



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudio de factores nucleares asociados a hemo-oxigenasa 1 en cáncer de próstata

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

Lic. Rocio Alejandra Seniuk

Directora de Tesis: Dra. Geraldine Gueron

Directora Adjunta: Dra. Ayelén Toro

Consejero de estudios: Dr. Eduardo Cánepa

Laboratorio de Inflamación y Cáncer

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

IQUIBICEN-CONICET

Buenos Aires, 2025

Fecha de defensa: 04-12-2025

RESUMEN

El cáncer de próstata (PCa) es el segundo tipo de cáncer con mayor incidencia y la quinta causa de muerte asociada a cáncer a nivel mundial en hombres. Su progresión a formas resistentes a la castración (CRPC) representa un desafío terapéutico mayor, que surge post-terapia de privación androgénica (ADT), metástasis viscerales y pérdida de dependencia del receptor de andrógenos (AR) junto con la aparición de fenotipos neuroendócrinos (NE). La heterogeneidad intratumoral en tumores mixtos adenocarcinoma-neuroendócrino (Ad-NEPC) complica el diagnóstico y tratamiento, demandando biomarcadores que capturen dinámicas espaciales y moleculares.

Hemo-oxigenasa 1 (HO-1, codificada por el gen *HMOX1*) es la enzima limitante en la reacción de degradación del grupo hemo a biliverdina (BV), monóxido de carbono (CO) y hierro ferroso (Fe^{2+}). Reportes de nuestro laboratorio documentaron por primera vez que la inducción de HO-1, posee un potente efecto anti-tumoral en el PCa, incluyendo inhibición de la proliferación, la migración y la metástasis ósea a través de vías como NF- κ B, HIF-1 α y Wnt/ β -catenina. En este contexto, HO-1 emerge como un blanco potencial en el PCa ya que mantiene la homeostasis celular y contrarresta el daño oxidativo e inflamatorio. Si bien estos efectos podrían atribuirse a su actividad canónica citoplásmica, su rol nuclear no canónico en el PCa aún debe ser esclarecido.

Este trabajo se centró en investigar el rol nuclear de HO-1 en el PCa, enfocándose particularmente en sus interacciones con factores y co-reguladores de la transcripción génica.

A través de un abordaje proteómico, se delineó por primera vez el interactoma nuclear de HO-1 en células de PCa, identificándose 11 proteínas interactoras que se hallaban exclusivamente en el núcleo de células de PCa tratadas con el inductor farmacológico de HO-1, hemina. Integrando análisis bioinformáticos utilizando STRING e IPA (*Ingenuity pathway analysis*), se determinó que la interacción entre estas 11 proteínas y HO-1 aún no se había descrito. Mediante co-inmunoprecipitación (Co-IP) utilizando la línea celular de PCa, PC3, tratadas con hemina, se validaron las interacciones físicas con factores como BCLAF1 y

SAFB.

Dado que los 11 interactores de HO-1 se detectaron en el núcleo de células de PCa en un contexto de inducción de HO-1 (PC3-hemina), nos propusimos investigar si estos interactores podían modular la expresión génica. Para ello, se utilizó la plataforma ChIP-Atlas que reúne datos de ChIP-seq de diferentes líneas tumorales. Los análisis llevados a cabo corroboraron que BCLAF1, SAFB, ILF3 y DDX17, presentan sitios de unión en los promotores de diversos genes. Los datos obtenidos en ChIP-Atlas fueron utilizados para explorar vías *KEGG* (Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas) significativamente representadas, revelando un enriquecimiento en vías asociadas a enfermedades neurológicas. Estos hallazgos nos llevaron a explorar la relación entre HO-1, los 4 interactores con sitios de unión al DNA y sus genes target, con los distintos subtipos del PCa, especialmente el carcinoma neuroendócrino (NEPC).

La evaluación transcriptómica de datos de RNA-seq provenientes de xenotransplantes derivados de pacientes (PDX) generados en el MD Anderson Cancer Center (PDX MDA PCa) y cohortes clínicas mostró, en un análisis de agrupamiento no supervisado, que la alta expresión de los genes que codifican los interactores de HO-1 se asocia con el NEPC y que además *HMOX1* se encuentra sub-expresada en este subtipo. A su vez, se utilizaron datos de transcriptómica espacial provenientes del tumor de un paciente con histología mixta, que incluía regiones de adenocarcinoma y NEPC. La expresión resuelta espacialmente confirmó el enriquecimiento de marcadores NE canónicos (*CHGA*, *SYP*, , *EZH2*) en los focos de NEPC acompañado de elevada expresión de los interactores de HO-1 en comparación con las regiones caracterizadas como adenocarcinoma.

Dada la asociación entre los interactores nucleares de HO-1 y el NEPC se procedió a analizar *in vitro* el efecto de la inducción de esta proteína sobre el proceso de transdiferenciación de células de PCa hacia un fenotipo NE. Con este fin, se estableció y caracterizó un modelo *in vitro* de transdiferenciación NE en las líneas celulares C4-2B y PC3 utilizando forskolina (Fsk), activador de la adenilato ciclasa, para inducir la reprogramación fenotípica, combinado con hemina para la inducción de HO-1. Se observó que el tratamiento con Fsk, indujo una morfología celular elongada, compatible con la diferenciación NE, acompañada de la

sobreexpresión de marcadores NE como *ASCL1*, *NSE*, *CHGA* y *SYP*. La co-inducción con hemina y Fsk revirtió parcialmente estos cambios, al reducir los niveles de dichos marcadores y restablecer el fenotipo epitelial.

Los hallazgos de este trabajo ofrecen una nueva perspectiva sobre las funciones no canónicas de HO-1, sugiriendo que sus interactores nucleares podrían ser moduladores clave de la transcripción génica y potenciales marcadores o blancos terapéuticos en subtipos agresivos de la enfermedad. En conclusión, este trabajo identifica por primera vez la asociación del interactoma nuclear de HO-1 con el NEPC, con ILF3/SAFB/BCLAF1 como marcadores que podrían ser útiles para la estratificación subclonal. Estos hallazgos integran y expanden la evidencia previa que atribuye a HO-1 funciones duales en el cáncer, proponiendo un modelo donde la localización nuclear de HO-1 ejerce efectos anti-tumorales y modula la plasticidad celular.

PALABRAS CLAVE: HEMO-OXIGENASA 1; CARCINOMA NEUROENDOCRINO; INTERACTORES NUCLEARES DE HO-1; REPROGRAMACIÓN TRANSCRIPCIONAL

ABSTRACT

Title: Study of Nuclear Factors Associated with Heme Oxygenase-1 in Prostate Cancer

Prostate cancer (PCa) is the second most incident cancer type and the fifth leading cause of cancer-associated death worldwide in men. Its progression to castration-resistant forms (CRPC) represents a major therapeutic challenge, emerging after androgen deprivation therapy (ADT), visceral metastases, and loss of androgen receptor (AR) dependence, along with the appearance of neuroendocrine phenotypes (NE). Intratumoral heterogeneity in mixed adenocarcinoma-neuroendocrine tumors (Ad-NEPC) complicates diagnosis and treatment, demanding biomarkers that capture spatial and molecular dynamics.

Heme oxygenase 1 (HO-1, encoded by the *HMOX1* gene) is the rate-limiting enzyme in the heme group degradation reaction to biliverdin (BV), carbon monoxide (CO), and ferrous iron (Fe^{2+}). Reports from our laboratory documented for the first time that HO-1 induction exerts a potent antitumor effect in PCa, including inhibition of proliferation, migration, and bone metastasis through pathways such as NF- κ B, HIF-1 α , and Wnt/ β -catenin. In this context, HO-1 emerges as a potential target in PCa, as it maintains cellular homeostasis and counteracts oxidative and inflammatory damage. Although these effects could primarily be attributed to its canonical cytoplasmic activity, its non-canonical nuclear role in PCa remains to be elucidated.

This work focused on decoding the nuclear role of HO-1 in PCa, particularly its interactions with transcription factors and co-regulators of gene transcription.

Through a proteomic approach, the nuclear interactome of HO-1 in PCa cells was delineated for the first time, identifying 11 interacting proteins that were exclusively present in the nucleus of PCa cells treated with the pharmacological HO-1 inducer, hemin. Integrating bioinformatics analyses using STRING and IPA (Ingenuity Pathway Analysis), it was determined that the interactions between these 11 proteins and HO-1 had not been described previously. Physical interactions with factors such as BCLAF1 and SAFB were validated by co-immunoprecipitation (Co-IP) using the PCa cell line PC3 treated with hemin.

Given that the 11 HO-1 interactors were detected in the nucleus of PCa cells in a context of HO-1 induction (PC3-hemin), we aimed to investigate whether these interactors could modulate gene expression. To this end, the ChIP-Atlas platform, which compiles ChIP-seq data from various tumor cell lines, was used. The analyses conducted confirmed that BCLAF1, SAFB, ILF3, and DDX17 exhibit binding sites in the promoters of various genes. The data obtained from ChIP-Atlas were used to explore significantly represented KEGG pathways (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), revealing enrichment in pathways associated with neurological diseases. These findings led us to explore the relationship between HO-1, the 4 interactors with DNA-binding sites, and their target genes, with the different PCa subtypes, particularly neuroendocrine carcinoma (NEPC).

Transcriptomic evaluation of RNA-seq data from patient-derived xenografts (PDX) generated at the MD Anderson Cancer Center (MDA PCa PDX) and clinical cohorts showed, in an unsupervised clustering analysis, that high expression of the genes encoding HO-1 interactors is associated with NEPC, and that HMOX1 is additionally underexpressed in this subtype. In turn, spatial transcriptomics data from a tumor in a patient with mixed histology, including adenocarcinoma and NEPC regions, were used. Spatially resolved expression confirmed the enrichment of canonical NE markers (CHGA, SYP, NSE, EZH2) in NEPC foci, accompanied by elevated expression of HO-1 interactors compared to regions characterized as adenocarcinoma.

Given the association between HO-1 nuclear interactors and NEPC, we decided to analyze in vitro the effect of this protein's induction on the transdifferentiation process of PCa cells toward an NE phenotype. To this end, an in vitro model of NE transdifferentiation was established and characterized in the C4-2B and PC3 PCa cell lines using forskolin (Fsk), an adenylate cyclase activator, to induce phenotypic reprogramming, combined with hemin for HO-1 induction. It was observed that Fsk treatment induced an elongated cellular morphology compatible with NE differentiation, accompanied by overexpression of markers such as ASCL1, NSE, CHGA, and SYP. Co-induction with hemin partially reversed these changes by reducing the levels of these markers and restoring the epithelial phenotype.

The findings of this work offer a new perspective on the non-canonical functions of HO-1, suggesting that its nuclear interactors could be key modulators of gene transcription and potential markers or therapeutic targets in aggressive disease subtypes. In conclusion, this work identifies for the first time the association of the HO-1 nuclear interactome with NEPC, with ILF3/SAFB/BCLAF1 as markers that could be useful for subclonal stratification. These findings integrate and expand previous evidence attributing dual functions to HO-1 in cancer, proposing a model in which the nuclear localization of HO-1 exerts antitumor effects and modulates cellular plasticity, while its cytoplasmic expression may favor tumor adaptation.

KEYWORDS: Heme-Oxygenase 1; Neuroendocrine Carcinoma; HO-1 Nuclear Interactors; Transcriptional Reprogramming

PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral he contribuido en trabajos que han dado lugar a las siguientes publicaciones de relevancia en el área de carcinogénesis y virología:

- Sanchis P, Sabater A, Lechuga J, Rada J, **Seniuk R**, Pascual G, Gatti M, Bizzotto J, Shepherd P, Yang J, Cotignola V, Vázquez E, Mateo J, Valacco P, Labanca E, Logothethis C, Gueron G, Anselmino N. *PKA-Driven SPP1 Activation as a Novel Mechanism Connecting the Bone Microenvironment to Prostate Cancer Progression*. *Oncogene*. 2025 Oct;44(38):3568-3579. doi: 10.1038/s41388-025-03511-z. Epub 2025 Aug 2. PMID: 40753365; PMCID: PMC12436191..
- 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, Costábile 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)_n 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- γ 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

“Uno no es uno solo: uno es uno más todos los que lo miraron, lo nombraron, lo quisieron o lo rechazaron. Somos retazos de los demás cosidos con un hilo invisible.”

-Hebe Uhart en Viajera Crónica

Como bien reza la frase anterior, no “somos” solos y es justamente por eso por lo que este logro no es solo mío y que fue posible gracias a muchísimas personas.

Quiero empezar agradeciendo a las dos instituciones públicas de excelencia que hicieron posible mi formación académica como Licenciada, la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, y como Doctora, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Me llena de orgullo ser parte de ambas. A su vez agradezco a la institución que financió mi doctorado (CONICET) y a la American Association for Cancer Research, quien me otorgó la invaluable oportunidad de viajar al congreso internacional AACR 2025 y participar como *GS/TA* en donde pude mostrar mis resultados y escuchar a científicos de renombre a nivel mundial.

A mis directoras, Geraldine Gueron y Ayelén Toro. Gracias Geral por haberme recibido en el laboratorio y me darne un lugar espectacular para desarrollar mi doctorado, lleno de desafíos y oportunidades. Supiste ser una excelente mentora, no solo en el ámbito científico sino también en lo personal, siempre impulsando mi crecimiento y sacándome de mi zona de confort porque sabías que iba a poder con el desafío.

Gracias Aye por tu paciencia infinita. Tu seguimiento diario fue crucial, me enseñaste que las cosas siempre se pueden hacer mejor y que, aunque suene a cliché, la diferencia está en los detalles. Gracias por prestar escucha y aconsejarme cada vez que pudiste.

A la Dra. Elba Vazquez, la voz de la experiencia y con quien tuve el honor de corregir este escrito. Gracias por prestarme tu tiempo y sabiduría.

Gracias a las tres por transmitirme la pasión que sienten por lo que hacen.

A Javier Cotignola por estar siempre dispuesto a brindar su tiempo para hablar de resultados, sumar una opinión distinta y empujarnos a cuestionarnos cada paso y decisión.

A mi consejero de estudios, el Dr. Eduardo Cánepa por participar de las diferentes instancias de mi doctorado y su buena predisposición para resolver los diferentes temas académicos que este conlleva.

A los Dres. Marcelo Martí y Alejandra Erlejman por aceptar formar parte de mi comité de seguimiento y prestar su tiempo para el mismo, contribuyendo siempre de manera constructiva para que el trabajo estuviera bien hecho.

A los Dres. Alejandra Erlejman, Caroline Lamb y Ezequiel Lacunza por aceptar ser jurados de esta tesis y realizar excelentes devoluciones para poder seguir mejorando el escrito y la interpretación de los resultados.

A la Dra. Pía Valacco por tomarse con tanta seriedad el análisis de cada uno de los resultados y por estar siempre dispuesta a dar una mano o consejo con lo que necesitara.

En el LIC me crucé con muy buena gente, con quienes no solo trabajamos juntos sino que también compartimos juntadas, mates, asados, hacen del laboratorio un lugar muy ameno para estar y conforman un gran grupo de trabajo. Durante estos 5 años de doctorado tuve la fortuna de coincidir con cinco personas en particular, que con el compartir diario, las risas y el acompañamiento mutuo terminaron convirtiéndose en grandísimos amigos. Gracias Sofi, Pablito, Agus, Sabri y Gastón, son grandísimas personas e hicieron de esta experiencia algo inigualable.

Gracias a todos los miembros del ETI1 por estar siempre dispuestos a dar una mano.

Gracias a mis amigas de siempre Meli y Lucre, con quienes a pesar de la distancia encontramos la forma de estar presentes en la vida de la otra.

A mis amigos no tan viejos, y sobre todo a aquellos que conocí y re-encontré viviendo en CABA, hicieron de esta ciudad enorme y apabullante un lugar espectacular para vivir.

A mis papás, Claudia y Lito, son invaluable viejitos. Siempre me mostraron con el ejemplo que todo se logra si le metes garra y dedicación. Este doctorado es fruto de lo que ustedes sembraron en mí durante tantos años.

Gracias Guada por ser la mejor hermana del mundo, no me imagino mi mundo sin vos. Gracias por ser la presidenta de mi club de fans, por escuchar y pensar conmigo siempre que necesito.

Gracias a los tres por acompañarme en cada decisión con confianza absoluta.

Agus, gracias por haberme abordado en la escalera de la FCEQyN para pedirme que estudiemos química orgánica juntas, sin saber que le estabas abriendo la puerta a esta

maravillosa amistad que espero trascienda universos. Gracias por tener la palabra (o el silencio) y el abrazo justo cuando lo necesité.

Finalmente, quiero agradecer a la persona que va dedicada esta tesis, Pato. Crecer junto con vos es de las mejores cosas que me pasó en la vida. Siempre me hiciste sentir acompañada a pesar de haber impuesto 1000 km entre nosotros durante estos 5 años. Has sabido leerme incluso cuando yo misma no sabía qué quería. Gracias por impulsarme a tener hambre de más y a no conformarme. Por animarte a dar el próximo paso de nuestras vidas con la confianza de que si estamos juntos, va a salir todo bien. Por muchas más aventuras, te amo.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Ad-NEPC	Adenocarcinoma-Neuroendócrino Mixto de Próstata
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADT	Terapia de privación androgénica
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de Varianza
AR	Receptor de Andrógenos
ARE	Elemento de Respuesta Antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ARPC	Cáncer de Próstata Positivo para Receptor de Andrógenos
AURKA	Aurora Kinase A
BCA	Ensayo de Ácido Bicincinónico
BCLAF1	Factor de Transcripción Asociado a BCL2 1
BCL-2	Proteína Antiapoptótica BCL-2
BR	Bilirrubina
BRX1	BRX1, Subunidad del Pre-60S Ribosomal
BSA	Albúmina de suero bovino
BV	Biliverdina
BVR	Biliverdina Reductasa
C4-2B	Línea celular derivada de C4-2 de cáncer de próstata humano
CASP14	Caspasa 14
cfDNA	ADN libre circulante
CD56	Cluster of Differentiation 56
CHGA	Cromogranina A
ChIP-seq	Secuenciación de Inmunoprecipitación de Cromatina
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
CRAPome	Base de Datos de Contaminantes Comunes en Proteómica
CRPC	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración
CRPC-Adeno	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración Adenocarcinoma

CRPC-NE	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración Neuroendócrino
DDX17	ARN Helicasa DEAD-Box 17
DHX35	DEAH-Box Helicase 35
DHT	Di-hidrotestosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECL	Electroquimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Kinasa Regulada por Señal Extracelular
EZH2	Enzima Homóloga a Zeste 2
Fe²⁺	Hierro ferroso
FSK	Forskolina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GEO	Base de Datos de Expresión Génica Ómnibus
GRCh38	Genoma de Referencia Humano Ensamblaje 38
GSEA	Análisis de Enriquecimiento de Conjunto de Genes
HCD	Disociación por Colisión de Alta Energía
HEM	Hemina
HIF1A	Factor Inducible por Hipoxia 1 Alfa
HMOX1	Gen que codifica para Hemo Oxigenasa-1
HO-1	Hemo-Oxigenasa 1 (proteína)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
HRP	Peroxidasa de rábano
IHC	Inmunohistoquímica
IgG	Inmunoglobulina G
ILF2	Factor de Interleucina 2
ILF3	Factor de Interleucina 3
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
ISUP	Sociedad Internacional de Patología Urológica
ITGA5	Integrina Alfa 5
kDa	kiloDalton
KEGG	Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas
KLK3	Kallikreína 3
KRT5	Citoqueratina 5

KRT8	Citoqueratina 8
KRT18	Citoqueratina 18
LC-ESI MS/MS	Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas con Electro-spray Ionización en Tándem
MAPK	Kinasa Activada por Mitógenos
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MYCN	Proto-oncogén Mielocitomatoso Amplificado
NaF	Fluoruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NaVO₄	Orto-vanadato de sodio
NCAM1	Molécula de Adhesión Celular Neural 1
NE	Neuroendócrino
NEMO	Kinasa Estimulada por Estrés Mitótico / Kinasa similar a Taquión
NEPC	Carcinoma Neuroendócrino
NF-κB	Factor Nuclear kappa B
Nrf2	Factor Nuclear Eritroide 2–Relacionado con Factor 2
NSE	Enolasa específica de neurona
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Solución tampón de fosfato salino
PC3	Línea celular de cáncer de próstata humano derivada de metástasis ósea
PCa	Cáncer de próstata
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDX	Xenotransplantes Derivados de Pacientes
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPIA	Peptidilprolil isomerasa A
PRDX1	Peroxirredoxina 1
PSA	Antígeno prostático específico
PTEN	Fosfatasa y tensina homóloga
qPCR	PCR cuantitativa
RB1	Gen del Retinoblastoma 1 / Proteína de Unión a Retinoblastoma 1
RBP	Proteína de unión a ARN
REL	Retículo endoplásmico liso

RIPA	Tampón de Ensayo de Radioinmunoprecipitación
RNA-seq	Secuenciación de ARN
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo), Roswell Park Memorial Institute (culture medium)
RT	Temperatura ambiente / Retrotranscripción
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SAFB	Factor de Fijación de Andamiaje B
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Error Estándar de la Media
SFB	Suero fetal bovino
SLC25A5	Miembro 5 de la Familia de Transportadores de Solutos 25
SOX2	Factor de transcripción SOX2
SPEN	Espina (Split Ends Homolog)
STAT3	Transductor de Señal y Activador de Transcripción 3
SYP	Sinaptofisina
TBS-T	Solución salina tamponada con Tris con Tween-20
TNM	Clasificación Tumor–Nódulo–Metástasis
TP53	Gen Supresor Tumoral p53
TR	Transcripción Reversa
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato
TSS	Sitio de inicio de transcripción
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VEGFC	Factor de crecimiento endotelial vascular C
ZBTB16	Contenedor de Dominio BTB y Dedo de Zinc 16
µg	microgramo
µM	micromolar

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	5
PUBLICACIONES.....	9
AGRADECIMIENTOS.....	12
ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN.....	23
PARTE I.....	24
1. LA PRÓSTATA: FISIOLÓGÍA Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS.....	24
1.1. LA GLÁNDULA PROSTÁTICA.....	24
2. CÁNCER DE PRÓSTATA (PCa).....	29
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	29
2.2. EPIDEMIOLOGÍA.....	29
2.3. ETIOLOGÍA.....	30
2.5. PROGRESIÓN Y TRATAMIENTO.....	34
2.6. CÁNCER DE PRÓSTATA NEUROENDÓCRINO (NEPC).....	37
PARTE II.....	41
1. CÁNCER E INFLAMACIÓN.....	41
1.1. ROL DE LA INFLAMACIÓN EN CÁNCER.....	41
2. HEMO-OXIGENASA 1 (HO-1).....	42
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	42
2.2. HO-1 EN LA BIOLOGÍA TUMORAL.....	44
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
HIPÓTESIS.....	48
OBJETIVO GENERAL.....	48
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1. CULTIVO CELULAR.....	50
1.1. LÍNEAS CELULARES.....	50
1.2. INDUCCIÓN FARMACOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE HO-1.....	50
2. ANÁLISIS DE PROTEÓMICA, DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS Y EXPRESIÓN PROTEICA.....	50
2.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	51
2.3. CUANTIFICACIÓN.....	52
2.4. CO-INMUNOPRECITACIÓN (CO-IP) CON BEADS DE AGAROSA.....	52
2.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON IONIZACIÓN ELECTRO-SPRAY Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC ESI-MS/MS).....	52
2.6. ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	53
2.7. ANÁLISIS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y SUS GENES TARGET UTILIZANDO ChIP-Atlas.	54
2.8. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE SET DE GENES (GSEA).....	54
2.9. VALIDACIÓN DE LOS INTERACTORES NUCLEARES DETECTADOS POR LC ESI-MS/MS A	

TRAVÉS DE CO-IP CON BEADS MAGNÉTICAS.....	54
2.10. WESTERN BLOT.....	55
2.11. ANTICUERPOS.....	56
3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	56
3.1. PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL.....	56
3.2. CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL.....	57
3.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT).....	57
3.4. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR).....	57
4. MODELO DE XENOTRANSPLANTES DERIVADOS DE PACIENTES (PDXs).....	59
4.1. ANIMALES.....	59
4.2. DESARROLLO DE PDXs.....	60
5. COHORTE DE PACIENTES CON NEPC.....	61
6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	61
6.1. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES Y ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO NO SUPERVISADO.....	61
6.2. TRANSCRIPTÓMICA ESPACIAL.....	61
7. PROTOCOLO DE TRANSDIFERENCIACIÓN NE in vitro.....	62
7.1. EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR.....	62
7.1.1. TINCIÓN CON FALOIDINA-TRITC.....	62
7.1.2 TINCIÓN CON AZUL DE METILENO.....	63
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
RESULTADOS.....	65
PARTE I.....	66
INTERACTOMA NUCLEAR DE HO-1 EN PCa.....	66
1. CONSTRUCCIÓN DEL INTERACTOMA NUCLEAR DE HO-1.....	66
1.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y TRANSCRIPTÓMICO INTEGRADO DE MUESTRAS DE PCa... 68	
1.2. VALIDACIÓN DE LAS INTERACCIONES DETECTADAS ENTRE HO-1 Y LOS FACTORES NUCLEARES.....	71
1.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS INTERACTORES DE HO-1.....	73
2. CORRELACIÓN CLÍNICA ENTRE HO-1, SUS INTERACTORES Y GENES TARGET CON MUESTRAS NEPC.....	75
2.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HMOX1 Y DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA SUS INTERACTORES NUCLEARES MEDIANTE TRANSCRIPTÓMICA ESPACIAL.....	82
PARTE II.....	86
ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE HO-1 Y SUS INTERACTORES EN EL NEPC.....	86
1. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO NEPC in vitro.....	86
2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FORSKOLINA SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR Y LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NE.....	87
3. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HO-1 EN CÉLULAS DE PCa TRANSDIFERENCIADAS.....	91
3.1. EL TRATAMIENTO CON HEMINA REVIERTA LA ADQUISICIÓN DE CARACTERÍSTICAS NE.. 92	
3.2. EFECTOS MOLECULARES DE LA MODULACIÓN DE HO-1 EN LA TRANSDIFERENCIACIÓN PROMOVIDA POR EL TRATAMIENTO CON FSK.....	95

DISCUSIÓN.....	100
REFERENCIAS.....	109

INTRODUCCIÓN

PARTE I

1. LA PRÓSTATA: FISIOLOGÍA Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

1.1. LA GLÁNDULA PROSTÁTICA

La próstata constituye la principal glándula exocrina accesoria del aparato reproductor masculino. Se localiza por delante del recto, bajo la vejiga y rodeando la uretra, un conducto angosto que atraviesa longitudinalmente el pene y por el que fluyen tanto el semen de los conductos eyaculatorios como la orina de la vejiga (**Figura 1**). Está compuesta por una porción glandular y otra fibromuscular, siendo su función principal secretar sustancias que promueven el desplazamiento y la viabilidad de los espermatozoides, favoreciendo así la fertilización. Contribuye con más del 30% del plasma seminal en la eyaculación, al producir enzimas como la fosfatasa ácida, la seminina y el activador del plasminógeno, además de compuestos tales como el zinc, el citrato, la fructosa y el antígeno prostático específico (PSA, del inglés *Prostate Specific Antigen*) (1).

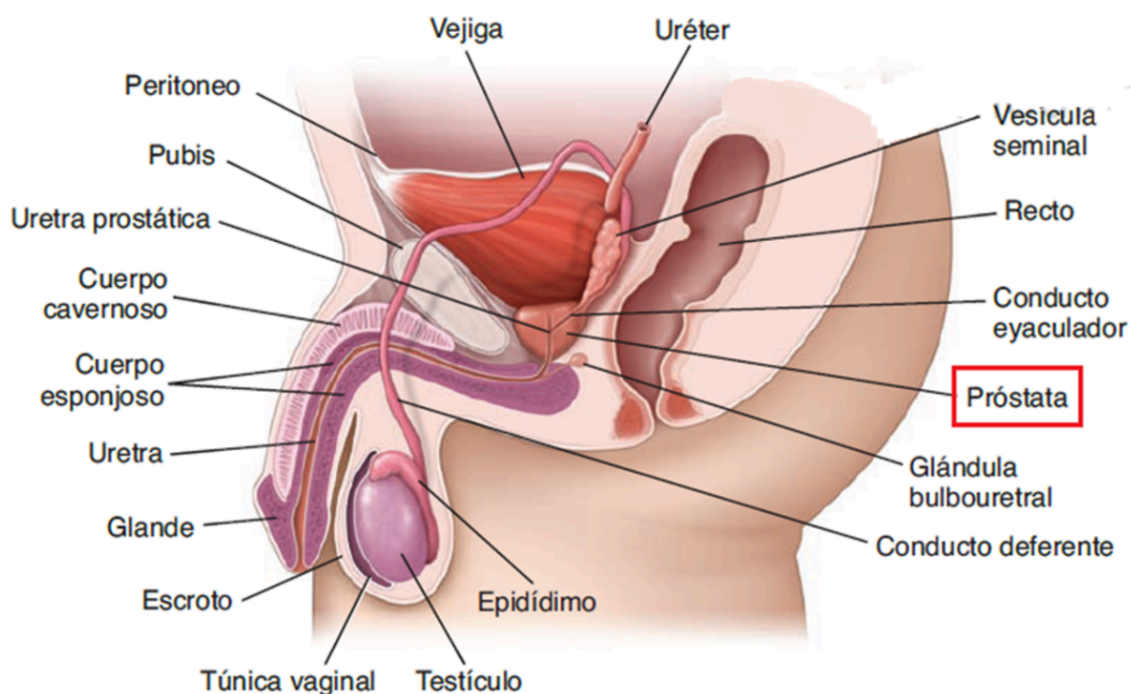


Figura 1. Localización anatómica de la próstata. La próstata es una glándula exocrina del aparato reproductor masculino, ubicada por delante del recto, inmediatamente debajo de la vejiga y

rodeando la uretra. Figura adaptada del libro Histología Texto y Atlas - Correlación con Biol. Mol. y Cel. (2).

En el adulto, la próstata se divide anatómicamente en cinco zonas o regiones distintas (**Figura 2**):

- **Zona central:** rodea los conductos eyaculadores y representa entre el 20 y 25% del volumen prostático.
- **Zona fibromuscular:** está compuesta por fibras musculares y tejido conectivo.
- **Zona de transición:** representa el 5% de la glándula y se encuentra rodeando la uretra.
- **Zona periférica:** representa el 70% del volumen total de la próstata.
- **Región periuretral:** es la zona que está en contacto directo con la uretra.

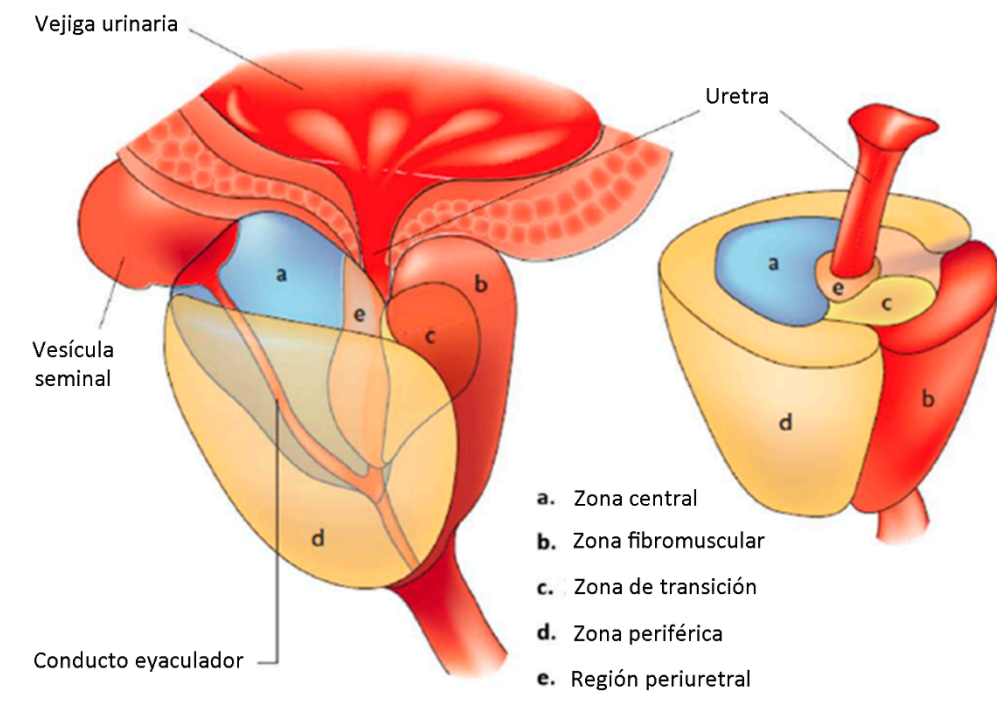


Figura 2. Esquema de las zonas anatómicas de la próstata. Figura adaptada de De Marzo *et al.* (3).

