | 2 (10,53%)                                                  | 10 (11,36%)                                                      |                      |
| 4-10                                                | 17 (89,47%)                                                 | 44 (50%)                                                         |                      |
| ≥ 10                                                | 4                                                           | 34 (38,64%)                                                      |                      |
| Recaída bioquímica <sup>2</sup>                     |                                                             |                                                                  | 0,023*               |
| No                                                  | 12 (54,55%)                                                 | 62 (78,48%)                                                      |                      |
| Si                                                  | 10 (45,45%)                                                 | 17 (21,52%)                                                      |                      |
| NA                                                  | 1                                                           | 9                                                                |                      |
| Tiempo de seguimiento (meses) <sup>1</sup>          |                                                             |                                                                  |                      |
| Sin BCR                                             | 82,5 (19-111)                                               | 80 (14-152)                                                      | 0,86                 |
| Con BCR                                             | 83 (27-119)                                                 | 88 (34-149)                                                      | 0,43                 |
| Tiempo a la recaída bioquímica (meses) <sup>1</sup> | 19 (10-80)                                                  | 43 (8-129)                                                       | 0,06                 |
| Grado ISUP <sup>2</sup>                             |                                                             |                                                                  | 0,056                |
| 1                                                   | 15 (65,22%)                                                 | 41 (46,59%)                                                      |                      |
| 2                                                   | 2 (8,69%)                                                   | 30 (34,09%)                                                      |                      |
| 3                                                   | 5 (21,74%)                                                  | 11 (12,5%)                                                       |                      |
| 4                                                   | 1 (4,35%)                                                   | 6 (6,82%)                                                        |                      |
| 5                                                   | 0                                                           | 0                                                                |                      |
| Estadío pT <sup>2</sup>                             |                                                             |                                                                  | 0,7                  |
| 2                                                   | 10 (47,62%)                                                 | 42 (50%)                                                         |                      |
| 3a                                                  | 10 (47,62%)                                                 | 38 (45,24%)                                                      |                      |
| 3b                                                  | 1 (4,76%)                                                   | 4 (4,76%)                                                        |                      |
| NA                                                  | 2                                                           | 4                                                                |                      |
| Terapia neoadyuvante <sup>2</sup>                   |                                                             |                                                                  | > 0,9                |
| No                                                  | 22 (95,65%)                                                 | 81 (92,05%)                                                      |                      |
| Si                                                  | 1 (4,35%)                                                   | 7 (7,95%)                                                        |                      |

Se observó que los pacientes con la combinación AR (CAG)<sub>M</sub> + APEX1 c.444TT/GG tenían un riesgo de recaída bioquímica a 6 años más de 2,5 veces superior en comparación con los otros

genotipos. Esta asociación fue significativa tanto en la cohorte completa (HR=2,89, IC 95%=1,32-6,33, p=0,008; **Figura 46A**) como en el subgrupo de pacientes con PSA <10 ng/ml (HR=2,61, IC 95%=1,03-6,61, p=0,044; **Figura 46B**) en el análisis univariable.

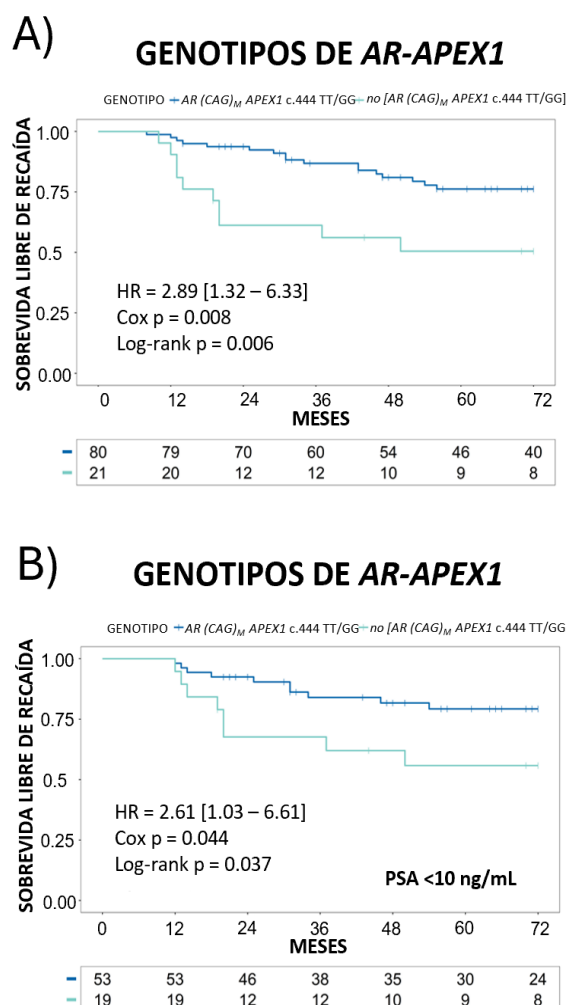


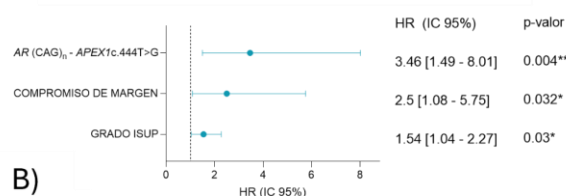
**Figura 46. Análisis de genotipos combinados en la BRFs en pacientes argentinos con PCa.** Curvas de Kaplan-Meier para la BRFs en **A)** la cohorte total de pacientes argentinos con PCa y **B)** pacientes con PSA <10 ng/ml, agrupados según AR (CAG)<sub>n</sub> + APEX1 c.444T>G. En todos los análisis, el genotipo AR (CAG)<sub>M</sub> + APEX1 c.444TT/GG fue considerado el grupo de referencia. HR (95% CI) = Razón de riesgos (95% Intervalo de Confianza). Cox p = valor p del modelo de riesgos proporcionales de Cox. Se estableció significancia estadística en p < 0,05 (prueba log-rank/Cox p).

El análisis multivariado que incluyó el grado ISUP y el compromiso de los márgenes quirúrgicos confirmó estos resultados, mostrando un riesgo significativo superior a 3 veces para el grupo total de pacientes (HR=3,46, IC 95%=1,49-8,01, p=0,004; **Figuras 47Ai**) y para los pacientes con valores de PSA menores a 10 ng/ml (HR=3,09, IC 95%=1,18-8,13, p=0,022; **Figuras 47Aii**),

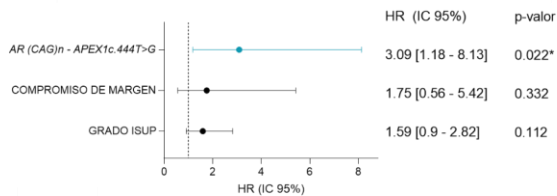
lo que sugiere el papel independiente de la combinación de AR (CAG)<sub>N</sub> y APEX1 c.444T>G en la predicción de la recaída.

A)

i) ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE GENOTIPOS DE AR (CAG)<sub>N</sub> - APEX1 c.444T>G

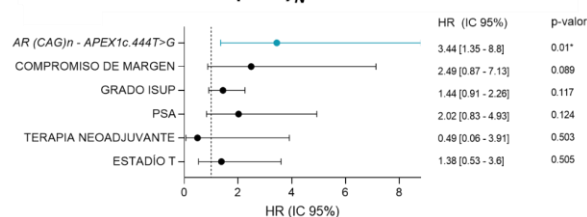


ii) ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE GENOTIPOS DE AR (CAG)<sub>N</sub> - APEX1 c.444T>G



B)

i) ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE GENOTIPOS DE AR (CAG)<sub>N</sub> - APEX1 c.444T>G



ii) ANÁLISIS MULTIVARIABLE DE GENOTIPOS DE AR (CAG)<sub>N</sub> - APEX1 c.444T>G

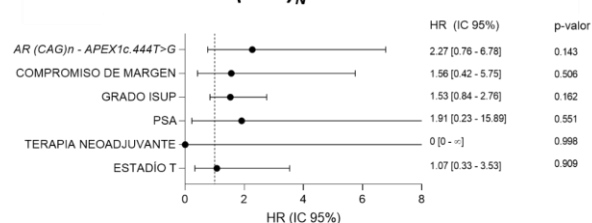


**Figura 47. Análisis de genotipos combinados en la BRFS en pacientes argentinos con PCa.**

**A)** Diagrama de Forest para la estimación del HR en análisis multivariantes que incluyen parámetros histopatológicos (compromiso de márgenes quirúrgicos y grado ISUP) y el genotipo AR (CAG)<sub>N</sub> + APEX1 c.444T>G como covariables para (i) la cohorte total y (ii) el subgrupo con PSA <10 ng/ml. **B)** Diagrama de Forest para el HR en análisis multivariantes que incluyen el compromiso de márgenes quirúrgicos, el grado ISUP, el PSA sérico, la terapia neoadyuvante y el estadio pT como covariables para (i) la cohorte total y (ii) el subgrupo con PSA <10 ng/ml. En todos los análisis, el genotipo AR (CAG)<sub>M</sub> + APEX1 c.444TT/GG fue considerado el grupo de referencia. HR (95% CI) = Razón de riesgos (95% Intervalo de Confianza). Cox p = valor p del modelo de riesgos proporcionales de Cox. Se estableció significancia estadística en  $p < 0,05$  (prueba log-rank/Cox p) donde \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ .

Para validar estos hallazgos en un modelo predictivo más complejo, se evaluó un modelo multivariado que incluyó la combinación genotípica junto con el grado ISUP, compromiso de los márgenes quirúrgicos, PSA al diagnóstico, terapia neoadyuvante y estadio pT como covariables. Encontramos que la combinación genotípica fue el único factor de riesgo significativo e independientemente asociado con la recaída bioquímica (HR=3,44, IC 95%=1,35-8,80,  $p=0,010$ ; **Figura 47Bi**). En este modelo multivariado, las asociaciones significativas del grado ISUP y el compromiso de los márgenes quirúrgicos se perdieron (**Figura 47Bi**). Para el modelo multivariado del subgrupo de pacientes con PSA <10 ng/ml, no se observaron asociaciones significativas (HR=2,27, IC 95%=0,76-6,78,  $p=0,143$ ; **Figura 47Bii**).

#### 4. CONCLUSIÓN GENERAL – PARTE II: POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA

En esta segunda parte del trabajo se abordó la caracterización de dos polimorfismos germinales con potencial valor pronóstico en PCa, en una cohorte de pacientes argentinos diagnosticados con PCa localizado. Se estudió tanto el número de repeticiones (CAG)<sub>n</sub> en el gen en el AR como el SNV c.444T>G (p.Asp148Glu) en el gen *APEX1*, analizando su distribución y asociación con variables clinicopatológicas relevantes.

En un primer lugar, los resultados obtenidos evidenciaron una distribución de los genotipos, dentro de la población analizada, con frecuencias similares a las reportadas en otras poblaciones. A su vez, se observó una asociación significativa entre el genotipo AR (CAG)<sub>M</sub> y la presencia de antecedentes familiares de cáncer, lo que sugiere una posible predisposición genética. En el análisis de sobrevida, se encontró que AR (CAG)<sub>M</sub> fue un predictor independiente de recaída bioquímica en el subgrupo de pacientes con valores de PSA ubicados en la zona gris de dicha determinación bioquímica (<10 ng/ml). A nivel combinado, los pacientes portadores de los genotipos (AR (CAG)<sub>M</sub> + *APEX1* c.444TT/GG) presentaron un riesgo significativamente aumentado de recaída, resultado que se mantuvo incluso en modelos multivariados ajustados por los factores clínico-patológicos usados convencionalmente en la clínica.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que ciertas variantes germinales en AR y *APEX1* pueden predecir la evolución clínica del PCa y ser consideradas como biomarcadores pronósticos complementarios a las herramientas utilizadas actualmente en la práctica clínica para contribuir a mejorar la estratificación pronóstica de los pacientes diagnosticados con PCa.

