



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Decodificación del interactoma de HO-1 y su impacto en la
arquitectura celular en cáncer de próstata**

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

Lic. Alejandra Verónica Paez

Directoras de Tesis
Dra. Elba Susana Vazquez
Dra. Geraldine Gueron
Consejera de Estudios
Dra. Adalí Pecci

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

Fecha de defensa: 17 de diciembre de 2018

Resumen

Decodificación del interactoma de HO-1 y su impacto en la arquitectura celular en cáncer de próstata.

El cáncer de próstata (PCa) es uno de los cánceres más frecuentes en el hombre y se considera una malignidad letal con gran incidencia en el mundo. HO-1 es la enzima limitante en la degradación del grupo hemo. Se reportó la participación de HO-1 en diferentes procesos celulares que exceden sus funciones canónicas. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la inducción farmacológica de HO-1 disminuye la proliferación, invasión y migración en líneas de PCa y que tumores derivados de la línea PC3HO-1, que sobre-expresa de manera estable HO-1, resultan más diferenciados, presentan un menor índice mitótico y una significativa reducción de los niveles del ARNm de MMP9 comparado con sus respectivos controles.

El objetivo general de este trabajo consistió en identificar los interactores moleculares de HO-1 responsables de la remodelación del citoesqueleto y la arquitectura celular, que permitan explicar sus implicancias en PCa hacia un fenotipo menos agresivo. Los resultados muestran que la inducción de HO-1 en las células de PCa remodela el citoesqueleto, en particular los filopodios y los niveles de expresión de E-cadherina y β -catenina y su localización en membrana. Mediante un abordaje proteómico, realizando espectrometría de masa a partir de células PC3 transfectadas con el plásmido p3xFLAGHO-1, inmunoprecipitamos FLAGHO-1 junto con sus proteínas asociadas. Identificamos 56 proteínas asociadas a HO-1, donde más del 50% corresponde a moléculas que participan en la regulación del citoesqueleto y la remodelación de la arquitectura celular.

Los resultados de proteómica fueron posteriormente integrados con los de transcriptómica, obtenidos de un RNAseq realizado a partir de células PC3 que sobre-expresan HO-1. Comprobamos que HO-1 regula proteínas de la vía del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Finalmente, dado que el hueso es el sitio de metástasis más frecuente y considerando la importante desregulación de las proteínas del citoesqueleto en los estadios metastásicos del PCa, realizamos co-cultivos indirectos entre células PC3 y la líneas de progenitores óseos de origen murino (MC3T3 o RAW 264.7). Los medios condicionados de cada condición experimental del co-cultivo fueron utilizados para crecer células tumorales prostáticas sobre las cuales se estudiaron las prolongaciones celulares. Los resultados obtenidos demostraron

que los MC provenientes del co-cultivo disminuyen los contactos entre células vecinas, mientras que el pre-tratamiento con hemina sobre las células de PCa previene este efecto.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el rol anti tumoral de HO-1 en PCa, en parte debido a la interacción con proteínas remodeladoras del citoesqueleto y la regulación negativa de vías celulares asociadas a la degradación de la matriz extracelular. Particularmente, la liberación de factores solubles en los medios condicionados de co-cultivos entre células PC3 pre-tratadas con hemina y células de hueso, impide la pérdida de contactos celulares en las células tumorales, lo cual podría prevenir la migración hacia el hueso.

Palabras Clave:

Hemo-oxigenasa 1

Citoesqueleto

Filopodios

Adhesión celular

Migración celular

Abstract

Decoding HO-1 interactome and its impact in cell architecture in prostate cancer.

Proteomics represents an important tool for the identification of new molecular targets for prostate cancer (PCa) tailored therapy. Considering the heterogeneity of the prostate tumors, a single biomarker does not seem sufficient to predict the disease outcome. Towards this end, we undertook an in-depth mass spectrometry-based proteomics study to build the Heme-oxygenase 1 (HO-1) interactome in PCa.

We have previously shown the anti-tumoral role of HO-1 in PCa. We propose that HO-1 and its interactors reprogram PCa cells and remodel the cytoskeleton and the cell architecture, favoring a less aggressive phenotype. Our results show that HO-1 induction remodels the cytoskeleton of PCa cells, particularly filopodia and the expression and localization of E-cadherin and β -catenin. Under HO-1 induction, PCa cells present reduced frequency in migration events, trajectory and cell velocity and, a significant higher proportion of filopodia-like protrusions favoring zippering among neighboring cells. Accordingly, these effects were reversed under siHO-1.

Given that bone is the main site of metastasis in PCa, we used a model of transwell co-culture system of PC3 cells with bone progenitors cell lines (MC3T3 or RAW 264.7). When PCa cells were grown in the presence of the conditioned media (CM) from the different experimental co-cultures, cell protrusions and neighboring cell contacts were impaired and these effects were prevented under HO-1 forced expression in PC3 cells.

FLAG immunoprecipitation assays were performed using lysates from PC3 cells transfected with FLAG-tagged HO-1, and the isolated proteins were subjected to LC/ESI-MSMS analysis. The HO-1 interactome yielded a network of 56 proteins, showcasing more than 50% of them related to cytoskeleton regulation and cell architecture remodeling. The bioinformatics screening for these cytoskeletal-related partners reveal that they are highly misregulated in prostate adenocarcinoma compared with normal prostate tissue.

Transcriptomics profiling evidenced significant modulation of key markers related to cell adhesion and cell–cell communication under HO-1 induction. The integration from our omics-based research provides a four-molecular pathway foundation (ANXA2/HMGA1/POU3F1;

NFRSF13/GSN; TMOD3/RAI14/VWF; and PLAT/PLAU) behind HO-1 regulation of tumor cytoskeletal cell compartments. The complementary proteomics and transcriptomics approaches presented here promise to move us closer to unravel the molecular framework underpinning HO-1 involvement in the modulation of cytoskeleton pathways, pushing toward a less aggressive phenotype in PCa.

Key Words:

Heme-oxygenase 1

Cytoskeleton

Filopodia

Cell adhesion

Cell migration

Publicaciones

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

HEME OXYGENASE 1 GOVERNS THE CYTOSKELETON AT FILOPODIA: PULLING THE BRAKES ON THE MIGRATORY INCAPACITY OF PROSTATE TUMORAL CELLS. Paez A, Vazquez E, Gueron G. *Cell death Discovery*. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.20

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

HEME-OXYGENASE - 1 IMPLICATIONS IN CELL MORPHOLOGY AND THE ADHESIVE BEHAVIOR OF PROSTATE CANCER CELLS. Gueron G, Giudice J, Valacco P, Paez A, Eguero B, Toscani AM; Jaworski F; Coluccio Leskow F; Cotignola J; Marti M; Binaghi M; Navone N; Vazquez E. *Oncotarget* (2014) 30;5(12):4087-102.**IMPACT FACTOR 2013: 6.636**

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

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

KEY ASSOCIATION OF HO-1 AND BRCA1 IN THE MAINTENANCE OF CELLULAR HOMEOSTASIS IN PROSTATE CANCER. Labanca, E.; De Luca, P.; Gueron, G; Paez, A; Giudice, J; Moiola, C; Zalazar, F, Vazquez, E and De Siervi, A. *Molecular Cancer Research* (2015) doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0150-T. **IMPACT FACTOR 2015: 4.380**

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, mi casa durante los últimos 10 años, por continuar formándome desde la excelencia que la caracteriza y que me hace sentir orgullosa por formar parte de esta institución. Gracias, también, a las instituciones que financiaron mi doctorado (CONICET y ANPCyT) y aquellas que me dieron la oportunidad de perfeccionarme en el exterior (AACR, Fulbright y MD Anderson Cancer Center).

A mis directoras de tesis, la Dra. Elba Vazquez y la Dra. Geraldine Gueron no solo por ofrecerme hacer el doctorado con ustedes y guiarme a lo largo de este camino, sino también por apostar siempre por mí. Gracias Geral por enseñarme a no achicarme, a arriesgarme, y a salir de mi zona de confort. Gracias por tu exigencia que sacó a la luz una confianza en mi misma que desconocía que podía tener. Gracias Elba por equilibrarme siempre, por bajarme a tierra cuando desespero, por ser la voz de la experiencia, por tu paciencia y dedicación características de tu alma de docente. Tu sensibilidad y tu capacidad de ponerte siempre en el lugar del otro son de las cosas por las que más te estoy agradecida. La pasión por lo que hacen fue un motor increíble durante estos cuatro años para buscar siempre nuevos desafíos.

Al Dr. Javier Cotignola por estar siempre dispuesto a brindar su tiempo para discutir resultados, sugerir alternativas, y sumar una opinión distinta que siempre mejora el resultado final.

A mi consejera de estudios, la Dra. Adalí Pecci por participar activamente de las diferentes instancias de mi doctorado y su buena predisposición para resolver los diferentes temas académicos que este conlleva.

A las Dras. Marina Simian e Isabel Luthy por aceptar formar parte de mi comité de seguimiento y prestar su tiempo para el mismo.

A la Dra. Luciana Bruno, la Dra. Valeria Levi y la Dra. Carla Pallavicini por colaborar con nosotras para hacer un trabajo interdisciplinario hermoso y enseñarnos tanto. Especialmente gracias a Carla por toda su paciencia al capacitarme para usar el microscopio y cuantificar las imágenes.

A la Dra. Jimena Giudice por hacerse siempre un tiempo en su agenda para darle una mirada a mis resultados y tomarse la molestia de enseñarme a la distancia para poder resolver las dificultades por mi cuenta.

Gracias a la Dra. María Binaghi quien me acompañó durante la primera parte del doctorado, me asistió durante las técnicas de clonado, y está siempre disponible para cualquier consulta aún estando fuera del laboratorio.

A la Dra. Pía Valacco, gracias por tomarte tanto tiempo (tantas veces) para mejorar protocolos juntas, depurar resultados y explicarme las particularidad de una técnica tan linda y compleja como la espectrometría de masa, de la cual aprendí mucho con vos.

Gracias a la Dra. Nora Navone y a todo su grupo en MD Anderson Cancer Center, quien me recibió durante 3 meses en su laboratorio y me dio la libertad intelectual y la confianza para trabajar en dos proyectos distintos. Gracias especialmente a mi gran amiga, Estefanía Labanca, con quien tuve el placer de volver a trabajar codo a codo durante mi estadía en el laboratorio de la Dra. Navone. Gracias Tef por tu inmensa generosidad, tu esfuerzo para hacerme mi lugar en el laboratorio y por hacer de mi experiencia en Houston una de las cosas más lindas de mi doctorado.

A los investigadores de la facultad con los que he tenido el placer de compartir el lugar de trabajo, experiencias profesionales y personales, gracias también por abrirme siempre las puertas de sus laboratorios y recibirme con una sonrisa. Gracias a Mariana Bermudez, Susana Correa, Eduardo Cánepa, Federico Coluccio, Luciana Rocha, Olga Castro, Oscar Perez, Marcelo Martí y Alejandra Guberman, al igual que a todos sus becarios por la buena onda de la vida cotidiana.

En un aspecto más personal, a mis compañeros y amigos del laboratorio, a quienes volvería a elegir una y mil veces para compartir el día a día. A Sofi, Emi, Flor V., Flor C., Javi, Nico, Juan, Daia y Mer: el doctorado con ustedes fue una experiencia hermosa, divertida e insólita. Gracias por los infinitos momentos de risa, reflexión y colaboración, siempre con un mate de por medio. Pocos tienen la posibilidad de trabajar con la complicidad, la diversión y la generosidad con la que trabajamos nosotros, sabiendo que siempre hay alguien detrás para dar una mano ante cualquier eventualidad. En especial gracias a Feli por confiar tanto en mí, por elegirme para que te escuche, por escucharme y aconsejarme tantas veces siendo el gran científico y persona que sos.

A las increíbles amigas que me dio esta facultad, con las que al día de hoy seguimos recorriendo este camino juntas, Jordi, Cami y Esme por la infinidad de charlas de catarsis para darnos fuerzas para seguir adelante y no bajar los brazos en esta carrera tan linda y tan desafiante que elegimos.

A mi gran amiga Sofi, quien siempre está alentando por mí y sintiéndose orgullosa por cada pequeño logro de mi vida como si fuese propio.

A mi familia entera, especialmente Nano, Yami y Bauti que están siempre haciendo el aguante (y siempre dispuestos a sacar un pasaje a cualquier lugar del mundo para acompañarme), al igual que Nica y mi padrino Ricky quien silenciosamente sigue cada pequeño paso de mi carrera. Gracias a la familia Laplaza, que también es mi familia y me ha acompañado desde la licenciatura hasta acá, mostrando interés en lo que hago como si fuese una hija y una hermana más.

A mis compañeros gatunos: Kika, que me acompañó durante buena parte de la escritura de esta tesis; y mi eterno Felipe, que me reencontró con mis pasiones y motivó la búsqueda de mi futuro profesional.

A mis papás, Lidia y Alberto, por creer que puedo cambiar el mundo. No hay palabras para agradecerles a ustedes porque simplemente han sido el motor detrás de toda mi formación y cualquier dedicatoria siempre les queda corta. Gracias por demostrarme siempre lo orgullosos que están de mí y compartir mi felicidad (y las derrotas) conmigo. Gracias por enseñarme a valerme por mis esfuerzos y a ser respetuosa con los demás, sabiendo que no es necesario pasar por encima de nadie para lograr lo que uno se propone. Tarde o temprano, todo llega. Los quiero con todo mi corazón.

Y finalmente a Pedro, mi compañero de vida, por ser mi respaldo incondicional. Por la paciencia para escucharme, por buscar las palabras justas para reconfortarme y darme un abrazo cuando más lo necesito. Gracias por creer que puedo lograr todo lo que me proponga, incluso cuando todavía no estoy segura si quiero arriesgarme. Me enseñás todos los días a ser paciente, a resolver los problemas de a uno a la vez y que todo siempre tiene solución. Gracias por elegirme todos los días. Te amo.

A Pedro

Abreviaciones

Abreviación	Significado
ABPs	Proteínas de unión a actina; <i>actin-binding proteins</i>
ADF	Nomenclatura para el Factor despolimerizador de actina; <i>actin depolymerization factor</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADT	Terapia por privación de andrógenos; <i>androgen deprivation therapy</i>
AIP-1	Nomenclatura para la Proteína de interacción con actina; <i>actin interacting protein</i>
ANGPT	Nomenclatura para las Angiopoyetinas
ANXA2	Nomenclatura para la proteína Anexina A2
AP-1	Nomenclatura de la Proteína activadora AP-1
AR	Nomenclatura para el Receptor de andrógenos; <i>androgen receptor</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASAP	Proliferación atípica de pequeños acinos; <i>atypical small acinar proliferation</i>
ATM	Proteína quinasa de ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BPH	Hiperplasia prostática benigna; <i>benign prostatic hyperplasia</i>
BR	Nomenclatura para la proteína Bilirrubina
BRCA1	Nomenclatura para la Proteína 1 de cáncer de mama
BSA	Seroalbúmina bovina; <i>bovine seroalbumin</i>
BV	Nomenclatura para la proteína biliverdina
BVR	Nomenclatura para la proteína biliverdin reductasa
CAMs	Moléculas de adhesión celular; <i>cell adhesion molecules</i>
CPB2	Nomenclatura para la Carboxipeptidasa B2
CPCN	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración; <i>castration resistant prostate cancer</i>
CSPC	Cáncer de próstata sensible a la castración; <i>castration sensitive prostate cancer</i> .
CTCs	Células tumorales circulantes
CTDs	Celúlas tumorales diseminadas
CTGF	Nomenclatura del Factor de crecimiento del tejido conectivo

CXCL12	Nomenclatura de la Quimoquina 12
CXCR4	Nomenclatura del Receptor de quimoquinas tipo 4
DHT	Dihidrotestosterona
dTTP	Deoxitirosinatrifosfato
dUTP	Deoxiuracilotrifosfato
E2F	Proteína de unión a retinoblastoma
EDR	Examen digital-rectal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Nomenclatura para el Receptor del factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EMT	Transición epitelio-mesenquimal; <i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ET-1	Nomenclatura para la proteína Endotelina 1
<i>F12</i>	Nomenclatura para el gen Precursor del factor XII de coagulación
FA	Filamentos de actina
FDA	Administración de drogas y alimentos; <i>food and drug administration.</i>
FDR	Probabilidad de falsos positivos; <i>False Discovery rate</i>
FI	Filamentos intermedios
FtH	Nomenclatura para la proteína ferritina
GAPs	proteínas activadas por GTPasas
GDP	Guanosin difosfato
GEFs	Factor intercambiador de nucleótido de guanina; <i>guanidine exchanging factors</i>
GO	Ontología génica; <i>Gene ontology</i>
GTP	Guanosin trifosfato
HG-PIN	Neoplasia intra-epitelial prostática de alto grado; <i>high grade prostatic intraneoplasia</i>
<i>HMGA1</i> y HMGA1	Nomenclatura para el gen y la proteína del grupo de alta movilidad A1
HMOX1	Nomenclatura para el gen hemo oxigenasa 1
HO-1	Nomenclatura para la proteína hemo oxigenasa 1
HRP	Peroxidasa de rábano; <i>Horseradish peroxidase</i>
HSFs	Nomenclatura de la familia de factores de respuesta a estrés térmico
HSPB1	Nomenclatura para la proteína de estrés térmico 1 de la familia B
IGF	Nomenclatura del Factor de crecimiento dependiente de insulina
IL	Nomenclatura para las interleuquinas

KSHV	Nomenclatura para el Receptor acoplado a proteína G del herpesvirus asociado a SK
LG-PIN	Neoplasia intra-epitelial prostática de bajo grado; <i>low grade prostatic intraneoplasia</i>
MC	Medio condicionado
MCS	Sitio múltiple de clonado; <i>multiple cloning site</i>
MDM2	Nomenclatura para la Proteína doble minuto 2 murina
MEC	Matriz extra celular
miRNA	Micro ARN
<i>MKLN1</i> y MKLN1	Nomenclatura para el gen y la proteína Muskelina
MMP2	Metaloproteínasa 2
MMP9	Metaloproteínasa 9
MT	Microtúbulos de tubulina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-E2	Factor nuclear eritroide
NFκB	Nomenclatura del Factor de transcripción NFκB
NRF2	Nomenclatura para el Factor relacionado a NF-E2
ON	<i>Overnight</i>
OPG	Nomenclatura para la proteína Osteoprotegerina
p21	Nomenclatura para la proteína de 21 KDa
p53	Nomenclatura para la proteína de 53 KDa
PBS	Buffer fosfato-salino
PCa	Cáncer de próstata; <i>prostate cancer</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa; <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	Nomenclatura del Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEI	Polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
PIN	Neoplasia intraepitelial; <i>prostatic intraepithelial neoplasia</i>
PLAT	Nomenclatura para el gen del activador del plasminógeno tisular
PLAU	Nomenclatura para el gen del plasminógeno tipo uroquinasa
PLAUR	Nomenclatura para el gen del receptor del plasminógeno tipo uroquinasa
PMOs	Osteoblastos primarios de ratón
POU3F1	Nomenclatura para la proteína <i>homeobox</i> POU de clase 3
PSA	Antígeno prostático específico; <i>prostate specific antigen</i>
PTEN	Nomenclatura para el Homólogo de fosfatasa y tensina

PtHRP	Nomenclatura de la Hormona paratiroide
RANK	Nomenclatura para el Receptor activador de NF κ B
<i>RAI14</i> y RAI14	Nomenclatura para el gen y la proteína inducida por ácido retinoico
RANKL	Nomenclatura para el Ligando del Receptor activador de NF κ B
Rb	Nomenclatura para la Proteína del retinoblastoma
ROS	Especies reactivas de oxígeno; <i>oxygen reactive species</i>
<i>RCC1</i> y RCC1	Nomenclatura para el gen y la proteína del regulador de la condensación de la cromatina
RPM	Revoluciones por minuto
RTqPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SERPINE1	Nomenclatura del Inhibidor del activador del plasminógeno
SERPINF2	Nomenclatura del miembro 2 de la familia F de Serpina
SDS	dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	ARN silenciador; <i>silencing RNA</i>
SK	Sarcoma de Kaposi
STAT3	Nomenclatura para el Transductor de señal y activador de la transcripción 3
STORM	Microscopía óptica de reconstrucción estocástica;
<i>TAFI</i>	Nomenclatura para el gen del Inhibidor de la fibrinólisis
<i>TES</i> y TES	Nomenclatura para el gen y la proteína Testina
TGF- β	Nomenclatura del Factor de crecimiento transformante tipo β
TMOD3	Nomenclatura para la proteína Tropomodulina 3
tPA	Nomenclatura para el plasminógeno tisular
uPA	Nomenclatura para el plasminógeno uroquinasa
uPAR	Nomenclatura para el receptor del plasminógeno uroquinasa
UTR	Ultrasonografía transrectal
VEGF	Nomenclatura del Factor de crecimiento vascular y epitelial
VWF	Nomenclatura para el factor de Von Willebrand

Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	4
Publicaciones.....	6
Agradecimientos.....	7
Abreviaciones.....	11
Introducción.....	19
I. La biología del cáncer.....	20
II. La próstata: fisiología y patologías asociadas.....	22
III. El cáncer de próstata.....	24
IV. Biomarcadores diagnóstico y pronóstico en PCa.....	28
V. Metástasis ósea del PCa.....	31
VI. Hemo oxigenasa 1 y su actividad homeostática.....	34
VII. Rol de HO-1 en cáncer.....	36
VIII. Conformación y dinámica del citoesqueleto.....	40
<i>Filamentos de actina.....</i>	41
<i>Microtúbulos de tubulina.....</i>	45
<i>Filamentos intermedios.....</i>	49
IX. La migración celular y su participación en la metástasis.....	50
Objetivos e hipótesis.....	56
Materiales y métodos.....	58
1. Cultivo celular.....	59
2. Transfecciones.....	59
2.1 Transfección con p3XFLAGHO-1 y pcDNA3HO-1.....	59
2.2 Transfección con siHO-1.....	60
3. Co-cultivos.....	60
4. Tratamiento con hemina.....	61
5. Tratamiento con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	62
6. Anticuerpos y sondas.....	62
7. Clonado de p3XFLAG-CMV-10-HO-1.....	62
8. Amplificación y purificación del plásmido (Maxiprep).....	65
9. Inmunoprecipitación de FLAG.....	65
10. Espectrometría de masa.....	66
11. Análisis bioinformático.....	67

11.1 Ontología génica.....	67
11.2 Meta análisis utilizando múltiples bases de datos de pacientes con PCa.....	67
12. Migración celular.....	70
13. Inmunofluorescencias.....	70
14. Western Blot.....	73
14.1 Extracción de proteínas.....	73
14.2 Medición de la concentración de proteínas.....	74
14.3 Electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa.....	74
14.4 Inmunodetección de proteínas.....	75
15. Extracción y cuantificación de ARN.....	75
15.1 Transcripción reversa.....	76
15.2 PCR cuantitativa en tiempo real.....	76
15.3 RNAseq.....	77
16. ELISA.....	78
17. <i>Pull down</i> de la RhoGTPasa Cdc42.....	78
18. Análisis estadístico.....	79
Resultados.....	80
Parte I. Identificación del interactoma de HO-1.....	81
Parte II. <i>Screening</i> bioinformático de la desregulación de proteínas del citoesqueleto en pacientes con PCa.....	85
Parte III. La modulación de HO-1 en líneas de PCa favorece el establecimiento de un fenotipo más adhesivo y menos invasivo.....	92
Parte IV. La modulación genética y farmacológica de HO-1 impacta en la expresión de genes asociados a la regulación de los filamentos de actina.....	113
Parte V. Validación de las vías de señalización celular afectadas bajo la inducción de HO-1 en líneas tumorales prostáticas.....	121
Parte VI. La modulación de HO-1 en células PC3 co-cultivadas con células progenitoras de hueso favorece la secreción de factores que afectan los contactos celulares.....	123
Discusión.....	127
Bibliografía.....	138
Anexo I.....	150
Anexo II.....	154
Anexo III.....	159

Introducción

I. LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER

Las células eucariotas se rigen por un ordenado sistema de control sobre el ciclo celular. Cada una de las etapas de dicho ciclo consiste en un sistema de puntos de control o *checkpoints* específicos que inhabilitan o permiten la progresión hacia la próxima etapa. Si los *checkpoints* no son superados por el tamaño celular inapropiado, por la presencia de daño al ADN, o errores en la replicación del mismo durante la fase S, se inhabilita la progresión del ciclo hasta que los errores sean reparados¹. Si esto no es posible, el ciclo se detiene por completo y las células pueden entrar en senescencia o incluso en apoptosis². Sin embargo, eventualmente si las proteínas inhibidoras del ciclo como la proteína de 53 KDa (p53), la proteína del retinoblastoma (Rb), la proteína de 21KDa (p21) o la proteína quinasa de ataxia telangiectasia mutada (ATM) fallan, y las proteínas promotoras del mismo como la proteína de unión a retinoblastoma (E2F) y la doble minuto 2 murina (MDM2) están constitutivamente activas, las células portadoras de mutaciones progresan hacia una división celular exitosa. En ese momento se desencadena una proliferación descontrolada que, de no ser eliminado por el sistema inmune³, puede dar lugar a neoplasias o tumores.

El conjunto de características que permite la transformación celular y la progresión tumoral consecuente, se conoce como sellos o *hallmarks* del cáncer que, si bien fueron descritos por primera vez en el año 2000 por Douglas Hanahan y Robert Weinberg⁴, cada vez más procesos son agrupados bajo esta nomenclatura. La proliferación sostenida, la evasión de factores supresores del crecimiento, la inmortalidad replicativa, la angiogénesis, la resistencia a la muerte celular e invasión y la metástasis fueron las primeras 6 características descritas que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica⁴. Una década más tarde, la evidencia señalaba que las alteraciones en el metabolismo celular, así como las fallas del sistema inmune para eliminar las células tumorales, también debían ser consideradas características de la transformación maligna⁵.

Algunos de los *hallmarks* del cáncer son considerados, además, propiedades facilitadoras de la progresión tumoral⁵. Resulta claro que la totalidad de las características anteriormente mencionadas no podrían establecerse sin previa acumulación de mutaciones e inestabilidad génica de las células tumorales que les permitan ser seleccionadas positivamente en el tejido local. El sistema inmune innato también es un agente facilitador gracias a la secreción de

factores pro-inflamatorios intra-tumorales. La inflamación puede potenciar la carcinogénesis debido al suministro de moléculas bioactivas en el microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento que mantienen activas las señales de proliferación, factores que inhiben la muerte celular, factores pro-angiogénicos y enzimas que alteran la matriz extracelular (MEC) facilitando la invasión, entre otros ⁶⁻⁹.

La figura 1 esquematiza y resume los *hallmarks* del cáncer aceptados hasta la fecha, que incluyen los 10 sellos que brindan una base sólida para comprender la biología de los tumores.



Figura 1. Sellos habilitantes en la transformación maligna. Adaptación^{5,10}

El cáncer es una enfermedad heterogénea, donde las características de cada tumor no solo pueden variar ampliamente dependiendo del tejido en el cual se desarrollan, sino también a lo largo de la progresión del mismo tumor (heterogeneidad temporal). Más aún, en cada tumor existen sub-poblaciones de células tumorales que pueden evolucionar de manera completamente independiente, incluso con programas transcripcionales y metabólicos distintos, dificultando la eficacia de las terapias anti-neoplásicas (heterogeneidad espacial)¹¹.

De acuerdo a la organización mundial de la salud, los tumores pueden clasificarse en seis grandes grupos, según sus diferencias histológicas. Mientras que los **sarcomas** se definen como tumores generados en el tejido conectivo u otros tejidos de soporte como el hueso, los **mielomas**, **leucemias** y **linfomas** encuentran su origen en células del sistema

hematopoyético. Sin embargo, el 80-90% de las neoplasias malignas refieren a tumores de origen epitelial, denominados **carcinomas**, siendo éstos más frecuentes en glándulas asociadas a la secreción de sustancias como las mamas y la próstata. También existen tumores de origen **mixto**¹².

II. LA PRÓSTATA: FISIOLÓGÍA Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

La próstata es una glándula pequeña del aparato reproductor masculino, del tamaño de una nuez ubicada en la base de la vejiga, delante del recto y que rodea a la uretra (Figura 2).

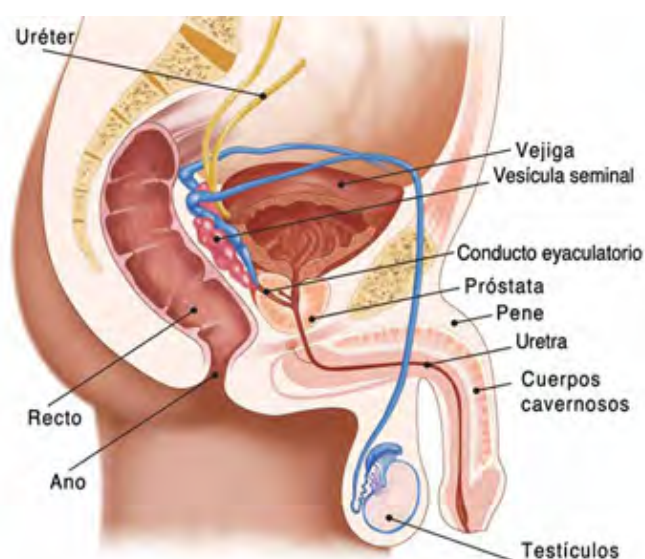


Figura 2. Aparato reproductor masculino

Esta glándula es la responsable de producir sustancias que faciliten la fertilización, el tránsito y supervivencia del espermatozoide durante la reproducción, en parte, gracias a la secreción del antígeno prostático específico (por sus siglas en inglés, *PSA*). El *PSA*, junto con otras sustancias producidas en la próstata y los testículos, como zinc, citrato y fructosa, son esenciales para proveer la energía necesaria a los espermatozoides y garantizar su llegada al óvulo.

Anatómicamente, en la próstata se pueden identificar 5 zonas o regiones distintas (Figura 3). La zona central, que constituye el 20% del tejido glandular de la próstata, se expande en forma de cono alrededor de los conductos eyaculatorios y se proyecta hasta la base de la vejiga¹³. La zona de transición y la periuretral, representan aproximadamente el 10% del tejido prostático, mientras que el 70% restante corresponde a la zona periférica, más cercana al

recto¹³. Por último, se puede identificar un tejido no glandular que corresponde a la zona fibromuscular, la cual separa la zona de transición de las restantes.

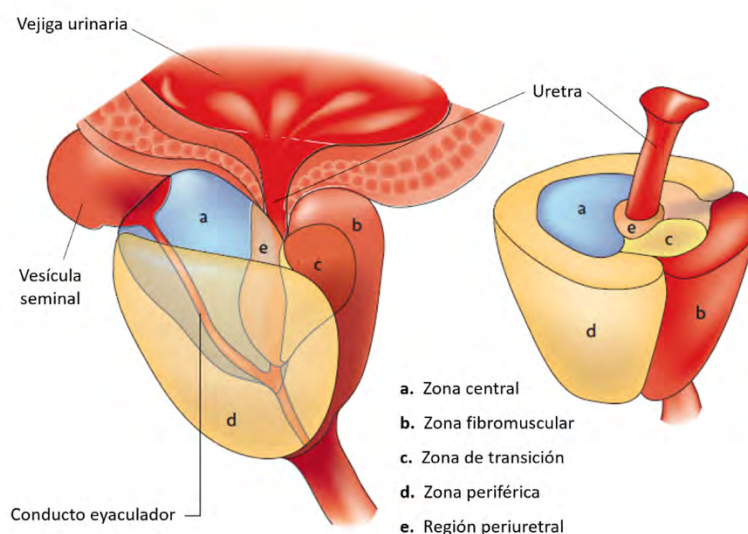


Figura 3. Zonas anatómicas de la próstata. Adaptación¹⁴.

La próstata crece mayoritariamente durante la adolescencia gracias al eje constituido por los andrógenos, principalmente dihidrotestosterona (DHT), y el receptor de andrógenos (AR). Sin embargo, no es sino hasta la adultez que la mayoría de los hombres comienzan a concientizarse sobre esta glándula, ya que es la causa de las tres patologías masculinas más importantes.

La prostatitis es una condición no proliferativa de la próstata, caracterizada por la inflamación de la glándula, que puede o no estar asociada a una infección bacteriana, y se describe con un fuerte dolor en estado de reposo o al orinar, acompañado por un cuadro de hematuria¹⁵. Otra patología asociada a la próstata, de origen proliferativo, es la hiperplasia prostática benigna (por sus siglas en inglés, *BPH*), caracterizada por un aumento en el número de células en la próstata¹⁵. Usualmente, la BPH se desarrolla en la zona de transición hacia el centro de la próstata, comprimiendo la uretra, motivo por el cual el dolor al orinar constituye el principal síntoma de esta patología. La BPH es actualmente tratada con α -bloqueantes que actúan como relajantes musculares de los esfínteres, o incluso con inhibidores de α -5-reductasa, la enzima responsable de la transformación de testosterona a DHT, mermando el crecimiento

descontrolado de la próstata. Aquellos pacientes que no responden a estos tratamientos o que cursan síntomas más graves pueden requerir cirugía. Entre las opciones quirúrgicas se pueden mencionar la prostatectomía laser, la incisión transuretral para liberar la presión ejercida por la próstata sobre la uretra y la electroevaporación transuretral. Si el tamaño de la próstata ha aumentado considerablemente comprimiendo la uretra y, cuando ya se han descartado todas las otras opciones quirúrgicas, puede indicarse la realización de una prostatectomía radical¹⁶. Finalmente, la segunda patología proliferativa es el cáncer, siendo esta la enfermedad asociada a la próstata de mayor relevancia clínica y científica.

III. EL CÁNCER DE PROSTATA

El cáncer de próstata (PCa) es el segundo tipo de neoplasia maligna más diagnosticado y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial (Figura 4). En Argentina, particularmente, es el tipo de cáncer de mayor incidencia en la población masculina y el que presenta mayor mortalidad, después del cáncer de pulmón y colorrectal¹⁷ (Figura 5).

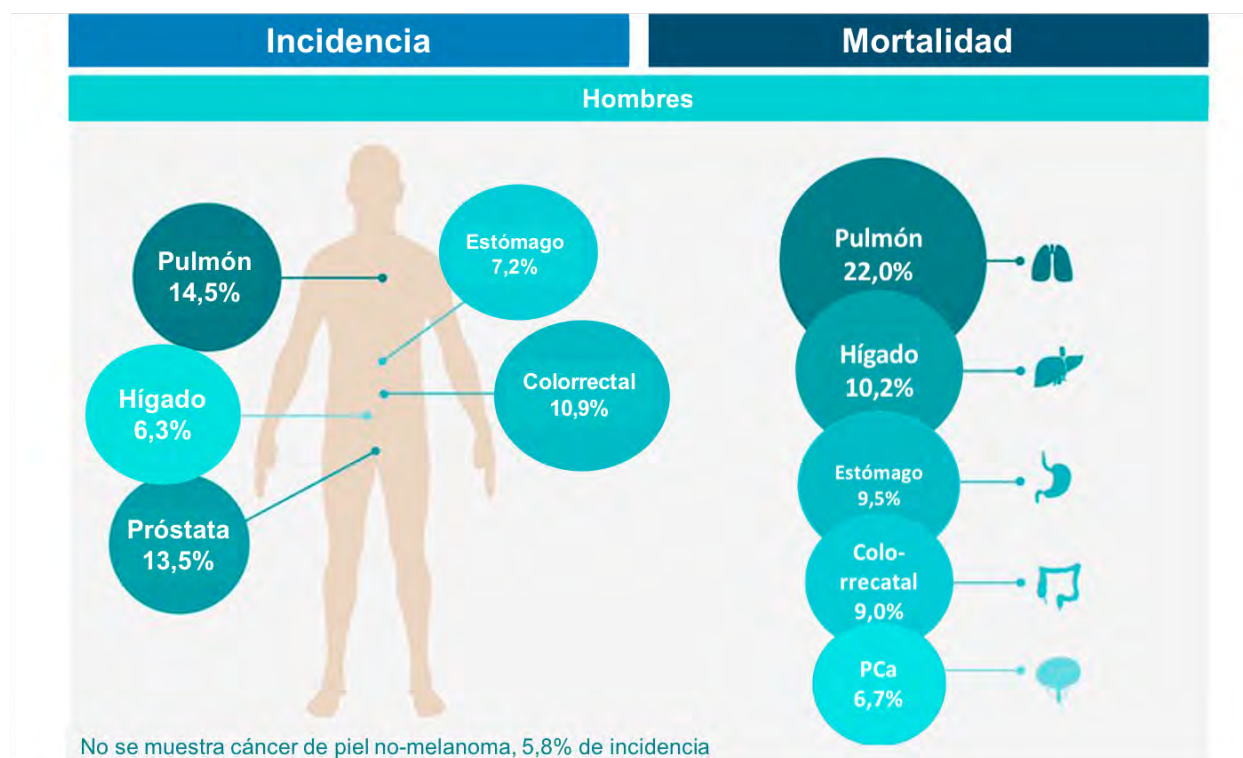


Figura 4: Incidencia y mortalidad de cáncer en hombres a nivel mundial. Adaptación¹⁷.

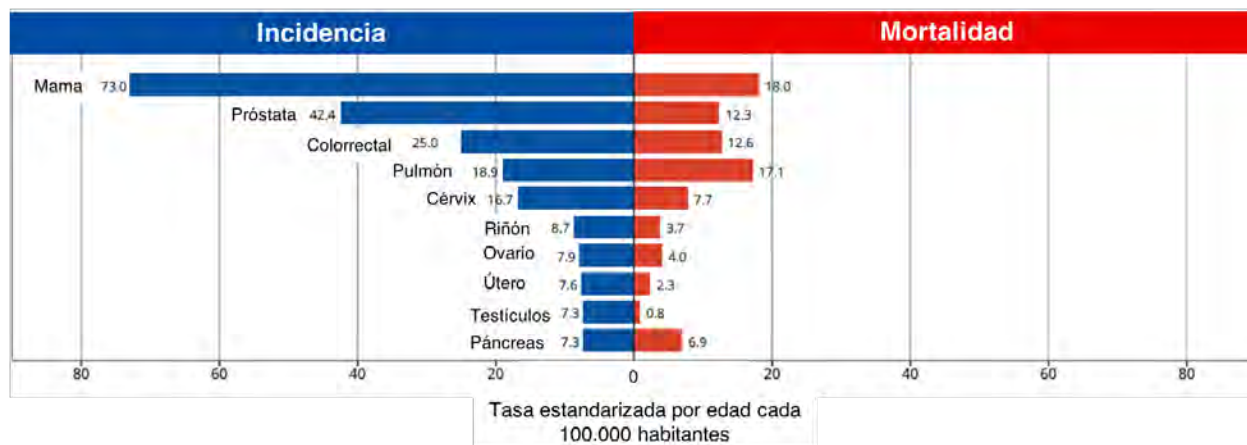


Figura 5: Número estimado de incidencia y mortalidad por cáncer de Argentina. Adaptación¹⁷.

No todas las zonas de la glándula son igualmente propensas a desarrollar tumores prostáticos. Si bien solo un 2,5% de los casos se da en la zona central, suelen ser tumores más agresivos y con peor pronóstico de recidiva¹⁸. Por el contrario, el 80% de los tumores prostáticos se da en la región periférica y progresa hacia fuera de la glándula, al contrario de lo que ocurre en las otras patologías no malignas. Así, el PCa puede pasar inadvertido durante años por considerarse asintomático en estadios tempranos. En este contexto, los controles de los niveles de PSA y el examen digital rectal (EDR) de forma anual luego de los 40 años de edad, resultan fundamentales para el diagnóstico temprano de un posible tumor asintomático, como se discutirá en la siguiente sección.

En el PCa pueden identificarse tres estadios, cada uno con un pronóstico y tratamiento distinto. Cuando el tumor se encuentra confinado a la glándula se dice que el PCa está *localizado* y tiene buen pronóstico. En el PCa *localmente avanzado*, si bien el tumor sigue estando mayoritariamente en la próstata, parte del tejido adyacente ha comenzado a ser penetrado por las células malignas, afectando la cápsula y las vesículas seminales. Finalmente, en la enfermedad *metastásica*, el cáncer ha escapado los confines de la glándula y colonizado inmediatamente los ganglios linfáticos, aunque normalmente puede invadir órganos más distantes como el hígado, los pulmones y, fundamentalmente, el hueso (Figura 6).

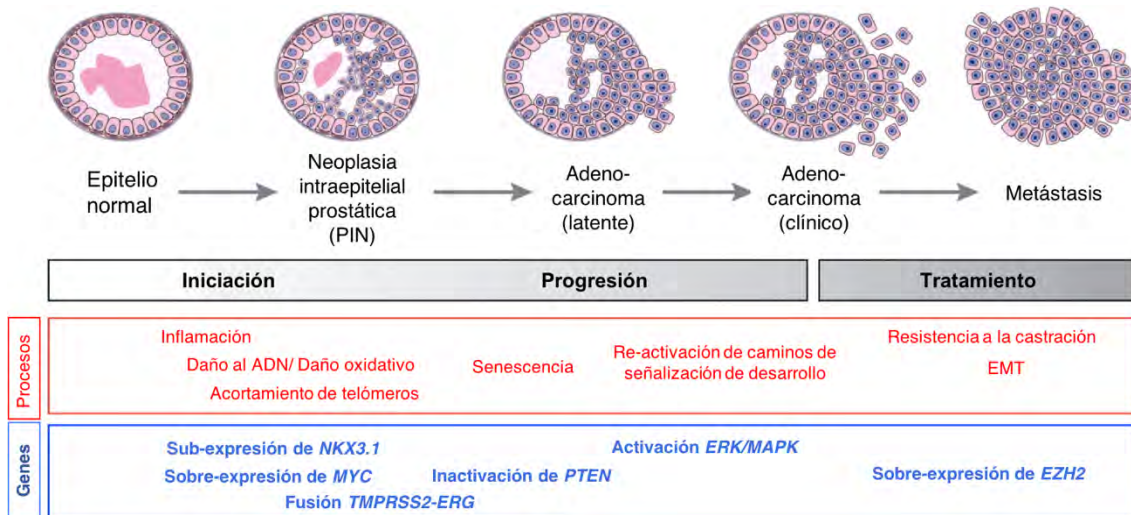


Figura 6. Esquema de la progresión del PCa. Estadios de la progresión del PCa junto a los procesos moleculares involucrados en cada estadio. (EMT: transición epitelio-mesenquimal; *NKX3.1*: factor de transcripción homeobox *NKX3.1*; *MYC*: proto-oncogen *MYC*; *TMPRSS2-ERG*: fusión génica entre el promotor de la serina-proteasa transmembrana 2 y el gen del virus de la eritroblastosis; *PTEN*: homólogo de fosfatasa y tensina; *ERK*: quinasa regulada por señal extracelular; *EZH2*: *enhancer* del complejo represivo polcomb Zeste 2.histona-lisina metiltransferasa.) Adaptación ¹⁹.

Para definir la agresividad de los cánceres próstáticos se utiliza el grado de Gleason que consiste en un sistema de escala entre 2 y 10, que permite inferir las posibilidades de diseminación de la enfermedad en base a las características de las células y el tejido tumoral observados en una biopsia. Para la asignación del grado de Gleason, el patólogo asigna un valor de acuerdo al patrón más representado en la biopsia y otro valor al segundo patrón más abundante. Así, un Gleason 7, por ejemplo, puede estar formado por los grados 3+4 o 4+3, dependiendo de los patrones observados por el patólogo²⁰. Un grado de Gleason bajo indica que las células tumorales son similares a las células normales, y en el tejido prostático aún se identifican glándulas pequeñas, siendo bajas las posibilidades de progresión de la enfermedad. Por el contrario, a mayor grado de Gleason, mayores son las diferencias que guardan las células tumorales respecto de las normales y mayor es la probabilidad de diseminación del tumor, evidenciado por una más tejido entre las glándulas (incremento del estroma) e infiltración de otros tipos celulares en tejidos adyacentes. Los grados más avanzados muestran glándulas ocasionales o ausencia de glándulas, y masas irregulares de células (Figura 7). Por lo tanto, el tratamiento administrado depende principalmente del estadio de la enfermedad, los niveles de PSA y el grado de Gleason, pero también se contempla la edad del paciente y el compromiso de las funciones urinarias del mismo ²¹.

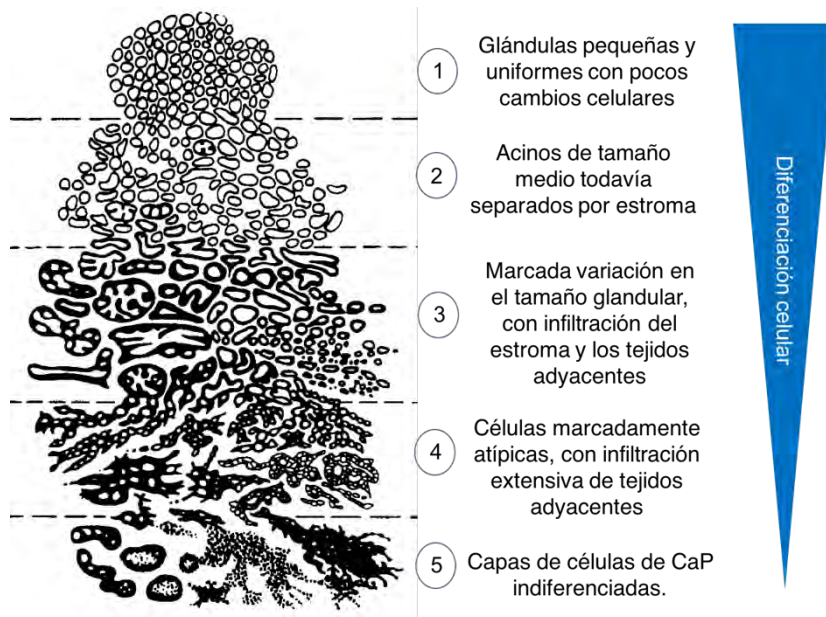


Figura 7. Esquema representativo de los cambios histológicos de la próstata durante la progresión tumoral con los 5 grados identificados por Gleason.

Existe otra clasificación aplicada a la estratificación del PCa conocida como TNM, que se basa en las características del tumor primario (T), de los ganglios linfáticos (N) y las metástasis (M). Mientras que los valores de T permiten distinguir entre la enfermedad intra-capsular (T1-T2) y la extra-capsular (T3-T4), el nivel N evalúa el compromiso de los ganglios linfáticos drenantes (N0 vs. N1), y el nivel M permite evaluar la proyección del tumor hacia los ganglios linfáticos más distante, otros órganos y el hueso (M0 vs. M1)²².

Usualmente, en los primeros estadios de la enfermedad, los tratamientos administrados incluyen radioterapia, cirugía o incluso la vigilancia activa, donde los pacientes se monitorean únicamente por EDR y evaluando los niveles de PSA²³. Dado el rol de los andrógenos en el desarrollo y crecimiento de la próstata, en estadios más avanzados suele recurrirse a la terapia por privación de andrógenos o ADT (por sus siglas en inglés *Androgen Deprivation Therapy*), la cual ha demostrado retardar la progresión del tumor efectivamente²⁴. Sin embargo, una gran proporción de pacientes que reciben esta terapia presentan recidivas, en forma de tumores mucho más agresivos y con alto potencial metastásico. En esta etapa, el AR se encuentra constitutivamente activo, y por lo tanto el crecimiento de las células tumorales prostáticas es independiente de la presencia de andrógenos. Es entonces cuando el PCa se vuelve resistente a la castración (CRPC) y el pronóstico decae considerablemente²⁵. Durante la CRPC los tumores pueden producir sus propios andrógenos, sobre-activar al AR, o incluso expresar variantes mutadas del mismo que le confieren actividad independiente de hormonas. En estos casos, dado que las células de PCa aún dependen de los caminos de señalización

del AR, suelen utilizarse terapias de “segunda línea” que evitan que el tumor se disemine, como son la administración de Abiraterona y Enzalutamida²⁶. Estas drogas fueron aprobadas por la Administración de drogas y alimentos de Estados Unidos (FDA) en 2012 como tratamiento para el CRPC metastásico²⁷. Abiraterona es un fármaco que impide la liberación de testosterona de las glándulas adrenales, las cuales aportan solo el 10% de la testosterona total. Por este motivo, solo algunos tratamientos se centran en las glándulas adrenales cuando se quiere eliminar toda la testosterona circulante. Generalmente, el tratamiento con abiraterona es co-administrado con esteroides para contrarrestar los efectos del bloqueo total de sus glándulas blanco y ha demostrado prolongar eficazmente la vida de pacientes con PCa refractario a la terapia hormonal. Por otro lado, la enzalutamida es anti-androgénico no-esteroideo que bloquea la actividad del AR²⁶. Si bien se ha demostrado que ambas drogas son efectivas en pacientes tanto pre como post-quimioterapia, la enzalutamida funciona particularmente bien en individuos con CRPC metastásico, prolongando el tiempo de vida del enfermo²⁶. Un estudio clínico presentado en 2017 denominado LATITUDE indicó que la combinación de abiraterona con prednisona en bajas dosis al comienzo de la ADT, es capaz de retardar la progresión tumoral hasta 18 meses. A un año del lanzamiento de LATITUDE, la FDA ha aprobado esta combinación de fármacos como tratamiento temprano en hombres con PCa de alto riesgo metastásico en estadios sensibles a la castración (*castration sensitive prostate cancer, CSPC*)²⁸.

IV. BIOMARCADORES DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO EN EL PCa

Como fue mencionado anteriormente, el PSA es uno de los marcadores más ampliamente utilizado en el diagnóstico del PCa. La prueba de PSA es sencilla y se basa en la medición de los niveles séricos totales de esta serina proteasa. Sin embargo, esta prueba puede dar falsos positivos, ya que otras patologías de la próstata como la BPH, pueden elevar los niveles de PSA. Éste, es un marcador tejido-específico pero no específico del PCa. Si bien se han aplicado ciertas correcciones sobre los valores de referencia utilizados, por ejemplo de acuerdo a la edad del paciente o relativizando al volumen de la glándula, aún existen controversias respecto al porcentaje de falsos negativos o incluso casos de pacientes no biopsiados por estos ajustes²⁹. Se han descrito otros marcadores moleculares que podrían ser útiles para la caracterización de tejidos pre-neoplásicos como el marcador de proliferación celular Ki67 y el regulador apoptótico Bcl-2, aunque aun no son utilizados de rutina para el diagnóstico de la enfermedad³⁰. Las fusiones cromosómicas en ciertos genes también pueden

ser identificadas como marcadores en PCa. Por ejemplo, la fusión TMPRSS2-ERG presente únicamente en PCa y ausente en las lesiones pre-malignas^{30,31}. Como fuera mencionado anteriormente, las alteraciones en el AR juegan un importante rol en PCa. Conforme la enfermedad progresa hacia el estadio CRPC, se pueden identificar variables de este receptor. En el año 2009 el grupo de investigación de Hu y colaboradores, logró identificar 5 variantes de *splicing* (ARV1, ARV2, ARV5, ARV6 y ARV7) de las cuales la forma ARV7 resultó la más ampliamente expresada en líneas tumorales prostáticas³²⁻³⁴. Más aún, fraccionamientos de núcleo y citoplasma en células de PCa como VCaP y 22RV1 han demostrado la presencia del ARV7 en núcleo en ausencia de andrógenos, confirmando su actividad como factor de transcripción constitutivamente activo³³. Desde su descubrimiento, el ARV7 cobró más relevancia como marcador, ya que es la variante más expresada no solo en líneas celulares de PCa, sino también en muestras de tejidos de pacientes con CRPC y modelos pre-clínicos de resistencia a la castración^{35,36}. Al evaluar la expresión de ARV7 mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RTqPCR) en 124 muestras de pacientes en diferentes estadios, se observó que aquellos individuos sometidos a prostatectomías radicales con expresión de ARV7 menor a la mediana, presentaban mayor sobrevida libre de progresión, definida por los niveles séricos de PSA. Estos datos fueron los primeros en sugerir que la expresión de ARV7 podría usarse como un biomarcador para identificar los pacientes en los cuales las terapias no resultarán exitosas³³.

Desde el año 2003, el ARNm no codificante conocido como uPM3, derivado del gen asociado a cáncer de próstata 3, *PCA3*, expresado únicamente en la próstata, es reconocido como otro marcador diagnóstico de la enfermedad al ser detectado en orina. Aunque ofrece una alta especificidad dada por un incremento de entre 60-100% en su expresión en cáncer, resultó más eficiente en el diagnóstico de pacientes que ya han cursado una biopsia, siendo necesaria la evaluación de uPM3 junto con otras pruebas ^{29,37}.

Otros métodos de detección más invasivos son también muy utilizados. La ultrasonografía transrectal (UTR) permite obtener imágenes tanto de la próstata como de las vesículas seminales, facilitando la localización de sitios específicos sobre los cuales se realizará la posterior biopsia de la glándula. Sin embargo, se demostró que la UTR no es una buena herramienta de diagnóstico en los estadios iniciales de la enfermedad, etapa en la cual más del 50% de los tumores no palpables pueden ser pasados por alto³⁸.

Actualmente, las biopsias se realizan sobre la zona central, la zona periférica y, ocasionalmente, si el paciente muestra aumento recurrente en los niveles de PSA, también se realizan sobre la zona de transición, tomándose muestra de hasta 12 sitios distintos de la próstata³⁹. Las biopsias tienen un alto valor pronóstico y diagnóstico gracias a la identificación de neoplasias intra-epiteliales prostáticas (PIN) y de proliferación atípica de pequeños acinos (ASAP). El PIN consiste en acinos prostáticos arquitectónicamente benignos y conductos revestidos por células citológicamente atípicas. Normalmente era sub-clasificado como PIN de bajo o alto grado. En la actualidad, el PIN de bajo grado (LG-PIN) no tiene valor pronóstico mientras que el de alto grado (HG-PIN) es considerado un precursor de PCa avanzado. Más aún, recientemente se identificó a la sobre-expresión del inhibidor 2a de la quinasa dependiente de ciclina (p16^{INK4A}) como un marcador específico de pacientes con HG-PIN, pronosticando la futura recaída de enfermos con PCa en estadios tempranos⁴⁰. El ASAP se caracteriza por pequeños acinos revestidos con células epiteliales citológicamente anormales con núcleos prominentes donde pueden identificarse los nucleolos fácilmente. Al igual que el PIN, el ASAP determinado mediante biopsia permite predecir la presencia de PCa en más del 40% de los casos⁴¹. Aún así, una biopsia negativa no excluye la posibilidad de PCa y un resultado positivo tampoco lleva a un tratamiento inmediato.