Desde el punto de vista histológico, la próstata presenta un epitelio glandular incrustado en un estroma fibromuscular. En torno al lumen glandular se localizan las células epiteliales lumbinales, responsables de secretar las enzimas que integran el fluido seminal. El epitelio secretor se apoya en células basales y células neuroendócrinas. Cabe resaltar la existencia de células madre entre las epiteliales, aunque en una proporción reducida (4). El estroma que rodea las glándulas prostáticas está formado por células musculares lisas y fibroblastos (4). Una membrana basal de matriz extracelular (ECM, del inglés *Extracellular matrix*) delimita las células basales del estroma. Adicionalmente, la próstata humana adulta incluye otros componentes celulares como vasos sanguíneos, nervios, ganglios periféricos y leucocitos infiltrados en el tejido (**Figura 3**).

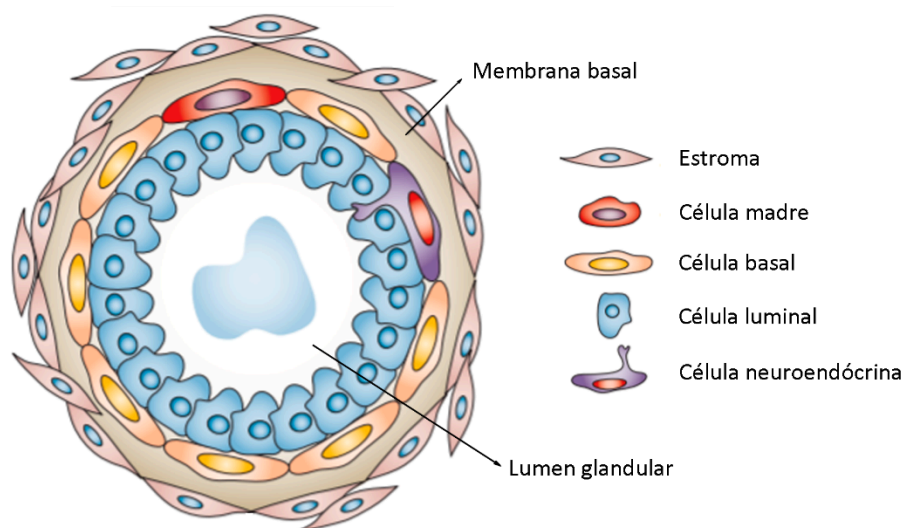


Figura 3. Histología de la próstata. La glándula prostática está formada por múltiples capas de células especializadas, entre las que se distinguen las células estromales, las células madre, las células basales, las células lumbinales y las células neuroendócrinas. Figura adaptada de Rane *et al.* (5).

Tanto el epitelio prostático como su estroma dependen de los andrógenos para su adecuado desarrollo y actividad funcional. El andrógeno circulante predominante en el hombre es la testosterona, sintetizada por las células de Leydig en el testículo, liberada a la sangre y transportada hasta la próstata ligada a una globulina. Una vez en las células prostáticas, la testosterona libre penetra en el interior celular y se transforma en dihidrotestosterona (DHT) mediante la acción de la enzima 5α -reductasa. Acto seguido, la DHT se asocia al receptor de andrógenos (AR, del inglés *Androgen Receptor*), un factor de transcripción que se activa por

unión a ligando. Este receptor, al activarse, se libera de las proteínas chaperonas, forma dímeros y se traslada al núcleo, donde se une a secuencias consenso en el ADN —denominadas elementos respondedores a andrógenos (ARE, del inglés *Androgen Response Elements*)— para modular la transcripción génica, incluyendo la del PSA (**Figura 4**).

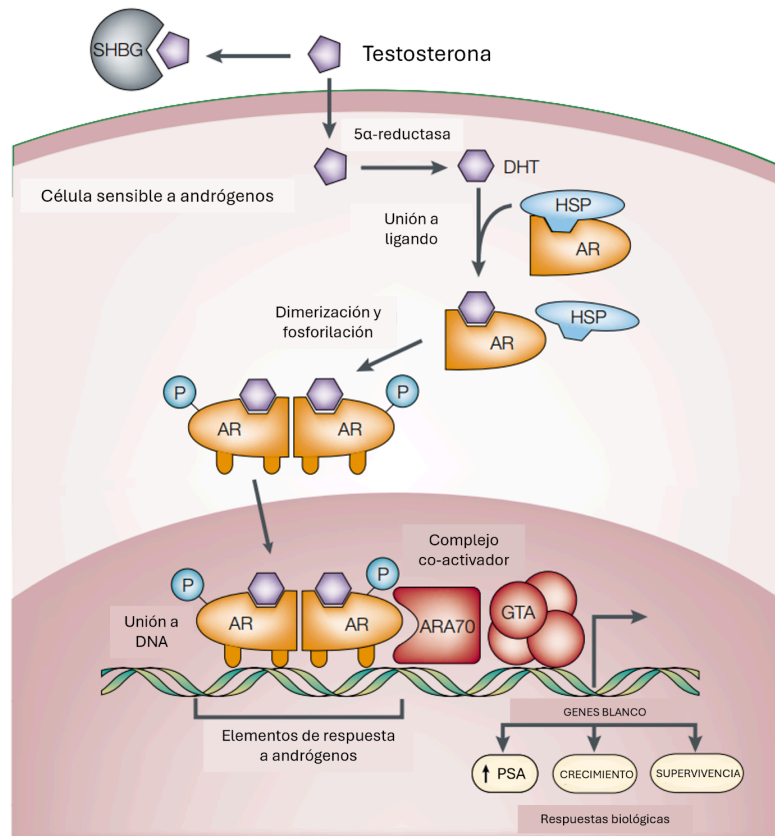


Figura 4. Mecanismos de acción del AR. La testosterona circula en la sangre unida a la albúmina y a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG). La testosterona libre, no unida a proteínas, ingresa a las células prostáticas y es convertida en DHT por la 5α-R. La unión de DHT al AR induce su disociación 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 (6).

1.2. PATOLOGÍAS PROSTÁTICAS

Es posible clasificar las patologías prostáticas en dos categorías principales: las no proliferativas y las proliferativas. En el primer grupo se destacan la atrofia focal —con mayor incidencia en la zona periférica de la próstata— y la inflamación moderada o crónica, que predomina en las zonas periférica y de transición de la glándula (3). Por otra parte, las patologías proliferativas incluyen a la hiperplasia prostática benigna (BPH, del inglés *Benign Prostate Hyperplasia*), la neoplasia intraepitelial prostática (PIN, del inglés *Prostatic Intraepithelial Neoplasia*) y el cáncer de próstata (PCa, del inglés *Prostate Cancer*) (**Figura 5**). La BPH se desarrolla en la zona de transición prostática y se caracteriza por una proliferación celular descontrolada y alteraciones en la composición tisular, lo que genera una compresión uretral e impide el flujo urinario desde la vejiga. El PIN de alto grado (HG-PIN, del inglés *High Grade-Prostatic Intraepithelial Neoplasia*) exhibe numerosas similitudes genéticas y morfológicas con el PCa, aunque sin capacidad invasiva, y representa la única lesión reconocida como precursora del PCa (7). El HG-PIN se define por la estratificación celular, aumento de la cromatina, nucléolos prominentes y disrupciones en la capa de células basales y la membrana basal. Tanto el PIN como el PCa muestran una mayor prevalencia en la zona periférica de la próstata (3).

La propensión a la formación de tumores difiere notablemente entre las diversas áreas prostáticas. Los tumores localizados en la zona central resultan poco comunes, representando un 2,5% de los casos, y caracterizados por una elevada agresividad y un mayor riesgo de reaparición con pronóstico adverso (8). En oposición, alrededor del 80% de los casos de PCa emergen en el sector periférico, desde donde frecuentemente se diseminan más allá de los confines glandulares. Finalmente, entre el 10 y el 20% de los PCa se inicia en la región de transición (9).

	Zona de la próstata		
	Periférica	Transición	Central
Atrofia focal	Prevalencia alta	Prevalencia media-alta	Prevalencia baja
Inflamación moderada	Prevalencia baja	Prevalencia baja	Ausente
Inflamación crónica	Prevalencia media-alta	Prevalencia media-alta	Prevalencia baja
Hiperplasia prostática benigna	Prevalencia baja	Prevalencia alta	Prevalencia baja
Neoplasia intraepitelial prostática	Prevalencia media-alta	Prevalencia baja	Prevalencia baja
Carcinoma	Prevalencia media-alta	Prevalencia baja	Ausente

Figura 5. Prevalencia de las patologías prostáticas en las diferentes zonas anatómicas de la próstata. Figura adaptada de De Marzo *et al.* (3).

2. CÁNCER DE PRÓSTATA (PCa)

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El PCa representa un adenocarcinoma glandular, originado por la proliferación excesiva de células luminales dentro de los ductos prostáticos, lo que conlleva la ruptura de la membrana basal y la invasión del estroma circundante (10,11).

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

El PCa figura como la segunda neoplasia más prevalente entre los hombres a escala global, sólo superado por el cáncer de pulmón, y se erige como la quinta causa de muerte por cáncer en esta población, sin considerar el cáncer de piel (**Figura 6**) (12). En Argentina, es la neoplasia con mayor incidencia y la tercera causa de muerte por cáncer después del cáncer de pulmón y colorrectal (13).

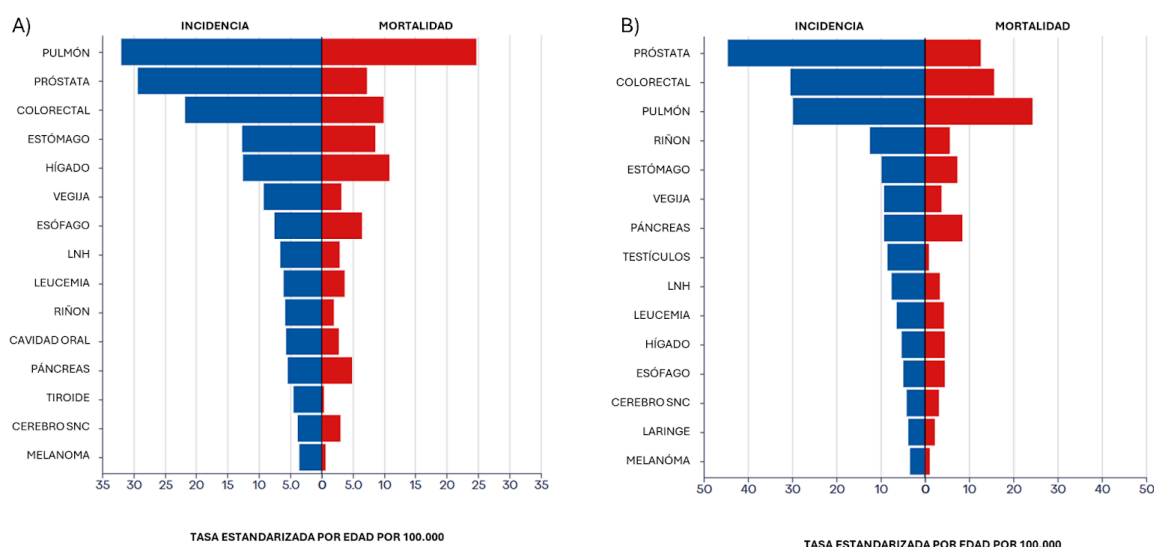


Figura 6. Epidemiología del PCa a nivel global. A) Tasas de incidencia y mortalidad por cáncer en hombres estandarizadas por edad a nivel mundial cada 100.000 habitantes. **B)** Tasa de incidencia y mortalidad por cáncer en hombres estandarizada por edad por 100.000 habitantes en Argentina. Se muestran los 15 tipos de cáncer más prevalentes en la población masculina. Figura adaptada de Global Cancer Observatory que utiliza datos de GLOBOCAN 2022 (12,13).

2.3. ETIOLOGÍA

Su etiología permanece desconocida, lo que complica el diagnóstico precoz. No obstante, se postula que resulta de la interacción de múltiples factores, incluyendo aspectos genéticos, hormonales, ambientales e infecciosos. Como evidencia la literatura, la edad constituye el principal factor de riesgo para el PCa. Otros elementos relevantes abarcan: el grupo étnico, los antecedentes familiares, la dieta, la inflamación local, las alteraciones genómicas y el PIN (14). Se ha consolidado que un entorno inflamatorio local fomenta la progresión tumoral (3), posicionando a la inflamación como un factor de riesgo clave. Respecto a las modificaciones genómicas, hay evidencia de que mutaciones en genes específicos elevan la susceptibilidad. Por ejemplo, las alteraciones genéticas recurrentes en el PCa comprenden la fusión *TMPRSS2-ERG*, mutaciones en *PTEN* (que codifica la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) y *TP53* (que codifica la proteína supresora de tumores p53), así como amplificaciones en *C-MYC* (proto-oncogén MYC) y *AR* (que codifica el receptor de andrógenos), entre otras (15).

2.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del PCa se fundamenta en una integración de pruebas bioquímicas, clínicas e histopatológicas. El tamizaje inicial se lleva a cabo mediante la medición de los niveles séricos de PSA y el examen dígito-rectal (DRE, del inglés *Digital Rectal Exam*), mientras que el diagnóstico definitivo se confirma por biopsia prostática. En individuos sanos, los valores séricos de PSA son bajos, por lo que su elevación puede sugerir un crecimiento patológico de la glándula (16). No obstante, un incremento en el PSA no siempre denota cáncer ya que condiciones benignas como BPH o la prostatitis pueden generar falsos positivos. A pesar de estas limitaciones, el PSA continúa siendo una herramienta primordial en el *screening* del PCa. Además, su determinación sérica resulta valiosa para el monitoreo post-tratamiento, permitiendo evaluar la respuesta terapéutica y detectar posibles recidivas (16). Complementando estas aproximaciones, se emplean métodos auxiliares como la ecografía endorrectal, la tomografía computarizada y la resonancia magnética (17,18). Otra alternativa diagnóstica es el test urinario del antígeno 3 específico de PCa (PCA3), que cuantifica el ARNm de PCA3 y PSA (19).

Si se evidencian niveles elevados de PSA y/o alteraciones en el DRE, el próximo paso en la clínica consiste en realizar una biopsia prostática seguida de una clasificación histológica basada en la puntuación de Gleason (GS, del inglés *Gleason Score*) (20). A nivel histopatológico, el PCa se clasifica mediante criterios morfológicos tisulares que determinan el GS. El sistema asigna patrones histológicos del 1 al 5 para luego determinar el GS, que se obtiene mediante la suma de los 2 patrones histológicos predominantes (**Figura 7**). En particular, un GS más alto se correlaciona con una menor diferenciación celular y un pronóstico más adverso de la enfermedad (21). Para la elección terapéutica, no sólo se consideran los criterios histopatológicos, sino que se integran también los aspectos clínicos individuales del paciente (22, 23, 24 y 25).

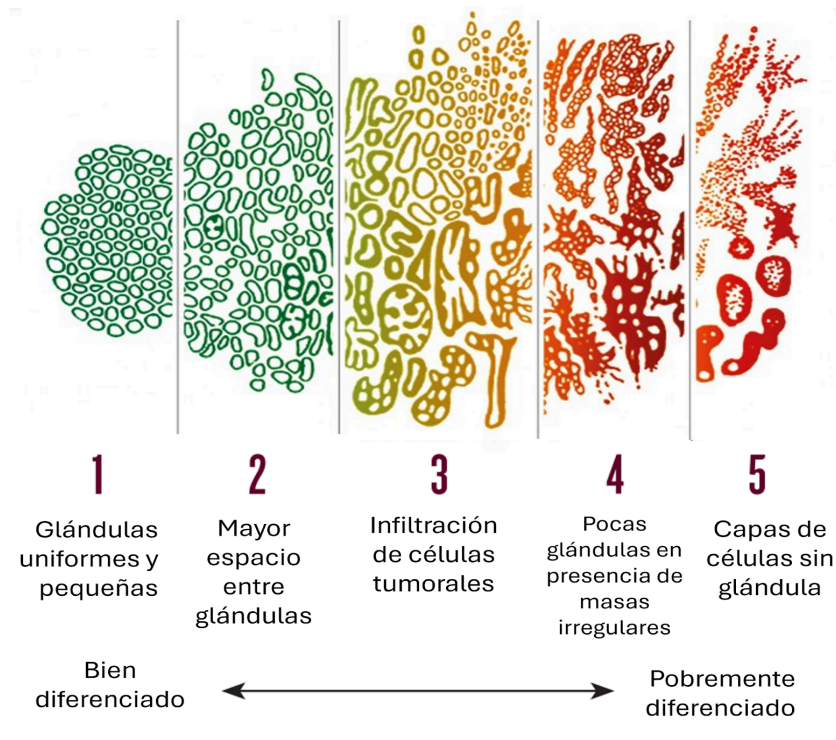


Figura 7. Diagrama esquemático de los patrones histológicos. Figura adaptada de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP, del inglés *International Society of Urological Pathology*) (22).

Para clasificar un tumor de PCa según el GS, se identifican inicialmente los dos patrones histológicos predominantes, asignándoles un puntaje individual a cada uno (del 1 al 5) (**Figura 7**); acto seguido, se suma estos valores para obtener el GS. La selección de dichos patrones mayoritarios se basa en la heterogeneidad característica de este tipo de tumores. El GS puede variar entre 2 y 10, pero sólo aquellos comprendidos entre 6 y 10 tienen relevancia clínica (26, 27 y 28).

En 2016, la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP, del inglés *International Society of Urological Pathology*), con el propósito de optimizar la estratificación de pacientes diagnosticados con PCa a partir del GS original, actualizó este sistema de clasificación, asociando los GS a una nueva escala denominada ISUP (**Tabla 1**) (22).

Tabla 1. Clasificación histológica del PCa según la ISUP (22)

<i>Gleason Score</i>	<i>Clasificación ISUP</i>	<i>Enfermedad</i>
≤ 6 <i>Glándulas bien formadas</i>	<i>Grado 1</i>	<i>No significativa</i>
$3 + 4 = 7$ <i>Predominantemente glándulas bien formadas y algunas pobremente formadas</i>	<i>Grado 2</i>	<i>Significativa</i>
$4 + 3 = 7$ <i>Predominantemente glándulas mal formadas y algunas bien formadas</i>	<i>Grado 3</i>	
$4 + 4 = 8$ <i>Solo glándulas mal formadas o ausencia parcial de glándulas</i>	<i>Grado 4</i>	
$9 \text{ y } 10$ <i>Glándulas ausentes o anormales</i>	<i>Grado 5</i>	

Además, la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) elaboró el sistema TNM, que integra tanto el grado de diseminación tumoral como parámetros bioquímicos e histopatológicos evaluados al momento del diagnóstico (**Tabla 2**) (23).

Tabla 2. Clasificación clínica del PCa según la AJCC (23).

<i>Componente</i>	<i>Descripción</i>
<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>

2.5. PROGRESIÓN Y TRATAMIENTO

El PCa se desarrolla de manera progresiva y relativamente lenta. Inicialmente, las células epiteliales lumbinales invaden el lumen prostático, dando origen al PIN considerado el estadio precursor del PCa. En una fase subsiguiente, las células malignas se extienden más allá de la glándula, afectando estructuras locales contiguas como las vesículas seminales. Su mantenimiento y crecimiento dependen de los andrógenos, por lo que el tratamiento predominante en esta etapa consiste en la castración química mediante terapia de privación androgénica (ADT, del inglés *Androgen Deprivation Therapy*), que inhibe la proliferación celular. La patología puede evolucionar hacia un estado de resistencia a la castración (CRPC, del inglés *Castration-Resistant Prostate Cancer*), en el cual se torna insensible a los andrógenos. En este punto, la arquitectura luminal glandular se desorganiza y las células ganan mayor potencial migratorio, lo que propicia la invasión de tejidos vecinos y, consecuentemente, la metástasis (**Figura 8**). El PCa metastatiza comúnmente a ganglios linfáticos, hígado y pulmones, aunque exhibe un marcado tropismo óseo (29).

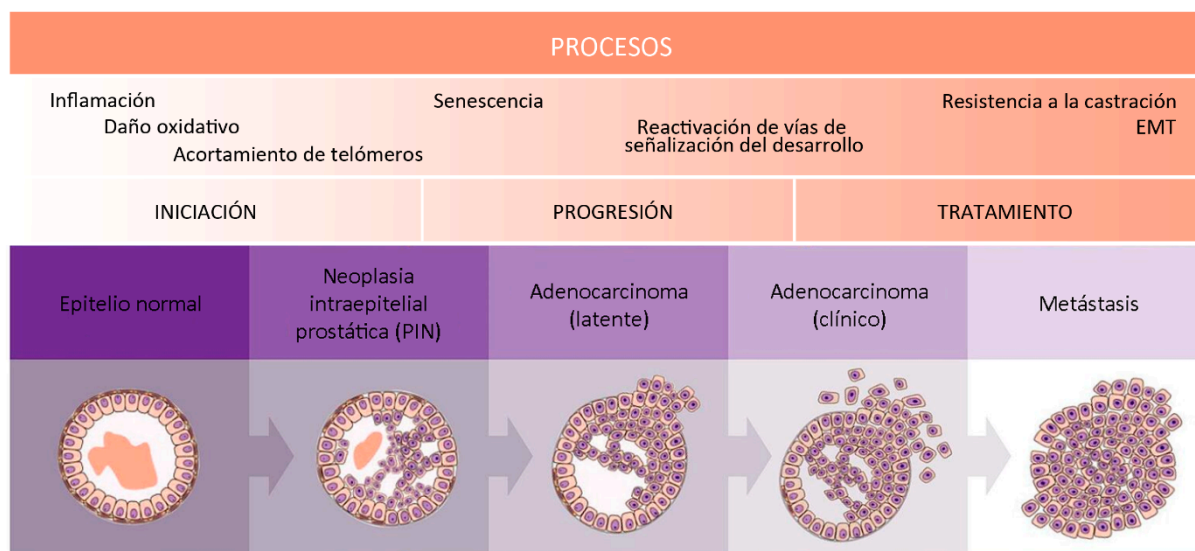


Figura 8. Esquema de progresión de los distintos estadios del PCa. Figura adaptada de (30).

En 2013, Logothetis y colaboradores plantearon un modelo alternativo en el que la progresión del PCa se representa como un proceso en espiral (31). Este esquema abarca tres fases principales. La inicial corresponde a la dependencia de la DHT, donde el tumor responde a intervenciones que inhiben la enzima 5 α -reductasa. Al perder sensibilidad a esta inhibición, el tumor inicia la fase de progresión en espiral, afectada por diversos elementos como modificaciones en la vía de señalización del AR, activación de oncogenes, supresión de genes antitumorales y alteraciones en el microambiente tumoral. Cada vuelta del espiral se define por uno o más biomarcadores predictivos, potenciales dianas terapéuticas. La magnitud de cada giro simboliza el lapso durante el cual el tumor permanece sensible a un tratamiento específico. Las adaptaciones que el tumor desarrolla como respuesta a la terapia confieren resistencia, propiciando el paso al giro subsiguiente y la acumulación de nuevas anomalías tanto en las células tumorales como en su microambiente (**Figura 9**).

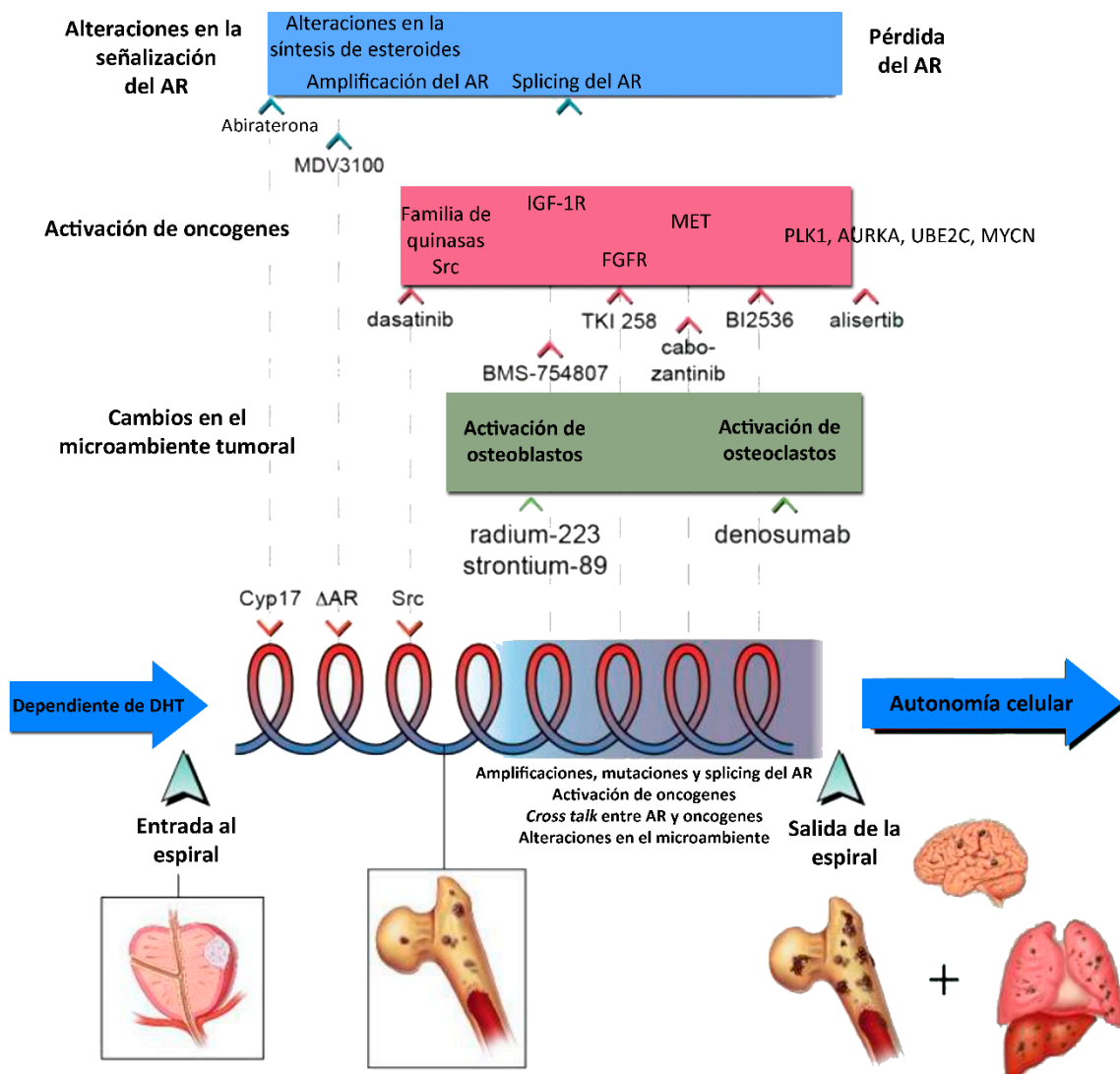


Figura 9. Modelo de progresión en espiral del PCa. Figura adaptada de Logothetis *et al.* (31). El modelo describe la progresión del cáncer de próstata (CaP) en tres fases: una inicial dependiente de DHT sensible a inhibidores de 5-alfa reductasa; una espiral de progresión impulsada por cambios en AR, oncogenes, supresores tumorales y en el microambiente, donde cada "giro" representa sensibilidad temporal a terapias específicas en donde marcadores predictivos guían las intervenciones más adecuadas; y una fase final autónoma del tumor, con mutaciones clave (pérdida de AR/RB/p53, sobre-expresión de *PLK1/AURKA*, amplificación de *MYCN*), requiriendo terapias dirigidas. La resistencia adaptativa impulsa la transición entre giros, enfatizando la importancia de marcadores para anticipar la progresión.

El espiral culmina cuando emergen mutaciones acumuladas en genes como *AR*, *RB* (que codifica la proteína del retinoblastoma), *TP53*, *PLK1* (que codifica la polo-like quinasa 1) y *AURKA* (que codifica la aurora quinasa A), junto con la amplificación de *N-MYC*. En esta fase

terminal, las células del PCa eluden el control del microambiente y adquieren autonomía completa. Este modelo en espiral subraya la complejidad dinámica de la progresión tumoral, donde las adaptaciones genómicas y microambientales no solo impulsan la resistencia terapéutica, sino que también fomentan la emergencia de subtipos histológicos heterogéneos con perfiles biológicos y clínicos divergentes. Estas transformaciones, particularmente aquellas que involucran la pérdida de control androgénico y la adquisición de autonomía celular, explican la variabilidad observada en la enfermedad, desde variantes indolentes hasta formas agresivas y resistentes (31).

2.6. CÁNCER DE PRÓSTATA NEUROENDÓCRINO (NEPC)

El PCa presenta diversos subtipos histológicos, como el carcinoma de células pequeñas, el carcinoma neuroendócrino, el carcinoma de células escamosas y el carcinoma ductal, cada uno con características biológicas y pronósticos distintos (31). La heterogeneidad de la enfermedad se refleja en su evolución clínica, que puede variar desde formas indolentes hasta tumores altamente agresivos, especialmente en etapas avanzadas donde es común la resistencia al tratamiento (**Figura 10**). La identificación precisa de estos subtipos es crucial para diseñar estrategias terapéuticas personalizadas ya que los enfoques estándar, como la terapia de deprivación androgénica, no son efectivos para todos los subtipos (32).

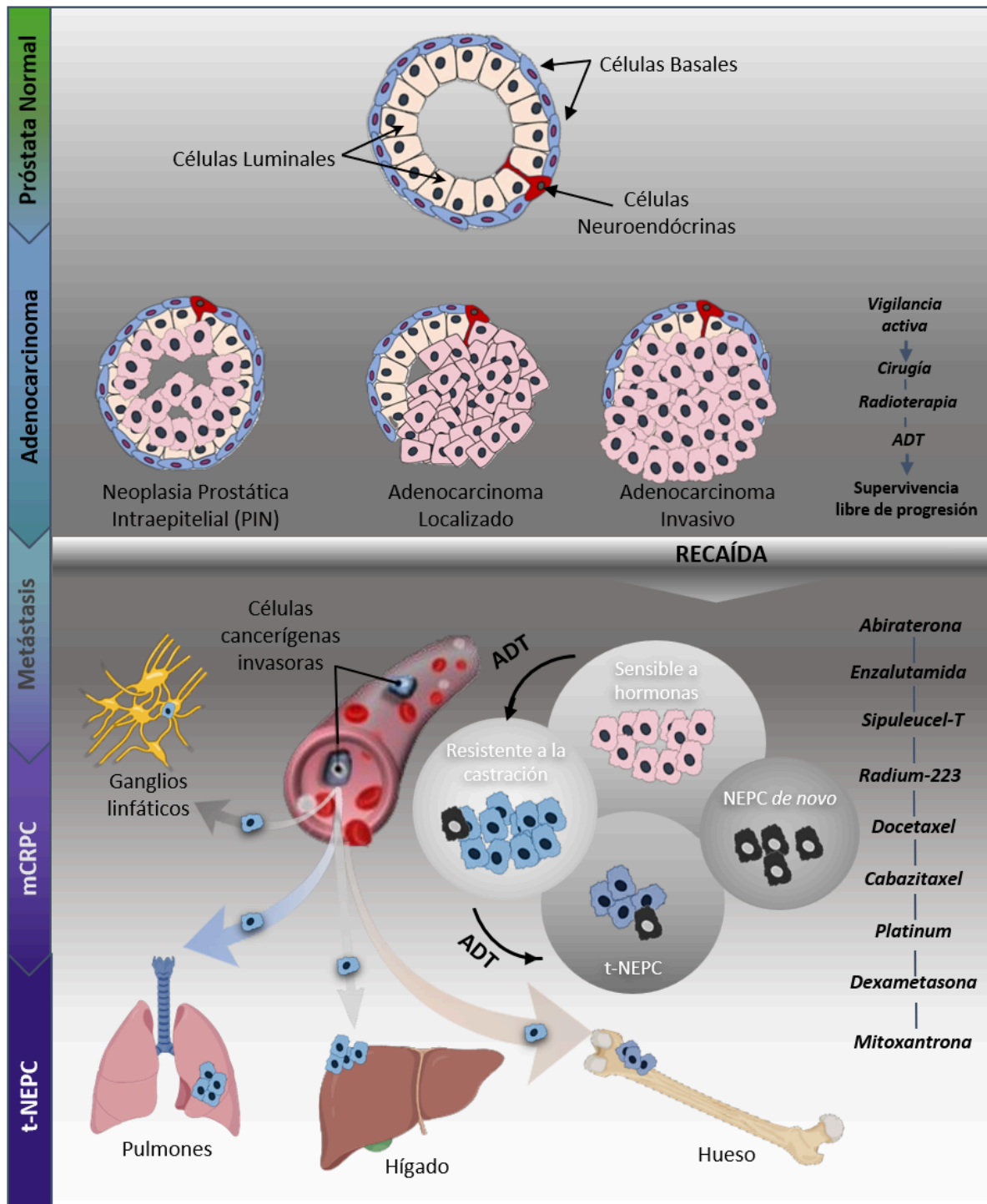


Figura 10. Esquema general de la progresión del PCa y las estrategias terapéuticas utilizadas en cada caso. Se describe el desarrollo del PCa desde células epiteliales normales (basales, lumbinales y neuroendócrinas), PIN, hasta el adenocarcinoma localizado e invasivo (panel superior). El esquema representa varios regímenes terapéuticos empleados en el tratamiento del PCa, incluyendo resección quirúrgica, radioterapia y ADT. Tras la respuesta inicial a la ADT, la mayoría de los pacientes recaen presentando resistencia a dicha, lo que lleva a un CRPC con o sin metástasis. Estos pacientes reciben

tratamiento adicional con ADTs de nueva generación, como enzalutamida o abiraterona. Durante el curso del tratamiento del CRPC, aproximadamente el 30% de los pacientes con PCa desarrollan una forma más agresiva y letal de la enfermedad denominada t-NEPC, que presenta respuestas terapéuticas muy limitadas (panel inferior). Modificado de Patel GK *et al.* (33).