# DISCUSIÓN

## PARTE I

El PCa es una de las neoplasias más prevalentes y una de las principales causas de mortalidad en hombres a nivel global (14,15). A nivel mundial, el PCa es el segundo cáncer más diagnosticado y la quinta causa de mortalidad relacionada con cáncer en hombres (15). En Argentina, es la neoplasia maligna más común y ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte por cáncer en hombres (15). Su progresión se caracteriza por una compleja interconexión entre la proliferación descontrolada, la invasión, la capacidad metastásica y una profunda interacción con el microambiente tumoral (25,179,180,208,209). Esta interacción no solo facilita el crecimiento del tumor primario, sino que también resulta crucial para el establecimiento de metástasis, particularmente en el microambiente óseo (25). De hecho, los avances en la comprensión de la biología del PCa han revelado la importancia de múltiples factores intrínsecos y extrínsecos que contribuyen a la agresividad y progresión de la enfermedad, tales como la desregulación de las vías de señalización intracelulares, las adaptaciones metabólicas distintivas —como el efecto Warburg—, la modulación del estrés oxidativo, y los cambios en la migración y adhesión celular (25,86,179,180,208,209).

En este contexto complejo, la presente tesis doctoral se enfocó en evaluar el potencial terapéutico de las CO-RMs en distintos modelos de PCa, poniendo especial énfasis en procesos funcionales clave relacionados con la biología tumoral, como proliferación, adhesión y migración celular, angiogénesis, propiedades de *stem-like*, estrés oxidativo, metabolismo energético y señalización en el microambiente óseo.

En primer lugar, para establecer las condiciones experimentales adecuadas, se evaluó la viabilidad celular frente a distintas concentraciones de tres CO-RMs con estructuras químicas y perfiles de liberación de CO diferentes: CORM-3, CORM-A1 y CORM-401. De esta manera se pudieron identificar rangos de concentraciones no tóxicos que permiten estudiar los efectos del tratamiento con CO-RMs sin inducir citotoxicidad directa.

Una vez definidos estos rangos, se confirmó la liberación efectiva de CO y su acumulación en células de PCa hasta 6 h post tratamiento. Cabe destacar que la liberación de CO es el

mecanismo bioactivo esencial de las CO-RMs y, por ende, la base de sus efectos biológicos (210). El CO es un gasotransmisor endógeno producido principalmente por la acción de HO-1, una enzima que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y citoprotectoras (211).

La inducción de HO-1 ha sido extensamente estudiada en el contexto del PCa, donde se ha asociado con múltiples efectos antitumorales, incluyendo la inhibición de la proliferación celular, la reducción de la viabilidad celular, la inducción de apoptosis, la disminución del potencial invasivo y metastásico, así como también con la modulación del metabolismo tumoral (76,114–116,121,122). En este marco, el uso de las CO-RMs representa una estrategia terapéutica prometedora que busca emular los beneficios de la inducción de HO-1 mediante la administración exógena y controlada de CO, permitiendo así una modulación localizada y regulada de procesos clave en el microambiente tumoral.

En cuanto a las características de las CO-RMs evaluadas, CORM-3 es un compuesto de rutenio con liberación rápida de CO; CORM-A1 es un compuesto de boro con liberación más lenta y sostenida; mientras que CORM-401 es una CO-RM basada en Mn que libera CO de forma lenta y sostenida y que posee la mayor biodisponibilidad y el potencial para la administración oral (133–135,138,139). Es importante destacar que CORM-401 puede liberar hasta tres moles de CO por molécula, a diferencia de CORM-3 y CORM-A1, que liberan un mol, lo cual puede influir significativamente en su eficacia y en sus efectos celulares (133–135,138,139).

Experimentalmente se observó que CORM-3 y CORM-A1 no disminuyeron la viabilidad celular en el rango de concentraciones estudiadas, mientras que sólo la concentración máxima estudiada de CORM-401 redujo significativamente la viabilidad celular.

Una vez establecidas las condiciones experimentales no citotóxicas y confirmada la liberación de CO, se procedió al estudio de diversos parámetros relacionados con la carcinogénesis prostática. En primer lugar, se observó una reducción significativa de la expresión del marcador de proliferación *Ki67* tras el tratamiento con CORM-401 y, en menor medida, con CORM-3. Este resultado es de gran relevancia ya que en procesos tumorales la sobreexpresión de *Ki67* es un indicador de proliferación exacerbada y, a menudo, se asocia con un pronóstico desfavorable y una mayor agresividad tumoral (212,213). Por lo tanto, dicha disminución generada por el tratamiento con las CO-RMs es un hallazgo que resulta de gran interés ya que

sugiere una inhibición potencial del crecimiento tumoral. Esta observación se alinea con la creciente literatura que describe al CO como un agente capaz de inducir el arresto del ciclo celular en diversos modelos tumorales, a menudo asociado a la modulación de vías de señalización que involucran factores como la Ciclina D1 y p53 entre otras (162,214–216). La capacidad del CO de afectar la proliferación celular a concentraciones que no comprometen la viabilidad celular, sugiere un posible uso terapéutico de las CO-RMs en combinación con otros agentes moduladores del ciclo celular.

Luego, dada la importancia de la vascularización en el crecimiento tumoral, se evaluó si el tratamiento con CO-RMs modula los niveles del factor angiogénico *VEGF* (177,178). Se observó una disminución significativa en la expresión de dicho gen tras el tratamiento con las tres CO-RMs, particularmente con CORM-401, en las concentraciones utilizadas. Este hallazgo es crucial ya que VEGF es un regulador central de la angiogénesis tumoral y su sobreexpresión en PCa ha sido correlacionada con agresividad, riesgo de metástasis y resistencia a tratamiento (177,178). Es sabido que los niveles elevados de VEGF promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigan el tumor, facilitando su crecimiento, invasión y diseminación (85,177,178). Por lo tanto, la inhibición de VEGF por las CO-RMs sugiere un posible efecto antiangiogénico, altamente deseable para limitar el acceso de nutrientes y oxígeno al tumor, un mecanismo particularmente relevante en los procesos carcinogénicos donde la vascularización es crítica para el establecimiento y crecimiento tumoral (177,178). Este hallazgo sugiere que las CO-RMs podrían impactar el entorno vascular tumoral, extendiendo su acción más allá de las células tumorales.

La similitud de los efectos observados en estos resultados utilizando las distintas CO-RMs y los reportados para la inducción de HO-1 en PCa sugiere que el CO podría ser un mediador clave de la actividad antitumoral de HO-1, reforzando la idea de que la administración controlada de CO podría replicar o potenciar algunos de estos efectos beneficiosos (76,114–116,121,122).

En relación con la capacidad de diseminación, un aspecto crítico de la progresión del PCa, se evaluó el impacto de las CO-RMs en la adhesión y migración celular. Se observó un aumento en el número total de células adheridas a un sustrato para todas las CO-RMs ensayadas, sugiriendo que las células podrían estar mostrando mayor predisposición al anclaje al sustrato

y, por lo tanto, menor capacidad para desprenderse y migrar. Si bien la adhesión celular es un proceso complejo con dinámicas variables en diferentes contextos, es posible que dicho aumento refleje una alteración en las propiedades de las células tumorales que las hace menos propensas a desprenderse del tumor primario o que altera su interacción con componentes específicos de la matriz extracelular (208). Por otro lado, los resultados del ensayo de cierre de la herida revelaron que todas las CO-RMs disminuyen significativamente la migración celular. Este efecto antimigratorio es de suma importancia ya que la migración celular es un paso esencial en la cascada metastásica, permitiendo a las células tumorales abandonar el sitio primario y colonizar órganos distantes (208). La relación entre el aumento de la adhesión y la disminución de la migración podría indicar una modulación compleja de la interacción célula-matriz, donde las células, aunque más adheridas a un sustrato, pierden su capacidad direccional de movimiento. Estudios previos han demostrado que el CO puede modular la expresión de integrinas y metaloproteinasas de matriz, cruciales para la adhesión y migración celular, respectivamente (162,208,214,217). Investigaciones futuras deberían focalizarse en los mecanismos moleculares específicos que subyacen a estos efectos diferenciales.

En cuanto al estrés oxidativo, un parámetro clave en la agresividad tumoral, se observó que el tratamiento con las tres CO-RMs disminuyó significativamente los niveles de ROS intracelulares totales (179). Este hallazgo es consistente con la bibliografía previa que describe al CO y a las CO-RMs como agentes con propiedades antioxidantes (163,210,211,218,219). El estrés oxidativo desempeña un papel crucial en todas las etapas de la carcinogénesis, promoviendo el daño al ADN, la inestabilidad genómica y la señalización pro-tumoral. La capacidad de las CO-RMs para reducir los niveles de ROS intracelulares sugiere un mecanismo por el cual se podría contribuir a los efectos antiproliferativos y a la modulación metabólica observada, ya que el estrés oxidativo influye en la activación de vías de señalización que promueven el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales (163,210,218,219). Además, la disminución de los niveles de estrés oxidativo podría ser beneficiosa para la estabilidad genómica de las células no tumorales en el microambiente (163,220).

Los resultados obtenidos sobre el efecto de las CO-RMs sobre diversos parámetros metabólicos sugieren que particularmente la CORM-401 puede inducir una disrupción

significativa del metabolismo energético en células de PCa. Dicho hallazgo resulta de gran relevancia ya que el PCa exhibe una plasticidad metabólica marcada, con un cambio hacia la glucólisis aeróbica (efecto Warburg) y fosforilación oxidativa exacerbada como estrategia para sostener su crecimiento y proliferación aún más en estadios avanzados (96,163,180,181). En este sentido, detectamos una reducción de los niveles intracelulares de ATP, acompañado de una disminución en la actividad de la LDH y de la expresión de genes clave de la glucólisis y del metabolismo mitocondrial como *PKM2*, *PDHB* y *ACO2* (183). Estas observaciones son de suma relevancia ya que en diversos tumores, incluido el PCa, se ha descrito un incremento en la actividad glucolítica como mecanismo de adaptación al estrés metabólico y como facilitador de la biosíntesis tumoral (96,163,180,181,183).

A su vez, el descenso en la producción de lactato intracelular podría tener múltiples implicancias. Por un lado, sugiere una inhibición del metabolismo glucolítico, lo cual es inusual en células tumorales altamente dependientes de la glucólisis aeróbica (96). Por otro, implica una menor acidificación del microambiente tumoral, lo cual podría modificar la invasividad, la inmunoevasión y el fenotipo de las células circundantes (96,221). Es importante destacar que el lactato ha emergido como un regulador clave en el microambiente tumoral, influyendo tanto en la progresión tumoral como en la dinámica inmune, ya que niveles elevados de lactato inhiben a las células inmunes efectoras mientras promueven a las células inmunosupresoras, lo que fomenta un desplazamiento del balance hacia un ambiente inmunosupresor (96,222). La modulación de la expresión de *PKM2* es crítica, ya que esta isoforma enzimática favorece la derivación de intermediarios glucolíticos hacia vías biosintéticas esenciales para la proliferación (183,223). A su vez, la reducción de *PDHB* sugiere una alteración en el complejo piruvato deshidrogenasa, clave para la entrada del piruvato a las mitocondrias, y la disminución de *ACO2* indica una disfunción en el ciclo de Krebs (181,183). En conjunto, estos hallazgos sugieren una reprogramación metabólica hacia un estado menos eficiente y menos propicio para el crecimiento tumoral.