Actualmente, la estratificación del grado de Gleason también es estudiada como marcador pronóstico de la enfermedad. Como fue mencionado anteriormente, el grado de Gleason 7 puede estar formado por los valores 3+4 o 4+3, asignados por el patólogo de acuerdo a los dos patrones predominantes observados en la biopsia. Se ha reportado que estas diferencias en la composición de un mismo Gleason 7 no solo impactan sobre la recaída bioquímica y la respuesta a la terapia primaria administrada, sino que también impacta sobre la mortalidad de los pacientes⁴². El trabajo de Wright y colaboradores reportó diferencias significativas en la mortalidad de pacientes con Gleason 3+4 vs. 4+3, disminuyendo el índice de supervivencia a 10 años de 92% a 77%, respectivamente, en individuos menores de 65 años. Estas diferencias podrían ser atribuidas a numerosos factores incluyendo diferencias poblacionales, variantes en las prácticas de la evaluación del PSA y sesgos durante la selección de las áreas biopsiadas ⁴².

En resumen, las herramientas implementadas al día de hoy no son totalmente efectivas para diferenciar entre aquellos tumores tempranos que representan una amenaza para la supervivencia y aquellos que no. Si bien el número de técnicas y marcadores para el diagnóstico va en

aumento y perfeccionamiento con el paso del tiempo, aún faltan identificar marcadores específicos que permitan discriminar entre las distintas etapas y las probabilidades de desarrollar un tumor prostático, o bien de recaer en la enfermedad luego del tratamiento administrado.

V. METÁSTASIS ÓSEA DEL PCa

Cuando las células tumorales prostáticas se diseminan hacia el hueso, se habla de metástasis ósea del PCa. En las primeras etapas del desarrollo tumoral, antes de que el tumor haya sido diagnosticado, algunas células malignas pueden infiltrarse en el torrente sanguíneo, convirtiéndose en células tumorales circulantes (CTCs). Aunque la mayoría de las CTCs muere antes de poder colonizar sitios diferentes al tejido de origen, estas células guardan la capacidad de invadir órganos distantes, asentarse en nichos fértiles y eventualmente crecer en el tejido blanco. Más aún, la pequeña proporción de células tumorales diseminadas en órganos distantes (CTDs) pueden localizarse de manera latente en el hueso durante años, y aún así solo la mitad de los pacientes desarrolla una metástasis clínicamente evidente⁴³.

El proceso metastásico en el hueso consta de varias etapas: en primer lugar, las células tumorales se escinden del tumor primario y migran localmente, invadiendo los vasos sanguíneos; luego, las células tumorales interactúan con distintos tejidos blanco, haciendo que el sitio de metástasis sea específico para cada tipo tumoral, adhiriéndose, finalmente, a la superficie del hueso, órgano que colonizan. El microambiente óseo está compuesto de osteoblastos, osteoclastos y matriz mineralizada, junto con otros tipos celulares, cuya actividad se ve alterada en pacientes con PCa metastásico. Si bien el hueso es continuamente remodelado gracias al balance entre osteoclastos y osteoblastos (Figura 8), la presencia de células de PCa afecta este balance, desplazándolo hacia la formación de hueso nuevo ya sea por una sobre-activación de los osteoblastos, la inhibición de los osteoclastos o una combinación de ambas. Estos procesos, en conjunto, favorecen el establecimiento y crecimiento de las células tumorales sobre el hueso mediado por el cambio del metabolismo óseo y por el cambio en la proliferación/ diferenciación de las células del hueso, inducido por las células tumorales en el nicho óseo ^{44,45}.

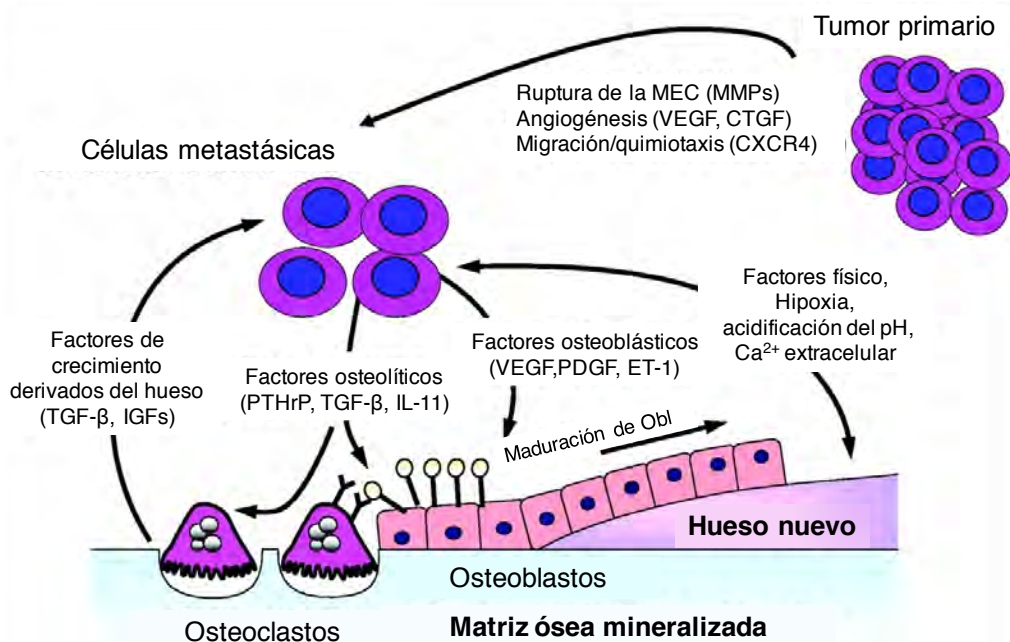


Figura 8. El ciclo de remodelación del hueso en la metástasis ósea. Factores como MMPs, CXCR4, VEGF y CTGF permiten la quimiotaxis de las células tumorales hacia el hueso y facilitan su supervivencia en el microambiente óseo. Los factores físicos, incluyendo la hipoxia, la acidificación del pH, el calcio extracelular, y factores derivados de las células óseas como TGF-β e IGFs, activan la expresión de factores estimulantes de osteoblastos como PDGF y ET-1. Los factores estimulantes de osteoclastos, incluyendo PTHrP, TGF-β e IL-11 también aumentan. Estos factores estimulan a las células óseas que promueven el crecimiento de las células tumorales en el hueso. (MMPs: metaloproteasas; CXCR4: receptor de quimioquinas tipo 4; VEGF: factor de crecimiento vascular y epitelial; CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo; TGF-β: factor de crecimiento transformante tipo β; IGF: factor de crecimiento dependiente de insulina; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; ET-1: endotelina 1). Adaptación⁴⁴.

La primera barrera que encuentran las células tumorales para poder migrar es la MEC, una malla densa formada por proteoglicanos y proteínas fibrosas como fibronectina y colágeno. La degradación de la MEC gracias a la liberación de metaloproteasas (MMPs), el plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), combinados con re-arreglos en el citoesqueleto de las células tumorales y modificación en la expresión de proteínas de adhesión, son los procesos que rigen y limitan las primeras etapas de la cascada metastásica^{46,47}.

Entre los caminos celulares que favorecen la ruptura de la MEC y la migración hacia órganos distantes, algunos de ellos favorecen específicamente el tropismo de las células tumorales prostáticas hacia el hueso. El eje RANKL/RANK/OPG está sobre-expresado en tumores avanzados, con alto grado de Gleason y altos niveles de PSA⁴⁸ y se lo correlaciona con un

peor pronóstico de supervivencia, siendo RANK el receptor activador de NF κ B, RANKL su ligando, y OPG osteoprotegerina, su receptor *decoy*. La expresión de las cadherinas en las células tumorales prostáticas y, más específicamente, la proporción de E-cadherina/N-cadherina es otro de los marcadores moleculares que describen el potencial metastásico. El *switch* de E-cadherina a N-cadherina es un indicativo de la pérdida del fenotipo epitelial hacia un fenotipo mesenquimal, conocido como transición epitelio-mesenquimal (EMT), evento que se describirá más adelante. El aumento de la expresión de N-cadherina por sobre E-cadherina se relaciona con una menor supervivencia de los pacientes⁴⁹. La pérdida de E-cadherina en membrana durante la EMT, resulta en la relocalización de β -catenina desde la membrana hacia el núcleo, donde esta última participa de la vía transcripcional inducida por el factor de transcripción *wingless e int* (Wnt), otro de los caminos celulares que facilitan la metástasis. Más específicamente, el balance entre Wnt y el inhibidor *Dickkopf* de la vía de Wnt (DKK1), determina la naturaleza ósea de la metástasis en el PCa: la actividad de Wnt es crítica en la diferenciación de osteoblastos a partir de sus precursores, mientras que DKK1 actúa como un regulador negativo de Wnt^{49,50}.

Si bien TGF- β no es el único ni el más abundante en el hueso, es quizá el factor determinante en la metástasis osteolítica del PCa, ya que regula la remodelación y desarrollo del hueso. Los osteoblastos depositan TGF- β en la matriz ósea, que luego se activa durante la resorción osteolítica. Este proceso, junto con la participación de otros factores de crecimiento (factores de crecimiento tipo insulina; IGF-I e IGF-II) estimulan la proliferación, tanto de las células del hueso como de las células tumorales allí presentes⁴⁴.

Los cánceres avanzados normalmente escapan de la inhibición de TGF- β , lo cual activa la EMT e invasión de las células malignas, aumentando la angiogénesis y suprimiendo la vigilancia inmunológica. La estimulación de TGF- β favorece la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroide (PTHrP), la cual desencadena el proceso osteolítico en el hueso junto con la interleucina 11 (IL-11)⁴⁴. El grupo de Fournier y colaboradores demostró que el *knock down* de PMEPA1, regulador negativo de TGF- β , favorece la formación de metástasis óseas en modelos murinos de PCa⁵¹ mientras que el grupo de Shariat y colaboradores ha demostrado que el aumento de los niveles séricos de TGF- β en pacientes sometidos a prostatectomías radicales guarda valor pronóstico de recidiva⁵². Sin embargo,

hasta el momento, no hay estudios que demuestren el valor pronóstico de TGF- β para predecir la metástasis al hueso.

Las integrinas, heterodímeros de membrana, también participan activamente en la progresión tumoral gracias a la proliferación, diferenciación, migración e invasión celular que desencadenan al internalizar las señales transmitidas por la MEC. Las interacciones célula-célula y célula-MEC permiten que la dimerización de diferentes integrinas α y β sobre la membrana plasmática tengan un efecto tejido-específico sobre las capacidades metastásicas de las células tumorales⁵³. Por ejemplo, se demostró que la sobre-expresión de $\alpha v\beta 3$ y su interacción con la quimioquina CXCL12 tiene un impacto tanto en las células tumorales como en la direccionalidad de la metástasis hacia el hueso. Más aún, aunque la interacción entre CXCL12 y su receptor, CXCR4, ha sido previamente descrita como un factor clave en la migración de células tumorales que facilita el proceso metastásico, no se ha comprobado que favorezca la metástasis ósea por sobre la metástasis visceral⁵⁴.

Mientras que la evidencia *in vitro* sostiene que las líneas celulares tumorales con perfiles más invasivos como PC3 exhiben una mayor expresión y localización de estas integrinas en membrana respecto de la línea LNCaP, estudios *in vivo* sugieren que la direccionalidad hacia el hueso se da por la interacción entre estas integrinas y componentes específicos de la matriz ósea como osteopontina y vitronectina⁵⁵.

VI. HEMO-OXIGENASA 1 Y SU ACTIVIDAD HOMEOSTÁTICA

Hemo-oxigenasa 1 (HO-1) es una proteína de 32 KDa 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, rindiendo cantidades equimolares de CO, bilirrubina (BR), obtenida a partir de biliverdina (BV) por la biliverdin reductasa (BVR), y Fe²⁺ como productos de la reacción (Figura 9).

Los productos de esta reacción enzimática ejercen un rol citoprotector, manteniendo la homeostasis celular. Por ejemplo, la relación BR/BV provee a las células de una alta capacidad antioxidante, eliminando las especies reactivas de oxígeno (ROS). De igual manera, si bien la producción de hierro ferroso podría ser tóxico para la célula, por el contrario el aumento de este catión favorece la sobre-expresión de ferritina (FtH), que secuestra el hierro libre y confiere propiedades antioxidantes y citoprotectoras⁵⁶. Por su parte, el CO ha

sido ampliamente estudiado como producto citoprotector de esta reacción, siendo una molécula anti-oxidante, anti-inflamatoria, anti-proliferativa y anti-apoptótica, estando también involucrada en la vascularización tisular⁵⁷. El aumento de los niveles de hemo, la luz ultravioleta, los lipopolisacáridos, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las cobalto-protoporfirinas, el estrés térmico (*heat shock*), los metales pesados, las citoquinas proinflamatorias, el óxido nítrico (NO), el etanol y las prostaglandinas son algunos de los factores pro-oxidativos que inducen la sobre-expresión de HO-1 como respuesta al estrés celular⁵⁸.

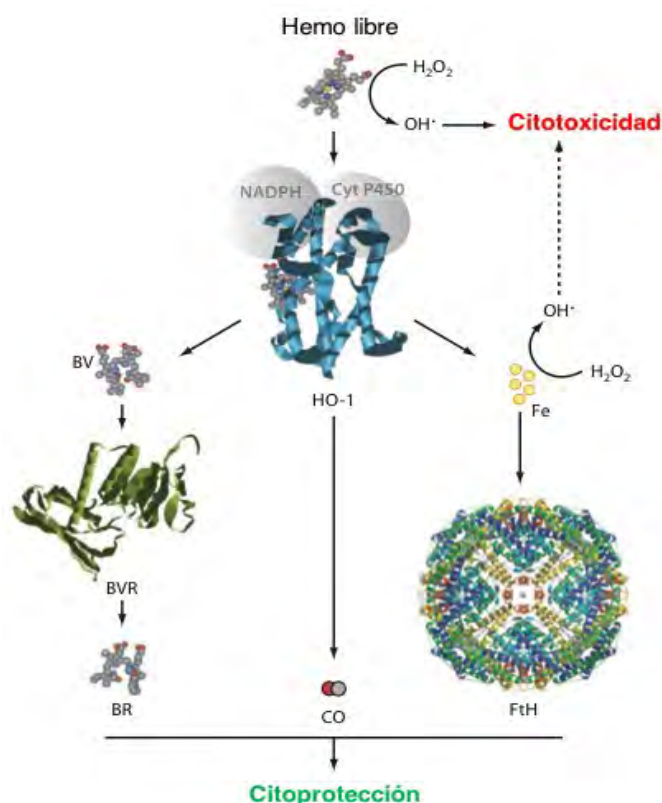


Figura 9. Esquema del eje hemo-HO-1 donde el hemo libre puede tener tanto capacidades citotóxicas como citoprotectoras, según la reacción. Mientras que la formación del radical hidroxilo producido por la oxidación del peróxido de hidrógeno ejerce un rol citotóxico, los productos de degradación del hemo por acción de HO-1 tienen un efecto citoprotector. La eliminación del hemo libre implica la ruptura del anillo de protoporfirina IX con la producción de biliverdina (BV), convertida a bilirrubina (BR) por la biliverdin reductasa (BVR); CO y Fe, captado rápidamente por la cadena pesada de la ferritina (FtH). Adaptación⁵⁹

La regulación de HO-1 ocurre a nivel transcripcional, siendo los factores de transcripción BACH1 y KEAP1 los principales responsables de mantener reprimida su expresión. Sin embargo, frente a los estímulos celulares anteriormente mencionados, la expresión de HO-1 es activada por distintos factores de transcripción. Hay 4 familias que activan la transcripción del gen *HMOX1*: los factores de estrés térmico (HSFs), el factor nuclear κB (NF- κB), el factor nuclear eritroide (NF-E2) y la proteína activadora (AP-1). Si bien cada una de ellas se activa frente a un estímulo celular distinto, también pueden funcionar de manera complementaria, ya que un mismo estímulo puede desencadenar diferentes tipos de estrés celular. Por ejemplo,

HSF1 es activado principalmente por la acumulación de proteínas no nativas intracelulares y facilita la expresión de genes cuyos productos son capaces de reestablecer la integridad de las proteínas dañadas. NF-κB es el principal regulador de citoquinas y otros mediadores de las respuestas inmune, capaz de regular la expresión del gen *HMOX1* a través de co-activadores transcripcionales frente a un aumento de condiciones celulares pro-inflamatorias. NRF2, miembro de los factores nucleares eritroides, que normalmente se encuentra retenido en citoplasma por el factor Keap1, es inducido y translocado al núcleo por la presencia de oxidantes celulares. Por último, la familia AP-1 regula procesos como el destino, crecimiento y muerte celular y puede activar la expresión de *HMOX1* por diferentes estímulos como factores inflamatorios⁶⁰.

Resulta claro, entonces, que las mutaciones en el gen *HMOX1* que generen una proteína trunca o deficiente en sus funciones, tendrá graves implicancias en el desarrollo del organismo portador de las mismas. De hecho, se conoce solo un caso de deficiencia en humanos, en el cual un niño de 6 años de edad mostraba un desarrollo anómalo asociado a una hemólisis intra-vascular persistente, coagulación deficiente, fragmentación de eritrocitos, bajos niveles de BR en plasma y deposición de hierro en hígado y riñones⁶¹. La deficiencia de HO-1 por pérdida de función de ambos alelos ha sido más profundamente descrita gracias al estudio de ratones doble *knock-out* para este gen. De los ratones deficientes en *HMOX1* sólo sobrevive un 1-8% de la descendencia según el fondo genético, desarrollan anemia por deficiencia de hierro hacia la semana 20-25 y dejan de ganar peso. Además, dado que el metabolismo del hierro se encuentra alterado, éste comienza a acumularse en los tejidos, lo cual genera estrés oxidativo en hígado y riñones, y una enfermedad inflamatoria crónica progresiva⁶². Las células de estos animales muestran una susceptibilidad aumentada a la injuria oxidativa⁶³.

VII. ROL DE HO-1 EN CANCER

Si bien HO-1 ha sido ampliamente descrita como regulador homeostático frente a distintos estímulos celulares, numerosos grupos han reportado que su expresión se ve alterada significativamente en distintos estadios y tipos de tumores, modulando el crecimiento tumoral y la metástasis. Ya en el año 1997, el grupo de Goodman y colaboradores reportó la sobre-expresión de *HMOX1* en carcinomas de células renales, no habiendo cambios en los niveles de expresión de este gen en el tejido normal circundante⁶⁴. En los laboratorios de Deininger y

Doi reportaron un comportamiento similar en glioblastoma y hepatoma, respectivamente⁶⁵. Más específicamente, tanto en muestras de pacientes como en modelos de ratas C6, se ha demostrado que durante la progresión del oligodendroglioma se acumulan macrófagos y células microgliales que sobre-expresan HO-1 en zonas necróticas, favoreciendo la activación de un eje inflamatorio por la liberación de citoquinas en respuesta a la hipoxia y re-oxigenación del tejido local⁶⁵. Por su parte, en hepatocarcinoma, HO-1 es responsable de un aumento en la tolerancia a estrés por hipoxia en tumores sólidos⁶⁶. En muestras de pacientes con cáncer pancreático, se reportó que los niveles de expresión de HO-1 pueden alcanzar hasta 3,5 veces el valor registrado en páncreas normal, mientras que su inhibición se condice con un aumento en la respuesta a radio y quimioterapia⁶⁷.

De igual manera, se observó elevada expresión de HO-1 tanto en los macrófagos infiltrantes como en el estroma y tejido adyacente de melanomas en estadios avanzados⁶⁷. HO-1 se asocia además con una disminución en la apoptosis en tumores gástricos⁶⁸, de pulmón⁶⁹, colon⁷⁰⁻⁷³, tiroides⁷⁴ y en leucemias⁷⁵. Más aún, la expresión de HO-1 en PCa ha sido previamente estudiada junto con la expresión de PTEN, un supresor tumoral altamente mutado estos tumores. Ambos factores asociados se relacionaron con un mayor grado de Gleason, peor pronóstico y mayor índice metastásico⁷⁶. En una cohorte de 217 pacientes, en el trabajo de Li y colaboradores, se observó que aquellos pacientes con baja expresión de PTEN y alta expresión de HO-1 tienen una mayor probabilidad de recaída clínica evaluada por los niveles de PSA⁷⁷. El análisis de una cohorte de 62 pacientes con CRPC en este mismo trabajo, demostró que los niveles de HO-1 y la incidencia de las deleciones en el gen PTEN está aumentadas en esta cohorte respecto de HG-PIN, PCa localizado y tejido prostático benigno. Incluso en líneas celulares tumorales prostáticas demostraron una menor invasión y proliferación celular al silenciar HO-1 y reestablecer la expresión de PTEN⁷⁷.

HO-1 también demostró tener un rol pro-tumoral en sarcoma de Kaposi (SK), siendo *HMOX1* uno de los genes activados por el receptor acoplado a proteína G del herpesvirus asociado a SK (KSHV) en células endoteliales y fibroblastos. La administración de inhibidores de HO-1 como la estaño protoporfirina IX (SnPP), disminuyó la proliferación y transformación celular y la expresión de VEGF, tanto *in vitro* como *in vivo*⁷⁸.

Sin embargo, el rol de HO-1 en cáncer es muy discutido ya que también se han publicado numerosos trabajos en los cuales se expone el su rol anti-tumoral. Entre los trabajos más

representativos en esta línea, se puede mencionar el de Skrzypek, en el cual se demuestra que HO-1 favorece la expresión de micro-ARNs (miRNAs), supresores tumorales y disminuye la expresión de aquellos pro-tumorales, como el mir-378, en la línea celular NCI-H292 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)⁷⁹. De igual manera, se observó un aumento en la expresión de p53, cambios en los niveles de angioproteína 1 y mucina-5AC, reduciendo así la proliferación, migración y el potencial angiogénico por la acción del CO, producto de la actividad de HO-1. Los experimentos *in vivo* publicados en dicho trabajo respaldan las observaciones *in vitro*, ya que tumores que sobre-expresan *HMOX1* en ratones inmunodeficientes resultaron de menor tamaño, menos vascularizados y oxigenados, y presentaron también una menor cantidad de metástasis. De acuerdo con estas observaciones, pacientes con CPCNP han exhibido una disminución de los niveles de HO-1 en las metástasis en ganglios linfáticos respecto del tumor primario⁷⁹. Trabajos posteriormente publicados por este mismo grupo, demostraron que las causas de estos efectos se extienden río arriba de HO-1, incluso a nivel del regulador transcripcional NRF2⁸⁰. Incluso, el trabajo de Andrés y colaboradores demuestra que una mayor expresión de HO-1 se correlaciona con una mayor supervivencia de pacientes, y que en conjunto con p53 es capaz de disminuir la viabilidad celular a través del arresto del ciclo celular y de mecanismos de apoptosis en líneas tumorales colorectales⁸¹. Respecto a la expresión de HO-1 en macrófagos, también hay evidencia de que su inducción *in vivo* en macrófagos K.O. para el receptor de la quimocina CXCR1 es capaz de reestablecer el peso corporal de los ratones, disminuir la inflamación intestinal y proteger de la carcinogénesis en colon⁸².

El trabajo de Alina Was, Jozef Dulak y Alicja Jozkowicz, quienes llevan una larga trayectoria estudiando las funciones homeostáticas y el rol de HO-1 en diferentes patologías, recopila información que evidencia el complejo papel que puede jugar HO-1 en la carcinogénesis dependiendo del contexto en el cual se la esté analizando⁸³. A su vez, el trabajo de Nitti y colaboradores describe detalladamente cómo es que la expresión de HO-1 puede cambiar a lo largo de la carcinogénesis y la progresión tumoral inhibiendo o favoreciendo dichos procesos, dependiendo del estadio de la malignidad⁸⁴.

Durante los últimos quince años, nuestro laboratorio ha demostrado el rol anti-tumoral de HO-1 en PCa, estudiando distintas vías y procesos celulares involucrados en la progresión tumoral. La inducción farmacológica y genética en distintas líneas tumorales prostáticas sensibles (LNCaP y MDA PCa2b) e insensibles a andrógenos (PC3) inhibe la proliferación,

migración e invasión celular, efectos revertidos luego del silenciamiento de *HMOX1* con un ARN pequeño de interferencia⁸⁵. Más aún, *microarrays* de células PC3 que sobre-expresan HO-1 de manera genética por transfección con el plásmido pcDNA3HO-1, exhiben una disminución en la expresión de genes pro-inflamatorios como *ANGPT1*, *ANGPTL3*, *FIGF*, *IL6*, *IL8*, y factores pro-angiogénicos como *VEGFA*, *VEGFC*, *VEGFD* y *THBS1*⁸⁵. Estos estudios demostraron que la metaloproteinasa MMP9, asociada a la progresión del PCA, también se encuentra inhibida tanto en sus niveles de ARNm, como proteicos y en actividad bajo inducción de HO-1⁸⁵.

Estos resultados son respaldados por las observaciones *in vivo* a partir de xenotransplantes generados por inoculación de células PC3 expresando el vector pcDNA3HO-1 de manera estable, en ratones *nu/nu*. La expresión de MM9, CD34 y la vascularización se ven disminuidos, al igual que el crecimiento tumoral⁸⁶. Incluso, en un modelo murino singénico, el pre-acondicionamiento del microambiente tumoral con hemina, inductor farmacológico específico de HO-1, inyectada de manera subcutánea en ratones C57BL/6 durante los 8 días previos a la inoculación con células TC-1 (línea murina de PCa), puede retardar el crecimiento tumoral hasta 10 días respecto de los ratones que recibieron por la misma vía el vehículo (*buffer* fosfato salino, PBS)⁸⁷.

Adicionalmente, hemos comprobado que el supresor tumoral BRCA1 regula activamente la transcripción de HO-1, así como también la de sus blancos moleculares, anteriormente mencionados⁸⁸. Además, HO-1 reprime la actividad de NFκB⁸⁶ y afecta negativamente la expresión del PSA, mediante la interacción directa con el AR y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). Se comprobó que estos efectos son mediados por la retención citoplasmática de estos factores de transcripción, bajo inducción de HO-1 en células LNCaP⁸⁹.

Incluso, en nuestro laboratorio pudimos determinar el impacto de HO-1 en la proliferación y activación de osteoblastos, gracias a la implementación de un sistema de co-cultivos indirectos entre células PC3 pre-tratadas con hemina y osteoblastos primarios de ratón (PMOs). La inducción farmacológica de HO-1 en las células de PCa modifica *in vitro* la comunicación entre las células tumorales prostáticas y los PMOs, reestableciendo la proliferación de osteoblastos sin alterar la expresión de factores de diferenciación de los mismos, y disminuyendo la expresión de factores de diferenciación de osteoclastos⁹⁰. Los

resultados *in vivo* en este mismo trabajo obtenidos a partir de células PC3HO-1 (que sobre-expresan HO-1 genéticamente) creciendo en el fémur de ratones *SCID*, muestran que los ratones PC3HO-1 exhiben una fuerte remodelación ósea ⁹⁰.

El rol de HO-1 en la diferenciación ósea fue reportado también en otros sistemas. El grupo de Vanella y colaboradores describió en el año 2010 que la sobre-expresión de HO-1 favorece la diferenciación de las células madre mesenquimales de médula ósea hacia el linaje osteoblástico por encima de la diferenciación hacia adipocitos⁹¹. Más aún, previamente también había sido demostrado que el CO producto de la acción enzimática de HO-1, así como también el NO son factores anti-apoptóticos en osteoblastos⁹², y que incluso HO-1 regula la osteoblastogénesis y resorción ósea luego de una fractura, inhibiendo la formación de osteoclastos⁹³. Incluso existen antecedentes de que el factor de alta movilidad 1 (HMGB1) ejerce un rol inhibitorio sobre HO-1, favoreciendo la osteoclastogénesis de los precursores murinos RAW-D⁹⁴. Los productos de degradación del hemo (CO y BR) también son eficientes en la inhibición de la osteoclastogénesis de macrófagos murinos derivados de médula y en la línea celular RAW 264.7, al ser co-estimuladas con RANKL y BR o compuestos liberadores de CO⁹⁵

Todos estos resultados confirman que HO-1 no es únicamente una enzima inducible involucrada en la degradación del hemo, sino que es un partícipe clave en la carcinogénesis y en la progresión tumoral. Mas aún, la presencia de esta proteína en núcleos de muestras de pacientes con PCa⁹⁶, confirma que HO-1 participa activamente en la regulación génica de las vías celulares descritas anteriormente. Sin embargo, al día de hoy se desconocen los interactores moleculares, ya sean nucleares o citoplasmáticos, que podrían explicar los múltiples efectos celulares asociados a HO-1 observados en PCa y en la progresión ósea de estos tumores.

VIII. CONFORMACIÓN Y DINÁMICA DEL CITOESQUELETO

El citoesqueleto, es una compleja red de fibras interconectadas que le otorgan a la célula una estructura que le permite migrar, cambiar su forma en respuesta a estímulos, resistir fuerzas externas e incluso transportar cargas de un extremo al otro de la célula⁹⁷. El citoesqueleto está compuesto principalmente por tres grandes filamentos: los filamentos de actina (FA), los microtúbulos (MT) y los filamentos intermedios (FI), cada uno de ellos con propiedades

diferentes en cuanto a su dinamismo y rigidez. La interacción entre los tres tipos de filamentos, junto con las proteínas que los regulan, determina la polaridad celular y permite la deformación de la célula durante la migración.

Filamentos de actina

Los filamentos de actina en las células pueden encontrarse de manera monomérica (G-actina) o polimerizada (F-actina). Para la polimerización, cada una de las subunidades de G-actina es reclutada a un complejo de nucleación formado por tres monómeros de actina-G-ATP y otras proteínas nucleadoras, como Arp 2/3 y forminas, blancos moleculares de RhoGTPasas que orquestan el proceso de polimerización, como se describirá más adelante. Posteriormente, se produce la rápida adición de más monómeros de actina-G-ATP, estableciendo el extremo positivo o *barbed end* del filamento hacia la periferia celular ⁹⁸ (Figura 10).

El dinamismo de los FA está dado por la posibilidad de despolimerizar por el extremo negativo o *pointed end*, donde la hidrólisis de adenosina trifosfato (ATP) genera un cambio conformacional que disminuye la energía de interacción de las subunidades y así éstas se liberan. Este conjunto de procesos da lugar a una estructura de doble hélice con un diámetro aproximado de 6 nm⁹⁹.

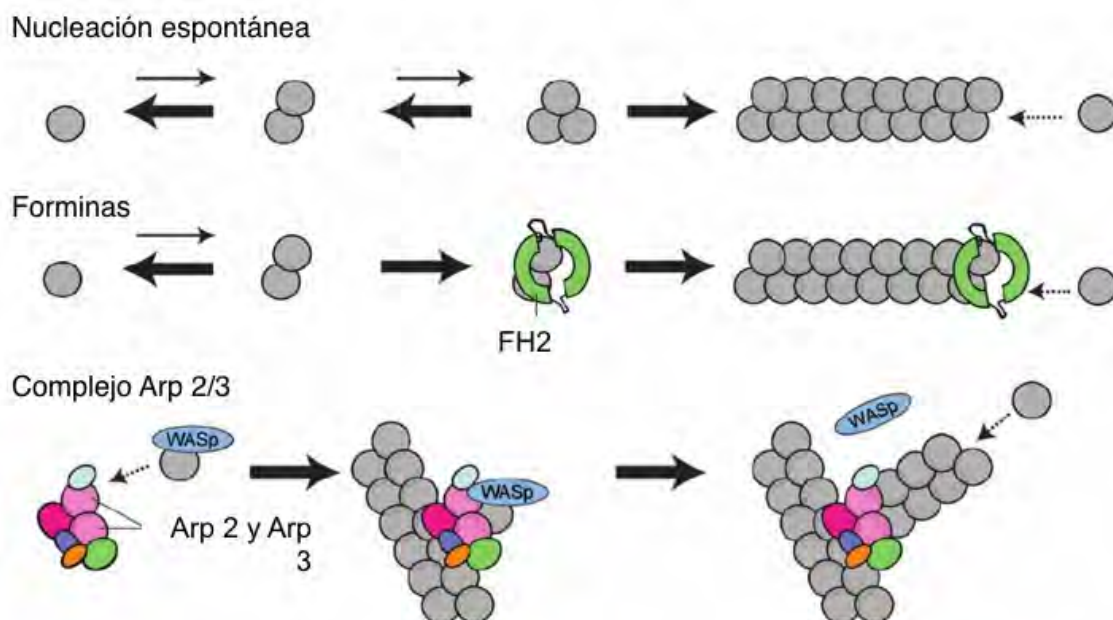


Figura 10. Esquematización del ensamblado de microfilamentos de actina por nucleación

espontánea, a través de forminas o bien en ramificaciones de filamentos pre-existentes por Arp 2/3. Adaptación¹⁰⁰.

Normalmente, el citoesqueleto de actina interviene en la motilidad celular, la diferenciación, división celular y organización de la membrana plasmática, procesos que no pueden ser llevados a cabo únicamente por la polimerización/despolimerización de monómeros, sino que requiere de la participación de las llamadas proteínas de unión a actina (ABPs), resumidas en la figura 11.

Como fue mencionado anteriormente, el complejo Arp 2/3 se une al extremo positivo asegurando la rápida nucleación de *novo* o polimerización sobre filamentos pre-existentes. Se demostró que otros complejos, como la familia WASP, WAVE y Verprolina/WIP, así como también la formina FH2, son potenciadores de la actividad de Arp 2/3 en el proceso de polimerización^{101,102}. Otras ABPs son responsables de mantener la integridad o promover la desintegración de los FA. Las proteínas del *capping*, tensina y gelsolina bloquean la adición de nuevos monómeros, aunque esta última puede tener un rol dual, participando también en la ruptura de los filamentos. Las proteínas más ampliamente estudiadas que regulan la despolimerización son el factor despolimerizador de actina (ADF) y la familia de cofilinas. Estas últimas se asocian a actina-F-ADP, promoviendo la disociación de actina-ADP del extremo negativo del microfilamento, generalmente en asociación con AIP-1 (proteína de interacción con actina-1)¹⁰².

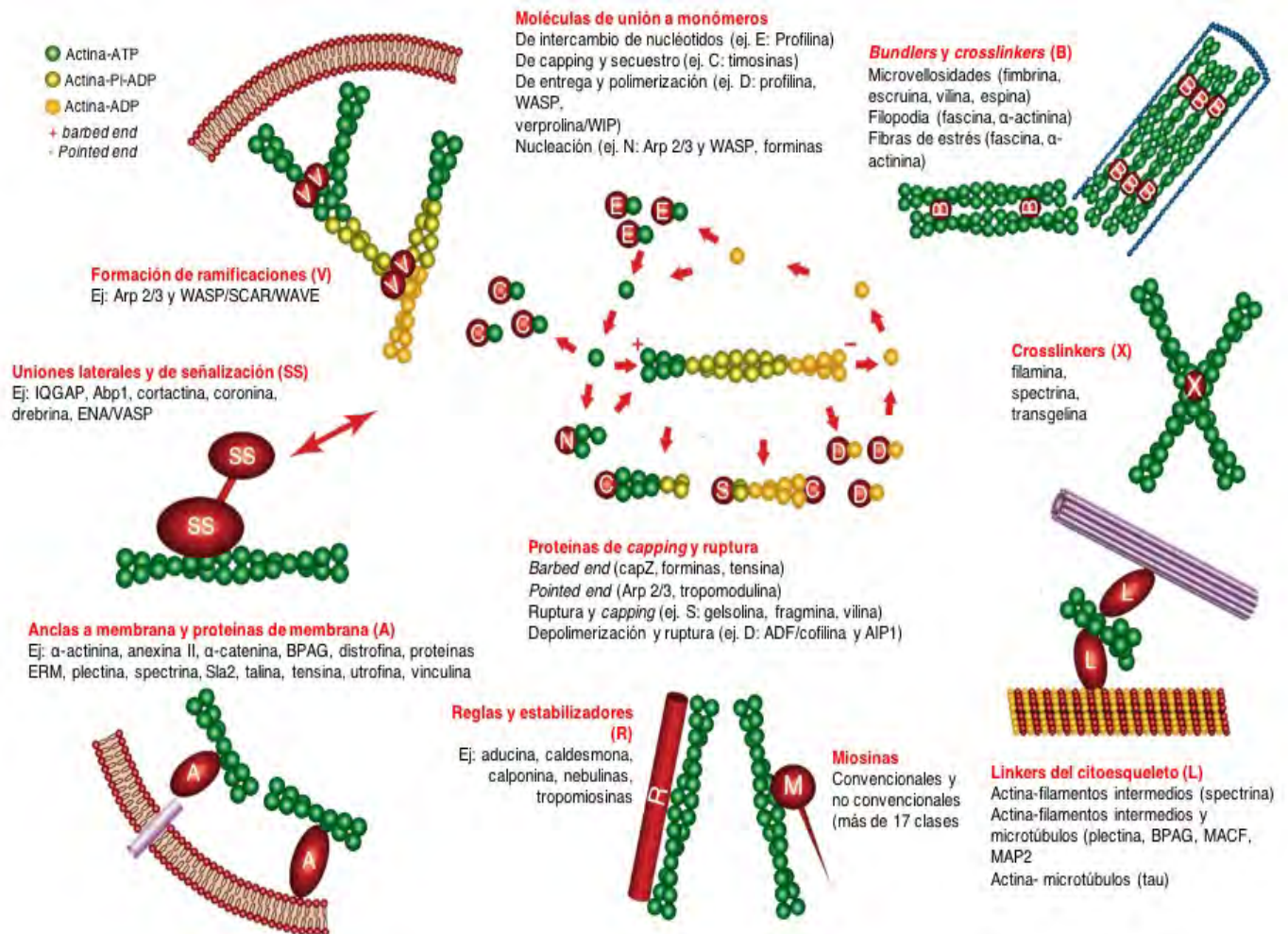


Figura 11. Proteínas de unión a actina de acuerdo a su función. Adaptación¹⁰².

Además, existen otras proteínas asociadas a los FA que no participan en la regulación de su dinámica, sino que únicamente la usan como soporte o andamiaje. Tal es el caso de las miosinas (moléculas transportadoras que se desplazan con gasto de ATP), talina y vinculina (moléculas que conectan el citoesqueleto de actina con receptores de adhesión celular como distroglicanos e integrinas) y anexas (moléculas de anclaje en la membrana).

Los FA pueden ubicarse de diferente manera en la célula. En la periferia celular, se identifican protrusiones delgadas tipo hoja de 0,1-0,2 μm llamadas **lamelipodios**, donde la actina se dispone de manera reticular y ramificada. En contraposición, los **filopodios** son estructuras tipo dedos de 0,1-0,3 μm formados por haces paralelos de actina filamentosa o *bundles* de actina¹⁰³. Ambas estructuras son responsables principalmente de la motilidad celular, en respuesta a las señales sensadas por las adhesiones focales (grupos de integrinas y otras proteínas de señalización de membrana). Las fuerzas protrusivas de la red de actina permiten

que los lamelipodios se prolonguen sobre la superficie de apoyo y, gracias a la presencia de moléculas de adhesión en los extremos de los filopodios, se produce el anclaje y empuje de la células hacia delante. Otras estructuras son responsables además de degradar la MEC durante la migración. A diferencia de los filopodios y lamelipodios, los **podosomas** e **invadopodios** son prolongaciones que se disponen sobre la MEC de modo perpendicular, confiriendo a las células capacidades invasivas (Figura 12). Mientras que los podosomas son típicos de células remodeladoras del tejido, como macrófagos y osteoclastos, los invadopodios son particularmente importantes durante la invasión de células tumorales¹⁰⁴. Sin embargo, ambas estructuras comparten características moleculares y funcionales, incluyendo la dependencia de las quinasas Src, presencia de proteínas de adhesión focal, integrinas y principalmente las metaloproteinasas, MMP2 y MMP9^{105,106}.

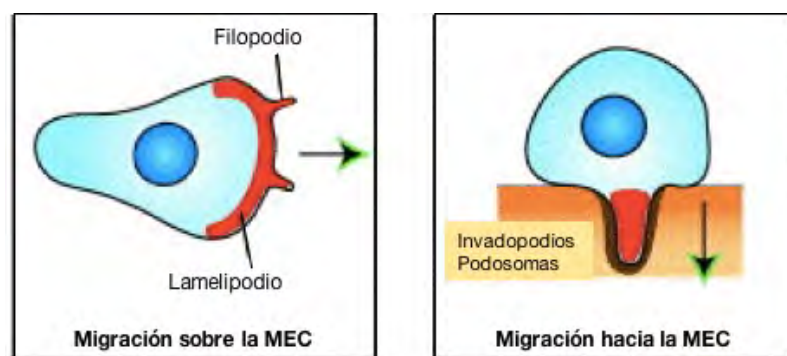


Figura 12. Estructuras de filamentos de actina durante la migración celular. Adaptación¹⁰⁷.

Las proteínas de la familia Rho son clave en la activación de las proteínas reguladoras del citoesqueleto, gracias a su capacidad de interacción tanto con GTP como GDP y su actividad intrínseca de GTPasas. Su activación está dada por el intercambio entre GTP y GDP, el cual es llevado a cabo por los factores de intercambio del nucleótido guanina (GEFs), que favorece la liberación de guanosin difosfato (GDP) y posterior unión a guanisin trifosfato (GTP). Cuando las Rho están unidas a GTP se dice que están *activadas* y son capaces de actuar sobre sus blancos moleculares. Su inactivación, en cambio, se da por las proteínas activadas por GTPasas (GAPs), que catalizan la hidrólisis de GTP, dejando a las Rho unidas a GDP y, en consecuencia, inactivas¹⁰⁸ (Figura 13).

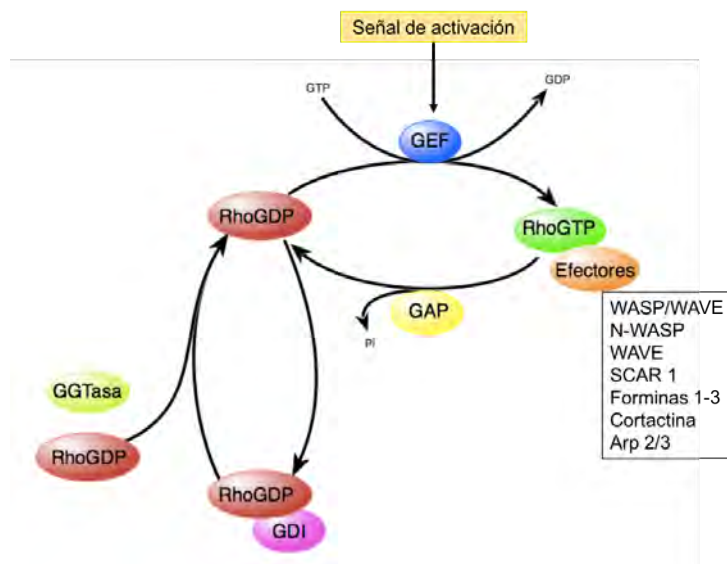


Figura 13. Esquema de la activación de Rho GTPasas. Las Rho GTPasas son dirigidas hacia la membrana por modificaciones post-transcripcionales generadas por las geranyl-geranyl-transferasas (GGTasas). El ciclo entre la forma inactiva (unido a GDP) y la forma activa (unido a GTP) es regulado por los factores de intercambio de nucleótido guanina (GEFs) y las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs). Los factores inhibidores de la disociación del nucleótido guanina (GDIs) inhiben la disociación del nucleótido y controlan el ciclo de las Rho GTPasas entre la membrana y el citosol. Las GTPasas activas, unidas a GTP, interactúan con las moléculas efectoras para mediar distintas respuestas celulares. La activación de las GTPasas río arriba ocurre a través de las GEFs. Adaptación¹⁰⁸.

Las tres RhoGTPasas más estudiadas en mamíferos son: RhoA, implicada en la formación de fibras de stress y adhesiones focales; Rac1, que promueve la formación de lamelipodios y Cdc42, que regula la síntesis de filopodios. Ya sea por unión a Cdc42, Rac1, por fosforilación o interacciones con cortactina, las proteínas WASP/WAVE, localizadas en la periferia celular, son el principal blanco molecular durante la polimerización de los filopodios. Se ha comprobado que estas proteínas Rho tienen una función redundante, ya que la deficiencia en la expresión o activación de alguna de ellas puede ser reemplazada por la actividad de otras variantes como Rif/Rho F y Rho D¹⁰⁹. Por ejemplo, en el año 2005 el grupo de Aleksandra Czuchra demostró que fibroblastos Cdc42 (-/-) mantenían sus propiedades adhesivas a pesar de exhibir una forma más ahusada y de menor área que fibroblastos *wild type*. Más aún, la depleción de Cdc42 en estas células tampoco impedía la formación de filopodios ni lamelipodios, incluso cuando Rac1 mostraba hasta un 50% de activación¹¹⁰.

Microtúbulos de tubulina

Los MT son los filamentos más rígidos de las células y por ende le proveen el mayor soporte

mecánico y están compuestos por heterodímeros de α/β tubulina. Si bien existe variedad en los isotipos de ambos monómeros, expresados diferencialmente según el tejido y el momento del desarrollo, las β -tubulinas están muy conservadas en las distintas especies, siendo el extremo carboxi-terminal la región variable que determina la interacción con diferentes proteínas que afectan la estabilidad y funcionalidad de los MT¹¹¹. Estas estructuras son claves durante el crecimiento celular, transporte vesicular y la mitosis, procesos que requieren un alto dinamismo, cambiando su disposición completamente en cada proceso. Un claro ejemplo es la reestructuración que sufren durante la mitosis. Durante la interfase, los centrosomas dan lugar a los MT formando una red tipo estrella o *hub-spoke*, disposición fundamental para el transporte vesicular. Durante la división celular, la red es completamente remodelada para formar los husos mitóticos cuyo eje se desmonta y al completarse la mitosis la red vuelve a re-estructurarse¹¹².

A diferencia de los FA, los MT tienen la capacidad de autoensamblarse sin la necesidad de proteínas nucleadoras, aunque el ensamblaje ocurre más rápidamente a partir de MT pre-existentes o fragmentados y su estabilidad es dependiente de la temperatura¹¹³. El armado y desarmado de los MT ocurre vía hidrólisis de una molécula de GTP sobre la sub-unidad β de un heterodímero α/β de tubulina y, si bien ocurre por ambos extremos del MT en formación, la polimerización ocurre preferentemente por uno de ellos. Los extremos de los MT también se identifican como “positivo” o “negativo” al igual que los FA. Sin embargo, mientras que en la actina esta nomenclatura responde al extremo por el cual el filamento polimeriza o despolimeriza, respectivamente, en los MT la polimerización y despolimerización puede darse por ambos extremos y los términos “positivo” y “negativo” responde a la velocidad con la cual ocurren estos procesos en cada extremo¹¹³ (Figura 14).

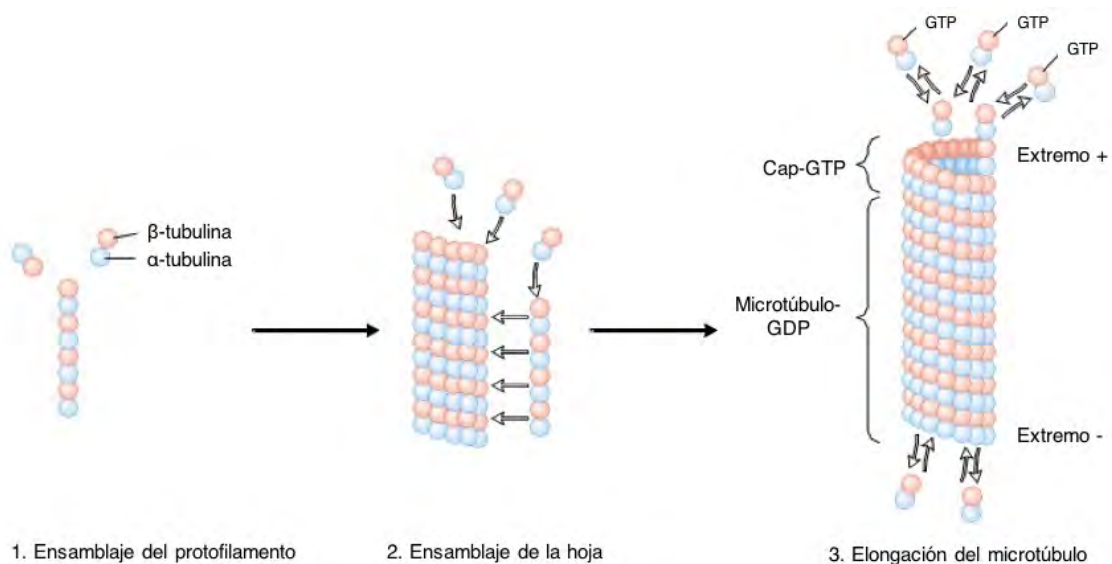


Figura 14. Esquema de la dinámica de los MT. En el primer paso, los dímeros de α/β tubulina se asocian para formar un protofilamento longitudinal corto que rápidamente se asocia de manera lateral hacia una forma de hoja, energéticamente más estable. Eventualmente, al unir 13 protofilamentos, la hoja se pliega alrededor de sí misma hasta formar un MT de un diámetro interno de 18 nm y diámetro externo de 25 nm, el cual posteriormente crece por la adhesión de subunidades en los extremos. Los dímeros libres de α/β están unidos a GTP a través del monómero β . Luego de la adición del heterodímero al MT, la molécula de GTP unida a β -tubulina se hidroliza a GDP. Si la velocidad de polimerización es mayor que la de hidrólisis de GTP, se forma un extremo protector (*cap*) unido a GTP, aunque la mayoría del MT estará unido a GDP. Adaptación¹¹³.

Aún así, bajo ciertas condiciones, es posible que la polimerización ocurra por un extremo mientras la despolimerización ocurre por el otro, como sucede con los FA. Este efecto se conoce como *treadmilling* y puede ser acompañado por otro proceso llamado *inestabilidad de microtúbulos* (Figura 15). En este caso, la velocidad de despolimerización supera la de polimerización en el extremo positivo y el GTP unido a β -tubulina es hidrolizado rápidamente a GDP antes de que otras sub-unidades puedan unirse a dicho extremo del MT. Este fenómeno es conocido como *catástrofe*. Aún así, la desintegración total del MT puede ser evitada por un proceso llamado *rescate*, si comienzan a unirse unidades de GTP- β -tubulina antes de que el GTP sea hidrolizado.

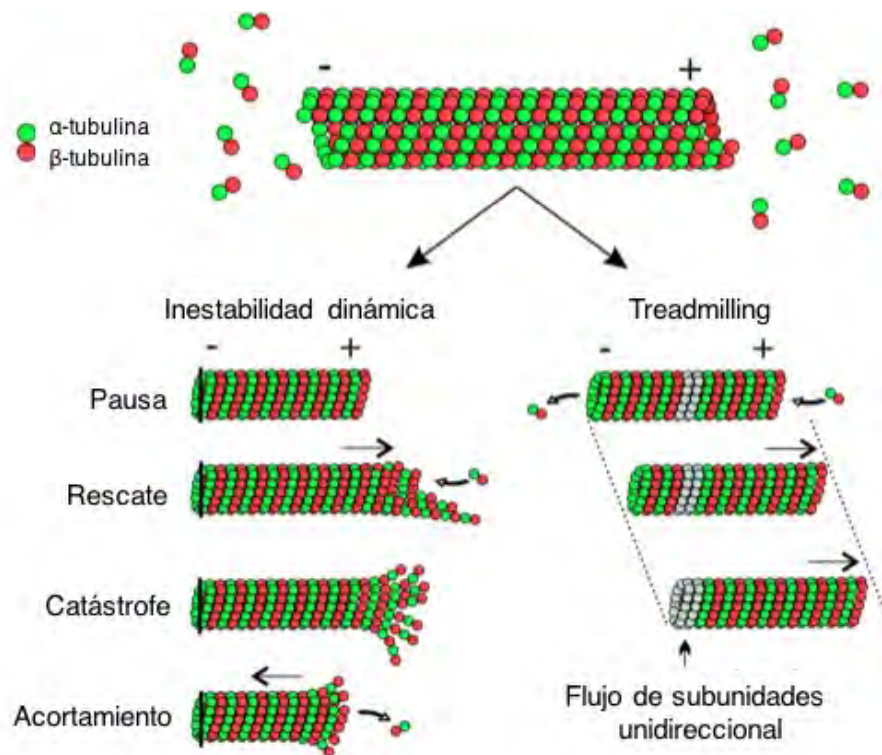


Figura 15. Procesos de inestabilidad dinámica y *treadmilling* de los MT. Adaptación¹¹⁴

Los MT también se asocian a algunas RhoGTPasas y pueden tanto regularlas como ser regulados por ellas. Se ha demostrado que los MT pueden interactuar con los GEFs y promover la activación de Rac1 mediante la polimerización de los MT, así como también liberar factores de activación de RhoA al despolimerizarse¹¹⁵.

De igual manera, los MT pueden reorganizarse en respuesta a los cambios celulares inducidos por RhoA. Según ha sido reportado, la estabilización de los MT en la periferia celular puede estar dada por la activación local de dicha GTPasa durante la migración celular¹¹⁶. Más aún, se ha demostrado que el ácido lisofosfatídico induce la formación de MT estables en fibroblastos en migración a través del la formina mDia, un efector directo de RhoA¹¹⁷.

También hay evidencia de que Rac1 y Cdc42 no solo regulan el citoesqueleto de actina sino que también influyen la dinámica de los MT, impidiendo el fenómeno de catástrofe vía fosforilación de statmin/Op18, blanco molecular de ambas RhoGTPasas^{118,119}

Filamentos intermedios

A diferencia de los FA y los MT que están compuestos por proteínas globulares altamente conservadas, los FI pueden estar formados por hasta 40 subunidades distintas que se dividen en 5 clases: queratinas, neurofilamentos, desmina, laminina y vimentina. La asociación directa con la MEC y la extensa red que forman por el citoplasma hasta rodear la membrana nuclear, le permite a los FI coordinar la actividad del citoesqueleto ^{120,121}.