El cáncer de próstata neuroendócrino (NEPC) es un subtipo particularmente agresivo, caracterizado por su independencia del AR y su mal pronóstico, con una supervivencia media de menos de un año (34). Este subtipo puede presentarse *de novo*, aunque es raro (0,5-1% de los casos), o surgir como una transformación inducida por el tratamiento (t-NEPC) en aproximadamente el 20% de los casos de CRPC, especialmente tras el uso prolongado de inhibidores potentes de la señalización androgénica, como enzalutamida o abiraterona (35). El NEPC se distingue por la pérdida de expresión del AR, bajos niveles de PSA en suero y la presencia de marcadores neuroendócrinos como cromogranina A (CHGA), sinaptofisina (SYP) y CD56 (36) (**Figura 11**). Son frecuentes las alteraciones genómicas como la pérdida *RB1* y *TP53*, genes supresores tumorales, y la amplificación de *AURKA* y *MYCN* que facilitan la transdiferenciación a este fenotipo (35). Estudios recientes han identificado dos subtipos moleculares de NEPC basados en la expresión de los factores de transcripción ASCL1 y NEUROD1, lo que sugiere una heterogeneidad intratumoral que complica el diagnóstico y el tratamiento (37). La detección temprana del NEPC, mediante la prueba de secuenciación de metilación del DNA (NEMO, del inglés *Neuroendocrine detection and Monitoring*) realizado a partir de ADN circulante en sangre (cfDNA, del inglés *cell-free DNA*), puede mejorar la selección de terapias dirigidas, como quimioterapia basada en platino o inhibidores de PARP (Olaparib), aunque la falta de tratamientos estándar sigue siendo un desafío (38,39).

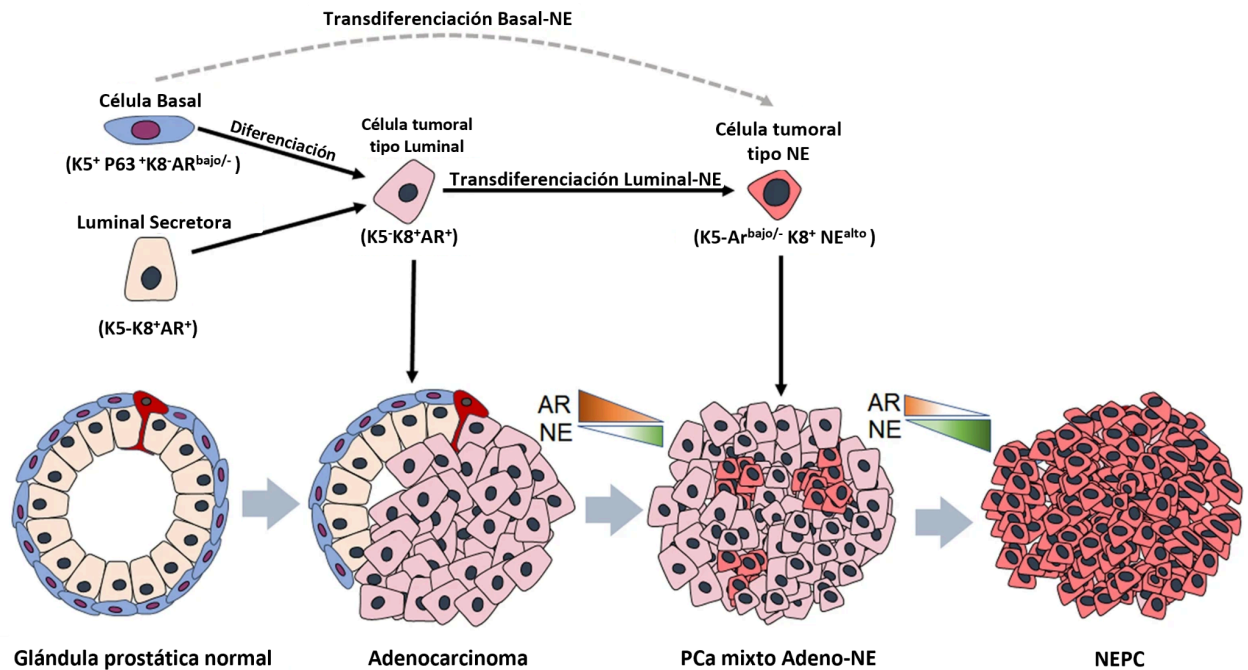


Figura 11. Ilustración esquemática de la evolución tumoral hacia el fenotipo neuroendócrino y del cambio en la expresión de los marcadores epiteliales y NE. En este modelo las flechas punteadas indican la posible relación entre linajes celulares y las flechas sólidas señalan que el NEPC se origina directamente de células tumorales dependientes de AR. Se asume que el precursor NE es una célula tumoral independiente de AR que se transdiferencia a una célula tumoral tipo luminal. Posteriormente, dicho precursor evolucionará para dar lugar al NEPC focal y, finalmente, progresar hacia el NEPC de células pequeñas (puro). El grado de los puntajes de firma AR y NE varía a lo largo del espectro de adenocarcinoma a transdiferenciación neuroendócrina (NE) (naranja indica un alto nivel de señal AR y verde indica un alto nivel de señal NE). Modificado de Dong B. *et al.* (40).

PARTE II

1. CÁNCER E INFLAMACIÓN

1.1. ROL DE LA INFLAMACIÓN EN CÁNCER

La inflamación es un sello distintivo o *hallmark* del cáncer (41). La proliferación celular por sí sola resulta insuficiente para forjar un tumor ya que también es necesario un microambiente con presencia de células inflamatorias, factores de crecimiento y agentes genotóxicos (42).

La relación entre la inflamación y el cáncer no es un hallazgo reciente. En 1863, Virchow detectó leucocitos en tejidos neoplásicos y postuló que el cáncer germina en focos de inflamación crónica (43). Décadas después, se ha reforzado la noción de que un microambiente inflamatorio acelera la progresión tumoral. Así, toda lesión neoplásica se asocia con la infiltración de células inflamatorias, donde se incluyen los leucocitos (macrófagos, mastocitos, neutrófilos, células dendríticas) y subpoblaciones de linfocitos T y B, que enriquecen el nicho tumoral con diversas moléculas como factores de crecimiento, promotores angiogénicos, citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, así como enzimas remodeladoras de la ECM, facilitando la angiogénesis, la invasión y la metástasis (44,45).

Asimismo, las células inflamatorias secretan especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), que generan daños en el ADN de las células epiteliales adyacentes, promoviendo la transición hacia fenotipos más agresivos. Niveles elevados de ROS intracelulares perturban múltiples vías de señalización, modulando la activación o inhibición de mecanismos vinculados a la proliferación, la motilidad y la supervivencia celular (46,47).

Aunque la etiología de la inflamación prostática permanece en gran medida enigmática, se infiere que infecciones virales o bacterianas, traumatismos por reflujo urinario, factores dietéticos, cambios hormonales o una sinergia de estos elementos podrían instaurar un microambiente inflamatorio (3) (**Figura 12**).

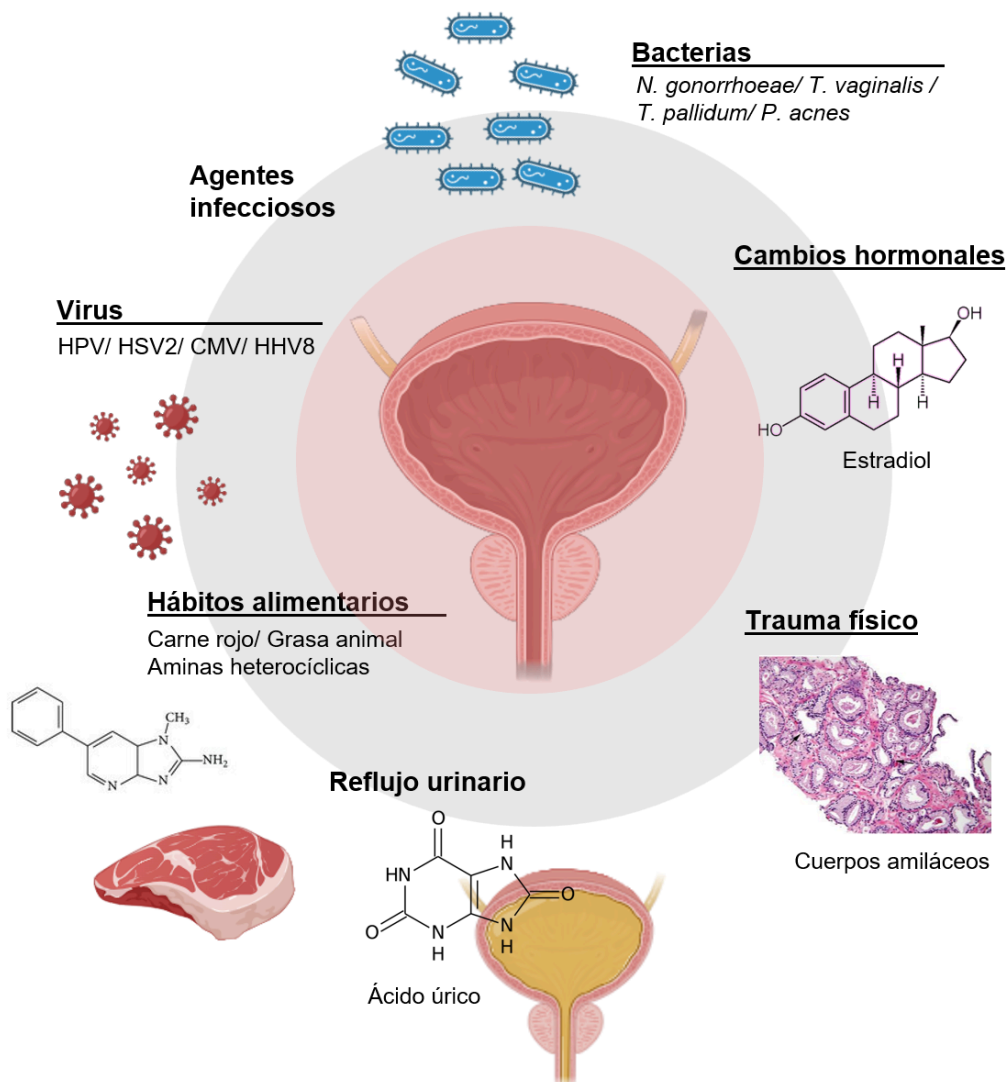


Figura 12. Factores que podrían contribuir al establecimiento de un microambiente inflamatorio en la glándula prostática. Figura adaptada de De Marzo *et al.* (3).

2. HEMO-OXIGENASA 1 (HO-1)

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La enzima hemo-oxigenasa 1 (HO-1) es una proteína de 32 kDa codificada por el gen *HMOX1* y descrita por primera vez en el año 1969 por Raimo Tenhunen, quien pudo identificarla como una enzima microsomal inducible, responsable de la degradación del grupo hemo para

formar biliverdina (BV) (compuesto rápidamente reducido a bilirrubina (BR) por la enzima biliverdina reductasa (BVR)), hierro (Fe^{+2}) y monóxido de carbono (CO) (48) (**Figura 13**). HO-1 también puede ser inducida farmacológicamente mediante el tratamiento con hemina, una droga análoga al grupo hemo, ya aprobada para el tratamiento de porfirias (49). El grupo hemo es una protoporfirina que forma el grupo prostético de las hemoproteínas. En condiciones de estrés oxidativo, ciertas hemoproteínas pierden sus grupos prostéticos (50,51) y el hemo que queda libre puede producir el daño de biomoléculas y, en consecuencia, comprometer la integridad celular y/o gatillar mecanismos de muerte celular programada inducida por agentes pro-inflamatorios (52).

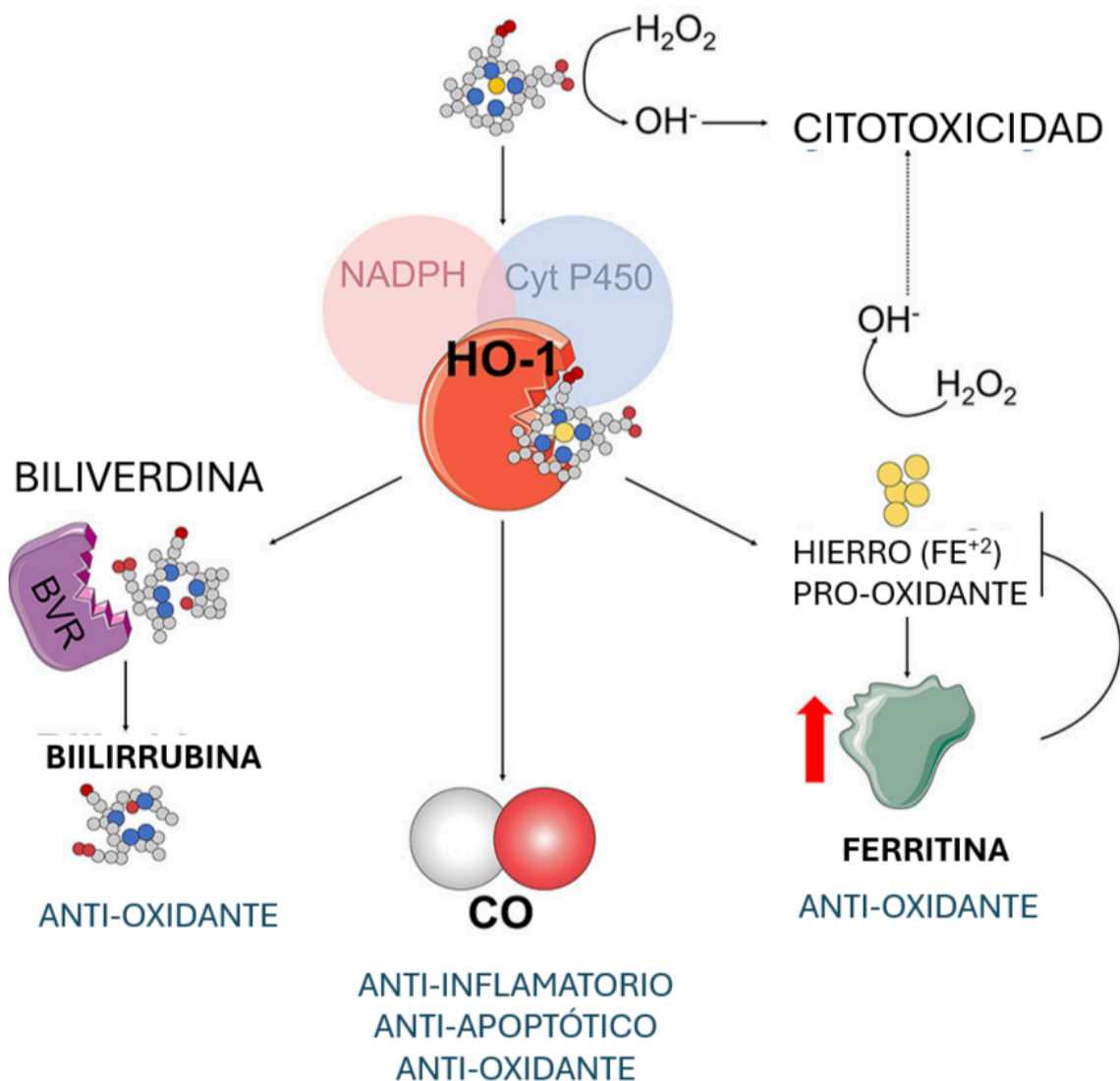


Figura 13. Hemo-Oxigenasa 1. La actividad enzimática de HO-1 degrada al grupo hemo rindiendo biliverdina (transformada a bilirrubina por la BVR), hierro y monóxido de carbono. Modificado de Di

Pietro *et al.* (53).

La expresión basal de HO-1 es baja en todos los tejidos, excepto en bazo e hígado. Sin embargo, HO-1 se encuentra sobre-expresada en células expuestas a agentes inductores de estrés celular como metales pesados, endotoxinas, citoquinas inflamatorias, hipoxia, óxido nítrico, radiación UV y ROS (54). Las funciones centrales de HO-1 son mediadas por los subproductos generados a partir de la degradación del hemo como BR, BV y CO, que exhiben efectos antiinflamatorios, anti-apoptóticos, antioxidantes e inmunomoduladores, mientras que el Fe^{+2} participa en acciones antioxidantes y ferroptosis relacionada con oxidación lipídica (55). Estos metabolitos modulan vías clave como MAPK, PI3K/Akt, STAT3 y VEGF (56).

Estos hallazgos indican que HO-1 no solo está involucrada en procesos fisiológicos normales y en el mantenimiento de la homeostasis celular, sino que también cumple un rol importante en estados fisiopatológicos. Por dicha razón, resulta de sumo interés el estudio de sus funciones citoprotectoras y de su potencial terapéutico para el tratamiento de diversas patologías asociadas a la inflamación y al estrés oxidativo.

En cuanto a su localización subcelular, HO-1 es una proteína integral de membrana del retículo endoplásmico liso (REL), donde está anclada mediante una única región transmembrana en su extremo C-terminal (57). Dicho extremo es susceptible al clivaje proteolítico, liberando a HO-1 de la membrana del REL y permitiendo su relocalización (58, 59, 60 y 61). Además, se ha detectado a HO-1 en la membrana plasmática (62), en la región perinuclear (63) y en las mitocondrias (64). En 2007, se reportó por primera vez que HO-1 transloca al núcleo ante estímulos como la hipoxia o la inducción con hemina, y que dicha translocación está acompañada por una pérdida de su actividad enzimática (65). Estudios de nuestro grupo de investigación demostraron por primera vez la presencia nuclear de HO-1 en carcinomas prostáticos primarios no tratados, sugiriendo un rol no canónico más allá de su función enzimática clásica (66,67).

2.2. HO-1 EN LA BIOLOGÍA TUMORAL

Existe un amplio consenso sobre la importancia de HO-1 en las enfermedades neoplásicas, ya que se ha documentado que su expresión está elevada en tejidos tumorales en

comparación con los tejidos sanos adyacentes (68, 69, 70 y 71). Esta proteína se detecta en una gran variedad de tumores humanos, tales como linfomas (72), PCa (66,73,74), tumores cerebrales (75), adenocarcinoma de células renales (76), hepatomas (69,77), carcinoma oral de células escamosas (68,78), gliomas (79,80), melanomas (81), cáncer de páncreas (82), cáncer de pulmón (83) y leucemia mieloide crónica (84). No obstante, los hallazgos sobre sus funciones en la progresión tumoral continúan siendo ambiguos. Por un lado, hay evidencia de un rol protumoral de HO-1 en diferentes neoplasias, por ejemplo en astrocitomas, carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello y gliomas (85); sin embargo, se ha sugerido que presenta un rol antitumoral en cáncer de mama (86), cáncer de pulmón de células no pequeñas (83) y cáncer colorrectal (87). Así, el carácter protumoral o antitumoral de HO-1 parece depender del tipo de tumor y del estado genético de las células neoplásicas.

Los estudios realizados en PCa por nuestro grupo de investigación demostraron un rol antitumoral de HO-1 en este tipo de tumores (67,88). Nuestro laboratorio fue pionero en documentar la localización nuclear de HO-1 en muestras de pacientes con PCa naïve de tratamiento, abarcando diferentes GS (66). Asimismo, se demostró que la sobreexpresión de *HMOX1* en líneas celulares de PCa sensibles e insensibles a andrógenos se asocia con un menor índice de proliferación, migración e invasión *in vitro*, y que estos efectos no dependen de su actividad enzimática (67). Además, se evidenció que los tumores generados en ratones atímicos *nude* a partir de células de PCa con sobreexpresión estable de *HMOX1* exhiben un crecimiento más lento en comparación con los controles (67). Por otra parte, se observó que niveles elevados de *HMOX1* correlacionan con una menor expresión de *VEGFA* (gen que codifica el factor de crecimiento vascular endotelial A), *VEGFC* (gen que codifica el factor de crecimiento vascular endotelial C), *HIF1 α* (gen que codifica la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia 1) e *ITGA5* (gen que codifica la integrina $\alpha 5\beta 1$), lo que se alinea con una reducción de la vascularización en dichos tumores (88). Nuestro grupo también describió la interacción física entre HO-1 y STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3), que genera la retención de STAT3 en el citoplasma, impidiendo así la transcripción de genes diana como el *AR* (89). Adicionalmente, se aportó evidencia de un mecanismo novedoso para la regulación transcripcional de *HMOX1* en PCa, mediado por BRCA1 (proteína 1 de cáncer de mama), que en cooperación con NRF2 (factor nuclear eritroide 2

relacionado con factor 2) se une a su promotor e induce su expresión en líneas celulares de PCa, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis celular (66). Asimismo, se demostró que HO-1 modula la expresión y la localización subcelular de E-cadherina y β -catenina, influyendo en la morfología y en las propiedades adhesivas de las células tumorales prostáticas (90). Por otro lado, se observó que la inducción de HO-1 se asocia con la modulación de la expresión de genes clave del citoesqueleto, promoviendo la remodelación de filamentos de actina en filopodios e incrementando la adhesión celular y, en consecuencia, disminuyendo el potencial migratorio e invasivo de las células (91). Por último, en trabajos previos de nuestro grupo se demostró que el pre-tratamiento con hemina retrasa el crecimiento de los tumores en un modelo *in vivo* de ratones xeno-transplantados subcutáneamente con células murinas de PCa (92).

En cuanto a las metástasis óseas, se comprobó que la modulación de HO-1, tanto en células tumorales prostáticas como en células óseas altera la comunicación entre células óseas y tumorales y modifica el nicho tumoral óseo (93).

Estos hallazgos confirman que las funciones de HO-1 trascienden su rol como enzima inducible y limitante en la degradación del hemo, posicionándose como un actor clave en la carcinogénesis y la progresión tumoral.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La inflamación es uno de los factores clave involucrados en la carcinogénesis prostática. En este escenario, HO-1 se perfila como un blanco terapéutico prometedor en el PCa, al preservar la homeostasis celular y contrarrestar el estrés oxidativo y la inflamación. Se ha demostrado que HO-1 se localiza en el núcleo en tumores prostáticos y, considerando que no posee dominios de unión al ADN, nuestra hipótesis es que **ejerce una función no canónica participando en la regulación de la actividad de factores de transcripción y modificando el microambiente tumoral generando un fenotipo menos agresivo.**

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto es identificar a los factores de transcripción asociados a HO-1 que podrían ser responsables de impedir los procesos biológicos que promueven la progresión tumoral de las células prostáticas. Estos factores pueden ser potenciales biomarcadores y ser seleccionados para definir un subtipo de pacientes con PCa que requieran una terapia alternativa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Delinear el interactoma nuclear de HO-1 mediante un abordaje proteómico en células de PCa.
2. Validar las interacciones detectadas entre HO-1 y factores/co-reguladores de transcripción.
3. Estudiar en PCa las implicancias biológicas de los interactores detectados.
4. Evaluar la relevancia clínica de los interactores nucleares de HO-1 en distintos subtipos de PCa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO CELULAR

1.1. LÍNEAS CELULARES

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

C4-2B: línea celular derivada de la línea celular C4-2, a su vez derivadas de la línea celular LNCaP, aislada de la próstata de un paciente masculino blanco con PCa. Presenta sensibilidad a andrógenos (94). Las células C4-2B se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen, EE.UU.) suplementado con bicarbonato de sodio 0,2% m/V, suero fetal bovino 10% (SFB; Gibco, Argentina) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml) en una atmósfera húmeda con CO₂ 5% a 37°C.

PC3: línea celular establecida de una metástasis ósea que proviene de un adenocarcinoma de próstata humano (94). Presenta insensibilidad a andrógenos. Las células PC3 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen, EE.UU.) suplementado con bicarbonato de sodio 0,2% m/V, SFB 10% (Internegocios, Argentina) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina 0,5 µg/ml) en una atmósfera húmeda con CO₂ 5% a 37°C.

1.2. INDUCCIÓN FARMACOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE HO-1

Las células fueron tratadas con hemina (Sigma-Aldrich, EE.UU.) una droga análoga al grupo hemo que induce la expresión y actividad de HO-1 (49). La solución stock se preparó disolviendo 36 mg de cloruro de hemina en 0,4 ml de NaOH 0,5 N, 0,5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 8. La solución se filtró utilizando filtros de 0,2 µm, se alicuotó y se conservó a -20°C hasta su uso. Al momento de tratar los cultivos celulares con la droga, se efectuó una dilución 1:100 en PBS estéril, de la cual, a su vez, se partió para obtener la concentración final deseada para cada experimento, preparada en RPMI, 10% v/v SFB con antibióticos. Se utilizó una concentración final de hemina 80 µM y el tratamiento tuvo una duración de 24 h.

2. ANÁLISIS DE PROTEÓMICA, DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS Y EXPRESIÓN PROTEICA

2.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Se plaquearon 1×10^6 células PC3 en placas de 100 mm de diámetro y se trataron con hemina (80 μ M, 24 h). Se utilizaron 2 placas por condición. Luego del tratamiento, el medio de cultivo fue removido de todas las placas y se realizaron dos lavados con PBS frío conteniendo inhibidores de proteasas: fluoruro de sodio (NaF), fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), ortovanadato de sodio (NaVO_4) y una mezcla de inhibidores de proteasas comercial (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Las células se rastrillaron y cosecharon de las placas con 1 ml de dicha solución y luego fueron centrifugadas a 2.500 rpm durante 1 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en la solución de lisis RIPA (NaCl 150 μ M, EDTA 20 μ M, deoxicolato de sodio 1% v/v, dodecilsulfato sódico (SDS) 0,1% v/v, Triton x-100 1%, Tris pH 7,4) y se incubó en hielo durante 20 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm a 4°C durante 20 min. El sobrenadante conteniendo las proteínas totales se conservó a -80°C.

2.2. EXTRACCIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS

Se plaquearon 1×10^6 células PC3 en placas de 100 mm de diámetro y se trataron con hemina (80 μ M, 24 h). Se utilizaron 4 placas por condición. Luego del tratamiento, el medio de cultivo fue removido de todas las placas y se realizaron dos lavados con PBS frío conteniendo inhibidores de proteasas: NaF, PMSF, NaVO_4 y una mezcla de inhibidores de fosfatasas comercial (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Las células se rastrillaron y cosecharon de las placas con 1 ml de dicha solución y luego fueron centrifugadas a 2.500 rpm durante 1 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 200 μ l de Buffer A por cada placa de 100 mm. La suspensión se incubó en hielo durante 15 min, seguido de la adición de 12,5 μ l de NP-40 al 10% por placa y se vortexeó durante 10 s. Posteriormente, se centrifugó a 12.500 rpm durante 1 min a 4°C y el sobrenadante, correspondiente a la fracción citoplasmática, se transfirió a un nuevo tubo. El pellet, correspondiente a la fracción nuclear, se resuspendió en 130 μ l de Buffer B por cada placa de 100 mm, se sonicó dos veces durante 10 s al 10% de potencia y se centrifugó a 12.500 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante, correspondiente a la fracción nuclear, se transfirió a un nuevo tubo. Ambas fracciones se conservaron a -80°C hasta su uso.

2.3. CUANTIFICACIÓN

Se determinó la concentración proteica usando el método del ácido bicinconínico (BCA, BCA 98% y CuSO₄ 2%; Sigma-Aldrich, EE.UU.). La curva estándar se realizó utilizando cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) disuelta en buffer de lisis RIPA. En una placa de 96 pocillos se sembraron 10 µl de las diluciones de cada concentración para realizar la curva de BSA y 10 µl de las correspondientes diluciones de muestra (1/10). Se agregaron 200 µl de BCA y se incubó en oscuridad 30 min a 37°C. Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (*Biorad Microplate Reader*, Benchmark, EE.UU.).

2.4. CO-INMUNOPRECITACIÓN (CO-IP) CON BEADS DE AGAROSA

Para realizar el ensayo de inmunoprecipitación se partió de 500 µg de proteínas de los lisados celulares diluidos en buffer RIPA (150 µM NaCl, 20 µM EDTA 1% v/v deoxicolato de sodio, 0,1% v/v dodecilsulfato sódico (SDS), 1% Triton x-100, Tris, pH 7,4) conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa y se incubaron con 10 µg del anticuerpo específico contra HO-1 (**ver sección 2.9**) durante toda la noche a 4°C con agitación orbital. Para el control de especificidad, en vez de anticuerpo específico contra HO-1, se utilizaron 10 µg de un anticuerpo IgG no específico. Al día siguiente, se agregaron 20 µl de beads de agarosa (*Protein A/G PLUS-Agarose beads*, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a cada tubo de inmunoprecipitación y se incubaron durante toda la noche a 4 °C con agitación orbital. Al día siguiente, se realizaron tres lavados con 500 µl de buffer RIPA, se centrifugó a 2.500 rpm durante 1 min a 4 °C. Los complejos proteicos junto con las beads fueron resuspendidos en 40 µl finales de RIPA y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON IONIZACIÓN ELECTRO-SPRAY Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (LC ESI-MS/MS)

Los péptidos se analizaron mediante nano LC ESI-MS/MS en un espectrómetro de masas QExactive acoplado a un nano HPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific). Para el análisis de LC ESI-MS/MS, se cargó aproximadamente 1 µg de péptidos en la columna y se eluyó durante 120 min usando una columna de fase inversa adecuada (C18, 2 µm, 100Å, 50 µm x 150 mm,

Easy-Spray Column PepMap RSLC (P/N ES801)) para separar complejos de proteínas con un alto grado de resolución. La velocidad de flujo utilizada para la nano columna fue de 300 nL min⁻¹ y el rango de gradiente de solvente fue de 7% A (ácido fórmico al 0,1% en agua) durante 5 min a 35% B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo) en 120 min. El volumen de inyección fue de 2 µL. El equipo de MS tiene una celda de disociación de alta colisión (HCD) para fragmentación y un analizador Orbitrap (Q-Exactive-Thermo Scientific Alemania). Se usó un voltaje de 3,5 kV para la ionización por electro-spray (Thermo Scientific, EASY-SPRAY). Se usó el software XCalibur 3.0.63 (Thermo Scientific) para la adquisición de datos con una configuración que permite la identificación de péptidos al mismo tiempo de su separación cromatográfica. Se utilizó un método dependiente de los datos: los espectros de masas de exploración completa se adquirieron en el analizador Orbitrap. El rango de masa escaneada fue de 400-1800 m/z a una resolución de 70000 a 400 m/z y los doce iones más intensos en cada ciclo fueron aislados secuencialmente, fragmentados por HCD y medidos en el analizador Orbitrap. Los péptidos con una carga de +1 o con un estado de carga no asignado se excluyeron de la fragmentación para MS2.