Desde el punto de vista mitocondrial, y como parte de la evaluación del metabolismo celular, se estudiaron distintos parámetros relacionados a la funcionalidad de dicha organela, donde se observó un aumento de la masa mitocondrial junto con una disminución de la integridad y del número de copias del ADN mitocondrial como consecuencia del tratamiento con CORM-

401. Esta combinación podría explicarse por un proceso de acumulación de mitocondrias disfuncionales, en el que la biogénesis mitocondrial se activa como respuesta compensatoria frente a un daño previo (224). Este fenómeno ha sido reportado en modelos donde el CO desencadenó la acumulación de mitocondrias con el potencial de membrana alterado (225–227). Si bien las células tumorales a menudo dependen de la glucólisis para la producción rápida de ATP, la integridad mitocondrial es crucial para mantener otros procesos vitales como la homeostasis de los niveles de las ROS, la apoptosis y la biosíntesis de macromoléculas (96). La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo están ampliamente implicados en el cáncer, a menudo promoviendo la inestabilidad genómica y la señalización pro-tumoral (183). Una disrupción significativa de la función mitocondrial, como la sugerida por nuestros resultados, podría comprometer la capacidad de las células tumorales para adaptarse y sobrevivir en entornos adversos para su progresión, lo que representa un mecanismo antitumoral adicional de las CO-RMs.

A su vez, se evaluó el metabolismo energético en tiempo real mediante el uso de el autoanalyzer Seahorse, donde se observó que el tratamiento con CORM-401 disminuyó el flujo glucolítico basal (disminución en la ECAR) a expensas de un aumento en la respiración mitocondrial basal (aumento en la OCR) en células PC3. Este hallazgo confirma y complementa las observaciones previas de disrupción metabólica inducida por la CORM-401, evidenciando una inhibición aguda del metabolismo glucolítico, mencionado anteriormente como el Efecto Warburg (86,89). Estos resultados van en consonancia con la disminución de la actividad de la LDH como de los niveles de lactato intracelulares que son indicio de una disminución de la glucólisis.

Otro aspecto evaluado fueron las propiedades *stem-like* de las células de PCa, un fenotipo asociado a la agresividad y resistencia terapéutica (184,186). La reducción en la formación de esferoides y en la eficiencia clonogénica tras el tratamiento con CORM-401 indica una pérdida de la capacidad de autorrenovación y de crecimiento tridimensional autónomo, características propias de las células madre tumorales (CSCs) (185). Estas células no solo se vinculan con la iniciación tumoral, sino también con la resistencia a terapias convencionales y a la aparición de recaídas, lo cual posiciona al *targeting* de CSCs como una estrategia prioritaria en oncología (184,186). Las CSCs exhiben características de células madre

mesenquimales y representan una subpoblación de células tumorales que desempeñan un papel importante en la progresión tumoral, la resistencia a la quimioterapia, la recurrencia y la metástasis (185). Nuestros hallazgos sugieren que CORM-401 tiene el potencial de modular negativamente estas propiedades inherentes de las CSCs, lo cual convierte a esta molécula en un candidato prometedor para futuras terapias dirigidas a esta subpoblación resistente y evasiva.

Finalmente, y de suma importancia para comprender el impacto de las CO-RMs en el contexto de la metástasis ósea del PCa, nuestro modelo de co-cultivo entre células óseas y tumorales reveló un efecto diferencial y complejo sobre las células del microambiente óseo y sobre las células tumorales prostáticas. En los precursores osteoblásticos, que una vez diferenciadas son las células encargadas de la formación de nuevo tejido óseo, se detectó una disminución en la expresión de genes clave relacionados con la diferenciación osteoblástica como *Runx2*, *Col1a1*, *Col1a2* y *Spp1*. *Runx2* codifica para un factor de transcripción fundamental y regulador maestro de la osteogénesis y el desarrollo óseo y su disminución indica una inhibición de la diferenciación osteoblástica (189). *Col1a1* y *Col1a2*, genes que codifican para los componentes principales del colágeno tipo I y II respectivamente, forman la matriz orgánica del hueso y son esenciales para su estructura y su reducción sugiere una producción menor de matriz ósea (191,192). Finalmente, *Spp1* codifica para una glicoproteína de la matriz ósea implicada en la mineralización, la remodelación ósea y en la interacción celular con la matriz, cuya disminución también se asocia con una actividad osteoblástica reducida (193). Este hallazgo es especialmente relevante porque las metástasis óseas del PCa son predominantemente osteoblásticas, caracterizadas por una formación de hueso desorganizada, densa y funcionalmente defectuosa, que contribuye al dolor, fracturas y una mayor morbilidad (81,195,228) por lo tanto, una reducción en la actividad osteoblástica, indicada por la disminución de estos marcadores clave inducida por las CO-RMs, podría ser altamente beneficiosa al limitar la progresión de las lesiones óseas patológicas y la formación de hueso ineficiente que acompaña el crecimiento tumoral en este sitio metastásico, ofreciendo una estrategia para mitigar la patología ósea. El aumento observado en la expresión de *Hmox1* en los precursores osteoblásticos indica una activación del sistema antioxidante y citoprotector mediado por HO-1, clave en la regulación del equilibrio redox celular y en la modulación del microambiente óseo (123,190).

Dado que HO-1 y su producto, el CO, participan en la regulación de la diferenciación celular y en la protección frente a daños oxidativos, este incremento sugiere que las células estromales responden al tratamiento con CO-RMs promoviendo la homeostasis tisular y limitando los procesos inflamatorios y degenerativos, posicionando a HO-1 como un mediador clave en la modulación del microambiente tumoral óseo bajo la influencia de CO-RMs (123,190,211).

Por otro lado, y mostrando la complejidad de la interacción entre las células tumorales y el microambiente, se observó en las células tumorales de PCa en co-cultivo, un aumento de marcadores proinflamatorios (*IL-6*, *IL-8*) y osteomiméticos (*PTHrP*, *OPG*) (81,194,196,197,229).

Esta doble respuesta observada en el modelo de co-cultivo refleja el rol multifacético del CO en contextos multicelulares y la dinámica de adaptación tumoral. En nuestros resultados, el tratamiento con CORM-401 se asoció a un aumento significativo en la expresión de *IL-6* e *IL-8* en las células tumorales, lo cual podría representar una activación de mecanismos compensatorios de supervivencia frente al estrés inducido por las CO-RMs. Ambas citoquinas activan rutas proinflamatorias como STAT3 y NF- $\kappa$ B, conocidas por su participación en la promoción de inflamación crónica, resistencia terapéutica y progresión tumoral (195–199). Además, *IL-8* ha sido implicada en procesos de angiogénesis, los cuales son esenciales, no sólo para sostener el crecimiento tumoral, sino también para permitir la formación de hueso nuevo durante el remodelado óseo, aspecto especialmente relevante en el contexto metastásico (199). En este sentido, el aumento de estas interleuquinas podría interpretarse como parte de una respuesta adaptativa pro-tumoral dentro del microambiente óseo, que debería considerarse al diseñar estrategias terapéuticas combinadas.

Asimismo, el aumento de *PTHrP* y *OPG* observado en las células tumorales co-cultivadas tratadas con CORM-401 adquiere particular relevancia en el contexto de las metástasis óseas del PCa. *PTHrP* es un mediador clave que estimula a los osteoblastos a producir RANKL, el cual activa la diferenciación osteoclástica y la resorción ósea (66,81,194). Este proceso libera factores de crecimiento atrapados en la matriz ósea, promoviendo a su vez la proliferación de las células tumorales, en lo que se ha denominado un ciclo vicioso osteotrópico pro-tumoral (66). El aumento de *PTHrP* en este modelo sugiere que las células tumorales podrían estar

activando vías que perpetúan su capacidad de colonización y expansión ósea, incluso frente a condiciones de estrés redox como las inducidas por el CO.

Por otro lado, OPG es una proteína soluble que actúa como un señuelo para RANKL, inhibiendo su unión a RANK en los osteoclastos y, por lo tanto, reduciendo la resorción ósea (81,229). Un aumento de *OPG* en las células tumorales podría ser una respuesta adaptativa compleja de las células de PCa para manipular el microambiente óseo, potencialmente favoreciendo la formación ósea que es característica de las lesiones de PCa en el hueso o bien, en un intento de protección tumoral. Así, limitar una excesiva resorción ósea que podría ser detrimental para el propio crecimiento tumoral en el microambiente óseo (81,195,228).

La alteración de estas moléculas clave de la interacción tumor-hueso por parte de las CO-RMs sugiere un impacto directo y complejo en la comunicación cruzada entre las células tumorales y el hueso, lo que representa una modulación significativa en la progresión de la enfermedad ósea asociada al PCa y potencialmente una interrupción del ciclo vicioso metastásico en el hueso, ya sea de forma directa o a través de mecanismos de adaptación tumoral (228). Nuestros resultados, por tanto, aportan a comprender cómo las CO-RMs no solo actúan sobre las células tumorales, sino que también modulan las interacciones clave dentro del microambiente metastásico (**Figura 48**).

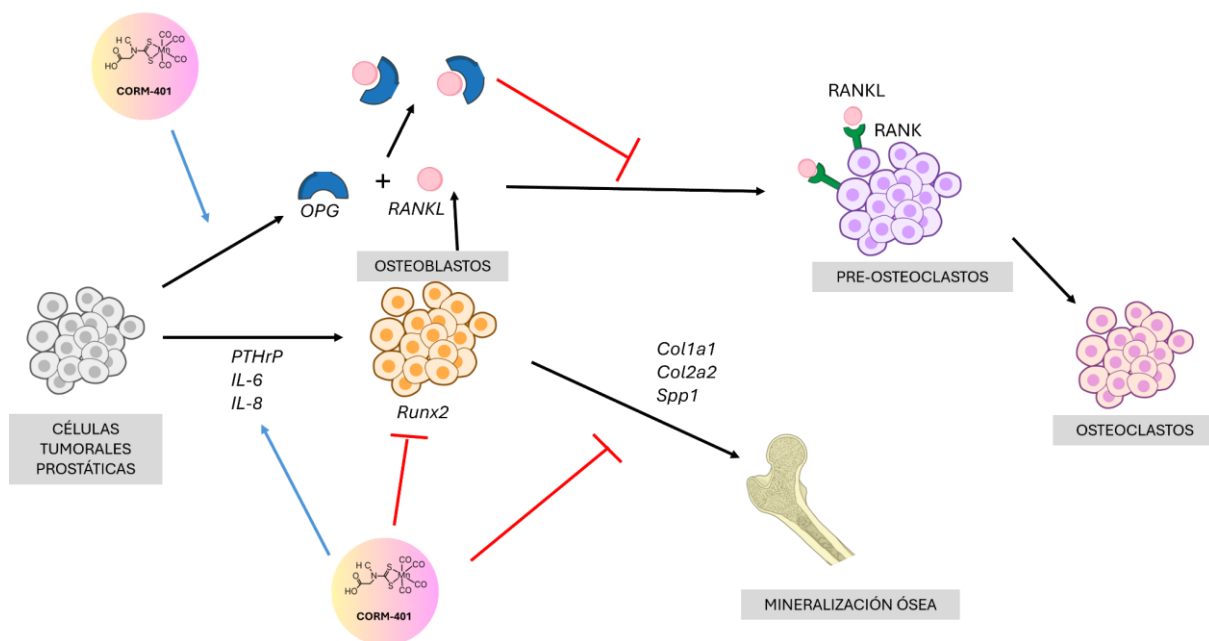


**Figura 48. Esquema resumen de los efectos de las CO-RMs en modelo in vitro de metástasis ósea. El tratamiento con CORM-401 disminuyó los niveles de los marcadores osteoblásticos en la línea celular**

de precursores osteoblásticos y generó un aumento de los marcadores inflamatorios y de osteomimetismo en células tumorales de próstata. Figura realizada utilizando Bioart (230).