Las queratinas son la clase más diversa de proteínas de FI, se expresan en células epiteliales y se asocian para formar heterodímeros que posteriormente forman filamentos de heteropolímeros. Existen queratinas tipo I y II que pueden combinarse de maneras distintas, aunque cada combinación es específica de cada epitelio en el que se expresa. Vimentina y desmina, junto con la proteína de acidificación fibrilar glial y la periferina son capaces de formar estructuras de FI tanto homo como heteropoliméricas. La vimentina, particularmente, permite conservar la estructura de las membranas celulares y conservar las organelas y al núcleo en un sitio definido de la célula. Más aún, la vimentina es responsable de la asociación entre FI y MT. Por otro lado, mientras que la desmina tiene un importante rol en la estabilización de los sarcómeros durante la contracción muscular, los neurofilamentos son las estructuras sobre las cuales se montan los axones neuronales durante el crecimiento radial de los mismos. Finalmente, las laminas se encuentran exclusivamente en el núcleo, formando una red fibrosa que sostiene la membrana nuclear¹²².

En todas las sub-unidades de los FI se pueden distinguir los mismos dominios: un centro de α hélice flanqueado por dos dominios globulares N- y C-terminal. La hélice del centro está conservada en todas las proteínas de los FI y consiste en cuatro α hélices separadas por tres regiones que no las forman. La posición de estos “elementos espaciadores” también está altamente conservado entre las proteínas de los FI. Los segmentos de α hélices se porean para formar dímeros tipo *coiled-coil* (Figura 16). Cada FI alcanza un diámetro de 10nm.

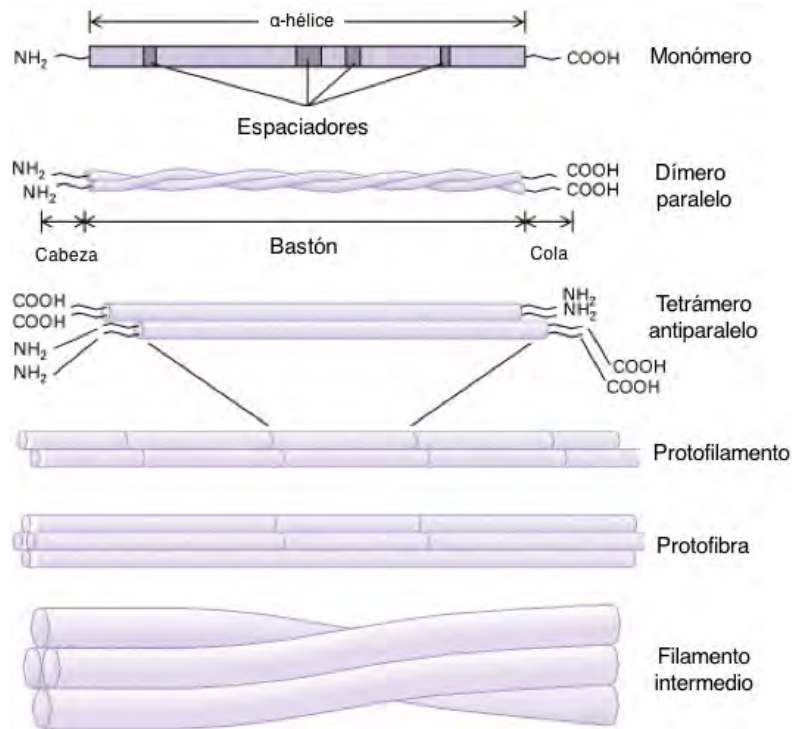


Figura 16. Estructura de los FI. Las proteínas de los FI forman homo y heterodímeros paralelos con un dominio coiled-coil altamente conservado y colas y cabezas de longitud y secuencia variable pero sin estructura de hélice. Luego se forma un tetrámero antiparalelo, formado por agregación de dos dímeros idénticos. Los tetrámeros, a su vez, se disponen cola con cola formando un protofilamento, los cuales se agregan de manera lateral para formar una profibra. La asociación lateral de 4 protofibras constituyen el filamento cilíndrico de 10 nm de espesor. Adaptación¹²².

IX. LA MIGRACIÓN CELULAR Y SU PARTICIPACIÓN EN LA METÁSTASIS

Como fuera mencionado anteriormente, los componentes del citoesqueleto intervienen en una amplia variedad de procesos celulares, entre ellos la adhesión y migración celular. Si bien la migración celular es clave para varios procesos fisiológicos durante el desarrollo desde la gastrulación hasta la formación de la cresta neural, también está involucrada en procesos patológicos como ocurre cuando los leucocitos migran hacia los ganglios linfáticos y tejido inflamado para generar una respuesta inmunológica^{123,124}. Así mismo, durante la progresión tumoral, la migración puede ocurrir de manera anormal, convirtiéndose en uno de los *hallmarks* de los cánceres metastásicos¹²⁵.

A pesar de ser una acción coordinada por todos los componentes del citoesqueleto, los FA son los más importantes para orquestrar el movimiento celular, acompañado por los cambios

en la morfología celular. La migración consiste en varios pasos organizados: en primer lugar la célula se polariza en respuesta a señales externas sensadas por la acumulación de quimioquinas y factores de crecimiento; luego, en el frente celular, los arreglos de actina permiten la prolongación de la membrana en forma de lamelipodios, seguidos por la formación de filopodios que se proyectan desde los primeros. Los lamelipodios se adhieren a la matriz y estabilizan el anclaje gracias a moléculas de adhesión. De esta forma, empujan el cuerpo celular en una dirección. Finalmente, para moverse hacia delante, la célula retracta su parte posterior gracias a la contracción generada por la actomiosina y la pérdida de las adhesiones en este extremo¹²³. Se han descrito distintos tipos de migración celular en cuanto a la velocidad de la migración, las interacciones célula-célula y la forma que adquieren las mismas durante el proceso. Las dos grandes clasificaciones referidas al patrón de invasión son: migración individual y migración colectiva. En la migración colectiva la principal característica es que las células interconectadas por cadherinas e integrinas, forman una línea de avance hacia el frente de migración donde se secretan proteasas que habilitan el desplazamiento del grupo. Estas células líderes tienen una forma mesenquimal caracterizada por una menor organización estructural, mientras que las células que las siguen están más estrechamente unidas y forman estructuras tubulares con forma de roseta. Las protrusiones celulares en las células líderes, la formación de adhesiones focales entre integrinas y los FA, las contracciones celulares dadas por la actomiosina y la degradación de la MEC por proteólisis generan el espacio físico para que la migración sea exitosa y el tumor invada nuevos tejidos. Este tipo de migración es muy frecuente en PCa, cáncer de mama y de endometrio¹²⁶.

La migración individual, en cambio, se caracteriza por la invasión de cada célula tumoral de manera independiente del resto. La migración mesenquimal es también llamada tipo fibroblástica, ya que se caracteriza por que las células adquieran una forma ahusada, elongada, sin ningún tipo de polaridad aparente, como ocurre en los fibroblastos normales.

Se ha postulado que la adquisición de un fenotipo mesenquimal se da como consecuencia de la EMT, cuando un tumor epitelial maligno comienza a des-diferenciarse y las células individuales se desprenden del tumor, ganando la capacidad de invadir otro tejido. Durante la EMT se pierden todas las uniones intercelulares y, como ya fue mencionado, se pierden E-cadherinas e integrinas, obligando al citoesqueleto a adaptar la forma celular, formando fibras de stress en la periferia¹²⁶ (Figura 17).

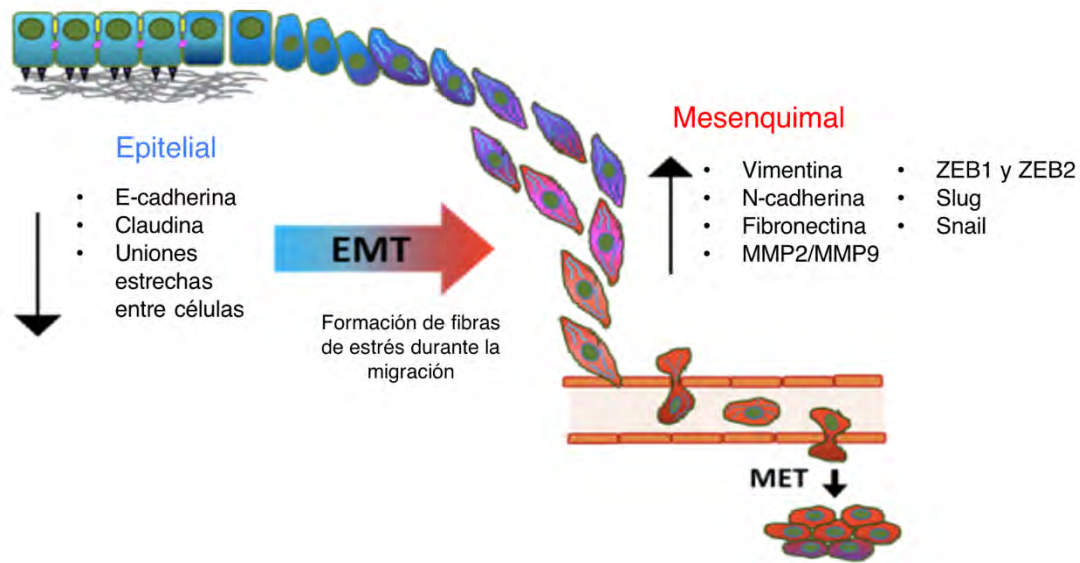


Figura 17. Esquema de los cambios moleculares y morfológicos asociados a EMT. Adaptado¹²⁷.

La degradación de la membrana basal del epitelio permite que las células tumorales que se escinden del tumor puedan penetrar la matriz estromal adyacente y migrar activamente. Los factores de transcripción ZEB1 y ZEB2 al igual que Snail y Slug, reprimen la expresión de las E-cadherinas y otros factores epiteliales, favoreciendo la expresión de marcadores mesenquimales típicos como MMPs y vimentina^{127,128}. Se demostró que tanto la Rho GTPasa Cdc42 como Rac1 participan de la migración fibroblástica. Incluso, la inhibición de Rac1 mediante la activación de RhoA y su efector molecular ROCK, son capaces de detener este tipo de migración en células malignas¹²⁶.

El otro tipo de migración celular individual es la migración ameboide, cuyo nombre hace referencia a la similitud con el desplazamiento típico de los organismos unicelulares. La particularidad más interesante de este tipo de migración es que es altamente eficiente, incluso al perderse la expresión de integrinas de membrana y de metaloproteasas que degraden la MEC.

La forma de una célula ameboide es redondeada o elíptica y sufre ciclos rápidos de expansión y contracción, generando protrusiones tipo burbujas o *blebs* que le permiten sentir el microambiente y encontrar la mejor manera de filtrarse entre los espacios libres de la MEC.

Estos cambios son controlados por la GTPasa RhoA y la quinasa ROCK¹²⁹⁻¹³¹.

La figura 18 resume los tipos de migración y la forma que adquieren las células en cada una de ellas. Como se puede ver en dicha figura, es posible que las células tumorales pasen de un tipo de migración a otro de acuerdo a la necesidad de la célula de adaptarse frente al nuevo microambiente tumoral que está colonizando.

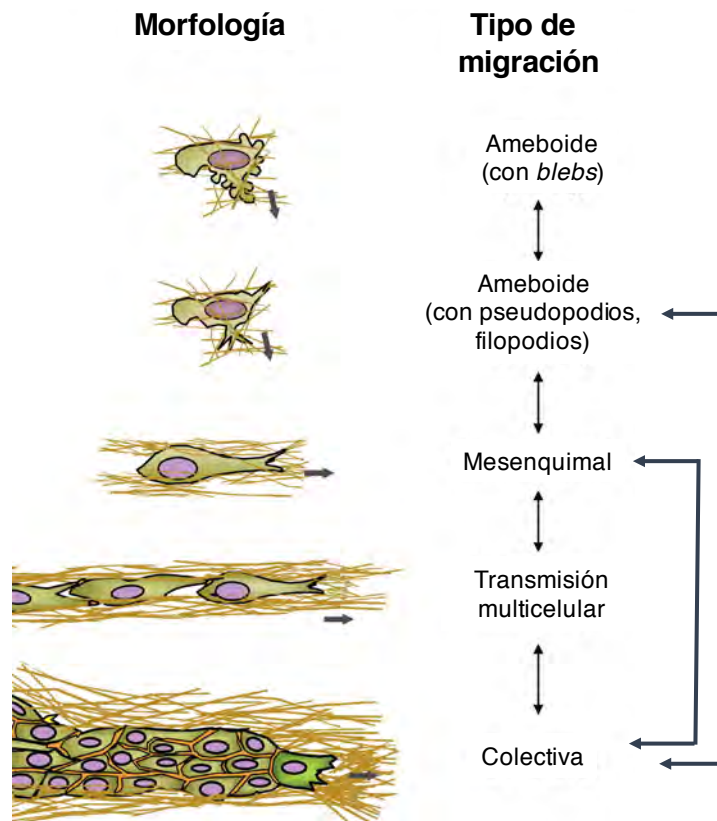


Figura 18. Morfología celular y transiciones entre tipos de migraciones celulares. Cada tipo de migración se caracteriza por una morfología celular típica (redondeada o ahusada) y un patrón (individual, escasamente conectadas o colectiva) y es gobernada por un conjunto de mecanismos moleculares distintos, que puede modificarse según el ambiente. Los cambios más comúnmente estudiados son la transición colectiva-individual. Adaptación¹³².

Así, muchos tumores son capaces de progresar incluso en presencia de inhibidores de las proteínas de adhesión y migración, adquiriendo una forma ameboide que les permite deformarse y moverse entre las fibras de colágeno de la MEC, aún cuando no pueden degradarla¹³⁰. Estos eventos, junto con la falta de especificidad de los inhibidores de MMPs desarrollados hasta el momento, y los efectos adversos asociados a las dosis utilizadas, son algunos de los motivos por los cuales las terapias anti-MMPs no han sido exitosas en la clínica hasta el momento¹³³.

En todos los casos, independientemente del tipo de migración que ocurra, una vez que las células tumorales han escapado del tumor primario pueden sintetizar proteínas que degraden la MEC, generalmente acumuladas en podosomas e invadopodios, y colonizar un órgano diferente al de origen. uPA, su receptor (uPAR) y el inhibidor del activador del plasminógeno (SERPINE1) son clave durante la migración e invasión celular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas¹³⁴. La unión entre uPA y uPAR convierte al zimógeno inactivo (plasminógeno) a su forma activa con actividad de serina proteasa, plasmina, la cual degrada directa o indirectamente la MEC. La plasmina puede también activar elastasas y MMPs, habilitando la degradación de lamininas, colágeno, fibronectina de la MEC y por lo tanto favoreciendo los procesos de invasión y metástasis¹³⁵. Desde su identificación como tales, hacia fines de 1980, y en la actualidad, uPA y SERPINE1 han sido identificados como marcadores pronóstico relevantes en cáncer¹³⁵. uPA ha sido extensamente descrita como una quinasa pro-tumoral, dado que inhibe la apoptosis^{136,137}, induce cascadas de señalización, como por ejemplo la vía de STAT3, la vía del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR)¹³⁸ y la vía de RAS que favorece la proliferación, migración e invasión celular¹³⁹. En contraposición, los inhibidores de uPA, como SERPINE1, son responsables de cooptar la señalización extracelular y migración celular favoreciendo las vías pro-apoptóticas¹⁴⁰. En PCa, el eje uPA/uPAR ha sido fuertemente asociado a metástasis: elevados niveles de uPA/uPAR se correlacionan directamente con un aumento en los niveles de PSA en suero e inversamente con la supervivencia de los pacientes con PCa¹⁴¹. Más aún, en el año 2007, el grupo de Shariat y colaboradores demostraron que los niveles de uPA/uPAR son restituidos a niveles comparables con aquellos niveles séricos en individuos sanos luego de practicarse prostatectomías radicales en pacientes con PCa¹⁴². De igual manera, se ha reportado un aumento significativo de los niveles de expresión tanto de uPA como su receptor en muestras de pacientes con Gleason mayor a 7 respecto de aquellos con un grado de Gleason intermedio o incluso BPH^{52,142}. En otras palabras, la caracterización de los niveles de expresión de esta quinasa resultan un buen indicador de las capacidades invasivas y migratorias de las células tumorales prostáticas.

Si bien se asume que la migración individual es más propensa a generar metástasis respecto de la migración colectiva, varios trabajos demostraron que las metástasis en modelos animales se dan más frecuentemente por *clusters* de células y que las células circulantes tumorales no migran individualmente sino que lo hacen en grupo, entrando a circulación por

vasos sanguíneos dañados o mediante interacción con células en estado de EMT¹²⁶. El estado de migración aumenta la resistencia a quimio y radioterapia ya que las células no se dividen temporalmente y aumentan la actividad de factores anti-apoptóticos. De igual manera, células en estado de EMT también pueden mostrar cierta quimioresistencia al expresar bombas tipo ABC encargadas de eliminar las drogas fuera de las células¹²⁶.

En resumen, tanto las interacciones célula-célula como entre las células y la MEC resultan determinantes para establecer las características migratorias y las capacidades invasivas de las células tumorales, procesos estrechamente regulados por los componentes del citoesqueleto y las moléculas asociadas al mismo.

Objetivos e Hipótesis

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes descriptos, y considerando que al día de hoy aún es controvertido el rol de HO-1 en la regulación de las propiedades de las células tumorales, la hipótesis de este trabajo es que **la modulación de HO-1 afecta la remodelación del citoesqueleto celular, alterando la adhesión celular, generando un perfil menos migratorio e invasivo en PCa.**

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto consistió en identificar los interactores moleculares de HO-1 responsables de la remodelación del citoesqueleto y la arquitectura celular en PCa hacia un fenotipo menos agresivo.

En particular, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- a. Construir la red de proteínas asociadas a HO-1 responsables de la remodelación del citoesqueleto en líneas de PCa, a través de un enfoque proteómico.
- b. Utilizar herramientas bioinformáticas para validar la red proteica responsable de la remodelación del citoesqueleto en PCa.
- c. Estudiar la motilidad, la morfología celular y las uniones célula-célula bajo modulación de HO-1 en diferentes líneas tumorales prostáticas.
- d. Determinar el rol de la inducción de HO-1 sobre el citoesqueleto y la arquitectura celular en la interacción célula prostática - célula progenitora del hueso.
- e. Estudiar el impacto de la modulación de HO-1 sobre la expresión génica en líneas tumorales de PCa.

Materiales y Métodos

1. Cultivo celular

Las células PC3 y C4-2B se obtuvieron en *American Type Culture Collection* (EE.UU.) y cultivadas con medio de cultivo RPMI 1640 (*Invitrogen, EE.UU.*) suplementado con 10% v/v suero fetal bovino (SFB, *Internegocios, Argentina*), penicilina y estreptomina 0,1% v/v y anfoterisina 0,02% v/v.

Las células MC3T3 y RAW 264.7 fueron cedidas gentilmente por la Dra. Nora Navone (MD Anderson Cancer Center, EE.UU.) y cultivadas con Alpha-MEM (*Modified Eagle Medium, Invitrogen, EE.UU.*) y DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen EE.UU.*), respectivamente, suplementado con 2% v/v SFB, 0,1% v/v penicilina y estreptomina y 0,02% v/v anfoterisina.

Todas líneas celulares se cultivaron a 37° C bajo una concentración de CO₂ del 5%. El mantenimiento celular se realizó repicando las células al alcanzar un 80% de confluencia. Para obtener los sub-cultivos provenientes de cada repique, se descartó el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS 1X estéril para remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero, y luego se agregó tripsina 1X en cantidad necesaria. Luego, se incubaron las células en una estufa a 37° C hasta lograr la disociación de las células, momento en el cual se agregó el medio fresco, previamente templado, en el volumen adecuado para realizar los sub-cultivos deseados. En el caso de la línea celular RAW 264.7, luego de incubar con tripsina a 37° C, las células fueron disociadas con un *scraper* dada su alta adherencia a la superficie de crecimiento.

2. Transfecciones

2.1 Transfección con p3xFLAGHO-1 y pcDNA3HO-1

Las células PC3 fueron transfectadas de manera transitoria durante 48 h con los plásmidos de sobre-expresión de HO-1 (p3xFLAGHO-1 o pcDNA3HO-1) o bien los vectores vacíos como control (p3xFLAG o pcDNA3). Cada placa de 10 cm de diámetro fue transfectada utilizando 10 µg de plásmido y 20 µl de polietilenglicol (PEI) en un volumen final de 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640. Las transfecciones se realizaron sobre placas con 3 ml de RPMI sin SFB ni antibióticos. Luego de 5 h de transfección, se reemplazó el medio de cultivo por RPMI completo con 10% v/v SFB y antibióticos en las concentraciones previamente mencionadas. Para los ensayos de proteómica se transfectaron 40 placas de 10 cm de diámetro de cada

condición experimental (FLAGHO-1 vs FLAG), mientras que para el ensayo de transcriptómica (RNAseq) se transfectaron 2 placas por condición (pcDNA3 vs. pcDNA3HO-1).

2.2 Transfección con siHO-1

Las células PC3 y C4-2B fueron transfectadas con un ARN de interferencia (siRNA) para disminuir la expresión de HO-1 (siHO-1) o bien con un siRNA de secuencia inespecífica (siRNA *scrambled*) como control negativo (*ON-TARGETplus siRNA, Dharmacon*). El siHO-1 es una mezcla de 4 siRNA específicos para 4 sitios distintos en la secuencia de HO-1.

Para las inmunofluorescencias, $1,3 \times 10^5$ células PC3 o C42B fueron cultivadas en placas de 12 pocillos sobre vidrios de 12 mm de diámetro, esterilizados, hasta alcanzar una confluencia del 60%. Luego se reemplazó el medio de cultivo de cada pocillo por 800 μ l de medio RPMI fresco (10% v/v SFB, sin antibióticos), y se transfectó con el siRNA correspondiente en una concentración 5 μ M, preparado en medio RPMI sin suero ni antibióticos en un volumen final de 100 μ l. 24 h más tarde, el medio de cultivo fue reemplazado por RPMI complementado con 10% v/v SFB y antibióticos, conteniendo o no hemina 80 μ M.

Para corroborar la disminución de la expresión de HO-1, 3×10^5 células PC3 o C42B fueron cultivadas en placas tipo p60 hasta alcanzar una confluencia del 60%. Luego se reemplazó el medio de cultivo de cada placa por 1,6 ml de medio RPMI fresco (10% v/v SFB, sin antibióticos), y se transfectó con el siRNA correspondiente en una concentración 5 μ M, preparado en medio RPMI sin suero ni antibióticos en un volumen final de 200 μ l. 24 h más tarde, el medio de cultivo fue reemplazado por RPMI complementado con 10% v/v SFB y antibióticos, conteniendo o no hemina 80 μ M.

3. Co-cultivos

Se sembraron 1×10^5 células PC3 en insertos estériles para cultivo celular con un tamaño de poro de 0,4 mm (*Falcon Becton Dickinson Labware, EE.UU.*). En el día 1, las células PC3 fueron tratadas o no con hemina 50 μ M durante 24 h. Los controles recibieron medio RPMI 10% v/v SFB fresco. En paralelo, se cultivaron 1×10^5 células MC3T3 o RAW 264.7 en placas de 6 pocillos. El día 2, tras 24 h del tratamiento con hemina, las líneas celulares fueron co-cultivadas o no durante 24 h. En todos los casos, los medios de cultivo fueron complementados con 2% v/v SFB. El día 3, se recolectaron los medios condicionados de cada condición, se centrifugaron a 1000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min para precipitar

las células que pudiesen estar en el medio de cultivo y se procedió a cultivar células PC3 durante 24 h más (figura 19) como se indica en la sección *Inmunofluorescencia*.

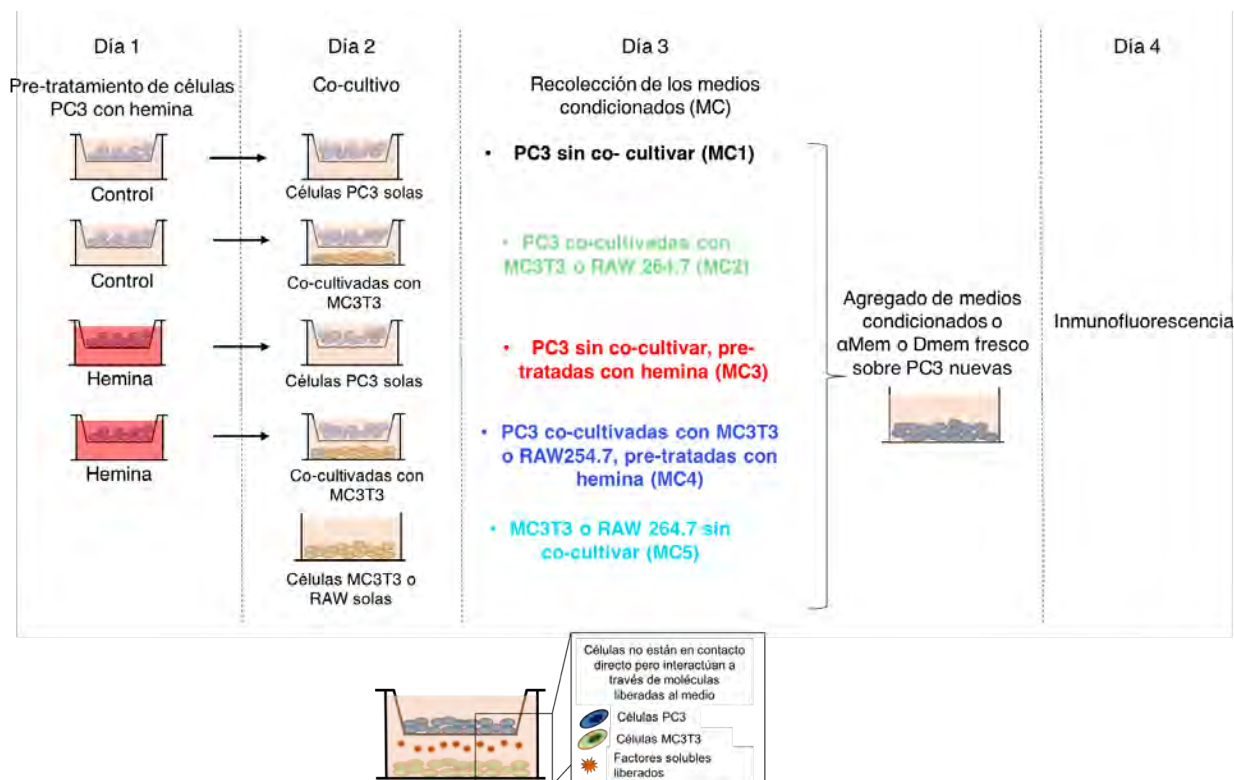


Figura 19. Esquema secuencial del co-cultivo con ambas líneas celulares. Brevemente, las células PC3 y las células precursoras de hueso fueron sembradas y crecidas por separado. Parte de las células PC3 fueron tratadas durante 24 h con hemina 50uM mientras que otra parte no recibió tratamiento. Posteriormente, la mitad de las células PC3 tratadas fueron puestas en co-cultivo con las líneas de hueso (MC4), mientras que la otra parte de las células tratadas se mantuvo sin co-cultivar (MC3). De las células PC3 que no recibieron pre-tratamiento con hemina, la mitad fue puesta en co-cultivo (MC2) mientras que la mitad restante se mantuvo sin co-cultivar (MC1). También se analizaron las prolongaciones de células PC3 que recibieron medio condicionados de células precursoras de hueso sin co-cultivar (MC5).

4. Tratamientos con hemina

La hemina fue obtenida en *Sigma-Aldrich* (EE.UU.). 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 1X 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. En los tratamientos

sobre PC3 y C4-2B se utilizó una concentración final de hemina 80 μM , mientras que para los co-cultivos se utilizó hemina 50 μM . En todos los casos el tratamiento tuvo una duración de 24 h.

5. Tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Las células PC3 fueron expuestas a H_2O_2 200 μM durante 30 min, preparada en PBS 1X estéril.

6. Anticuerpos y sondas

El anticuerpo monoclonal anti-HO-1 humano hecho en ratón fue obtenido en *Abcam* (EE.UU.). El anticuerpo anti β -actina humano hecho en ratón fue obtenido en *Cell Signaling* (EE.UU.), al igual que los anticuerpos anti E-cadherina humana y β -catenina humana, ambos hechos en conejo. El anticuerpo monoclonal anti-MMP9 hecho en ratón fue obtenido en *Santa Cruz* (EE.UU.). La sonda Rodamina-Faloidina fue obtenida en *Invitrogen* y la sonda de membrana C-laurdan fue gentilmente cedida por la Dra. Valeria Levi.

El anticuerpo secundario contra ratón, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) fue obtenido en *Cell Signaling*. El anticuerpo secundario asociado a fluoróforo Alexa 488, Alexa 555 y Alexa 647 fueron obtenidos en *Molecular Probes*, *Invitrogen* (EE.UU.). El anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina hecho en ratón fue obtenido en *Sigma Aldrich* (EE.UU.).

7. Clonado de p3xFLAG-CMV-10-HO-1

El vector p3xFLAG-CMV-10-HO-1 (de ahora en más p3xFLAGHO-1) se generó clonando la secuencia de ADN copia (cDNA) codificante para HO-1 humana (*HMOX1*) entre los sitios de restricción EcoRI y BamHI del vector de expresión en mamíferos p3xFLAG-CMV-14 (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)(Figura 20).

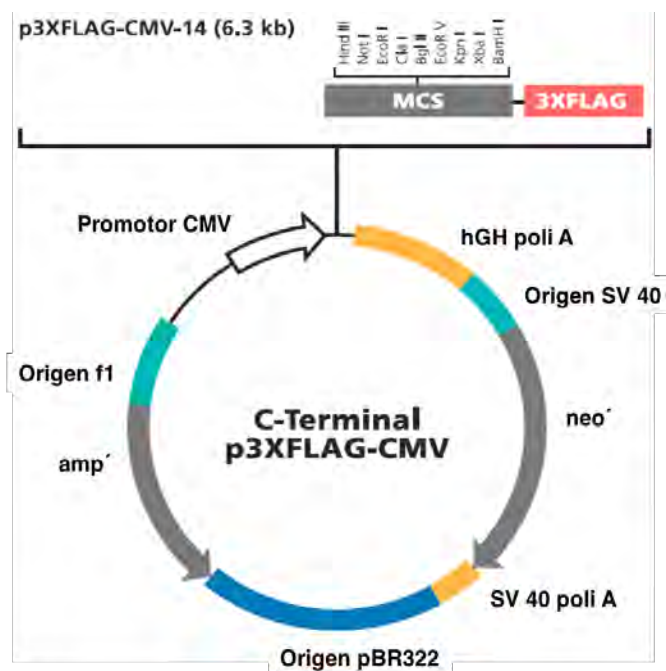


Figura 20. Esquema del plásmido p3XFLAG-CMV-14 donde se observa una secuencia promotora de citomegalovirus (CMV) para expresión constitutiva del gen clonado en el sitio de clonación múltiple (MCS), en este caso *Hmox1*. En el extremo C-terminal de *Hmox1* se expresan tres repeticiones del péptido FLAG. El plásmido también cuenta con secuencias que confieren resistencia a ampicilina y neomicina, las cuales facilitan su amplificación en cultivos bacterianos y la expresión estable en líneas eucariotas, respectivamente. Adaptación Sigma Aldrich

Esta estrategia resulta en la fusión del péptido FLAG en el extremo C-terminal de *HMOX1*. El gen de HO-1 fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de un vector de ADN (pcDNA3HO-1). La secuencia de *primers* utilizada fue la siguiente:

sentido – 5'-GCAGAATTCCACCATGGAGCGTCCGCAACCC-3';

antisentido – 5'-GCCGGATCCGCATTACATGGCATAAAGC-3'.

El *primer* sentido se diseñó con un codón ATG (rojo) para garantizar la expresión de HO-1 con la secuencia 3xFLAG en el extremo C terminal. Se incluyó un sitio de restricción para la enzima EcoRI (verde) coincidente con el tercer sitio de restricción en el sitio múltiple de clonación en el vector elegido (MCS). Además, se incluyó una secuencia Kozak (subrayada) entre el sitio de restricción y la secuencia de HO-1 para permitir el reconocimiento ribosomal durante la traducción del ARNm de HO-1. El *primer* antisentido se diseñó sin codón de terminación ya que la secuencia 3xFLAG estaba presente en el extremo C terminal con su propia secuencia de terminación. Se incluyó un sitio de restricción para la enzima BamHI (azul), coincidente con el último sitio de restricción en el MCS en el vector elegido. Además, se incluyó el codón GCA para separar el tag de FLAG de la secuencia de *HMOX1* (subrayado).

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Mastercycler* de gradiente Eppendorf en un volumen final de 50 μ l conteniendo *buffer* de reacción 1X (*Invitrogen*, EE.UU.), 2,5 mM MgCl₂, 0,15 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 2,5U de Pfu recombinante (*Fermentas*, EE.UU.) y 1 μ M de oligonucleótidos (*Invitrogen*). Las muestras se amplificaron usando 40 ciclos de: 45 seg a 94° C, 45 seg a 65° C y 1 min a 72° C. Se incluyó un paso inicial de 5 min a 94° C y un paso final de 10 min a 72° C. Luego, cada fragmento amplificado fue purificado con un kit comercial (GFX™ PCR DNA and gel band purification kit, *Amersham biosciences*, Reino Unido).

Para la ligación de los fragmentos, el plásmido p3xFLAG-CMV-14 fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI/BamHI, defosforilado y purificado. La reacción se llevó a cabo con 6 μ l de cada plásmido y 1 μ l del correspondiente inserto, 2 μ l de *buffer* y 1 μ l de T4 ligasa en un volumen final de 20 μ l. Como control se utilizó 1 μ l de plásmido p3xFLAG-CMV-14 sin inserto. La reacción de ligación se llevó a cabo ON a 16° C.

Posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* competentes de la cepa DH5 α para amplificar el plásmido ligado. Para tal fin, se utilizaron 100 μ l de células competentes incubados en hielo durante 30 min, con 5 μ l del producto de ligación y el plásmido vacío. Luego, se incubaron durante 2 min a 42° C y 5 min. más en hielo. Se agregaron 450 μ l de medio de cultivo LB sin antibiótico y se incubó durante 1 h a 37° C, para luego plaquear en medio LB sólido con ampicilina 50 μ g/ml, utilizando un rastrillo. La placa fue incubada ON a 37° C.

La correcta transformación de las colonias fue verificada por PCR en tiempo final contra el gen de *HMOX1* clonado, y las colonias que resultaron positivas para la transformación con el plásmido fueron amplificadas en un cultivo con medio LB con ampicilina (*Maxiprep*, próxima sección). Se realizó una restricción con EcoRI y BamHI para corroborar la escisión del fragmento de HO-1 del plásmido mediante una corrida electroforética en gel de agarosa 1% m/v, visualizándose un fragmento de 900 pb correspondiente *HMOX1* y otro fragmento de 5400 pb correspondiente al plásmido FLAG. El plásmido clonado fue secuenciado por *Macrogen* y la expresión de HO-1 fue verificada por PCR cuantitativa en tiempo real (RTqPCR) y *Western blot*.

8. Amplificación y purificación del plásmido (Maxiprep)

Las colonias que crecieron luego de la transformación en un medio selectivo con ampicilina se utilizaron para realizar un cultivo en 2 ml de LB ampicilina (50 µg/ml) 4 h a 37° C en agitación permanente, tanto para las bacterias transformadas con el plásmido ligado como también para las bacterias con el plásmido vacío (FLAGHO-1 y FLAG respectivamente). Posteriormente, los 2 ml fueron transferidos a un maxi cultivo de LB ampicilina (50 µg/µl) de volumen final 100 ml, el cual fue cultivado ON a 37° C en agitación permanente. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4° C en una centrífuga Sorvall, en los recipientes adecuados para dicha centrífuga. El sobrenadante fue descartado y resuspendido en *buffer* P1 (50 mM Tris Base, 2% v/v ácido etilendiaminotetra acético (EDTA) 0,5 M, pH 8) con 25 µl de RNAsa A 50 µg/µl. Se agregaron 10 ml de *buffer* P2 (200 mM NaOH, 5% v/v SDS 20%) y se mezcló por inversión 4 a 6 veces, incubando los tubos a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se agregaron 10 ml de *buffer* P3 (acetato de potasio 3 M, pH 5,5) y se mezcló por inversión 4 a 6 veces más, incubando nuevamente a temperatura ambiente durante 5 min. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 30 min a 4° C. El sobrenadante fue trasvasado y centrifugado nuevamente a 13.000 rpm durante 15 min a 4° C. El nuevo sobrenadante fue conservado y se agregaron 0,7 volúmenes de isopropanol a fin de precipitar el ADN de las muestras, las cuales fueron mezcladas nuevamente por inversión. Una vez más, las muestras fueron centrifugadas a 11.000 rpm por 30 min a 4° C, descartando el sobrenadante resultante. El precipitado o *pellet* obtenido fue lavado con 5 ml de etanol 70% y centrifugado a 11.000 rpm por 10 min, descartando el sobrenadante. El *pellet* obtenido fue secado durante 10 min para eliminar el ARN que pudiese haber quedado en las muestras y resuspendido en 500 µl de agua de ampolla.

9. Inmunoprecipitación de FLAG.

Luego de 48 h de realizada la transfección con p3xFLAGHO-1 o el vector vacío p3xFLAG, se extrajeron proteínas totales utilizando un *buffer* de baja concentración de NaCl (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% NP40, pH 7,5) para evitar la disrupción de las interacciones entre proteínas. Los extractos proteicos fueron incubados con las perlas magnéticas anti-FLAG M2 (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) durante 2 h a 4° C. Luego de remover las proteínas que no interactuaron con la construcción FLAG, las cuales se encuentran en el sobrenadante, los

complejos formados se incubaron con el péptido 3XFLAG (100 µg/µl) durante 2 h a 4° C. El péptido 3XFLAG compete con los complejos de proteínas unidos a las perlas magnéticas y, como resultado, las proteínas que interactúan con la construcción FLAGHO-1 quedan retenidas en el sobrenadante.

10. Espectrometría de masa

Los complejos proteicos asociados a la proteína recombinante FLAGHO-1 fueron reducidos con 20 mM DTT, alquilados con 20 mM iodoacetamida y digeridos en solución con tripsina ON. Los péptidos fueron desalados y concentrados utilizando una resina C18 (Zip-Tips, *Waters Technologies Corporation*, EE.UU.) previo al análisis por LC-ESI MS/MS realizado en el Centro de Metabolómica y Espectrometría de Masa (*The Scripps Research Institute*, La Jolla, CA, EE.UU.).

Los péptidos fueron separados por cromatografía de fase reversa y luego sometidos a espectrometría de masa de la siguiente manera: las columnas con fase estacionaria Zorbax SB-C18 de partículas de 5 µm y de 15 cm de largo y 75 µm de diámetro interno fueron sintetizadas en el centro *Scripps*.

El gradiente de separación en fase reversa fue realizado con agua y acetonitrilo (0,1% v/v ácido fórmico) como fases móviles. El gradiente se realizó con 5% v/v acetonitrilo durante 10 min. seguido un gradiente de 8% v/v acetonitrilo por 5 min, 35% v/v acetonitrilo por 113 min, 55% v/v acetonitrilo por 12 min, 95% v/v acetonitrilo por 15 min y re equilibrado con 5% v/v acetonitrilo por 15 min.

Los datos de MS/MS fueron obtenidos con un espectrofotómetro de masa de trampa de iones lineal LTQ (por sus siglas en inglés *Linear Trap Quadrupole*) con una fuente de nanoelectrospray de 2kV en la punta. Cada espectro de MS fue seguido de 4 escaneos de MS/MS de los iones más abundantes luego de la aplicación de una lista de exclusión dinámica. Los espectros en tándem fueron extraídos con el uso del *software* Xcalibur (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE.UU.).

Las muestras obtenidas por MS/MS fueron analizadas utilizando Mascot (versión 2.1.04; Matrix Science) contra proteínas de *H. Sapiens* presentes en la base de datos proteica del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), simulando la digestión con tripsina. La

búsqueda Mascot se realizó con una tolerancia de masa de fragmento de 0,8 Da y una tolerancia de ion parental de 0,2 Da. La identificación de péptidos se realizó con un nivel de confianza de 95% con una probabilidad de falsos positivos (*false discovery rate* o FDR calculado con una base de datos decoy concatenada) menor al 1%. Para descartar las interacciones no específicas, se compararon las proteínas purificadas con FLAGHO-1 con las proteínas inmunoprecipitadas con el vector vacío FLAG. Para el posterior análisis se consideraron únicamente las proteínas unidas diferencialmente asociadas a FLAGHO-1.

11. Análisis bioinformático.

En todos los casos las redes de interacción se realizaron utilizando la plataforma *GeneMANIA* y el programa *Cytoscape* versión 3.2.1.

11.1 Ontología génica

El análisis de ontología génica se realizó comparando las proteínas obtenidas contra las proteínas humanas contenidas en la base de datos *DAVID (Database for annotation, Visualization and Integrated Discovery)* versión 6.7 (Leidos Biomedical Research, Inc., EE.UU.).

11.2 Meta análisis utilizando múltiples bases de datos de pacientes con PCa.

a. *Oncomine*

Se utilizó la plataforma *Oncomine* (<http://www.oncomine.org>), que contiene 715 sets de datos de *microarrays* de pacientes con PCa y 68 tipos de tumor, para identificar los *microarrays* de expresión que compararan la expresión en adenocarcinoma prostático vs. glándula prostática.

Criterios de selección:

- i) Provenir de tumores humanos.
- ii) Comparar adenocarcinoma prostático vs. glándula prostática normal.
- iii) Diferencias en los niveles de expresión entre ambas muestras con un $P < 0,05$.
- iv) Aumento o disminución en la expresión génica mayor o igual a 1,5 veces (*fold change*) y/o
- v) Que el gen estudiado estuviese entre el 10% de los genes con mayor cambio de expresión entre los trabajos considerados (*gene rank*).

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

Análisis:

La búsqueda y selección de cada estudio fue realizada para cada gen individualmente utilizando el símbolo del gen como el término de búsqueda, obteniéndose múltiples estudios para cada gen. Para cada gen analizado se asignó un valor "*gene rank*" que corresponde al ranking que ocupa dicho gen en el array analizado de acuerdo a su expresión, y un "*median rank*" correspondiente a la mediana del "*gen rank*" del gen estudiado entre todos los arrays estudiados. Los resultados obtenidos en OncoPrint fueron validados con la literatura citada en cada resultado.

b. cBioportal

Criterios de selección:

Para analizar las alteraciones génicas más frecuentes en los genes asociados al citoesqueleto, se utilizó la plataforma *cBioportal for Cancer Genomics Platform* (<http://cbioportal.org>), una plataforma pública creada por Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. De los 12 trabajos disponibles para PCa al momento de realizar el análisis, se seleccionaron los 8 trabajos de acuerdo al siguiente criterio:

- i) Estudios en pacientes con PCa.
- ii) Estudios publicados.
- iii) Estudios con un número de muestras mayor a 60.

Análisis:

Las alteraciones génicas estudiadas fueron: alteración en el número de copias, mutaciones, deleciones, amplificaciones o alteraciones múltiples.

c. GEO: Gene Expression Omnibus

Criterios de selección:

Para estudiar el impacto de la expresión de los genes del citoesqueleto en la supervivencia de pacientes, se seleccionaron dos *set* de datos de acuerdo al siguiente criterio:

- i) Estudios con información de expresión génica en muestras de PCa primario

- ii) Estudios con información de sobrevida (total o libre de recaída) para los pacientes de los cuales provienen las muestras
- iii) Estudios con un número mayor a 60 muestras y con un seguimiento mayor a 5 años
- iv) Estudios publicados y disponibles en el repositorio de datos GEO (Gen Expression Omnibus)

Análisis:

a. Se utilizó el dataset del Proyecto Adenocarcinoma Prostático de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA-PRAD) (disponible en <http://cancergenome.nih.gov/>) que cuenta con información sobre la expresión génica de 500 muestras de PCa y tejido normal adyacente, medido por secuenciación masiva (IlluminaHiSeq). Para las comparaciones entre tumor y tejido normal adyacente, se utilizó la herramienta bioinformática GEPIA¹⁴³ y se evaluaron las veces de cambio (expresadas como *log 2 fold change*) de la expresión en la muestra tumoral vs. el tejido normal adyacente. Para obtener los valores P ajustados, se utilizó el método de *false Discovery rate* de Benjamini y Hochberg¹⁴⁴.

b. *Swedish Watchful Waiting Cohort* (GSE16560)¹⁴⁵ que cuenta con información de 281 pacientes con PCa libres de tratamiento y seguimiento clínico a 30 años, incluido el tiempo de sobrevida total de los pacientes. Se midió la expresión de 6100 genes a partir de muestras obtenidas por resección transuretral prostática. El set de datos cuenta con la información clínica para cada paciente y su panel de expresión génica medida por *microarray* en la plataforma *Illumina GPL5474 Human 6k*.

c. *Ross-Adams 2015 VALIDATION COHORT* (GSE70769)¹⁴⁶ que cuenta con información de 94 pacientes con PCa sometidos a prostatectomía radical y seguimiento clínico a 6 años, incluida información de recaída (recurrencia bioquímica). Se midió la expresión de 31.000 transcritos mediante 47.000 sondas utilizando la plataforma *Illumina HumanHT-12 V4.0* en las muestras tumorales.

Utilizando estos conjuntos de datos, los pacientes se estratificaron en dos grupos según su la alta o baja expresión del gen de interés con la herramienta *cutoff finder*¹⁴⁷, que utiliza el método del valor P mínimo para encontrar el punto de corte óptimo en una variable continua. Se utilizó el dataset de Sboner para comparar la sobrevida total entre pacientes con alta o

baja expresión para cada gen, y el *set* de datos de Ross Adams para comparar el tiempo de recaída luego de la prostatectomía. Utilizando el *software* STATA de estadística y análisis de datos, se generaron las curvas de Kaplan-Meier (sobrevivencia). Para determinar la diferencia estadística entre las curvas generadas, se utilizó la prueba de *log Rank* y modelo de riesgo proporcional de Cox (*Hazard Ratio*).

12. Migración celular

Las células PC3 fueron cultivadas hasta alcanzar una confluencia de monocapa en placas de 35 mm de diámetro. Las células fueron expuestas a hemina 80 μ M o bien RPMI con SFB 10% v/v con antibióticos como control. Luego se realizó una herida a lo largo de toda la placa utilizando un *tip* de micropipeta de 200 μ l y se registró la migración celular cada 20 min durante 48 h, utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer (*Zeiss*, Alemania) equipado con una cámara de incubación a 37 °C (*Ibidi Heating System*, EE.UU.) y una cámara fotográfica AxioCam HRm (*Zeiss*, Alemania). Las películas obtenidas se analizaron con el *plug-in* disponible para Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>) para registrar el desplazamiento celular. Las trayectorias fueron analizadas y se obtuvo el desplazamiento cuadrado medio (MSD), de acuerdo a la ecuación 1, donde x e y son las coordenadas de la célula, t es el tiempo y los corchetes representan el promedio de las trayectorias.

$$\text{MSD}(t) = [(x(t) - x(0))^2 + (y(t) - y(0))^2] \quad (1)$$

13. Inmunofluorescencias

Se cultivaron $1,3 \times 10^5$ células PC3 y C42B sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro cubiertos con *FNC Coating Mix* (EE.UU.) para simular una matriz celular. El *FNC Coating Mix* fue colocado sobre los vidrios, previo al plaqueo de células, durante 10 min. Posteriormente fueron lavados dos veces con PBS 1x estéril y colocados en placas de 12 pocillos. Luego, se procedió a los respectivos tratamientos y transfecciones. Las células fueron lavadas suavemente con PBS y luego fijadas con una solución 4% m/v de paraformaldehído (PFA), 4% m/v de sacarosa y 0,1% v/v glutaraldehído durante 20 min. a temperatura ambiente. Luego de remover la solución fijadora y realizar 3 lavados con PBS, las células se incubaron en una solución permeabilizadora de PBS-tritón 0,05% v/v durante 20 min. Este paso fue obviado en el análisis de distancia al primer vecino, donde las células fueron marcadas con una sonda de membrana, C-laurdan. Nuevamente, las células fueron lavadas con PBS y se agregó glicina

100 mM. Posteriormente, los vidrios fueron colocados en una cámara húmeda y oscura sobre *Parafilm* y se realizó un bloqueo con PBS-BSA 3% m/v. Para las tinciones que incluyen rodamina-faloídina, el bloqueo se realizó ON, mientras que para las marcaciones de E-cadherina y β -catenina, el bloqueo fue de 1 h. Los vidrios fueron lavados con PBS e incubados con la sonda o anticuerpo primario correspondiente:

- i) Para las tinciones con E-cadherina y β -catenina se preparó una dilución 1:200 de cada anticuerpo, preparados en PBS-BSA 3% m/v. Los vidrios fueron incubados ON a 4 h con los anticuerpos primarios. Al día siguiente, se los incubó con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 555, respectivamente, en una dilución 1:5000, preparada en PBS-seroalbúmina bovina (BSA) 3% m/v.
- ii) para las tinciones con rodamina-faloídina, se preparó una dilución 1:500 de Rodamina Faloídina en etanol 96% v/v y luego, a partir de ésta, se preparó una dilución 1:10 en PBS-BSA 3% m/v. La rodamina-faloídina se incubó durante 1 h a 4° C.
- iii) para la tinción con C-laurdan se utilizó dicha sonda en una concentración 5 μ M preparada en PBS-BSA 3% m/v, incubada durante 1 h a 4° C.
- iv) para las tinciones con rodamina-faloídina y anticuerpos anti-HO-1 o anti-MMP9, luego de incubar con rodamina-faloídina, las células se lavaron con PBS y se incubaron 2 h a 4° C con el respectivo anticuerpo. Ambos anticuerpos primarios fueron preparados en PBS-BSA 3% m/v en una dilución 1:100. Posteriormente, se procedió a incubar con el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo en una dilución 1:6000 en la misma solución de bloqueo durante 1 h a 4° C. Para *STORM* se utilizó un anticuerpo primario anti- α -tubulina en una dilución 1:2000 y una dilución del anticuerpo secundario 1:1000.

Finalmente, luego de lavar los vidrios con PBS, los mismos fueron montados en un portaobjetos con 2 μ l de *Mowiol 488* (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y guardados a 4° C en oscuridad hasta su uso.

Las imágenes correspondientes a E-cadherina, β -catenina, F-actina, MMP9 y HO-1 fueron obtenidas por microscopía confocal utilizando un microscopio Olympus Fluoview FV1000, con un objetivo UPlanSApo 60X de inmersión en aceite con una apertura numérica NA 1/41.35 Olympus, utilizando un láser diodo 543, 488 y 635 como las fuentes de excitación.

Las imágenes correspondientes a la distancia al primer vecino fueron obtenidas por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia Olympus IX7, con un objetivo UPlanSApo 10X de inmersión en aceite, con una apertura numérica NA 0,30 Olympus. Las fotografías fueron obtenidas con una cámara Qimaging EXI Aqua. Las imágenes fueron analizadas con un algoritmo diseñado para binarizar la imagen y asignar una etiqueta a cada conjunto de píxeles conectados, que representa una única célula o bien un conjunto de células en el cual no puede distinguirse cada célula individual. Para cada conjunto de células, se calculó la distancia a la primera célula vecina. Las distancias fueron normalizadas al radio celular promedio.

Para cuantificar los filopodios, seleccionamos regiones en las cuales los filopodios de células vecinas estuviesen en contacto, (excluyendo zonas de contacto directo entre membranas) y dividimos estas regiones en segmentos donde la distancia entre las células, permanecieran constante. Posteriormente, utilizando el programa Matlab, analizamos los perfiles de intensidades con un algoritmo que suaviza los picos de señal obtenidos y extrae las posiciones de los máximos de intensidad correspondientes a filopodios, para luego establecer la densidad de contactos sobre el perfil trazado¹⁴⁸.

La mecánica de los microtúbulos fue evaluada por microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM, por sus siglas en inglés). Se determinó la longitud de persistencia (L_p) de los microtúbulos mediante la técnica de microscopía de acuerdo a la metodología previamente descrita. Brevemente, Gittes y colaboradores¹⁴⁹ establecieron un método que nos permite analizar los filamentos (en este caso, microtúbulos) como si fuesen funciones trigonométricas, y así establecer diferencias en la curvatura (amplitud) de los mismos. Como muestra la Figura 21, las posiciones XY de los microtúbulos fueron reconstruidas una rutina de seguimiento de filamentos de acuerdo al procedimiento descrito por Pallavicini y colaboradores¹⁴⁸.

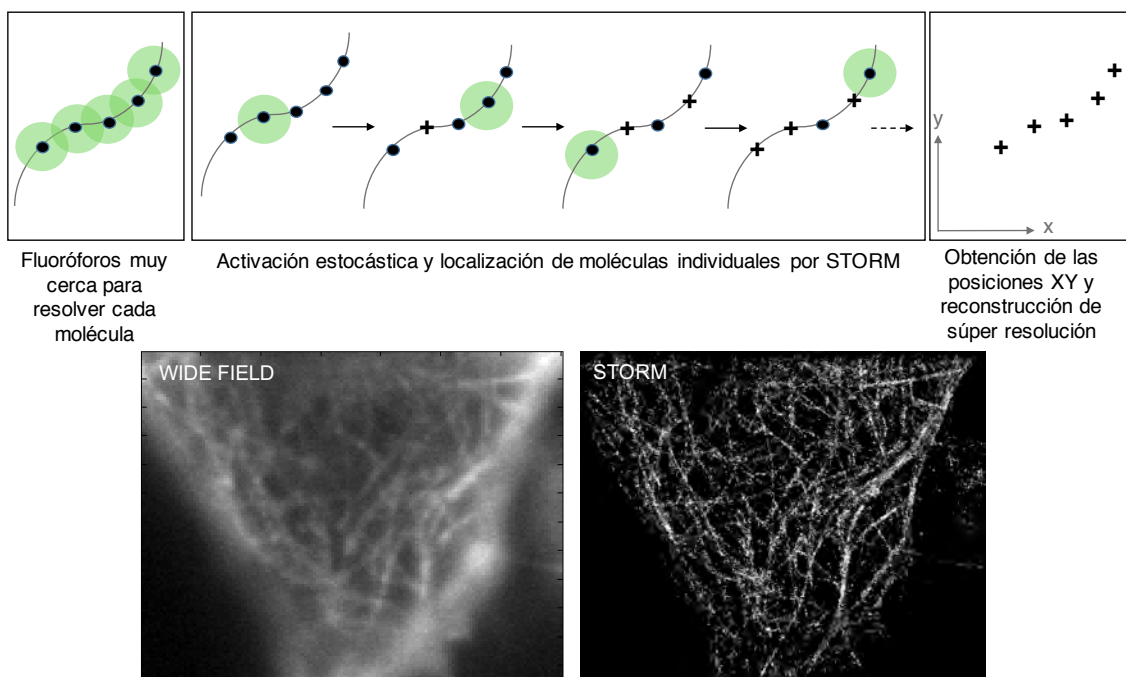


Figura 21. Esquemización del fundamento de la técnica de *STORM* e imágenes representativas de microtúbulos obtenidas por microscopía *wide field* vs. *STORM*. Adaptación¹⁵⁰

Se realizó un análisis de Fourier sobre la forma de los filamentos y se registraron las amplitudes de los mismos, fraccionando cada filamento en segmentos de 3 μm . Finalmente, la L_p fue obtenida ajustando al inverso del cuadrado del conjunto de varianzas de estas amplitudes como función del número de modo de acuerdo a la ecuación (2).

$$\text{var}(a_n) = \frac{1}{l_p} \frac{1}{q_n^2} \quad (2)$$

Donde $q_n = n\pi/L$ es el vector de onda para un filamento de longitud L . Este método ha resultado robusto para determinar la longitud de persistencia de microtúbulos y filamentos de actina *in vitro*¹⁴⁹.