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

2.6. ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

Las interacciones entre HO-1 y proteínas nucleares se analizaron usando la herramienta STRING (<https://string-db.org/>; último acceso: 20 de Mayo 2023) y el software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, QIAGEN Inc., EE.UU.) (95) para estudiar, en este caso, las interacciones entre las proteínas de interés y otras moléculas. El IPA es una aplicación bioinformática que

permite cargar resultados de análisis de datos de experimentos de alto rendimiento, como microarrays y RNA-seq, para realizar análisis funcionales y lograr una mayor integración de los datos.

2.7. ANÁLISIS DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y SUS GENES TARGET UTILIZANDO ChIP-Atlas

Para determinar los genes target de las proteínas con función potencial de factor de transcripción, se utilizó la función genes target en el software *ChIP-Atlas* (https://chip-atlas.org/target_genes), que integra datos públicos de ChIP-seq para predecir sitios de unión en genes target basados en sitios de unión enriquecidos. Se realizó esta búsqueda para los 11 interactores nucleares de HO-1, y se determinaron parámetros como la especie y la distancia de pegado al sitio de inicio de la transcripción. Se seleccionó 5 Kb como distancia máxima desde el sitio de inicio de transcripción (típicamente 1-10 Kb). La herramienta procesa miles de *datasets* de ChIP-seq, identificando genes con picos de unión cercanos al promotor, y genera una lista de genes target ordenados de acuerdo a un puntaje de pegado o *binding score* para cada gen. Dicho binding score cuantifica la fuerza de unión del factor de transcripción basada en la intensidad y posición de los picos de ChIP-seq.

2.8. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE SET DE GENES (GSEA)

Los interactores de HO-1 y sus genes target, identificados a través de ChIP-Atlas se sometieron a un análisis de enriquecimiento de sets de genes (GSEA) (Broad Institute, EE.UU.), usando los paquetes de R clusterProfiler (96) y enrichplot (97). Se utilizó la colección de vías KEGG (98) para explorar vías enriquecidas. Se consideraron significativas aquellas vías con un $p < 0,05$. Para graficar los resultados obtenidos se utilizó el paquete *enrichplot* de R (99).

2.9. VALIDACIÓN DE LOS INTERACTORES NUCLEARES DETECTADOS POR LC ESI-MS/MS A TRAVÉS DE CO-IP CON BEADS MAGNÉTICAS

Para validar los resultados obtenidos por MS/MS se realizó una co-inmunoprecipitación utilizando 500 µg de proteínas de los lisados de células PC3. Inicialmente, 50 µl de

Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 10007D; concentración 30 mg/ml en PBS pH 7.4 con Tween-20 0.01% y azida sódica 0.09%) se resuspendieron por vortex (>30 s), se transfirieron a tubos, se lavaron en el magneto DynaMag™ y se descartó el sobrenadante. Para formar los complejos *Beads*-anticuerpos se incubaron 10 µg de anticuerpos con las *beads* magnéticas en 200 µl de *Ab Binding & Washing Buffer*, en agitación orbital durante 10 min a temperatura ambiente. Para el control de especificidad, en vez de anticuerpo específico contra SAFB o BCLAF1, se utilizaron 10 µg de un anticuerpo IgG no específico. Estos complejos fueron incubados en agitación orbital con los lisados proteicos durante 20 min a temperatura ambiente para capturar el antígeno. Posteriormente, se añadieron las *beads* al lisado con anticuerpo y se incubaron 10 min a temperatura ambiente con rotación orbital. Luego se magnetizaron los tubos para remover el sobrenadante (fracción no ligada) y se lavaron las *beads* tres veces con 200 µl de *Washing Buffer* (incubación 5 min con agitación orbital 3 veces, se magnetizaron los tubos y se descartó el sobrenadante a 4°C). Finalmente, los complejos proteicos se eluyeron los complejos utilizando 20-50 µl *Elution Buffer* y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, luego se magnetizaron los tubos y se recolectó el sobrenadante neutralizado con Tris-HCl pH 8.0. Los inmunocomplejos se analizaron mediante Western blot.

2.10. WESTERN BLOT

Las muestras fueron preparadas como se describió en la Sección 2.1. y se sembraron 30 µl de cada una por pocillo. Se utilizó un marcador de peso molecular (*Blue Plus IV Protein Marker*, Transgen, China), sembrado en un pocillo adicional del mismo gel para verificar los pesos moleculares de las bandas obtenidas. Tanto la preparación de los geles como las electroforesis se realizaron en el sistema vertical de Bio-Rad. Las muestras se resolvieron en un gel 10% poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes a 80 V, durante 1 h, seguido de 1 h a 100 V en presencia de buffer de electroforesis (Tris 25 mM ; Glicina 192 mM; SDS 0,1%). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Reino Unido) en buffer de transferencia (Towbin) (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 3,5 mM, pH 8,3; Metanol 20% (v/v)). La transferencia fue realizada a 250 mA, durante 90 min.

Para evitar la inmunodetección inespecífica de proteínas, las membranas fueron bloqueadas durante 60 min en 5% m/v leche descremada preparada en TBS-T (150 mM NaCl; 2,68 mM KCl 2,68; 24,7 mM Tris; 0,05% v/v Tween-20; pH 7,4). Las membranas luego fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C en agitación suave. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas sucesivas veces con TBS-T e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente y su dilución correspondiente según los datos del fabricante. Las membranas fueron nuevamente lavadas con TBS-T y la visualización de proteínas fue realizada por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial para detección por quimioluminiscencia ECL (Easy-see western blot kit, TransGen Biotech, China). La visualización de las bandas en la membrana se realizó con el equipo G-Box (Syngene, India) o Amersham Imager 600 RGB (GE, Healthcare Life Sciences, Reino Unido).

2.11. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios utilizados incluyen: anti- β -actina (Proteintech, EE.UU., Cat. #22952, hecho en conejo; dilución 1/1000), anti-GAPDH (Cell Signaling, EE.UU., Cat. #3873, hecho en ratón; dilución 1/1000), anti-CHGA (Abcam, EE.UU., Cat. #32127, hecho en conejo; dilución 1/1000), anti-SYP (Abcam, EE.UU., Cat. #32127, hecho en conejo; dilución 1/1000) y anti-HO-1 (Abcam, EE.UU., Cat. #13248, hecho en ratón; dilución 1/1000).

Los anticuerpos secundarios utilizados incluyen: anti-IgG de conejo (Cell Signaling, EE.UU., Cat. #7074S; dilución 1/5000) o anti-ratón (Cell Signaling, EE.UU., Cat. #7076S; dilución 1/5000) acoplados a la enzima peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *Horseradish peroxidase*).

3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

3.1. PURIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

Para la purificación de ARN total se utilizó el reactivo Quick-Zol (Kalium technologies, Argentina). Al momento de cosechar las células de cada experimento, se descartó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS. Luego, se recolectaron las células utilizando

una espátula y 500 µl de Quick-Zol (Kalium technologies, Argentina); la suspensión celular se homogeneizó completamente por pipeteo y se incubó a RT durante 5 min. Seguidamente se añadieron 100 µl de cloroformo, se mezcló enérgicamente con vortex durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Para acelerar la separación de fases se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 15 min. La fase acuosa superior, que contiene el ARN, se transfirió a un nuevo tubo. El ARN se precipitó con 250 µl de isopropanol por cada 500 µl de Quick-Zol (Kalium technologies, Argentina) incubando a -20°C durante 40 min. Se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75%. Se centrifugó a 7.500 rpm a 4°C durante 5 min y se removió el sobrenadante. Para eliminar las trazas remanentes de etanol, el pellet se secó a 50°C durante 3 min, se resuspendió en 10-30 µl de H₂O libre de ARNasas y se rehidrató incubando 10 min a 55-60°C. El ARN total extraído se conservó a -80°C hasta su uso.

3.2. CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

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.

3.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

El ADN copia (ADNc) se sintetizó a partir del ARN total mediante una transcripción reversa o retrotranscripción (RT) utilizando el kit RevertAid RT (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se incubaron 1-2 µg de ARN total con Oligo dT y agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 12 µl. Se desnaturalizaron las muestras a 65°C durante 5 min. Luego se agregó la mezcla de reacción obteniendo así una solución final con buffer de reacción 1X, dNTPs 0,5 mM, inhibidores de ARNasas 1 U/µl y transcriptasa reversa 10 U/µl. Se incubó durante 60 min a 42°C. La reacción se inactivó a 70°C durante 5 min. Como control se realizó el mismo protocolo, pero sin el agregado de la enzima transcriptasa reversa. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su uso.

3.4. PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)

El ADNc se amplificó por RT-qPCR utilizando el kit FastStart Universal Probe Master (Roche, EE.UU.). Se amplificaron 1,8 µl de una dilución 1:30 del ADNc en una mezcla de reacción conteniendo los primers específicos para cada gen de interés (0,2 µM, Integrated DNA Technologies Inc., EE.UU.; **Tabla 3**) en un volumen de reacción de 15 µl. Se relativizó la expresión del gen de interés a un gen de referencia utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (100). Se emplearon como genes de referencia ciclofilina A (*PPIA*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). 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.

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	

Tabla 4. Lista de *primers* utilizados. Fw: *primer forward*. Rv: *primer reverse*. T°: temperatura

Gen	Secuencia FW (5'-3')	Secuencia RV (5'-3')	T° de <i>annealing</i> (°C)	Especie
-----	----------------------	----------------------	-----------------------------	---------

ASCL1	<i>CGGTCTCATCCTACTCGTCG</i>	<i>GTTGTGCGATCACCTGCTT</i>	59	Humano
KLK3	<i>TGAACCAGAGGAGTTCTTGAC</i>	<i>CCCAGAATCACCCGAGCAG</i>	56	Humano
BCL-2	<i>CCTGTGGATGACTGAGTA</i>	<i>GAGACAGCCAGGAGAAATCA</i>	60	Humano
TP53	<i>TCCCCTGCCCTCAACAAGATG</i>	<i>GAGAGGAGCTGGTGTGTTGG</i>	55	Humano
NSE	<i>TGCACAGGCCAGATCAAGAC</i>	<i>CCAGGCAAGCAGAGGAATCA</i>	59	Humano
NCAM1	<i>AGTCCAAGGGGAACCCAGT</i>	<i>CTCAGCATTCAGTCCAGGG</i>	60	Humano
EZH2	<i>CGAAGCTACTCCGAGTTCCC</i>	<i>GCACTCAGACAAAGGACGGA</i>	59	Humano
HMOX1	<i>ACTGCGTTCCTGCTCAACAT</i>	<i>GGGGCAGAATCTTGCACTTT</i>	60	Humano
GAPDH	<i>CAGTCAGCCGCATCTTCTTTTG</i>	<i>ACCAGAGTTAAAAGCAGCCCT</i>	60	Humano
PPIA	<i>GGTATAAAAGGGGCGGGAGG</i>	<i>CTGCAAACAGCTCAAAGGAGAC</i>	60	Humano

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 $p < 0,05$.

4. MODELO DE XENOTRANSPLANTES DERIVADOS DE PACIENTES (PDXs)

4.1. ANIMALES

Todas las prácticas que involucran animales de laboratorio fueron aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del *MD Anderson Cancer Center* de la

Universidad de Texas (Houston, EE.UU.), bajo la regulación del Comité de Bienestar Animal (IACUC, Protocolo #: 00001091-RN03, título: *The Relationship Between Prostate Cancer & the Bone Environment*) y se ajustan a la Política de los *National Institutes of Health* (NIH) sobre Cuidado Humano y Uso de Animales de Laboratorio.

4.2. DESARROLLO DE PDXs

Los xenotrasplantes derivados de pacientes (PDXs) se desarrollaron en el Laboratorio de la Dra. Nora Navone bajo el "Programa de xenotrasplantes derivados de pacientes con PCa" en el *MD Anderson Cancer Center* y el *David H. Koch Center for Applied Research of Genitourinary Cancers* (Houston, TX, EE.UU.) (101).

Brevemente, los PDX generados en el *MD Anderson Cancer Center* (PDX MDA PCa) se establecieron a partir de muestras tumorales obtenidas de pacientes con PCa sometidos a prostatectomía radical, cistoprostatectomía/exenteración pélvica o resección/análisis de biopsia de lesiones metastásicas. Los tejidos se evaluaron y macro-disectaron por un patólogo para su implantación en ratones macho intactos CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrl (RRID: IMSR_CRL:236; *Charles River Laboratories*). Los injertos suplementados con Matrigel se implantaron subcutáneamente en el flanco de los ratones. Los animales fueron monitoreados para seguir el crecimiento inicial hasta 18 meses después de la implantación. Los tumores que crecieron se pasaron en serie, hasta 5 veces, sin Matrigel. Una línea se considera establecida después de cinco pasajes. En cada pasaje, se almacenaron muestras representativas en diversas formas para caracterización y propagación continua. Estos PDX se sometieron a un control de calidad riguroso. Se utilizaron muestras de tumor de pasajes posteriores (>3) para la secuenciación (102).

Específicamente, los PDX 146-10 y 146-12 se derivaron de áreas diferentes de un único tumor primario mixto Adeno-NEPC y, posteriormente, se establecieron como NEPC puro (146-10) y Adeno (146-12). El NEPC 146-10 no expresó AR ni su target, ZBTB16. A pesar de las diferencias en morfología, ambos PDXs compartieron mutaciones en *TP53* y *RB1*, así como la delección de *PTEN* entre otras alteraciones genómicas, incluyendo una mutación en *SPEN*, un represor de transcripción inducible por hormonas implicado en el PCa (101).

Para esta tesis se trabajó con datos transcriptómicos pre-procesados (expresión en valores de FPKM) que se encuentran disponibles en cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>).

5. COHORTE DE PACIENTES CON NEPC

Para evaluar la expresión génica en muestras de NEPC, se descargaron los datos del conjunto de datos *Neuroendocrine Prostate Cancer* (Multi-Institute, Nat Med 2016) publicado por Beltran *et al.* (35) de cBioPortal (fecha de acceso: 3 de octubre de 2023) (<https://www.cbioportal.org/>). Brevemente, este conjunto de datos contiene datos transcriptómicos obtenidos mediante RNA-Seq e histopatológicos de 49 pacientes con PCa (34 CRPC-Adeno y 15 CRPC-NE). A su vez, se utilizaron los datos publicados por Watanabe *et al.* (129) de transcriptómica espacial de una muestra de un hombre de 78 años diagnosticado con PCa mixto: NEPC pT4N1M0 y cáncer positivo para AR (ARPC) pT2aN0M0 con una puntuación de Gleason de 4 + 4.

6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

6.1. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES Y ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO NO SUPERVISADO

El análisis de componentes principales (PCA) consiste en un algoritmo de reducción de dimensionalidades, de modo tal que se transforma un conjunto de múltiples variables (cada una de ellas es una dimensión, por ejemplo, cada gen de un transcriptoma completo), en un set de variables más pequeño que siga conteniendo toda la información. Se ejecutó utilizando el paquete *factoextra* en R (103). El análisis de agrupamiento no supervisado, incluyendo los datos de expresión de los genes metabólicos desregulados, se realizó utilizando los paquetes *ggplot2* (104) y *pheatmap* (105) en R.

6.2. ANÁLISIS DE DATOS DE TRANSCRIPTÓMICA ESPACIAL

Para este análisis utilizamos datos de expresión del trabajo publicado por Watanabe *et al.* (129) que posee datos de transcriptómica espacial ya procesados de un tumor neuroendócrino, el cual fue caracterizado espacialmente utilizando el software *CytAssist*

Visium (129) y que se encuentran disponibles para su visualización y análisis en la base de datos STOMICS DB (<https://db.cngb.org/stomics/>).

7. PROTOCOLO DE TRANSDIFERENCIACIÓN NE in vitro

Para promover la transdiferenciación en células de PCa se utilizó Forskolina (Fsk) (Sigma-Aldrich, EE.UU.), un diterpeno que promueve la activación de la Adenilato Ciclasa y estimula la producción de Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) intracelular (106). La solución stock se preparó en una concentración final 10 mM en dimetilsulfoxido (DMSO). La solución se filtró utilizando filtros de 0,2 μ m, se alicuotó y se conservó a -20°C hasta su uso. Al momento de tratar los cultivos celulares con la droga, se efectuó una dilución 1:1000 en RPMI, 10% v/v SFB con antibióticos, para obtener la concentración final deseada de 10 μ M. Las células fueron tratadas durante 48 h y 72 h.

7.1. EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

7.1.1. TINCIÓN CON FALOIDINA-TRITC

Se cultivaron células C4-2B en placas de 12 pocillos en las que se había insertado un vidrio de 12 mm de diámetro. Luego del tratamiento con Fsk 10 μ M, hemina 80 μ M o la combinación de ambas drogas, durante 48 h y 72 h, las células fueron lavadas suavemente con PBS y fijadas con una solución de PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, se removió la solución fijadora y se realizaron 3 lavados con PBS. Luego las células se incubaron en una solución permeabilizadora de PBS con 0,05% de tritón X-100 durante 15 min y se lavaron 2 veces con PBS. Posteriormente, se realizó una incubación con una dilución 1:10 de TRITC-faloidina en PBS con 3% de BSA (preparada a partir de una dilución 1:500 en etanol 96% v/v) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó 2 veces con PBS y se incubó con DAPI (1,5 μ g/ml) por 10 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Por último, luego de lavar 2 veces con PBS, los vidrios fueron montados en un portaobjetos con 2 μ l de Mowiol (Sigma-Aldrich; San Luis, Misuri, EE.UU.) y conservados a 4°C en oscuridad hasta su uso. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía invertida de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus IX71, con un objetivo 10X de aire. Con el

programa Fiji, se calcularon los parámetros morfológicos de largo, ramificaciones e intersecciones de los procesos similares a neuritas de un mínimo de 35 células por condición. Los datos se presentan como el promedio $\pm$ desvío estándar (SD) de al menos tres experimentos independientes, a menos que se indique de otro modo. La significancia estadística se determinó con el software GraphPad Prism 9, empleando pruebas de *t-Test* de muestras no pareadas para comparaciones entre las condiciones experimentales.

7.1.2 TINCIÓN CON AZUL DE METILENO

Se cultivaron células PC3 en placas de 12 pocillos en las que se había insertado un vidrio de 12 mm de diámetro. Luego del tratamiento con Fsk 10 μ M, hemina 80 μ M o la combinación de ambas drogas, durante 48 h y 72 h, las células fueron lavadas suavemente con PBS y fijadas con una solución de PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, se removi6 la solución fijadora y se realizaron 3 lavados con PBS. Para la tinci6n, se prepar6 una soluci6n de azul de metileno al 0,5% en agua destilada est6ril y se aplic6 500 μ l por well de placa de 12 pocillos, incubando durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Por 6ltimo, luego de lavar 2 veces con PBS, los vidrios fueron montados en un portaobjetos con 8 μ l de Mowiol 488 (Sigma-Aldrich; San Luis, Misuri, EE.UU.) y conservados a 4°C en oscuridad.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos que fueron descritos específicamente en cada secci6n se realizaron utilizando el programa *GraphPad Prism* (<https://www.graphpad.com/>) y el lenguaje de programaci6n R (107), mediante la interfase *R Studio* (108).

RESULTADOS

PARTE I

INTERACTOMA NUCLEAR DE HO-1 EN PCa

Distintas investigaciones han señalado a HO-1 como una proteína con roles no convencionales en cáncer (88,109). Como se mencionó anteriormente, la función canónica de HO-1 consiste en catalizar la degradación del grupo hemo para formar BV, CO y Fe^{+2} . Trabajos de nuestro grupo empleando modelos tanto *in vitro* como *in vivo* han reportado que HO-1 ejerce efectos antitumorales en PCa. A su vez, por primera vez, demostramos que HO-1 transloca al núcleo de células de PCa, donde ejerce una función distinta a su actividad enzimática (110,111). Si bien se ha reportado que HO-1 interactúa con proteínas que pueden localizarse en el núcleo de células de PCa, hasta el momento, no se han identificado las proteínas que interactúan con HO-1 en el núcleo (112).

1. CONSTRUCCIÓN DEL INTERACTOMA NUCLEAR DE HO-1

Con el objetivo de determinar cuáles son los interactores nucleares de HO-1 en el contexto del PCa, se realizó un estudio proteómico mediante la técnica de LC ESI-MS/MS. La **Figura 14** muestra un esquema del diseño experimental empleado para la extracción de proteínas y su posterior análisis por espectrometría de masa. Brevemente, células de la línea PC3, derivadas de una metástasis ósea de PCa, fueron tratadas con hemina (80 μM , 24 h) para inducir la expresión de HO-1. Luego, se realizó la extracción diferencial de proteínas nucleares y citoplasmáticas y se procedió a la inmunoprecipitación de HO-1. Las proteínas que co-inmunoprecipitaron junto con HO-1 se analizaron por LC ESI-MS/MS. Los parámetros utilizados en el estudio de espectrometría de masa y en el posterior análisis de los datos obtenidos, se encuentran detallados en la sección Materiales y Métodos (**Sección 2.5**). Luego de filtrar los resultados de la espectrometría de masa utilizando CRAPome (113), se obtuvo un total de 56 proteínas interactoras de HO-1, tanto en citoplasma como en núcleo de células control y tratadas.

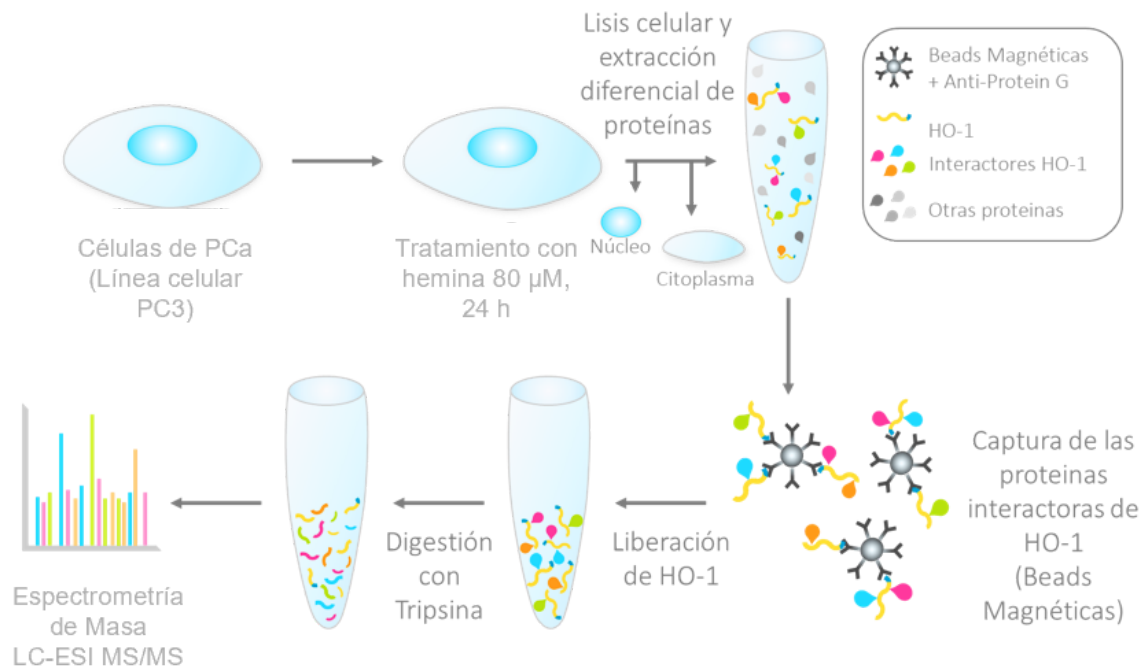


Figura 14. Esquema del flujo de trabajo para la construcción del interactoma de HO-1 empleando la línea celular PC3. Los ensayos de inmunoprecipitación de HO-1 se realizaron a partir de extractos de células PC3 tratadas con hemina (80 µM, 24 h). Para los análisis de LC-ESI MS/MS, los péptidos se desalaron y concentraron utilizando una columna de resina C18. Los espectros de MS y MS/MS se adquirieron utilizando los programas *Flex Analysis* y *Biotoools*.

A continuación, se realizó una comparación entre los péptidos obtenidos en la condición control (PC3-control) y en la condición tratada con hemina (PC3-hemina) y se analizaron tanto las fracciones nucleares como las citoplasmáticas. Así, se identificaron 44 proteínas presentes en el núcleo de células de PCa, de las cuales 11 se encontraron únicamente en la condición tratada con hemina (**Figura 15**).

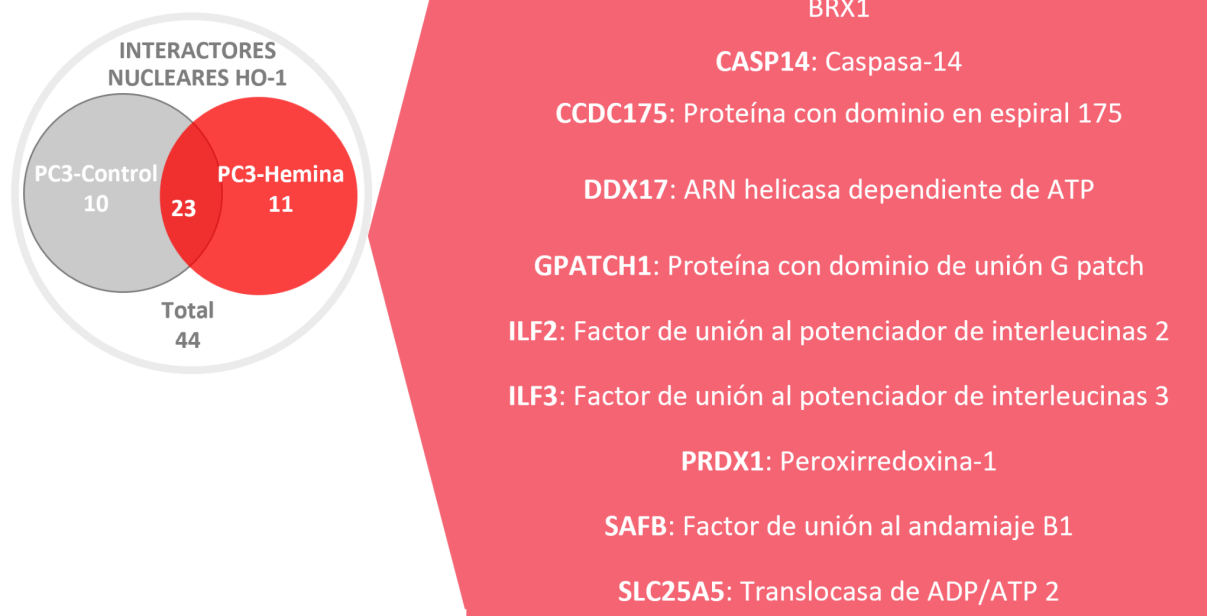


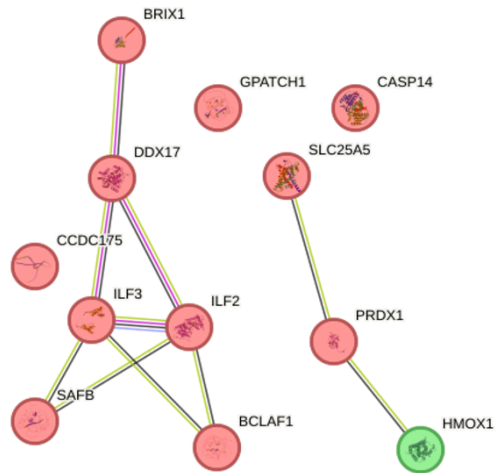
Figura 15. Detalle del interactoma nuclear de HO-1 en células PC3-hemina vs. PC3-control. Diagrama de Venn representando las 44 proteínas identificadas en la fracción nuclear de células PC3, de las cuales 11 se detectaron en los inmunoprecipitados de HO-1 luego del tratamiento con hemina (PC3-hemina, rojo) en comparación con la condición control (PC3-control, gris) (izquierda). Listado de las proteínas identificadas sólo en la condición PC3-hemina (derecha).

Como se muestra en la **Figura 15**, se detectaron 11 proteínas que interactúan con HO-1 en el núcleo de células de PCa tratadas con hemina (80 μ M, 24 h). Los interactores nucleares de HO-1 identificados mediante LC-ESI MS/MS se encuentran implicados en diversas funciones, entre ellas: organización de la cromatina y regulación de la expresión génica (SAFB y BCLAF1) (114,115), estabilización del ARN (ILF2, ILF3, GPATCH1) (116,117), regulación del metabolismo del ARN (DDX17) (118), biogénesis ribosomal (BRIX1) (119), muerte celular programada (CASP14) (120), control del centrosoma y ensamblaje microtubular (CCDC175) (121), sensor REDOX (PRDX1) (122) y transporte de nucleótidos adenina en mitocondrias (SLC25A5) (123).

1.1. ANÁLISIS PROTEÓMICO Y TRANSCRIPTÓMICO INTEGRADO DE MUESTRAS DE PCa

Con el objetivo de analizar si existen interacciones entre los componentes del interactoma nuclear de HO-1 en PCa, se utilizaron los softwares *STRING* e *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA; QIAGEN) para construir redes potenciales de interacción. Como puede observarse en la **Figura 16A**, se identificaron dos redes principales, una compuesta por: ILF3, ILF2, BCLAF1, DDX17, SAFB y BRIX1 y otra compuesta por: SLC25A5, PRDX1 y HO-1. Las proteínas CCDC175, GPATCH1 y CASP14 aparecen como nodos sueltos ya que no fueron relacionadas con las demás. A su vez, tampoco se encontró una red que relacione a todos los interactores a la vez. En paralelo, los resultados obtenidos a través del software IPA muestran que 6 de los interactores de HO-1 (SAFB, ILF3, ILF2, BRIX1, DDX17 y BCLAF1) interactúan entre sí o con HO-1 en el núcleo, validando así los resultados obtenidos por LC-ESI MS/MS (**Figura 16B**).

A



B

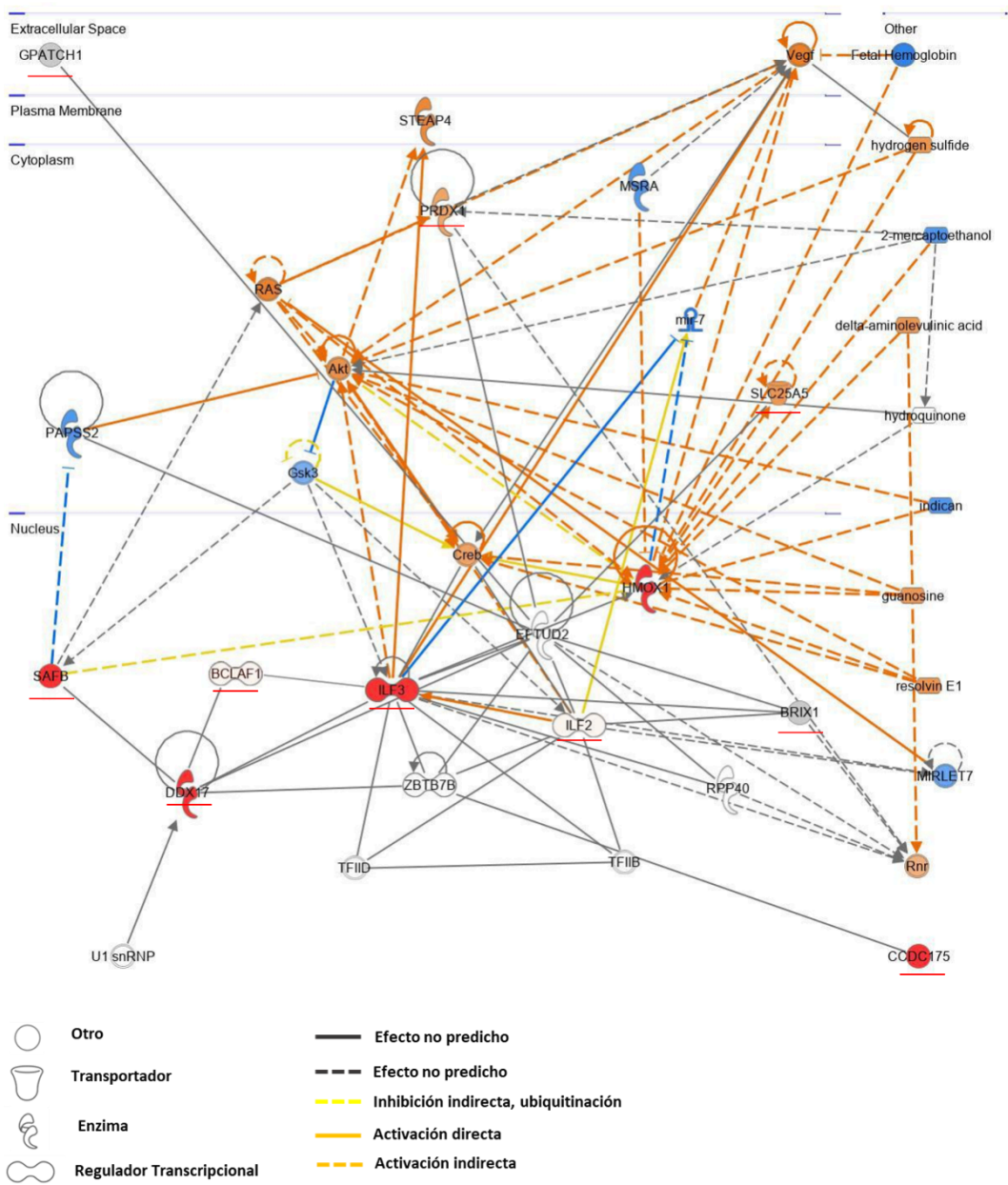


Figura 16. Interacciones predichas entre los factores nucleares diferencialmente detectados en células PC3-hemina vs. PC3-control. A) Red de interacción propuesta por STRING entre HO-1 (círculo verde) y sus interactores nucleares (círculos rosados) (124). **B)** *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) utilizando los PSMs de los interactores nucleares de HO-1 identificados por espectrometría de masas (subrayado en rojo) (125).