En síntesis, los hallazgos de esta tesis sugieren que la CORM-401, en particular, ejerce efectos pleiotrópicos en células de PCa, modulando de forma significativa la proliferación, el metabolismo, la angiogénesis, las propiedades de *stem-like*, la adhesión, la migración y el estrés oxidativo, así como la compleja interacción con el microambiente óseo. Estos resultados son el punto de partida para nuevas investigaciones de las CO-RMs como agentes terapéuticos o coadyuvantes en el tratamiento del PCa, destacando la necesidad de futuras investigaciones *in vivo* para validar estos hallazgos y explorar el potencial clínico de estas moléculas (Figura 49).

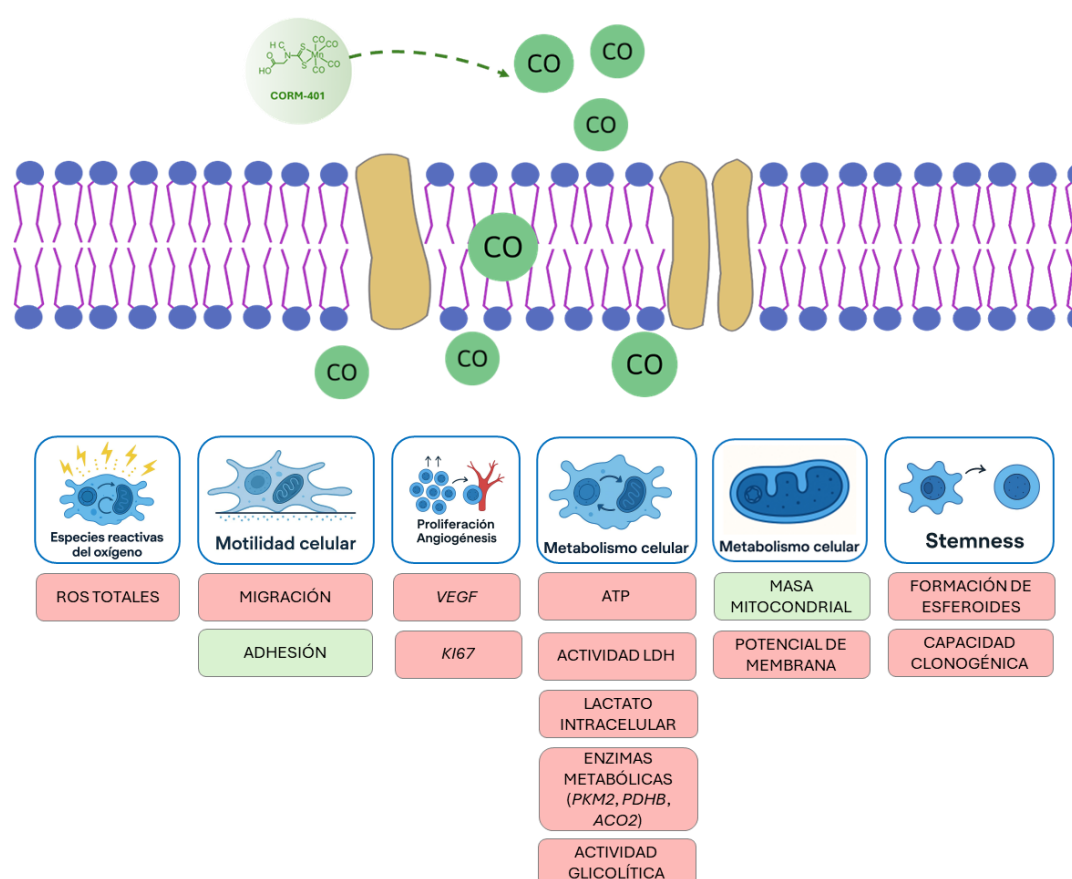


**Figura 49. Resumen de los efectos descritos de la CORM-401 en células de PCa.** El tratamiento con CORM-401 se asoció con una inhibición de marcadores asociados a distintos procesos carcinogénicos prostáticos como la proliferación, angiogénesis, motilidad, estrés oxidativo y metabolismo y celular.

## PARTE II

La identificación de biomarcadores genéticos que permitan predecir el comportamiento clínico del PCa constituye una necesidad prioritaria, especialmente en contextos donde las decisiones terapéuticas se basan en parámetros clínico-patológicos que no siempre reflejan la complejidad biológica de la enfermedad. El PCa localizado es una entidad altamente heterogénea: pacientes con valores similares de PSA, score de Gleason y estadio tumoral pueden experimentar desenlaces clínicos divergentes, lo que limita la eficacia de los sistemas de estadificación actuales para predecir la progresión tumoral o la recaída bioquímica (231,232).

En este contexto, el estudio de variantes germinales asociadas a susceptibilidad tumoral y evolución clínica adquiere un valor creciente como complemento de las herramientas pronósticas convencionales. La incorporación de polimorfismos genéticos en modelos de predicción podría aportar una capa adicional de precisión, contribuyendo a una medicina más personalizada y adaptada al perfil molecular del paciente. Si bien múltiples estudios han identificado polimorfismos asociados al riesgo de desarrollar PCa, su relación con el pronóstico y la evolución de la enfermedad ha sido menos explorada, particularmente en poblaciones latinoamericanas.

En esta segunda parte del trabajo se analizó, por primera vez en una cohorte argentina de pacientes con PCa, la asociación entre los polimorfismos *AR* (CAG)<sub>n</sub> y *APEX1* c.444T>G y el riesgo de recaída bioquímica en pacientes argentinos con PCa. Los resultados muestran que estos polimorfismos están vinculados a una menor supervivencia libre de recaída bioquímica, lo que indica una posible predisposición genética hereditaria a la progresión del PCa. La predicción del curso clínico del PCa localizado sigue siendo un desafío importante, ya que pacientes con características tumorales similares pueden mostrar desenlaces muy diferentes. A pesar de los avances en metodologías de diagnóstico y pronóstico, la heterogeneidad intrínseca del PCa sigue limitando la capacidad de los sistemas de estadificación actuales para predecir con precisión la progresión de la enfermedad (233,234). Por lo tanto, la incorporación de variantes genéticas germinales en los modelos predictivos representa un enfoque prometedor para mejorar la precisión pronóstica y ayudar a los médicos a tomar decisiones terapéuticas más precisas.

El gen *AR* contiene un polimorfismo de repetición del codón (CAG)<sub>n</sub> en el primer exón, que codifica una secuencia de poliglutamina (polyQ) en el dominio de transactivación N-terminal. Se ha informado ampliamente que la longitud de esta secuencia polyQ está inversamente correlacionada con la actividad de transactivación del AR, tanto basal como inducida por ligandos (7,42–44). Además, la longitud de la secuencia polyQ se ha asociado con diversas características y enfermedades en hombres (235–241) y mujeres (242–244). Sin embargo, el efecto de este polimorfismo en el desarrollo y la progresión de enfermedades sigue siendo incierto y controvertido, con algunos autores sugiriendo efectos específicos según la región y la etnicidad (243–245). Además, un estudio *in vivo* utilizando ratones TRAMP (adenocarcinoma de próstata transgénico humanizado con AR), generados mediante la recombinación de un fragmento de ADN humano AR (CAG)<sub>(12, 21 o 48)</sub> con el gen *Ar* del ratón, demostró que los microsatélites más largos tenían un efecto protector contra el desarrollo de PCa (incidencia de PCa: 85%, 52% y 28%, respectivamente) (205). Curiosamente, los ratones con (CAG)<sub>21</sub> mostraron una mayor mortalidad relacionada con PCa en comparación con los ratones con (CAG)<sub>(12 o 48)</sub>. Estos hallazgos coinciden con estudios *in vitro* que sugieren que tanto los alelos cortos como los largos reducen la actividad del AR al alterar las interacciones con correguladores (202). En conjunto, estos resultados sugieren que, si bien un AR (CAG)<sub>n</sub> más corto se asocia con un mayor riesgo de desarrollar PCa, los alelos de longitud media pueden representar un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad una vez que el tumor se ha desarrollado. Además, la asociación significativa entre el AR (CAG)<sub>n</sub> de longitud media y los antecedentes familiares de cáncer de mama y ovario sugiere que este polimorfismo podría contribuir a la carga genética en la agregación familiar del cáncer. Cabe destacar que los antecedentes familiares de PCa no fueron incluidos en este análisis debido a la herencia materna del cromosoma X, lo que descarta un componente genético en familiares de primer grado con PCa que pudiera estar asociado con este polimorfismo.

A la hora de la genotipificación de AR (CAG)<sub>n</sub>, 12 muestras (9,76%) fueron consideradas como fallidas tras realizar tres repeticiones de la PCR, lo que podría estar relacionado con la calidad del ADN. Aunque la causa más probable de las fallas en la PCR sea una baja calidad del ADN, no se puede descartar que el fracaso en la amplificación se deba a la presencia de expansiones del microsatélite AR (CAG)<sub>n</sub> que exceden el rango de amplificación de la técnica.

En particular algunos estudios han mostrado expansiones de la repetición (CAG)<sub>n</sub> del gen *AR* con alelos que presentaron más de 38 repeticiones y, aunque la expansión de este microsatélite suele asociarse con trastornos neurológicos como la Atrofia Muscular Espinal y Bulbar (SBMA, también conocida como enfermedad de Kennedy), un estudio reciente que analizó a 74.277 individuos (hombres y mujeres) encontró una expansión del (CAG)<sub>n</sub> del *AR* mayor a la esperada en la población general (no afectada por SBMA) (202,246). Por lo tanto, aunque la explicación más probable para la falla en la PCR es la baja calidad del ADN, no podemos descartar la posibilidad de que también se deba a una expansión del microsatélite que exceda el rango de amplificación de la PCR.

Por otro lado, se estudió un SNV en el gen que codificada para *APEX1*, una enzima involucrada en la vía de reparación por escisión de bases del ADN (51,247–249) que es reclutada en las regiones de elementos de respuesta a andrógenos para ayudar a modular la transcripción de los genes diana del *AR* (52). Se ha informado que el SNV c.444T>G (p.Asp148Glu) de *APEX1* es inocuo en cuanto a la actividad de unión al ADN. En línea con esta evidencia, los meta-análisis de asociación en todos los modelos genéticos (dominante, recesivo, codominante, aditivo y alélico) no han respaldado este SNV como un factor de riesgo para varios tipos de cáncer (incluido el PCa) o solo han encontrado asociaciones débiles en ciertos subgrupos o poblaciones (248,250–252).

En este estudio, se observó un mayor riesgo de recaída bioquímica del PCa en pacientes con el genotipo c.444TG en comparación con pacientes homocigotas. Este modelo genético codominante está respaldado por otros estudios que han reportado un riesgo significativamente mayor de desarrollar PCa en poblaciones brasileñas solo entre pacientes heterocigotas ( $HR_{TGvsTT} = 1,64$ , IC 95% = 1,06–2,53,  $p = 0,03$ ;  $HR_{GGvsTT} = 3,10$ , IC 95% = 0,59–16,67,  $p = 0,30$ ) (54). Además, un meta-análisis que incluyó 58 artículos y 48,903 participantes con varios tipos de cáncer obtuvo una estimación global de OR = 1,08 (IC 95% = 1,01–1,16;  $p = 0,026$ ) específicamente para el modelo genético heterocigota (207).