14. Western Blot

14.1 Extracción de proteínas

El medio de cultivo fue removido de todas las placas y se realizaron dos lavados con PBS frío conteniendo inhibidores de proteasas: NaF, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), NaVO_4 y mezcla de inhibidores de proteasas comercial (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.). Las células fueron

rastrilladas de las placas en 1 ml de la misma solución y luego fueron centrifugadas a 2.500 rpm durante 1 min a 4° C. El precipitado fue resuspendido en la solución de lisis RIPA [150 μ M NaCl, 20 μ M EDTA 1% v/v deoxicolato de sodio, 0,1% v/v dodecilsulfato sódico (SDS), 1% Triton x-100Tris, pH 7,4] e incubado en hielo durante 20 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm a 4° C durante 20 min. La concentración de proteínas presentes en los sobrenadantes fue cuantificada a través del método de ácido bicinonínico (BCA) y posteriormente desnaturalizadas con *buffer* de siembra (1M Tris pH 8, 10% v/v SDS, 20% v/v glicerol, 36 mM sacarosa, azul de bromofenol, 5% v/v β -mercaptoetanol) durante 10 min a 95° C.

14.2 Medición de la concentración de proteínas

La concentración proteica fue determinada usando el método BCA (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (98% BCA y 2% sulfato de cobre (CuSO₄)). La curva estándar se realizó a partir de diluciones seriadas con BSA disuelto en agua destilada. Se colocaron 10 μ l de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se agregaron 200 μ l de CuSO₄/BCA. La placa fue incubada durante 30 min a 37° C. Se determinó la absorbancia a 550 nm en un luminómetro (*Promega, EE.UU.*).

14.3 Electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa

Las muestras fueron preparadas como se describió anteriormente y se sembraron 30 μ l 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 100V en presencia de *buffer* de electroforesis (25mM Tris; 192mM Glicina; 0,1 % SDS). Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, Reino Unido), en *buffer* de transferencia (Towbin) (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 3,5 mM SDS, pH 8,3; 20% (v/v) Metanol). La transferencia fue realizada a 250 mA, durante 90 min.

14.4 Inmunodetección de proteínas

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 ON 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). La cuantificación y relativización de las bandas, respecto del control de carga utilizado (β -actina) fueron realizadas por densitometría utilizando el programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov>, NIH).

15. Extracción y cuantificación de ARN.

El aislamiento de ARN para estudios transcripcionales fue realizado a partir de cultivos celulares en fase de crecimiento exponencial, siendo la confluencia del 80%. Se descartó el medio y las células se lavaron con 5 ml de PBS. Luego, se recolectaron las células de cada placa utilizando una espátula y 500 μ l de *Quick-Zol* (Kalium Technologies, Argentina). La suspensión celular se homogeneizó completamente por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para asegurar la disociación de los complejos nucleo-proteicos. Posteriormente se agregaron 100 μ l de cloroformo, se mezcló enérgicamente con vortex durante 15 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Para favorecer la separación de fases, se centrifugó a 12.000 rpm a 4° C durante 15 min. La fase acuosa superior, que contiene el ARN, se transfirió a un nuevo tubo. El ARN se precipitó con 250 μ l de isopropanol por cada 500 μ l de *Quick-Zol*, incubando a -20° C durante 40 min. Posteriormente, 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 12.000 rpm a 4° C durante 5 min y se removió el sobrenadante. Para eliminar las trazas remanentes de etanol, el pellet se secó a 37° C durante 3 min. Luego, se resuspendió en 30 μ l de H₂O libre de

RNASas y se rehidrató incubando 10 min a 55 - 60° C. El ARN total extraído se conservó a -80° C hasta su uso.

La concentración y pureza del ARN total obtenido se midieron mediante absorbancia en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). El grado de pureza de la muestra se estimó como el cociente (A260/A280) nm, parámetro que proporciona una noción de la relación entre ácidos nucleicos y proteínas presentes en la muestra. Se adoptó como criterio de pureza un cociente mayor o igual a 1,7.

15.1 Transcripción reversa

Para la obtención del ADN copia (ADNc) a partir del ARN total mediante la transcripción reversa o retro-transcripción (RT), se utilizó el *kit RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, EE.UU.)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En cada caso, se preparó una solución conteniendo 2 µg de ARN, 1 µl de OligodT (0,5 µg/µl) y se llevó a volumen final de 12 µl con agua libre de RNAsas. Las muestras se desnaturalizaron a 65° C durante 5 min y luego se agregó la mezcla de reacción obteniendo una solución final con *buffer* de reacción 1X, dNTPs 0,5 mM, inhibidores de RNAsas 1 U/µl y transcriptasa reversa 10 U/µl. La mezcla se incubó durante 60 min a 42° C. La reacción se inactivó a 70° C durante 5 min. El ADNc obtenido se conservó a -20° C hasta su posterior uso. Como control, se realizó el mismo protocolo pero sin el agregado de la enzima transcriptasa reversa (NoRT).

15.2 PCR cuantitativa en tiempo real (RTqPCR)

Se amplificaron 1,8 µl de una dilución 1:30 de ADNc en una mezcla de reacción con *buffer* de reacción 1X; MgCl₂ 2 mM; oligonucleótidos específicos 0,25 µM; dNTPs 0,2 mM; SYBR Green 1%, Taq ADN polimerasa 0,03 u/µl (Fermentas, EE.UU) y H₂O libre de nucleasas en un volumen final de 15 µl. Cada PCR se realizó por duplicado y se realizaron 3 experimentos independientes para cada gen. Los *primers* fueron diseñados para amplificar 100 pb del ARN maduro.

Los *primers* utilizados fueron diseñados con la herramienta web *Primer Blast* (NCBI, EE.UU) y sintetizados por IDT (EE.UU) y Macrogen (Corea del Sur). En la Tabla 1 se encuentran las secuencias de los *primers* específicos para cada gen analizado. Se realizaron las pruebas pertinentes, para constatar que la amplificación fuera gen- y especie-específica.

Tabla 1. Primers utilizados para el análisis de la expresión de diversos genes de interés mediante la técnica de RTqPCR. Para establecer las condiciones óptimas de cada gen analizado, se realizaron gradientes de temperatura de hibridación. La existencia de un solo producto de amplificación fue determinada mediante el análisis de las curvas de *melting*.

Nombre del gen	Orientación del oligo	Secuencia	Temp. Annealing (Ta)
HMOX1	Directo	GAGTGTAAGGACCCATCGGA	60° C
	Inverso	GCCAGCAACAAAGTGCAAG	
ECAD	Directo	AAGGTTACCCAGCACCTTGCA	58° C
	Inverso	GGCAGAGGGACACACCAGTGTA	
BCAT	Directo	CATAACCTTTCCCATCATCGT	60° C
	Inverso	TGTGGAGAGTTGTAATGGCA	
ACTB	Directo	CAC AGA GCC TCG CCT TTG C	62° C
	Inverso	AAT CCT TCT GAC CCA TGC CC	

Se utilizó el equipo Opticon-3 para la amplificación, y los niveles de expresión se relativizaron a la expresión de β -actina y el control. Los errores fueron calculados como se describió anteriormente⁸⁵.

15.3 RNAseq

Las bibliotecas de ARN fueron preparadas con el kit *TruSeq Stranded Total RNA kit* (Illumina Inc., EE.UU.) a partir de 1 μ g de ARN total. De acuerdo con las instrucciones del proveedor, el primer paso consiste en la eliminación de todo ARN ribosomal (ARNr) del ARN total, para luego purificar este último, fragmentarlo y sintetizar ADNc. El ARN fragmentado fue retro transcripto a una cadena simple de ADNc utilizando *primers* aleatorios. El próximo paso consistió en remover el ARN molde y sintetizar la cadena complementaria, incorporando deoxiuracilotrifosfato (dUTP) en lugar de deoxitirosinatrifosfato (dTTP). Se utilizaron las perlas AMPure XP para separar el ADNc doble cadena de la segunda mezcla de reacción de cadena, dando como resultado ADNc de extremos romos. A continuación, se añadió un único nucleótido "A" a los extremos 3' de los fragmentos romos. Múltiples adaptadores de indexación, que contienen un solo nucleótido "T" en el extremo 3' del adaptador, se ligaron a los extremos del ADNc doble cadena, preparándolos para la hibridación. Las bibliotecas fueron purificadas y su tamaño fue validado en un 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip (*Agilent Technologies*, EE.UU.). La biblioteca de ADN fue cuantificada utilizando el kit *Kapa*

Biosystems qPCR kit, y luego mezcladas o *pooleadas* de manera equimolar a una concentración final de 2 nM. Cada *pool* fue desnaturalizado, diluido a 10 pM y agrupado en calles individuales en un dispositivo *HiSeq Flow Cell* utilizando un *Illumina cBot* y el correspondiente kit *paired-end TruSeq V3 cluster*. Las muestras pooleadas y agrupadas fueron corridas en un secuenciador *HiSeq2500* de acuerdo a protocolo sugerido por el proveedor (*Illumina Inc.*, EE.UU.).

16. ELISA

Las células PC3 fueron tratadas o no con hemina 80 μ M. Al cabo de 24 h, se recolectaron los medios de cultivo de las células tratadas y sin tratar. Los medios condicionados fueron concentrados utilizando las columnas *VivaSpin* (3 x 15 min, 6500 g). Para medir los niveles de uPA liberados en los medios condicionados, se utilizó una dilución 1:10.000 de cada medio, determinada como la dilución óptima de trabajo tras realizar una curva de calibración. Para la calibración y cuantificación se utilizó el kit comercial *Human ELISA Kit (Abcam, EE.UU)* que consiste en 96 pocillos previamente revestidos con un anticuerpo monoclonal hecho en ratón anti-uPA. Se colocaron 100 μ l de cada medio en distintos pocillos y se incubaron con el anticuerpo a 37° C durante 90 min. Posteriormente, en cada pocillo se agregaron 100 μ l de anticuerpo anti-uPA biotinilado el cual se incubó a 37° C durante 60 min. Seguido a este paso de incubación, los pocillos fueron lavados 3 veces con 300 μ l de PBS 0,01M, dejando reposar el *buffer* 1 min entre lavados. Luego, en cada pocillo se agregaron 100 μ l del complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa que fueron incubados durante 30 min. Los pocillos fueron lavados nuevamente con PBS 0,01M, dejando reposar el *buffer* 2 min entre lavados para eliminar los conjugados libres. Finalmente, se agregaron 90 μ l de buffer TMB para generar la reacción enzimática de la peroxidasa, la cual genera un producto azul, que cambia hacia un color amarillo con el agregado del compuesto de finalización de reacción, 25 min más tarde. Finalmente, la concentración de uPA se determinó utilizando un luminómetro *GloMax (Promega, EE.UU.)* midiendo absorbancia a 450nm, 30 min luego de finalizada la reacción enzimática.

17. Pull down de la RhoGTPasa Cdc42 activada

Para la determinación de Cdc42 activada, las células PC3 fueron tratadas o no con hemina 80 μ M durante 24 h. Posteriormente, las células fueron cosechadas y se extrajeron proteínas utilizando un buffer de lisis/lavado/unión provisto por el kit *Active Cdc42 pull down and*

detection kit (Thermo Scientific, EE.UU.). Las proteínas fueron cuantificadas por el método de BCA, previamente explicado y se utilizaron 500 μg de proteína total para realizar el *pull down* y los controles positivo y negativo. Para realizar el *pull down*, se utilizó una resina de glutatión acoplado a perlas de agarosa la cual fue posteriormente acoplado a la proteína de fusión GST-Pak1-PBD. Esta proteína de fusión contiene el dominio de unión a p21 (PBD) de la quinasa activada de p21 (Pak1) para precipitar específicamente Cdc42. Los 500 μg de proteínas junto con el complejo glutatión- GST-Pak1-PBD fueron incubados durante 1 h a 4° C en columnas de purificación. Posteriormente, las columnas se centrifugaron y se utilizaron tubos colectores para filtrar el sobrenadante mientras los complejos eran retenidos en las columnas de purificación. Las mismas fueron lavadas dos veces con 400 μl del buffer de lisis/lavado/unión, centrifugando a 6.000 g durante 30 seg. entre lavados. Finalmente, se agregaron 50 μl de buffer reductor preparado con SDS y 5% v/v β -mercaptoetanol, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 2 min y posteriormente las proteínas fueron eluidas de la resina calentando las muestras a 100° C durante 5 min. Sobre los controles positivo y negativo se efectuó el mismo protocolo, previa incubación durante 15 min a 30° C con GTP γ S 0,1Mm o GDP 1Mm, respectivamente. Las reacciones fueron finalizadas con 32 μl de MgCl₂ 1M.

18. Análisis estadístico

Los resultados muestran el promedio \pm el error estandar del promedio (s.e.m.), o bien el desvío estándar (SD) de cada réplica independiente, según corresponda. Se utilizó el test T de Student para atribuir la significancia estadística según el valor P (< 0,05). Los *Boxplots* de las Partes III y IV de Resultados muestran el promedio, la mediana y los bigotes representan la ventana del 5 al 95%. Para el análisis de distancias al primer vecino, las distribuciones de las mismas se compararon de a pares con un test de Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó un suavizado de Kernel sobre los datos para obtener las curvas de probabilidad de densidad estimada.

Resultados

PARTE I

IDENTIFICACIÓN DEL INTERACTOMA DE HO-1

HO-1 está involucrada en una amplia variedad de procesos celulares que inhiben la progresión tumoral^{79–81,85–90,94}. Sin embargo, es claro que esta proteína no actúa por sí sola, sino que su interacción con otras proteínas podría estar haciéndola partícipe de dichos procesos celulares. Por este motivo, nos propusimos identificar las proteínas asociadas a HO-1 mediante un análisis por espectrometría de masa de proteínas inmunoprecipitadas con HO-1. Para tal fin, células de la línea PC3, derivadas de una metástasis ósea de PCa¹⁵¹, fueron transfectadas con el vector FLAGHO-1 o bien el vector vacío (FLAG) como control. Luego de 48 h de transfección, las células fueron tratadas durante 30 min con H₂O₂ 200 μM, tratamiento que favorece una condición inflamatoria y oxidativa similar a la que caracteriza al PCa. Posteriormente, se procedió a la inmunoprecipitación de FLAGHO-1 junto con sus interactores. Los eluidos fueron digeridos para su posterior análisis por espectrometría de masa en tándem con cromatografía líquida de ionización por *electrospray* (LC-ESI MS/MS) y los resultados analizados utilizando la base de datos de secuencias proteicas MASCOT¹⁵², para la identificación de péptidos. Luego de contrastar los resultados contra las proteínas inmunoprecipitadas inespecíficamente con el control FLAG vacío, se lograron identificar 56 proteínas diferencialmente unidas a HO-1. La Tabla 2 enumera las proteínas detectadas junto con el número de péptidos únicos identificados para cada una, el nombre del gen y el porcentaje de cobertura respecto de la secuencia completa. El conjunto de las proteínas halladas fue denominado el *interactoma de HO-1*.

Tabla 2. Proteínas inmunoprecipitadas con HO-1 e identificadas por espectrometría de masa.

Nombre de la proteína	Gen	Masa molecular teorica (Da)	No. de peptidos	Cobertura (%)
High mobility group protein HMG-I/HMG-Y isoform a	AHCTF1	11.669	2	29,2
Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	39.193	5	25
Anexin 2	ANXA2	38.808	3	13,6
Cycle-like factor CLIF	ARNTL2	67.908	1	2
Aspartyl beta-hydroxylase	ASPH	85.959	1	3
Potassium-transporting ATPase alpha chain 1	ATP4A	11.4045	1	2
Putative uncharacterized protein C5orf27	C5ORF27	10.849	1	14,58
Chromobox homolog 1	CBX1	21.519	2	1,2
Chromobox homolog 3	CBX3	20.997	2	15,2
Coiled-coil domain-containing protein 73	CCDC73	1.079	1	2,78
Cardiomyopathy-associated protein 5	CMYA5	175,45	1	0,9
Damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa	DDB1	128.086	1	1,4
Translation elongation factor 1-alpha	EEF1A1	35.825	2	12
Eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	96.246	1	2,9
Translation initiation factor eIF3 p40 subunit	EIF3H	40.075	1	5
FtsJ3 protein	FTSJ3	84.015	1	2
Gelsolin	GSN	31.052	3	22,7
High mobility group AT-hook 1	HMGA1	34.635	1	5,1
Heme oxygenase 1	HMOX1	32.798	5	25
Heat shock 27kDa protein	HSPB1	22.427	3	31,4
Junctional sarcoplasmic reticulum protein 1	JSRP1	36.296	1	2
KH-type splicing regulatory protein	KHSRP	10.362	1	24,4
Lasp-1	LASP1	30.185	1	5
Matrin 3	MATR3	95.078	2	5
Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10	MEGF10	122.121	1	2,11
Muskelin 1	MKLN1	84.713	11	17
Kinesin-like protein KIF23	MKLP-1	98.842	1	1,7
Interferon-induced Mx protein	MX1	75.929	1	2
Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	45.631	1	4,1
Nitric oxide-associated protein	NOA1	78.409	1	4,44
Nucleophosmin 1	NPM1	31.09	2	12,7
5'-nucleotidase, cytosolic II	NT5C2	65.384	1	2
Palmdelphin, isoform CRA_a	PALMD	53.404	1	2
Programmed cell death 5 short isoform	PDCD5	4.472	1	32
Peroxiredoxin 2	PDX2	22.014	1	5
Purine-rich element binding protein A	PURA	35.003	1	8,2
Retinoic acid induced 14	RAI14	110.617	1	1,5
Regulator of chromosome condensation	RCC1	44.485	1	3,7
Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit	RPA1	68.723	1	3,6
Ribosomal protein SA pseudogene 9	RPSA1	32.947	1	9
s100 calcium- binding protein A6	S100A6BP	10,23	1	8
Splicing factor, arginine/serine-rich 3	SFRS3	19.546	1	11,8
Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	SIPA1L1	201.102	1	1,25
K-Cl co-transporter KCC4	SLC12A7	120.327	1	0,6
Isoform 4 of Spastin	SPAST	54.385	1	7,23
Spermatogenesis-associated protein 7	SPATA7	8.799	1	36,84
Sequestosome 1	SQSTM1	48.37	1	4,5
RNA polymerase II transcription factor SIII subunit A3-like-2	TCEB3CL2	59.735	1	3,48
Testis derived transcript	TES	49.789	1	3,1
Thyroid hormone receptor associated protein 3	THRAP3	108.686	1	1,9
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit	TIMM44	15.215	1	19,55
Tropomodulin 3	TMOD3	39.727	2	9,7
DNA topoisomerase 1	TOP1	66.890	2	5,3
Tripartite motif-containing 28	TRIM28	80.621	6	18
Zinc finger CCCH-type, antiviral 1	ZC3HAV1	103.135	3	7,3
Zinc finger protein 589	ZNF589	40.736	7	36

Con el fin de conocer los procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares en los cuales estaban involucradas las proteínas asociadas a HO-1, se utilizó el *software* DAVID 6.8 para realizar un análisis de ontología génica (GO). La Figura 22 muestra las categorías de ontología génica significativamente representadas para el interactoma de HO-1.

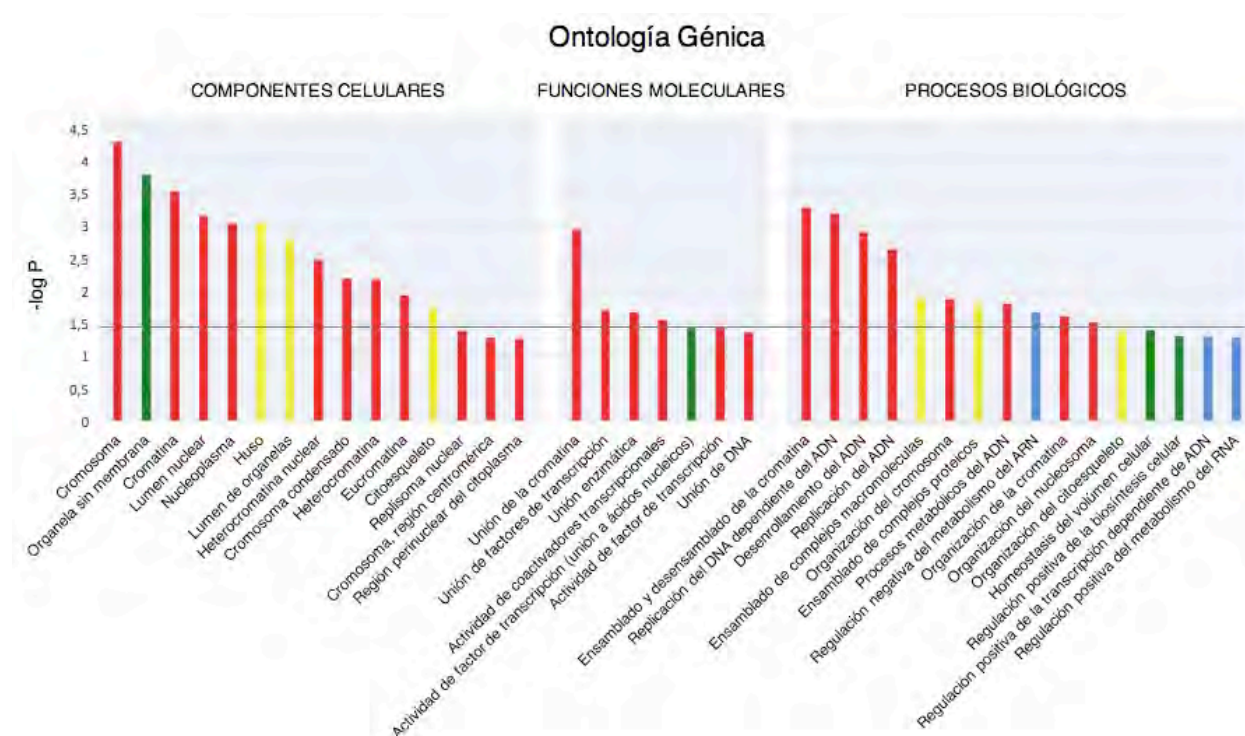


Figura 22. Categorías de GO asociadas a funciones moleculares, componentes celulares y procesos biológicos, respectivamente, graficadas en función del logaritmo del valor P. Las categorías fueron sub-clasificadas en: ADN y transcripción (rojo), procesamiento del ARN (azul), citoesqueleto (amarillo) y otras categorías (verde).

Paralelamente, se construyeron redes de interacción con los *softwares* GeneMANIA y Cytoscape 3.6.0, herramientas comúnmente utilizadas para la visualización e interpretación de procesos biológicos. Se pudieron identificar interacciones de tipo físicas, genéticas, de co-localización, dominios proteicos compartidos, interacciones predichas y caminos metabólicos en común. La red obtenida se muestra en la Figura 23.

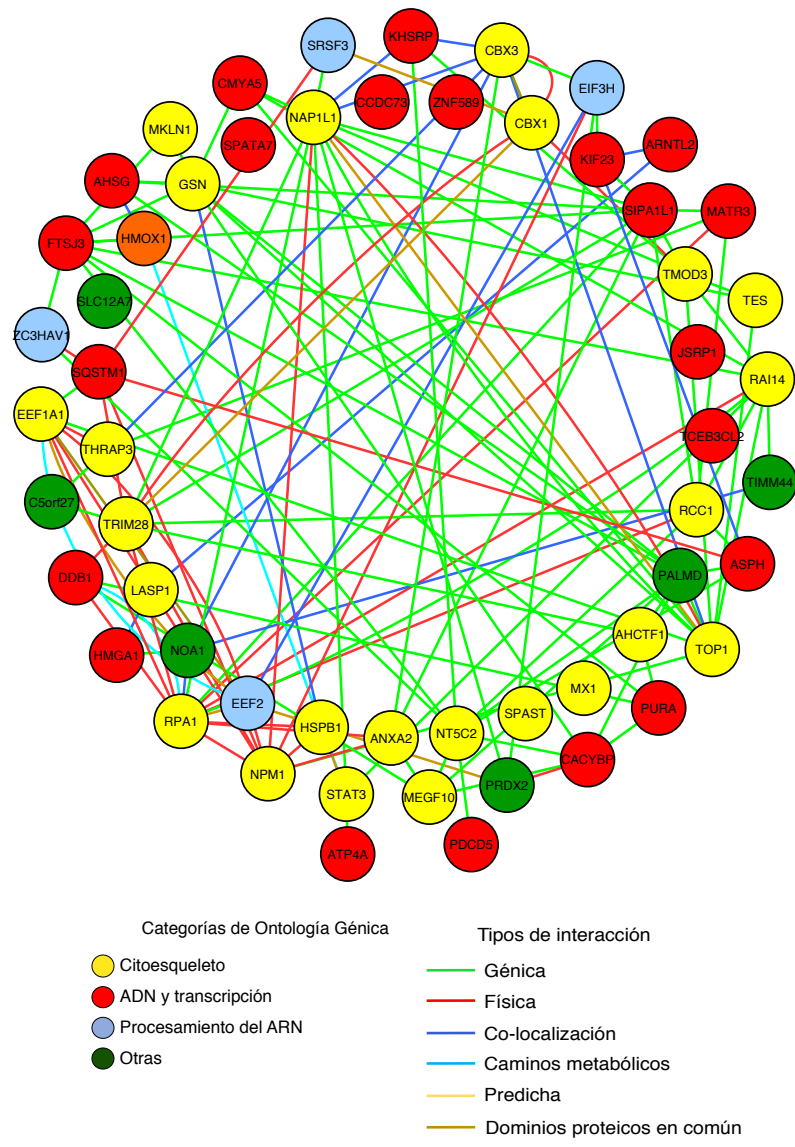


Figura 23. Red de interacciones del interactoma de HO-1. Los colores de las proteínas corresponden a las categorías de GO mencionadas anteriormente; ADN y transcripción (rojo), procesamiento del ARN (azul), citoesqueleto (amarillo) y otras (verde). La red se construyó con *Cytoscape 3.6.0*. a partir de las interacciones obtenidas con *GeneMANIA*.

Si bien la mayoría de las proteínas inmunoprecipitadas están incluidas en más de un tipo de categoría, al observar el número de proteínas identificadas en amarillo en la Figura 23, podemos concluir que **más del 50% de las proteínas del interactoma de HO-1 están vinculadas directa o indirectamente a la regulación del citoesqueleto.**

PARTE II

SCREENING BIOINFORMÁTICO DE LA DESREGULACIÓN DE PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO EN PACIENTES CON PCa.

En base al resultado obtenido utilizando *DAVID*, resulta evidente que existe una relación entre HO-1 y la regulación del citoesqueleto. Por este motivo, centramos nuestro análisis en las proteínas del interactoma asociadas a esta categoría del GO y realizamos un *screening* bioinformático utilizando bases de datos públicas para conocer la expresión de las mismas en PCa. En primer lugar, se utilizó la base de datos de *microarrays* de pacientes *Oncomine 4.3 Research Edition*¹⁵³, la cual al momento del análisis contaba con un total de 715 *sets* de datos y 86.763 muestras de pacientes con diferentes tipos de cánceres. Se evaluó la expresión de los genes asociados al citoesqueleto, identificados por GO, siguiendo los criterios establecidos en la sección 11.1 de Materiales y métodos. Así, se consideraron 16 trabajos (*sets* de datos) que cumplieran los criterios de inclusión previamente establecidos (sección 11.2 de Materiales y métodos) donde la expresión de estos genes se vio significativamente alterada ($P < 0,05$) en el carcinoma prostático respecto de la glándula normal. La Tabla 3 lista los 16 trabajos seleccionados para el análisis, detallando la cantidad de genes estudiados en los *microarrays*, el número de pacientes analizados ($n_{total}=1.045$), la significancia, y las veces de cambio. La Figura 24 muestra el grado de sub o sobre-expresión de cada uno de los genes mencionados anteriormente. A cada gen se le asignó un “*gene rank*” (un valor para su expresión dentro de dicho *array* directamente asociado a una posición dentro del ranking de expresión del *array*). A su vez se estableció un “*median rank*”, que es la mediana de dicho ranking génico para el gen de interés comparando los distintos *arrays*.

Tabla 3. Estudios seleccionados de la plataforma *Oncomine* conteniendo *microarrays* de expresión comparando el carcinoma prostático contra glándula normal.

Nº	Estudio	Plataforma	Genes estudiados	N	P-valor	Veces de cambio	GEO <i>accession</i>
1	Arredouani Prostate	HG U133 Plus 2.0 Array	19.574	21	0,05	1,5	GSE55945
2	Grasso Prostate	Agilent Human Genome 44K	19.189	122	0,05	1,5	GSE35988
3	Holzbeierlein Prostate	HG U95A-Av2 Array	8.603	54	0,05	1,5	ND*
4	Lapointe Prostate	Undefined plataform	10.166	112	0,05	1,5	GSE3933
5	LaTulippe Prostate	HG U95A-Av2 Array	8.603	35	0,05	1,5	GSE68882
6	Liu Prostate	HG U133A Array	12.624	57	0,05	1,5	GPL1261
7	Luo Prostate	Hu35k (A-D) y HG U95A-Av2 array	15.302	30	0,05	1,5	GSE68545
8	Magee Prostate	HumanGeneFL Array	5.338	15	0,05	1,5	ND
9	Singh Prostate	HG U95A-Av2 Array	8.603	102	0,05	1,5	GSE68907
10	Taylor Prostate	Undefined plataform	22.238	150	0,05	1,5	GSE21032
11	Tomlins Prostate	Undefined plataform	10.656	53	0,05	1,5	GSE6099
12	Vanaja Prostate	HG U133(A-B) Array	17.779	40	0,05	1,5	ND
13	Varambally Prostate	HG U133 Plus 2.0 Array	19.574	19	0,05	1,5	GSE3325
14	Wallace Prostate	HG U133 2.0 Array	12.603	89	0,05	1,5	GSE6956
15	Welsh Prostate	HG U95A-Av2 Array	8.603	34	0,05	1,5	GPL96
16	Yu Prostate	HG U95A-Av2 Array	8.603	112	0,05	1,5	GSE68555

* ND :No disponible.

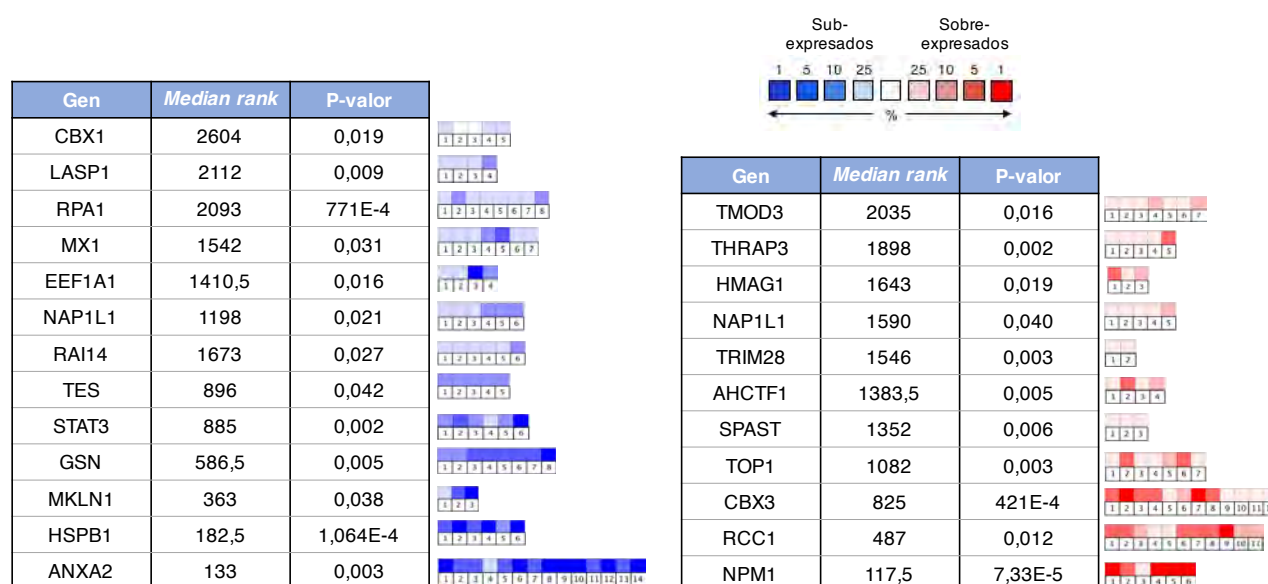


Figura 24. Expresión génica de las proteínas del citoesqueleto asociadas a HO-1. Se denomina *median rank* a la posición (*ranking*) del gen considerando su expresión en todos los estudios analizados, y el valor P corresponde a la mediana de cada gen. Las escalas de colores representan el porcentaje de sub o sobre-expresión en aquellos trabajos donde los cambios en la expresión génica, seguía los parámetros mencionados anteriormente (Materiales y métodos). Cada cuadrado al costado derecho de las tablas representa un *set* de datos en donde el gen se encontró sub-expresado (escala de azules) o sobre-expresado (escala de rojos).

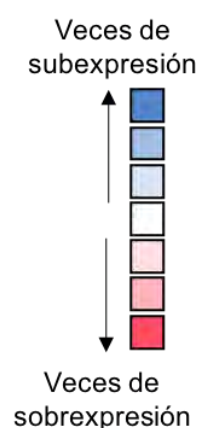
En la sección **Anexo I** se adjunta un gráfico representativo de un *set* de datos seleccionado mostrando la expresión de cada gen mencionado en la Figura 24 en adenocarcinoma prostático vs. próstata normal. El análisis de estos datos muestra una clara desregulación de

estos genes en el PCa vs. la próstata normal.

En paralelo, estudiamos la expresión de estos genes del citoesqueleto asociados a HO-1 en el proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (disponible en <http://cancergenome.nih.gov/>) que cuenta con información sobre la expresión génica en 500 muestras de tumor primario de PCa comparadas con tejido normal adyacente. A diferencia de *Oncomine* que tiene datos de *microarrays*, TCGA posee información de expresión génica medido por secuenciación masiva (RNAseq). El resultado del análisis se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de cambio en la expresión de los genes del citoesqueleto expresados como el logaritmo en base 2 de las veces de cambio (*Log2 Fold Change*) en PCa respecto del tejido normal adyacente.

Gen	Log2FC	P valor ajustado
ANXA2	-1,013	4,48E-19
GSN	-0,907	3,40E-21
MX1	-0,791	1,04E-07
HSPB1	-0,777	9,95E-24
HMGA1	-0,465	1,70E-13
TES	-0,435	7,81E-04
RAI14	-0,401	7,76E-06
LASP1	-0,085	1
AHCTF1	-0,081	1
THRAP3	0,101	5,84E-05
NAP1L1	0,12	3,14E-02
TMOD3	0,204	9,23E-05
CBX1	0,22	3,80E-03
TRIM28	0,314	1,36E-21
RPA1	0,317	5,39E-06
SPAST	0,337	4,06E-17
MKLN1	0,359	3,69E-09
CBX3	0,392	8,67E-12
EEF1A1	0,537	1,13E-17
TOP1	0,554	5,58E-14
RCC1	0,799	6,48E-31
NPM1	1,017	1,09E-36



En la segunda columna se observa las veces de cambio de cada gen como *Log2 Fold Change* en PCa respecto del tejido normal adyacente de cada paciente. Los valores mayores a 0 (cero) significan inducción y los valores menores a 0 significan represión. Las veces de cambio están asociadas a una escala de colores, donde los azules representan los genes sub-expresados y los rojos los sobre-expresados en PCa respecto al tejido adyacente. En la tercera columna

se puede observar la significancia. Se aprecia que un 66 % de esta lista de los interactores de HO-1 está desregulado de igual forma entre los sets de datos de Oncomine y TCGA.

Con el fin de profundizar el estudio de los genes asociados al citoesqueleto y con el advenimiento del acceso a una mayor cantidad de bases de datos públicas, analizamos la sobrevida en relación a la expresión de dichos genes utilizando los criterios que se detallan en la sección 11.3 de Materiales y métodos. Seleccionamos dos sets de datos: en primer lugar, una cohorte de 281 pacientes con PCa localizado libre de tratamiento con un seguimiento clínico a 30 años, de los cuales se midió la expresión de 6.100 genes a partir de muestras obtenidas por resección transuretral prostática, fijadas en parafina¹⁴⁵; y en segundo lugar un set de datos de 92 pacientes con información de 31.000 transcritos y tiempo hasta la recaída bioquímica luego de haber sido sometidos a prostatectomía radical¹⁴⁶. La Tabla 5 muestra la relación de la alta expresión de cada gen de interés con la sobrevida y la probabilidad de muerte, respecto de los pacientes con baja expresión. La expresión de los genes se categorizó como "alta" o "baja" según los criterios descritos en la sección 11.3 de Materiales y métodos. El *hazard ratio* (HR) indica la probabilidad de muerte de un paciente con alta expresión del gen respecto de uno con baja, considerándose HR=1 para este último caso. Los genes marcados con un asterisco son aquellos que mostraron diferencias significativas en las curvas de Kaplan-Meier, para la sobrevida o para el tiempo de recaída para cada gen, en cada set de datos.

La Tabla 5, muestra una clara asociación entre los genes del citoesqueleto que interaccionan con HO-1 y los tiempos de sobrevida y recaída. Los genes resaltados en celeste son aquellos cuyas curvas de sobrevida (Sboner) y/o tiempo de recaída (Ross-Adams) se ven significativamente alteradas cuando comparamos pacientes con alta expresión del gen vs. baja expresión del gen.

Tabla 5. Sobrevida asociadas a la alta expresión de los genes de citoesqueleto vinculados a HO-1 en pacientes libres de tratamiento (sobrevida total, *Sboner database*¹⁴⁵) o que recaen luego de las prostatectomías radicales (recaída, base de datos *Ross-Adams*¹⁴⁶) N/D: no disponible, valor *P < 0,05.

Gen	Sobrevida total			Recaída		
	sobrevida alta expresión vs. baja expresión	p valor	hazard ratio	sobrevida alta expresión vs. baja expresión	p valor	hazard ratio
CBX1	menor	0,15	1,74 (0,81 - 3,7)	menor	0,22	1,44 (0,8 - 2,59)
LASP1	menor	0,05*	1,38 (1 - 1,9)	mayor	0,11	0,62 (0,34 - 1,13)
RPA1	mayor	0,008*	0,54 (0,34 - 0,86)	mayor	0,005*	0,42 (0,23 - 0,79)
MX1	menor	0,053	1,86 (0,98 - 3,54)	mayor	0,24	10,7 (0,38 - 1,27)
EEF1A1	N/D			mayor	0,13	0,64 (0,36 - 1,15)
NAP1L1	menor	3,7E-4*	2,43 (1,47 - 4,03)	mayor	0,19	0,67 (0,37 - 1,22)
RAI14	menor	0,041*	1,38 (1,01 - 1,87)	menor	0,0055*	2,44 (1,27 - 4,69)
TES	menor	0,041*	1,37 (1,01 - 1,87)	menor	0,0023*	2,99 (1,43 - 6,29)
GSN	mayor	0,018*	0,65 (0,45 - 0,93)	mayor	0,036*	0,51 (0,27 - 0,97)
MKLN1	N/D			mayor	0,059	0,51 (0,25 - 1,04)
HSPB1	mayor	0,05	0,51 (0,26 - 1,01)	mayor	0,0037*	0,39 (0,2 - 0,75)
ANXA2	menor	0,19	1,23 (0,9 - 1,68)	menor	0,027*	2,25 (1,08 - 4,7)
TMOD3	N/D			mayor	0,054	0,48 (0,22 - 1,03)
THRAP3	N/D			menor	0,13	1,64 (0,87 - 3,09)
HMGA1	mayor	0,27	0,78 (0,49 - 1,22)	mayor	0,33	0,73 (0,38 - 1,39)
TRIM28	menor	0,0045*	1,57 (1,15 - 2,14)	menor	0,19	1,53 (0,81 - 2,87)
AHCTF1	N/D			menor	0,13	1,91 (0,81 - 4,52)
SPAST	N/D			menor	0,11	1,62 (0,89 2,94)
TOP1	N/D			menor	0,0056*	2,36 (1,26 - 4,41)
CBX3	menor	6,4E-4*	1,8 (1,28 - 2,53)	menor	0,051	2,11 (0,98 - 4,53)
RCC1	menor	2,4E-7*	2,3 (1,61 - 3,29)	menor	2,8E-4*	3,46 (1,7 - 7,07)
NPM1	N/D			mayor	0,059	0,28 (0,07 - 1,15)

Como se observa en la Figura 25 (paneles izquierdos), para la población de Sboner, los pacientes con PCa que expresan valores elevados del gen inducido por ácido retinoico (*RAI14*), el gen de la proteína reguladora de la condensación de la cromatina (*RCC1*) y testina (*TES*), presentan menor sobrevida (*P<0,05). En el set de datos de Ross-Adams, se puede apreciar el mismo patrón. En cambio, los genes gelsolina (*GSN*) y el gen de la proteína de replicación 1 (*RPA1*) se comportan de manera opuesta para ambos sets de datos. En el **Anexo II** se pueden apreciar todas las curvas de Kaplan-Meier tanto para la sobrevida como para el tiempo de recaída para cada gen, según su alta o baja expresión.

Resulta interesante que el gen *RCC1* que se encuentra significativamente sobre-expresado en el tumor primario respecto del tejido adyacente (*TCGA* y *Oncomine*) coincide con una caída en la sobrevida de los pacientes, como se muestra en la Figura 25. De igual manera, la pérdida de expresión de *GSN* en el tumor primario (*TCGA* y *Oncomine*) permite entender cómo los pacientes con baja expresión de este gen muestran menor sobrevida y tiempo de vida libre de recaída en los datos de Sboner y Ross-Adams.

Adicionalmente, utilizamos la plataforma *cBioPortal for Cancer Genomics* (www.cbioportal.org) con el fin de encontrar las alteraciones más comunes en PCa en los genes correspondientes a las proteínas del citoesqueleto. En el **Anexo III** se puede observar la presencia de mutaciones puntuales, amplificaciones génicas y deleciones en el grupo de genes de citoesqueleto analizados donde, de un total de 1.266 muestras analizadas, la amplificación es la alteración más frecuente para dichos genes asociados al citoesqueleto.

No observamos diferencias significativas al comparar la expresión de HO-1 en adenocarcinoma respecto de próstata normal (Oncomine) ni tejido normal adyacente (TCGA). Tampoco encontramos un cambio en la supervivencia total (Sboner *et. al*) ni en la supervivencia libre de recaída (Ross Adams *et al.*) asociada a su alta expresión.

Sobrevida (Sboner)

Recaída (Ross -Adams)

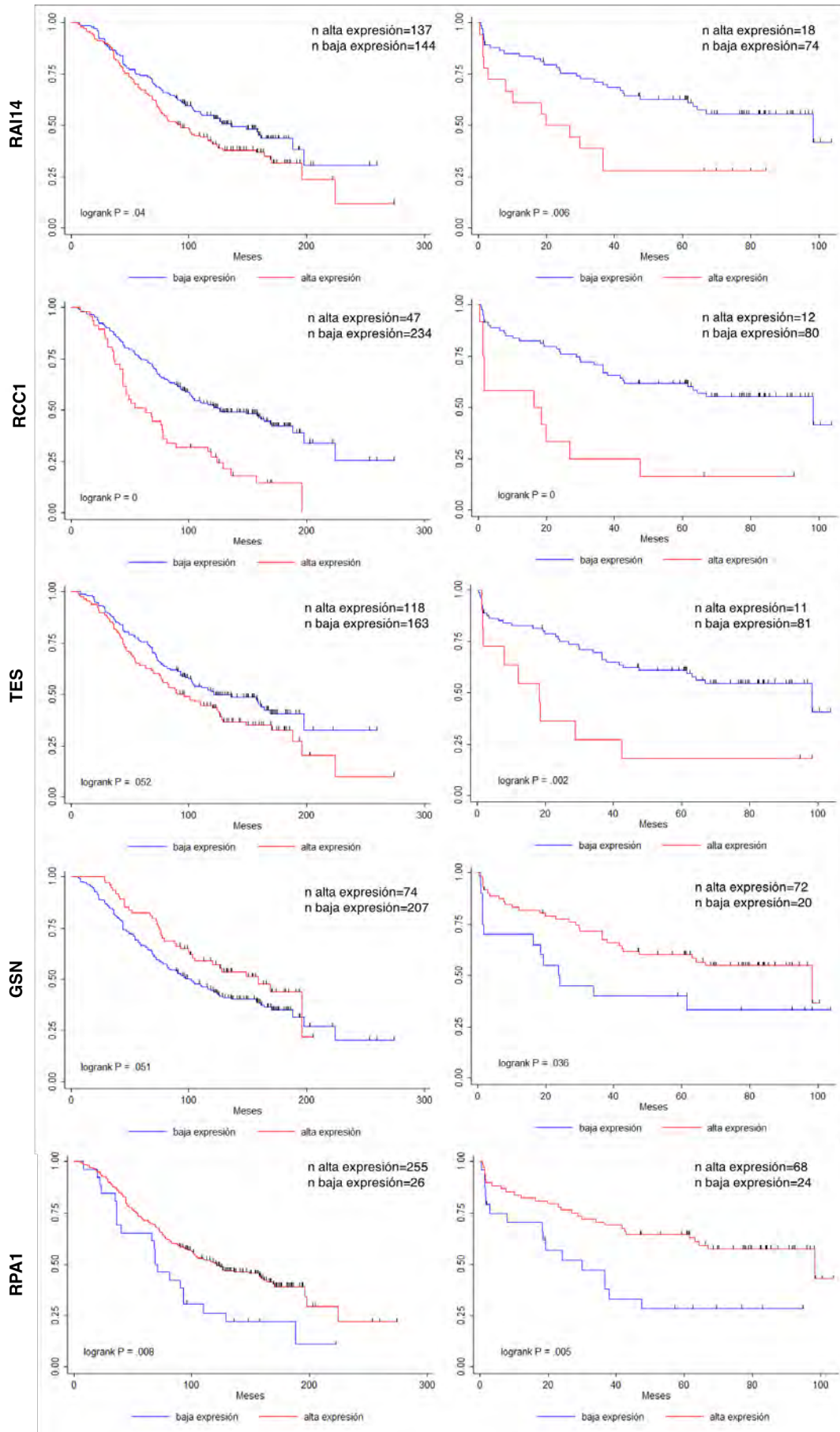


Figura 25. Curvas de supervivencia y tiempo de recaída para pacientes con alta o baja expresión de cada uno de los genes mencionados, utilizando las bases de datos Sboner ¹⁴⁵ y Ross-Adams ¹⁴⁶ respectivamente. Las curvas rojas corresponden a los pacientes con alta expresión y las curvas azules a los pacientes con baja expresión del gen indicado. Cada línea negra sobre las curvas representa un paciente que muere o recae, en el momento indicado. El valor del *logrank P* se muestra en cada gráfico y *n* representa la cantidad de pacientes por grupo.

En resumen, el meta-análisis realizado demostró que la mayoría de los **genes correspondientes a las proteínas del citoesqueleto asociadas a HO-1 no solo se encuentran significativamente desreguladas en PCa, sino que también se correlacionan con variaciones en el tiempo hasta la recaída y en el tiempo de supervivencia de los pacientes.**

PARTE III

LA MODULACIÓN DE HO-1 EN LÍNEAS DE PCa FAVORECE EL ESTABLECIMIENTO DE UN FENOTIPO MÁS ADHESIVO Y MENOS INVASIVO.

Con el fin de estudiar si la asociación entre HO-1 y proteínas implicadas en la integridad del citoesqueleto tenía un impacto en la dinámica del mismo, estudiamos diferentes parámetros que nos permitieran describir el potencial adhesivo y migratorio de las células. El tráfico intracelular y la localización celular de los componentes de las uniones adherentes en la superficie celular son clave durante estos procesos¹⁵⁴. Por tal motivo, evaluamos si HO-1 era capaz de modular los niveles de expresión y localización celular de dos proteínas históricamente asociadas a la transición EMT y el establecimiento de un fenotipo más invasivo como E-cadherina y β -catenina. Durante la desestabilización de las uniones adherentes, la E-cadherina es clivada en la membrana plasmática, posteriormente degradada y en consecuencia β -catenina se re-localiza desplazándose desde la membrana hacia el núcleo para ejercer un rol como factor de transcripción en la vía de *WNT* o es directamente degradada¹⁵⁵. Los resultados de la Figura 26 demuestran que tanto el tratamiento con hemina, inductor farmacológico específico de HO-1 como la sobre-expresión genética de esta proteína mediante transfecciones estables con el vector pcDNA3HO-1 en células PC3, se correlaciona con un aumento en los niveles totales de E-cadherina y β -catenina, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

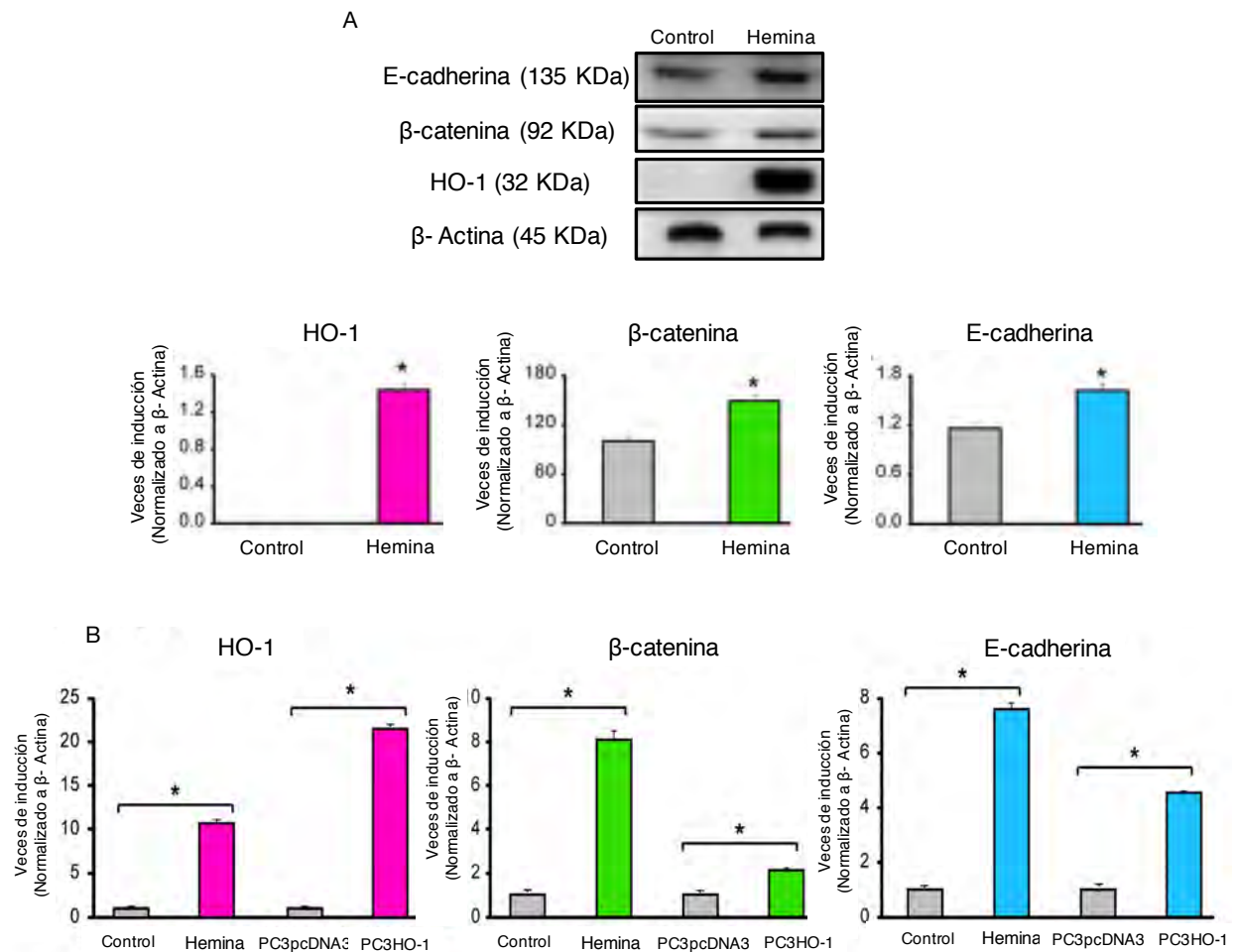


Figura 26. Expresión de HO-1, E-cadherina y β -catenina en células PC3 en diferentes condiciones experimentales. (A) Células PC3 fueron tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control. Se extrajeron proteínas totales y se determinó la expresión de HO-1, E-cadherina, β -catenina mediante *Western blot*. La cuantificación se realizó mediante un análisis de densitometría utilizando *Image J*. La intensidad de las bandas fue relativizada a las de β -actina. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes y las barras de error corresponden al desvío estándar (SD) (* $P < 0,05$). (B) Niveles de expresión de ARNm de HO-1, E-cadherina y β -catenina determinadas por RTqPCR en células PC3 tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control, o bien transfectadas con el vector pcDNA3HO-1 (PC3HO-1) o el vector vacío (pcDNA3). Los datos fueron relativizados a β -actina como gen de referencia en ambos casos y las barras de error corresponden al desvío estándar (SD). Se muestra una de tres repeticiones independientes (* $P < 0,05$)

Para determinar el rol de HO-1 *in vivo* evaluamos los niveles de ARNm de ambos genes a partir de tumores sobre-expresando HO-1 de manera estable que fueron previamente generados en nuestro laboratorio⁸⁵. Brevemente, para la generación de estos tumores se inyectaron $3,5 \times 10^6$ células PC3HO-1 o PC3pcDNA3 en el flanco derecho de ratones atímicos⁸⁵

y los tumores se extirparon a los 23 días post-inyección, se congelaron instantáneamente y se extrajo el ARN total. Los xenotransplantes PC3HO-1 muestran mayores niveles de ARNm tanto de E-cadherina como de β -catenina, analizados por RTqPCR (Figura 27).