1.2. VALIDACIÓN DE LAS INTERACCIONES DETECTADAS ENTRE HO-1 Y LOS FACTORES NUCLEARES

Posteriormente, con el objetivo de validar algunas de las interacciones detectadas en la fracción nuclear de células PC3, se realizó una co-inmunoprecipitación seleccionando los factores BCLAF1 y SAFB, ya que se ha reportado que los mismos están involucrados en la regulación de la expresión génica ya sea como co-activadores o represores transcripcionales dependiendo del contexto celular (126,127). Para ello, a partir de lisados proteicos totales obtenidos de células PC3 control (PC3-control) y tratadas con hemina (PC3-hemina) se realizó una inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos anti-BCLAF1 o anti-SAFB (**Figura 17A**). Los inmunocomplejos se analizaron mediante *Western Blot* utilizando un anticuerpo específico anti-HO-1 (**Figura 17B**).

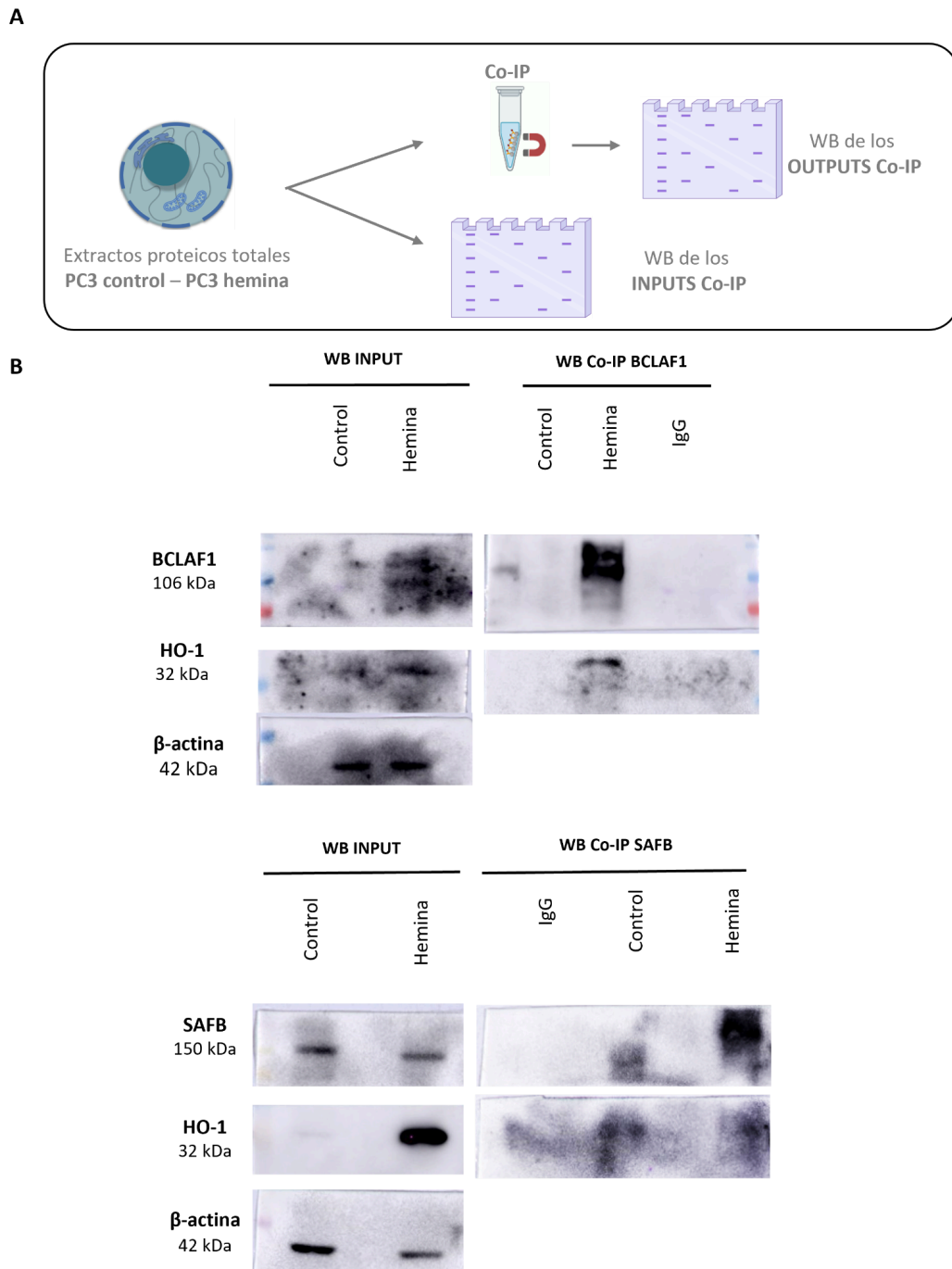


Figura 17. Validación de la interacción de HO-1 con factores nucleares por co-inmunoprecipitación en PC3-hemina vs. PC3-control. A) Esquema experimental simplificado. Brevemente, células de la línea PC3 fueron tratadas con hemina (80 μ M, 24 h), se lisaron y se extrajeron proteínas totales, para luego someterlas a una inmunoprecipitación (IP) y posterior análisis mediante *Western Blot* (WB). **B)** La IP se realizó con los extractos proteicos de células PC3-hemina vs PC3-control con anticuerpos específicos anti-BCLAF1 (IP BCLAF1) o anti-SAFB (IP SAFB). Se utilizó como control de isotipo anticuerpo anti-IgG. Tonto los inmunoprecipitados del control de isotipo (IgG) de la condición

PC3-control y de la condición PC3-hemina, como los *inputs* fueron revelados mediante WB con anticuerpos específicos anti-HO-1 y anti-SAFB o anti-BCLAF1. Se evaluaron los niveles de β -actina como control de carga.

Como se observa en la **Figura 17**, se comprobó que tanto BCLAF1 como SAFB interaccionan con HO-1 en células de PCa tratadas con hemina (PC3-hemina). De esta manera, se validó la interacción de HO-1 con dos de las proteínas más relevantes del interactoma delineado por LC-ESI MS/MS en células de PCa.

1.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS INTERACTORES DE HO-1

Posteriormente, dado que los 11 interactores de HO-1 se detectaron en el núcleo de células de PCa en un contexto de inducción de HO-1 (PC3-hemina), nos propusimos investigar si son capaces de modular la expresión génica. En primer lugar, se evaluó si dichas proteínas eran capaces de actuar como factores de transcripción o como co-reguladores de la transcripción, más allá de las funciones descritas previamente (**Figura 15**). Para abordar este objetivo, se utilizó la base de datos ChIP-Atlas, que reúne datos de análisis por secuenciación de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-seq) en diferentes líneas celulares tumorales (https://chip-atlas.org/target_genes), para investigar si los 11 interactores de HO-1 son capaces de regular la transcripción. Los análisis llevados a cabo mostraron que BCLAF1, SAFB, ILF3 y DDX17, interactores nucleares de HO-1, interactúan con el ADN en las siguientes líneas tumorales: K562, Hep-G2 y NTERA2 (**Figura 18**). En la figura se grafican mapas de calor que representan el *Binding Score*, un parámetro que indica la fuerza de unión de la proteína a un determinado sitio del gen target, junto con nubes de palabras para cada interactante (SAFB, BCLAF1, ILF3 y DDX17) encontrado en la base de datos de ChIP-Atlas.

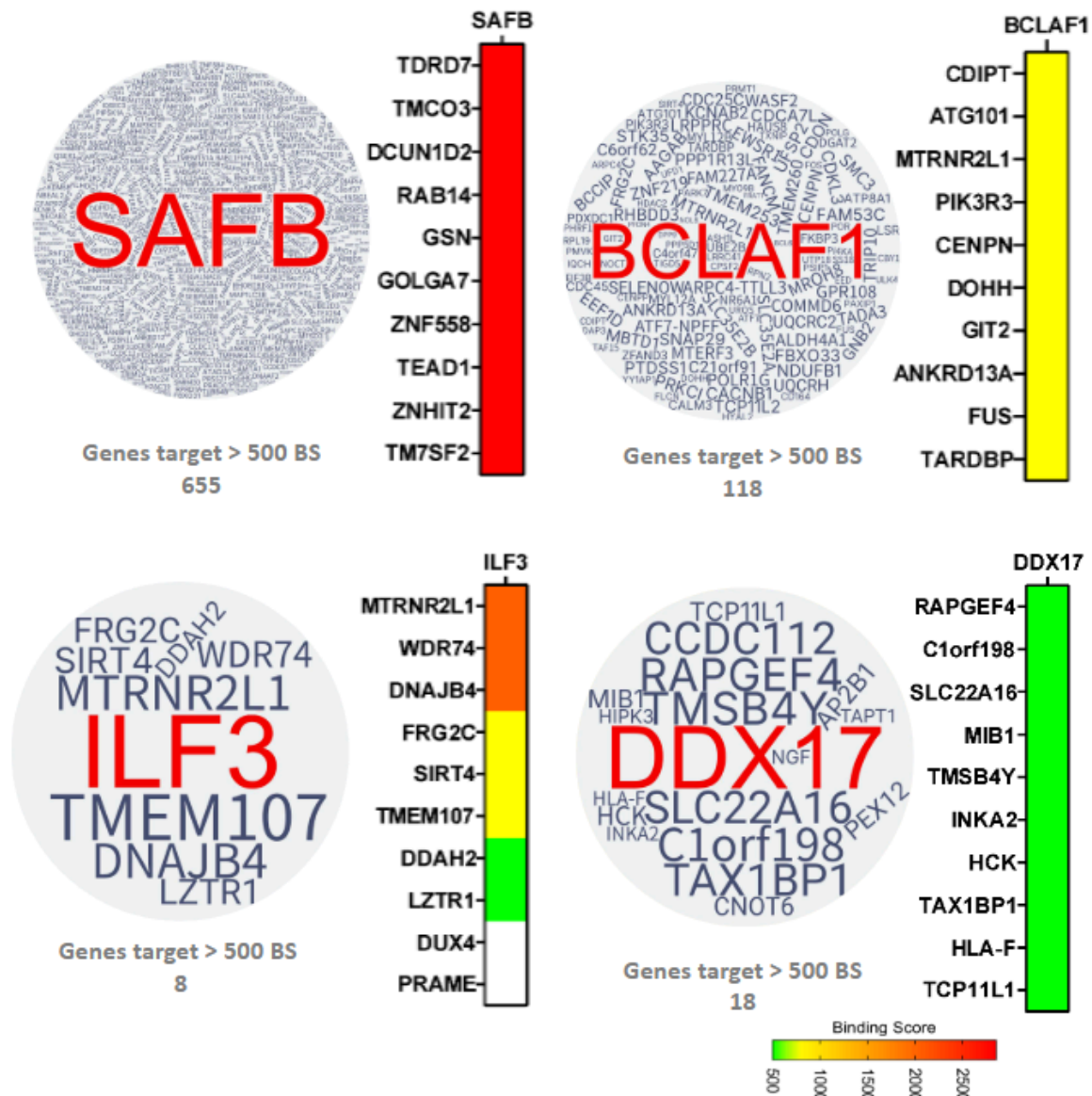


Figura 18. Evaluación de la capacidad de unión al ADN de los interactores nucleares de HO-1. Se utilizó el repositorio Chip-Atlas para el análisis de los sitios blanco de los interactores de HO-1. Las nubes de palabras representan a los interactores y a sus genes target (se incluyen aquellos que poseen un *Binding Score* mayor a 500). A la derecha de cada nube de palabras se incluye un mapa de calor para los 10 genes que presentan mayor *Binding Score*, el cual está representado por la escala de colores.

Para continuar con la caracterización de los interactores de HO-1, se realizó un GSEA (*Broad Institute*, EE.UU.) y se exploró la base de datos *KEGG* (98) para evaluar qué vías y enfermedades humanas se hallaban representadas. Para nuestro análisis utilizamos una lista

de genes compuesta por: *HMOX1*, sus 4 interactores con genes target, y los genes target de estos últimos. Para la elección de los genes *target* utilizamos como punto de corte el valor de *Binding Score*. Fueron incluidos los genes que tuvieran 500 o más de *Binding score*, por lo que el número total de genes analizados fue de 799. El análisis mostró un enriquecimiento de genes asociados a vías neurodegenerativas en distintas enfermedades, a la enfermedad de Huntington, a la vía de señalización de la neurotrofina y al metabolismo de la colina en cáncer (Figura 19).

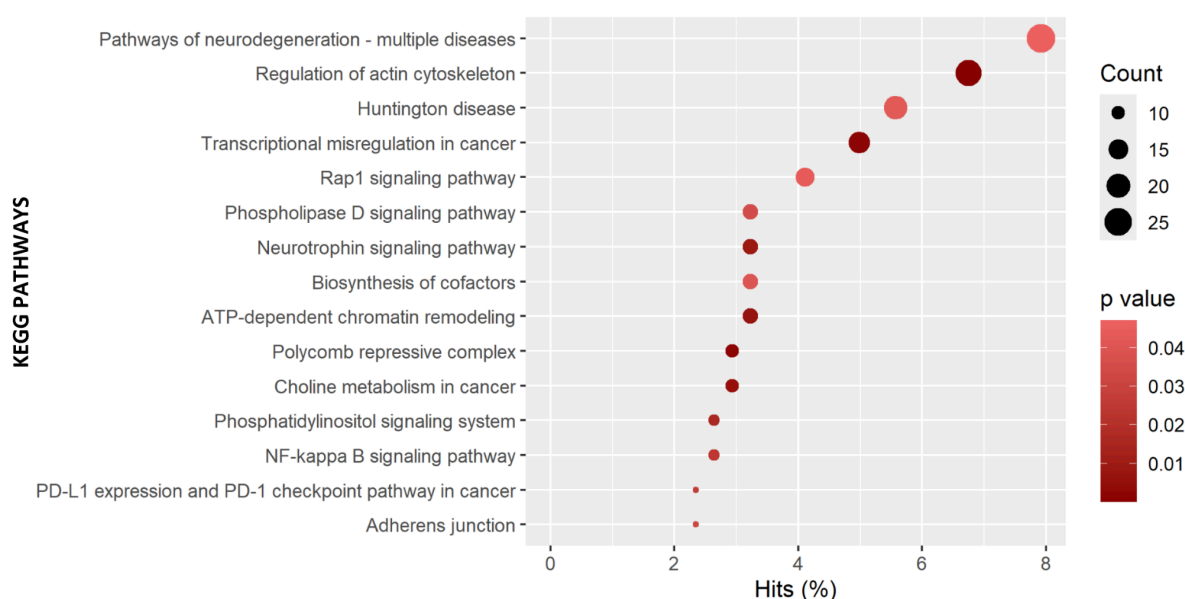


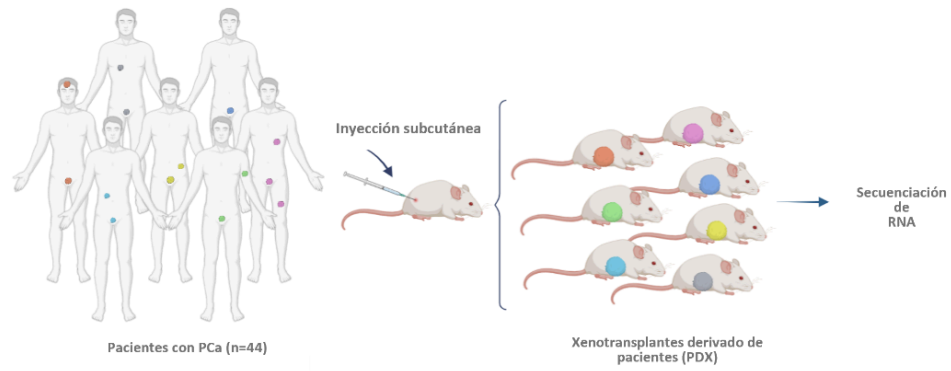
Figura 19. Análisis de enriquecimiento (GSEA) de los interactores de HO-1 determinados en células PC3 y sus genes target hallados en ChIP-Atlas. En el gráfico se muestran las vías *KEGG* enriquecidas significativamente para el conjunto de genes seleccionado (799 genes representados por *HMOX1*, *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* y *DDX17*). El tamaño de los puntos representa la cantidad de genes involucrados en cada categoría y el gradiente de color muestra el *p* valor. La significancia estadística se fijó en $p < 0,05$.

2. CORRELACIÓN CLÍNICA ENTRE HO-1, SUS INTERACTORES Y GENES TARGET CON MUESTRAS NEPC

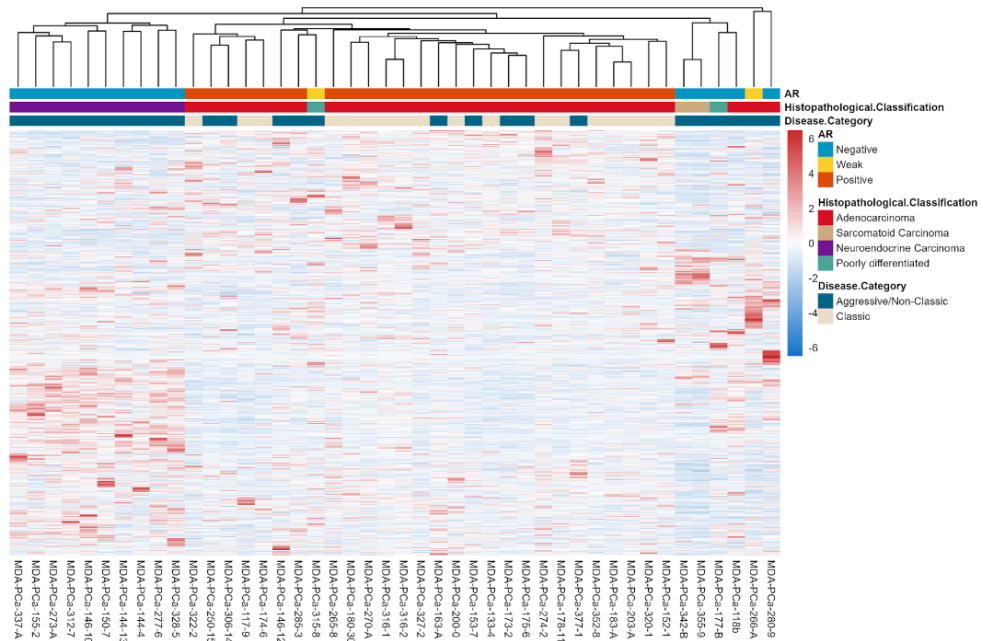
Interesantemente, los resultados obtenidos evidencian una asociación entre los genes que codifican para los interactores nucleares de HO-1 y sus genes target, con enfermedades neurodegenerativas. En consecuencia, se decidió explorar si existía alguna relación entre

HMOX1, los genes que codifican para sus interactores y sus genes target, con alguno de los subtipos de PCa. Para este fin, se analizaron datos transcriptómicos por secuenciación masiva (RNA-seq) de una colección de xenotrasplantes derivados de pacientes con PCa del *MD Anderson Cancer Center* (MDA PCa PDXs). Uno de los aspectos más valiosos de este modelo *in vivo* es que los PDXs representan la heterogeneidad de la enfermedad y, por dicha razón, son modelos preclínicos ampliamente utilizados (101,102). A su vez, los MDA PCa PDXs contienen datos clínico-patológicos de los pacientes y datos transcriptómicos y genómicos de los PDXs. Así, a partir de dicha colección, se evaluó la expresión de nuestros genes de interés (**Figura 20A**).

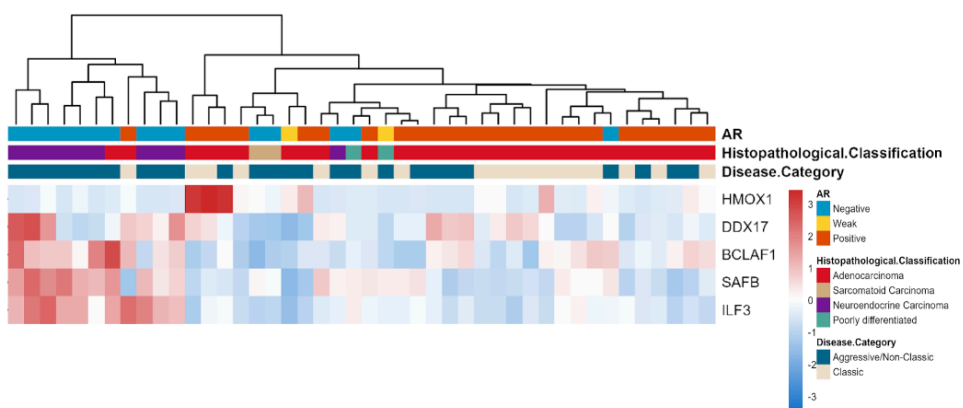
A



B



C



D

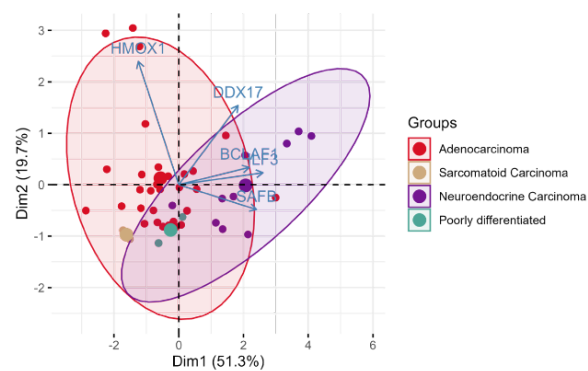


Figura 20. Evaluación de la correlación entre *HMOX1*, los genes que codifican para los interactores nucleares de HO-1 y sus genes target con los subtipos de PCa utilizando xenotransplantes derivados de pacientes (MDa PCa PDX). **A)** Representación esquemática de los MDa PCa PDXs de la colección del *MD Anderson Cancer Center*. **B)** Mapa de calor que representa un análisis de agrupamiento no supervisado de los MDa PCa PDX. Se encuentra representada la expresión génica de *HMOX1*, sus interactores con sitios de unión al DNA y los genes target con *Binding Score* mayor a 500 (799 genes). Los colores rojo, blanco y azul representan los niveles de expresión altos, intermedios o bajos, respectivamente, representados como *z score*. En la parte superior del mapa de calor se pueden observar variables clínico-patológicas correspondientes a cada paciente, las mismas se encuentran detalladas a la derecha del gráfico. **C)** Mapa de calor realizado para la expresión de *HMOX1* y la de los genes que codifican para sus interactores *SAFB*, *BCLAF1*, *DDX17* e *ILF3*. **D)** Gráfico de análisis de componentes principales considerando la expresión de los 5 genes analizados en el mapa de calor.

Se realizó un análisis de agrupamiento no supervisado de *HMOX1*, *SAFB*, *BCLAF1*, *DDX17* e *ILF3* y los genes target con valores de *Binding Score* mayores a 500 (799 genes en total). Se observó que este grupo de genes estratifica a todos los MDa PCa PDX AR negativos y de histopatología NE en un único clúster (**Figura 20B**). A continuación, se realizó el mismo análisis restringiendo significativamente el número de genes de 799 a 5, es decir contemplando únicamente a *HMOX1*, *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* y *DDX17*, sin involucrar a los genes target. Sorprendentemente, a pesar de la disminución en el número de genes utilizados para el análisis, se observó que la mayoría de los PDX NE se siguieron agrupando en un mismo *cluster* (**Figura 20C**). A su vez, el análisis de componentes principales indicó que los genes que más aportan a la variabilidad entre muestras fueron *BCLAF1*, *SAFB* e *ILF3* (**Figura 20D**). Estos resultados indican una correlación negativa entre la expresión de *HMOX1* y sus interactores en los PDX NE.

Para determinar con una mayor precisión la especificidad de la expresión de los interactores de HO-1 como marcadores candidatos de NEPC, se seleccionaron los PDXs MDA PCa 146-10 y MDA PCa 146-12, ambos derivados del mismo tumor pero de diferentes regiones histológicas, NEPC y adenocarcinoma, respectivamente (**Figura 21A**). Curiosamente, el análisis de la expresión, a partir de datos de RNA-seq, reveló que el PDX 146-12, establecido a partir de la región adenocarcinoma, muestra altos niveles de expresión de *HMOX1* y bajos de *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* en comparación con el PDX 146-10, derivado de la región

neuroendócrina del tumor. En cuanto a *DDX17*, la expresión en ambos PDXs parece no variar (Figura 21B).

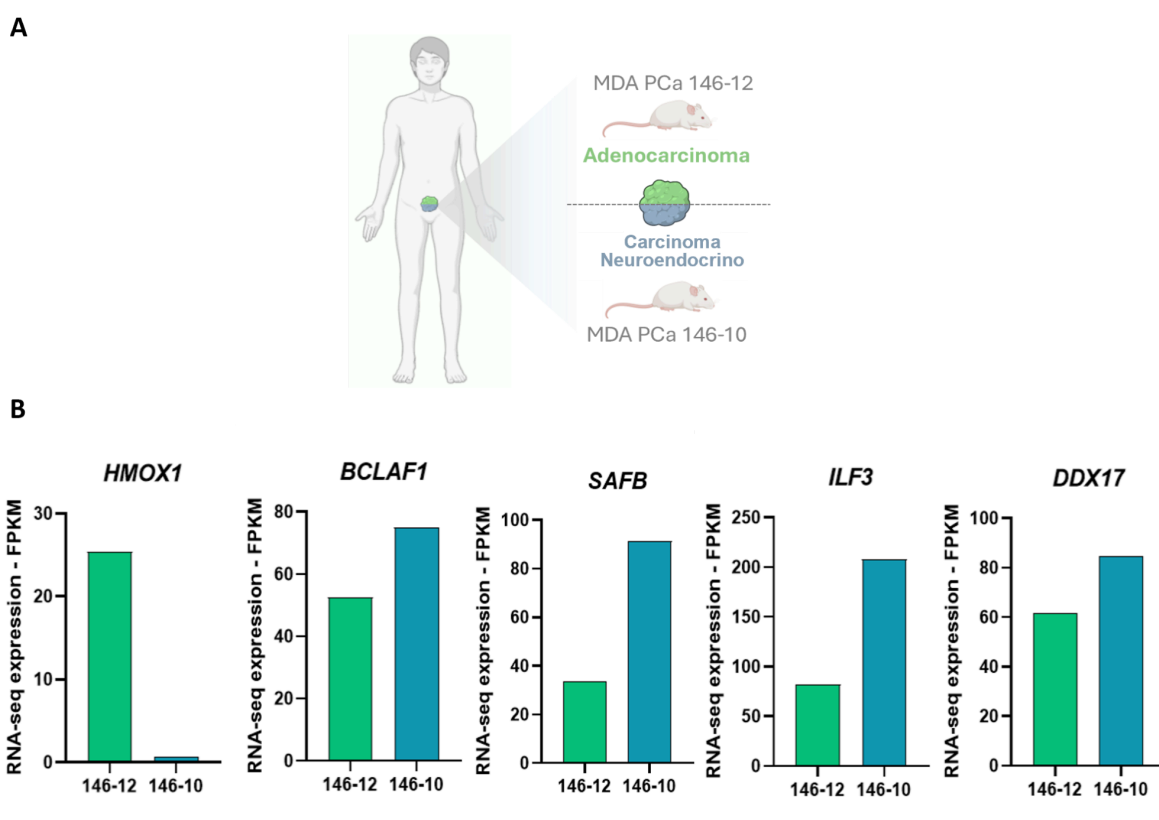


Figura 21. Comparación de la expresión génica (FPKM) de *HMOX1*, *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* y *DDX17* entre los PDXs MDA PCa 146-12 (adenocarcinoma) y MDA PCa 146-10 (NEPC), generados a partir del mismo tumor de próstata. A) Representación esquemática de la generación de los PDX heterólogos 146-10 (NE) y 146-12 (adenocarcinoma) provenientes de un único tumor con características histológicas mixtas y que posteriormente fueron secuenciados. **B)** Gráficos de barra que representan los niveles de expresión (FPKM) de *HMOX1*, *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* y *DDX17*, determinados a partir de un análisis de RNA-seq (n=1) en el PDX MDA PCa 146-12 (adenocarcinoma) vs. el PDX MDA PCa 146-10 (NE).

Estos resultados demuestran que la expresión de los genes que codifican para los interactores nucleares de HO-1, identificados por primera vez a través un análisis proteómico en células de PCa, junto con *HMOX1* fue capaz de discriminar entre las muestras caracterizadas como NEPC y las muestras de PCa primario, CRPC y carcinoma sarcomatoide, sugiriendo la relevancia clínica de *HMOX1* y sus interactores en el subtipo NE de la

enfermedad.

Para seguir explorando la relación entre *HMOX1*, sus interactores y el subtipo NE, se realizaron análisis bioinformáticos adicionales utilizando el conjunto de datos de Beltran *et al.* (n = 49) que incluye 15 muestras provenientes de tumores CRPC-NE y 34 muestras de tumores CRPC-adenocarcinoma, incluyendo datos transcriptómicos y clínicos (35). Se evaluaron dos conjuntos de genes, en primer lugar el conjunto de 799 genes compuesto por *HMOX1*, sus interactores *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* y *DDX17* y los genes target de estos últimos (**Figura 22A**). Posteriormente, se realizó el mismo análisis de agrupamiento no supervisado reduciendo el número de genes a 5, grupo compuesto por *HMOX1* y sus interactores *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* y *DDX17*. Tanto en el conjunto de 799 genes como en el de 5 se observó la formación de un clúster compuesto por muestras CRPC-NE con baja expresión de *HMOX1* (**Figura 22B**). Por último, al evaluar la expresión de *HMOX1* y sus interactores *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* y *DDX17* en muestras de adenocarcinoma vs. neuroendócrinas se observó un aumento significativo de la expresión de *BCLAF1*, *SAFB* e *ILF3* junto con la sub-expresión de *HMOX1* en las muestras NEPC (**Figura 22C**).