Finalmente, para evaluar la hipótesis de un efecto epistático entre estos dos polimorfismos en el riesgo de recaída bioquímica del PCa, se combinaron ambos genotipos y se realizó un análisis de supervivencia libre de recaída bioquímica. Se observó que los pacientes con ambos genotipos de riesgo (*AR* (CAG)<sub>M</sub> + *APEX1* c.444TT/GG) tenían el menor tiempo medio hasta la

recaída, lo que enfatiza el potencial de estos marcadores combinados para identificar pacientes de alto riesgo. Esto es particularmente relevante en pacientes con PSA < 10 ng/ml, donde los marcadores tradicionales pueden no predecir suficientemente los resultados. Dichos hallazgos sugieren que la incorporación de estos marcadores genéticos en los modelos pronósticos podría mejorar la estratificación del riesgo y guiar enfoques de tratamiento más personalizados.

Para determinar la contribución específica de los polimorfismos de *AR* y *APEX1* en el pronóstico del PCa, es esencial evaluar sus efectos independientemente de otros factores clínicos conocidos. Este análisis ayuda a establecer la solidez y fiabilidad de estos marcadores genéticos en la predicción de los resultados de la enfermedad. El análisis multivariable confirmó que los polimorfismos de *AR* y *APEX1* son predictores independientes de recaída bioquímica, incluso al considerar otras variables histológicas pronósticas como la afectación de márgenes quirúrgicos y el grado patológico ISUP. Este análisis integral subraya el valor pronóstico de los polimorfismos de *AR* y *APEX1* en la evaluación del riesgo de recaída bioquímica en pacientes con PCa y resalta su utilidad clínica.

**En conclusión, este estudio demuestra el significativo valor pronóstico de los polimorfismos germinales *AR* (CAG)<sub>n</sub> y *APEX1* p.Asp148Glu en pacientes argentinos con PCa. Su evaluación a través de pruebas sanguíneas simples podría proporcionar información pronóstica valiosa, ayudando a tratamientos más precisos. Se requieren más estudios en cohortes más grandes y diversas para validar estos hallazgos y explorar su integración en la práctica clínica.**

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Ross MH, Pawlina W. Histología: Texto y Atlas - Correlación con Biología Molecular y Celular. 8, editor. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2020.
2. Verze P, Cai T, Lorenzetti S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. Vol. 13, Nature Reviews Urology. Nat Rev Urol; 2016. p. 379–86.
3. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. Nat Rev Cancer. 2007 Apr;7(4):256–69.
4. Rane JK, Pellacani D, Maitland NJ. Advanced prostate cancer—a case for adjuvant differentiation therapy. Vol. 9, Nature reviews. Urology. England; 2012. p. 595–602.
5. Liu AY, True LD, LaTray L, Nelson PS, Ellis WJ, Vessella RL, et al. Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 30;94(20):10705–10.
6. Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. Genes Dev. 2000 Oct 1;14(19):2410–34.
7. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. Endocr Rev. 2004 Apr;25(2):276–308.
8. Tan MHE, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E leong. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. Acta Pharmacol Sin. 2015 Jan;36(1):3–23.
9. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. Nat Rev Cancer. 2001 Oct;1(1):34–45.
10. Cáncer de próstata [Internet]. [cited 2025 Feb 19]. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-prostata.html>
11. Udensi UK, Tchounwou PB. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. J Exp Clin Cancer Res CR. 2016 Sep 8;35(1):139.
12. Cohen RJ, Shannon BA, Phillips M, Moorin RE, Wheeler TM, Garrett KL. Central zone carcinoma of the prostate gland: a distinct tumor type with poor prognostic features. J Urol. 2008 May;179(5):1762–7; discussion 1767.
13. 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. 2007 Jun;4(6):321–32.
14. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2025 Feb 19]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
15. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229–63.
16. Prostate Cancer: What Are The Risk Factors? [Internet]. [cited 2025 Feb 20]. Available from: <https://www.pcf.org/patient-resources/family-cancer-risk/prostate-cancer-risk-%20factors/>

17. Etzioni RD, Howlader N, Shaw PA, Ankerst DP, Penson DF, Goodman PJ, et al. Long-term effects of finasteride on prostate specific antigen levels: results from the prostate cancer prevention trial. *J Urol*. 2005 Sep;174(3):877–81.
18. Matikainen MP, Schleutker J, Mörsky P, Kallioniemi OP, Tammela TL. Detection of subclinical cancers by prostate-specific antigen screening in asymptomatic men from high-risk prostate cancer families. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1999 Jun;5(6):1275–9.
19. Comprehensive Cancer Information - NCI [Internet]. [cited 2025 Feb 20]. Available from: <https://www.cancer.gov/>
20. Montes de Oca LF, Scorticati C, editors. *Cáncer de próstata*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2014.
21. Walsh P. prostate cancer foundation. 2014. Prostate Cancer Foundation. Available from: [http://www.pcf.org/site/c.leJRIROrEpH/b.8586063/k.hiperplasia\\_prost225tica\\_HP.B.htm](http://www.pcf.org/site/c.leJRIROrEpH/b.8586063/k.hiperplasia_prost225tica_HP.B.htm)
22. Rubin MA, Demichelis F. The Genomics of Prostate Cancer: emerging understanding with technologic advances. *Mod Pathol*. 2018;31(1):1–11.
23. City of Hope [Internet]. 2020 [cited 2025 Feb 20]. Prostate Cancer Causes, Risk Factors and Prevention. Available from: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/prostate-cancer/risk-factors>
24. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*. 1994 May;151(5):1283–90.
25. Sekhoacha M, Riet K, Motloung P, Gumenku L, Adegoke A, Mashele S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*. 2022 Sep 5;27(17):5730.
26. Filella X, Foj L, Milà M, Augé JM, Molina R, Jiménez W. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. *Tumor Biol*. 2013 Jun 16;34(3):1337–47.
27. Vickers AJ, Till C, Tangen CM, Lilja H, Thompson IM. An empirical evaluation of guidelines on prostate-specific antigen velocity in prostate cancer detection. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Mar;103(6):462–9.
28. Prognosis: Proportionate response | Nature [Internet]. [cited 2025 Feb 22]. Available from: <https://www.nature.com/articles/528S124a>
29. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016 Feb;40(2):244–52.
30. American Cancer Society. Prostate Cancer Stages and Other Ways to Assess Risk [Internet]. 2021 [cited 2021 Oct 10]. p. 1–6. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>
31. Morton RA, Isaacs WB. Molecular Genetics of Prostate Cancer: Clinical Applications. *J*

- Natl Med Assoc. 1998;90(SUPPL.):2410–34.
32. Barbieri CE, Demichelis F, Rubin MA. Molecular genetics of prostate cancer: Emerging appreciation of genetic complexity. Vol. 60, *Histopathology*. 2012. p. 187–98.
  33. Gleason DF, Mellinger GT, Arduino LJ, Bailer JC, Becker LE, Berman HI, et al. Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging. *J Urol*. 1974;111(1):58–64.
  34. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*. 1966 Mar;50(3):125–8.
  35. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum Pathol*. 1992;23(3):273–9.
  36. Logothetis CJ, Gallick GE, Maity SN, Kim J, Aparicio A, Efsthathiou E, et al. Molecular classification of prostate cancer progression: Foundation for marker-driven treatment of prostate cancer. *Cancer Discov*. 2013 Aug;3(8):849–61.
  37. Rybak AP, Bristow RG, Kapoor A. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*. 2015;6(4):1900.
  38. Gandaglia G, Abdollah F, Schiffmann J, Trudeau V, Shariat SF, Kim SP, et al. Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. *The Prostate*. 2014 Feb;74(2):210–6.
  39. Haffner MC, Zwart W, Roudier MP, True LD, Nelson WG, Epstein JI, et al. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2021 Feb;18(2):79–92.
  40. D'Amico F, Biancolella M, Margiotti K, Reichardt JK, Novelli G. Genomic biomarkers, androgen pathway and prostate cancer. *Pharmacogenomics*. 2007 Jun;8(6):645–61.
  41. Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Verri E, Scarpelli M, et al. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells*. 2020 Dec 10;9(12):2653.
  42. Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, et al. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet*. 1993 Oct;5(2):184–8.
  43. Feldman D. Androgen and Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms: the Long and Short of Prostate Cancer Risk. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1997 Jan 15;89(2):109–11.
  44. Nelson KA, Witte JS. Androgen receptor CAG repeats and prostate cancer. *Am J Epidemiol*. 2002 May 15;155(10):883–90.
  45. Gakis G, Perner S, Stenzl A, Renninger M. The CAG-triplet in the androgen receptor gene and single-nucleotide polymorphisms in androgen pathway genes in patients with concomitant bladder and prostate cancer. *Urol Oncol*. 2022 May;40(5):198.e1-198.e8.
  46. Yu H, Bharaj B, Vassilikos EJ, Giai M, Diamandis EP. Shorter CAG repeat length in the androgen receptor gene is associated with more aggressive forms of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2000 Jan;59(2):153–61.

47. Qin Z, Li X, Han P, Zheng Y, Liu H, Tang J, et al. Association between polymorphic CAG repeat lengths in the androgen receptor gene and susceptibility to prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jun;96(25):e7258.
48. Tayeb MT, Clark C, Murray GI, Sharp L, Haites NE, McLeod HL. Length and somatic mosaicism of CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene and the risk of prostate cancer in men with benign prostatic hyperplasia. *Ann Saudi Med*. 2004;24(1):21–6.
49. Mononen N, Ikonen T, Autio V, Rökman A, Matikainen MP, Tammela TLJ, et al. Androgen receptor CAG polymorphism and prostate cancer risk. *Hum Genet*. 2002 Aug;111(2):166–71.
50. Compérat E, Wasinger G, Oszwald A, Kain R, Cancel-Tassin G, Cussenot O. The Genetic Complexity of Prostate Cancer. *Genes*. 2020 Nov 25;11(12):1396.
51. Shah F, Logsdon D, Messmann RA, Fehrenbacher JC, Fishel ML, Kelley MR. Exploiting the Ref-1-APE1 node in cancer signaling and other diseases: from bench to clinic. *Npj Precis Oncol*. 2017 Jun 8;1(1):1–19.
52. Yang S, Zhang J, Zhang Y, Wan X, Zhang C, Huang X, et al. KDM1A triggers androgen-induced miRNA transcription via H3K4me2 demethylation and DNA oxidation. *The Prostate*. 2015 Jun 15;75(9):936–46.
53. Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K, Mohrenweiser HW, Wilson DM. Functional characterization of Ape1 variants identified in the human population. *Nucleic Acids Res*. 2000 Oct 15;28(20):3871–9.
54. Kuasne H, Rodrigues IS, Losi-Guembarovski R, Reis MB, Fuganti PE, Gregório EP, et al. Base excision repair genes XRCC1 and APEX1 and the risk for prostate cancer. *Mol Biol Rep*. 2011 Mar;38(3):1585–91.
55. Agalliu I, Kwon EM, Salinas CA, Koopmeiners JS, Ostrander EA, Stanford JL. Genetic variation in DNA repair genes and prostate cancer risk: results from a population-based study. *Cancer Causes Control CCC*. 2010 Feb;21(2):289–300.
56. Mittal RD, Mandal RK, Gangwar R. Base excision repair pathway genes polymorphism in prostate and bladder cancer risk in North Indian population. *Mech Ageing Dev*. 2012 Apr;133(4):127–32.
57. Mandal RK, Gangwar R, Kapoor R, Mittal RD. Polymorphisms in base-excision & nucleotide-excision repair genes & prostate cancer risk in north Indian population. *Indian J Med Res*. 2012 Jan;135(1):64–71.
58. Chen L, Ambrosone CB, Lee J, Sellers TA, Pow-Sang J, Park JY. Association between polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and APE1, and the risk of prostate cancer in white and black Americans. *J Urol*. 2006 Jan;175(1):108–12; discussion 112.
59. Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, et al. Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol*. 2000 May;31(5):578–83.
60. Wong SK, Mohamad NV, Giaze TR, Chin KY, Mohamed N, Ima-Nirwana S. Prostate cancer and bone metastases: The underlying mechanisms [Internet]. Vol. 20,