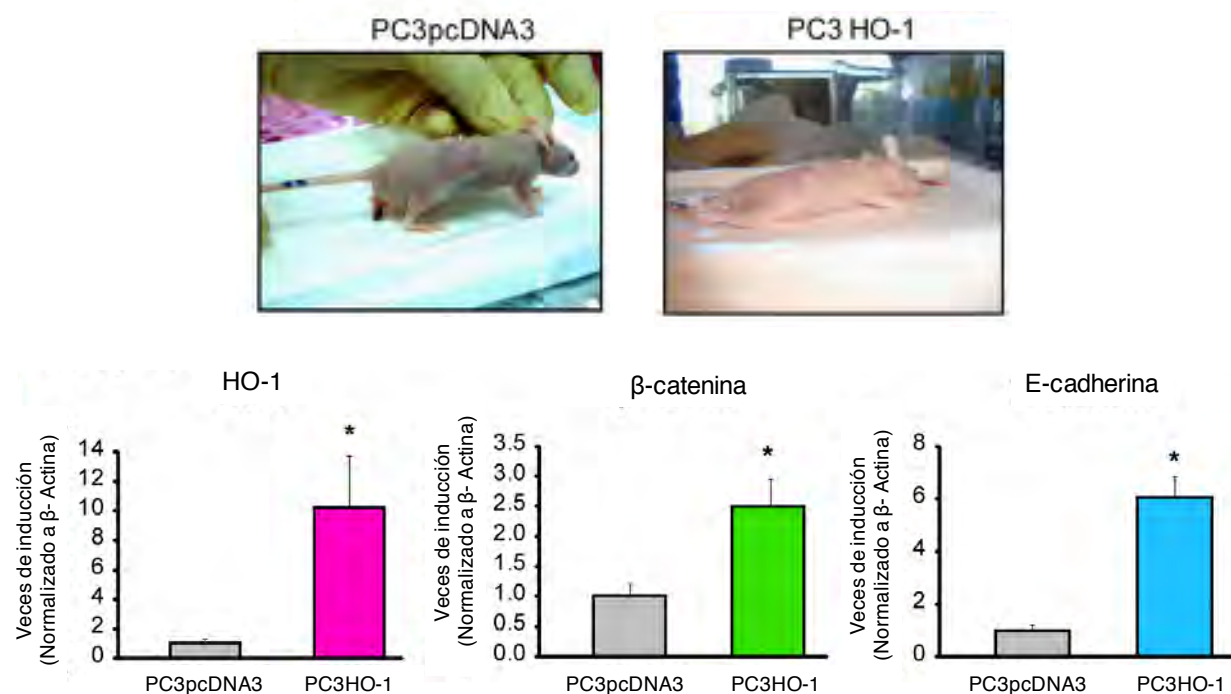


Figura 27. Expresión de HO-1, E-cadherina y β -catenina bajo inducción genética de HO-1 *in vivo*. Ratones atímicos *nude* (*nu/nu*) fueron inyectados de manera subcutánea en el flanco derecho con células PC3 sobre-expresando HO-1 (PC3HO-1) o control (pcDNA3). Los animales fueron sacrificados luego de 23 días y los tumores fueron extirpados, congelados en nitrógeno líquido y procesados para el aislamiento de ARN. Se determinaron los niveles de expresión de ARNm de HO-1, E-cadherina y β -catenina por RTqPCR. Los datos fueron relativizados a β -actina como gen de referencia. Las barras de error representan el desvío estándar. Se muestra uno de tres repeticiones independientes (*P < 0,05).

Considerando que previamente habíamos demostrado que estos tumores de PCa exhibían un menor tamaño, menor índice mitótico y menores niveles de expresión y actividad de MMP9⁸⁵, **el conjunto de resultados presentados en esta sección confirma que HO-1 modula las moléculas de adhesión *in vitro* e *in vivo*, respaldando su participación en los procesos de adhesión celular.**

Como fue mencionado anteriormente, las uniones adherentes estabilizadas por E-cadherina juegan un rol dual en la integridad del epitelio y el mantenimiento de la homeostasis¹⁵⁶. Para comprender mejor la naturaleza de las alteraciones en las interacciones célula-célula durante

la evolución neoplásica evaluamos la expresión de E-cadherina y β -catenina bajo sobreexpresión de HO-1 en líneas tumorales prostáticas. La localización de E-cadherina reveló un aumento significativo de la intensidad en los bordes célula-célula bajo tratamiento con hemina comparado con un patrón de marcación más difuso observado en células control (Figura 28). La posterior cuantificación de la intensidad de marcación confirmó el aumento en los niveles de la relación E-cadherina en membrana/E-cadherina total cuando las células PC3 habían **A** o expuestas a hemina (* $P < 0,05$). Análogamente, la expres **B** de β -catenina y su distribución celular visualizada por inmunofluorescencia también mostraron los mismos patrones de marcación revelando la re-localización hacia la membrana celular respecto de los niveles intracelulares bajo inducción farmacológica de HO-1 (Figura 28).

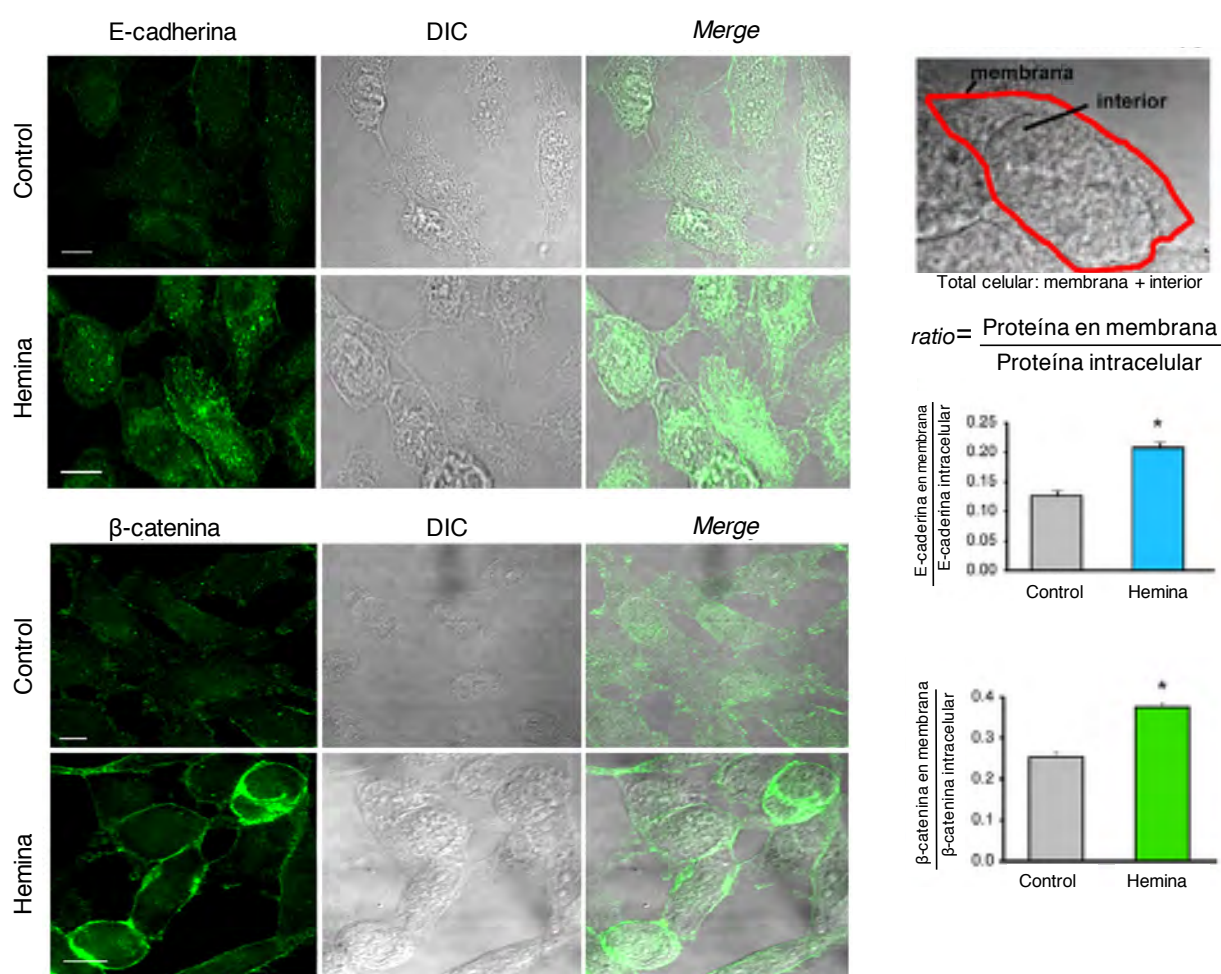


Figura 28. La expresión y distribución celular de E-cadherina y β -catenina (A) Inmunofluorescencia en células PC3 tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS (control). Se muestra una imagen representativa de cada grupo, obtenida por microscopía confocal (60X, escala: 10 μ m). (B) Se realizó una segmentación de la membrana plasmática (rojo) y el interior celular y se determinó la intensidad de E-cadherina y β -catenina en la membrana plasmática

y la totalidad de la célula, calculándose la relación (*ratio*) entre Proteína en membrana/Proteína intracelular. Las barras de error representan el desvío estándar (*P<0,05).

Con el fin de evaluar las regiones de contacto célula-célula en detalle, exploramos las uniones adherentes entre células vecinas mediante una tinción simultánea con β -catenina y vimentina (Figura 29 A). El análisis cuantitativo reveló no solo una extensa red de filopodios, sino también un aumento del porcentaje de contacto entre células PC3 vecinas expuestas al tratamiento con hemina (Figura 29 B y C). Estos resultados se observaron tanto en células PC3 como en células LNCaP (datos no mostrados).

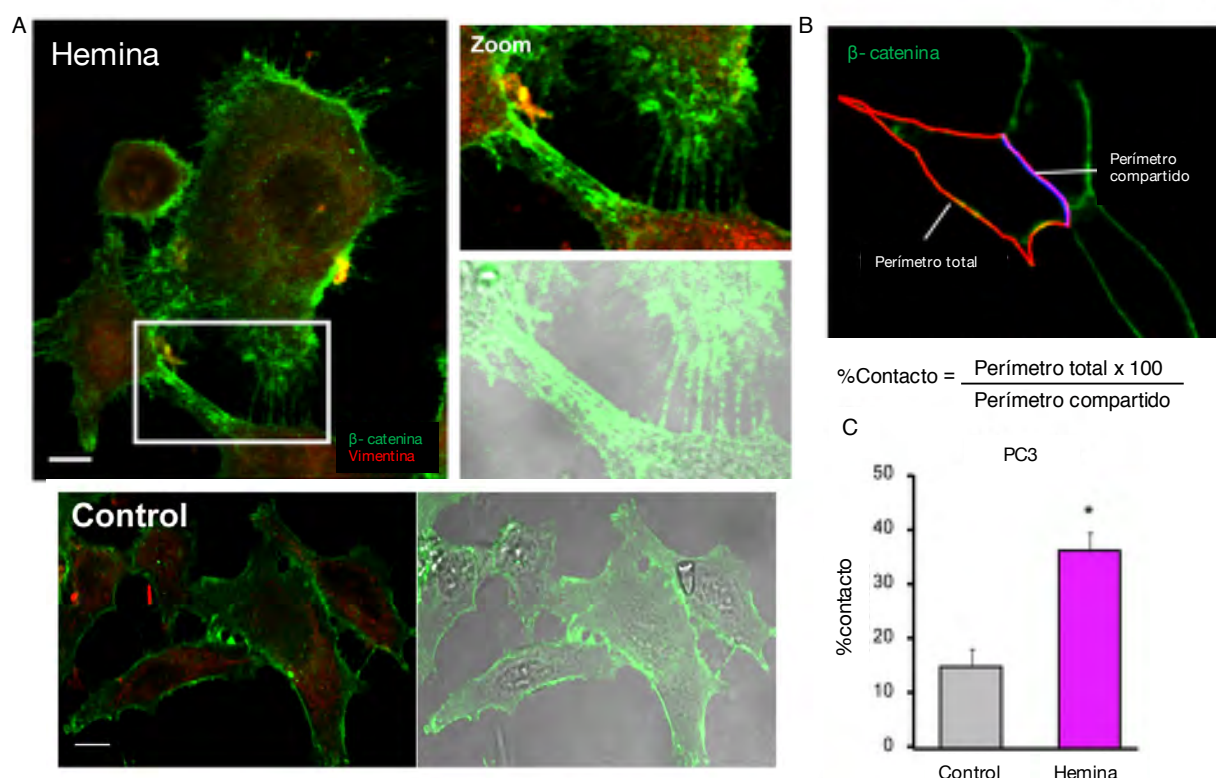


Figura 29. Expresión y distribución celular de β -catenina en células PC3. (A) La expresión de β -catenina (verde) fue visualizada por inmunofluorescencia en células PC3 tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS (control). Se muestra una imagen representativa de cada grupo obtenida por microscopía confocal (60X, escala: 10 μ m). Se utilizó DAPI (azul) como marca nuclear y vimentina (rojo) como marca citoplasmática. Los recuadros blancos señalan las áreas analizadas. (B) Se realizó una segmentación del perímetro celular (rojo) y del perímetro compartido (violeta), y se calculó el porcentaje de contacto (perímetro compartido x 100/ perímetro total). (C) Porcentaje de contacto en células PC3 tratadas o no con hemina. Se muestra uno de tres experimentos independientes (n> 10 células por condición, *P<0,05).

Para confirmar que el efecto observado sobre E-cadherina y β -catenina, tanto en su expresión como en su localización celular se debía específicamente a la sobre-expresión de HO-1, silenciamos HO-1 mediante el uso de un ARN pequeño de interferencia (siHO-1) para el gen *HMOX1*, o bien un siRNA inespecífico como control (siRNA *scrambled*). La Figura 30 confirma la efectividad del silenciamiento, mostrando la disminución significativa de HO-1 tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína.

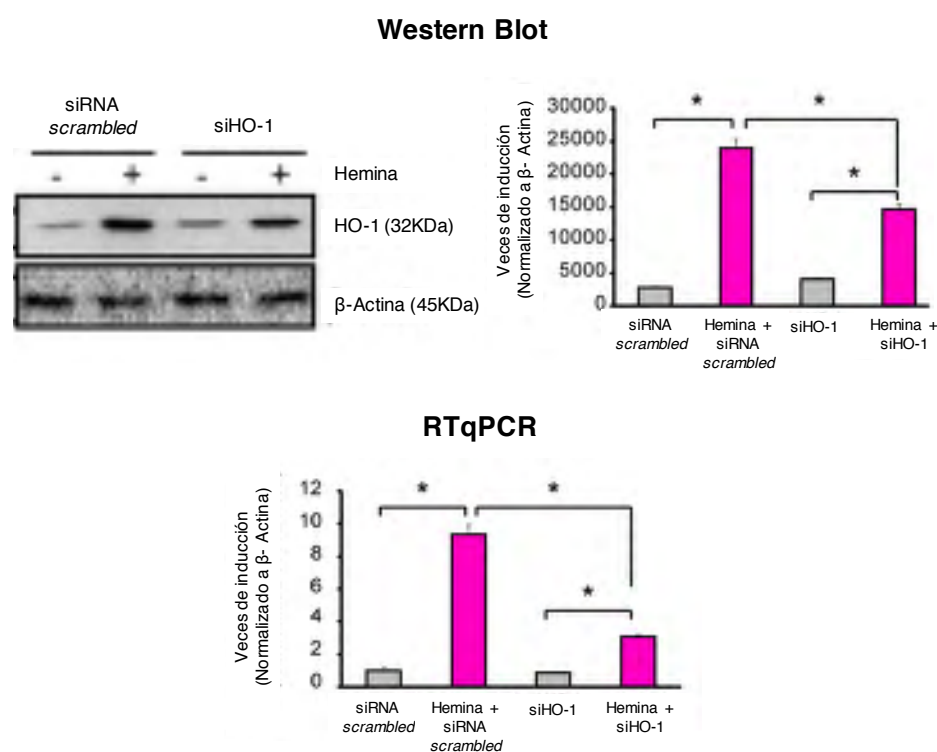


Figura 30. Silenciamiento de *HMOX1* en células PC3. Células PC3 fueron tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control y transfectadas con un siRNA específico para *HMOX1* (siHO-1) o bien un siRNA control (*scrambled*). Se extrajeron proteínas totales y ARN, y se determinó la expresión de HO-1 mediante *Western blot* y RTqPCR, respectivamente. Se utilizó β -actina como control de carga en ambos casos y el análisis de densitometría se realizó con *Image J*. Se muestra uno de tres experimentos independientes (* $P < 0,05$).

Los niveles proteicos de E-cadherina y β -catenina se vieron atenuados al silenciar HO-1 en células PC3 (Figura 31).

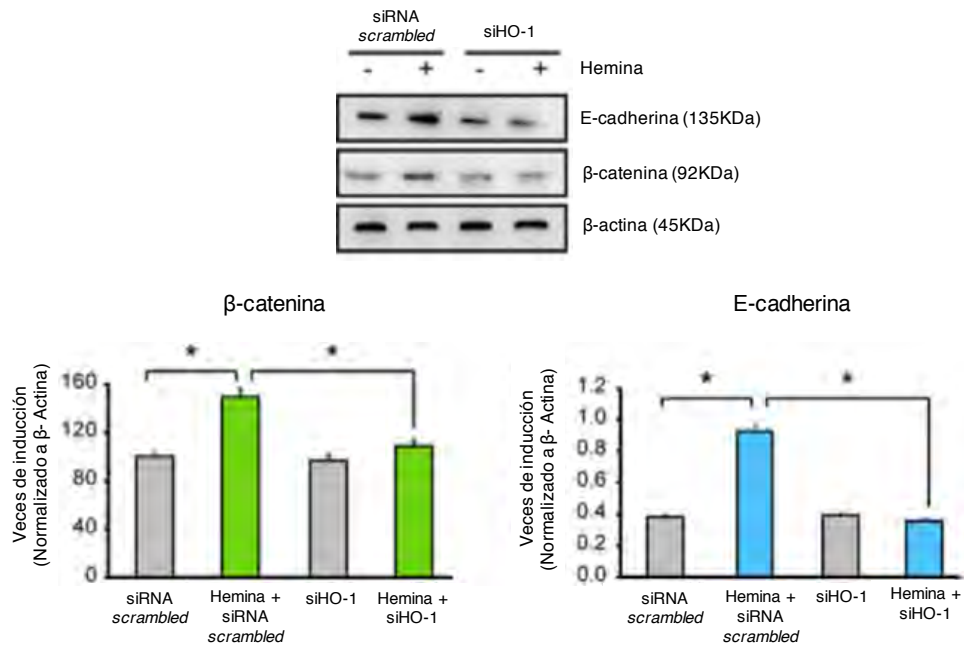
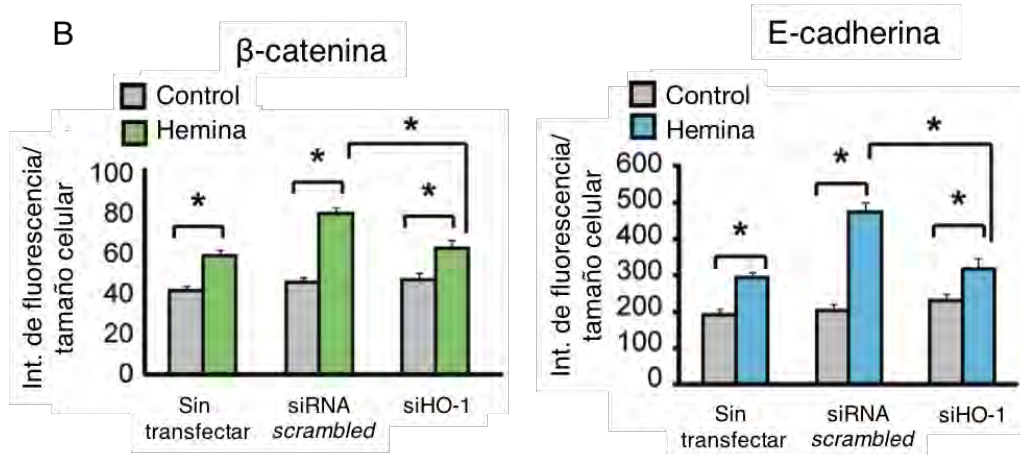
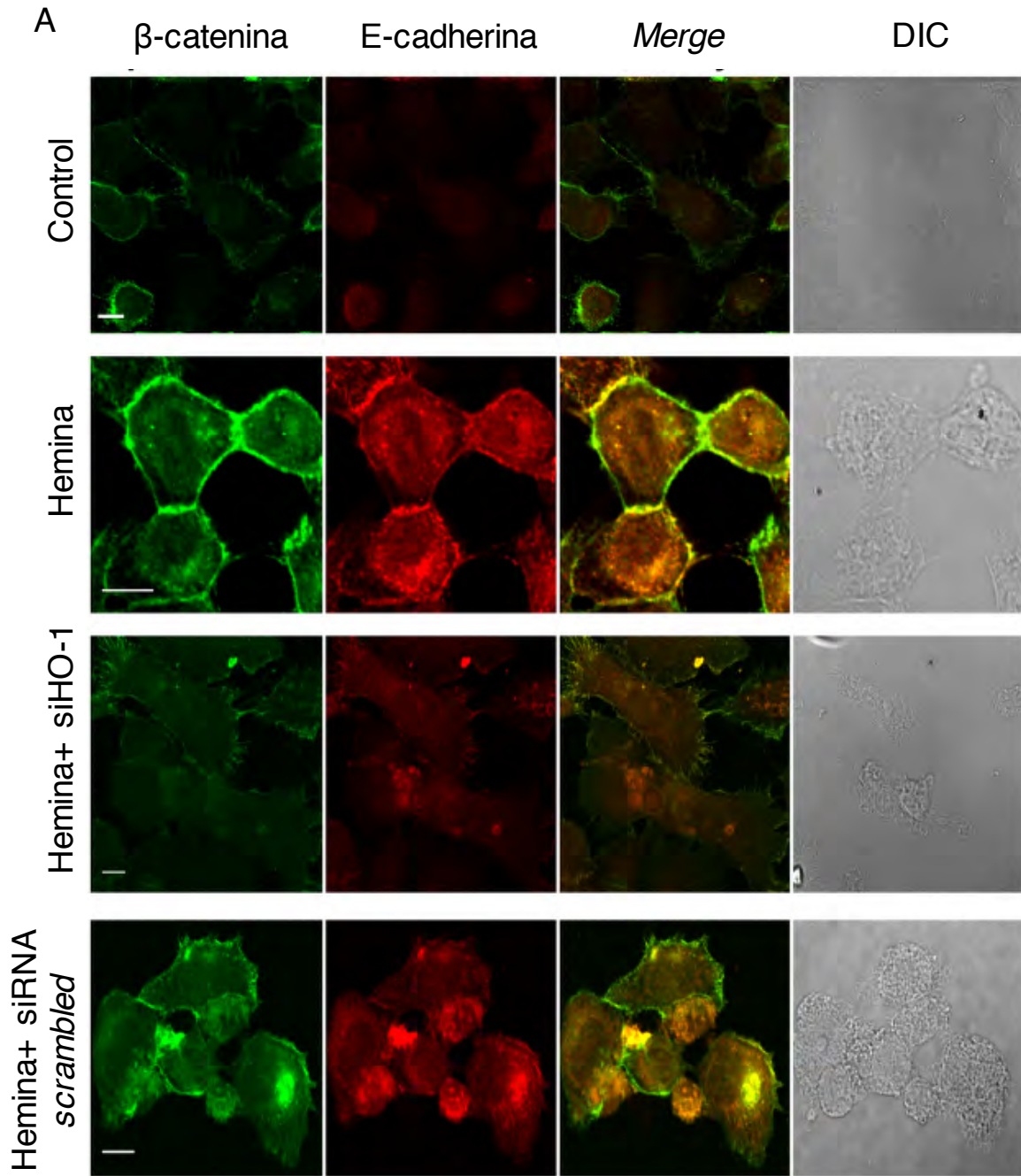


Figura 31. Expresión de E-cadherina y β -catenina en células luego del silenciamiento de HO-1. Células PC3 fueron tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control y transfectadas con un siRNA específico para *HMOX1* (siHO-1) o bien un siRNA control (*scrambled*). Se extrajeron proteínas totales y se determinó la expresión de E-cadherina, β -catenina mediante *Western blot*. Se utilizó β -actina como control de carga. La cuantificación se realizó mediante un análisis de densitometría utilizando *Image J*. La intensidad de las bandas fue relativizada a las de β -actina. Se muestra uno de tres experimentos independientes (* $P < 0,05$).

Imágenes obtenidas por microscopía confocal confirmaron las observaciones de la Figura 31 (Figura 32 A y B). Células PC3 doblemente marcadas contra E-cadherina y β -catenina mostraron no solo un aumento en los niveles de ambas moléculas de adhesión bajo sobre-expresión de HO-1 (Figura 32 C), sino que también evidenciaron un incremento de las mismas en la periferia celular con un mayor porcentaje de contacto celular (Figura 32 D). El silenciamiento de HO-1 mediante el siRNA se tradujo en una reducción significativa en la expresión de E-cadherina y β -catenina (Figura 32 A y B), así como también en una menor localización en membrana (Figura 32 C) y una disminución del contacto celular (Figura 32 D).



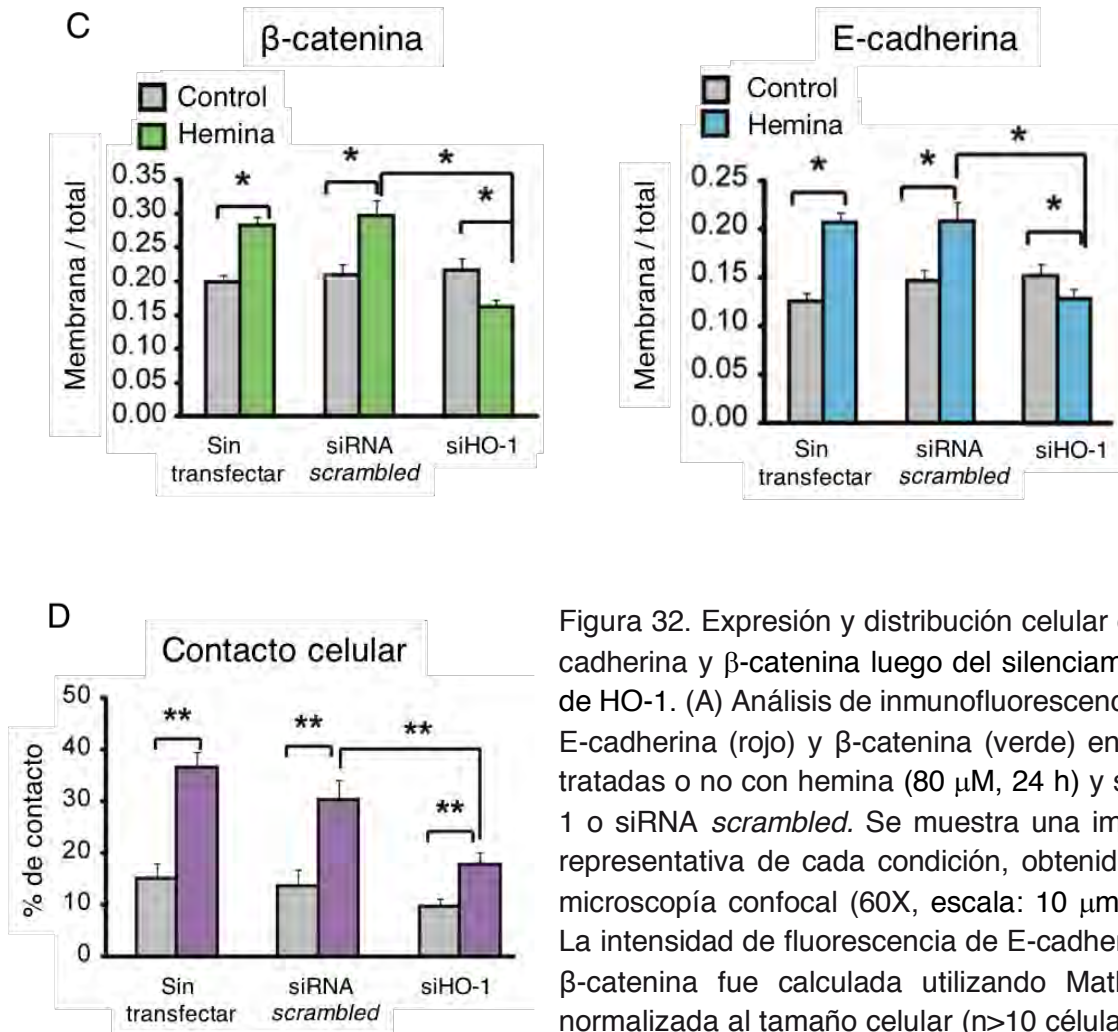


Figura 32. Expresión y distribución celular de E-cadherina y β -catenina luego del silenciamiento de HO-1. (A) Análisis de inmunofluorescencia de E-cadherina (rojo) y β -catenina (verde) en PC3 tratadas o no con hemina (80 μ M, 24 h) y siHO-1 o siRNA *scrambled*. Se muestra una imagen representativa de cada condición, obtenida por microscopía confocal (60X, escala: 10 μ m). (B) La intensidad de fluorescencia de E-cadherina y β -catenina fue calculada utilizando Matlab y normalizada al tamaño celular ($n > 10$ células por condición, * $P < 0,05$). (C) Se realizó una segmentación de la membrana plasmática y el interior celular. Se determinó la intensidad de E-cadherina y β -catenina en ambas regiones y se calculó la relación Proteína en membrana/Proteína total (* $P < 0,05$). (D) El porcentaje de contacto fue calculado para células individuales como Perímetro compartido $\times 100$ /Perímetro total ($n > 15$ células por condición, * $P < 0,05$). Las barras de error corresponden al desvío estándar.

En conjunto, estos datos sugieren que la expresión y localización celular de las proteínas involucradas en las uniones adherentes de las células, son reguladas por HO-1, proponiendo un rol para esta proteína en las interacciones célula-célula que mantienen la arquitectura celular.

Con estos resultados, decidimos evaluar si este aumento en el área de contacto guardaba relación con la migración celular. Realizamos un ensayo de herida mediante el cual pudimos determinar el área explorada por células individuales tanto en la situación control como bajo

el tratamiento con hemina. Luego de determinar el área explorada promedio con el conjunto de datos obtenidos para ambas condiciones experimentales, pudimos observar que las células tratadas con hemina recorrían un área menor al área promedio y realizaban trayectorias más erráticas que las células control (Figura 33).

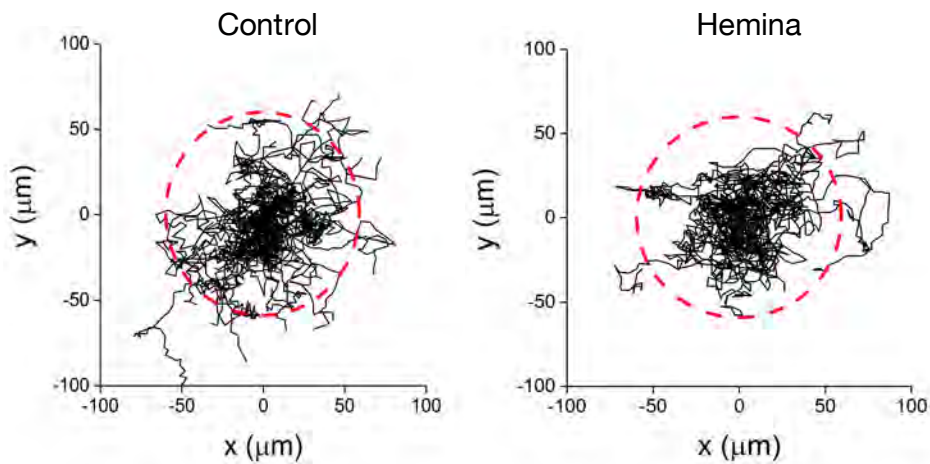


Figura 33. Área explorada bajo inducción de la expresión de HO-1. Células PC3 tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control fueron cultivadas hasta alcanzar una monocapa. Luego se realizó una herida lineal a lo largo de la placa de cultivo. Se tomaron imágenes de las heridas cada 20 min. Se muestra una trayectoria representativa de una célula individual control (panel izquierdo) o tratada con hemina (panel derecho). Los círculos con líneas punteadas rojas representan el área explorada promedio por todas las células PC3 luego de 18 h de realizada la herida.

En concordancia con este resultado, podemos observar que, si bien el desplazamiento cuadrado medio de la totalidad de las células analizadas aumenta en función del tiempo para ambas condiciones, luego de 10 h de realizada la herida, el desplazamiento medio disminuye significativamente en aquellas células que sobre-expresan HO-1 (Figura 34).

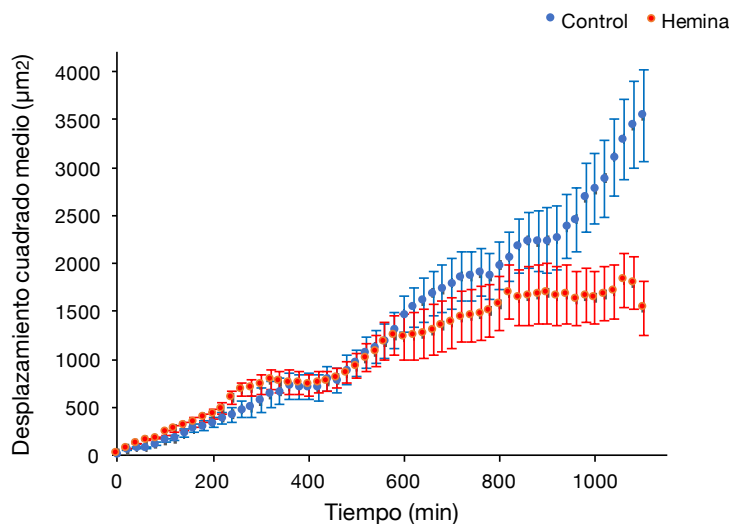


Figura 34. Desplazamiento cuadrado medio en función del tiempo de células PC3 tratadas o no con hemina (80 μM , 24 h). Cada punto representa el desplazamiento cuadrado medio \pm error estándar obtenido para 70 y 78 trayectorias de las células tratadas con hemina o PBS como control, respectivamente.

Para comprender si la disminución del desplazamiento afecta las interacciones celulares, decidimos estudiar la distancia a la célula más cercana o primer vecino en células PC3 tratadas con hemina (80 μM , 24 h) o células control. Para ello establecimos una colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Valeria Levi, la Dra. Luciana Bruno y la Dra. Carla Pallavicini (FCEyN, UBA), quienes diseñaron los algoritmos adecuados para cuantificar dichas interacciones.

Para el análisis, se midió la distancia entre células individuales o a un grupo de células (*cluster*). En los paneles superiores de la Figura 35 se puede apreciar una imagen representativa de las células (izquierda) y la misma imagen esquematizada (derecha), donde las líneas blancas representan las distancias célula- célula o célula-*cluster* (círculos naranjas). La distancia al primer vecino se muestra con una línea roja. Se consideró un $n=2.200$ distancias y estas fueron normalizadas al radio celular promedio. El panel inferior de la Figura 35 muestra la distribución de las distancias al primer vecino y revela que las células de PCa bajo inducción de HO-1 exhiben una mayor probabilidad de encontrar al primer vecino a distancias menores que las células control.

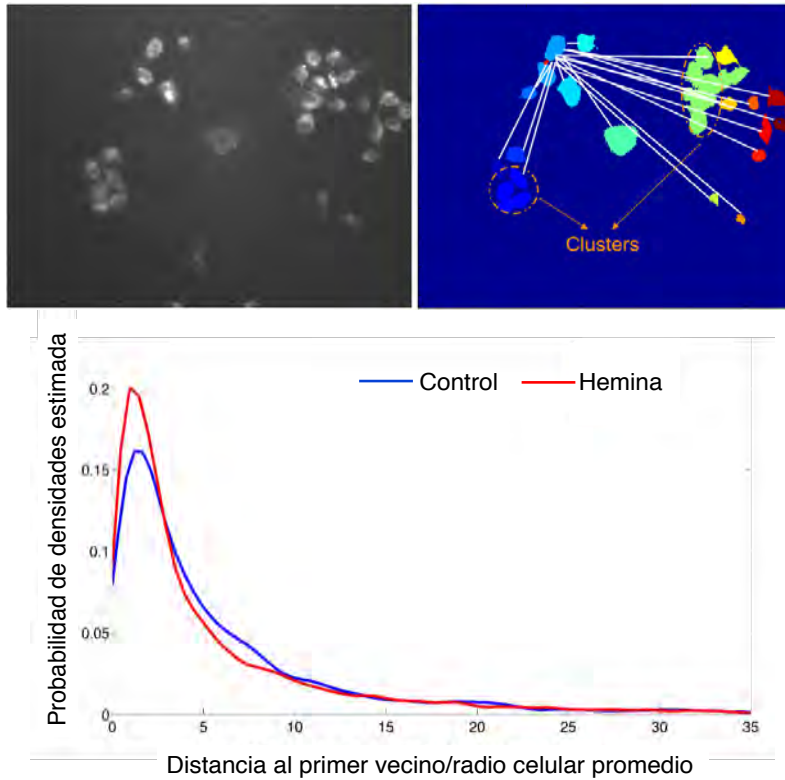


Figura 35. Células PC3 fueron tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control. El panel superior izquierdo muestra una imagen representativa obtenida por microscopía de fluorescencia (10X). El panel derecho esquematiza las distancias tomadas de una célula a otra u otro *cluster* de células (líneas blancas), los cuales se muestran agrupados en naranja. La distancia al primer vecino se muestra con una línea roja. Las distancias fueron normalizadas al radio celular promedio. El panel inferior muestra la distribución de las distancias al primer vecino ($n > 2.200$ primeros vecinos para cada condición).

Para determinar si este comportamiento era acompañado por cambios en los componentes del citoesqueleto, y considerando que previamente habíamos observado un aumento en el número de filopodios y contacto celular de manera cualitativa bajo inducción de HO-1 (Figura 29), decidimos evaluar de manera cuantitativa el número de filopodios tanto en células individuales como los contactos entre células vecinas, nuevamente en colaboración con la Dra. Valeria Levi, la Dra. Luciana Bruno y la Dra. Carla Pallavicini. La cuantificación de los filopodios se realizó determinando el perfil de intensidades por célula individual y entre células vecinas, descartando las zonas de contacto directo, como se detalla en la sección 13 de Materiales y métodos. En el panel izquierdo de la Figura 35 se esquematiza un perfil de intensidades de señal, donde cada “pico”, señalado con una punta de flecha, es identificado posteriormente como un filopodio individual mediante un algoritmo especialmente diseñado para contar contactos¹⁴⁸. El panel A de la Figura 36 muestra dos imágenes representativas de células PC3 marcadas con rodamina-faloidina, en cada condición experimental.

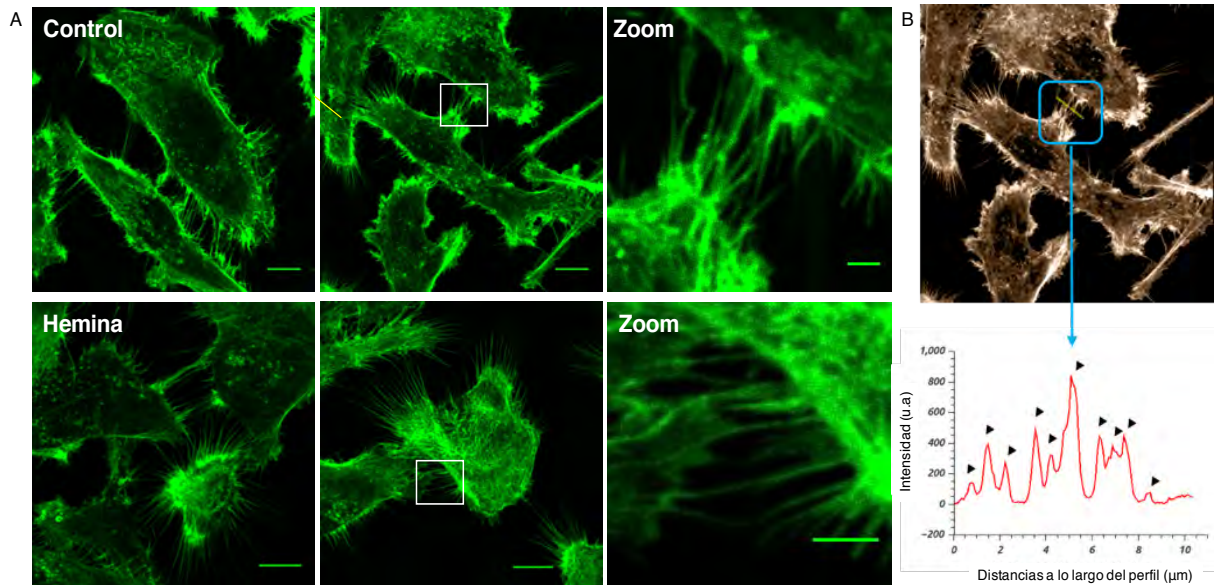


Figura 36. Células PC3 fueron tratadas con hemina (80 μM , 24 h) o PBS como control y teñidas con rodamina-faloïdina para marcar F-actina (verde). (A) Se muestran dos imágenes representativas de cada grupo obtenidas por microscopía confocal (60X, escala: 10 μm). (B) El recuadro blanco señala áreas analizadas (escala: 2 μm). La línea amarilla del panel izquierdo ejemplifica una zona equidistante entre células (recuadro azul) donde se estableció un perfil de intensidades de señal detectada. Cada pico señalado con una punta de flecha corresponde a un pico de intensidad, identificado como un filopodio utilizando un algoritmo diseñado para contabilizar filopodios (Matlab).

Se observa un aumento en el número de contactos entre células vecinas y en el total de filopodios en cada célula individual analizada, bajo tratamiento con hemina respecto a las células control. (Figura 37).

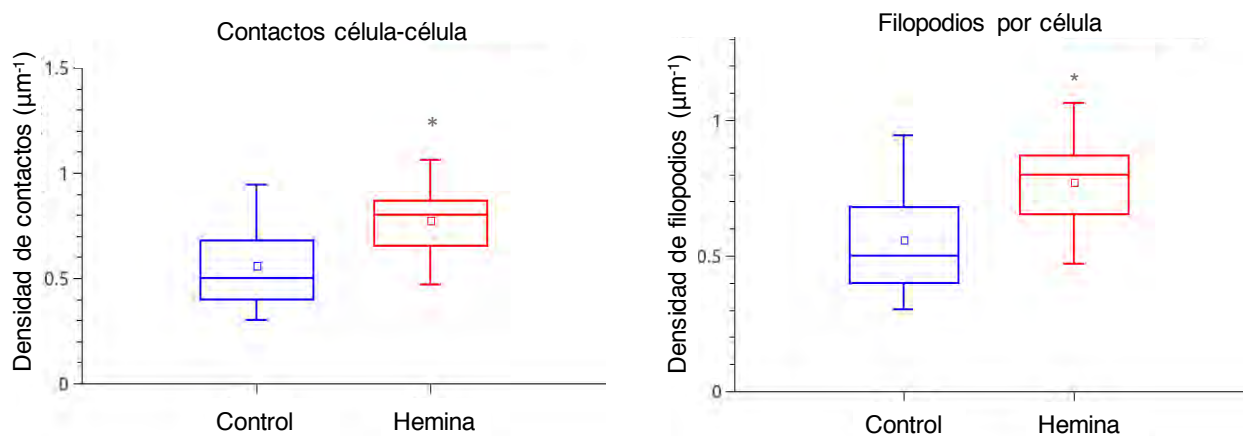


Figura 37. *Boxplots* comparando los contactos célula-célula y los filopodios por célula individual, en células PC3 tratadas con hemina (80 μM , 24 h) o PBS como control ($n > 90$ células para cada condición; $*P < 0,001$). La densidad de filopodios por célula individual fue

medida trazando un perfil de intensidades alrededor del perímetro celular y evaluando el número de filopodios por unidad de longitud.

Las células metastásicas utilizan estructuras de tipo invadopodios para degradar la matriz MEC e invadir. Para descartar que las estructuras observadas fueran invadopodios, prolongaciones celulares similares a lamelipodios, observamos si había tinción positiva para MMP9 en estas estructuras del citoesqueleto. Las metaloproteasas, en especial la MMP9, han sido implicadas en la migración e invasión tumoral, y las estructuras de tipo invadopodio suelen presentar alta expresión de MMPs¹⁵⁷. En la Figura 38 comprobamos la ausencia de MMP9 en dichas estructuras, confirmando que las prolongaciones celulares aumentadas no eran invadopodios.

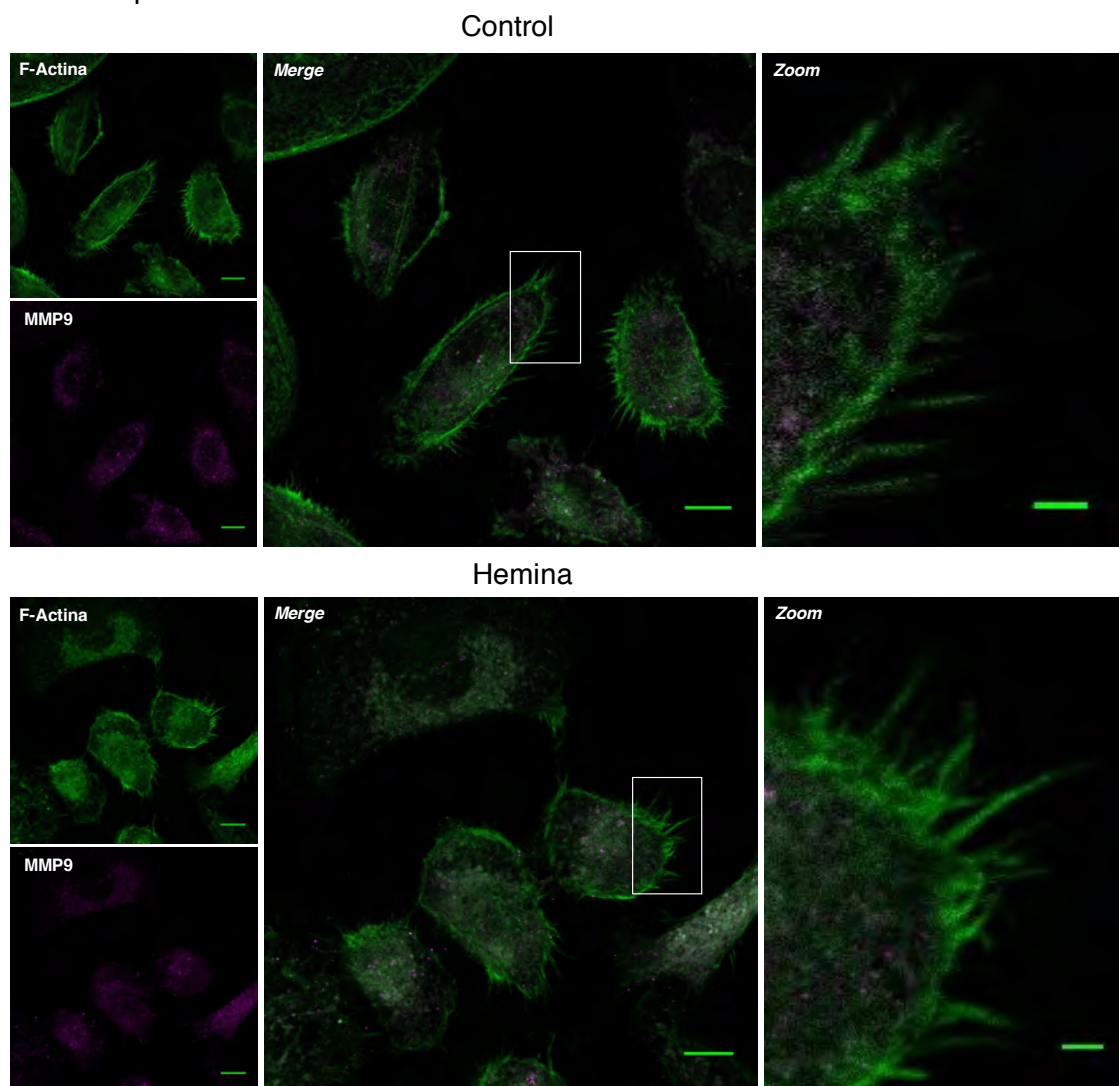


Figura 38. La distribución celular de MMP9 (magenta) y F-actina (verde) fue visualizada por inmunofluorescencia en células PC3 tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS (control). Se

muestra una imagen representativa de cada grupo, obtenida por microscopía confocal (60X, escala: 10 μm). Los recuadros blancos señalan las áreas analizadas (escala: 2 μm).

Con el fin de evaluar si el aumento de los filopodios y contactos celulares correspondía específicamente a la sobre-expresión de HO-1, repetimos el análisis en células PC3 luego de silenciar el gen *HMOX1*. Dados los bajos niveles basales de la proteína en esta línea celular, las células PC3 fueron tratadas con hemina 80 μM durante las 24 h previas a la transfección con un siRNA específico para HO-1. Luego de verificar mediante *Western Blot* la inducción de la expresión de HO-1 por tratamiento con hemina y su posterior silenciamiento por transfección con el siRNA (Figura 39), repetimos la cuantificación de filopodios como se describió previamente.

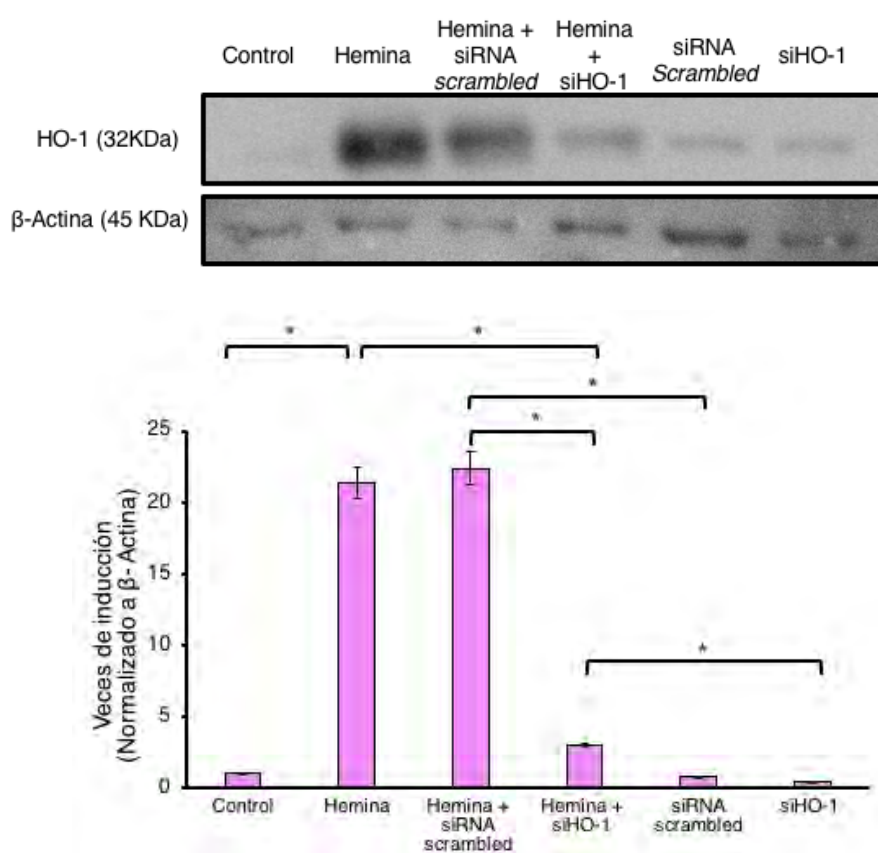


Figura 39. Células PC3 fueron tratadas con hemina (80 μM , 24 h) o PBS como control y transfectadas con un siRNA específico para *HMOX1* (siHO-1) o bien con un siRNA control (*scrambled*). Se extrajeron proteínas totales y se determinó la expresión de HO-1 mediante *Western blot*. Se utilizó β -actina como control de carga en ambos casos y el análisis de densitometría se realizó con *Image J*. Se muestra uno de tres experimentos independientes (* $P < 0,05$).