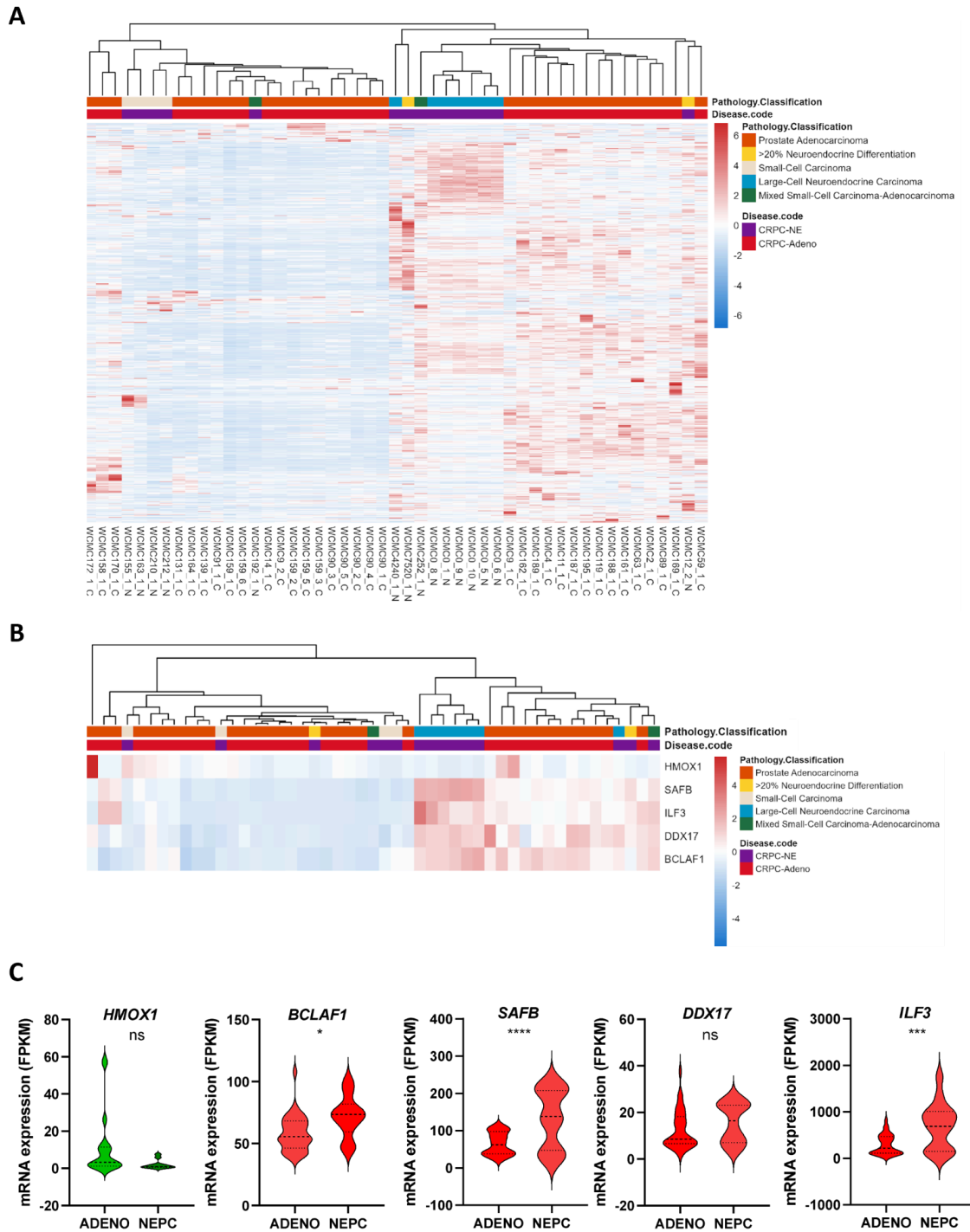


Figura 22. Evaluación de la correlación entre *HMOX1*, sus interactores y genes target con los subtipos de PCa en muestras de pacientes. A) Mapa de calor que representa un análisis de agrupamiento no supervisado de las muestras de pacientes del set de datos Beltran *et al.* (35). Se encuentra representada la expresión génica de *HMOX1*, los genes que codifican para sus interactores con sitios de unión al ADN y los genes target con *binding score* mayor a 500 (799 genes). Los colores rojo, blanco y azul representan niveles de expresión altos, intermedios o bajos, respectivamente,

representados como *z score*. En la parte superior del mapa de calor se pueden observar variables clínico-patológicas correspondientes a cada paciente y detalladas a la derecha del gráfico. **B)** Mapa de calor realizado para la expresión (FPKM) de *HMOX1*, *SAFB*, *BCLAF1*, *DDX17* e *ILF3*. **C)** Gráficos de violín que muestran los niveles de expresión (FPKM) de *HMOX1*, *SAFB*, *BCLAF1*, *DDX17* e *ILF3* en muestras de adenocarcinoma (ADENO) y PCa neuroendócrino (NEPC) del set de datos Beltran *et al.* (35).

2.1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *HMOX1* Y DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA SUS INTERACTORES NUCLEARES MEDIANTE TRANSCRIPTÓMICA ESPACIAL

A continuación, teniendo en cuenta la heterogeneidad de los tumores de próstata, se decidió evaluar la expresión de *HMOX1* y sus interactores nucleares en muestras de NEPC mediante transcriptómica espacial, una técnica que permite estudiar la expresión génica en su contexto espacial dentro de los tejidos. Para ello, se utilizó el repositorio de datos de transcriptómica espacial STOmics DB, una plataforma especializada que centraliza datos de transcriptómica espacial provenientes de distintas especies y tejidos (128). En nuestro análisis, se utilizó el *dataset* publicado por Watanabe *et al.*, que posee datos de transcriptómica espacial de un tumor neuroendócrino, el cual fue caracterizado espacialmente utilizando el software *CytAssist Visium* (129). La muestra de dicho *dataset* proviene de paciente con PCa mixto (NEPC y cáncer positivo para AR (ARPC)), (**Figura 23A**) en la cual los autores definieron dos clusters: cluster 0, que contiene a la región NEPC, y cluster 7, el cual contiene a la región ARPC (**Figura 23B**). En primer lugar, para confirmar y delinear la región de NEPC en el tejido, se analizó la expresión de *SYP*, *NSE*, *EZH2*, *MYCN*, *CHGA*, *SOX2*, *NCAM1* y *AURKA*, marcadores característicos de este subtipo de PCa. Así, se comprobó que la expresión de dichos marcadores es alta en la región izquierda del chip (Cluster 0), de manera consistente con la pérdida marcada de *AR* y *KLK3* en NEPC (**Figura 23C-B**). Una vez delineada la región correspondiente al subtipo NEPC, se analizó la disposición espacial de los interactores de *HMOX1* dentro del tejido, tanto en el cluster 0 (NEPC) como en el Cluster 7 (ARPC). Se observó que, al igual que en los resultados previamente obtenidos en PDXs, la expresión de *BCLAF1*, *SAFB* e *ILF3* fue mayor en el Clúster 0 (NEPC) en comparación con el Clúster 7 (ARPC) (**Figura 23Di-iii**), mientras que *DDX17* mostró un patrón opuesto (**Figura 23Div**). Al analizar *HMOX1*, se observó que su expresión es mayor en la región de NEPC en comparación con la región ARPC (**Figura 23Dv**). Sin embargo, cabe resaltar que la mayor expresión de *HMOX1* se detectó en la región correspondiente al subtipo NEPC, que discrepa

con los resultados presentados anteriormente (**Figuras 24E**). De esta manera, se debe tener en cuenta que los datos utilizados para este análisis provienen de una muestra de un tumor de un único paciente mientras que los análisis previos fueron realizados con datos provenientes de múltiples pacientes y de todas las regiones del tumor. Así, en particular, la localización específica de *HMOX1* y sus interactores en regiones NEPC podría revelar patrones funcionales que se diluyen en análisis globales del tumor.

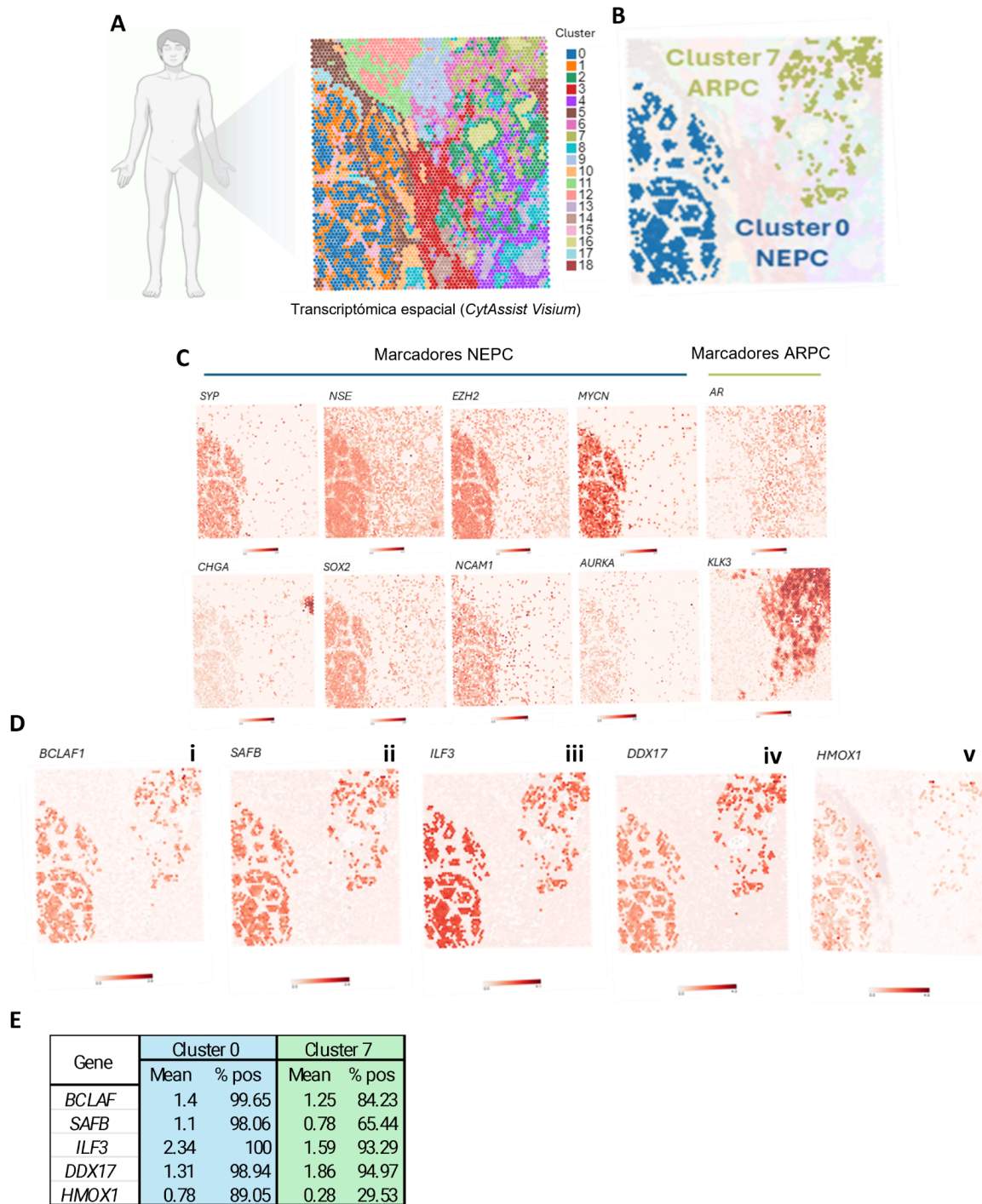


Figura 23. Evaluación de la expresión de los interactores de *HMOX1* y su correlación con el fenotipo NEPC utilizando datos de transcriptómica espacial. A) Esquema del chip obtenido de la muestra del paciente. **B)** Detalle de los clusters presentes en la muestra utilizada: Cluster 0 (NEPC, azul) y Cluster 7 (ARPC, verde). **C)** Análisis espacial de la expresión de marcadores neuroendócrinos (*SYP*, *NSE*, *EZH2*, *MYCN*, *CHGA*, *SOX2*, *NCAM1* y *AURKA*) en la región del tumor clasificada como NEPC (Cluster 0) vs. la región clasificada como ARPC (Cluster 7). **D)** Análisis espacial de la expresión de *BCLAF1* (i), *SAFB* (ii), *ILF3* (iii), *DDX17* (iv) y *HMOX1* (v).

ILF3(iii), *DDX17* (iv) y *HMOX1* (v). **E)** Análisis cuantitativo de la expresión en cada uno de los clusters. Se detalla el valor obtenido para la media (mean) y el porcentaje de células positivas (% pos).

En conclusión, nuestros resultados muestran una relación entre la expresión de los interactores de *HMOX1* y el subtipo neuroendócrino del PCa. Dichos resultados fueron evaluados adicionalmente mediante un análisis de transcriptómica espacial provenientes de un tumor mixto con componente NEPC. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar la resolución espacial y la heterogeneidad intratumoral al interpretar los perfiles de expresión génica en PCa.

PARTE II

ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE HO-1 Y SUS INTERACTORES EN EL NEPC

1. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO NEPC *in vitro*

Durante el desarrollo y establecimiento del NEPC se desencadenan diferentes cambios moleculares que pueden ser utilizados como indicadores de la transdiferenciación. Frecuentemente en NEPC se observan alteraciones genómicas clave, como la pérdida alélica o la mutación de los genes supresores tumorales *TP53*, *RB1* y *PTEN*, facilitando la reprogramación epigenética y la pérdida de la identidad de las células epiteliales luminales (130). Modificadores epigenéticos como *EZH2* desempeñan un papel crucial al promover la metilación de histonas (H3K27me3), que suprime la señalización de AR y mejoran la plasticidad del linaje (131). A su vez, reguladores transcripcionales como N-Myc (*MYCN*) y *AURKA* están sobreexpresados en aproximadamente el 40% de los casos de NEPC, impulsando la diferenciación neuroendócrina al reprimir las vías de AR y promover la progresión del ciclo celular (132). Adicionalmente, en células LNCaP transdiferenciadas *in vitro* se evidenció una elevada expresión del factor antiapoptótico *BCL-2* lo que correlaciona con lo observado en células de carcinoma de células pequeñas en muestras clínicas (133). Por otra parte, en la clínica los tumores NE se definen generalmente por la expresión de cromogranina A (CHGA), sinaptofisina (SYP), molécula de adhesión celular neural 1 (NCAM1) y enolasa específica de neuronas (NSE), generalmente evaluadas a través de inmunohistoquímica (134,135).

Para validar los resultados obtenidos a partir de los análisis bioinformáticos, se decidió trabajar con un modelo NEPC *in vitro*. Dado que no se disponía de una línea celular de NEPC, como por ejemplo NCI-H660, nos basamos en la bibliografía para establecer un protocolo de transdiferenciación utilizando las líneas celulares de PCa, C4-2B y PC3. En la literatura pueden encontrarse distintos protocolos, en los cuales la transdiferenciación NE de células de PCa puede promoverse mediante la estimulación con inductores de AMP cíclico (AMPC), tales como epinefrina, forskolina (Fsk) o isobutil-metilxantina (IBMX) (106). Está reportado que el tratamiento con dichos inductores promueve la expresión de marcadores NE en líneas

de PCa como LNCaP (135) y C4-2B (136). Por otro lado, existen otros protocolos que se basan en el uso de medios de cultivo deficientes en hormonas como el suero fetal bovino charcoalizado, lo que simula la privación androgénica y resulta en un aumento de la producción de AMPc y la adquisición de un fenotipo NE (137). Estos métodos inducen cambios morfológicos, cambios en la expresión de marcadores de NEPC, el arresto del ciclo celular en G1 y la pérdida de clonogenicidad en respuesta a los niveles elevados de AMPc (138,139).

De esta manera, se estableció en el laboratorio un protocolo de transdiferenciación basado en la inducción de AMPc utilizando Fsk. El mismo consistió en tratar células de las líneas C4-2B y PC3, como fue descrito en la sección *Materiales y Métodos* (Sección 7)(Figura 24).

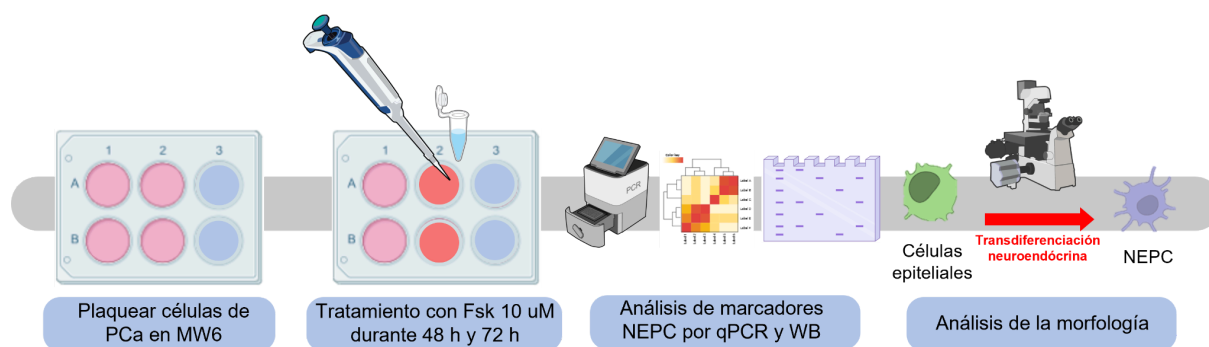


Figura 24. Esquema del protocolo de transdiferenciación NE utilizado. Células de las líneas C4-2B y PC3 fueron tratadas con Fsk (10 μ M, 48 h y 72 h) realizándose cambios de medio cada 24 h. Finalizado el tratamiento se evaluó la morfología celular por microscopía óptica y la expresión de marcadores NE por RT-qPCR y Western Blot.

2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA FORSKOLINA SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR Y LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NE

En primer lugar, se evaluó la morfología de las células en los distintos tiempos de tratamiento para inducir la transdiferenciación (Fsk 10 μ M, 48 h y 72 h). Se observó que las células de la línea C4-2B presentaron un marcado cambio morfológico a las 48 h y 72 h de tratamiento al compararlas con el control. Las células tratadas con Fsk adquirieron una morfología más alargada, presentando protrusiones similares a neuritas (Figura 25).

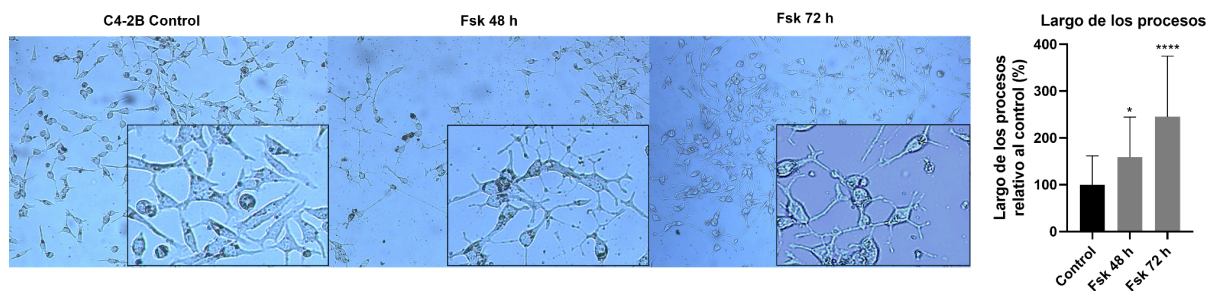
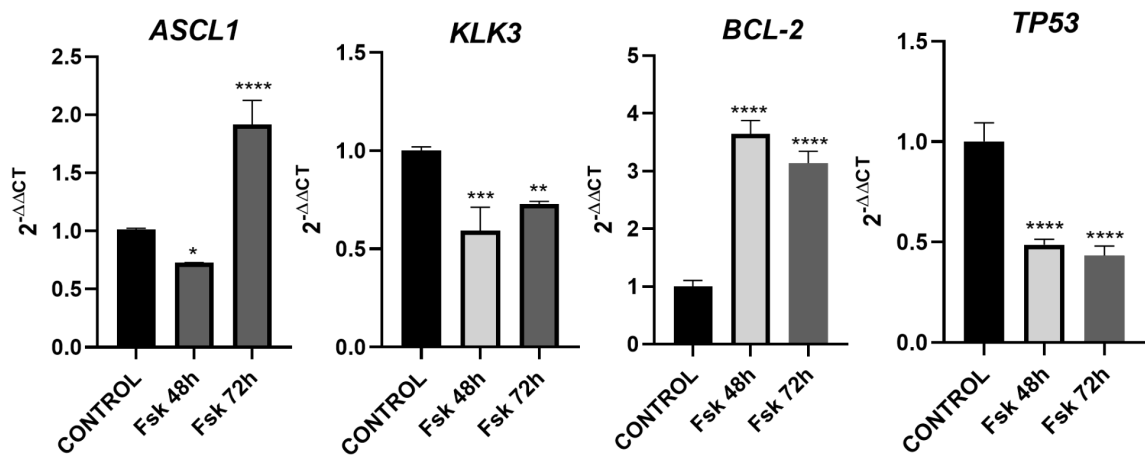


Figura 25. Efecto del tratamiento con Fsk sobre la morfología de células C4-2B. Micrografías obtenidas con un microscopio óptico invertido donde se observan los cambios en la morfología celular durante el proceso de transdiferenciación al realizar el tratamiento con Fsk (10 μ M, 48 h y 72 h). Aumento: 400X. Gráfico de barras que representa la cuantificación del largo de las neuritas en cada una de las condiciones. La cuantificación se realizó utilizando el Software Fiji. Los resultados se muestran como media $\pm$ S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0,05$ siendo ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

A su vez, para determinar si los cambios morfológicos eran acompañados de cambios a nivel transcripcional, se evaluó la expresión de algunos marcadores relevantes en la transdiferenciación NE. La expresión de *ASCL1* aumentó significativamente a las 72 h de tratamiento (**Figura 26A**). Respecto a *BCL-2*, se observó un aumento significativo sostenido en el tiempo (**Figura 26A**). Dado que la línea C4-2B es sensible a andrógenos también se evaluó la expresión de *KLK3* (gen regulado por AR) (140) y se observó una disminución significativa en ambas condiciones de tratamiento (**Figura 26A**). La expresión de *TP53*, normalmente alterado en muestras NEPC (141), también disminuyó significativamente como consecuencia del tratamiento con Fsk. Adicionalmente, se determinó la expresión proteica de sinaptofisina (SYP) por Western Blot. Si bien se observaron niveles basales de SYP en C4-2B control como previamente demostraron Jing *et al.* (142), dichos niveles no se modificaron significativamente en presencia de Fsk.

A



B

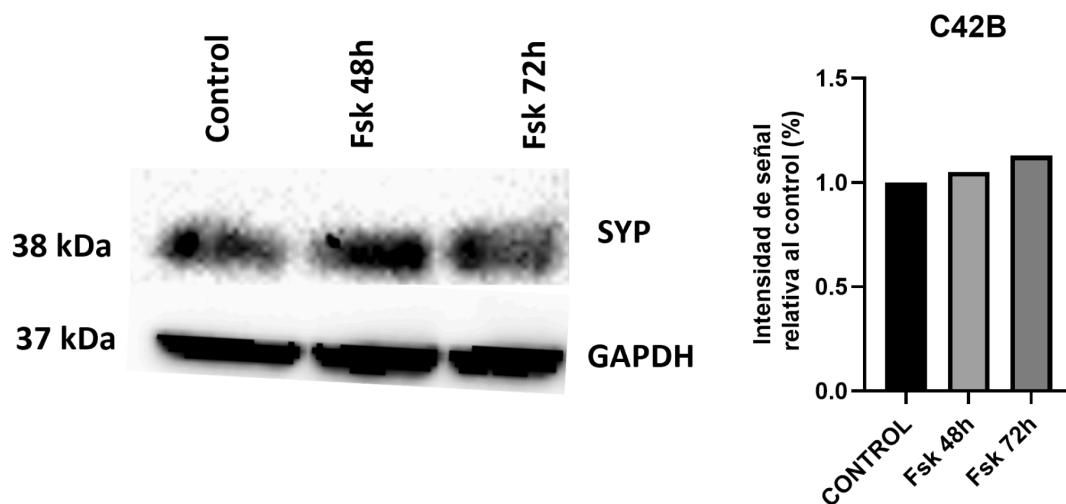


Figura 26. Transdiferenciación de la línea de PCa sensible a andrógenos C4-2B, evaluación molecular. A) Los niveles de expresión génica de *ASCL1*, *KLK3*, *BCL-2* y *TP53* se evaluaron mediante RT-qPCR en células tratadas con Fsk 10 μ M durante 48 h y 72 h. Se utilizó *PPIA* como gen de referencia. Cada condición está relativizada al control. Los resultados se muestran como media $\pm$ S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0,05$ siendo ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. **B)** Evaluación de la expresión de Sinaptofisina (SYP) mediante WB en células C4-2B tratadas o no con Fsk (10 μ M). Se utilizó GAPDH como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos se realizó mediante un análisis de densitometría utilizando el software Fiji.

Por otro lado, se utilizó el mismo protocolo, basado en el aumento de los niveles de AMPc como consecuencia del tratamiento con Fsk (10 μ M, 48 h y 72 h), para transdiferenciar células de la línea PC3, protocolo que no estaba reportado con anterioridad en la literatura. En este

caso, se observaron dos subpoblaciones como respuesta a la presencia de Fsk: una que conservaba el fenotipo epitelial y otra de morfología más alargada con prolongaciones similares a neuritas (**Figura 27**).

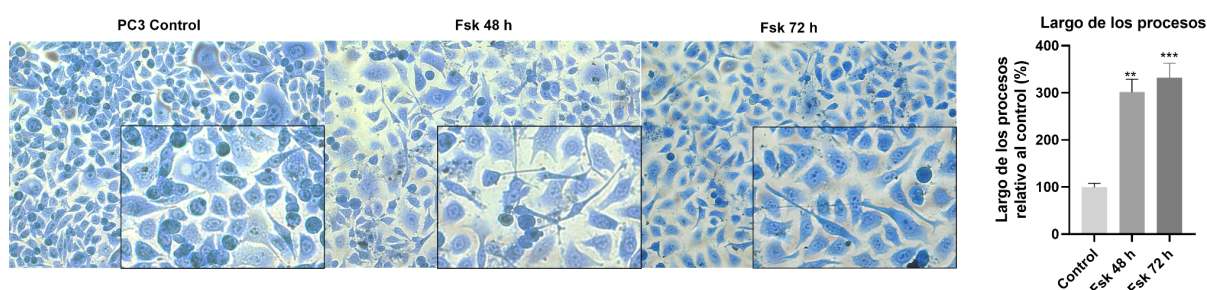


Figura 27. Efecto del tratamiento con Fsk sobre la morfología de células PC3. Imágenes representativas obtenidas con un microscopio óptico invertido de células PC3, teñidas con Azul de metileno para obtener mejor contraste, que muestran los cambios en la morfología celular durante el proceso de transdiferenciación al utilizar Fsk 10 μ M durante 48 h y 72 h. Aumento: 400X. Se cuantificó el largo de las neuritas utilizando el Software Fiji. Cada condición está relativizada al control. Los resultados se muestran como media $\pm$ S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0,05$ siendo ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

En cuanto a la expresión transcriptómica de marcadores NE, se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm de *NSE*, *EZH2*, *BCL-2* y *NCAM1* a las 72 h de tratamiento (**Figura 28A**). Mediante Western Blot se evaluó la expresión de CHGA y se evidenció que el tratamiento con Fsk (72 h) parece promover un aumento en los niveles proteicos de dicho marcador NE (**Figura 28B**).

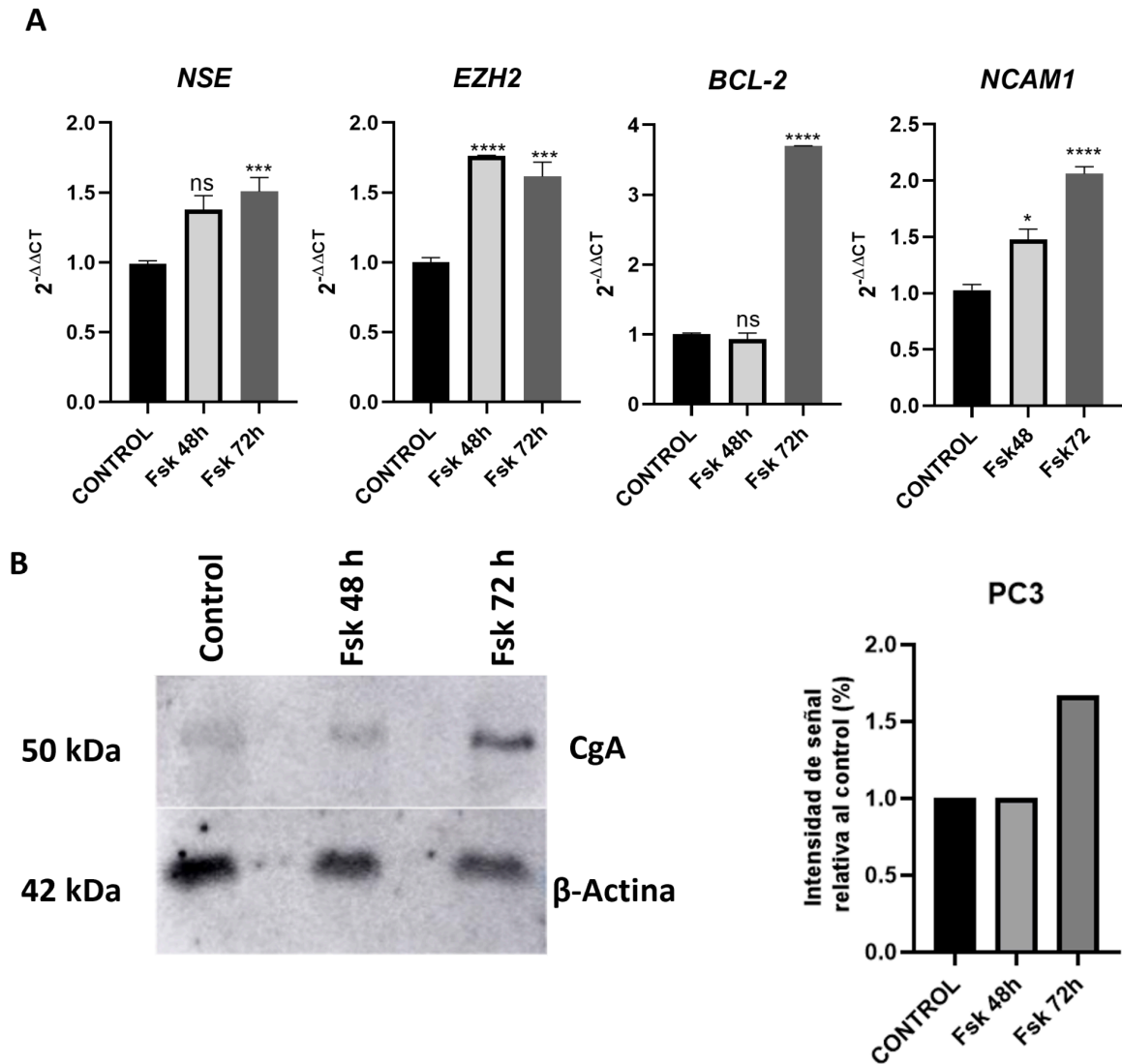


Figura 28. Transdiferenciación de la línea de PCa insensible a andrógenos PC3, evaluación molecular. A) Los niveles de expresión de *NSE*, *EZH2*, *BCL-2* y *NCAM1* se evaluaron mediante RT-qPCR en células tratadas con Fsk 10 μ M durante 48 h y 72 h. Se utilizó *GAPDH* como gen de referencia. Cada condición está relativizada al control. Los resultados se muestran como media $\pm$ S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0,05$ siendo $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$. **B)** Evaluación de la expresión de Cromogranina A (CHGA) mediante WB en células PC3 tratadas o no con Fsk (10 μ M). Se utilizó β -actina como control de carga. La cuantificación de los niveles proteicos se realizó mediante un análisis de densitometría utilizando el software Fiji.

3. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HO-1 EN CÉLULAS DE PCa TRANSDIFERENCIADAS

En la **Parte I.2** de esta sección se describieron los resultados obtenidos mediante análisis bioinformáticos los cuales evidenciaron que *HMOX1* se encuentra sub-expresada en pacientes con NEPC y en PDXs con fenotipo NE. Para profundizar el estudio del rol de *HMOX1* en el fenotipo NEPC, nos propusimos modular su expresión y actividad en modelos de transdiferenciación *in vitro* mediante el tratamiento con Fsk. Para ello se cultivaron las células (C4-2B y PC3) en presencia de Fsk (10 μ M, 48 h y 72 h) y hemina (80 μ M, 48 h y 72 h) con el fin de evaluar el efecto de la inducción de HO-1 en el proceso de transdiferenciación.

3.1. EL TRATAMIENTO CON HEMINA REVIERTE LA ADQUISICIÓN DE CARACTERÍSTICAS NE

En primer lugar, mediante una tinción con Faloidina-TRITC, se evaluó el efecto del tratamiento con hemina sobre la morfología de las células C4-2B sometidas al protocolo de transdiferenciación (Fsk 10 μ M, 48 h y 72 h). Como era esperable, se observó que el tratamiento con Fsk 10 μ M tanto a las 48 h como a las 72 h, promovió el aumento del número de procesos similares a neuritas y en consecuencia el número de intersecciones entre las mismas (**Figura 29A**). Al combinar el tratamiento de Fsk con hemina, se observó una disminución significativa tanto en el largo de los procesos como en el número de intersecciones al comparar con las células control y las tratadas solo con Fsk (**Figura 29B**).