61. Svensson E, Christiansen CF, Ulrichsen SP, Rørth MR, Sørensen HT. Survival after bone metastasis by primary cancer type: A Danish population-based cohort study. *BMJ Open*. 2017 Sep;7(9).
62. Kan C, Vargas G, Pape FL, Clézardin P. Cancer Cell Colonisation in the Bone Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct;17(10).
63. Wells KV, Krackeler ML, Jathal MK, Parikh M, Ghosh PM, Leach JK, et al. Prostate cancer and bone: clinical presentation and molecular mechanisms. *Endocr Relat Cancer*. 2023 Sep 1;30(9):e220360.
64. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med*. 2010 Mar;16(3):133–44.
65. Ponzetti M, Rucci N. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 22;22(13):6651.
66. Berish RB, Ali AN, Telmer PG, Ronald JA, Leong HS. Translational models of prostate cancer bone metastasis. *Nat Rev Urol*. 2018 Jul;15(7):403–21.
67. Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int*. 2002 Aug;71(2):145–54.
68. Aszódi A, Bateman JF, Gustafsson E, Boot-Handford R, Fässler R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Struct Funct*. 2000 Apr;25(2):73–84.
69. Pratap J, Javed A, Languino LR, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, et al. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion. *Mol Cell Biol*. 2005 Oct;25(19):8581–91.
70. Fournier PGJ, Juárez P, Jiang G, Clines GA, Niewolna M, Kim HS, et al. The TGF- $\beta$  Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone. *Cancer Cell*. 2015 Jun 8;27(6):809–21.
71. Whang PG, Schwarz EM, Gamradt SC, Dougall WC, Lieberman JR. The effects of RANK blockade and osteoclast depletion in a model of pure osteoblastic prostate cancer metastasis in bone. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2005 Nov;23(6):1475–83.
72. Zhao Y, Bachelier R, Treilleux I, Pujuguet P, Peyruchaud O, Baron R, et al. Tumor  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res*. 2007 Jun 15;67(12):5821–30.
73. Jin JK, Dayyani F, Gallick GE. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *Int J Cancer*. 2011 Jun 1;128(11):2545–61.
74. Wan X, Corn PG, Yang J, Palanisamy N, Michael W, Efsthathiou E, et al. Prostate cancer cell-stromal cell crosstalk via FGFR1 mediates antitumor activity of dovitinib in bone metastases. *Sci Transl Med*. 2015;6(252).

75. Li ZG, Yang J, Vazquez ES, Rose D, Vakar-Lopez F, Mathew P, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mediates the prostate cancer-induced formation of new bone. *Oncogene*. 2008 Jan 24;27(5):596–603.
76. Leonardi DB, Anselmino N, Brandani JN, Jaworski FM, Páez AV, Mazaira G, et al. Heme Oxygenase 1 Impairs Glucocorticoid Receptor Activity in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb;20(5).
77. Rucci N, Teti A. Osteomimicry: How the Seed Grows in the Soil. *Calcif Tissue Int*. 2018 Feb;102(2):131–40.
78. Furesi G, Rauner M, Hofbauer LC. Emerging Players in Prostate Cancer–Bone Niche Communication. *Trends Cancer*. 2021 Feb;7(2):112–21.
79. Chung LWK, Zhau HE, Petros JA, Farach-Carson MC. Prostate Cancer Bone Colonization: Osteomimicry in the Bone Niche. In: *Bone and Cancer*. London: Springer London; 2010. p. 157–66.
80. Lin SC, Yu-Lee LY, Lin SH. Osteoblastic Factors in Prostate Cancer Bone Metastasis. *Curr Osteoporos Rep*. 2018 Dec;16(6):642–7.
81. Logothetis CJ, Lin SH. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jan;5(1):21–8.
82. Kang J, La Manna F, Bonollo F, Sampson N, Alberts IL, Mingels C, et al. Tumor microenvironment mechanisms and bone metastatic disease progression of prostate cancer. *Cancer Lett*. 2022 Apr 1;530:156–69.
83. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
84. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022 Jan 12;12(1):31–46.
85. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
86. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309–14.
87. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):85–95.
88. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab*. 2008 Jan 1;7(1):11–20.
89. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029–33.
90. Kim SH, Baek KH. Regulation of Cancer Metabolism by Deubiquitinating Enzymes: The Warburg Effect. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 8;22(12):6173.
91. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine: *Cell*.
92. Kaelin WG, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):393–402.

93. Singh KK, Desouki MM, Franklin RB, Costello LC. Mitochondrial aconitase and citrate metabolism in malignant and nonmalignant human prostate tissues. *Mol Cancer*. 2006 Apr 4;5:14.
94. Antico Arciuch VG, Gueron G, Cotignola JH, Vazquez ES. Altered Signaling Pathways in Prostate Cancer Drive Metabolic Fate. 2017 Sep [cited 2025 Feb 22]; Available from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/52227>
95. Gaude E, Frezza C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab*. 2014;2:10.
96. Pujana-Vaquerizo M, Bozal-Basterra L, Carracedo A. Metabolic adaptations in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2024 Nov;131(8):1250–62.
97. Ahmad F, Cherukuri MK, Choyke PL. Metabolic reprogramming in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2021 Oct;125(9):1185–96.
98. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond Engl*. 2001 Feb;357(9255):539–45.
99. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec;420(6917):860–7.
100. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009 Jul;30(7):1073–81.
101. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Vol. 140, *Cell*. United States; 2010. p. 883–99.
102. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2001;11(4):173–86.
103. Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res*. 2008 Mar;68(6):1777–85.
104. Thapa D, Ghosh R. Antioxidants for prostate cancer chemoprevention: challenges and opportunities. *Biochem Pharmacol*. 2012 May;83(10):1319–30.
105. Omabe M, Ezeani M. Infection, inflammation and prostate carcinogenesis. Vol. 11, *Infection, Genetics and Evolution*. Infect Genet Evol; 2011. p. 1195–8.
106. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*. 1988 Jul;2(10):2557–68.
107. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem*. 1969 Dec 10;244(23):6388–94.
108. Di Pietro C, Öz HH, Murray TS, Bruscia EM. Targeting the Heme Oxygenase 1/Carbon Monoxide Pathway to Resolve Lung Hyper-Inflammation and Restore a Regulated Immune Response in Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol*. 2020;11:1059.
109. Salloom RJ, Ahmad IM, Sahtout DZ, Baine MJ, Abdalla MY. Heme Oxygenase-1 and Prostate Cancer: Function, Regulation, and Implication in Cancer Therapy. *Int J Mol*

Sci. 2024 Aug 24;25(17):9195.

110. Jozkowicz A, Was H, Dulak J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal*. 2007 Dec;9(12):2099–117.
111. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987 Feb;235(4792):1043–6.
112. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):422–8.
113. Gueron G, De Siervi A, Vazquez E. Advanced prostate cancer: Reinforcing the strings between inflammation and the metastatic behavior. Vol. 15, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. England; 2012. p. 213–21.
114. Gueron G, De Siervi A, Ferrando M, Salierno M, De Luca P, Elguero B, et al. Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2009;7(11):1745–55.
115. Sacca P, Meiss R, Casas G, Mazza O, Calvo JC, Navone N, et al. Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. Vol. 97, *British Journal of Cancer*. 2007. p. 1683–9.
116. Ferrando M, Gueron G, Elguero B, Giudice J, Salles A, Leskow FC, et al. Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer. *Angiogenesis*. 2011 Dec;14(4):467–79.
117. Elguero B, Gueron G, Giudice J, Toscani MA, De Luca P, Zalazar F, et al. Unveiling the association of STAT3 and HO-1 in prostate cancer: role beyond heme degradation. *Neoplasia N Y N*. 2012 Nov;14(11):1043–56.
118. Labanca E, De Luca P, Gueron G, Paez A, Moiola CP, Massillo C, et al. Association of HO-1 and BRCA1 Is Critical for the Maintenance of Cellular Homeostasis in Prostate Cancer. *Mol Cancer Res MCR*. 2015 Nov;13(11):1455–64.
119. Gueron G, Giudice J, Valacco P, Paez A, Elguero B, Toscani M, et al. Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2014 Jun 30;5(12):4087–102.
120. Paez AV, Pallavicini C, Schuster F, Valacco MP, Giudice J, Ortiz EG, 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*. 2016;7(12):e2570-16.
121. Cascardo F, Anselmino N, Páez A, Labanca E, Sanchis P, Antico-Arciuch V, et al. Ho-1 modulates aerobic glycolysis through Idh in prostate cancer cells. *Antioxidants* [Internet]. 2021 Jun;10(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34208670/>
122. Jaworski FM, Gentilini LD, Gueron G, Meiss RP, Ortiz EG, Berguer PM, et al. In Vivo Hemin Conditioning Targets the Vascular and Immunologic Compartments and Restrains Prostate Tumor Development. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Sep;23(17):5135–48.
123. Anselmino N, Starbuck M, Labanca E, Cotignola J, Navone N, Gueron G, et al. Heme

Oxygenase-1 Is a Pivotal Modulator of Bone Turnover and Remodeling: Molecular Implications for Prostate Cancer Bone Metastasis. *Antioxid Redox Signal*. 2020/01/20 ed. 2020 Jun;32(17):1243–58.

124. Kashfi K, Patel KK. Carbon monoxide and its role in human physiology: A brief historical perspective. *Biochem Pharmacol*. 2022 Oct 1;204:115230.
125. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86(2):583–650.
126. Piantadosi CA. Carbon Monoxide, Reactive Oxygen Signaling, and Oxidative Stress. *Free Radic Biol Med*. 2008 Sep 1;45(5):562–9.
127. Kajimura M, Goda N, Suematsu M. Organ design for generation and reception of CO: lessons from the liver. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Aug;4(4):633–7.
128. Ryter SW, Choi AMK. Heme oxygenase-1: molecular mechanisms of gene expression in oxygen-related stress. *Antioxid Redox Signal*. 2002 Aug;4(4):625–32.
129. Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett GV, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*. 1993 Jan 15;259(5093):381–4.
130. Motterlini R, Otterbein LE. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Sep;9(9):728–43.
131. Pogson ZEK, Antoniak MD, Mckeever TM, Lewis SA, Britton JR, Fogarty AW. Exhaled carbon monoxide in asthmatic adults with bronchial reactivity: a prospective study. *J Asthma Off J Assoc Care Asthma*. 2009 Sep;46(7):665–9.
132. Sylvester KP, Patey RA, Rafferty GF, Rees D, Thein SL, Greenough A. Exhaled carbon monoxide levels in children with sickle cell disease. *Eur J Pediatr*. 2005 Mar;164(3):162–5.
133. Clark JE, Naughton P, Shurey S, Green CJ, Johnson TR, Mann BE, et al. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res*. 2003 Jul 25;93(2):e2-8.
134. Motterlini R, Sawle P, Hammad J, Bains S, Alberto R, Foresti R, et al. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2005 Feb;19(2):284–6.
135. Crook SH, Mann BE, Meijer AJHM, Adams H, Sawle P, Scapens D, et al.  $[\text{Mn}(\text{CO})_4\{\text{S}_2\text{CNMe}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})\}]$ , a new water-soluble CO-releasing molecule. *Dalton Trans*. 2011 Apr 5;40(16):4230–5.
136. Motterlini R, Haas B, Foresti R. Emerging concepts on the anti-inflammatory actions of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs). *Med Gas Res*. 2012 Nov 21;2(1):28.
137. Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE, Green CJ. Carbon Monoxide-Releasing Molecules. *Circ Res*. 2002 Feb 8;90(2):e17–24.
138. Fayad-Kobeissi S, Ratovonantenaina J, Dabiré H, Wilson JL, Rodriguez AM, Berdeaux A, et al. Vascular and angiogenic activities of CORM-401, an oxidant-sensitive CO-releasing molecule. *Biochem Pharmacol*. 2016 Feb 15;102:64–77.

139. Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 Nov;14(11):1305–18.
140. Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):1142–6.
141. Motterlini R, Mann BE, Johnson TR, Clark JE, Foresti R, Green CJ. Bioactivity and pharmacological actions of carbon monoxide-releasing molecules. *Curr Pharm Des*. 2003;9(30):2525–39.
142. Siracusa R, Schaufler A, Calabrese V, Fuller PM, Otterbein LE. Carbon Monoxide: From Poison to Clinical Trials. *Trends Pharmacol Sci*. 2021 May;42(5):329–39.
143. Beckman JD, Belcher JD, Vineyard JV, Chen C, Nguyen J, Nwaneri MO, et al. Inhaled carbon monoxide reduces leukocytosis in a murine model of sickle cell disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Oct;297(4):H1243–1253.
144. Hegazi RAF, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE, Plevy SE. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1–dependent pathway. *J Exp Med*. 2005 Dec 19;202(12):1703–13.
145. Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Boyle P, Jaffe R, Upperman J, Zamora R, et al. Carbon monoxide protects against the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Sep;289(3):G607–613.
146. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphanio S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007 Jun;13(6):703–10.
147. Wegiel B, Gallo DJ, Raman KG, Karlsson JM, Ozanich B, Chin BY, et al. Nitric oxide-dependent bone marrow progenitor mobilization by carbon monoxide enhances endothelial repair after vascular injury. *Circulation*. 2010 Feb 2;121(4):537–48.
148. Chung SW, Liu X, Macias AA, Baron RM, Perrella MA. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):239–47.
149. Desmard M, Davidge KS, Bouvet O, Morin D, Roux D, Foresti R, et al. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) exerts bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* and improves survival in an animal model of bacteraemia. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2009 Apr;23(4):1023–31.
150. Ameredes BT, Otterbein LE, Kohut LK, Gligonic AL, Calhoun WJ, Choi AMK. Low-dose carbon monoxide reduces airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Dec;285(6):L1270–1276.
151. Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest*. 2007 Feb;117(2):438–47.
152. Stagni E, Privitera MG, Bucolo C, Leggio GM, Motterlini R, Drago F. A water-soluble carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) lowers intraocular pressure in rabbits. *Br J Ophthalmol*. 2009 Feb;93(2):254–7.

153. Zimmermann A, Leffler CW, Tcheranova D, Fedinec AL, Parfenova H. Cerebroprotective effects of the CO-releasing molecule CORM-A1 against seizure-induced neonatal vascular injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct;293(4):H2501-2507.
154. Allanson M, Reeve VE. Carbon monoxide signalling reduces photocarcinogenesis in the hairless mouse. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 2007 Nov;56(11):1807–15.
155. Sun B, Sun H, Liu C, Shen J, Chen Z, Chen X. Role of CO-Releasing Molecules Liberated CO in Attenuating Leukocytes Sequestration and Inflammatory Responses in the Lung of Thermally Injured Mice. *J Surg Res*. 2007 May 1;139(1):128–35.
156. Sun BW, Sun Y, Sun ZW, Chen X. CO liberated from CORM-2 modulates the inflammatory response in the liver of thermally injured mice. *World J Gastroenterol WJG*. 2008 Jan 28;14(4):547–53.
157. Bansal S, Liu D, Mao Q, Bauer N, Wang B. Carbon Monoxide as a Potential Therapeutic Agent: A Molecular Analysis of Its Safety Profiles. *J Med Chem*. 2024 Jun 27;67(12):9789–815.
158. Yang X, Lu W, Wang M, Tan C, Wang B. “CO in a pill”: Towards oral delivery of carbon monoxide for therapeutic applications. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2021 Oct 10;338:593–609.
159. Rapid Eradication of Human Breast Cancer Cells through Trackable Light-Triggered CO Delivery by Mesoporous Silica Nanoparticles Packed with a Designed photoCORM | Chemistry of Materials [Internet]. [cited 2025 May 23]. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemmater.5b03859>
160. Kourtí M, Jiang WG, Cai J. Aspects of Carbon Monoxide in Form of CO-Releasing Molecules Used in Cancer Treatment: More Light on the Way. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:9326454.
161. Víték L, Gbelcová H, Muchová L, Váňová K, Zelenka J, Koníčková R, et al. Antiproliferative effects of carbon monoxide on pancreatic cancer. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 2014 Apr;46(4):369–75.
162. Yan Y, Du C, Li G, Chen L, Yan Y, Chen G, et al. CO suppresses prostate cancer cell growth by directly targeting LKB1/AMPK/mTOR pathway in vitro and in vivo. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2018 Jun 1;36(6):312.e1-312.e8.
163. Tien Vo TT, Vo QC, Tuan VP, Wee Y, Cheng HC, Lee IT. The potentials of carbon monoxide-releasing molecules in cancer treatment: An outlook from ROS biology and medicine. *Redox Biol*. 2021 Sep 6;46:102124.
164. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*. 1979 Jul;17(1):16–23.
165. Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Preosteoblast Subclones with Distinct In Vitro and In Vivo Differentiation/Mineralization Potential - Wang - 1999 - Journal of Bone and Mineral Research - Wiley Online Library.
166. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol*. 1983 Jan 1;96(1):191–8.

167. Heinemann SH, Hoshi T, Westerhausen M, Schiller A. Carbon monoxide--physiology, detection and controlled release. *Chem Commun Camb Engl*. 2014 Apr 11;50(28):3644–60.
168. Yong HI, Han M, Kim HJ, Suh JY, Jo C. Mechanism Underlying Green Discolouration of Myoglobin Induced by Atmospheric Pressure Plasma. *Sci Rep*. 2018 Jun 28;8(1):9790.
169. Pachel C, Mathes D, Arias-Loza AP, Heitzmann W, Nordbeck P, Deppermann C, et al. Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 Apr;36(4):629–35.
170. Mao Q, Kawaguchi AT, Mizobata S, Motterlini R, Foresti R, Kitagishi H. Sensitive quantification of carbon monoxide in vivo reveals a protective role of circulating hemoglobin in CO intoxication. *Commun Biol*. 2021 Mar 29;4:425.
171. Kitagishi H, Mao Q, Kitamura N, Kita T. HemoCD as a Totally Synthetic Artificial Oxygen Carrier: Improvements in the Synthesis and O<sub>2</sub> /CO Discrimination. *Artif Organs*. 2017 Apr;41(4):372–80.
172. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001 Dec;25(4):402–8.
173. Avena S, Via M, Ziv E, Pérez-Stable EJ, Gignoux CR, Dejean C, et al. Heterogeneity in Genetic Admixture across Different Regions of Argentina. *PLoS ONE*. 2012 Apr 10;7(4):e34695.
174. Ito H, Matsuo K, Hamajima N, Mitsudomi T, Sugiura T, Saito T, et al. Gene-environment interactions between the smoking habit and polymorphisms in the DNA repair genes, APE1 Asp148Glu and XRCC1 Arg399Gln, in Japanese lung cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004 Aug;25(8):1395–401.
175. Dexter TA. R: a language and environment for statistical computing. *Quat Res*. 2014;81(2):114–24.
176. Allaire JJ. RStudio: Integrated Development Environment for R.
177. Ioannidou E, Moschetta M, Shah S, Parker JS, Ozturk MA, Pappas-Gogos G, et al. Angiogenesis and Anti-Angiogenic Treatment in Prostate Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 14;22(18):9926.
178. Meleggh Z, Oltean S. Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 May 31;20(11):2676.
179. Kalinina EV, Gavriluk LA, Pokrovsky VS. Oxidative Stress and Redox-Dependent Signaling in Prostate Cancer. *Biochem Biokhimiia*. 2022 May;87(5):413–24.
180. Cardoso HJ, Carvalho TMA, Fonseca LRS, Figueira MI, Vaz CV, Socorro S. Revisiting prostate cancer metabolism: From metabolites to disease and therapy. *Med Res Rev*. 2021 May;41(3):1499–538.
181. Uo T, Sprenger CC, Plymate SR. Androgen Receptor Signaling and Metabolic and Cellular Plasticity During Progression to Castration Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:580617.

182. Li Z, Zhang H. Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2015 Oct 23;73(2):377–92.
183. Stine ZE, Schug ZT, Salvino JM, Dang CV. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Feb;21(2):141–62.
184. Verma P, Shukla N, Kumari S, Ansari MS, Gautam NK, Patel GK. Cancer stem cell in prostate cancer progression, metastasis and therapy resistance. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2023 May;1878(3):188887.
185. Sancho P, Barneda D, Heeschen C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer*. 2016 Jun 14;114(12):1305–12.
186. Leão R, Domingos C, Figueiredo A, Hamilton R, Tabori U, Castelo-Branco P. Cancer Stem Cells in Prostate Cancer: Implications for Targeted Therapy. *Urol Int*. 2017;99(2):125–36.
187. Rasouli M, Safari F, Kanani MH, Ahvati H. Principles of Hanging Drop Method (Spheroid Formation) in Cell Culture. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2025;2879:289–300.
188. Wang M, Xia F, Wei Y, Wei X. Molecular mechanisms and clinical management of cancer bone metastasis. *Bone Res*. 2020;8(1):30.
189. Lin TC. RUNX2 and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 10;24(8):7001.
190. Anselmino N, Bizzotto J, Sanchis P, Lage-Vickers S, Ortiz E, Valacco P, et al. HO-1 interactors involved in the colonization of the bone niche: Role of ANXA2 in prostate cancer progression. *Biomolecules*. 2020 Mar;10(3):1–24.
191. Tamaddon M, Burrows M, Ferreira SA, Dazzi F, Apperley JF, Bradshaw A, et al. Monomeric, porous type II collagen scaffolds promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Sci Rep*. 2017 Mar 3;7:43519.
192. Selvaraj V, Sekaran S, Dhanasekaran A, Warriar S. Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization. *Differ Res Biol Divers*. 2024;136:100757.
193. Kumari A, Kashyap D, Garg VK. Osteopontin in cancer. *Adv Clin Chem*. 2024;118:87–110.
194. Cramer SD, Chen Z, Peehl DM. Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *J Urol*. 1996 Aug;156(2 Pt 1):526–31.
195. DiNatale A, Fatatis A. The Bone Microenvironment in Prostate Cancer Metastasis. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1210:171–84.
196. Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2000 May;6(5):2104–19.
197. McGregor NE, Murat M, Elango J, Poulton IJ, Walker EC, Crimeen-Irwin B, et al. IL-6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2019 May 10;294(19):7850–63.