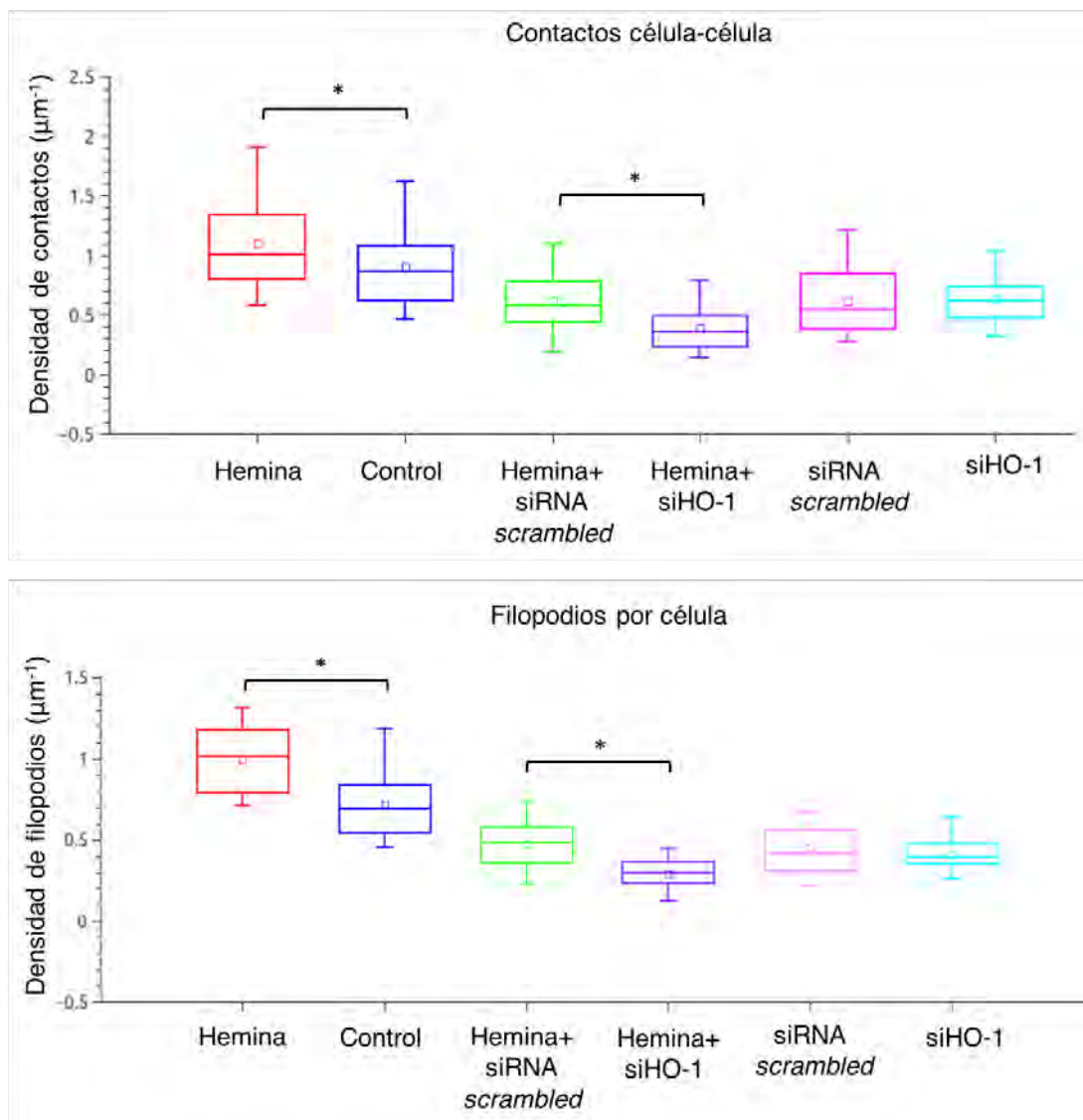


Figura 40. *Boxplots* comparando la densidad de contactos célula-célula (panel superior, $n > 30$ áreas de contacto) y de filopodios por célula individual (panel inferior, $n > 20$ células) para las diferentes condiciones experimentales en PC3. La cuantificación de filopodios fue realizada como se explicó anteriormente en la Figura 36 ($*P < 0,05$).

La Figura 40 muestra cómo las células PC3 con expresión disminuida de HO-1 exhiben una reducción significativa de ambos parámetros analizados (*boxplots* verdes vs. violetas), confirmando así la participación de HO-1 en el aumento de filopodios tanto en células individuales como entre células vecinas. En paralelo, se descartó que existiera una correlación negativa entre la distancia y los contactos celulares para todas las condiciones (Figura 41).

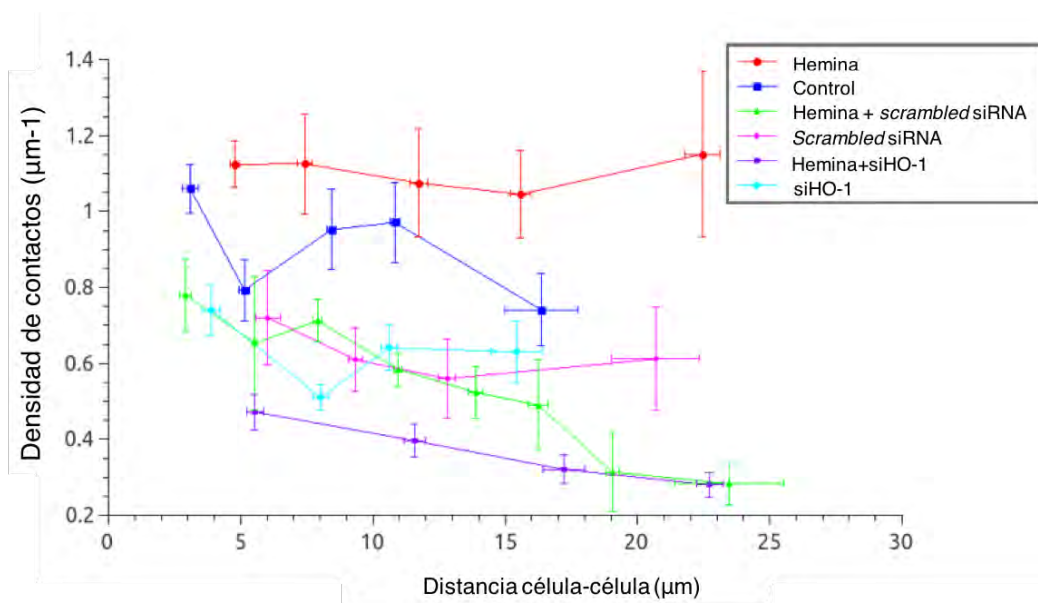


Figura 41. Densidad de contactos célula-célula vs. distancia entre células. Se contabilizó el número de contactos entre células y se obtuvo una densidad lineal computando el número de contactos por unidad perpendicular de distancia. Cada punto representa la densidad de contactos promedio para cada distancia evaluada \pm error estándar ($n > 30$ regiones de contacto para cada condición experimental, $*P < 0,001$)

A la luz de estos resultados, evaluamos si HO-1 se localizaba en estas protrusiones celulares. Como se puede observar en la Figura 42, el tratamiento con hemina muestra un aumento en la expresión de HO-1 tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células pero no reveló presencia de la misma en las estructuras de tipo filopodios. Esta observación nos permite inferir que **el rol de HO-1 en la regulación de los filopodios es probablemente ejercido mediante la interacción con otras proteínas reguladoras de estos filamentos.**

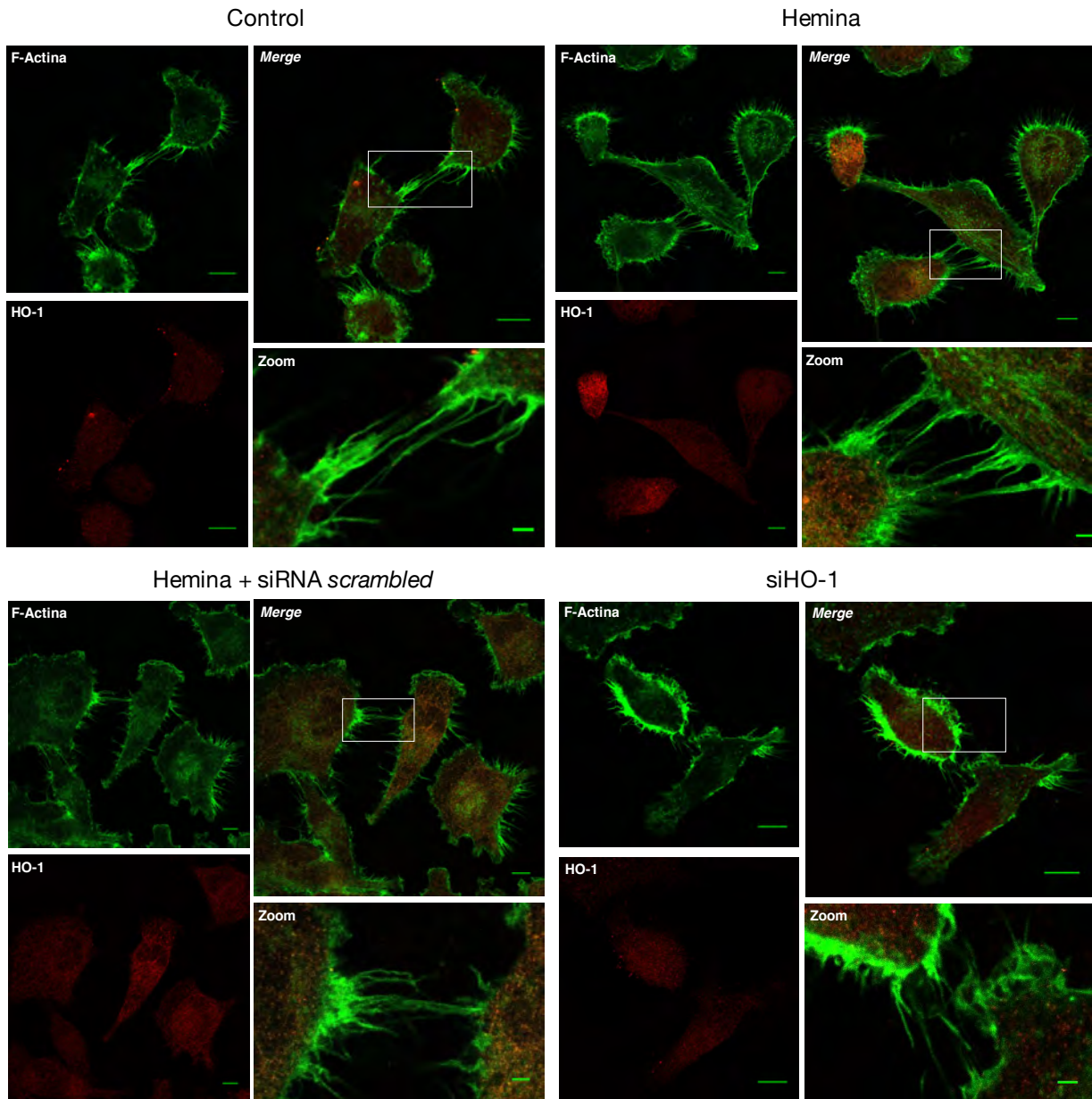


Figura 42. La localización celular de HO-1 (rojo) y F-actina (verde) fue visualizada por inmunofluorescencia en células PC3 tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS (control) y transfectadas con un siRNA específico para *HMOX1* (siHO-1) o bien un siRNA control (*scrambled*). Se muestra una imagen representativa de cada grupo, obtenida por microscopía confocal (60x, escala: 10 μ m). Los recuadros blancos señalan las áreas analizadas (escala: 2 μ m).

Dado que las células PC3 tienen un comportamiento metastásico osteolítico, decidimos estudiar si el efecto observado sobre las protrusiones celulares se repetía en una línea celular con reacción osteoblástica cuando es implantada en el hueso. Se utilizó la línea metastásica

C4-2B, derivada de la línea LNCaP^{158,159}. Dado que la expresión de HO-1 en esta línea celular es muy similar a la expresión en PC3, el análisis se realizó bajo las mismas condiciones experimentales anteriormente mencionadas, luego de confirmar la inducción de la expresión de HO-1 por tratamiento con hemina y el silenciamiento del gen 48 h posteriores a la transfección con el siRNA específico (Figura 43).

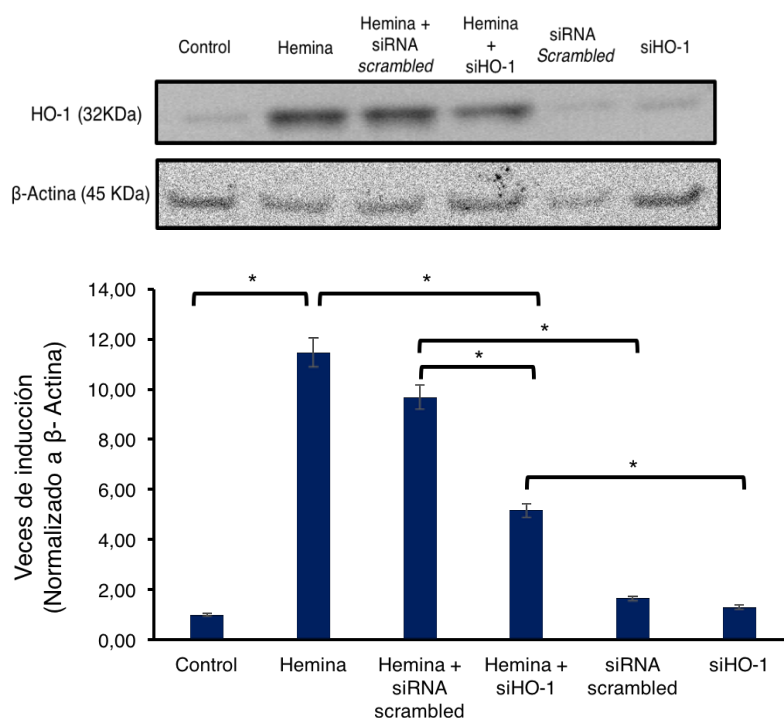


Figura 43. Células C4-2B fueron tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control y transfectadas con un siRNA específico para *HMOX1* (siHO-1) o bien un siRNA control (*scrambled*). Se extrajeron proteínas totales y se determinó la expresión de HO-1 mediante *Western blot*. Se utilizó β -actina como control de carga en ambos casos y el análisis de densitometría se realizó con *Image J*. Se muestra uno de tres experimentos independientes. (* $P < 0,05$).

Al igual que lo observado con la línea osteolítica, las células C4-2B exhibieron un aumento significativo en el número de contactos celulares y en la densidad de filopodios al inducir la expresión de HO-1 mediante el tratamiento con hemina (Figura 44, *boxplots* rojos vs. azules). Sin embargo, el silenciamiento de HO-1 afectó únicamente la densidad de contactos, ya que no se observaron diferencias significativas en el número de filopodios por célula al disminuir la expresión de dicha proteína (Figura 44, *boxplots* verdes vs. violetas).

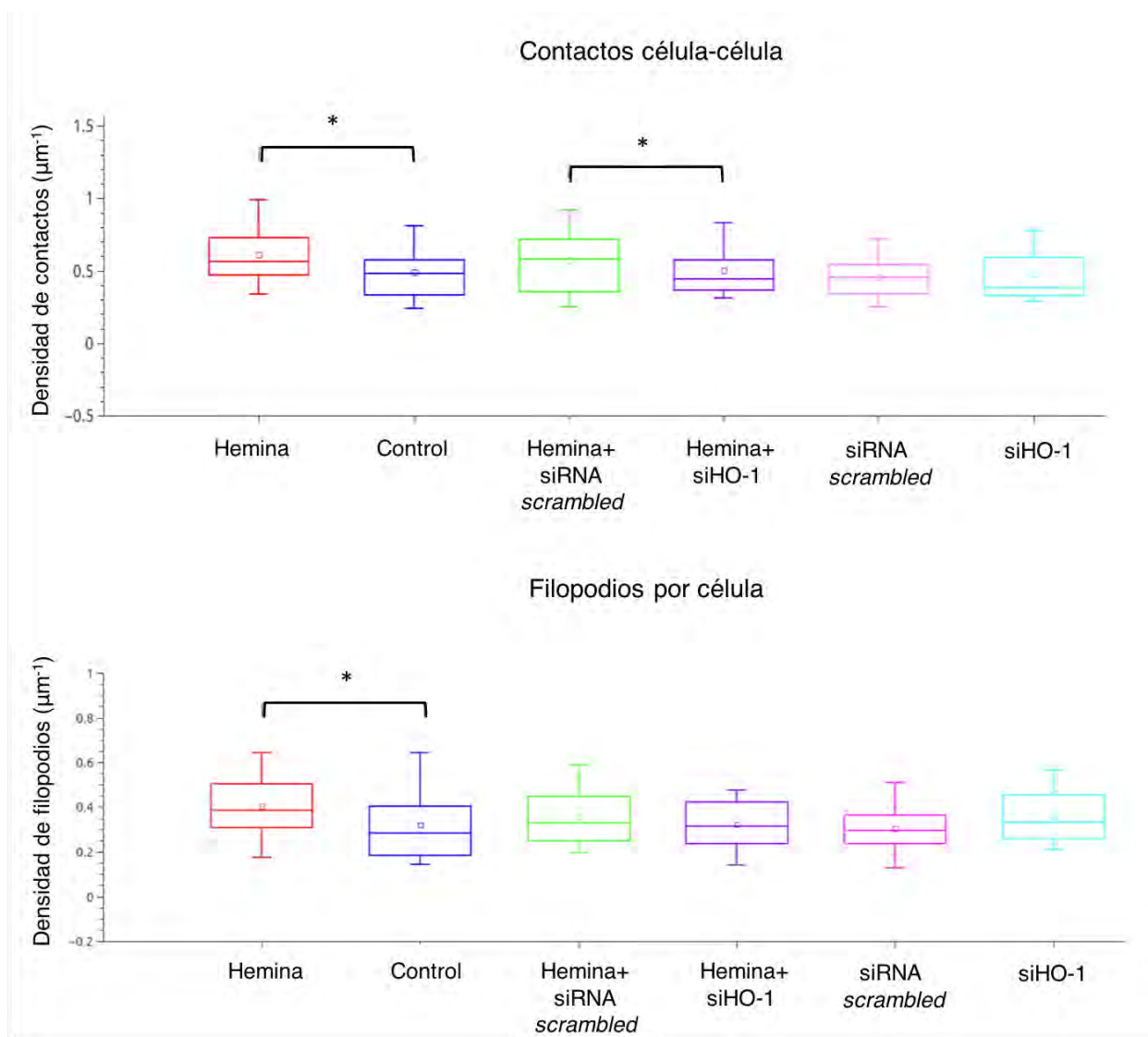


Figura 44. *Boxplots* comparando la densidad de contactos célula-célula (panel superior, $n > 50$ áreas de contacto) y de filopodios por célula individual (panel inferior, $n > 50$ áreas de contacto) para las diferentes condiciones experimentales en células C4-2B. La cuantificación de filopodios fue realizada como se explicó anteriormente en la Figura 37 ($*P < 0,05$).

En resumen, los resultados presentados en esta sección nos permiten inferir que la inducción de HO-1 en líneas tumorales prostáticas se asocia con un aumento en la adhesión entre células vecinas gracias al mayor número de contactos entre ellas, lo cual podría explicar la menor área explorada al sobre-expresar HO-1.

Para conocer si la modulación de HO-1 tenía también un impacto en otros componentes del citoesqueleto, estudiamos junto a las colaboradoras mencionadas anteriormente la longitud

de persistencia de los MT, estructuras mucho más dinámicas y rígidas que proveen el mayor soporte mecánico a las células y que son capaces de regular los filamentos de actina¹²⁰. La longitud de persistencia (L_p) es un parámetro ampliamente utilizado para describir las propiedades mecánicas de filamentos, y se define como la razón entre la rigidez del filamento y las fuerzas térmicas actuando sobre el mismo. Células PC3 fueron tratadas o no con hemina (80 μ M, 24 h) y se obtuvieron imágenes mediante la técnica de microscopía de reconstrucción estocástica o *STORM* (Figura 45). Los MT fueron analizados por el método de Fourier (explicado en la sección 13 de Materiales y métodos), tomando segmentos de 3 μ m de longitud y se obtuvo la varianza de las amplitudes de los modos de Fourier en función del número de onda, q_n . Los datos siguen una forma funcional de tipo q_n^{-2} (comportamiento similar térmico). Este resultado permitió aplicar el modelo térmico definido por la ecuación 2 de la sección Materiales y métodos para calcular la longitud de persistencia aparente de los MT. No obtuvimos diferencias significativas en la L_p entre las células control y aquellas tratadas con hemina, sugiriendo que HO-1 no afecta la flexibilidad de los MT en células PC3.

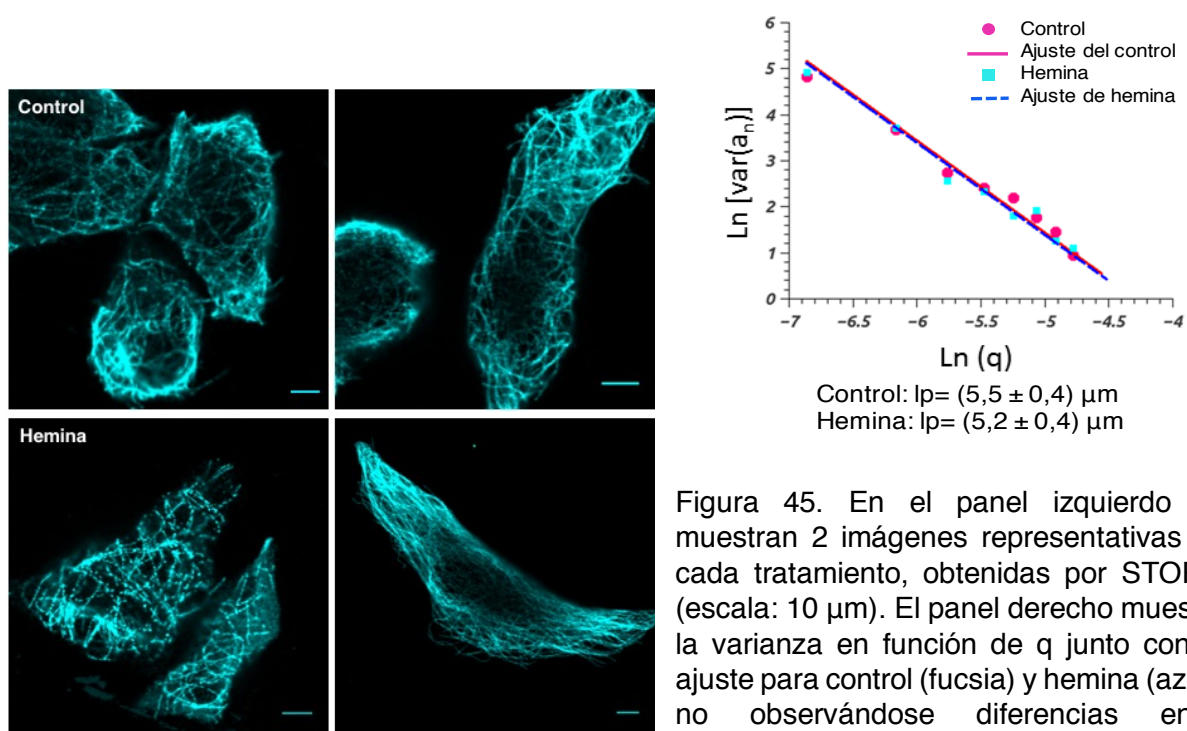


Figura 45. En el panel izquierdo se muestran 2 imágenes representativas de cada tratamiento, obtenidas por STORM (escala: 10 μ m). El panel derecho muestra la varianza en función de q junto con el ajuste para control (fucsia) y hemina (azul), no observándose diferencias entre tratamientos.

PARTE IV

LA MODULACIÓN GENÉTICA Y FARMACOLÓGICA DE HO-1 IMPACTA EN LA EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA REGULACIÓN DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA.

Dada la evidencia hasta aquí presentada de que la modulación de HO-1 tiene un impacto sobre las fuerzas protrusivas de las células, realizamos un análisis de secuenciación masiva (*RNAseq*) para conocer los genes del citoesqueleto cuya expresión se ve alterada al sobre-expresar HO-1, ya sea de manera farmacológica o genética. Para tal fin, se extrajo ARN de células PC3 tratadas o no con hemina (80 μ M, 24 h) o bien de células transfectadas de manera transitoria con el vector pcDNA3.HO-1(PC3HO-1) o el vector vacío como control (pcDNA3).

Como esquematiza la Figura 46, para cada conjunto de comparaciones (pcDNA3.HO-1 vs. pcDNA3 y control vs. hemina) se detectaron genes con su expresión modificada más de dos veces respecto de los controles. En la comparación pcDNA3HO-1 vs. pcDNA3 observamos 538 (446+92) genes sub-expresados y 813 (695+118) genes sobre-expresados, mientras que la comparación Hemina vs. control reveló un total de 962 (870+92) genes sub-expresados y 915 (797+118) sobre-expresados (* $P < 0,05$). De la totalidad de genes alterados, seleccionamos los 92 genes sub-expresados y los 118 genes sobre-expresados más de dos veces en ambas condiciones experimentales (pcDNA3HO-1 y hemina) para un posterior análisis.

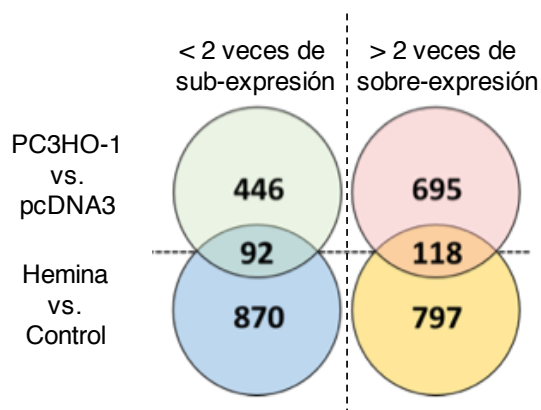
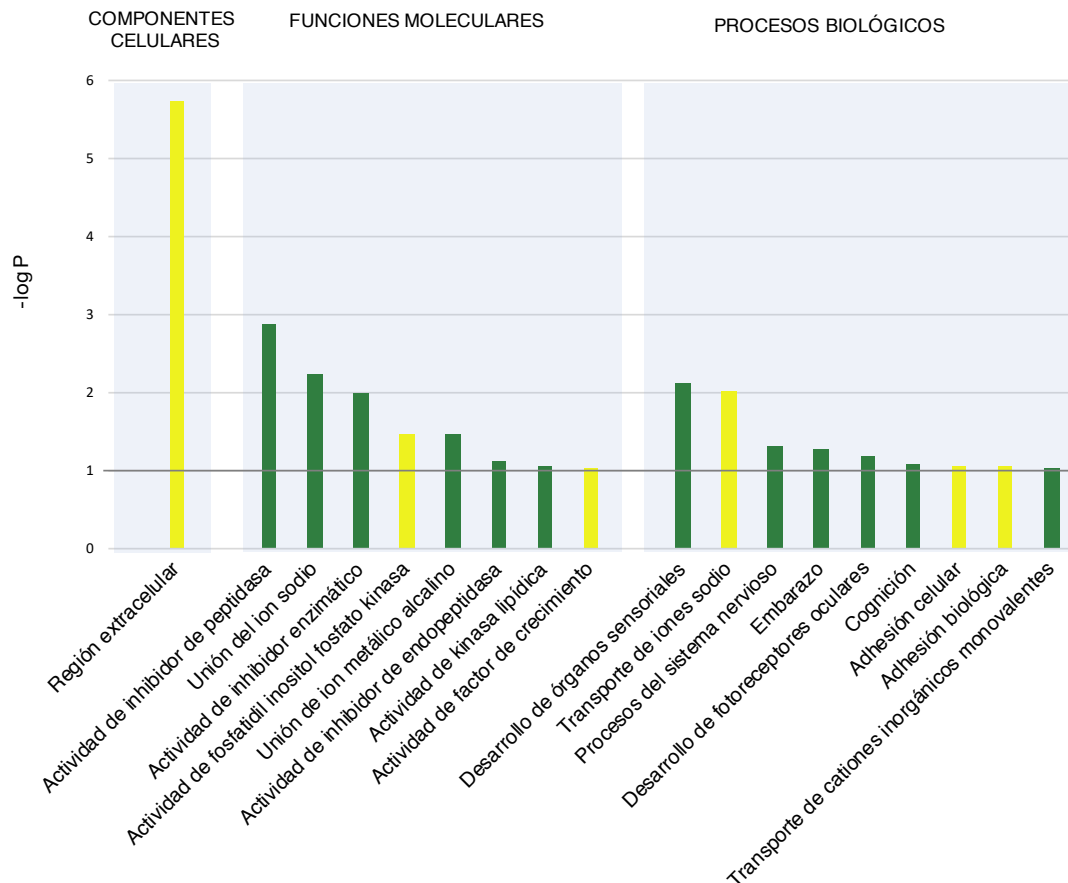


Figura 46. Representación esquemática indicando el número de genes con expresión alterada más de dos veces en cada condición respecto de su control. La intersección entre conjuntos muestra el número de genes alterados en ambas condiciones por sub o sobre-expresión (* $P < 0,05$). Para el análisis posterior, se utilizaron los 92 genes sub-expresados más de dos veces y los 118 genes sobre-expresados más de 2 veces en ambas condiciones experimentales.

Con los genes seleccionados, realizamos un nuevo análisis de GO con el fin de identificar categorías asociadas a la reestructuración del citoesqueleto de actina. La Figura 47 muestra el resultado de dicho análisis donde en amarillo se grafican las categorías de interés para los 92 genes sub-expresados en ambas condiciones: sobre-expresión genética y farmacológica de HO-1 (panel superior) y los 118 genes sobre-expresados (panel inferior) más de 2 veces respecto del control.

Ontología génica de los genes sub-expresados más de 2 veces en el RNAseq



Ontología génica de los genes sobre-expresados más de 2 veces en el RNAseq

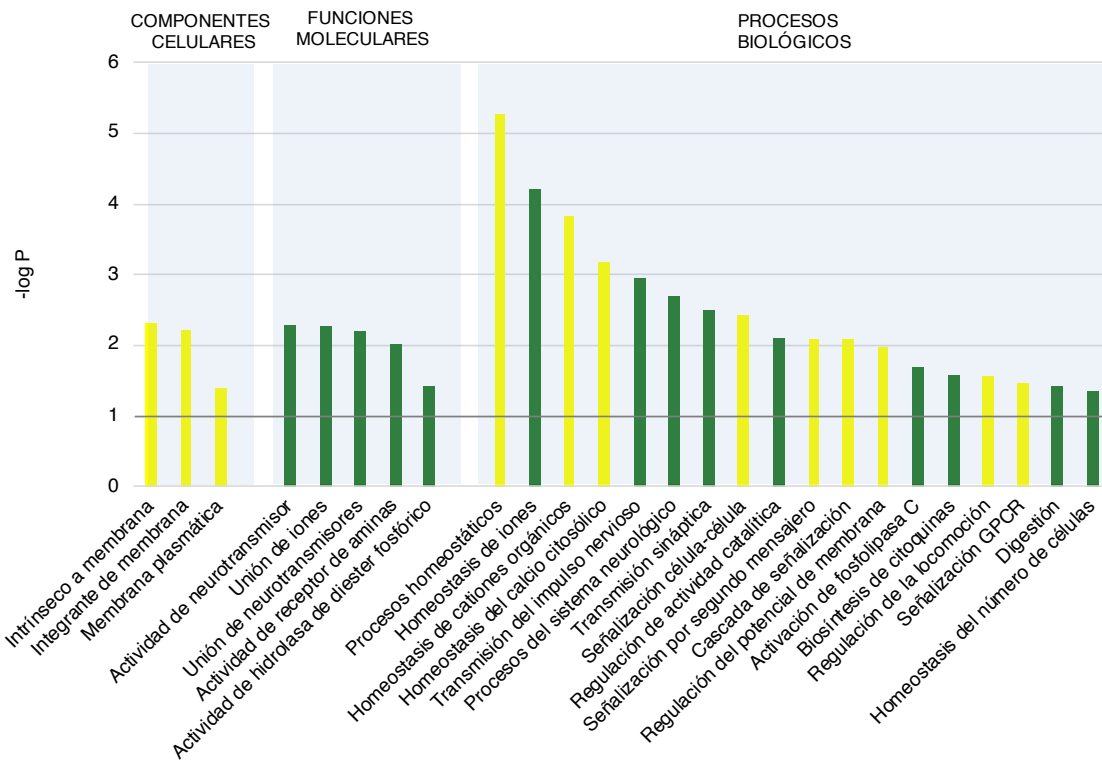
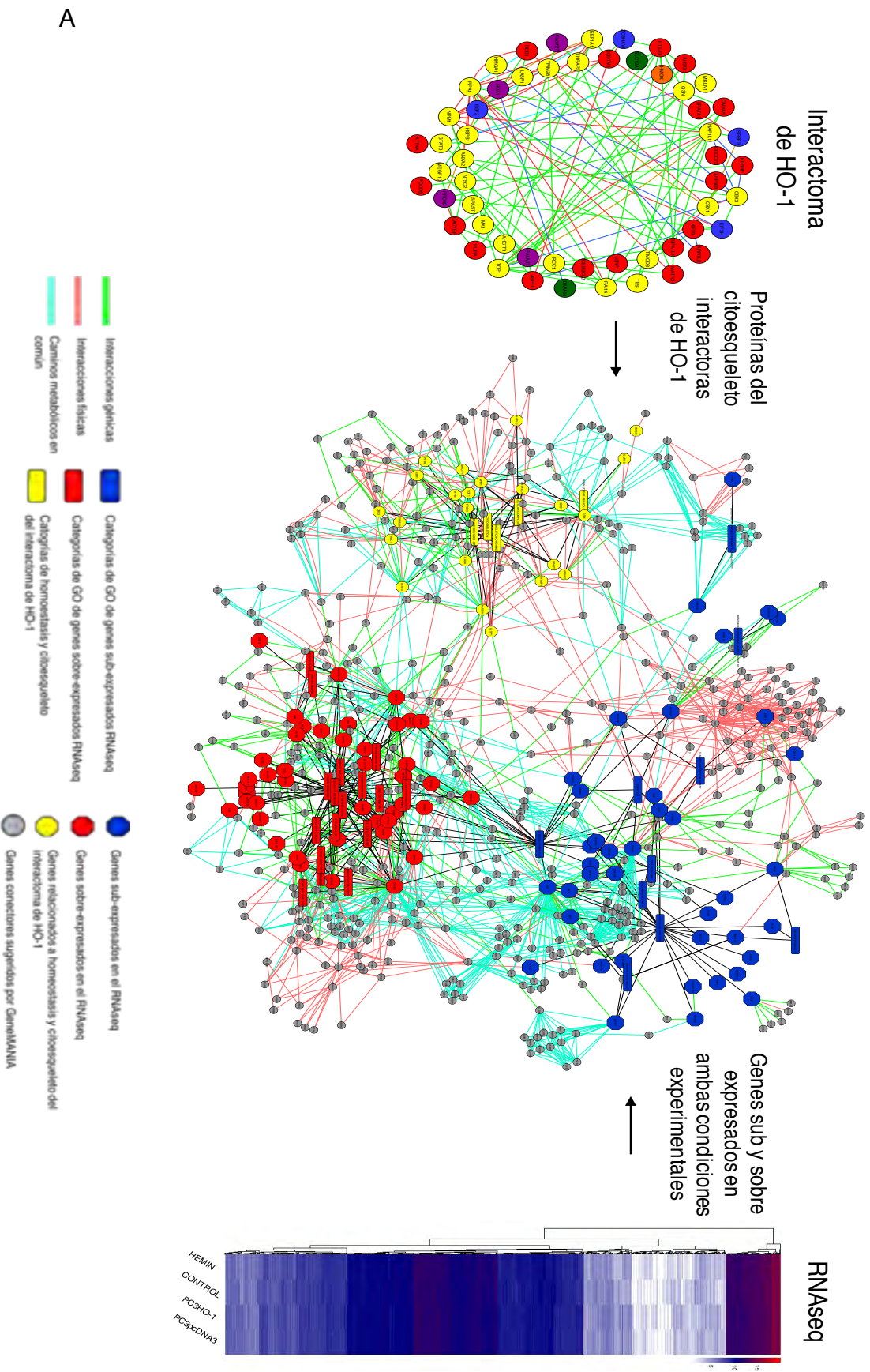


Figura 47. Categorías de GO asociadas a citoesqueleto y homeostasis (amarillo) y otras categorías (verdes) graficadas en función del logaritmo del valor P utilizando *DAVID*. Las categorías fueron arbitrariamente asignadas.

A continuación, integramos el conjunto de datos de transcriptómica y del interactoma de HO-1 para obtener una visión holística combinada de los mecanismos moleculares implicados en la remodelación del citoesqueleto en PCa. Utilizando nuevamente los programas *Cytoscape* y *GeneMania*, construimos una red de interacciones entre ambos conjuntos de datos. En el panel A de la Figura 48 se puede observar la red de interacciones, entre las proteínas del citoesqueleto identificadas por espectrometría de masa (amarillo) y los 92 genes más de dos veces sub-expresados o los 118 genes sobre-expresados en el RNAseq (azul y rojo, respectivamente). De todas las interacciones existentes entre ambos conjuntos de datos, en el panel B de la Figura 48 se muestran específicamente las conexiones físicas que existen entre los genes seleccionados.



B

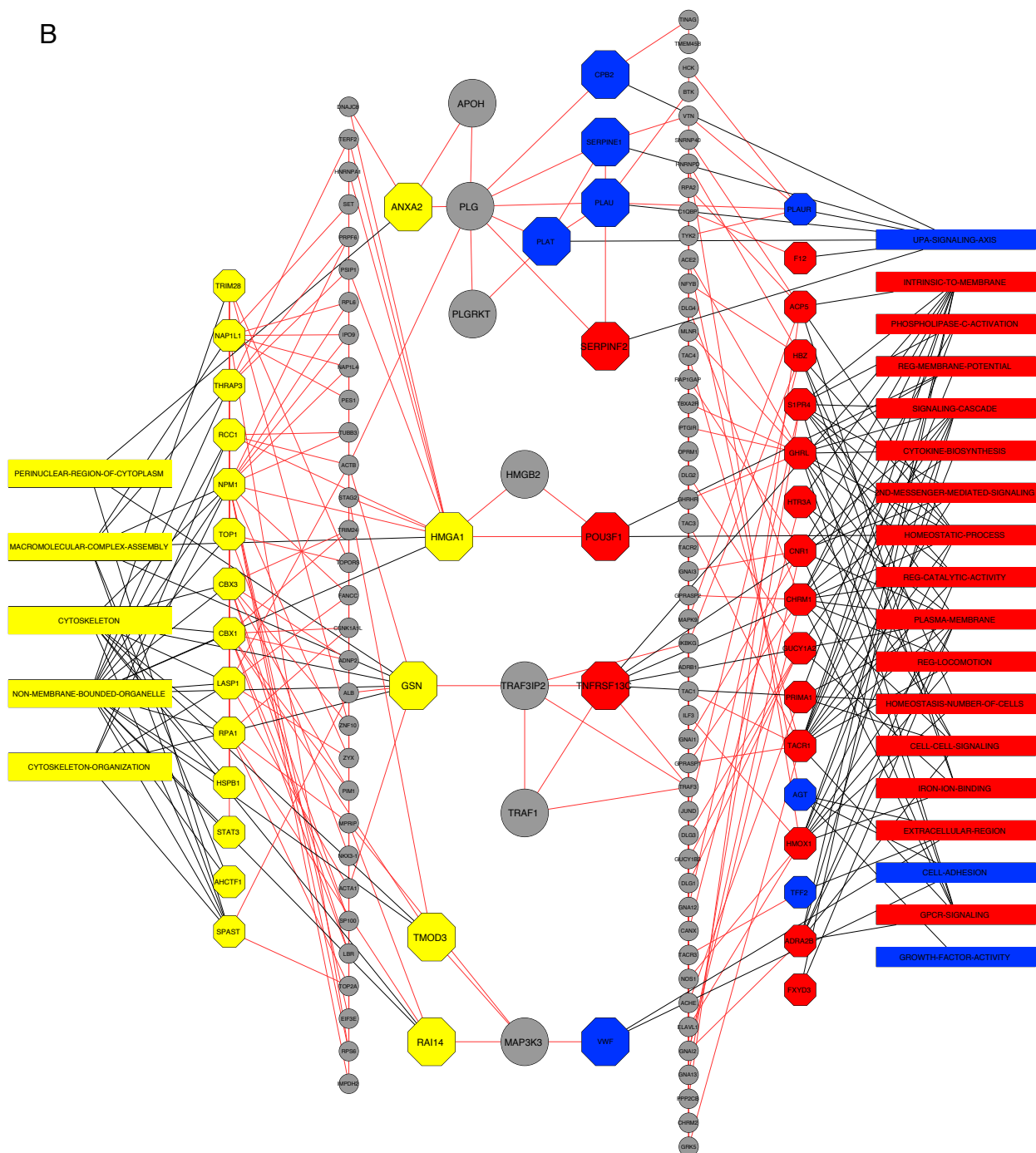
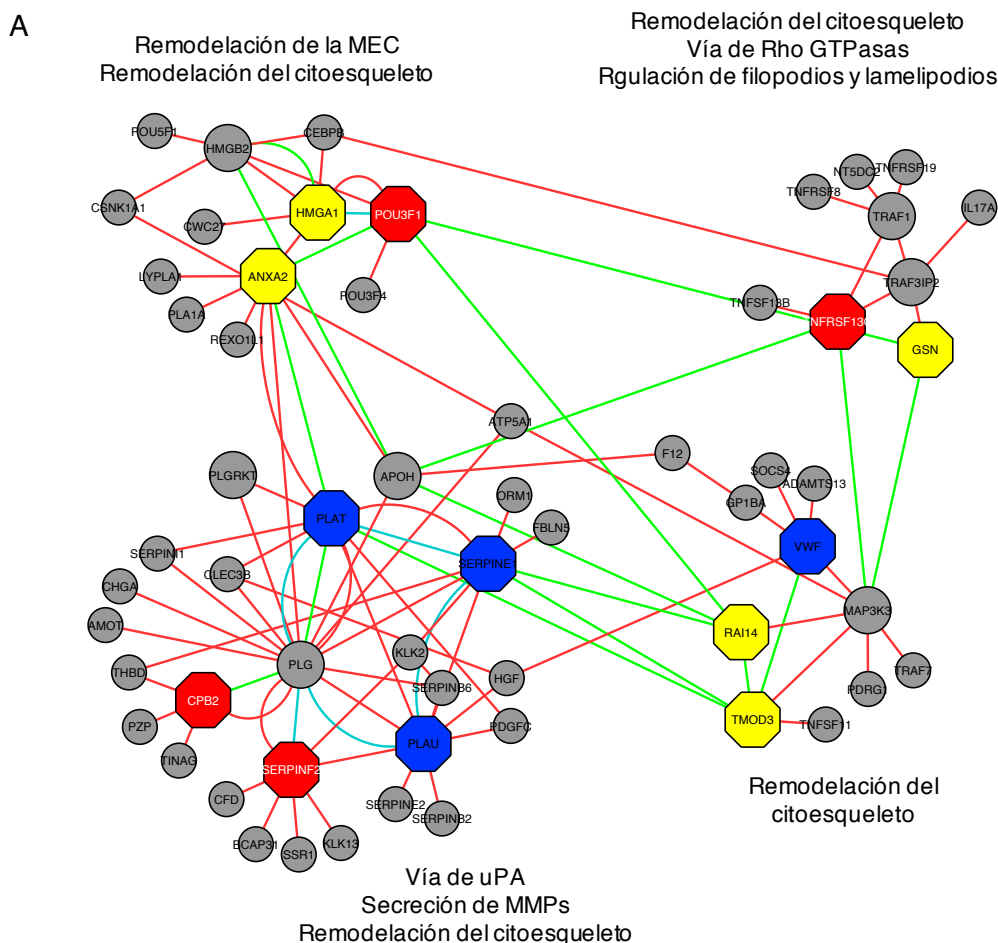


Figura 48. (A) Análisis integrado del interactoma y del transcriptoma modulado por HO-1 en PCa. Red de interacciones entre las proteínas del interactoma pertenecientes a las categorías de ontología génica asociadas al citoesqueleto (amarillo) y los genes sub o sobre-expresados más de dos veces (azul y rojo, respectivamente) al inducir HO-1 de manera farmacológica o genética. La interconectividad se muestra por interacciones génicas (líneas verdes), interacciones físicas (líneas rojas) o caminos metabólicos en común (líneas turquesas). (B) La red anteriormente descrita, filtrada para las interacciones físicas. En este caso, los genes señalados en gris son genes sugeridos por el *software* en base a la bibliografía documentada,

para poder construir la red de interacciones pero que no han sido detectados por proteómica o transcriptómica.

Mediante el conjunto de datos integrados, pudimos identificar 4 grupos de interacciones de particular interés que podrían acercarnos a uno o más mecanismos que expliquen el fenotipo observado en las células tumorales prostáticas al modular HO-1. La Figura 49 A muestra una ampliación de los 4 grupos de interacciones encontradas con especial relevancia en vías de regulación del citoesqueleto.



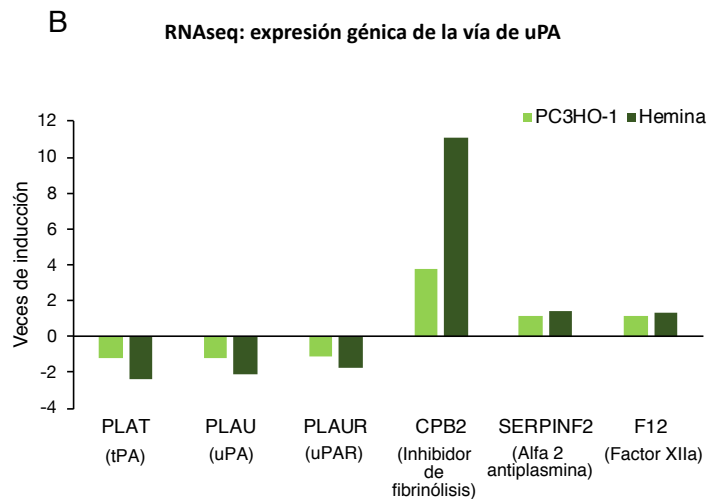


Figura 49. (A) Red de interacciones ampliada de los cuatro grupos de genes relacionados entre el interactoma y el RNAseq, asociados por interacciones físicas (líneas rojas), caminos metabólicos en común (líneas celestes) e interacciones génicas (líneas verdes). En la Figura se señalan los procesos celulares en los cuales participan los genes de cada uno de los 4 nodos identificados. (B) Perfil de expresión de los genes de la vía de uPA bajo la inducción farmacológica (hemina) o genética (PC3HO-1) de HO-1.

Entre las interacciones encontradas pudimos identificar la conexión de Anexina A2 (ANXA2) al precursor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (PLAU) y a la proteína del grupo de alta movilidad (HMGA1) con la proteína *homeobox* POU de clase 3 (POU3F1) que a su vez están interconectados con GSN, el receptor del factor de necrosis tumoral TNFRSF13C, tropomodulina 3 (TMOD3) y RAI14 con el factor de Von Willebrand (VWF). Estos caminos de señalización están intrínsecamente relacionados con la remodelación del citoesqueleto, secreción de MMPs, la vía de uPA, RhoGTPasas y la regulación de filopodios y lamelipodios. Particularmente, como se muestra en la Figura 49 B, podemos observar que la modulación de HO-1, tanto de manera génica como de forma farmacológica, impacta sobre la expresión de los factores reguladores de la vía de uPA; mientras que los activadores de esta vía se encuentran sub-expresados bajo inducción de HO-1 (*PLAT*, *PLAU*, *PLAU*). A su vez, los inhibidores de la vía de uPA se encuentran sobre-expresados en ambas condiciones experimentales (*CPB2*, *SERPINF2*, *F12*).

En resumen, la red obtenida a partir de los datos de proteómica y transcriptómica nos permitió identificar los niveles moleculares a los cuales HO-1 opera regulando las fuerzas protrusivas, la migración, invasión y adhesividad celular.

Con el conjunto de resultados obtenidos hasta el momento, construimos un modelo integrando los niveles en los cuales HO-1 participa afectando la polimerización de filamentos de actina y la degradación de la matriz extracelular.

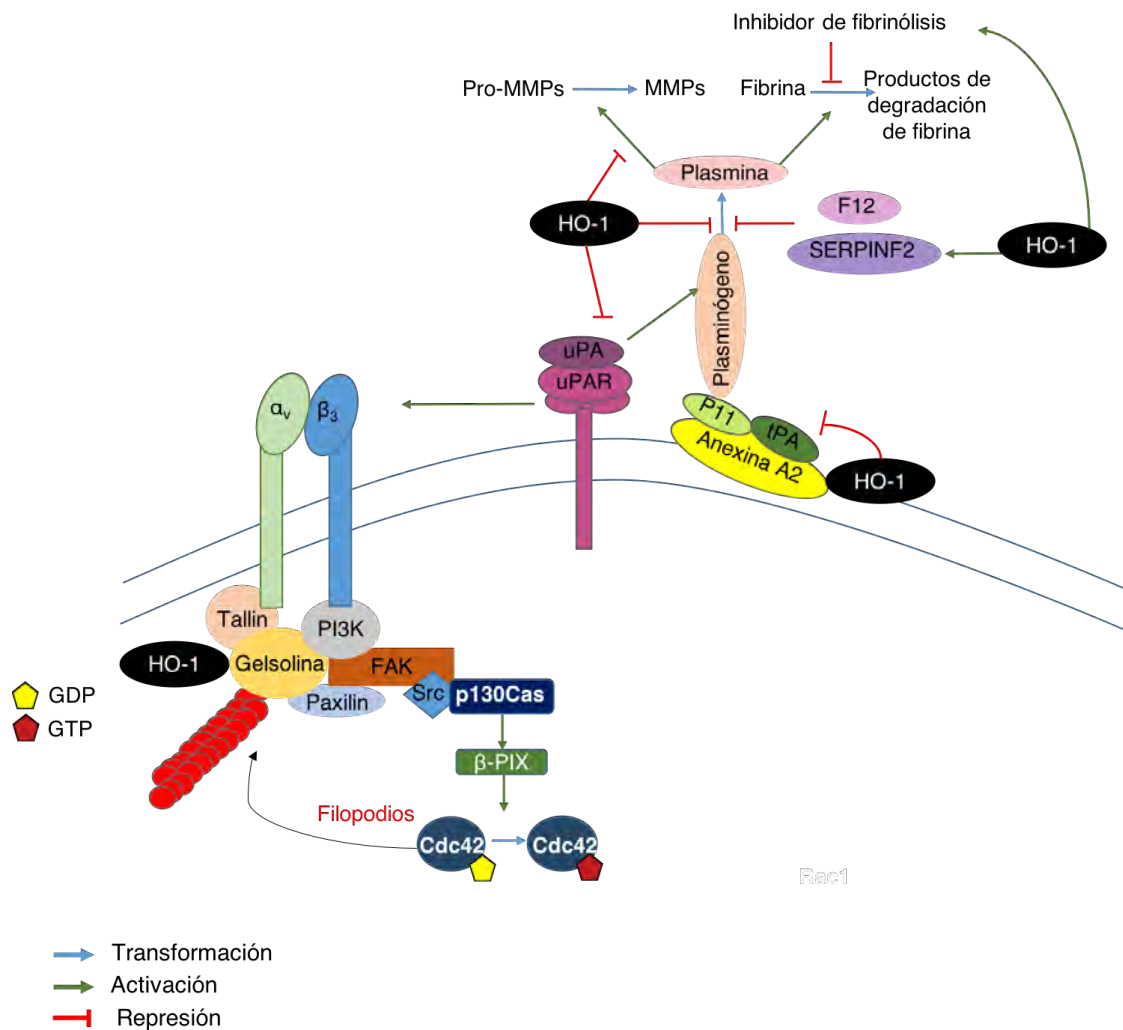


Figura 50. Representación esquemática del modelo propuesto sobre los caminos moleculares afectados por HO-1 que resultan en la disminución de la migración e invasión celular, favoreciendo un fenotipo más adhesivo y menos agresivo en PCa. La sobre-expresión de HO-1 disminuye la degradación de la MEC inhibiendo las MMPs, aumentando los niveles de los inhibidores de la vía y silenciando la expresión de los activadores de la misma.

En conclusión, la sobre-expresión de HO-1 participa de la modulación negativa de la degradación de la MEC mediante la sub-expresión de MMPs y de uPA y su receptor, así como también mediante la sobre-expresión del inhibidor de fibrinólisis (TAFI), y de SERPINF2, un inhibidor de proteasas responsable de inactivar la conversión de plasmina a plasminógeno. La regulación negativa de la vía de uPA/uPAR impacta directamente sobre las vías de Rho GTPasas a través de la integrina $\alpha_v\beta_3$, involucrada en la polimerización de actina en filopodios y lamelipodios celulares.

Por lo tanto, **podemos inferir que frente a la inducción de HO-1 en células tumorales**

prostáticas, se manifiesta la alteración de vías celulares asociadas a la reestructuración del citoesqueleto y a la matriz extracelular, factores claves involucrados en la migración celular.

PARTE V

VALIDACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR AFECTADAS BAJO LA INDUCCIÓN DE HO-1 EN LÍNEAS TUMORALES PROSTÁTICAS.

En la sección anterior se observan alteraciones en la expresión de genes de la vía de uPA y de la remodelación del citoesqueleto bajo modulación de HO-1. Por tal motivo decidimos evaluar si esta disminución en la expresión de uPA era acompañada por una disminución en los niveles de esta uroquinasa en el medio extracelular. Para tal fin realizamos un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) sobre medios condicionados de células PC3 recolectados 24 h posteriores al tratamiento con hemina 80 μ M. La inmovilización de uPA sobre pocillos cubiertos con un anticuerpo anti-uPA y posterior agregado de un anticuerpo secundario acoplado a una enzima que genera un producto coloreado, nos permitió determinar la concentración de uPA liberada al medio condicionado en cada condición experimental. La Figura 51 muestra una disminución significativa en la concentración de uPA liberada al medio luego de 24 h de inducción farmacológica de HO-1.

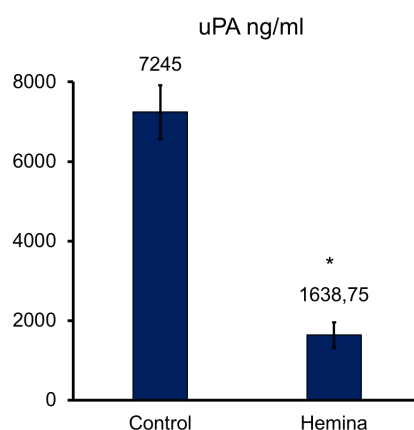


Figura 51. Concentración de uPA, expresada como ng/ml, en medios condicionados de células PC3 tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control. Se muestra uno de tres experimentos independientes (* $P < 0,05$).