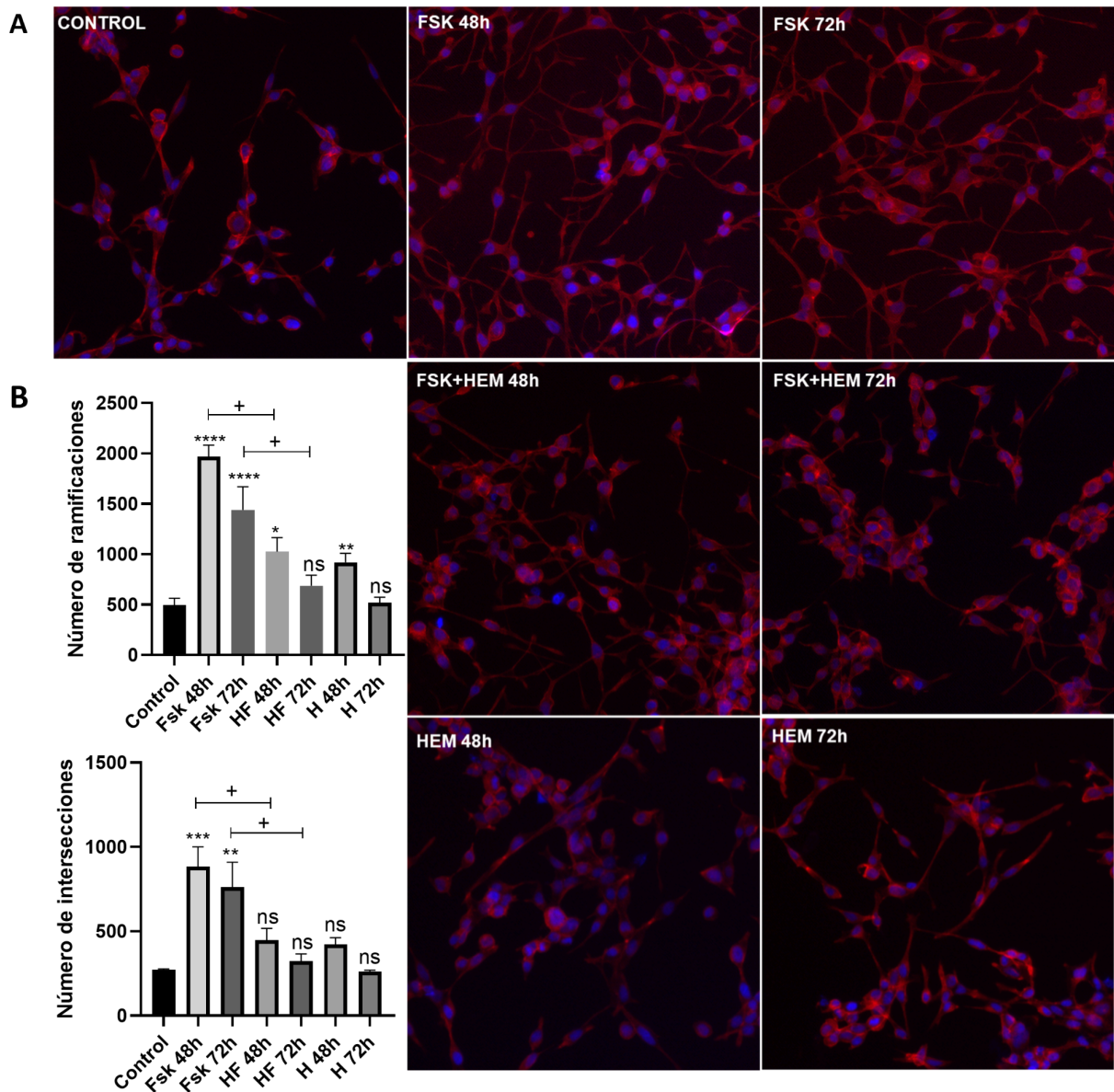


Figura 29. Efecto de la inducción de HO-1 mediante el tratamiento con hemina en células C4-2B sometidas a un protocolo de transdiferenciación. A) Imágenes representativas obtenidas mediante un microscopio de fluorescencia de células C4-2B teñidas con Faloidina-TRITC (rojo, F-actina) en distintas condiciones: control, Fsk 48 h y 72 h (FSK), Fsk + hemina (FSK+HEM) a 48 h y 72 h, hemina (HEM) 48 h y 72 h. **B)** Cuantificación de parámetros morfológicos: número de ramificaciones y número de puntos de intersección por ramificación. Los resultados se muestran como media $\pm$ S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0,05$ siendo $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, $+p < 0,001$.

Además, se determinó el efecto de la hemina en la morfología de células de la línea PC3

tratadas con Fsk. Se observó que el tratamiento con Fsk, tanto a las 48 h como a las 72 h, indujo cambios morfológicos en una subpoblación de células (**Figura 30A**). A su vez, se detectó un aumento en la longitud de las mismas cuando las células fueron cultivadas con Fsk (**Figura 30B**). Si bien, se observó un aumento a lo largo de los procesos en las células tratadas con ambas drogas, dicho aumento fue menor que el inducido en las células cultivadas sólo con Fsk (**Figura 30B**).

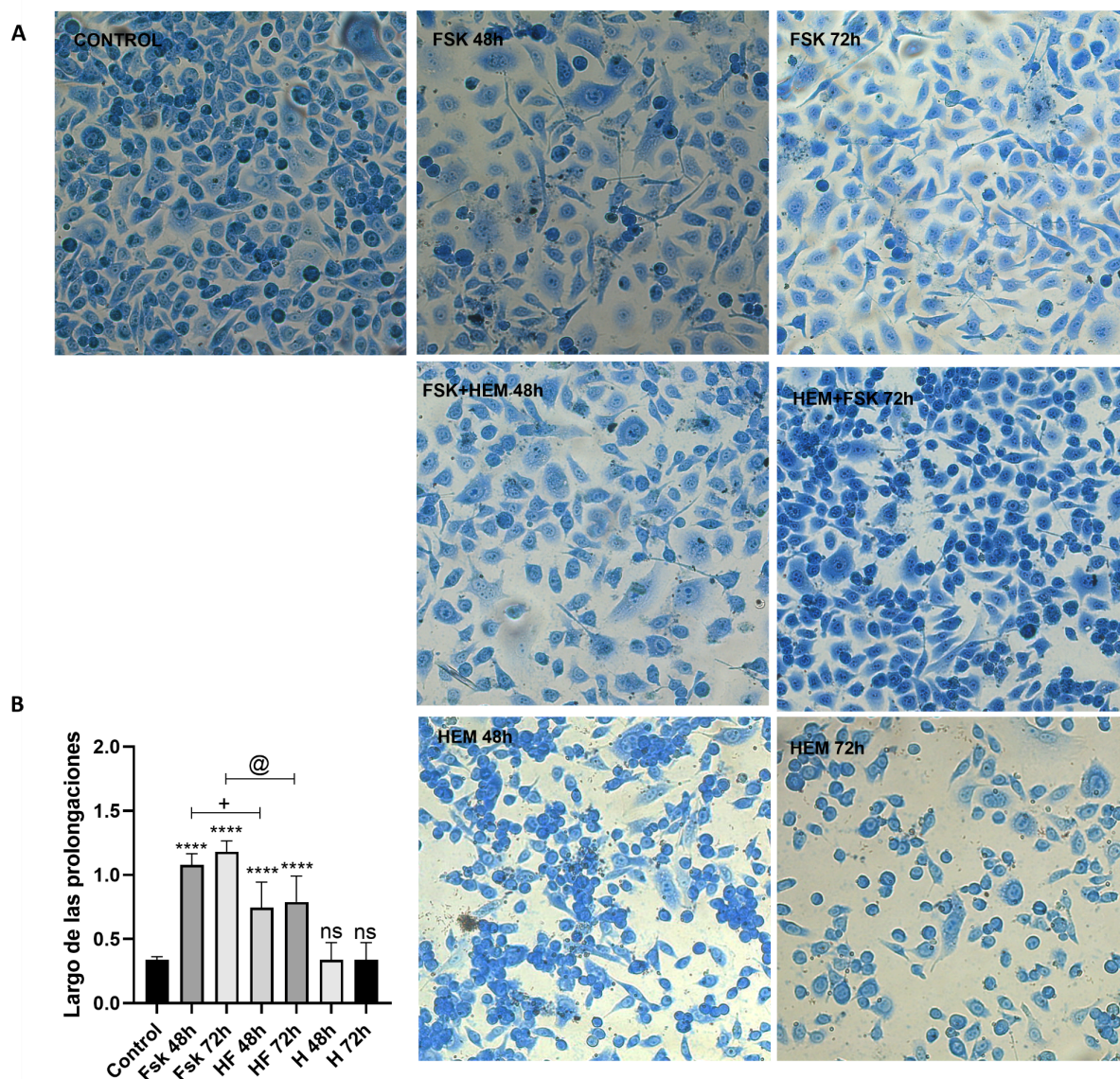


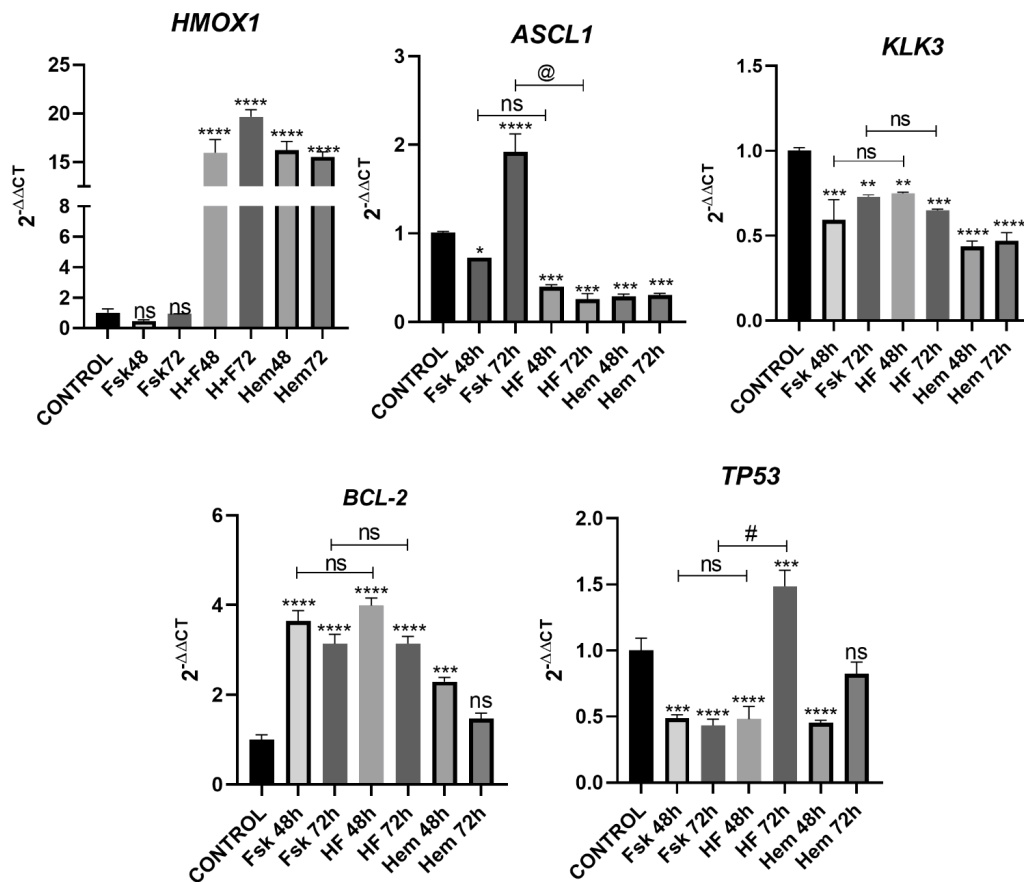
Figura 30. Efecto de la inducción de HO-1 mediante el tratamiento con hemina en células PC3 sometidas a un protocolo de transdiferenciación. A) Imágenes representativas de células PC3 teñidas con Azul de Metileno en distintas condiciones: control, Fsk 48 h y 72 h (FSK), Fsk + hemina

(FSK+HEM) a 48 h y 72 h, hemina (HEM) 48 h y 72 h. **B)** Cuantificación del largo de las prolongaciones. Los resultados se muestran como media $\pm$ S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0,05$ siendo ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, + $p < 0,01$, @ $p < 0,0001$

3.2. EFECTOS MOLECULARES DE LA MODULACIÓN DE HO-1 EN LA TRANSDIFERENCIACIÓN PROMOVIDA POR EL TRATAMIENTO CON FSK

Como se describió en la sección anterior, la inducción de HO-1 mediante el tratamiento con hemina en células de PCa sometidas a un protocolo de transdiferenciación con Fsk, promueve la reversión del fenotipo NE a nivel morfológico (**Figuras 29-30**). A continuación, se evaluó por RT-qPCR la expresión de *HMOX1* y de marcadores NE. Los resultados muestran que, tanto en células C4-2B como PC3, la expresión de *HMOX1* disminuyó significativamente como consecuencia del tratamiento con Fsk. El agregado de hemina (80 μ M, 48 h y 72 h) sola o en presencia de Fsk indujo significativamente los niveles transcriptómicos de *HMOX1* (**Figuras 31-32**).

A



B

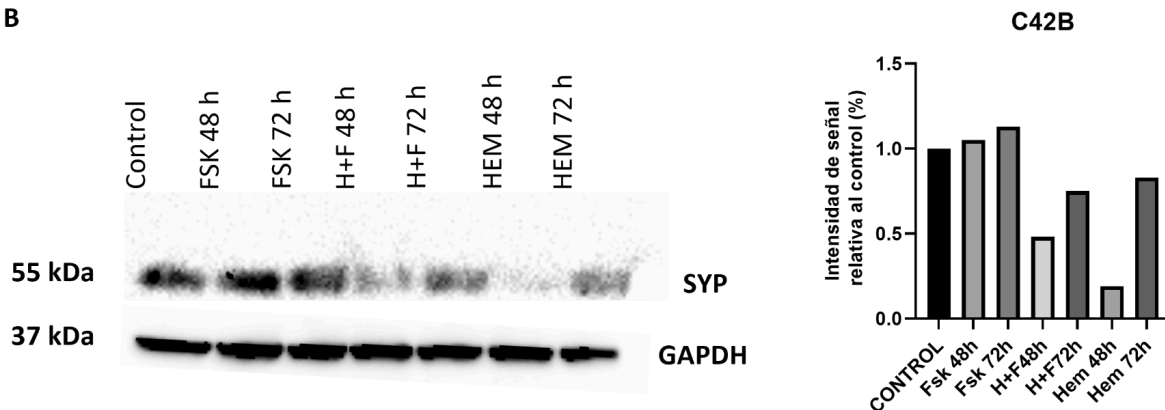


Figura 31. Evaluación del efecto del tratamiento con hemina sobre marcadores de transdiferenciación NE en la línea celular sensible a andrógenos C4-2B. A) Los niveles de expresión de *ASCL1*, *KLK3*, *BCL-2*, *TP53* y *HMOX1* se evaluaron mediante RT-qPCR en células C4-2B tratadas con Fsk 10 μ M, hemina 80 μ M y la combinación de ambas drogas durante 48 h y 72 h. Se utilizó *PPIA* como gen de referencia. Cada condición está relativizada al control. **B)** Evaluación de la expresión de Sinaptofisina (SYP) mediante Western Blot en células C4-2B sometidas a distintos tratamientos. Se evaluaron los niveles de GAPDH como control de carga. La cuantificación se realizó mediante un

análisis de densitometría utilizando el software Fiji. Los resultados se muestran como media $\pm$ S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0,05$ siendo $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$; $\#p < 0,0001$; $@p < 0,001$.

A su vez, se determinó la expresión de *ASCL1*, *KLK3*, *BCL-2* y *TP53* en la línea celular C4-2B. Se observó que la expresión de *ASCL1* aumentó con el tratamiento con Fsk 72 h. Dicho incremento no se detectó cuando se trataron las células con ambas drogas (**Figura 31A**). La expresión de *KLK3*, marcador de la vía androgénica, disminuyó como consecuencia del tratamiento con Fsk, hemina y con la combinación de ambas drogas (**Figura 31A**). La expresión de *BCL-2*, un factor antiapoptótico que normalmente se encuentra sobreexpresado en células NEPC, fue mayor en las células tratadas con Fsk en comparación con el control (**Figura 31A**). El tratamiento con ambas drogas no revirtió el efecto observado con Fsk sola (**Figura 31A**). La expresión de *TP53* disminuyó significativamente con todos los tratamientos a excepción de la combinación de hemina y Fsk 72 h, en la cual se obtuvo un aumento de casi el doble. En paralelo, también se determinó la expresión proteica de Sinaptofisina (SYP) mediante Western blot, observando un aumento asociado al tratamiento con Fsk (**Figura 31B**). Interesantemente, la combinación de Fsk y hemina 48 h disminuyó la expresión de dicho marcador NE (**Figura 31B**).

En cuanto a la línea celular PC3, los resultados muestran que la Fsk indujo un aumento de la expresión de *NSE*, la enolasa específica de neurona, a las 72 h de tratamiento, efecto que se revirtió al agregar hemina (**Figura 32**). Al evaluar la expresión de *BCL-2*, se observó que la combinación de Fsk y hemina (72 h) disminuyó la expresión de este marcador a pesar de que el efecto de las drogas por separado fue el opuesto (**Figura 32**). Los niveles de expresión de *NCAM1*, marcador de adhesión neuronal, se modularon de manera similar a los de *NSE*, ya que se observó un aumento en su expresión como consecuencia del tratamiento con Fsk 72 h o hemina 72 h (**Figura 32**). A su vez, los niveles de expresión de *NCAM1* disminuyeron con la combinación de ambas drogas en ambos tiempos de tratamiento (**Figura 32**). Por último, al determinar mediante Western blot la expresión de CHGA, se observó un aumento dependiente del tiempo del tratamiento con Fsk (**Figura 32B**). Si bien contamos con una sola réplica del Western Blot, parecería ser que el agregado de hemina al tratamiento con Fsk no promueve la disminución de la expresión de CHGA (**Figura 32B**).

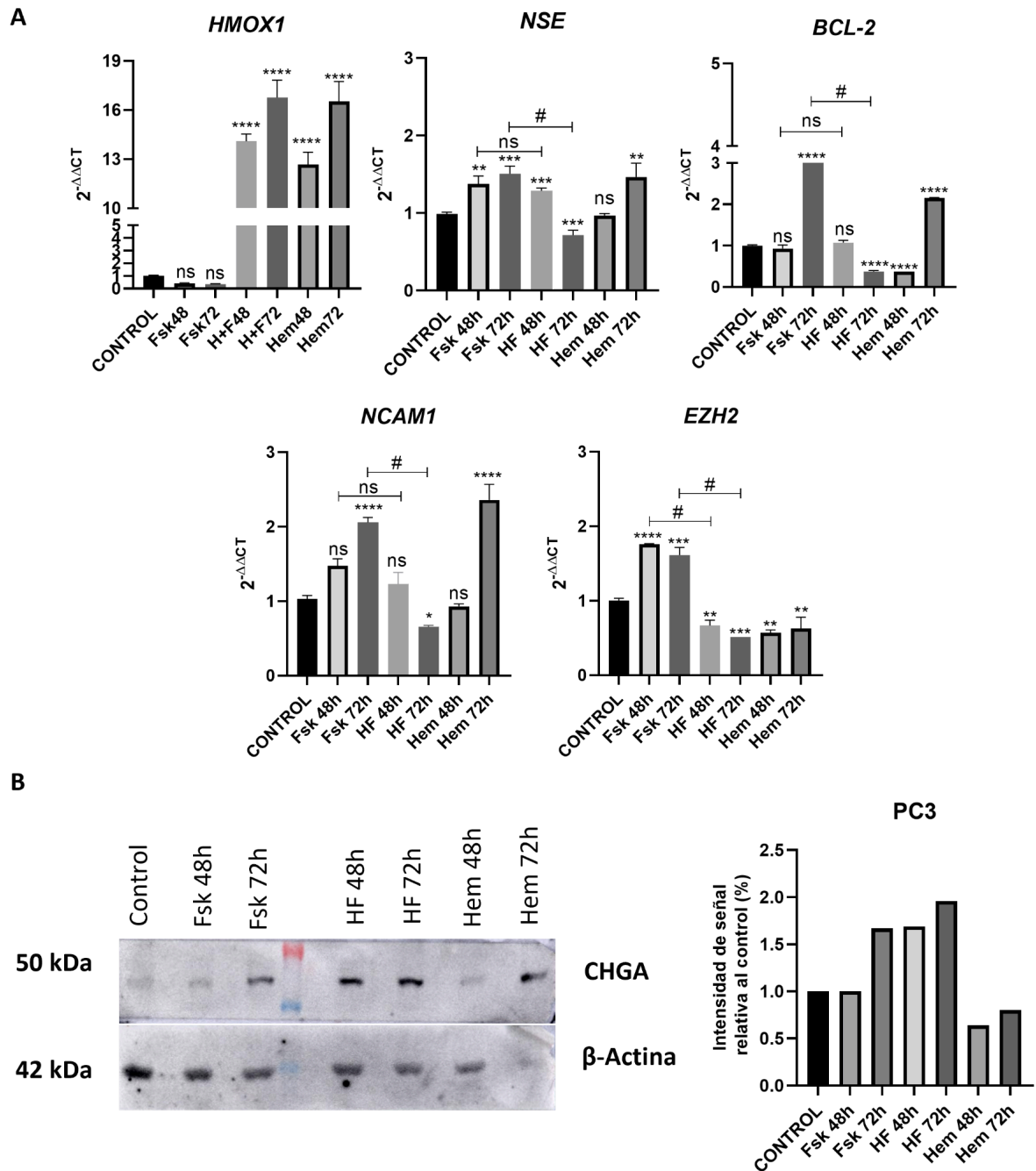


Figura 32. Evaluación del efecto del tratamiento con Hemina sobre marcadores de transdiferenciación en células de la línea PC3, insensible a andrógenos. A) Los niveles de expresión génica de *NSE*, *BCL-2*, *NCAM1*, *EZH2* y *HMOX1* se evaluaron mediante RT-qPCR en células tratadas con Fsk 10 μ M, Hemina 80 μ M y la combinación de ambas drogas durante 48 h y 72 h. Se utilizó *GAPDH* como gen de referencia y a su vez cada condición está relativizada al control. **B)** Western blot de CHGA y β -actina (control de carga) partiendo de lisados celulares de PC3 control y tratadas. La cuantificación se realizó mediante un análisis de densitometría utilizando el software Fiji. Los resultados se muestran como media $\pm$ S.E.M. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0,05$

siendo ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; # $p < 0,0001$.

En conjunto, estos resultados demuestran que la inducción de HO-1 mediante el tratamiento con hemina modula de manera significativa la transdiferenciación NE inducida por Fsk en líneas celulares de PCa. La sobreexpresión de *HMOX1* se asoció con la reversión parcial del fenotipo NE, evidenciada tanto por la recuperación de características morfológicas epiteliales como por la disminución de marcadores moleculares asociados a la diferenciación neuroendócrina. Estos hallazgos sugieren que HO-1 podría desempeñar un papel regulador en la plasticidad celular del PCa, actuando como un posible modulador negativo del programa de transdiferenciación NE y abriendo nuevas perspectivas sobre su relevancia funcional en la progresión hacia NEPC.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis demuestran por primera vez que HO-1 y sus interactores nucleares desempeñan un rol activo en la regulación de la plasticidad tumoral del PCa. A través de un abordaje integral que combinó análisis proteómicos, transcriptómicos, modelos pre-clínicos, datos de pacientes y ensayos de transdiferenciación, se identificó un conjunto de interactores nucleares de HO-1 —entre ellos BCLAF1, SAFB, ILF3 y DDX17— capaces de modular la expresión génica y asociarse a fenotipos clínicos agresivos como el NEPC. Asimismo, se demostró que la inducción de HO-1 mediante el tratamiento con hemina revierte parcialmente la transdiferenciación NE *in vitro*, evidenciando que actúa como un regulador negativo del programa neuroendócrino y de la plasticidad tumoral. En conjunto, estos hallazgos aportan una visión innovadora y multidimensional del papel de HO-1, posicionándola no sólo como un sensor de estrés celular, sino como un modulador nuclear con impacto directo en la progresión, heterogeneidad y diferenciación del PCa.

El interactoma nuclear de HO-1 identificado en este trabajo constituye el primer mapa experimental que describe sus asociaciones nucleares en células de PCa. Las proteínas nucleares detectadas, muchas de ellas implicadas en la organización de la cromatina, el procesamiento de ARN y la regulación transcripcional, revelan un espectro funcional que trasciende las funciones clásicas de HO-1 en el citoplasma. Este conjunto de interacciones, validado mediante co-inmunoprecipitación y análisis bioinformáticos, muestra que HO-1 puede integrarse en complejos transcripcionales que controlan la expresión de genes vinculados a diferenciación, apoptosis y remodelación estructural, sugiriendo un **rol de co-regulador nuclear**. Esta observación, junto con el hallazgo de que la expresión coordinada de *HMOX1* y sus interactores permite distinguir tumores NEPC en modelos de PDX y en cohortes de pacientes, redefine el papel de HO-1 dentro del panorama molecular del PCa avanzado.

En este contexto, los resultados de esta tesis se alinean con una evidencia creciente que atribuye a HO-1 funciones no canónicas relacionadas con la regulación génica, la respuesta al daño en el ADN y la reprogramación epigenética (143,144). Diversos autores han demostrado que la translocación nuclear de HO-1 puede modificar la expresión de genes de adhesión, proliferación y respuesta inflamatoria (65,88). Sin embargo, hasta el momento no se había documentado un vínculo entre esta localización nuclear y la plasticidad de linaje en

PCa. Estos hallazgos son relevantes en el contexto actual de la literatura, que reconoce a HO-1 como una enzima de comportamiento dual en cáncer, capaz de ejercer funciones protectoras o pro-tumorales según el contexto celular, la magnitud del estrés oxidativo y su localización subcelular (56,143).

En los últimos años se ha consolidado la idea de que HO-1 cumple un papel esencial en la respuesta adaptativa frente al estrés oxidativo e inflamatorio. Su inducción por hemina, hipoxia o citoquinas activa un programa citoprotector que involucra la degradación del grupo hemo y la generación de BV, BR, CO y Fe^{+2} (54). Estos productos poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas, capaces de **modular vías centrales como Nrf2/ARE, NF- κ B, MAPK/ERK, PI3K/Akt y STAT3** (56,82).

Los resultados de esta tesis confirman y amplían ese conocimiento al demostrar que la inducción farmacológica de HO-1 en células de PCa (PC3 y C4-2B) no solo regula la respuesta oxidativa, sino que también **modula la morfología, la adhesión y la expresión de marcadores de diferenciación**. Esta evidencia es consistente con observaciones previas de nuestro grupo que mostraron que la sobreexpresión de *HMOX1* reduce la proliferación, migración e invasión tumoral (66,67), y que su inducción está asociada con una disminución de *VEGFA*, *VEGFC*, *HIF1A* e *ITGA5*, acompañada de una menor vascularización tumoral (82).

El trabajo reciente de Ben-Eltriki y colaboradores plantea que la dualidad funcional de HO-1 depende de la magnitud del estrés oxidativo: ante un aumento masivo de ROS, HO-1 asume un rol protector y anti-tumoral, mientras que incrementos moderados pueden favorecer la supervivencia tumoral (56). En este contexto, los resultados obtenidos se alinean con la primera situación, dado que la inducción de HO-1 en las condiciones experimentales empleadas condujo a un fenotipo menos agresivo y a una reversión parcial de la transdiferenciación NE. Esto sugiere que, en PCa, **la función de HO-1 podría depender de un umbral de expresión y de la localización subcelular**, donde su actividad nuclear represiva predomina sobre los efectos pro-supervivencia descritos en otros modelos.

Uno de los aportes más significativos de esta tesis es la **caracterización del interactoma nuclear de HO-1** mediante aproximaciones proteómicas y bioinformáticas. Los resultados

revelaron la interacción de HO-1 con proteínas involucradas en la regulación transcripcional, la estructura de la cromatina y el procesamiento de ARN, entre ellas **BCLAF1**, **SAFB**, **ILF3** y **DDX17**. Este hallazgo constituye una evidencia sólida de que HO-1 participa directamente en la modulación de la expresión génica, posiblemente actuando como co-regulador o modulador epigenético.

La presencia nuclear de HO-1 ha sido documentada previamente en distintos tipos de cáncer, incluyendo próstata, melanoma y hepatocarcinoma (65,144). En PCa, Sacca *et al.* fueron los primeros en demostrar que HO-1 se localiza en el núcleo de células tumorales humanas, donde se asocia con un fenotipo menos proliferativo (66). Posteriormente, Ferrando *et al.* (82) y Gueron *et al.* (67) demostraron que la sobreexpresión de HO-1 modula genes de adhesión celular y remodelación del citoesqueleto, alterando la morfología tumoral. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman y amplían dichas observaciones, aportando un mapa interactómico detallado que vincula a HO-1 con reguladores transcripcionales y del metabolismo del ARN, sugiriendo un rol integrador entre el estrés oxidativo y la regulación de la expresión génica.

En particular, la interacción de HO-1 con **BCLAF1** y **SAFB** resulta de gran interés, ya que ambos factores actúan como co-reguladores de la transcripción y participan en la respuesta al daño en el ADN y en la represión de genes asociados a proliferación (114,115). Nuestros análisis en bases de datos de PDXs y cohortes de pacientes (35) mostraron que la combinación de **baja expresión de HMOX1** y **alta expresión de sus interactores nucleares se asocia con el fenotipo NEPC**, lo cual sugiere que el equilibrio funcional entre HO-1 y estos co-factores puede definir la transición entre estados luminales y neuroendócrinos.

Estos resultados permiten proponer que **HO-1 actúa como un “buffer” transcripcional**, interfiriendo con complejos de coactivadores asociados a la reprogramación NE y estabilizando un programa génico más diferenciado y epitelial. Este rol no había sido descrito previamente y constituye uno de los aportes más originales de esta tesis.

Un aspecto central de este trabajo fue la validación del eje **HMOX1–BCLAF1–SAFB–ILF3–DDX17** en **modelos de PDX** del MD Anderson Cancer Center, así

como en la cohorte transcriptómica de Beltran *et al.* (35). Este análisis permitió establecer un puente directo entre los hallazgos moleculares obtenidos en modelos *in vitro* y su expresión en tumores humanos, demostrando la **relevancia clínica y biológica del interactoma nuclear de HO-1**.

Los modelos de PDX constituyen una herramienta fundamental para el estudio del PCa avanzado, ya que preservan la arquitectura tumoral, la heterogeneidad intratumoral y las características genómicas y epigenéticas del tumor original (145,146). A diferencia de las líneas celulares establecidas, los PDX permiten analizar la dinámica de la evolución clonal, la respuesta a terapias y la emergencia de subtipos histológicos, como el **CRPC** y el **NEPC**. En este contexto, el uso de los PDXs brindó la posibilidad de evaluar la expresión de *HMOX1* y sus interactores en un sistema que reproduce fielmente la complejidad tumoral humana.

Los resultados mostraron que el grupo conformado por ***HMOX1*, *BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3* y *DDX17*** permitió **estratificar los PDXs NEPC** en un clúster independiente, tanto en el análisis de 799 genes target derivados de ChIP-Atlas como en el modelo reducido de 5 genes. Este hallazgo es notable por dos razones. En primer lugar, demuestra que un conjunto de genes regulados por HO-1 es suficiente para **discriminar tumores con características NE** sin necesidad de incluir marcadores clásicos como CHGA o SYP. En segundo lugar, sugiere que el **estado funcional de HO-1** —reflejado por su expresión y la de sus interactores— **constituye un eje transcriptómico distintivo** del fenotipo NE.

El hecho de que los PDXs NEPC se agruparan de manera consistente con **baja expresión de *HMOX1* y alta expresión de *BCLAF1*, *SAFB* e *ILF3*** sugiere un **efecto represor de HO-1 sobre la reprogramación NE**. Esto concuerda con nuestros datos *in vitro*, donde la inducción de HO-1 mediante el uso de hemina revirtió parcialmente el fenotipo NE. En conjunto, los análisis de PDXs y de pacientes sostienen que la **pérdida de HO-1 podría facilitar la transición transcripcional hacia NEPC**, mientras que su inducción restablece un programa génico epitelial.