198. Pencik J, Wiebringhaus R, Susani M, Culig Z, Kenner L. IL-6/STAT3/ARF: the guardians of senescence, cancer progression and metastasis in prostate cancer. *Swiss Med Wkly*. 2015;145:w14215.
199. Guo Y, Zang Y, Lv L, Cai F, Qian T, Zhang G, et al. IL-8 promotes proliferation and inhibition of apoptosis via STAT3/AKT/NF- $\kappa$ B pathway in prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2017 Dec;16(6):9035–42.
200. Rigau M, Olivan M, Garcia M, Sequeiros T, Montes M, Colás E, et al. The present and future of prostate cancer urine biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2013 Jun 17;14(6):12620–49.
201. Tsoi TH, Chan CF, Chan WL, Chiu KF, Wong WT, Ng CF, et al. Urinary Polyamines: A Pilot Study on Their Roles as Prostate Cancer Detection Biomarkers. *PloS One*. 2016;11(9):e0162217.
202. Buchanan G, Yang M, Cheong A, Harris JM, Irvine RA, Lambert PF, et al. Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Hum Mol Genet*. 2004 Aug 15;13(16):1677–92.
203. Gómez R, Torres-Sánchez L, Camacho-Mejorado R, Burguete-García AI, Vázquez-Salas RA, Martínez-Nava GA, et al. Androgen receptor CAG polymorphism and sporadic and early-onset prostate cancer among Mexican men. *J Hum Genet*. 2016 Sep;61(9):781–6.
204. rs1130409 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. 2024 [cited 2024 Jul 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1130409>
205. Albertelli MA, Scheller A, Brogley M, Robins DM. Replacing the mouse androgen receptor with human alleles demonstrates glutamine tract length-dependent effects on physiology and tumorigenesis in mice. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2006 Jun;20(6):1248–60.
206. Zhang L, Wu B, Zha Z, Zhao H, Yuan J, Jiang Y, et al. Surgical margin status and its impact on prostate cancer prognosis after radical prostatectomy: a meta-analysis. *World J Urol*. 2018 Nov;36(11):1803–15.
207. Hu D, Lin X, Zhang H, Zheng X, Niu W. APEX Nuclease (Multifunctional DNA Repair Enzyme) 1 Gene Asp148Glu Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis Involving 58 Articles and 48903 Participants. *PLoS ONE*. 2013 Dec 12;8(12):e83527.
208. Mol AJM, Geldof AA, Meijer GA, van der Poel HG, van Moorselaar RJA. New experimental markers for early detection of high-risk prostate cancer: role of cell-cell adhesion and cell migration. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007 Oct;133(10):687–95.
209. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res*. 2017;7(5):1016–36.
210. Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investig Drugs*. 2005 Nov;14(11):1305–18.
211. Motterlini R, Foresti R. Heme oxygenase-1 as a target for drug discovery. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Apr 10;20(11):1810–26.
212. Berlin A, Castro-Mesta JF, Rodriguez-Romo L, Hernandez-Barajas D, González-Guerrero JF, Rodríguez-Fernández IA, et al. Prognostic role of Ki-67 score in localized

- prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol*. 2017 Aug;35(8):499–506.
213. Maia R, Santos GAD, Reis S, Viana NI, Pimenta R, Guimarães VR, et al. Can we use Ki67 expression to predict prostate cancer aggressiveness? *Rev Col Bras Cir*. 2022;49:e20223200.
  214. Shao L, Gu YY, Jiang CH, Liu CY, Lv LP, Liu JN, et al. Carbon monoxide releasing molecule-2 suppresses proliferation, migration, invasion, and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer Calu-3 cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Apr;22(7):1948–57.
  215. Chakraborty I, Carrington SJ, Hauser J, Oliver SRJ, Mascharak PK. Rapid Eradication of Human Breast Cancer Cells through Trackable Light-Triggered CO Delivery by Mesoporous Silica Nanoparticles Packed with a Designed photoCORM. *Chem Mater*. 2015 Dec 22;27(24):8387–97.
  216. Lee WY, Chen YC, Shih CM, Lin CM, Cheng CH, Chen KC, 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*. 2014 Jan 1;274(1):55–62.
  217. Lv C, Su Q, Fang J, Yin H. Styrene-maleic acid copolymer-encapsulated carbon monoxide releasing molecule-2 (SMA/CORM-2) suppresses proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Dec 3;520(2):320–6.
  218. Jung SS, Moon JS, Xu JF, Ifedigbo E, Ryter SW, Choi AMK, et al. Carbon monoxide negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 May 15;308(10):L1058-1067.
  219. Juszczak M, Kluska M, Wysokiński D, Woźniak K. DNA damage and antioxidant properties of CORM-2 in normal and cancer cells. *Sci Rep*. 2020 Jul 22;10(1):12200.
  220. Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4771–8.
  221. Estrella V, Chen T, Lloyd M, Wojtkowiak J, Cornnell HH, Ibrahim-Hashim A, et al. Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res*. 2013 Mar 1;73(5):1524–35.
  222. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007 May 1;109(9):3812–9.
  223. Hasan D, Gamen E, Abu Tarboush N, Ismail Y, Pak O, Azab B. PKM2 and HIF-1 $\alpha$  regulation in prostate cancer cell lines. *PloS One*. 2018;13(9):e0203745.
  224. Ryter SW. Therapeutic Potential of Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Acute Organ Injury, Critical Illness, and Inflammatory Disorders. *Antioxidants*. 2020 Nov 19;9(11):1153.
  225. Wegiel B, Gallo D, Csizmadia E, Harris C, Belcher J, Vercellotti GM, et al. Carbon monoxide expedites metabolic exhaustion to inhibit tumor growth. *Cancer Res*. 2013 Dec 1;73(23):7009–21.

226. Long R, Salouage I, Berdeaux A, Motterlini R, Morin D. CORM-3, a water soluble CO-releasing molecule, uncouples mitochondrial respiration via interaction with the phosphate carrier. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1837(1):201–9.
227. Kaczara P, Motterlini R, Rosen GM, Augustynek B, Bednarczyk P, Szewczyk A, et al. Carbon monoxide released by CORM-401 uncouples mitochondrial respiration and inhibits glycolysis in endothelial cells: A role for mitoBKCa channels. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1847(10):1297–309.
228. Zhang X. Interactions between cancer cells and bone microenvironment promote bone metastasis in prostate cancer. *Cancer Commun Lond Engl*. 2019 Nov 21;39(1):76.
229. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol*. 2014;5:511.
230. Bioart [Internet]. [cited 2025 Jun 21]. Available from: <https://bioart.niaid.nih.gov/>
231. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, de Borja R, Trudel D, Lalonde E, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet*. 2015 Jul;47(7):736–45.
232. Løvf M, Zhao S, Axcróna U, Johannessen B, Bakken AC, Carm KT, et al. Multifocal Primary Prostate Cancer Exhibits High Degree of Genomic Heterogeneity. *Eur Urol*. 2019 Mar;75(3):498–505.
233. Alarcón-Zendejas AP, Scavuzzo A, Jiménez-Ríos MA, Álvarez-Gómez RM, Montiel-Manríquez R, Castro-Hernández C, et al. The promising role of new molecular biomarkers in prostate cancer: from coding and non-coding genes to artificial intelligence approaches. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2022 Sep;25(3):431–43.
234. Chen JY, Wang PY, Liu MZ, Lyu F, Ma MW, Ren XY, et al. Biomarkers for Prostate Cancer: From Diagnosis to Treatment. *Diagnostics*. 2023 Jan;13(21):3350.
235. Bellai DJ, Rae MG. A systematic review of the association between the age of onset of spinal bulbar muscular atrophy (Kennedy's disease) and the length of CAG repeats in the androgen receptor gene. *eNeurologicalSci*. 2024 Mar 1;34:100495.
236. Sasako T, Ilboudo Y, Liang KYH, Chen Y, Yoshiji S, Richards JB. The Influence of Trinucleotide Repeats in the Androgen Receptor Gene on Androgen-related Traits and Diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2024 May 3;dgae302.
237. Huang R, Wang S, Wang N, Zheng Y, Zhou J, Yang B, et al. CCL5 derived from tumor-associated macrophages promotes prostate cancer stem cells and metastasis via activating  $\beta$ -catenin/STAT3 signaling. *Cell Death Dis* 2020 114. 2020 Apr;11(4):1–20.
238. Pan B, Li R, Chen Y, Tang Q, Wu W, Chen L, et al. Genetic Association Between Androgen Receptor Gene CAG Repeat Length Polymorphism and Male Infertility: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Mar;95(10):e2878.
239. Weng H, Li S, Huang JY, He ZQ, Meng XY, Cao Y, et al. Androgen receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2017 Jan 16;7:40554.
240. Qin J, Cui N, Hou R, Liu T, Sun H, Liu Y, et al. Association between androgen receptor gene polymorphisms and testicular germ cell tumor: A systematic review and meta-

- analysis. *J Cancer Res Ther*. 2019 Mar;15(Supplement):S60–8.
241. Jiang W, Zhang J, Zhou Q, Liu S, Ni M, Zhu P, et al. Predictive value of GGN and CAG repeat polymorphisms of androgen receptors in testicular cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Feb 12;7(12):13754–64.
  242. Mao Q, Qiu M, Dong G, Xia W, Zhang S, Xu Y, et al. CAG repeat polymorphisms in the androgen receptor and breast cancer risk in women: a meta-analysis of 17 studies. *OncoTargets Ther*. 2015 Aug 13;8:2111–20.
  243. Deng Y, Wang J, Wang L, Du Y. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism and ovarian cancer risk: A meta-analysis. *Biosci Trends*. 2017 May 23;11(2):193–201.
  244. Zhu H, Zhu X, Zheng L, Hu X, Sun L, Zhu X. The role of the androgen receptor in ovarian cancer carcinogenesis and its clinical implications. *Oncotarget*. 2016 Oct 11;8(17):29395–405.
  245. Sun JH, Lee SA. Association between CAG repeat polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis by race, study design and the number of (CAG)<sub>n</sub> repeat polymorphisms. *Int J Mol Med*. 2013 Nov;32(5):1195–203.
  246. Zanolletto M, Ibáñez K, Brown AL, Sivakumar P, Bombaci A, Santos L, et al. Unexpected frequency of the pathogenic AR CAG repeat expansion in the general population. *Brain J Neurol*. 2023 Jul 3;146(7):2723–9.
  247. Gong Z, Platek ME, Till C, Goodman PJ, Tangen CM, Platz EA, et al. Associations Between Polymorphisms in Genes Related to Oxidative Stress and DNA Repair, Interactions With Serum Antioxidants, and Prostate Cancer Risk: Results From the Prostate Cancer Prevention Trial. *Front Oncol*. 2022 Jan 14;11.
  248. Liu J, Zheng J, Guo Y, Sheng X, Yin Y, Qian S, et al. Association between APE1 rs1760944 and rs1130409 polymorphism with prostate cancer risk. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Nov 19;100(46):e27630.
  249. Juhnke M, Heumann A, Chirico V, Höflmayer D, Menz A, Hinsch A, et al. Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) overexpression is an independent prognostic marker in prostate cancer without TMPRSS2:ERG fusion. *Mol Carcinog*. 2017 Sep;56(9):2135–45.
  250. Dai ZJ, Shao YP, Kang HF, Tang W, Xu D, Zhao Y, et al. Relationship between apurinic endonuclease 1 Asp148Glu polymorphism and gastrointestinal cancer risk: An updated meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2015 Apr 28;21(16):5081–9.
  251. Zhou X, Wei L, Jiao G, Gao W, Ying M, Wang N, et al. The association between the APE1 Asp148Glu polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis based on case–control studies. *Mol Genet Genomics*. 2015 Feb 1;290(1):281–8.
  252. Yang S, Lai Y, Xiao L, Han F, Wu W, Long S, et al. Susceptibility and REF1 gene polymorphism towards colorectal cancer. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Mar;71(2):977–82.