Además, dada la interacción encontrada entre HO-1 y GSN (Sección I de Resultados), una proteína fundamental en la organización del citoesqueleto de actina implicada en la polimerización de estos filamentos, decidimos estudiar la activación de Cdc42, RhoGTPasa responsable de la formación de filopodios^{160,161}. Para tal fin, realizamos un *pull down* de Cdc42

activada, a partir de extractos proteicos de células PC3 tratadas o no con hemina. Como muestra la Figura 52, si bien no logramos observar la activación de Cdc42 en ninguna de las dos condiciones experimentales, detectamos un aumento significativo en los niveles de expresión de esta RhoGTPasa en las células PC3 con inducción farmacológica de HO-1.

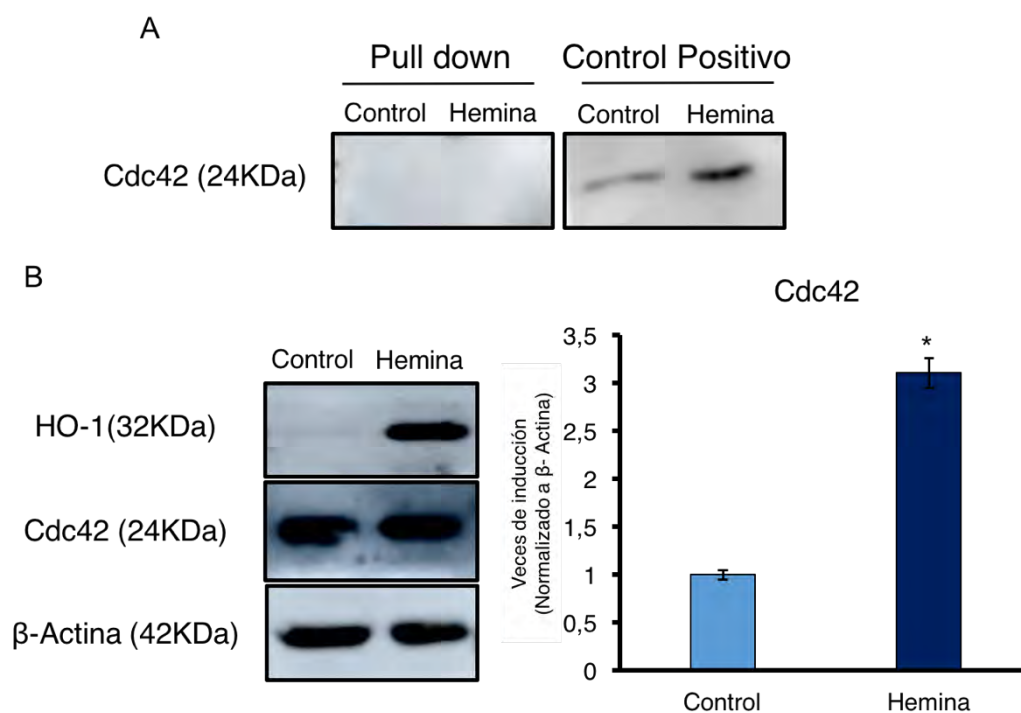


Figura 52. (A) Células PC3 fueron tratadas con hemina (80 μ M, 24 h) o PBS como control. Se extrajeron proteínas totales y se evaluó la presencia de Cdc42 activada mediante *Western Blot*, luego de realizar un *pull down* contra esta RhoGTPasa activada. Como control positivo se utilizaron extractos proteicos incubados con GTP γ S. (B) Se evaluó la expresión de Cdc42 en extractos proteicos totales. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes (*P<0,05).

Podemos concluir que la inducción de HO-1 en PCa tiene un claro impacto en las vías de señalización celular implicadas en migración y adhesión, aumentando la expresión de proteínas responsables de la polimerización de filopodios y disminuyendo la secreción de uPA, uroquinasa clave en la degradación de la MEC, favoreciendo un fenotipo menos invasivo.

PARTE VI

LA MODULACIÓN DE HO-1 EN CÉLULAS PC3 CO-CULTIVADAS CON CÉLULAS PROGENITORAS DE HUESO FAVORECE LA SECRECIÓN DE FACTORES QUE AFECTAN LOS CONTACTOS CELULARES.

Dado que el hueso es el sitio más frecuente de metástasis en la progresión del PCa y considerando el análisis bioinformático presentado en la Sección II de Resultados, donde observamos una importante desregulación de las proteínas del citoesqueleto en el estadio metastásico del PCa, decidimos estudiar el efecto de medios condicionados (MC) obtenidos de co-cultivos indirectos entre células PC3 y líneas progenitoras de hueso. MC3T3 o RAW 264.7 en los filopodios de células PC3. Las células MC3T3 corresponden a una línea celular osteoblástica derivada de calvarias de ratón¹⁶², mientras que las células RAW 264.7 corresponden a una línea murina monocítica capaz de diferenciarse a osteoclastos, producto de la transformación inducida por el virus de la leucemia murina Abelson¹⁶³. Células PC3 fueron pre-tratadas o no con hemina 50 μ M durante 24 h y posteriormente fueron colocadas en co-cultivo con células MC3T3 o RAW 264.7 durante 24 h adicionales, según el diseño experimental descrito en la Figura 53 (Figura 19 de Materiales y métodos).

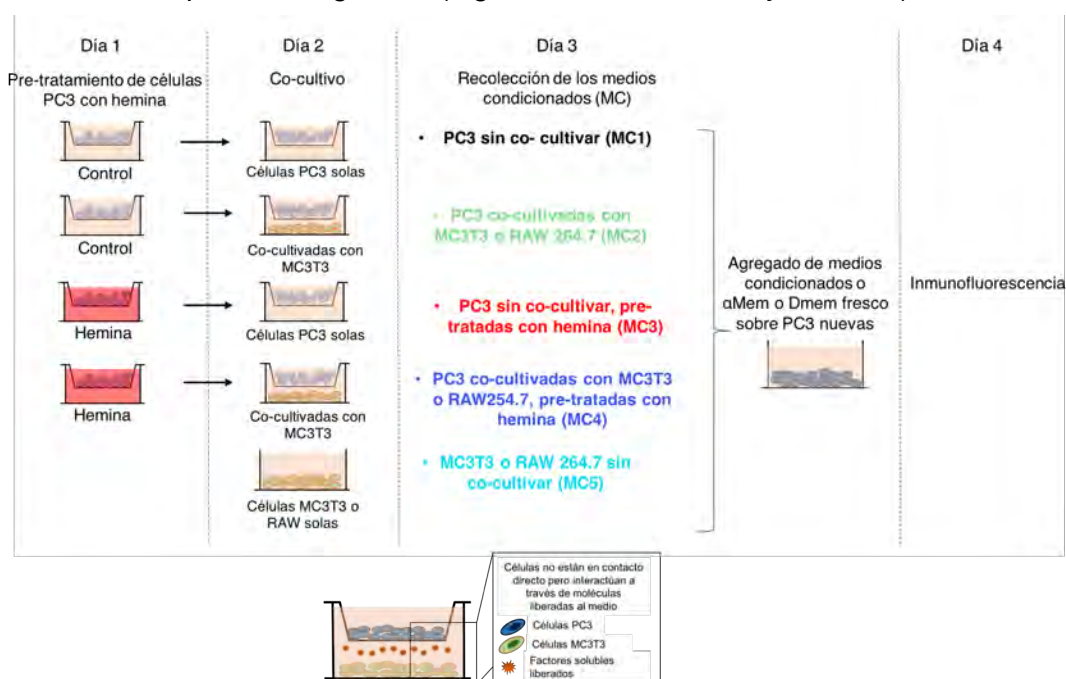


Figura 53. Esquema secuencial del co-cultivo con ambas líneas celulares. Brevemente, las células PC3 y las células precursoras de hueso fueron sembradas y crecidas por separado. Parte de las células PC3 fueron tratadas durante 24 h con hemina 50 μ M mientras que otra parte no recibió tratamiento. Posteriormente, la mitad de las células PC3 tratadas fueron

puestas en co-cultivo con las líneas de hueso (MC4), mientras que la otra parte de las células tratadas se mantuvo sin co-cultivar (MC3). De las células PC3 que no recibieron pre-tratamiento con hemina, la mitad fue puesta en co-cultivo (MC2) mientras que la mitad restante se mantuvo sin co-cultivar (MC1). También se analizaron las prolongaciones de células PC3 que recibieron medio condicionado de células precursoras de hueso sin co-cultivar (MC5).

Al finalizar los co-cultivos, los medios condicionados fueron recolectados y puestos en contacto con células PC3 durante 24 h. Luego, por microscopía confocal, se estableció el número de filopodios y densidad de contactos de la misma manera que se realizó en las experiencias anteriormente explicadas y cuyo método fue detallado en su correspondiente sección. El MC del co-cultivo con MC3T3 (Figura 54) o RAW 264.7 (Figura 55) redujo significativamente el número de contactos entre células PC3 (PC3+MC2 vs. PC3+MC1, *boxplots* verdes vs. negros). Sin embargo, en las células PC3 que recibieron MC de co-cultivos donde las células de PCa habían sido previamente tratadas con hemina, esta disminución en el número de filopodios se vio impedida (PC3+MC4 vs. PC3+MC2, *boxplots* azules vs. verdes).

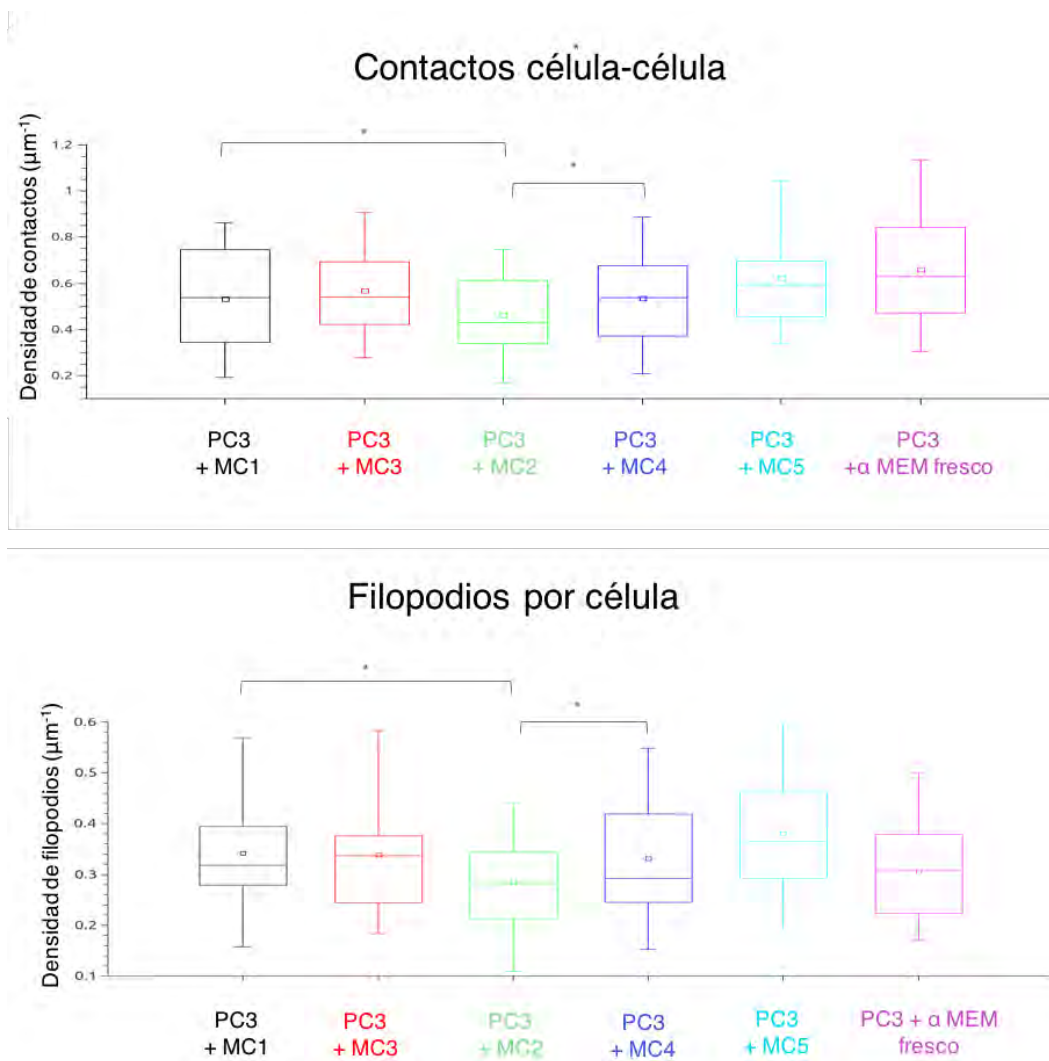


Figura 54. Densidad de contactos entre células ($n > 50$ contactos por condición) y densidad de filopodios por célula individual ($n > 50$ células por condición) en células PC3 que recibieron el medio condicionado de cada condición experimental del co-cultivo con células MC3T3. (MC1: PC3 sin pre-tratar con hemina y sin co-cultivar; MC2: co-cultivo sin pre-tratar con hemina; MC3: PC3 pre-tratadas con hemina y sin co-cultivar; MC4: co-cultivo entre PC3 y MC3T3; MC5: MC3T3 sin co-cultivar) (* $P < 0,05$).

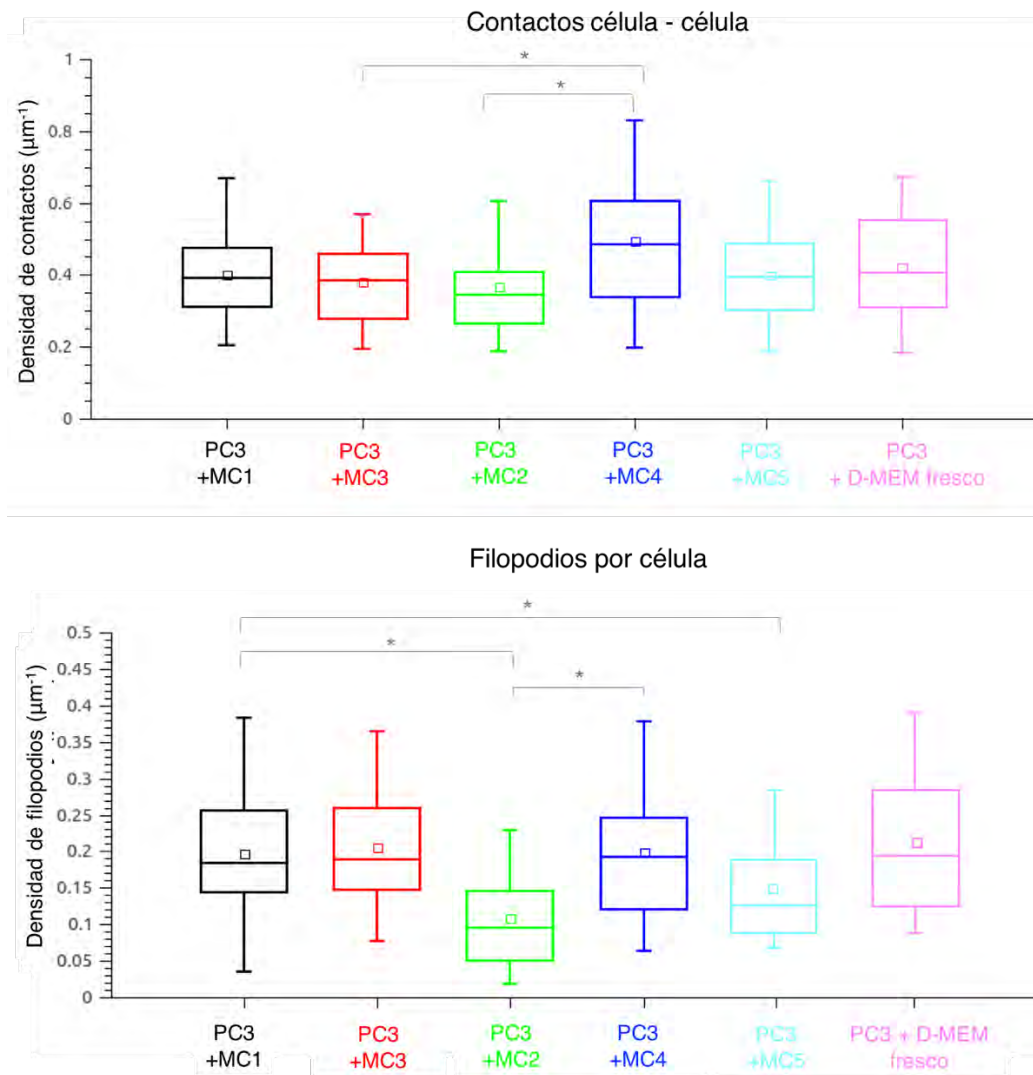


Figura 55. Densidad de contactos entre células ($n > 50$ contactos por condición) y densidad de filopodios por célula individual ($n > 50$ células por condición) en células PC3 que recibieron el medio condicionado de cada condición experimental del co-cultivo con células RAW264.7. (MC1: PC3 sin pre-tratar con hemina y sin co-cultivar; MC2: co-cultivo sin pre-tratar con hemina; MC3: PC3 pre-tratadas con hemina y sin co-cultivar; MC4: co-cultivo entre PC3 y RAW 264.7 MC5: RAW 264.7 sin co-cultivar) (* $P < 0,05$).

Estos resultados demuestran que los MC provenientes de los cultivos indirectos entre las células tumorales y los precursores óseos contienen factores solubles que disminuyen los contactos celulares o los filopodios por célula, reduciendo la adhesión entre las células de PCa. Por el contrario, la sobre-expresión de HO-1 en células PC3 revierte el fenotipo observado, siendo este de carácter más adhesivo y así previniendo potencialmente la extravasación e invasión de las células tumorales a otros órganos hospedadores.

Discusión

Las adhesiones celulares son esenciales para el desarrollo, diferenciación y mantenimiento de los tejidos biológicos. Las células epiteliales requieren del establecimiento de uniones estrechas o “zippering” entre células vecinas para garantizar el ensamblado de una barrera funcional que mantiene la homeostasis tisular¹⁶⁴. Entre las principales moléculas de adhesión celular (CAMs) se destacan cadherinas, integrinas, selectinas e inmunoglobulinas, responsables de mantener la integridad del tejido, el anclaje entre células y la MEC, señalización celular y reparación tisular⁵³. Las cadherinas, cuya principal función es el mantenimiento de las adhesiones célula-célula, son ampliamente reconocidas por su rol en la EMT, migración celular y regulación de la expresión génica a través de la señalización mediada por cateninas⁵³. La pérdida de la barrera generada por las CAMs puede ser una ventaja considerable para la progresión tumoral. Las posibilidades de un tumor de propagarse hacia órganos distantes fuera del sitio de origen son determinantes en la progresión de la enfermedad. Mientras que los tumores localizados presentan una alta tasa de supervivencia, aquellos que desarrollan metástasis son la causa de la mayoría de las muertes por cáncer¹⁶⁵.

De acuerdo a *Cancer Facts and Figures 2018*, la supervivencia puede caer del 100% al 28% en pacientes con PCa al comparar aquellos individuos en los cuales el tumor se encuentra confinado en la glándula prostática y aquellos en los cuales el tumor se ha propagado a órganos distantes. Este comportamiento metastásico se debe, en parte, a la pérdida de la arquitectura tisular, íntimamente relacionadas con las interacciones célula-célula y célula-MEC¹⁶⁶. Cuando se altera la expresión o localización de las moléculas que participan de estas uniones, las células comienzan a mostrar aberraciones estructurales que les permiten migrar y colonizar tejidos blanco libremente^{167,168}. Dado que las CAMs cumplen un rol clave en la adhesión de células cancerosas¹⁶⁹⁻¹⁷¹, resulta interesante entender los mecanismos involucrados en la desregulación de su expresión y localización celular durante el comportamiento metastásico.

En los sitios de uniones intercelulares se identifican estructuras denominadas “puncta” o puntos de adhesión, caracterizadas por la presencia de complejos formados por E-cadherina y α / β -catenina¹⁷² (Greaves et al 2000). El dominio extracelular de E-cadherina se extiende desde la superficie celular y se une a las cadherinas presentes en las células adyacentes¹⁷³, mientras que el dominio intracelular contiene sitios de unión a cateninas y otras proteínas reguladoras¹⁷⁴. Las principales cateninas involucradas en el ensamblado de cadherinas son p120-, α -, β -, and γ -catenina. α -catenina permite la unión entre β -catenina y actina, lo cual

facilita la formación de grupos de uniones adherentes y la estabilización de la adhesión celular¹⁵⁶.

La pérdida de E-cadherina o la pérdida de su localización normal en los contactos célula-célula, es comúnmente observada durante la EMT y la progresión tumoral. La expresión de E-cadherina suele correlacionarse inversamente con la malignidad del tumor^{156,175-177}. Por lo tanto, el rol de E-cadherina como supresor tumoral es respaldado por la pérdida de esta proteína en una amplia variedad de cánceres invasivos incluyendo de mama¹⁷⁸, de ovario¹⁷⁹, pancreático¹⁸⁰, gástrico¹⁸¹ y de próstata^{182,183}. En este último caso, se ha demostrado que una menor expresión de E-cadherina se correlaciona con una mayor invasividad celular¹⁸⁴. Por lo tanto, la ausencia de esta proteína predice la potencial capacidad de estos tumores de dar metástasis ósea^{185,186}.

Además, se ha propuesto que la evaluación colectiva de varios componentes de las adhesiones celulares puede representar un marcador potencial para distinguir el cáncer de próstata localizado de la enfermedad metastásica agresiva¹⁸⁷. β -catenina pivotea entre dos procesos celulares críticos como son la adhesión y la señalización durante el desarrollo normal y la transformación celular¹⁸⁸. La disociación de las uniones adherentes puede favorecer la endocitosis de E-cadherina, la disponibilidad de β -catenina citoplasmática y de los sustratos disponibles para la señalización de la vía de Wnt. Uno de los factores determinantes en la integridad estructural de los complejos cadherina/ β -catenina es la fosforilación de esta última en distintas tirosinas, que culmina en la ruptura de los complejos adhesivos, liberando la β -catenina de su unión a E-cadherina y aumentando la migración e invasión celular¹⁸⁹.

La ruptura de las interacciones célula-célula generada por la disminución de la expresión de las CAMs favorece la pérdida de la unión de las células tumorales a la MEC y el consecuente aumento de la proliferación, señalización atípica, transición epitelio-mesenquimal, invasión y metástasis¹⁹⁰. Los diferentes componentes del citoesqueleto participan activamente de estos procesos¹⁶⁷. Los filamentos de actina, componente principal de filopodios, lamelipodios, podosomas y fibras de estrés, contribuyen a la polaridad celular manteniendo las uniones intercelulares y microvellosidades¹⁶⁷. Las proteínas del citoesqueleto junto con los filamentos de actina funcionan como mecanosensores entre las células y el microambiente, interviniendo claramente durante el proceso metastásico¹⁶⁷.

No existe una regla general que indique que el empaquetamiento de los haces de las fibras de actina o *bundling* de actina promueva o inhiba la metástasis¹⁶⁷. Si bien históricamente la rigidez del citoesqueleto se asoció con un perfil más invasivo, el grupo de Swaminathan y colaboradores¹⁹¹ ha reportado que células tumorales con mayor capacidad migratoria e invasiva son significativamente menos rígidas que las células con menor potencial migratorio e invasivo. Resulta claro que las células transformadas presentan alteraciones en el *bundling*, convirtiendo los compartimentos del citoesqueleto en potenciales blancos para comprender la progresión tumoral y desarrollar terapias apropiadas.

Al día de hoy existen numerosas terapias citostáticas que afectan la polimerización de los microtúbulos: los clásicos alcaloides de la vinca, taxanos, epipodofilotoxinas (etopósidos y teniposidos) y derivados de camptotecina; y otros compuestos naturales que se han presentado en el último año como potenciales terapéuticos. Entre estos últimos se destacan productos vegetales como flavonoides aislados de *Tanacetum gracile* (activan *checkpoints* del huso mitótico e impiden la unión de las subunidades α y β a la tubulina), artelastinas aisladas de *Artocarpus elasticus* (afectan la estructura radial de los MT) y alcaloides derivados de *Hymenocallis littoralis* que ha demostrado interrumpir la polimerización de MT en células Hep-G2, entre otros. Algunos de estos compuestos ya son utilizados en la clínica y otros están siendo investigados en ensayos clínicos, aunque ninguno de ellos en PCa¹⁹². Aún así, es necesario identificar compuestos diferentes que no afecten solamente la polimerización de los MT ya que los efectos adversos asociados a ellos incluyen neutropenia y neurotoxicidad dada su baja eficiencia al ser utilizado como único agente terapéutico¹⁹².

El citoesqueleto de actina cumple una función relevante en muchos aspectos fisiológicos y patológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la carcinogénesis, la reparación de las heridas y la inflamación. Cada uno de estos procesos complejos involucra la formación coordinada de múltiples estructuras formadas a base de actina. Particularmente, durante la inflamación, se genera un microambiente que favorece el desprendimiento de las células tumorales, su migración e invasión, gracias a la liberación de citoquinas y factores pro-angiogénicos.

En el caso de los filamentos de actina, inhibidores de proteasas o supresores del eje RhoA/ROCK se postulan como compuestos prometedores, dado que cada uno tiene efectos de inhibir la migración celular mesenquimal y ameboide, respectivamente^{193,194}. Dado que el

uso de inhibidores de proteasas puede potenciar el movimiento ameboide, una terapia combinada con ambos tipos de compuestos podría potenciar el efecto de estos compuestos. De la variedad de compuestos derivados de plantas que pueden inhibir la migración por acción de los FA, solo la cucurbitacina E ha demostrado ser eficiente frenando el ciclo celular en fase G2/M e induciendo apoptosis en la línea celular LNCaP a través de cofilina-1, mTOR, AMPK, p53 y caspasa-9¹⁹⁵. Por lo tanto, aunque muchos se encuentran bajo análisis en estudios pre-clínicos, aún no hay compuestos en uso que afecten directamente la polimerización de actina de manera eficiente.

Numerosos estudios han demostrado el efecto anti-inflamatorio de HO-1 en diferentes enfermedades ^{89,196,197}. Sin embargo, su rol en cáncer se encuentra en discusión ^{79,80,83,198-200}. Previamente en nuestro laboratorio demostramos que HO-1 disminuye la proliferación, la migración celular y la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*⁸⁵ en PCa, mediante mecanismos parcialmente esclarecidos, entre ellos cabe resaltar la vía de STAT3 y NFkB. Sin embargo, no puede descartarse la participación de esta proteína en la regulación de otros procesos celulares altamente implicados en el control de la carcinogénesis, incluyendo un efecto directo sobre el comportamiento adhesivo de las células tumorales. Es notable la importancia de las ROS en la señalización intra e intercelular de las CAMs, postulándose que estas especies son agentes reguladores maestros de las proteínas de adhesión²⁰¹. Dada la participación de HO-1 como proteína antioxidante^{57,202,203}, la modulación de su expresión emerge como una herramienta para regular los niveles de ROS en la célula tumoral^{57,204}. Por ende, estrategias dirigidas hacia el control de la homeostasis de las ROS para preservar la adhesividad coordinada y las funciones de señalización de las CAMs, podrían tener implicancias terapéuticas en esta enfermedad.

Con el objetivo de esclarecer la función no canónica de HO-1 como mediadora de la arquitectura celular, en esta tesis doctoral analizamos el impacto de la modulación de esta proteína directamente sobre la adhesión y motilidad celular en diferentes condiciones experimentales, utilizando líneas tumorales prostáticas. Nuestros resultados muestran que la modulación farmacológica y genética de HO-1 induce la expresión de E-cadherina y β -catenina tanto *in vitro* como *in vivo*. La sobre-expresión de HO-1 impacta en la localización de estas CAMs, aumentando su presencia en la membrana plasmática y, en consecuencia, aumentando significativamente el porcentaje de contacto entre células vecinas. Estas observaciones son respaldadas por la disminución del área explorada por células individuales

y el desplazamiento cuadrado medio de células de PCa tratadas con hemina, el inductor farmacológico específico de HO-1. Como ha sido previamente reportado, los niveles de expresión de E-cadherina y β -catenina son sensibles a la expresión del NF κ B, el cual se encuentra constitutivamente activo y está altamente asociado a la metástasis ósea en PCa. Por ejemplo, en cáncer de mama, NF κ B activa la expresión de los factores que favorecen la EMT (Snail, Slug, ZIB1, ZIB2 y Twist), disminuyendo así los niveles de E-cadherina^{205,206}. Más aún, la asociación entre NF κ B y los promotores de estos factores pro-mesenquimales ha sido confirmada tanto por análisis bioinformáticos como por inmunoprecipitación de la cromatina. El bloqueo de su expresión y actividad (mediante inhibidores específicos y siRNAs) resultó en una disminución en los niveles de los mismos, en la invasión y en la migración en líneas celulares altamente metastásicas de cáncer de mama²⁰⁶. De manera similar, la proporción de E-cadherina en tejido tumoral en cáncer gástrico es mucho menor respecto de los niveles de NF κ B y Snail, al compararlos con la mucosa gástrica normal²⁰⁷. Si bien existen numerosos reportes sobre la relación entre NF κ B y β -catenina en cáncer, dependiendo el tipo de tumor, la misma ha sido descrita como pro-tumoral o anti-tumoral²⁰⁸. En línea con estos antecedentes, de acuerdo a nuestras investigaciones previas la sobre-expresión de HO-1 (tanto genética como farmacológicamente) en células tumorales prostáticas se traduce en una sub-expresión e inhibición de la actividad de NF κ B, lo cual estabiliza las uniones adherentes entre dichas células²⁰⁷.

Las células epiteliales se comunican con las células vecinas a través de las uniones adherentes y la extensión de filopodios y lamelipodios intercelulares, disparando caminos de señalización que contribuyen a la migración^{154,209–211}. La asociación entre HO-1 y el aumento de las capacidades adhesivas de las células tumorales, junto con el aumento y la reubicación de E-cadherina y β -catenina hacia la membrana plasmática, nos permitió hipotetizar la posibilidad de que HO-1 esté implicada en el “*zippering*” celular y en la regulación de los filamentos de actina en la periferia celular. En línea con esta hipótesis, el trabajo de Zou y colaboradores reportó previamente que la sobre-expresión de HO-1 genética y farmacológicamente (mediante tratamiento con hemina) impide la migración celular en la línea celular HepG2 de hepatocarcinoma, efecto revertido por el tratamiento con concentraciones de hemina insuficientes para inducir HO-1 (5 μ M) o por transfección con una mutante inactiva²¹².

Mediante el uso de microscopía confocal analizamos la formación de filopodios en la periferia de células tumorales prostáticas. La implementación de un algoritmo para identificar el número de filopodios a lo largo de un perfil de intensidades seleccionado, ya sea en la periferia celular o entre células vecinas, nos permitió estandarizar el análisis cuantitativo de los mismos¹⁴⁸. Nuestros resultados sostienen que HO-1 induce la remodelación de los filamentos de actina aumentando el número de filopodios, favoreciendo un fenotipo más adhesivo y menos invasivo en células de PCa con diferente ractividad ósea. Si bien pudimos corroborar un efecto de HO-1 sobre los filamentos de actina, el análisis sobre los microtúbulos no reveló variaciones en la longitud de persistencia, y por lo tanto en la flexibilidad de los MT, indicando que los FA son los responsables de las alteraciones observadas en la morfología celular bajo inducción de HO-1, aunque restaría evaluar a futuro el impacto de HO-1 sobre los filamentos intermedios. Más aún, el hecho de que el silenciamiento de HO-1 pueda revertir el aumento en el número de contactos entre células vecinas, permite inferir una acción directa de HO-1 sobre las prolongaciones celulares. La ausencia de HO-1 en los filopodios podría implicar un rol regulatorio sobre las proteínas del citoesqueleto, más que su participación directa sobre la polimerización de la actina.

Por tal motivo, decidimos identificar el conjunto de proteínas asociadas a HO-1 en células de PCa. Mediante la inmunoprecipitación de HO-1 seguida de espectrometría de masa, construimos una red de proteínas vinculadas a HO-1, la cual denominamos “el interactoma de HO-1”. Este interactoma está constituido por un total de 56 proteínas entre las que se identifican moléculas vinculadas a la estructura celular, procesos fisiológicos, señalización celular y regulación de la dinámica de las fibras de estrés. De la totalidad de las proteínas inmunoprecipitadas con HO-1, el 50% corresponde a proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto, interconectadas de forma física o por caminos de señalización en común.

Aunque muchos trabajos han estudiado tejidos tumorales prostáticos a nivel transcriptómico, las proteínas responsables de la progresión tumoral han sido menos exploradas en PCa. Distintos grupos de genes, proteínas y metabolitos son responsables de la progresión desde una lesión precursora hacia una enfermedad localizada y finalmente dando lugar a un estadio metastásico. Para entender la significancia de las proteínas asociadas a HO-1 relacionadas con el citoesqueleto en la carcinogénesis y progresión tumoral prostática, realizamos un análisis bioinformático exhaustivo, utilizando bases de datos públicas que nos permitieron conocer la relevancia clínica de las mismas en diferentes estadios de la enfermedad^{213,214}.

Nuestro análisis demostró que los genes correspondientes al citoesqueleto se encuentran significativamente desregulados y presentan numerosas alteraciones en adenocarcinoma vs. próstata normal. Logramos identificar genes como *TES* y *MKLN1*, los cuales se ubican entre el 1-9% de los genes más sub-expresados en adenocarcinoma respecto del tejido normal, entre los trabajos comparados. *TES*, es una proteína que funciona como andamiaje en el citoesqueleto ²¹⁵ reconocida por ser un supresor tumoral en PCa²¹⁶ y *MKLN1* es un mediador nucleoplasmático de la morfología y adhesividad celular²¹⁷ que exhibe, además, una dinámica similar a la de HO-1, relocalizándose en la membrana plasmática ²¹⁸.

Pudimos confirmar que existe una correlación entre los niveles de expresión de estos genes y parámetros de relevancia clínica como el tiempo de sobrevida y recaída en pacientes libres de tratamiento o sometidos a prostatectomías radicales. La baja expresión de genes como *RAI14*, *RCC1* y *TES* (reguladores de la formación de uniones celulares, polaridad y adhesión celular), se asocia con una mayor sobrevida en una cohorte de 281 pacientes con PCa libres de tratamiento (*set* de datos Sboner¹⁴⁵), luego de un seguimiento de diez años. Incluso, en 92 pacientes que fueron sometidos a prostatectomías (*set* de datos Ross-Adams¹⁴⁶), el tiempo de recaída también disminuye conforme baja la expresión de estos mismos genes.

Por el contrario, otros genes de adhesión como *GSN* y *RPA1* exhiben alta expresión en pacientes con mayores tiempos de sobrevida y recaída clínica; esta última evaluada por los niveles de PSA sérico. *GSN* y *RCC1* son dos de los genes más sub- y sobre-expresados, respectivamente, en tejido tumoral prostático respecto de tejido normal adyacente (TCGA). De esta manera, hemos logrado identificar proteínas reguladoras del citoesqueleto asociadas a HO-1 que se encuentran significativamente alteradas en el PCa. La caracterización y profundización sobre las mismas permitiría la identificación de nuevos marcadores pronóstico o diagnóstico que complementen aquellos utilizados hasta el momento.

Los hombres con PCa presentan metástasis mayoritariamente osteoblásticas, principales causales de la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad²¹⁹. Trabajos previos han demostrado que HO-1 es capaz de modificar el microambiente óseo⁹⁰. Para explorar la contribución de HO-1 en la comunicación entre las células tumorales prostáticas y células precursoras óseas (osteoblastos y osteoclastos), utilizamos un sistema de co-cultivos indirectos entre células tumorales prostáticas humanas (PC3) y líneas murinas pre-osteoblástica (MC3T3) o pre-osteoclastica (RAW 264.7). El sistema de co-cultivo utilizado en

esta tesis doctoral, ya había demostrado con anterioridad que los factores liberados al MC son capaces de inducir cambios en las líneas celulares que participan del mismo, por ejemplo inhibiendo la proliferación de osteoblastos en co-cultivos entre PMOs y células PC3⁴⁵. Incluso, el trabajo publicado por nuestro laboratorio en el año 2013 confirmó que la sobre-expresión de HO-1 en PC3 impide la disminución de la proliferación de los PMOs y altera la expresión de factores implicados en la diferenciación osteoblástica/osteoclástica⁹⁰.

En el trabajo aquí presentado, demostramos que las células tumorales prostáticas expuestas al MC provenientes de los co-cultivos reducen significativamente el número de filopodios, tanto en las áreas de interacción con células vecinas como en células individuales. El MC de células PC3 tratadas con hemina previo al co-cultivo, previno esta pérdida de contactos. Es decir, el co-cultivo entre células de hueso y células de PCa en las cuales se indujo la expresión de HO-1 farmacológicamente, favorece la liberación de factores solubles al medio de cultivo que restablecen los contactos entre células, limitando las posibilidades de migración de las células tumorales prostáticas y respaldando nuestra hipótesis de que HO-1 favorece la remodelación del citoesqueleto hacia un fenotipo más adhesivo.

Las estrategias “multi-ómicas” utilizadas en este trabajo revelan nuevos aspectos sobre los mecanismos utilizados por HO-1 para modificar las fuerzas protrusivas y adhesivas de las células tumorales, que no podrían haber sido identificadas mediante proteómica o transcriptómica únicamente. El perfil transcriptómico obtenido mediante RNAseq mostró alteraciones significativas en marcadores claves asociados a categorías de adhesión y comunicación célula-célula bajo sobre-expresión de HO-1. Comprobamos un aumento de la carboxipeptidasa B2 (CPB2), enzima que hidroliza uniones en el extremo C-terminal, inhibe la fibrinólisis luego de la activación de la trombina. Se reportó que su expresión es baja en diferentes tipos de tumores, como cáncer de pulmón de células no pequeñas²²⁰, mientras que en líneas de cáncer de mama su inhibición aumenta la migración, proliferación e invasión celular²²¹.

Resulta interesante resaltar que la integración entre el proteoma y el transcriptoma bajo modulación de HO-1 reveló 4 *clusters* de señalización que podrían explicar la regulación de las fuerzas protrusivas observadas en las células tumorales: *ANXA2/HMGA1/POU3F1*; *NFRSF13/GSN*; *TMOD3/RAI14/VWF*; *PLAT/PLAU*. Particularmente, pudimos observar una notoria disminución en los niveles de expresión de los factores activadores de la vía de uPA

y una sobre-expresión de los genes inhibidores de este mismo camino de señalización. Así mismo, el análisis transcriptómico mostró una disminución en tres factores promotores de la vía de uPA, como son el activador del plasminógeno tipo tisular (*PLAT*), uPA (o *PLAU*) y su receptor, uPAR (o *PLAUR*). Como fue mencionado anteriormente, la desregulación de esta vía está asociada a la progresión tumoral y a la metástasis en diferentes tumores²²². Estos resultados, junto con la disminución de la concentración de uPA en los MC de células PC3 tratadas con hemina, nos permiten concluir que la inhibición de esta vía en líneas tumorales de próstata puede estar regulada por HO-1. La regulación negativa de uPA observada bajo modulación de HO-1 es consistente con los resultados previamente publicados por nuestro laboratorio, donde observamos que la sobre-expresión de HO-1 inhibe la expresión y la actividad de la metaloproteinasa MMP9⁸⁵, cuya activación y liberación a la MEC se ha demostrado que depende indirectamente de uPA^{223,224}). Además, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, donde no se observa la presencia de MMP9 en los filopodios, descartan así la existencia de invadopodios.

De esta manera, construimos un esquema donde podemos observar los procesos en los cuales interviene HO-1 (Figura 50), tanto a nivel extracelular inhibiendo la degradación de la MEC, como a nivel intracelular interactuando con proteínas reguladoras del citoesqueleto como GSN y HSPB1. Trabajos publicados demuestran que existe un *crosstalk* entre el eje uPA/uPAR y las RhoGTPasas que regulan la formación de filopodios y lamelipodios, dado que uPA no solo modula la motilidad celular activando al plasminógeno que degrada la MEC, sino que también activa caminos de señalización intracelulares mediante la unión con su receptor²²⁵. La activación de la familia de RhoGTPasas puede impactar sobre la motilidad e invasión celular a través de uPAR^{226,227}, por ejemplo afectando la formación de protrusiones celulares. Varios estudios sugieren que diferentes integrinas están involucradas en la señalización que desencadena la formación de filopodios y lamelipodios ^{228–230}.

El trabajo de Smith y colaboradores²²⁵ demuestra que los GEFs, como DOCK180-p130Cas-Crk, se encuentran en la misma vía de señalización de uPAR, el cual promueve la fosforilación de p130Cas-Crk y posterior ensamblaje con DOCK180. Además de actuar como mediador entre uPAR y el complejo DOCK180-p130Cas-Crk regulando la formación de lamelipodios, la integrina $\alpha v \beta 3$ participa en la formación de filopodios mediante la interacción entre p130Cas-Crk, Src y Cdc42²³¹. La RhoGTPasa Cdc42 facilita la polimerización de actina en las protrusiones celulares, evento que históricamente se asoció a una mayor motilidad e invasión

celular. Sin embargo, dada la disminución en los niveles de uPA secretados y la reducción en la migración celular, observadas bajo inducción de HO-1, evaluamos la actividad de Cdc42 en dichas condiciones experimentales. Sorprendentemente, no pudimos identificar un cambio en la actividad de Cdc42, aunque sí observamos un aumento en su expresión. Así, aunque la actividad de la Cdc42 se encuentra más frecuentemente asociada a la polimerización de actina que regula las capacidades migratorias (y metastásicas) en células tumorales, algunos trabajos han demostrado que también participa de la migración ameboide, dependiendo de la vía por la cual se active^{232,233}. Por lo tanto, no es únicamente Cdc42 quien podría favorecer la polimerización de los filopodios observados. La pérdida de su actividad junto con la activación de otras RhoGTPasas, controlan la invasividad de estas células. Nuestra hipótesis, en consecuencia, es que si bien Cdc42 estaría participando en la polimerización de actina, puede no estar involucrada en las vías de señalización que permiten la migración, tal vez debido a la actividad de otras GTPasas, dado el rol redundante que tienen las mismas como Rho F y Rho D, o incluso Rac^{109,110}. En este contexto, restaría evaluar la expresión y actividad de otras RhoGTPasas y la expresión de la integrina $\alpha\beta3$ en células PC3, a fin de comprender el posible mecanismo subyacente a la formación de filopodios como estructuras que permiten una mayor adhesión y menor migración celular.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis doctoral permiten concluir que HO-1 juega un rol clave en la re-estructuración del citoesqueleto, particularmente en los filopodios de actina y las propiedades adhesivas en las células de PCa, gracias a su interacción con proteínas reguladoras del citoesqueleto. Este efecto sobre la adhesividad celular, marcado por un aumento en el número de filopodios entre células, se condice con una menor migración, rompiendo con el paradigma aceptado hasta el momento donde un aumento en el número de filopodios es sinónimo de una mayor migración celular. Incluso, hemos comprobado que la sola comunicación indirecta entre las células tumorales de próstata con sobre-expresión de HO-1 y precursores óseos a través de factores solubles, es capaz de inducir la liberación de proteínas que inhiben la pérdida de contactos entre las células tumorales ya sea por la disminución de la degradación de la MEC o bien por las cascadas de señalización que disparan.

Bibliografía

1. Barnum, K. J. & O'Connell, M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1170**, 29–40 (2014).
2. Galluzzi, L. & Vitale, I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
3. Finn, O. J. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann. Oncol.* **23**, viii6-viii9 (2012).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
6. DeNardo, D. G., Andreu, P. & Coussens, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 309–316 (2010).
7. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
8. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
9. Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A. Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis.* **26**, 75–85 (2006).
10. Porsolt Company. Fluorfarma. Available at: www.fluofarma.com/cell-based_therapeutic-areas_oncology_cancer-assays.phtml.
11. Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* **15**, 81–94 (2018).
12. World Health Organization. International Classification of Diseases for Oncology, 3rd Edition (ICD-O-3). *Classification of Diseases* (2015). doi:10.1136/jcp.30.8.782-c
13. Verze, P., Cai, T. & Lorenzetti, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nature Reviews Urology* **13**, 379–386 (2016).
14. De Marzo, A. M. *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* **7**, 256–269 (2007).
15. Rodríguez-López, M. R., Baluja-Conde, I. B. & Bermúdez-Velásquez, S. Patologías benignas de la próstata: prostatitis e hiperplasia benigna. *Biomed* **18**, 47–59 (2007).
16. Canadian Cancer Society. Benign prostatic hyperplasia. Available at: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/benign-prostatic-hyperplasia/?region=on>.
17. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* (2018). doi:10.3322/caac.21492
18. Cohen, R. J. *et al.* Central Zone Carcinoma of the Prostate Gland: A Distinct Tumor Type With Poor Prognostic Features. *J. Urol.* **179**, 1762–1767 (2008).
19. Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* **24**, 1967–2000 (2010).
20. Prostate Cancer Foundation. The Gleason Score. Available at: <https://www.pcf.org/c/gleason-score/>.
21. Keyes, M. *et al.* Treatment options for localized prostate cancer. *Can. Fam. Physician* **59**, 1269–1274 (2013).
22. Sobin, L., Wittekind, C. & International Union against Cancer. in *TNM Classification of Malignant Tumours* 239 (2002). doi:10.1016/S0936-6555(98)80120-9
23. Walsh, P. C., DeWeese, T. L. & Eisenberger, M. A. Clinical practice. Localized prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2696–2705 (2007).
24. American Cancer Society. Hormone Therapy for Prostate Cancer.

25. Basu, S. & Tindall, D. J. Androgen action in prostate cancer. *Horm. {&} cancer* **1**, 223–228 (2010).
26. Prostate Cancer Foundation. Hormonal Therapy.
27. National Cancer Institute. Abiraterone Approved for Earlier Use in Men with Metastatic Prostate Cancer.
28. Fizazi, K. *et al.* Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **377**, 352–360 (2017).
29. Borley, N. & Feneley, M. R. Prostate cancer: Diagnosis and staging. *Asian Journal of Andrology* **11**, 74–80 (2009).
30. Tomlins, S. A. *et al.* Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer. *Neoplasia* **10**, 177-IN9 (2008).
31. Tomlins, S. a *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**, 644–648 (2005).
32. Wadosky, K. M., Koochekpour, S., Wadosky, K. M. & Koochekpour, S. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. *Oncotarget* **8**, 18550–18576 (2017).
33. Hu, R. *et al.* Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* **69**, 16–22 (2009).
34. Guo, Z. *et al.* A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res.* **69**, 2305–2313 (2009).
35. Haile, S. & Sadar, M. D. Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3971–81 (2011).
36. Lu, C. & Luo, J. Decoding the androgen receptor splice variants. *Transl. Androl. Urol.* **2**, 178–186 (2013).
37. Fradet, Y. *et al.* uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* **64**, 311–315 (2004).
38. Brock, M. *et al.* Detecting Prostate Cancer: A Prospective Comparison of Systematic Prostate Biopsy With Targeted Biopsy Guided by Fused MRI and Transrectal Ultrasound. *Deutsches Ärzteblatt International* **112**, 605–611 (2015).
39. American Cancer Society. Tests for Prostate Cancer.
40. Henshall, S. M. *et al.* Overexpression of the cell cycle inhibitor p16INK4A in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia predicts early relapse in prostate cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **7**, 544–50 (2001).
41. Koca, O., Çalişkan, S., Öztürk, M. I., Güneş, M. & Ihsan Karaman, M. Significance of atypical small acinar proliferation and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia in prostate biopsy. *Korean J. Urol.* **52**, 736–740 (2011).
42. Wright, J. L. *et al.* Prostate Cancer Specific Mortality and Gleason 7 Disease Differences in Prostate Cancer Outcomes Between Cases With Gleason 4 + 3 and Gleason 3 + 4 Tumors in a Population Based Cohort. *J. Urol.* **182**, 2702–2707 (2009).
43. Massagué, J. & Obenauf, A. C. Metastatic Colonization. *Nature* **529**, 298–306 (2016).
44. Kingsley, L. A., Fournier, P. G. J., Chirgwin, J. M. & Guise, T. A. Molecular biology of bone metastasis. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2609–17 (2007).
45. Li, Z. G. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mediates the prostate cancer-induced formation of new bone. *Oncogene* **27**, 596–603 (2008).
46. Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massagué, J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer* **9**, 274–284 (2009).
47. Hall, A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **28**, 5–14 (2009).

48. Li, X. *et al.* Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. *Oncol. Rep.* **32**, 2605–2611 (2014).
49. Gravidal, K., Halvorsen, O. J., Haukaas, S. A. & Akslen, L. A. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7003–7011 (2007).
50. Zhi, G. L. *et al.* Androgen receptor-negative human prostate cancer cells induce osteogenesis in mice through FGF9-mediated mechanisms. *J. Clin. Invest.* **118**, 2697–2710 (2008).
51. Fournier, P. G. J. *et al.* The TGF- β Signaling Regulator PMEPA1 Suppresses Prostate Cancer Metastases to Bone. *Cancer Cell* **27**, 809–821 (2015).
52. Shariat, S. F. *et al.* Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol.* **50 Suppl 1**, 61–75 (2011).
53. Farahani, E. *et al.* Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis* **35**, 747–759 (2014).
54. Manca, P. *et al.* Determinants of bone specific metastasis in prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **112**, 59–66 (2017).
55. Sun, Y.-X. *et al.* Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *Prostate* **67**, 61–73 (2007).
56. Loboda, A., Jozkowicz, A. & Dulak, J. HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism - Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy. *Vascular Pharmacology* **74**, 11–22 (2015).
57. Otterbein, L. E., Soares, M. P., Yamashita, K. & Bach, F. H. Heme oxygenase-1: Unleashing the protective properties of heme. *Trends in Immunology* **24**, 449–455 (2003).
58. Grochot-Przeczek, A., Dulak, J. & Jozkowicz, A. Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin. Sci.* **122**, 93–103 (2012).
59. Gozzelino, R., Jeney, V. & Soares, M. P. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 323–354 (2010).
60. Alam, J. & Cook, J. L. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 166–174 (2007).
61. Yachie, A. *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J. Clin. Invest.* **103**, 129–35 (1999).
62. Poss, K. D. & Tonegawa, S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 10919–10924 (1997).
63. Poss, K. D. & Tonegawa, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10925–30 (1997).
64. Goodman, A. I., Choudhury, M., da Silva, J. L., Schwartzman, M. L. & Abraham, N. G. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **214**, 54–61 (1997).
65. Deininger, M. H. *et al.* Heme oxygenase (HO)-1 expressing macrophages/microglial cells accumulate during oligodendroglioma progression. *Brain Res.* **882**, 1–8 (2000).
66. Doi, K. *et al.* Induction of haem oxygenase-1 by nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br. J. Cancer* **80**, 1945–1954 (1999).
67. Berberat, P. O. *et al.* Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3790–3798 (2005).
68. Liu, Z.-M. *et al.* Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to

- apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* **23**, 503–13 (2004).
69. Lee, P. J., Alam, J., Wiegand, G. W. & Choi, A. M. Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10393–8 (1996).
 70. Fang, J. *et al.* In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res.* **63**, 3567–3574 (2003).
 71. Tanaka, S. *et al.* Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br. J. Cancer* **88**, 902–909 (2003).
 72. Nowis, D. *et al.* Heme oxygenase-1 protects tumor cells against photodynamic therapy-mediated cytotoxicity. *Oncogene* **25**, 3365–3374 (2006).
 73. Busserolles, J., Megías, J., Terencio, M. C. & Alcaraz, M. J. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1510–1517 (2006).
 74. Chen, G. G. *et al.* Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor- α and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* **92**, 1246–1256 (2004).
 75. Mayerhofer, M. *et al.* Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* **64**, 3148–3154 (2004).
 76. Pourmand, G. *et al.* Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urol. J.* **4**, 95–100 (2007).
 77. Li, Y. *et al.* PTEN deletion and heme oxygenase-1 overexpression cooperate in prostate cancer progression and are associated with adverse clinical outcome. *J. Pathol.* **224**, 90–100 (2011).
 78. Marinissen, M. J. *et al.* Inhibition of heme oxygenase-1 interferes with the transforming activity of the Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **281**, 11332–11346 (2006).
 79. Skrzypek, K. *et al.* Interplay Between Heme Oxygenase-1 and miR-378 Affects Non-Small Cell Lung Carcinoma Growth, Vascularization, and Metastasis. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 644–660 (2013).
 80. Tertilt, M. *et al.* Nrf2-heme oxygenase-1 axis in mucoepidermoid carcinoma of the lung: Antitumoral effects associated with down-regulation of matrix metalloproteinases. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 147–157 (2015).
 81. Andrés, N. C. *et al.* Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: Involvement of p53. *Exp. Mol. Pathol.* **97**, 321–331 (2014).
 82. Marelli, G. *et al.* Heme-oxygenase-1 production by intestinal CX3CR1+macrophages helps to resolve inflammation and prevents carcinogenesis. *Cancer Res.* (2017). doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2501
 83. Was, H., Dulak, J. & Jozkiewicz, A. Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy. *Curr. Drug Targets* **11**, 1551–1570 (2010).
 84. Nitti, M. *et al.* HO-1 Induction in Cancer Progression: A Matter of Cell Adaptation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **6**, (2017).
 85. Gueron, G. *et al.* Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells. *Mol. cancer Res.* **7**, 1745–1755 (2009).
 86. Ferrando, M. *et al.* Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer. *Angiogenesis* **14**, 467–479 (2011).
 87. Jaworski, F. M. *et al.* In Vivo Hemin Conditioning Targets the Vascular and Immunologic Compartments and Restrains Prostate Tumor Development. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5135–5148 (2017).