Los resultados obtenidos en los **PDXs longitudinales MDA PCa 146-10 y 146-12** aportan además evidencia directa de la **plasticidad intratumoral** y de la relevancia del eje HO-1 en

ese proceso. Ambos PDXs derivan del mismo tumor primario, pero representan regiones histológicamente distintas: una con patrón adenocarcinoma (146-12) y otra con fenotipo NE (146-10). La comparación de sus perfiles transcriptómicos mostró que la región NE exhibe **reducción significativa de *HMOX1*** y aumento de ***BCLAF1*, *SAFB* e *ILF3***, reforzando la hipótesis de que la pérdida de HO-1 se asocia a la dediferenciación y al surgimiento del fenotipo NE.

En paralelo, el análisis del *dataset* de Beltran *et al.* confirmó estos resultados en muestras clínicas humanas (35). Tanto en el conjunto extendido (799 genes) como en el modelo reducido (5 genes), los tumores **CRPC-NE** se agruparon con **baja expresión de *HMOX1*** y **sobre-expresión de sus interactores nucleares**, validando el patrón identificado en PDXs. Además, los resultados obtenidos durante este trabajo mostraron una asociación significativa entre la **baja expresión de *HMOX1*** y la **sobre-expresión de *BCLAF1*, *SAFB* e *ILF3*** en muestras NEPC frente a adenocarcinomas.

En conjunto, estos hallazgos indican que el eje ***HMOX1*–*BCLAF1*–*SAFB*–*ILF3*–*DDX17*** no solo define un circuito molecular relevante en células tumorales, sino que también posee potencial clasificatorio y pronóstico en pacientes. La coherencia entre los datos de proteómica, bioinformática y cohortes clínicas sugiere que **HO-1 ejerce un control transcripcional jerárquico que regula factores asociados a la plasticidad y la diferenciación celular**.

Desde una perspectiva traslacional, emplear PDXs no sólo permitió validar la relevancia de ***HMOX1*–*BCLAF1*–*SAFB*–*ILF3*–*DDX17*** en la biología del PCa, sino también **posicionar este eje como biomarcador de transición hacia NEPC**. La identificación de patrones transcriptómicos reproducibles entre PDXs y pacientes ofrece una base sólida para el desarrollo de **paneles diagnósticos o pronósticos** basados en la expresión de *HMOX1* y sus interactores.

En síntesis, los resultados derivados del análisis de PDXs aportan una validación *in vivo* y clínica fundamental, consolidando la hipótesis de que **HO-1 actúa como un modulador de la plasticidad tumoral en el PCa**, cuya pérdida favorece la emergencia de fenotipos NE y cuya inducción podría representar una estrategia terapéutica para revertir o prevenir esta

transición.

Además, la integración con análisis de transcriptómica espacial demuestra que **los patrones de expresión de *HMOX1* y de sus interactores varían según la topografía tumoral**. En regiones NEPC, la expresión de *BCLAF1*, *SAFB* e *ILF3* es mayor, mientras que la de *HMOX1* tiende a disminuir, lo cual sugiere la existencia de microdominios funcionales dentro del tumor donde la actividad de HO-1 podría modular selectivamente la reprogramación celular.

La segunda parte de esta tesis abordó el impacto de la inducción de HO-1 sobre la transdiferenciación NE, un proceso de gran relevancia clínica en la progresión del PCa hacia formas más agresivas. Se observó que el tratamiento con Fsk, un activador de la vía del AMPc, promovió una morfología celular alargada, compatible con la diferenciación NE, junto con la sobreexpresión de marcadores como *ASCL1*, *NSE*, *CHGA* y *SYP*. La co-inducción con hemina revirtió parcialmente estos cambios, disminuyendo los niveles de dichos marcadores y restableciendo características epiteliales.

Estos resultados son consistentes con la literatura que vincula la activación de CREB, STAT3 y PI3K/Akt con la reprogramación NE (35,147). La observación de que HO-1 modula este proceso sugiere que su inducción interfiere con la cascada CREB/STAT3, posiblemente a través de su interacción con co-factores nucleares o mediante regulación indirecta de la señalización de AR (67). De hecho, estudios previos de nuestro grupo demostraron que HO-1 puede secuestrar a STAT3 en el citoplasma e inhibir la transcripción de genes diana como el AR (82). En este marco, la presente tesis aporta evidencia funcional de que la inducción de HO-1 también puede **revertir la pérdida de diferenciación luminal y la activación de programas NE**, lo que posiciona a HO-1 como un modulador clave de la plasticidad tumoral.

Ben-Eltriki *et al.* (56) revisaron más de 70 estudios experimentales y concluyeron que el rol de HO-1 en PCa depende críticamente de su localización: mientras la forma citoplásmica promueve la supervivencia tumoral, la nuclear está asociada con control del crecimiento y diferenciación. Nuestros datos apoyan esta hipótesis y proponen que la translocación nuclear de HO-1 inducida por hemina representa un mecanismo activo de regulación de la expresión génica que limita la adquisición de un fenotipo NE.

La evidencia presentada sugiere que HO-1 no solo actúa como una enzima antioxidante, sino que **funciona como un sensor y modulador de plasticidad celular**, integrando señales de estrés redox, inflamación y diferenciación. Este concepto se alinea con el modelo de “*cellular adaptation*” propuesto por Nitti *et al.* (143), según el cual la inducción sostenida de HO-1 promueve un estado de equilibrio adaptativo que previene la transformación maligna.

En el caso del PCa, la inducción de HO-1 podría **favorecer la estabilidad epitelial**, contrarrestando los efectos del microambiente inflamatorio y la presión terapéutica que inducen plasticidad y transdiferenciación. Nuestros resultados respaldan esta visión, demostrando que la inducción de HO-1 no solo reduce la expresión de marcadores NE, sino que también modifica la morfología celular y el patrón de adhesión, sugiriendo un retorno a un fenotipo menos invasivo.

A nivel molecular, esto podría explicarse por la interacción de HO-1 con complejos transcripcionales que regulan genes de citoesqueleto y adhesión celular (como E-cadherina, β -catenina y ANXA2), tal como describieron Ferrando *et al.* (82) y Anselmino *et al.* El modelo propuesto por esta tesis plantea que la localización nuclear de **HO-1 se asocia con la represión de la transdiferenciación asociada a NEPC** y activa vías epiteliales mediadas por E-cadherina (148), contribuyendo así a la plasticidad reversible del tumor.

Desde una perspectiva traslacional, estos hallazgos poseen implicancias significativas. La transición hacia un fenotipo NE constituye uno de los principales mecanismos de resistencia a las terapias anti-androgénicas de nueva generación (149). La posibilidad de intervenir farmacológicamente este proceso mediante la inducción de HO-1 abre una vía terapéutica alternativa y complementaria. Compuestos como la hemina, curcumina, atorvastatina o ácido corosólico se han descrito como inductores de HO-1 en modelos de PCa (56). En este trabajo, la inducción por hemina demostró efectos consistentes con un freno a la transdiferenciación NE, lo cual refuerza la hipótesis de que la **activación controlada de HO-1 podría restaurar la diferenciación luminal y limitar la progresión hacia NEPC**. Así, la validación de *HMOX1* y sus interactores nucleares (*BCLAF1*, *SAFB*, *ILF3*) como posibles biomarcadores de plasticidad y progresión podría tener relevancia clínica, permitiendo estratificar pacientes con alto riesgo de conversión NE y ajustar terapias combinadas.

No obstante, dada la naturaleza dual de HO-1, su utilización terapéutica requiere precaución. La literatura señala que la sobreexpresión sostenida o desregulada de HO-1 puede conferir ventajas de supervivencia a las células tumorales bajo hipoxia o estrés (49,59). En consecuencia, sería deseable considerar estrategias de inducción transitoria o dirigida a la fracción nuclear, evitando sus efectos pro-angiogénicos o anti-apoptóticos citoplasmáticos.

En conjunto, los resultados de esta tesis aportan una **visión renovada del rol de HO-1 en el PCa, que trasciende su función enzimática clásica para posicionarla como un regulador nuclear de plasticidad y diferenciación**. Se demuestra que HO-1 interactúa con co-factores transcripcionales nucleares, modula programas génicos asociados a la identidad celular y limita la transición hacia un fenotipo NE. Estos hallazgos integran y expanden la evidencia previa que atribuye a HO-1 funciones duales en el cáncer, proponiendo un modelo donde la localización nuclear de HO-1 ejerce efectos anti-tumorales y modula la plasticidad celular, mientras que su expresión citoplasmática podría favorecer la adaptación tumoral.

La inducción farmacológica de HO-1, en condiciones controladas, emerge así como una estrategia potencial para restaurar la diferenciación epitelial y limitar la progresión a NEPC. Este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones destinadas a explotar terapéuticamente las funciones nucleares de HO-1, con el objetivo de desarrollar intervenciones innovadoras en un subtipo de PCa de mal pronóstico y actualmente sin opciones terapéuticas eficaces.

REFERENCIAS

1. Marley J. Campbell-Walsh Urology, 9th Edition (E-dition) - Edited by AJ Wein, LR Kavoussi, AC Novick, AW Partin and CA Peters. Int J Urol Nurs. 2007;1(2):94-5.
2. Pawlina W. Ross. Histología: Texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular, 8e. Ross MH, editor. Lippincott Williams & Wilkins; 2020.
3. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. Nat Rev Cancer. abril de 2007;7(4):256-69.
4. Rane JK, Pellacani D, Maitland NJ. Advanced prostate cancer—a case for adjuvant differentiation therapy. Nat Rev Urol. octubre de 2012;9(10):595-602.
5. Rane JK, Pellacani D, Maitland NJ. Advanced prostate cancer—a case for adjuvant differentiation therapy. Nat Rev Urol. octubre de 2012;9(10):595-602.
6. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. Nat Rev Cancer. octubre de 2001;1(1):34-45.
7. Braun M, Perner S. [High-grade prostatic intraepithelial neoplasia: the only accepted prostate cancer precursor lesion]. Pathol. noviembre de 2011;32 Suppl 2:237-41.
8. 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. mayo de 2008;179(5):1762-7; discussion 1767.
9. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. Am J Surg Pathol. diciembre de 1988;12(12):897-906.
10. Cáncer de próstata | Información y resumen del cáncer de próstata [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <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. 8 de septiembre de 2016;35(1):139.
12. Global Cancer Observatory [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/en>
13. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. mayo de 2021;71(3):209-49.
14. Are You at Higher Risk? [Internet]. Prostate Cancer Foundation. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.pcf.org/patient-support/higher-risk/>
15. Rubin MA, Demichelis F. The Genomics of Prostate Cancer: emerging understanding with technologic advances. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. enero de 2018;31(S1):S1-11.

16. 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.* mayo de 1994;151(5):1283-90.
17. Comprehensive Cancer Information - NCI [Internet]. 1980 [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/>
18. Sekhoacha M, Riet K, Motloung P, Gumenku L, Adegoke A, Mashele S. Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Mol Basel Switz.* 5 de septiembre de 2022;27(17):5730.
19. Filella X, Foj L, Milà M, Augé JM, Molina R, Jiménez W. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* junio de 2013;34(3):1337-47.
20. 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.* 16 de marzo de 2011;103(6):462-9.
21. Prognosis: Proportionate response | Nature [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/528S124a>
22. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. 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.* febrero de 2016;40(2):244-52.
23. Prostate Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging.html>
24. Morton RA, Isaacs WB. Molecular genetics of prostate cancer: clinical applications. *J Natl Med Assoc.* noviembre de 1998;90(11 Suppl):S728-731.
25. Barbieri CE, Demichelis F, Rubin MA. Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity. *Histopathology.* enero de 2012;60(1):187-98.
26. Gleason DF, Mellinger GT, Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging. *J Urol.* febrero de 2017;197(2S):S134-9.
27. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* marzo de 1966;50(3):125-8.
28. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* marzo de 1992;23(3):273-9.
29. Rybak AP, Bristow RG, Kapoor A. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins

and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget*. 10 de febrero de 2015;6(4):1900-19.

30. Lage Vickers S. La integración de estudios “ómicos” revela nuevos biomarcadores pronóstico en el cáncer de próstata [Internet] [Tesis Doctoral]. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 2020 [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/tesis/document/tesis_n6800_LageVickers
31. Logothetis CJ, Gallick GE, Maity SN, Kim J, Aparicio A, Efstathiou E, et al. Molecular classification of prostate cancer progression: foundation for marker-driven treatment of prostate cancer. *Cancer Discov*. agosto de 2013;3(8):849-61.
32. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, et al. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 4 de febrero de 2021;7(1):9.
33. Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer—An Intriguing Example of Tumor Evolution at Play - PMC [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6826557/>
34. Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, Zhang L, Feng FY, Thomas GV, et al. Clinical and Genomic Characterization of Treatment-Emergent Small-Cell Neuroendocrine Prostate Cancer: A Multi-institutional Prospective Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de agosto de 2018;36(24):2492-503.
35. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med*. marzo de 2016;22(3):298-305.
36. Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, Zhang L, Feng FY, Thomas GV, et al. Clinical and Genomic Characterization of Treatment-Emergent Small-Cell Neuroendocrine Prostate Cancer: A Multi-institutional Prospective Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de agosto de 2018;36(24):2492-503.
37. Romero R, Chu T, González Robles TJ, Smith P, Xie Y, Kaur H, et al. The neuroendocrine transition in prostate cancer is dynamic and dependent on ASCL1. *Nat Cancer*. noviembre de 2024;5(11):1641-59.
38. Zhang W, Liu B, Wu W, Li L, Broom BM, Basourakos SP, et al. Targeting the MYCN–PARP–DNA Damage Response Pathway in Neuroendocrine Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*. 31 de enero de 2018;24(3):696-707.
39. Franceschini GM, Quaini O, Mizuno K, Orlando F, Ciani Y, Ku SY, et al. Noninvasive Detection of Neuroendocrine Prostate Cancer through Targeted Cell-free DNA Methylation. *Cancer Discov*. 1 de marzo de 2024;14(3):424-45.
40. Dong B, Miao J, Wang Y, Luo W, Ji Z, Lai H, et al. Single-cell analysis supports a luminal-neuroendocrine transdifferentiation in human prostate cancer. *Commun Biol*. 16

de diciembre de 2020;3:778.

41. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4 de marzo de 2011;144(5):646-74.
42. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 19 de diciembre de 2002;420(6917):860-7.
43. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet Lond Engl*. 17 de febrero de 2001;357(9255):539-45.
44. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. julio de 2009;30(7):1073-81.
45. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 19 de marzo de 2010;140(6):883-99.
46. 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.
47. Thapa D, Ghosh R. Antioxidants for prostate cancer chemoprevention: challenges and opportunities. *Biochem Pharmacol*. 15 de mayo de 2012;83(10):1319-30.
48. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. julio de 1988;2(10):2557-68.
49. 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*. 24 de agosto de 2024;25(17):9195.
50. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. junio de 2007;13(6):703-10.
51. Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med Berl Ger*. octubre de 2008;86(10):1097-111.
52. Gueron G, De Siervi A, Vazquez E. Key questions in metastasis: new insights in molecular pathways and therapeutic implications. *Curr Pharm Biotechnol*. noviembre de 2011;12(11):1867-80.
53. 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.
54. Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*. abril de 2006;86(2):583-650.

55. Luu Hoang KN, Anstee JE, Arnold JN. The Diverse Roles of Heme Oxygenase-1 in Tumor Progression. *Front Immunol.* 2021;12:658315.
56. Ben-Eltriki M, Gayle EJ, Walker N, Deb S. Pharmacological Significance of Heme Oxygenase 1 in Prostate Cancer. *Curr Issues Mol Biol.* 15 de mayo de 2023;45(5):4301-16.
57. Hwang HW, Lee JR, Chou KY, Suen CS, Hwang MJ, Chen C, et al. Oligomerization is crucial for the stability and function of heme oxygenase-1 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 21 de agosto de 2009;284(34):22672-9.
58. Huber lii WJ, Scruggs BA, Backes WL. C-Terminal membrane spanning region of human heme oxygenase-1 mediates a time-dependent complex formation with cytochrome P450 reductase. *Biochemistry.* 13 de enero de 2009;48(1):190-7.
59. Was H, Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr Drug Targets.* diciembre de 2010;11(12):1551-70.
60. Kim HP, Pae HO, Back SH, Chung SW, Woo JM, Son Y, et al. Heme oxygenase-1 comes back to endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun.* 1 de enero de 2011;404(1):1-5.
61. Yang Q, Wang W. The Nuclear Translocation of Heme Oxygenase-1 in Human Diseases. *Front Cell Dev Biol [Internet].* 29 de junio de 2022 [citado 29 de octubre de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2022.890186/full>
62. Patel HH, Insel PA. Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* junio de 2009;11(6):1357-72.
63. Ewing JF, Maines MD. Regulation and expression of heme oxygenase enzymes in aged-rat brain: age related depression in HO-1 and HO-2 expression and altered stress-response. *J Neural Transm Vienna Austria 1996.* abril de 2006;113(4):439-54.
64. Bansal S, Biswas G, Avadhani NG. Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in macrophages, kidney fibroblasts and in chronic alcohol hepatotoxicity. *Redox Biol.* 2014;2:273-83.
65. Lin Q, Weis S, Yang G, Weng YH, Helston R, Rish K, et al. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem.* 13 de julio de 2007;282(28):20621-33.
66. 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. *Br J Cancer.* 17 de diciembre de 2007;97(12):1683-9.
67. 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 MCR.* noviembre de 2009;7(11):1745-55.

68. Hong KS, Kim BJ, Lee JY, Kwon SU, PICASSO Investigators. Rationale and design of the Prevention of Cardiovascular events in iSchemic Stroke patients with high risk of cerebral hemorrhage (PICASSO) study: A randomized controlled trial. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc.* octubre de 2015;10(7):1153-8.
69. Sass G, Leukel P, Schmitz V, Raskopf E, Ocker M, Neureiter D, et al. Inhibition of heme oxygenase 1 expression by small interfering RNA decreases orthotopic tumor growth in livers of mice. *Int J Cancer.* 15 de septiembre de 2008;123(6):1269-77.
70. Nuhn P, Künzli BM, Hennig R, Mitkus T, Ramanauskas T, Nobiling R, et al. Heme oxygenase-1 and its metabolites affect pancreatic tumor growth in vivo. *Mol Cancer.* 9 de junio de 2009;8:37.
71. Kang KA, Maeng YH, Zhang R, Yang YR, Piao MJ, Kim KC, et al. Involvement of heme oxygenase-1 in Korean colon cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* agosto de 2012;33(4):1031-8.
72. Schacter BA, Kurz P. Alterations in hepatic and splenic microsomal electron transport system components, drug metabolism, heme oxygenase activity, and cytochrome P-450 turnover in Murphy-Sturm lymphosarcoma-bearing rats. *Cancer Res.* septiembre de 1982;42(9):3557-64.
73. Maines MD, Abrahamsson PA. Expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in human prostate: normal, hyperplastic, and tumor tissue distribution. *Urology.* mayo de 1996;47(5):727-33.
74. Li Y, Su J, DingZhang X, Zhang J, Yoshimoto M, Liu S, et al. PTEN deletion and heme oxygenase-1 overexpression cooperate in prostate cancer progression and are associated with adverse clinical outcome. *J Pathol.* 1 de mayo de 2011;224(1):90-100.
75. Shimizu H, Kumabe T, Tominaga T, Kayama T, Hara K, Ono Y, et al. Noninvasive evaluation of malignancy of brain tumors with proton MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol.* abril de 1996;17(4):737-47.
76. Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG. Overexpression of the Heme Oxygenase Gene in Renal Cell Carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1 de enero de 1997;214(1):54-75.
77. Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, et al. Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer.* agosto de 1999;80(12):1945-54.
78. Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, et al. Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett.* 26 de abril de 1999;138(1-2):53-9.
79. Sferrazzo G, Di Rosa M, Barone E, Li Volti G, Musso N, Tibullo D, et al. Heme Oxygenase-1 in Central Nervous System Malignancies. *J Clin Med.* 21 de mayo de 2020;9(5):1562.

80. Gandini NA, Fermento ME, Salomón DG, Obiol DJ, Andrés NC, Zenklusen JC, et al. Heme oxygenase-1 expression in human gliomas and its correlation with poor prognosis in patients with astrocytoma. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. marzo de 2014;35(3):2803-15.
81. Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res Gann*. septiembre de 2000;91(9):906-10.
82. Ferrando M, Wan X, Meiss R, Yang J, Siervi AD, Navone N, et al. Heme Oxygenase-1 (HO-1) Expression in Prostate Cancer Cells Modulates the Oxidative Response in Bone Cells. *PLOS ONE*. 4 de noviembre de 2013;8(11):e80315.
83. Degese MS, Mendizabal JE, Gandini NA, Gutkind JS, Molinolo A, Hewitt SM, et al. Expression of heme oxygenase-1 in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its correlation with clinical data. *Lung Cancer Amst Neth*. julio de 2012;77(1):168-75.
84. Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M, Marculescu R, et al. Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 1 de mayo de 2004;64(9):3148-54.
85. Gandini NA, Fermento ME, Salomón DG, Blasco J, Patel V, Gutkind JS, et al. Nuclear localization of heme oxygenase-1 is associated with tumor progression of head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Mol Pathol*. octubre de 2012;93(2):237-45.
86. Gandini NA, Alonso EN, Fermento ME, Mascaró M, Abba MC, Coló GP, et al. Heme Oxygenase-1 Has an Antitumor Role in Breast Cancer. *Antioxid Redox Signal*. 20 de junio de 2019;30(18):2030-49.
87. Andrés NC, Fermento ME, Gandini NA, Romero AL, Ferro A, Donna LG, et al. Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: involvement of p53. *Exp Mol Pathol*. diciembre de 2014;97(3):321-31.
88. 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*. diciembre de 2011;14(4):467-79.
89. Unveiling the association of STAT3 and HO-1 in prostate cancer: role beyond heme degradation - PubMed [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23226098/>
90. 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*. 30 de junio de 2014;5(12):4087-102.
91. 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*. 29 de diciembre de 2016;7(12):e2570.

92. 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*. 1 de septiembre de 2017;23(17):5135-48.
93. 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*. 10 de junio de 2020;32(17):1243-58.
94. Russell PJ, Kingsley EA. Human prostate cancer cell lines. *Methods Mol Med*. 2003;81:21-39.
95. Bioinformatics Software | QIAGEN Digital Insights [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Bioinformatics Software | QIAGEN Digital Insights. Disponible en: <https://digitalinsights.qiagen.com/>
96. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innov Camb Mass*. 28 de agosto de 2021;2(3):100141.
97. Bioconductor [Internet]. [citado 30 de octubre de 2025]. enrichplot. Disponible en: <http://bioconductor.org/packages/enrichplot/>
98. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*. 4 de enero de 2016;44(D1):D457-462.
99. Yu G. enrichplot: Visualization of Functional Enrichment Result.
100. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
101. Palanisamy N, Yang J, Shepherd PDA, Li-Ning-Tapia EM, Labanca E, Manyam GC, et al. The MD Anderson Prostate Cancer Patient-derived Xenograft Series (MDA PCa PDX) Captures the Molecular Landscape of Prostate Cancer and Facilitates Marker-driven Therapy Development. *Clin Cancer Res*. 15 de septiembre de 2020;26(18):4933-46.
102. Anselmino N, Labanca E, Shepherd PDA, Dong J, Yang J, Song X, et al. Integrative Molecular Analyses of the MD Anderson Prostate Cancer Patient-derived Xenograft (MDA PCa PDX) Series. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 de mayo de 2024;30(10):2272-85.
103. Kassambara A, Mundt F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses [Internet]. 2020 [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html>
104. Ginestet C. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc*. 1 de enero de 2011;174(1):245-6.

105. pheatmap: Pretty Heatmaps version 1.0.13 from CRAN [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://rdr.io/cran/pheatmap/>
106. Zhang L, Seitz LC, Abramczyk AM, Liu L, Chan C. cAMP initiates early phase neuron-like morphology changes and late phase neural differentiation in mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 20 de agosto de 2010;68(5):863-76.
107. Team R. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. 2010 [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1370294721063650048>
108. RStudio T. RStudio: integrated development for R [Internet]. 2015 [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1370004240607707919>
109. Chiang SK, Chen SE, Chang LC. A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 21 de diciembre de 2018;20(1):39.
110. 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*. 16 de marzo de 2014;5(12):4087-102.
111. Paez A, Vazquez E, Gueron G. Heme oxygenase 1 governs the cytoskeleton at filopodia: pulling the brakes on the migratory capacity of prostate tumoral cells. *Cell Death Discov*. 3 de abril de 2017;3(1):17020.
112. Lage-Vickers S, Sanchis P, Bizzotto J, Toro A, Sabater A, Lavignolle R, et al. Exploiting Interdata Relationships in Prostate Cancer Proteomes: Clinical Significance of HO-1 Interactors. *Antioxid Basel Switz*. 31 de enero de 2022;11(2):290.
113. Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens AL, Lambert JP, St-Denis N, Li T, et al. The CRAPome: a Contaminant Repository for Affinity Purification Mass Spectrometry Data. *Nat Methods*. agosto de 2013;10(8):730-6.
114. Yu Z, Zhu J, Wang H, Li H, Jin X. Function of BCLAF1 in human disease. *Oncol Lett*. febrero de 2022;23(2):58.
115. Norman M, Rivers C, Lee YB, Idris J, Uney J. The increasing diversity of functions attributed to the SAFB family of RNA-/DNA-binding proteins. *Biochem J*. 25 de noviembre de 2016;473(23):4271-88.
116. Sun T, Li X, Zhang Y, Zou B, Zhang Y. ILF2: a multifaceted regulator in malignant tumors and its prospects as a biomarker and therapeutic target. *Front Oncol*. 13 de diciembre de 2024;14:1513979.
117. Li Y, Fischer P, Wang M, Zhou Q, Song A, Yuan R, et al. Structural insights into spliceosome fidelity: DHX35–GPATCH1- mediated rejection of aberrant splicing substrates. *Cell Res*. abril de 2025;35(4):296-308.
118. Xu K, Sun S, Yan M, Cui J, Yang Y, Li W, et al. DDX5 and DDX17—multifaceted proteins

in the regulation of tumorigenesis and tumor progression. *Front Oncol.* 3 de agosto de 2022;12:943032.

119. Jiang C, Sun L, Wen S, Tian Y, Xu C, Xu Q, et al. BRX1 promotes ribosome synthesis and enhances glycolysis by selected translation of GLUT1 in colorectal cancer. *J Gene Med.* enero de 2024;26(1):e3632.
120. Markiewicz A, Sigorski D, Markiewicz M, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. Caspase-14—From Biomolecular Basics to Clinical Approach. A Review of Available Data. *Int J Mol Sci.* 25 de mayo de 2021;22(11):5575.
121. Priyanka PP, Yenugu S. Coiled-Coil Domain-Containing (CCDC) Proteins: Functional Roles in General and Male Reproductive Physiology. *Reprod Sci* Thousand Oaks Calif. octubre de 2021;28(10):2725-34.
122. Neumann CA, Cao J, Manevich Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* Georget Tex. 15 de diciembre de 2009;8(24):4072-8.
123. Liu A ran, Liu Y nan, Shen S xuan, Yan L rong, Lv Z, Ding H xi, et al. Comprehensive Analysis and Validation of Solute Carrier Family 25 (SLC25) and Its Correlation with Immune Infiltration in Pan-Cancer. *BioMed Res Int.* 8 de octubre de 2022;2022:4009354.
124. STRING: functional protein association networks [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://string-db.org/>
125. Ingenuity Pathway Analysis | QIAGEN Digital Insights [Internet]. Bioinformatics Software | QIAGEN Digital Insights. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-ipa/>
126. Shao A w, Sun H, Geng Y, Peng Q, Wang P, Chen J, et al. Bclaf1 is an important NF- κ B signaling transducer and C/EBP β regulator in DNA damage-induced senescence. *Cell Death Differ.* mayo de 2016;23(5):865-75.
127. Hong EA, Gautrey HL, Elliott DJ, Tyson-Capper AJ. SAFB1- and SAFB2-mediated transcriptional repression: relevance to cancer. *Biochem Soc Trans.* 20 de julio de 2012;40(4):826-30.
128. Xu Z, Wang W, Yang T, Li L, Ma X, Chen J, et al. STOmicsDB: a comprehensive database for spatial transcriptomics data sharing, analysis and visualization. *Nucleic Acids Res.* 5 de enero de 2024;52(D1):D1053-61.
129. Watanabe R, Miura N, Kurata M, Kitazawa R, Kikugawa T, Saika T. Spatial Gene Expression Analysis Reveals Characteristic Gene Expression Patterns of De Novo Neuroendocrine Prostate Cancer Coexisting with Androgen Receptor Pathway Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 18 de mayo de 2023;24(10):8955.
130. Zelivianski S, Verni M, Moore C, Kondrikov D, Taylor R, Lin MF. Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype.

Biochim Biophys Acta. 28 de mayo de 2001;1539(1-2):28-43.

131. Yamada Y, Beltran H. Clinical and Biological Features of Neuroendocrine Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*. 12 de enero de 2021;23(2):15.
132. Beltran H, Rickman DS, Park K, Chae SS, Sboner A, MacDonald TY, et al. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer Discov*. noviembre de 2011;1(6):487-95.
133. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells in: *Endocrine-Related Cancer Volume 14 Issue 3 (2007)* [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/14/3/0140531.xml>
134. Preclinical Models of Neuroendocrine Prostate Cancer - PubMed [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37166213/>
135. Neuroendocrine Transdifferentiation in Human Prostate Cancer Cells: An Integrated Approach | Cancer Research | American Association for Cancer Research [Internet]. [citado 29 de octubre de 2025]. Disponible en: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/75/15/2975/605304/Neuroendocrine-Transdifferentiation-in-Human>
136. Zhang C, Soori M, Miles FL, Sikes RA, Carson DD, Chung LWK, et al. Paracrine factors produced by bone marrow stromal cells induce apoptosis and neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *The Prostate*. 1 de febrero de 2011;71(2):157-67.
137. Parsons EC, Hoffmann R, Baillie GS. Revisiting the roles of cAMP signalling in the progression of prostate cancer. *Biochem J*. 13 de octubre de 2023;480(20):1599-614.
138. Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, et al. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 de junio de 1994;91(12):5330-4.
139. Martin-Caraballo M. Regulation of Molecular Biomarkers Associated with the Progression of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 10 de abril de 2024;25(8):4171.
140. Ito S, Kayukawa N, Ueda T, Taniguchi H, Morioka Y, Hongo F, et al. MRGBP promotes AR-mediated transactivation of *KLK3* and *TMPRSS2* via acetylation of histone H2A.Z in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech*. 1 de septiembre de 2018;1861(9):794-802.
141. Zhang Y, Shi M, Zhang Y, Wang J, Zhang H, Ren G. RB1 and p53 are diagnostic markers for treatment-related neuroendocrine prostate cancer: a clinical and pathological analysis of 23 cases. *Am J Clin Exp Urol*. 25 de abril de 2025;13(2):118-31.
142. Jing N, Tao Z, Du X, Wen Z, Gao WQ, Dong B, et al. Targeting SOX4/PCK2 signaling suppresses neuroendocrine trans-differentiation of castration-resistant prostate cancer.

Biol Direct. 16 de julio de 2024;19:56.

143. Nitti M, Piras S, Marinari UM, Moretta L, Pronzato MA, Furfaro AL. HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. *Antioxid Basel Switz*. 5 de mayo de 2017;6(2):29.
144. Was H, Dulak J, Jozkowicz A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr Drug Targets*. diciembre de 2010;11(12):1551-70.
145. Gao Y, Zhou R, Huang JF, Hu B, Cheng JW, Huang XW, et al. Patient-Derived Xenograft Models for Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Their Application in Guiding Personalized Medicine. *Front Oncol*. 13 de julio de 2021;11:704042.
146. Dobrolecki LE, Airhart SD, Alferez DG, Aparicio S, Behbod F, Bentires-Alj M, et al. Patient-derived Xenograft (PDX) Models In Basic and Translational Breast Cancer Research. *Cancer Metastasis Rev*. diciembre de 2016;35(4):547-73.
147. Amorino GP, Parsons SJ. Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2004;14(4):287-300.
148. 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*. 18 de marzo de 2020;10(3):467.
149. Dardenne E, Beltran H, Benelli M, Gayvert K, Berger A, Puca L, et al. N-Myc Induces an EZH2-Mediated Transcriptional Program Driving Neuroendocrine Prostate Cancer. *Cancer Cell*. 10 de octubre de 2016;30(4):563-77.