88. Labanca, E. *et al.* Association of HO-1 and BRCA1 Is Critical for the Maintenance of Cellular Homeostasis in Prostate Cancer. *Mol. Cancer Res.* **13**, 1455–1464 (2015).
89. Elguero, B. *et al.* Unveiling the association of STAT3 and HO-1 in prostate cancer: role beyond heme degradation. *Neoplasia* **14**, 1043–1056 (2012).
90. Ferrando, M. *et al.* Heme oxygenase-1 (HO-1) expression in prostate cancer cells modulates the oxidative response in bone cells. *PLoS One* **8**, (2013).
91. Vanella, L. *et al.* HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. *Bone* **46**, 236–243 (2010).
92. Chae, H. J. *et al.* Carbon monoxide and nitric oxide protect against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: HO-1 is necessary to mediate the protection. *Clin. Chim. Acta.* **365**, 270–278 (2006).
93. Zwerina, J. *et al.* Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.* **19**, 2011–2013 (2005).
94. Sakai, E. *et al.* Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. *J. Cell. Biochem.* **113**, 486–498 (2012).
95. Bak, S. U. *et al.* Heme oxygenase-1 (HO-1)/carbon monoxide (CO) axis suppresses RANKL-induced osteoclastic differentiation by inhibiting redox-sensitive NF-κB activation. *BMB Rep.* **50**, 103–108 (2017).
96. Sacca, P. *et al.* Nuclear translocation of haeme oxygenase-1 is associated to prostate cancer. 1683–1689 (2007). doi:10.1038/sj.bjc.6604081
97. Alberts, B. *et al.* *Molecular biology of the cell.* (2002).
98. Alberts, B. *et al.* in *Molecular biology of the cell* (2002).
99. Howard, J. & Clark, R. Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton. *Appl. Mech. Rev.* **55**, B39 (2002).
100. Goode, B. L. & Eck, M. J. Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 593–627 (2007).
101. Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S. & Lappalainen, P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends in Cell Biology* **14**, 386–394 (2004).
102. Winder, S. J. & Ayscough, K. R. Actin-binding proteins. *J. Cell Sci.* **118**, 651–654 (2005).
103. Mattila, P. K. & Lappalainen, P. Filopodia: Molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 446–454 (2008).
104. Alblazi, K. M. O. & Siar, C. H. Cellular protrusions--lamellipodia, filopodia, invadopodia and podosomes--and their roles in progression of orofacial tumours: current understanding. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 2187–2191 (2015).
105. Buccione, R., Orth, J. D. & McNiven, M. A. Foot and mouth: Podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 647–657 (2004).
106. Linder, S. & Aepfelbacher, M. Podosomes: Adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends in Cell Biology* **13**, 376–385 (2003).
107. Yamaguchi, H. & Condeelis, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1773**, 642–652 (2007).
108. Ridley, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology* **16**, 522–529 (2006).
109. Pellegrin, S. & Mellor, H. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr. Biol.* **15**, 129–133 (2005).
110. Czuchra, A. *et al.* Cdc42 Is Not Essential for Filopodium Formation, Directed Migration, Cell Polarization, and Mitosis in Fibroblastoid Cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4473–4484

- (2005).
111. Luduena, R. F. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **302**, 41–185 (2013).
 112. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–265 (2004).
 113. Lodish, H. *et al.* in *Molecular Cell Biology*
 114. Dixit, R. The Cortical Microtubule Array: From Dynamics to Organization. *PLANT CELL ONLINE* **16**, 2546–2552 (2004).
 115. Wittmann, T. & Waterman-Storer, C. M. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* **114**, 3795–803. (2001).
 116. Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L. & Hahn, K. M. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* **440**, 1069–1072 (2006).
 117. Etienne-Manneville, S. Microtubules in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 471–499 (2013).
 118. Larsson, N., Marklund, U., Gradin, H. M., Brattsand, G. & Gullberg, M. Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5530–5539 (1997).
 119. Andersen, S. S. L. Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. in *Trends in Cell Biology* **10**, 261–267 (2000).
 120. Fife, C. M., McCarroll, J. A. & Kavallaris, M. Movers and shakers: Cell cytoskeleton in cancer metastasis. *British Journal of Pharmacology* **171**, 5507–5523 (2014).
 121. Chang, L. & Goldman, R. D. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 601–613 (2004).
 122. Lodish, H., Berk, A. & Zipursky, L. in *Molecular Cell Biology*
 123. Le Clainche, C. & Carlier, M.-F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* **88**, 489–513 (2008).
 124. Carlier, M.-F. & Pantaloni, D. Control of Actin Assembly Dynamics in Cell Motility. *J. Biol. Chem.* **282**, 23005–23009 (2007).
 125. Fouad, Y. A. & Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research* **7**, 1016–1036 (2017).
 126. Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V. & Perelmuter, V. M. Cancer invasion: Patterns and mechanisms. *Acta Naturae* **7**, 17–28 (2015).
 127. Lo, U.-G., Lee, C.-F., Lee, M.-S. & Hsieh, J.-T. The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2079 (2017).
 128. Kim, S. & Lee, J. W. Membrane Proteins Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Invasion: Studies on TMPRSS4 and TM4SF5. *Genomics Inform.* **12**, 12–20 (2014).
 129. Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. & Segall, J. E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nature Cell Biology* **14**, 777–783 (2012).
 130. Sabeh, F., Fox, D. & Weiss, S. J. Membrane-Type I Matrix Metalloproteinase-Dependent Regulation of Rheumatoid Arthritis Synoviocyte Function. *J. Immunol.* **184**, 6396–6406 (2010).
 131. Sanz-Moreno, V. *et al.* Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement. *Cell* **135**, 510–523 (2008).
 132. Friedl, P. & Gilmour, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 445–457 (2009).
 133. Shay, G., Lynch, C. C. & Fingleton, B. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol.* **44–46**, (2015).

134. McMahon, B. & Kwaan, H. C. The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* **36**, 184–194 (2008).
135. Li, Y. & Cozzi, P. J. Targeting uPA/uPAR in prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews* **33**, 521–527 (2007).
136. Gondi, C. S., Kandhukuri, N., Dinh, D. H., Gujrati, M. & Rao, J. S. Down-regulation of uPAR and uPA activates caspase- mediated apoptosis and inhibits the PI3K / AKT pathway. *Int. J. Oncol.* **31**, 19–27 (2007).
137. Prager, G. W. *et al.* Urokinase mediates endothelial cell survival via induction of the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Blood* **113**, 1383–1390 (2009).
138. Mamoune, A. *et al.* DU145 human prostate carcinoma invasiveness is modulated by urokinase receptor (uPAR) downstream of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling. *Exp. Cell Res.* **299**, 91–100 (2004).
139. Ma, Z., Webb, D. J., Jo, M. & Gonias, S. L. Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J. Cell Sci.* **114**, 3387–3396 (2001).
140. Soeda, S. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 aids nerve growth factor-induced differentiation and survival of pheochromocytoma cells by activating both the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun pathways. *Neuroscience* **141**, 101–108 (2006).
141. Steuber, T. *et al.* Free PSA isoforms and intact and cleaved forms of urokinase plasminogen activator receptor in serum improve selection of patients for prostate cancer biopsy. *Int. J. cancer* **120**, 1499–1504 (2007).
142. Shariat, S. F. *et al.* Association of the circulating levels of the urokinase system of plasminogen activation with the presence of prostate cancer and invasion, progression, and metastasis. *J. Clin. Oncol.* **25**, 349–355 (2007).
143. Tang, Z. *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* **45**, W98–W102 (2017).
144. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **57**, 289–300 (1995).
145. Sboner, A. *et al.* Molecular sampling of prostate cancer: A dilemma for predicting disease progression. *BMC Med. Genomics* **3**, (2010).
146. Ross-Adams, H. *et al.* Integration of copy number and transcriptomics provides risk stratification in prostate cancer: A discovery and validation cohort study. *EBioMedicine* **2**, 1133–1144 (2015).
147. Budczies, J. *et al.* Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* **7**, e51862 (2012).
148. Pallavicini, C. *et al.* Lateral motion and bending of microtubules studied with a new single-filament tracking routine in living cells. *Biophys. J.* **106**, 2625–2635 (2014).
149. Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J. & Howard, J. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* **120**, 923–934 (1993).
150. Lab, H. Super-resolution Microscopy. Available at: <http://huanglab.ucsf.edu/STORM.html>.
151. Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. & Jones, L. W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17**, 16–23 (1979).
152. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.

- Electrophoresis* **20**, 3551–67 (1999).
153. Rhodes, D. R. *et al.* ONCOMINE: A Cancer Microarray Database and Integrated Data-Mining Platform. *Neoplasia* **6**, 1–6 (2004).
 154. Theard, D., Raspe, M. A., Kalicharan, D., Hoekstra, D. & van IJzendoorn, S. C. D. Formation of E-Cadherin/ β -Catenin-based Adherens Junctions in Hepatocytes Requires Serine-10 in p27(Kip1). *Mol. Biol. Cell* **19**, 1605–1613 (2008).
 155. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 178–196 (2014).
 156. Tian, X. *et al.* E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, (2011).
 157. Desai, B., Ma, T. & Chellaiah, M. A. Invadopodia and matrix degradation, a new property of prostate cancer cells during migration and invasion. *J. Biol. Chem.* **283**, 13856–13866 (2008).
 158. Thalmann, G. N. *et al.* LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis. *Prostate* **44**, 91–103 Jul 1;44(2) (2000).
 159. Thalmann, G. N. *et al.* Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.* **54**, 2577–2581 (1994).
 160. Parri, M. & Chiarugi, P. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun. Signal.* **8**, 23 (2010).
 161. De Corte, V. *et al.* Gelsolin-induced epithelial cell invasion is dependent on Ras–Rac signaling. *EMBO J.* **21**, 6781–6790
 162. Sudo, H., Kodama, H. A., Amagai, Y., Yamamoto, S. & Kasai, S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* **96**, 191–198 (1983).
 163. Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P. & Nakoinz, I. Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* **15**, 261–267 (1978).
 164. Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. & Fuchs, E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209–219 (2000).
 165. Society, A. C. Cancer Facts and Figures 2018. *American Cancer Society* (2018). doi:DOI 10.1007/s00027-007-0905-2
 166. Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
 167. Stevenson, R. P., Veltman, D. & Machesky, L. M. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 1073–1079 (2012).
 168. Vasioukhin, V. Adherens junctions and cancer. *Subcell. Biochem.* **60**, 379–414 (2012).
 169. Bendas, G., Borsig, L., Bendas, G. & Borsig, L. Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins, Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *Int. J. Cell Biol. Int. J. Cell Biol.* **2012**, **2012**, e676731 (2012).
 170. Cui, Y. & Yamada, S. N-cadherin dependent collective cell invasion of prostate cancer cells is regulated by the N-terminus of alpha-catenin. *PLoS One* **8**, e55069 (2013).
 171. Bogenrieder, T. & Herlyn, M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**, 6524–6536 (2003).
 172. Greaves, S. Zipping up adhesion. *Nat. Cell Biol.* **2**, (2000).
 173. Shapiro, L. & Weis, W. I. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, (2009).
 174. Perez-Moreno, M. & Fuchs, E. Catenins: Keeping Cells from Getting Their Signals Crossed. *Developmental Cell* **11**, 601–612 (2006).
 175. Cowin, P., Rowlands, T. M. & Hatsell, S. J. Cadherins and catenins in breast cancer.

- Current Opinion in Cell Biology* **17**, 499–508 (2005).
176. Junghans, D., Haas, I. G. & Kemler, R. Mammalian cadherins and protocadherins: About cell death, synapses and processing. *Current Opinion in Cell Biology* **17**, 446–452 (2005).
 177. Yap, A. S. The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: A thematic review. *Cancer Investigation* **16**, 252–261 (1998).
 178. Chao, Y. L., Shepard, C. R. & Wells, A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol. Cancer* **9**, (2010).
 179. Sawada, K. *et al.* Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via $\alpha 5$ -integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res.* **68**, 2329–2339 (2008).
 180. von Burstin, J. *et al.* E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* **137**, 361–71, 371.e1–5 (2009).
 181. Tang, B., Peng, Z. H., Yu, P. W., Yu, G. & Qian, F. Expression and significance of Cx43 and E-cadherin in gastric cancer and metastatic lymph nodes. *Med Oncol* **28**, 502–508 (2011).
 182. Rubin, M. a *et al.* E-cadherin expression in prostate cancer: a broad survey using high-density tissue microarray technology. *Hum. Pathol.* **32**, 690–7 (2001).
 183. Tomita, K. *et al.* Cadherin Switching in Human Prostate Cancer Progression Cadherin Switching in Human Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* **60**, 3650–3654 (2000).
 184. Mao, Q. *et al.* Suppression of migration and invasion of PC3 prostate cancer cell line via activating E-cadherin expression by small activating RNA. *Cancer Invest.* **28**, 1013–1018 (2010).
 185. Fan, L. *et al.* Loss of E-cadherin promotes prostate cancer metastasis via upregulation of metastasis-associated gene 1 expression. *Oncol. Lett.* **4**, 1225–1233 (2012).
 186. Pontes, J. *et al.* E-cadherin and beta-catenin loss of expression related to bone metastasis in prostate cancer. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **18**, 179–184 (2010).
 187. Morgan, C., Jenkins, S. A., Kynaston, H. G. & Doak, S. H. The role of adhesion molecules as biomarkers for the aggressive prostate cancer phenotype. *PLoS One* **8**, e81666 (2013).
 188. Bienz, M. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr. Biol.* **15**, R64--7 (2005).
 189. Hülsken, J., Birchmeier, W. & Behrens, J. E-cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **127**, 2061–2069 (1994).
 190. Bowser, J. L. *et al.* Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression. *J. Clin. Invest.* **126**, 220–238 (2016).
 191. Swaminathan, V. *et al.* Mechanical Stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Res.* **71**, 5075–5080 (2011).
 192. Hermenean, A. in (ed. Jimenez-Lopez, A. A. E.-J. C.) Ch. 16 (IntechOpen, 2017). doi:10.5772/66911
 193. Fayard, B. *et al.* The serine protease inhibitor protease nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. *Cancer Res.* **69**, 5690–5698 (2009).
 194. Worthylake, R. A. & Burridge, K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J. Biol. Chem.* **278**, 13578–13584 (2003).
 195. He, X., Gao, Q., Qiang, Y., Guo, W. & Ma, Y. Cucurbitacin E induces apoptosis of human prostate cancer cells via cofilin-1 and mTORC1. *Oncol. Lett.* **13**, 4905–4910 (2017).
 196. An, L. *et al.* Protective effects of hemin in an experimental model of ventilator-induced

- lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* **661**, 102–108 (2011).
197. Chen, C. *et al.* TLR4 signaling-induced heme oxygenase upregulation in the acute lung injury: Role in hemorrhagic shock and two-hit induced lung inflammation. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 1167–1172 (2013).
 198. Jozkowicz, A., Was, H. & Dulak, J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2099–2117 (2007).
 199. Lin, C.-W., Shen, S.-C., Hou, W.-C., Yang, L.-Y. & Chen, Y.-C. Heme oxygenase-1 inhibits breast cancer invasion via suppressing the expression of matrix metalloproteinase-9. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1195–1206 (2008).
 200. Wegiel, B. *et al.* Carbon monoxide expedites metabolic exhaustion to inhibit tumor growth. *Cancer Res.* **73**, 7009–7021 (2013).
 201. Goitre, L., Pergolizzi, B., Ferro, E., Trabalzini, L. & Retta, S. F. Molecular Crosstalk between Integrins and Cadherins: Do Reactive Oxygen Species Set the Talk? *J. Signal Transduct.* **2012**, 807682 (2012).
 202. Kapitulnik, J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol. Pharmacol.* **66**, 773–779 (2004).
 203. Oberle, S. *et al.* Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythrityl trinitrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1539–1544 (2002).
 204. Vanella, L., Sanford, C. J., Kim, D. H., Abraham, N. G. & Ebraheim, N. Oxidative stress and heme oxygenase-1 regulated human mesenchymal stem cells differentiation. *Int. J. Hypertens.* **2012**, 890671 (2012).
 205. Chua, H. L. *et al.* NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* **26**, 711–724 (2007).
 206. Pires, B. R. B. *et al.* NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS One* **12**, e0169622 (2017).
 207. Chen, Z. *et al.* COX-2 regulates E-cadherin expression through the NF-kappaB/Snail signaling pathway in gastric cancer. *Int. J. Mol. Med.* **32**, 93–100 (2013).
 208. Ma, B. & Hottiger, M. O. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF- κ B Signaling Pathway during Inflammation. *Front. Immunol.* **7**, 378 (2016).
 209. Baum, B. & Georgiou, M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *Journal of Cell Biology* **192**, 907–917 (2011).
 210. Basson, M. A. Signaling in cell differentiation and morphogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
 211. Herszterg, S., Leibfried, A., Bosveld, F., Martin, C. & Bellaiche, Y. Interplay between the Dividing Cell and Its Neighbors Regulates Adherens Junction Formation during Cytokinesis in Epithelial Tissue. *Dev. Cell* **24**, 256–270 (2013).
 212. Zou, C. *et al.* Heme oxygenase-1: a molecular brake on hepatocellular carcinoma cell migration. *Carcinogenesis* **32**, 1840–1848 (2011).
 213. Daves, M. H., Hilsenbeck, S. G., Lau, C. C. & Man, T. K. Meta-analysis of multiple microarray datasets reveals a common gene signature of metastasis in solid tumors. *BMC Med. Genomics* **4**, (2011).
 214. Grasso, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239–243 (2012).
 215. Griffith, E., Coutts, A. S. & Black, D. M. RNAi knockdown of the focal adhesion protein TES reveals its role in actin stress fibre organisation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 140–152 (2005).
 216. Gunduz, E. *et al.* Downregulation of TESTIN and its association with cancer history and a tendency toward poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch.*

- Otolaryngol. - Head Neck Surg.* **135**, 254–260 (2009).
217. Valiyaveettil, M. *et al.* Novel role of the muskelin-RanBP9 complex as a nucleocytoplasmic mediator of cell morphology regulation. *J. Cell Biol.* **182**, 727–739 (2008).
 218. Gueron, G. *et al.* Heme-oxygenase-1 implications in cell morphology and the adhesive behavior of prostate cancer cells. *Oncotarget* **5**, 4087–102 (2014).
 219. Mohamedali, K. A. *et al.* Inhibition of prostate cancer osteoblastic progression with VEGF 121/rGEL, a single agent targeting osteoblasts, osteoclasts, and tumor neovasculature. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2328–2338 (2011).
 220. LIM, S. Bin, TAN, S. J., LIM, W.-T. & LIM, C. T. An extracellular matrix-related prognostic and predictive indicator for early-stage non-small cell lung cancer. *Nat. Commun.* **8**, 1734 (2017).
 221. Bazzi, Z. A. *et al.* Activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa) attenuates breast cancer cell metastatic behaviors through inhibition of plasminogen activation and extracellular proteolysis. *BMC Cancer* **16**, (2016).
 222. Bene, M. C. *et al.* CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review. *Leukemia* **18**, 394–400 (2004).
 223. Moirangthem, A. *et al.* Simultaneous knockdown of uPA and MMP9 can reduce breast cancer progression by increasing cell-cell adhesion and modulating EMT genes. *Sci. Rep.* **6**, 21903 (2016).
 224. Huang, H.-Y. *et al.* Inhibition of human breast cancer cell invasion by siRNA against urokinase-type plasminogen activator. *Cancer Invest.* **28**, 689–697 (2010).
 225. Smith, H. W., Marra, P. & Marshall, C. J. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *J. Cell Biol.* **182**, 777–790 (2008).
 226. Kjølner, L. & Hall, A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J. Cell Biol.* **152**, 1145–1157 (2001).
 227. Vial, E., Sahai, E. & Marshall, C. J. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* **4**, 67–79 (2003).
 228. Aguirre Ghiso, J. A. Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene* **21**, 2513–2524 (2002).
 229. Zhang, F. *et al.* Distinct ligand binding sites in integrin $\alpha 3\beta 1$ regulate matrix adhesion and cell-cell contact. *J. Cell Biol.* **163**, 177–188 (2003).
 230. Wei, Y. *et al.* Urokinase receptors are required for alpha 5 beta 1 integrin-mediated signaling in tumor cells. *J Biol Chem* **282**, 3929–3939 (2007).
 231. Sakamoto, Y. *et al.* Interaction of integrin $\alpha v\beta 3$ with nectin: Implication in cross-talk between cell-matrix and cell-cell junctions. *J. Biol. Chem.* **281**, 19631–19644 (2006).
 232. de Toledo, M., Anguille, C., Roger, L., Roux, P. & Gadea, G. Cooperative Anti-Invasive Effect of Cdc42/Rac1 Activation and ROCK Inhibition in SW620 Colorectal Cancer Cells with Elevated Blebbing Activity. *PLoS One* **7**, e48344 (2012).
 233. Gadea, G., Sanz-Moreno, V., Self, A., Godi, A. & Marshall, C. J. DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr. Biol.* **18**, 1456–1465 (2008).

Anexo I

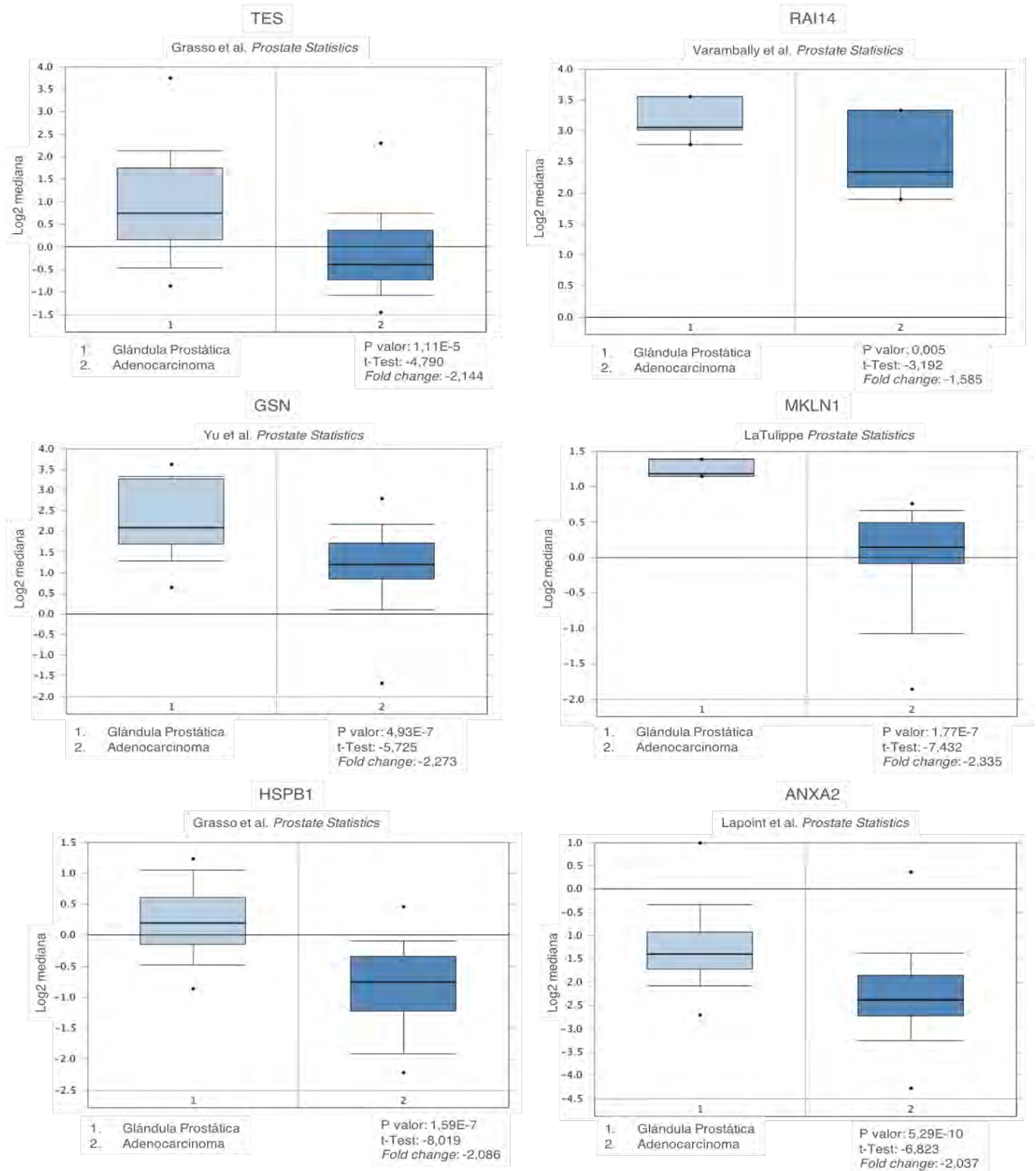
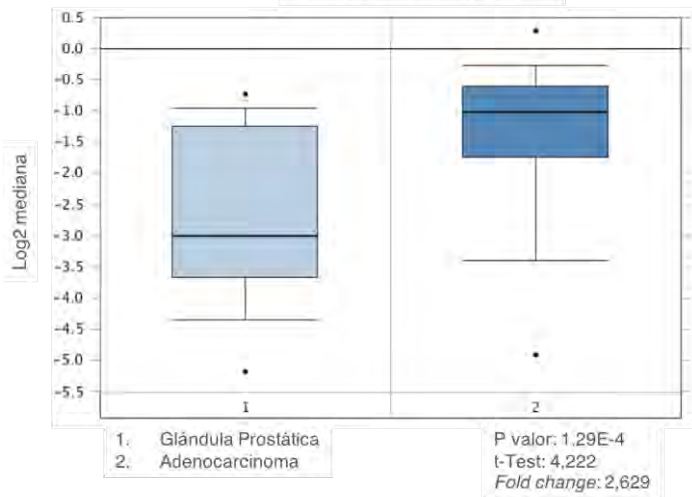


Figura A1. Gráficos representativos de la expresión de cada gen asociado al citoesqueleto donde la expresión se vio significativamente disminuida en Pca vs. próstata normal. Se muestran los gráficos del trabajo más representativo de todos los analizados con la plataforma *Oncomine*.

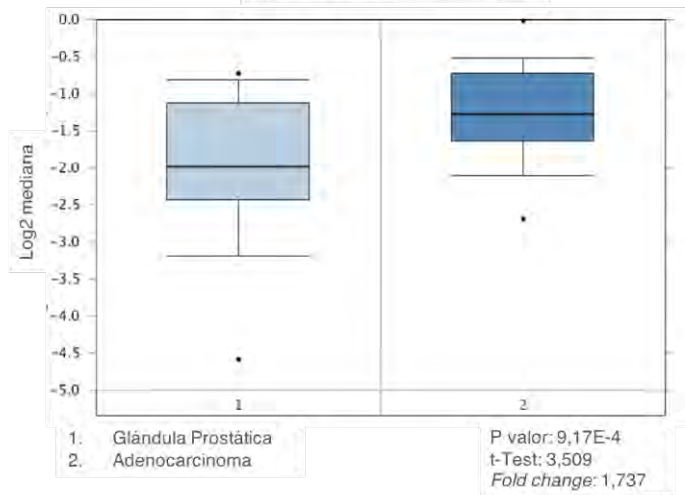
THRAP3

Wallace et al. *Prostate Statistics*



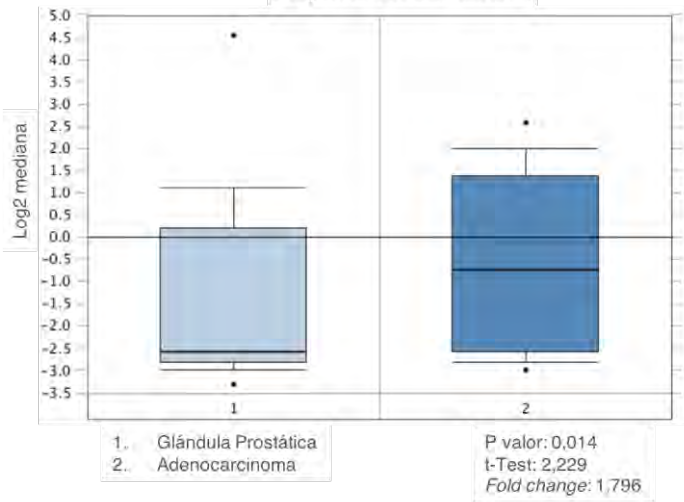
TMOD3

Wallace et al. *Prostate Statistics*



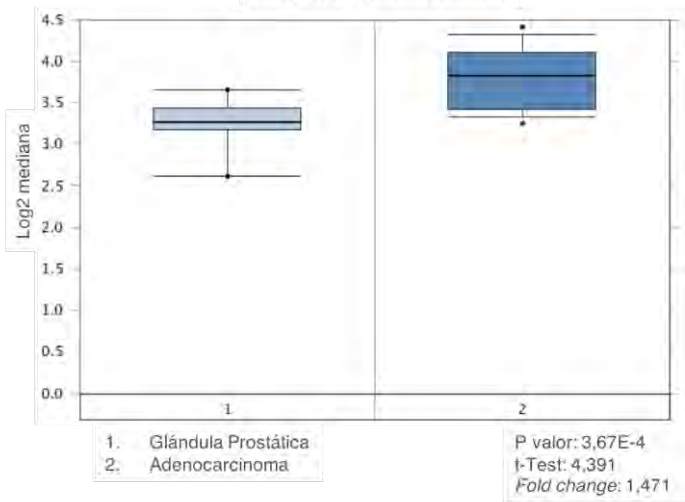
HMG1

Singh et al. *Prostate Statistics*



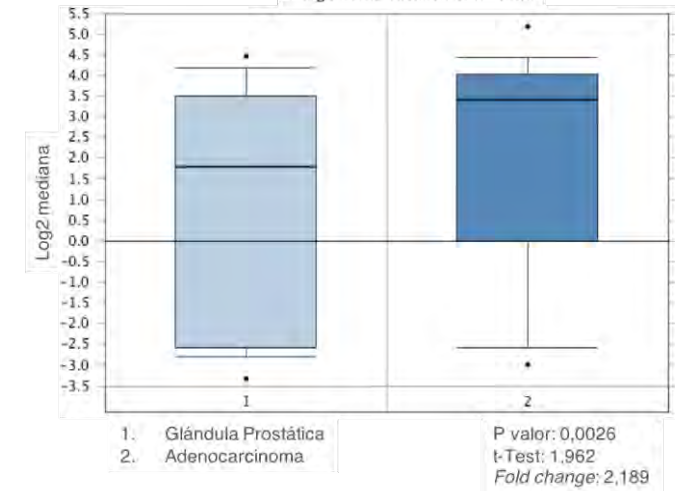
NAP1L1

Vanaja et al. *Prostate Statistics*



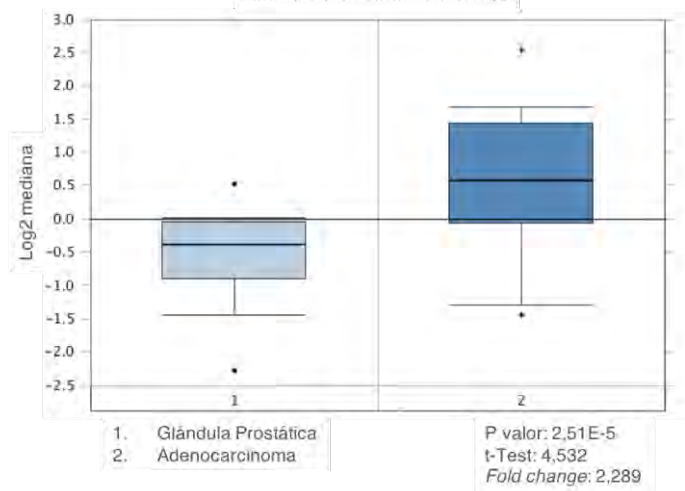
TRIM28

Singh et al. *Prostate Statistics*



AHCTF1

Tomlins et al. *Prostate Statistics*



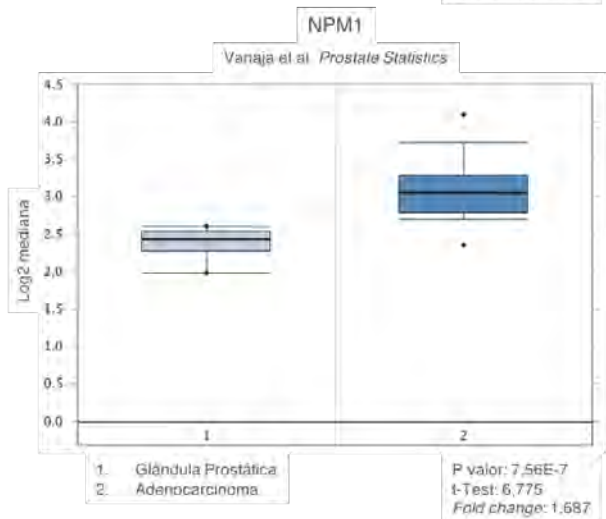
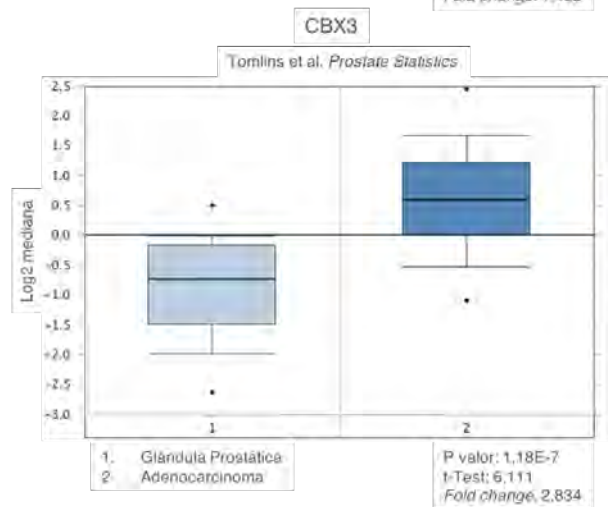
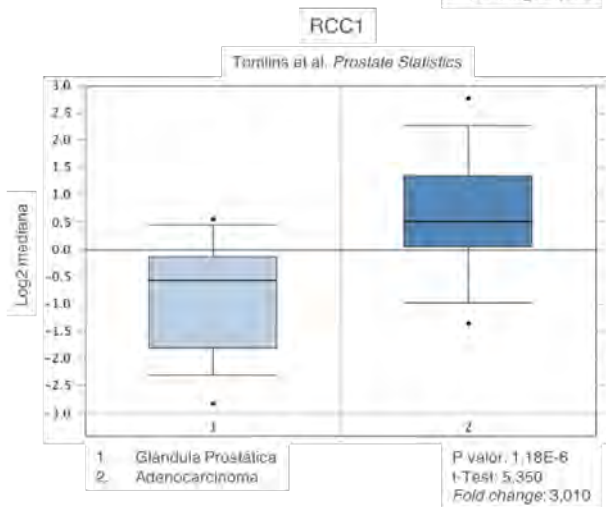
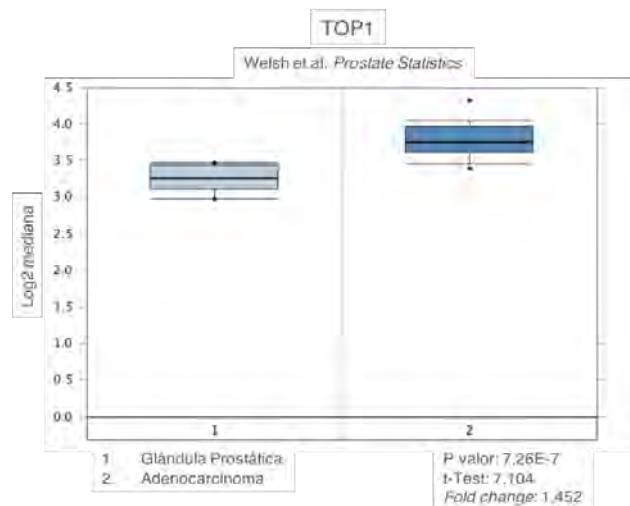
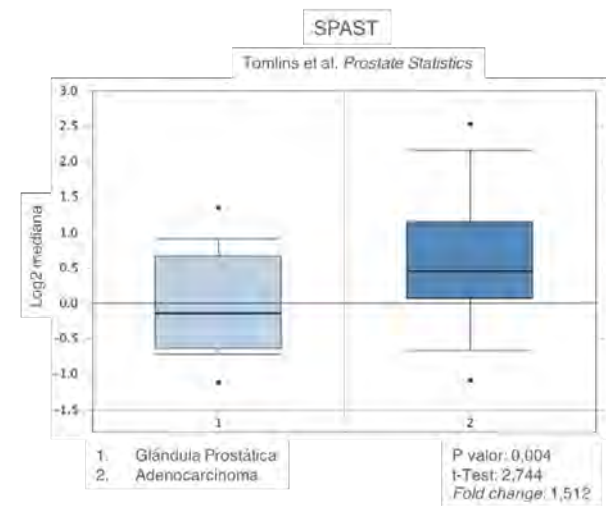
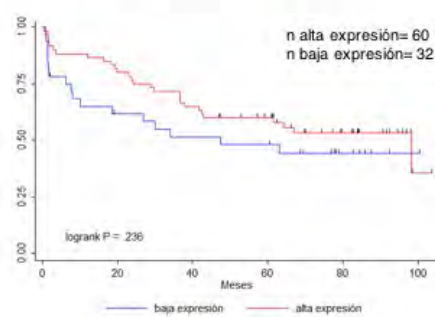
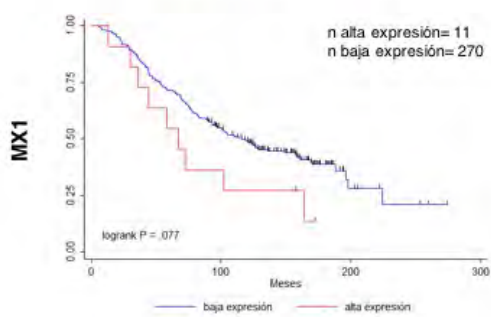
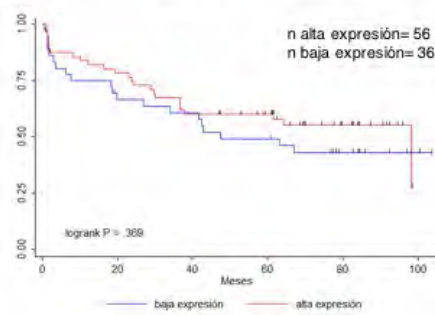
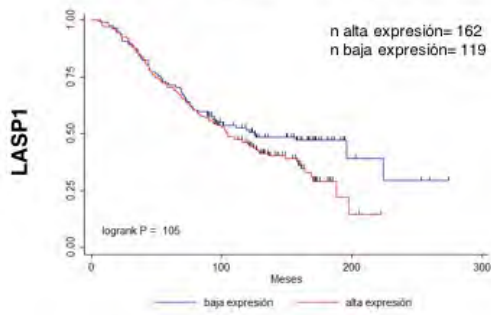
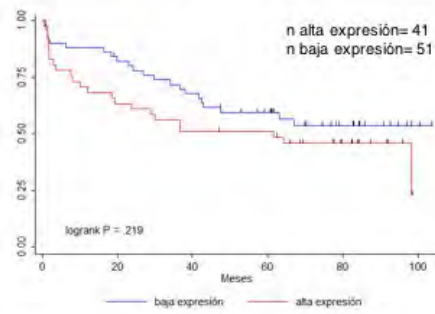
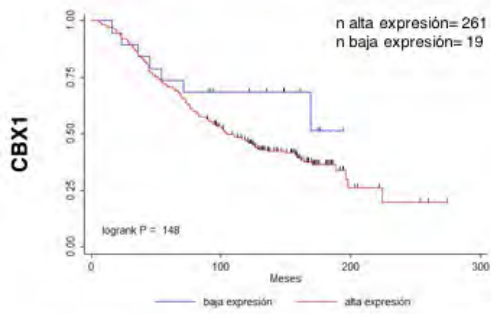


Figura A2. Gráficos representativos de la expresión de cada gen asociado al citoesqueleto donde la expresión se vio significativamente aumentada en PCa vs. próstata normal. Se muestran los gráficos del trabajo más representativo de todos los analizados con la plataforma *OncoPrint*.

Anexo II

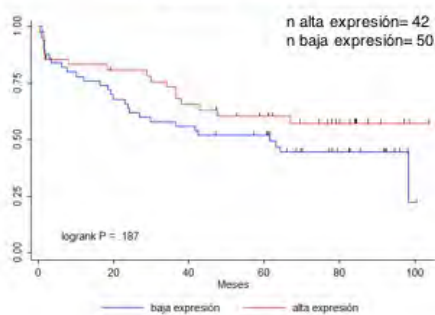
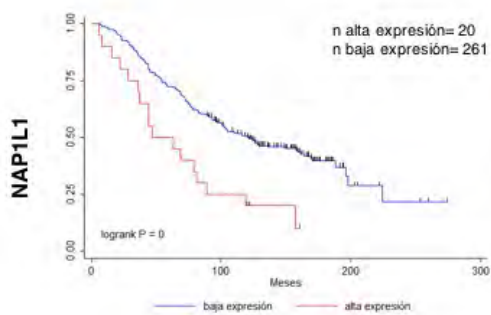
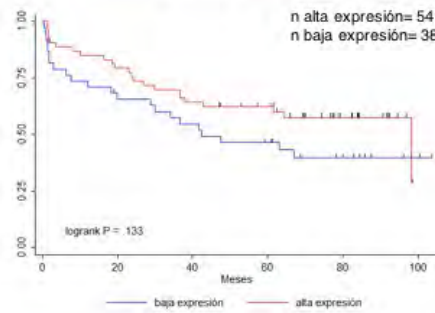
Sobrevida (Sboner)

Recaida (Ross-Adams)



EEF1A1

N/D

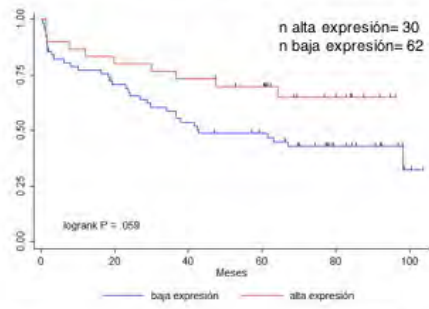


Sobrevida (Sbner)

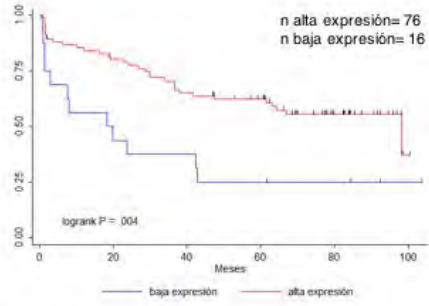
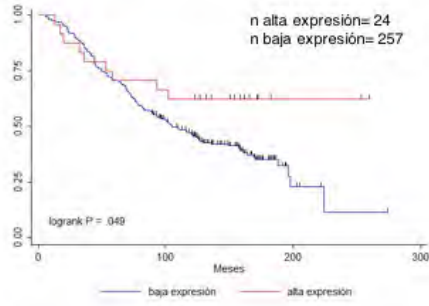
Recaída (Ross-Adams)

MKLN1

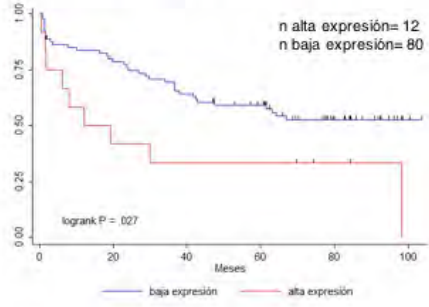
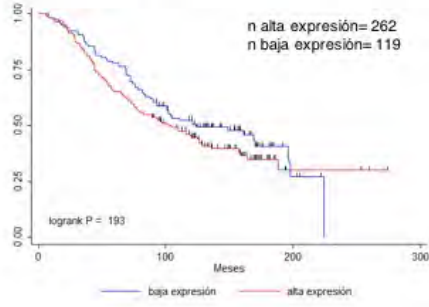
N/D



HSPB1

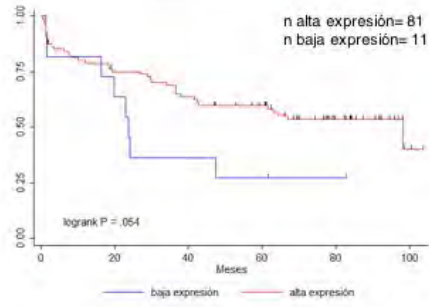


ANXA2

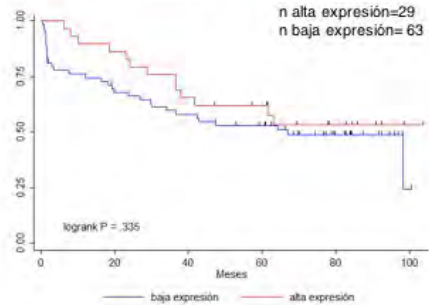
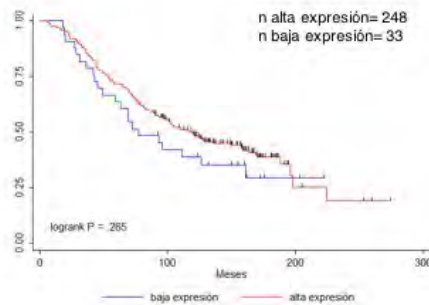


TMOD3

N/D



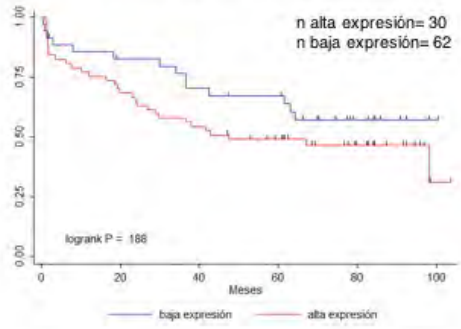
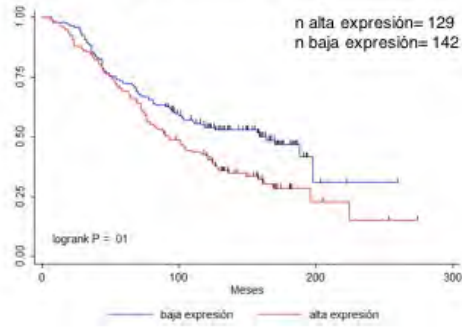
HMG1



Sobrevida (Sboner)

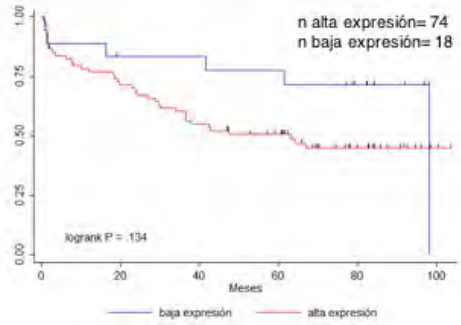
Recáida (Ross-Adams)

TRIM28



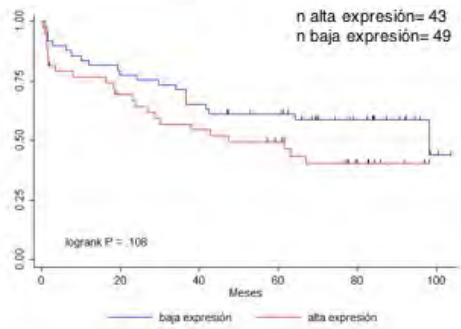
AHCTF1

N/D



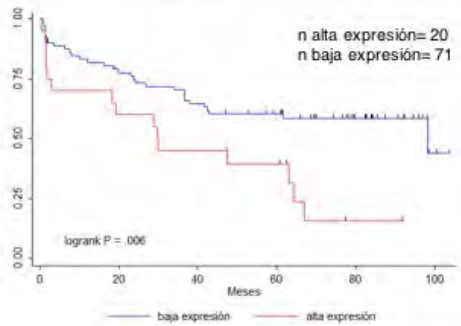
SPAST

N/D



TOP1

N/D



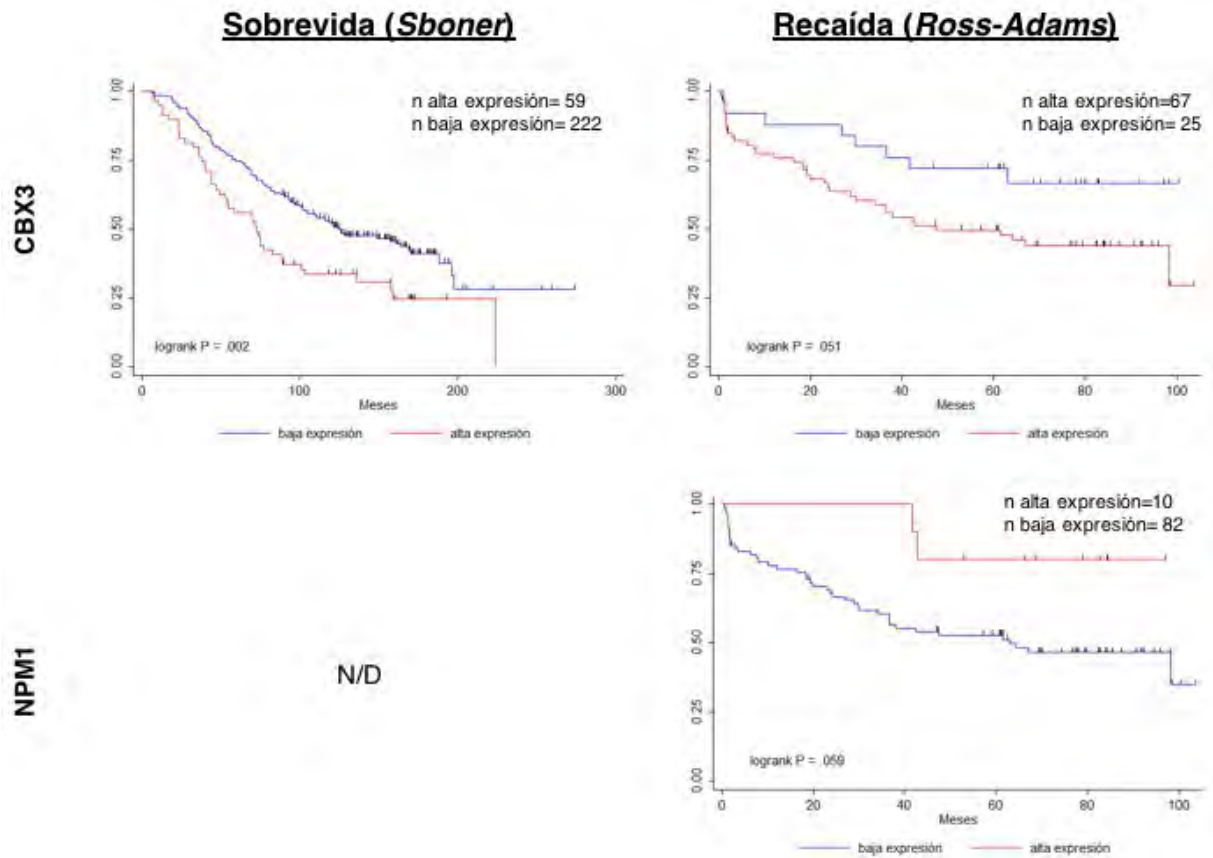


Figura A3. Curvas de supervivencia y tiempo de recaída para pacientes con alta o baja expresión de cada uno de los genes mencionados, utilizando las bases de datos Sboner y colaboradores y Ross-Adams, respectivamente. Las curvas rojas corresponden a los pacientes con alta expresión y las curvas azules a los pacientes con baja expresión del gen mencionado. Cada línea negra sobre las curvas representa un paciente que muere o recae, en el momento indicado. El valor del *logrank* p está indicado para cada gráfico. (N/D: información no disponible para dicho el gen el la correspondiente base de datos)

Anexo III

Tabla A1. Trabajos seleccionados en la plataforma *cBioportal* para el análisis de alteraciones génicas junto con el porcentaje de casos alterados y el número de muestras analizadas en cada trabajo.

Abreviatura del estudio	Nombre del estudio	% casos alterados	N° muestras
NEPC (Trento/Cornell/Broad 2016)	Neuroendocrine Prostate Cancer (Trento/Cornell/Broad 2016)	52.3%	114
Prostate (FHCRC)	Prostate Adenocarcinoma (Nelson Lab, Fred Hutchinson CRC)	40.9%	176
Prostate (MICH)	Prostate Adenocarcinoma, Metastatic (Michigan, Nature 2012)	36.1%	61
Prostate (TCGA 2015)	Prostate Adenocarcinoma (TCGA, Cell 2015)	34.5%	333
Prostate (SU2C)	Metastatic Prostate Cancer, SU2C/PCF Dream Team (Robinson et al., Cell 2015)	22.7%	150
Prostate (MSKCC 2010)	Prostate Adenocarcinoma (MSKCC, Cancer Cell 2010)	9.7%	216
Prostate (Broad/Cornell 2012)	Prostate Adenocarcinoma (Broad/Cornell, Nat Genet 2012)	3.7%	112
Prostate (MSKCC 2014)	Prostate Adenocarcinoma CNA study (MSKCC, PNAS 2014)	1%	104

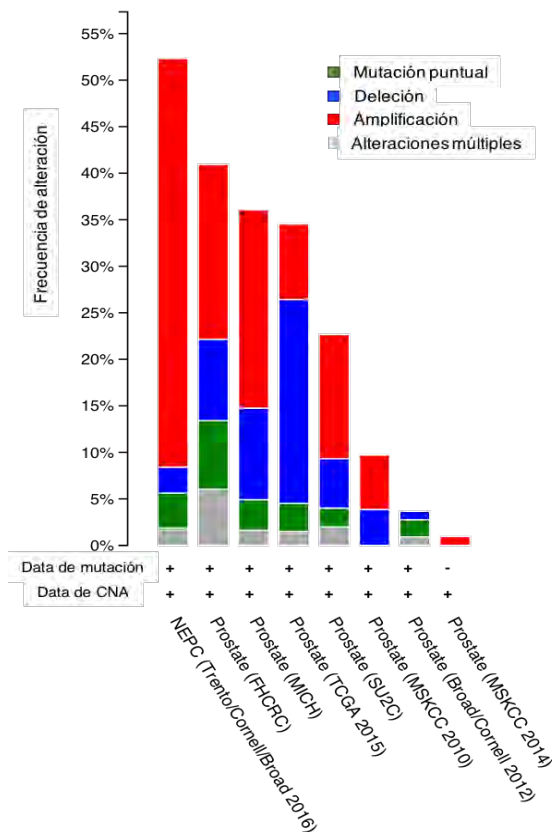


Figura A4. Porcentaje de casos alterados (eje y) y el tipo de alteraciones observadas ya sea por mutaciones o alteración en el número de copias (CNA) para cada estudio (eje x). Las mutaciones puntuales se muestran en verde, las deleciones en azul, las amplificaciones en rojo y las alteraciones múltiples en gris para los 8 sets de datos seleccionados comparando la próstata normal vs. tejido tumoral en un total de 1266 muestras analizadas